



## Compte rendu du Keystone Symposia “Molecular Regulation of Stem Cells”

10-15 février 2005, Banff, Canada

Compte rendu rédigé par Annick Martin, PhD  
AFM - Direction de la recherche et du développement des  
Thérapeutiques

Les cellules souches continuent à susciter un énorme intérêt au niveau de la recherche fondamentale ainsi que de ses éventuelles applications thérapeutiques. Si les premières recherches concernaient les processus d'identification de nouvelles populations de cellules souches, actuellement les efforts portent sur l'identification de méthodes permettant de manipuler leur capacité d'autorenouvellement et de différenciation ainsi qu'à l'établissement d'un catalogue donnant le profil d'expression des gènes des cellules souches.

Lors de ce symposium, des biologistes spécialistes des cellules souches, plus particulièrement dans le domaine embryonnaire, neuronal et hématopoïétique ont présenté leurs dernières recherches sur les mécanismes moléculaires des cellules souches.

### PRÉSENTATIONS ORALES

#### 003 Genetic regulation of hematopoietic stem cells (HSC) Margaret Goodell

Les cellules souches hématopoïétiques ont la capacité de renouvellement sans limitation, ces cellules sont quiescentes in vivo et présentent des limitations au niveau de l'expansion ex vivo.

Les mécanismes moléculaires, qui maintiennent de leur potentiel ou régulent leur propre renouvellement, sont peu connus.

L'étude a porté sur la comparaison de l'expression de gènes entre les cellules souches hématopoïétiques quiescentes adultes et des cellules souches hématopoïétiques fœtales en utilisant le système Affymetrix. Ceci a permis l'identification de classes de gènes impliqués et de proposer un modèle du cycle d'activation des cellules HSC.

Le signal de prolifération induit une étape « préparatoire », suivi par une phase de prolifération précoce, puis tardive. La ré-induction de la quiescence implique des molécules d'adhésion avant le ré-établissement de l'homéostasie.

L'analyse des HSC chez les souris âgées a montré que ces cellules présentaient moins d'activation des HSC, par contre leur nombre était plus élevé et que leur faculté de différenciation était affectée. Il est observé que les cellules souches ont une activité réduite dans le temps.

Certains gènes sont up-régulés dans les cellules âgées comme la p-selectine (impliquée dans l'interaction cellule/cellule), la clusterine (glycoprotéine présente dans le sang), la nucléoline (protéine nucléolaire majeure des cellules eucaryotes en prolifération) et cox-2 (qui pourrait avoir un rôle majeur médiateur de l'inflammation).

Parmi les gènes down régulés dans les cellules âgées, il y a la lamine A (les lamines sont des composants de la lamina nucléaire et pourraient interagir avec la chromatine) et le CD86 (CD86 est exprimé par les monocytes activés humains, c'est une molécule co-stimulatrice pour les lymphocytes T).

En conclusion, les cellules HSC augmentent en nombre avec l'âge, elles sont moins fonctionnelles. Beaucoup de ces changements sont associés à l'âge, au processus inflammatoire et aux interactions avec la chromatine.

## 016 The regulation of stem Cell self renewal

### S. Morisson

Les cellules souches persistent **le long de** la vie dans le système hématopoïétique, CNS, PNS.

#### **La question qui se pose est : y a t-il un mécanisme commun ?**

Bmp1 (Bone Morphogenetic Protein) est un répresseur de la transcription qui a été décrit comme impliqué dans le renouvellement des cellules souches dans le système hématopoïétique. Chez les Bmp1<sup>-/-</sup>, le nombre de cellules souches est normal pendant le développement fœtal : les cellules peuvent se différencier normalement mais montrent une défaillance au niveau de leur autorenouvellement qui est réduit à l'état postnatal.

Les auteurs ont étudié la voie de transduction downstream de Bmp1 dans laquelle bmp1 favorise la maintenance des cellules souches adultes par la répression de p16ink4a (inhibiteur cycline dépendent kinase). Bmp1 agit au niveau de la prolifération des fibroblastes en réprimant le locus ink4a/arf.

La délétion de p16ink4a chez la souris bmp1<sup>-/-</sup> induit une récupération partielle dans la fréquence de renouvellement des cellules souches neurales chez la souris adulte.

Ink4/arf code 2 protéines p16ink4a et p19arf qui inhibent la prolifération cellulaire.

En conclusion, les auteurs ont montré que :

- bmp1 favorise partiellement l'autorenouvellement des cellules souches en réprimant ink4a (in vitro)

- en absence d'une répression de ink4a il existe une sénescence précoce des cellules souches
- la délétion de p19arf dans bmp1-/- conduit à une récupération partielle de l'autorenouvellement des cellules souches et du développement neuronal des souris.

L'autorenouvellement diminue avec l'âge (de 2 fois pour le système nerveux central, de 10 fois pour le système nerveux périphérique).

Des mécanismes autres sont sûrement impliqués, sachant que bmp1 agit aussi sur p53.

## **029 Mechanisms underlying unexpected potency of adult stem cells**

### **CM Verfaillie**

Les auteurs ont identifié chez l'homme, le rongeur, et le porc une population de cellules primaires de tissus postnataux qui ont, au niveau cellulaire, un potentiel de différenciation multipotente et de prolifération extensive. Ces cellules sont appelées MAPC « Multipotent Adult Progenitor Cell ».

Les MAPC peuvent se différencier in vitro en endothélium, hépatocytes, astrocytes et neurones. Les MAPC ne sont pas sénescents.

Concernant la stabilité cytogénétique, les MAPC sont stables chez le large animal mais pas chez la souris ou le rat où il existe une perte de chromosome.

Les cellules MAPC ont un phénotype différent suivant les conditions de culture utilisées (5% ou 20% en O<sub>2</sub>, densité cellulaire). Les MAPC en culture à 5% O<sub>2</sub> à haute densité prolifèrent plus vite mais après une culture à haute densité de plusieurs jours, elles perdent Oct4. Toutes les MAPC isolées à 5% n'expriment pas un haut niveau d'Oct4. Les MAPC isolées à 20% O<sub>2</sub> n'expriment pas Oct4 quand elles sont cultivées à 5%.

### ***Quel est le rôle d'Oct4? Est-ce que des niveaux élevés d'Oct4 pourraient avoir une implication fonctionnelle ?***

Différenciation des cellules ayant un taux faible en oct4 (mésoderme, ectoderme,...).

Néanmoins, un taux élevé d'Oct4 semble être associé à une augmentation du potentiel de différenciation.

D'autres laboratoires ont maintenant isolé des cellules ayant des propriétés similaires à celles décrites par le groupe de Verfaillie.

## **036 Factor maintaining pluripotency**

### **S. Yamanaka**

Les cellules souches embryonnaires (ES), qui sont dérivées des blastocystes de mammifères, poussent vite et indéfiniment et gardent leur pluripotentialité et leur faculté à se différencier dans tous les types cellulaires.

Afin d'éviter les problèmes éthiques liés à l'utilisation des cellules ES humaines pour des applications cliniques, l'idée est de générer des cellules pluripotentes à partir de cellules somatiques ou d'autres cellules. Pour

cela, il faut identifier les facteurs de reprogrammation qui pourraient changer les cellules somatiques en cellules à l'état embryonnaire.

La caractérisation de ces gènes appelés ECAT « ES Cell Associated Transcript », comme ECAT4 qui codent la protéine de l'homéobox de Nanog est essentiel pour la pluripotence. ECAT5 codent une nouvelle protéine de la famille Ras (ERas) qui joue un rôle dans l'établissement et le maintien des cellules ES murines. Nanog, Sox2, oct4 sont essentiels pour la pluripotence. Plus précisément, Nanog est exprimé dans les cellules pluripotentes mais n'est pas exprimé dans les cellules germinales. Oct2, Sox 2 sont exprimés dans les cellules totipotentes et pluripotentes et enfin Oct 4 et Sox 2 régulent directement Nanog.

### ***Pourquoi les cellules somatiques n'expriment-elles pas Nanog ?***

La méthylation CpG pourraient expliquer que Sox2 et Oct4 ne régulent pas Nanog dans les fibroblastes contrairement aux cellules ES.

L'acétylation des histones ou /et une CpG méthylation pourraient aussi jouer.

### ***Pourquoi les cellules germinales n'expriment-elles pas Nanog ?***

La raison pourrait être une hyper CpG méthylation et cela pourrait être également dû à un mécanisme p53 indépendant (p53 supprime l'expression de Nanog).

## **Regulation of stem cell proliferation in the adult brain**

### **Jonas Frisen**

La famille des Eph récepteurs (récepteur protéine kinase) et de leur ligand Ephrin (ligand lié à la membrane ephrin A1 à A5 et B1-B2). EphrinA2 et EphA7 sont exprimés dans les cultures cellulaires, et régulent négativement la prolifération du renouvellement des cellules.

EphrinA2 régule négativement le nombre dans le bulbe olfactif.

EphB signaling induit la prolifération des cellules progénitrices, contrôle la distribution des cellules progénitrices dans l'intestin grêle, le colon et joue un rôle dans l'entrée à nouveau dans le cycle cellulaire.

Un des mécanismes qui contrôle le nombre de cellules dans le cerveau se fait via EphA7. EphA7 induit un effet reverse sur ephrin-A2 qui régule négativement la prolifération cellulaire des cellules progénitrices neuronales. Chez les souris ephrin A2 mutantes, les cellules de la niche des cellules souches neuronales du cerveau adulte prolifèrent plus et ont un cycle cellulaire plus court. Cette augmentation de la prolifération des cellules progénitrices est accompagnée par un nombre élevé de cellules dans le bulbe olfactif. L'interruption de l'interaction entre ephrin A2 et EphA7 dans le cerveau adulte normal désinhibe la prolifération et augmente la neurogenèse. L'identification de EphA7 et EphrinA2 comme des régulateurs négatifs de la prolifération des cellules progénitrices montre un nouveau mécanisme dans le contrôle du nombre de cellules dans le cerveau.

## **3035 Functional recovery from a Parkinson –like state in the newt C.Parish, A. Simon**

Le triton a la faculté de pouvoir régénérer ces membres. Ils ont créé un modèle de parkinson en utilisant le 6OHDA (hydroxydopamine) pour induire la mort des neurones dopaminergiques soit 90% des cellules sont détruites dans le modèle.

Un mois après la liaison, il y a 80-90% de récupération que ce soit au niveau des cellules tyrosine hydroxylases positives mais aussi au niveau du comportement.

Cette récupération est due à la neurogenèse adulte. Le type cellulaire est en cours.

## POSTERS

## **3019 : Bone marrow- derived myofibers induce skeletal muscle regeneration in vivo**

N. Salah G. millet, I. André-Schmutz, B. Desforages, R. Olaso, N. Roblot, S. Courageot, G. Bensimon, M. Cavazzana-Calvo, J. Melki

Le modèle utilise est SMA décrit par J. Melki (délétion de l'exon 7 de smn1). Les souris sont irradiées, avec de faibles doses d'irradiation.

Les souris âgées de 2 mois sont transplantées (en intraveineuse dans l'œil de la souris) avec de la moelle osseuse non fractionnée de donneur sauvage exprimant GFP.

La transplantation de MO entraîne une amélioration de certains phénotypes des souris mutantes irradiées comme le gain du nombre total de fibre musculaire (+31%), une activation de la régénération du muscle squelettique (+56%) et une augmentation de la capacité motrice (+85%). L'atténuation remarquable du phénotype mutant est en contraste avec le faible recrutement des cellules dérivées de la MO dans les myofibres (2%).

Ces résultats suggèrent que les myofibres fusionnées ou différenciées des souris sauvages et non pas des mutants délivrent un facteur autocrine qui active la régénération des muscles squelettiques in vivo donnant des bénéfices thérapeutiques.

## **3055 Human circulating AC133+ stem cells restore dystrophin expression and ameliorate function in dystrophic skeletal muscle Y. Torrente**

Les cellules AC133+ sont des cellules souches hématopoïétiques qui expriment des marqueurs myogéniques précoces. Les cellules souches humaines AC133+ sont mises en co-culture avec des myoblastes de souris ou des cellules exprimant Wnt, les cellules sont ensuite injectées dans les tissus squelettiques des souris scid/mdx.

Dans ces conditions les cellules humaines AC133+ forment des myotubes dans les cultures mixtes, participent dans la régénération des muscles et

aussi reconstituent le compartiment de cellules satellites des muscles dystrophiques injectés. Les cellules AC133+ entraînent une amélioration significative de la structure des muscles squelettiques et de leur fonction quand elles sont délivrées dans les souris scid/mdx.

Les auteurs spéculent que l'injection des cellules souches AC133+ circulantes pourraient représenter un traitement pour les myopathies.

## **1009 Characterisation of bone marrow stem cell in normal and dystrophic muscle**

**Aurélie Avril-Delplanque, Dreyfus**

Les cellules dérivées de la moelle osseuse (MO) adulte ont été montrées comme contribuant à la régénération musculaire.

Les cellules ont été transplantées chez les souris normales et les souris mdx. Les auteurs utilisent la cytofluorométrie de flux pour suivre les cellules. Il y a 95% de chimérisme dans le sang périphérique et 30 % dans le muscle. Six mois après transplantation de cellules dérivées de MO adulte GFP+, ils observent 95% de chimérisme dans le sang périphérique et 30% dans le muscle. Une majorité des cellules GFP+ sont CD45+, sca low et CD34-.

Les CD45- représentent 15% et peuvent être différenciés avec leur faible ou forte expression de sca1.

Aucune de ces cellules n'expriment CD34 dans le muscle des C57Bl/6 tandis que 5% de CD45- sca low CD34+ peuvent être détectées chez les souris mdx greffées.

L'analyse des compartiments SP montre que :

- les cellules mononuclées du muscle GFP+ sont enrichies en cellules SP, toutes expriment CD45 spécifique pour un compartiment hématopoïétique. ;
- 50% des cellules mononuclées du muscle sont GFP+ ;
- la présence de cellules SP GFP- montre l'existence de cellules SP endogènes qui ne sont pas délogées par les SP de la MO.

Cette étude a permis de mettre en évidence une sous population de GFP+ de cellules dérivées de la MO impliquée dans l'homéostasie du muscle.

## **3066 Isolation of adult mouse myogenic progenitors: functional heterogeneity of cells within and engrafting skeletal muscle.**

**Sherwood RI, Christensen JL, Conboy IM, Conboy MJ, Rando TA, Weissman IL, Wagers AJ.**

Les auteurs ont isolé des précurseurs fonctionnels myogéniques adultes. Ces cellules ne proviennent pas des précurseurs hématopoïétiques, de la moelle osseuse (MO), ou des précurseurs circulants. La régénération du muscle squelettique chez l'adulte arrive à travers une action des cellules satellites localisées dans les fibres musculaires matures. Des études récentes suggèrent que des progénitures musculaires incluent les cellules de la MO ou d'origine hématopoïétique.

Pour comprendre l'origine des cellules myogéniques adultes, les auteurs utilisent des critères phénotypiques, morphologiques et fonctionnels de façon à identifier et par la suite isoler un sous groupe de cellules associées aux myofibres capables au niveau d'une cellule de générer des colonies myogéniques à une haute fréquence.

Ces études montrent l'isolement au niveau clonal de cellules progénitrices myogéniques adultes fonctionnelles et démontrent que ces cellules ne proviennent pas des précurseurs circulants hématopoïétiques ou de moelle osseuse.

## **2060 Side population cells isolated from different tissues share transcriptome signatures and express tissue-specific markers**

**Liadaki K, Kho AT, Sanoudou D, Schienda J, Flint A, Beggs AH, Kohane IS, Kunkel LM.**

Les cellules SP isolées de la moelle osseuse adulte murine montrent une activité de cellules souches hématopoïétiques. Par ailleurs, les cellules SP dérivées des muscles squelettiques murins montrent à la fois un potentiel hématopoïétique et myogénique. Pour mieux comprendre si le phénotype est associé avec un profil de transcription unique, les auteurs ont caractérisé l'expression des gènes de cellules SP provenant de 2 tissus distincts. Une étude comparative, entre les cellules SP et les cellules MP (Main Population) différenciées dans un tissu, montre que les cellules SP sont dans un état actif pour la transcription et la traduction et qu'elles sous-expriment des gènes liés à des fonctions tissu-spécifiques. Une étude directe de l'expression des gènes des cellules SP de différents tissus a permis d'identifier des gènes communs et spécifiques des cellules SP dans un tissu spécifique. Elle a ainsi permis de définir un environnement spécifique muscle ou moelle osseuse.

L'étude de l'expression des gènes dans les cellules satellites musculaires montre que 257 gènes présentent un profil différent. Il y a 190 gènes qui sont surexprimés (5% comprenant des gènes impliqués dans la transcription, la traduction et 25% inconnus) et 67 gènes sont sous-exprimés (gènes liés à adhésion cellulaire, récepteurs 20%, ligands 17%). Une étude similaire a été réalisée sur des cellules SP (Side Population) de la moelle osseuse. Les auteurs ont trouvé 647 gènes qui montraient une expression différente ; 475 gènes sont surexprimés (représentant pour 15% transcription; inconnu 10%), 199 gènes sont sous-exprimés (métabolisme 20%).