

# Les cellules souches neurales

Le cerveau est un organe complexe. Jusqu'à la fin du 20<sup>e</sup> siècle, on le considérait comme stable, dépourvu de mécanisme de régénération neuronale, qui entacherait la théorie selon laquelle le cerveau doit être stable pour que se conservent souvenirs et pensées tout au long de la vie. A partir des années 1960, grâce à la sophistication des techniques de biologie cellulaires et moléculaires, de nombreuses observations se sont succédées et ont permis de mettre en évidence ce qui était autrefois considéré comme une hérésie : des neurones naissent dans le cerveau adulte tout au long de la vie, chez les Mammifères.

Quelles sont les zones où la neurogenèse se produit à l'état embryonnaire et à l'état adulte ?  
Quels sont les mécanismes cellulaires et moléculaires qui sous tendent ces neurogenèses ;  
quels sont les déterminismes épigénétiques ?

Comment exploiter ces mécanismes pour engendrer des cellules neurales en cas de besoin ;  
quelles sont les applications thérapeutiques possibles ?

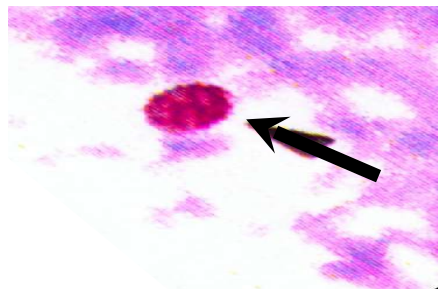
## I – Découvertes de l'existence des cellules souches neurales.

La vision selon laquelle le cerveau adulte est considéré comme stable repose sur la différence de plasticité qui existe entre le cerveau d'un fœtus, et d'un enfant, avec celui d'un adulte. On sait depuis longtemps que le cerveau d'un jeune enfant est capable de se réorganiser en fonction des stimulations externes, et peut se régénérer plus facilement que le cerveau d'un adulte, en cas de lésions. Des études ont permis de visualiser facilement des zones de divisions dans le cerveau embryonnaire, ou au cours de la période post-natale, mais il est plus rare de les observer dans le cerveau adulte. De plus, les cellules neurales en division que l'on pouvait observer étaient considérées, sur des critères morphologiques, comme des précurseurs de cellules gliales et non comme des cellules neuronales.

C'est en 1965, que Joseph Altman publia un article dans lequel il indiquait avoir découvert un phénomène de neurogenèse dans le cerveau de Mammifères adultes (*Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats*). A cette époque, seule la régénération de cellules gliales astrocytaires était considérée comme possible, comme en témoignaient les cicatrices gliales observées après une lésion cérébrale. J. Altman caractérisa cependant, sur des critères morphologiques, de nouvelles cellules identifiées comme neurones (plus volumineuses, et plus claires avec les colorants classiques que les cellules gliales). Cependant, ce type d'arguments n'était pas considéré comme concluant dans un contexte régit par la théorie stable du cerveau.

Au début des années 1980, des chercheurs ont mis en évidence l'existence de synapses au niveau des cellules neurales néoformées, attestant leur nature neuronale et non gliale. Cependant, les techniques de détection prenant beaucoup de temps, et le nombre de cellules produites étant minime, le phénomène de neurogenèse chez les mammifères était considéré comme négligeable, comme un vestige évolutif hérité des Sauropsidés ou des Oiseaux, chez lesquels la neurogenèse chez l'adulte est importante.

Ce n'est qu'au début des années 1990, que l'observation de très nombreux neurone néoformés a pu se faire, grâce à la mise au point de [techniques immuno-histochimiques](#). Ces techniques mettant en évidence une neurogenèse chez les Mammifères adultes n'étaient pas applicables à l'Homme car il fallait, après divers traitements *in vivo*, autoradiographier des coupes de cerveau. Pour mettre en évidence la production de neurones dans le cerveau adulte chez l'Homme, *Fred Gage* et son équipe, profitèrent, en 1992, d'une étude de cancérologie réalisée pour des raisons thérapeutiques. Lors de cette étude, les patients recevaient des injections du bromodésoxyuridine (BrdU), un analogue d'une des quatre bases de l'A.D.N., afin de quantifier la réplication de l'A.D.N., indicateur d'une prolifération tumorale. Des anticorps monoclonaux spécifiques du BrdU, couplés à des marqueurs fluorescents, permettent ensuite de visualiser des cellules qui sont en phase S du cycle cellulaire *Fred Gage* préleva l'hippocampe de cinq patients traités décédés, et décela des cellules marquées. Des analyses complémentaires utilisant des anticorps spécifiques de protéines membranaires propres aux neurones, démontrèrent qu'environ 500 neurones naissent dans la région hippocampique dans le cerveau d'un Homme adulte.



**Cellules hippocampiques traitées par immunohistochimie au BrdU (marquage rouge) et contre coloration de Nissl (violet). La flèche indique une cellule marquée au BrdU.**

Depuis, la neurogenèse a été identifiée chez de nombreuses espèces de mammifères, au niveau du bulbe olfactif, de la région du gyrus dentatus de l'hippocampe, et même au niveau du cortex pariéto-frontal chez les Primates, et au niveau de certains noyaux dans la moelle épinière. Malgré tout, le dogme ancestral n'est pas entièrement faux ; si des phénomènes de neurogenèse ont été décrits à l'état adulte, il semble que ce phénomène soit restreint au niveau de certaines zones cérébrales, et d'après les connaissances actuellement, seuls certains sous-types de neurones se régénèrent chez l'adulte, sans que les techniques aient pu véritablement les identifier.

Comment expliquer la restriction de la neurogenèse à certaines zones du cerveau adulte ? Comment expliquer que la localisation des cellules souches neurales diffère avec les zones où se réalise la neurogenèse ?

Quels sont les mécanismes et les déterminismes qui sous tendent ce phénomène à l'âge adulte ?

## **II – Les mécanismes cellulaires et moléculaires qui sous-tendent les phénomènes de neurogenèse.**

### **III1 – La restriction de la neurogenèse chez les Mammifères adultes.**

La neurogenèse correspond à l'ensemble des processus de prolifération puis de différenciation cellulaires conduisant à la formation de neurones. Chez l'adulte, seuls quelques foyers de neurogenèse sont maintenus, au niveau du bulbe olfactif, de la région du gyrus dentatus de l'hippocampe, et même au niveau du cortex pariéto-frontal chez les Primates et au niveau de certains noyaux dans la moelle épinière.

### **III2 – Les cellules souches neurales : des mécanismes sous-tendant leurs potentialités mitotiques à leurs différenciations.**

Une cellule souche est une cellule progénitrice indifférenciée multipotente, capable de renouveler leur population, ainsi que de renouveler des tissus lésés. Les cellules constituant le système nerveux sont produites au cours de la vie fœtale et chez l'adulte dans certaines régions du cerveau. Ces cellules prolifèrent par mitose pour donner des cellules post-mitotiques qui peuvent alors se différencier en neurone, astrocyte ou oligodendrocyte. Les neurones sont des cellules strictement post-mitotiques et ne se divisent donc pas.



### **III2A – La neurogenèse repose sur les actions antagonistes de gènes spécifiques.**

Chez la souris, des expériences d'inactivation génique ciblée par recombinaison homologue ont permis de mettre en évidence l'existence de gènes s'exprimant durant la phase de différenciation. Ces gènes codent des protéines dites à hélice-boucle-hélice caractéristiques des facteurs de transcription. L'expression de gènes précoces responsables de la spécification d'une cellule indifférenciée vers les lignées neuronales (Mash1 (homologue de achaete-scute chez la drosophile), neurogénine et Math1 homologues d'atonal)) induisent la spécification cellulaire (l'entrée dans la phase de différenciation), et l'expression de gènes plus tardifs (NeuroD et Math2) permet l'accomplissement de la phase de différenciation.

D'autres gènes HLH exprimés dans les cellules précurseurs neuronales ont été identifiés. L'inactivation de ces gènes provoque une différenciation accélérée. Il semble que ces gènes (dont Hes1 et Hes5) exercent une action inhibitrice sur la phase de différenciation, en

réprimant (directement ou indirectement) l'expression des gènes de spécification neuronale (neuronal) précoces.

## ***II2B – Le contrôle extra-cellulaire de la différenciation des cellules souches neurales.***

### **II2B1 – La voie de contrôle Notch – Delta.**

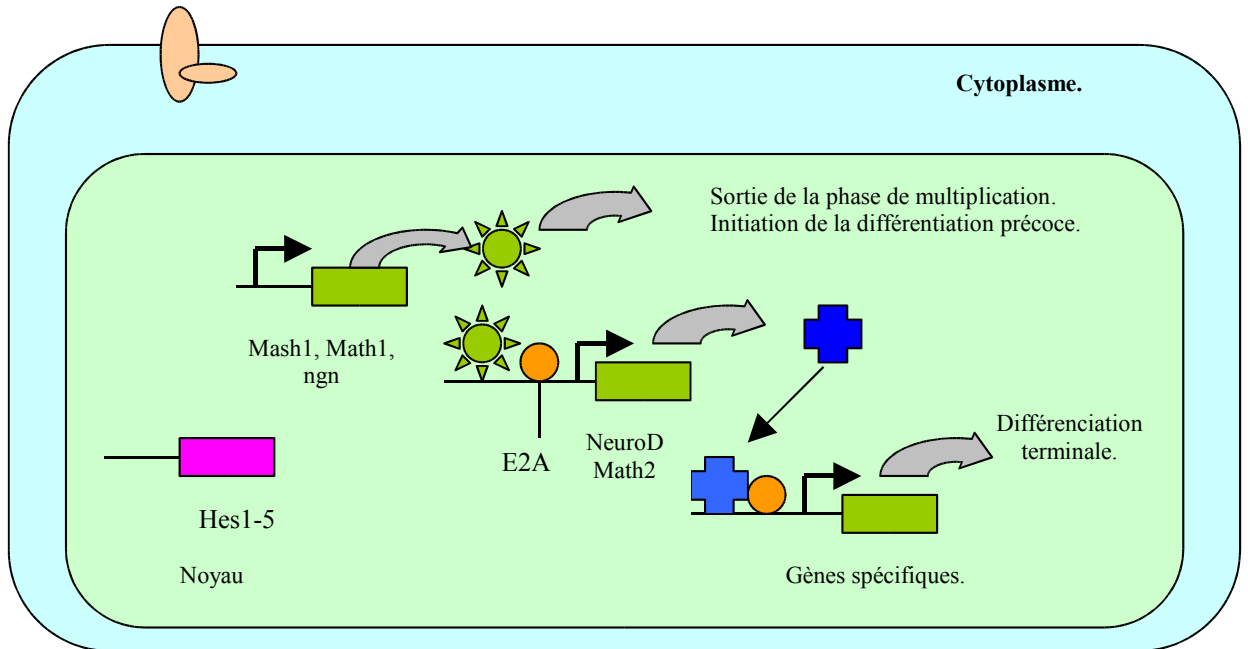
La répression du programme neuronal est régulée chez la drosophile par un couple moléculaire, le couple Notch – Delta (il existe 4 gènes homologues Notch 1-4 identifiés chez la souris). La protéine Notch est une protéine récepteur transmembranaire de 300kDa. Les protéines Delta (dont il existe 3 isoformes principales) sont des protéines transmembranaires dont les gènes correspondants sont activés par les gènes de différenciation tardive. L'interaction de Notch avec ses ligands Delta déclenche une voie de signalisation intracellulaire conduisant à l'inhibition de la neurogenèse des cellules voisines via l'activation des gènes pro-neuraux. La fixation de Delta sur les motifs extracellulaires EGF-like de Notch, provoque un clivage protéolytique du fragment cytoplasmique de Notch. Ce fragment ainsi formé s'associe avec une protéine cytoplasmique RBP-Jκ. Le complexe est alors transloqué dans le noyau où il se fixe sur des séquences de transcription des gènes anti-neuraux ; le complexe agit comme « dérépresseur » en entrant en compétition avec un complexe répresseur fixé sur l'ADN ; de ce fait, la répression des gènes sous leur contrôle, en particulier Hes1-5, est levée).

Les protéines Hes1 et Hes2 se fixent avec une protéine cytoplasmique Groucho (corépresseur) et les complexes Hes1-groucho et Hes2- Groucho répriment les gènes pro-neuraux précoces ou inhibent leur association avec la protéine E2A (nécessaire à l'activation de l'expression des gènes proneuraux tardifs), et inhibent ainsi l'engagement des cellules précurseurs neuronales dans la phase de différenciation : elles restent en phase proliférative ou s'engagent vers la voie gliale.

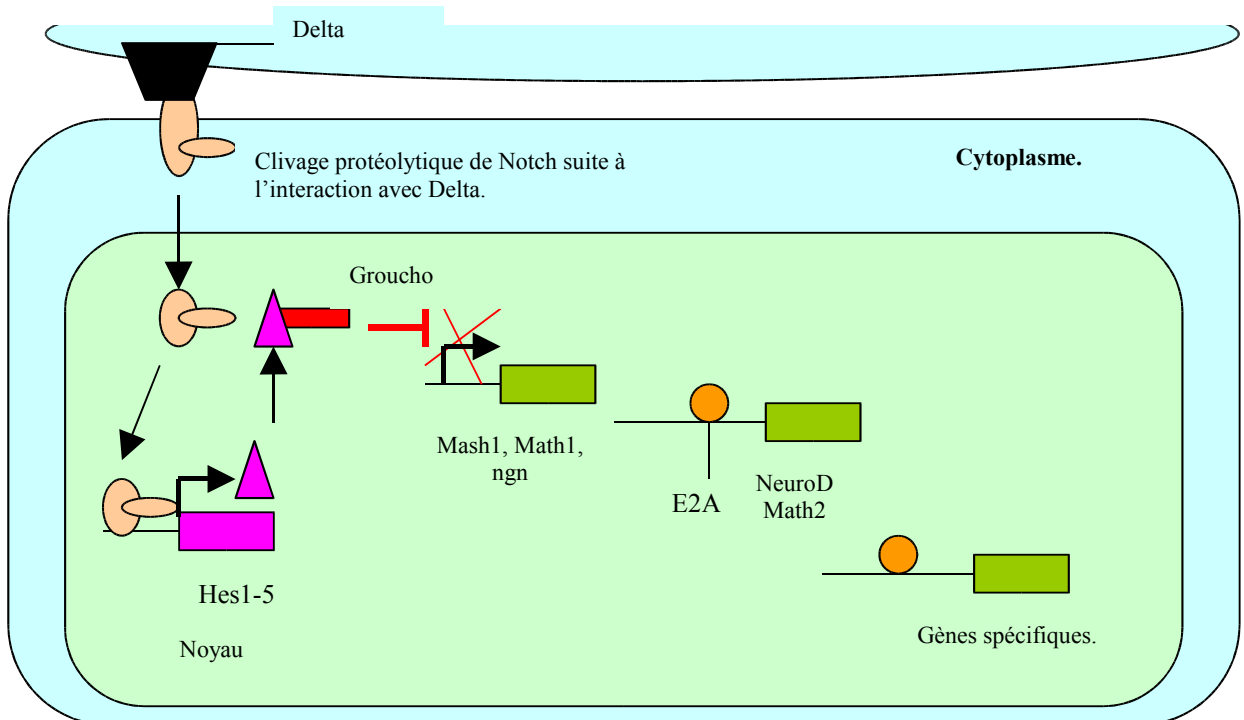
La voie Notch-Delta joue un rôle décisif dans les processus de différenciation des types cellulaires du système nerveux. En effet, les neurones en voies de différenciation, exprimant delta, empêchent transitoirement la différenciation des cellules précurseurs voisines, et étale ainsi la neurogenèse. Les facteurs extracellulaires qui contrôlent le type de différenciation changent au cours du temps. Les cellules précurseurs sont ainsi soumises à un environnement moléculaire inducteur nouveau ultérieurement, les engageant dans une voie de différenciation différente. Les modifications de signaux inducteurs ne suffisent pas pour expliquer la mise en place séquentielle des divers types cellulaires. Les facteurs contrôlant les modifications de compétences intrinsèques des précurseurs neurales sont actuellement inconnus.

## Modèle de la régulation moléculaire de la neurogenèse.

### A – Voies de signalisation intracellulaires en l'absence de la signalisation Notch/RBP-J/Hes1-5.



### B - Voies de signalisation intracellulaires en présence de la signalisation Notch/RBP-J/Hes1-5.



## II2B2 – Les facteurs extracellulaires contrôlant la spécification de l'identité et la différenciation des cellules neurales.

Les éléments décrits ci-dessous sont réalisés in vitro.

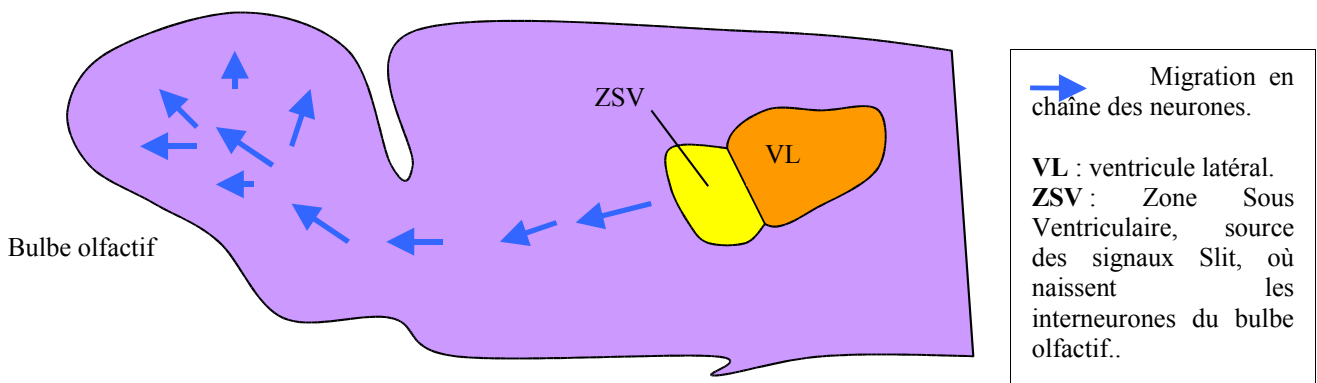
Les cellules souches du système nerveux central présentent des propriétés semblables que ce soit chez l'embryon ou chez l'adulte. Elles se multiplient en réponse à des facteurs mitogènes FGF et EGF. Les cellules souches neurales s'engagent dans une voie de différenciation neuronale, par défaut, en l'absence de ces facteurs mitogènes.

L'engagement dans une voie de différenciation gliale nécessite des facteurs inducteurs tels le CNTF ou le BMP pour les précurseurs de la lignée astrocytaire, ou tels l'hormone thyroïdienne T3 pour les précurseurs de la lignée oligodendrocytaire. Il semble que l'hormone thyroïdienne T3 soit aussi indispensable à la survie des neurones et des cellules gliales après leur différenciation grâce à une régulation très efficace de l'apoptose. Ses effets anti-apoptotiques interviennent dès la phase de différenciation, mais on ignore encore si ses effets sont directs ou relayés par des facteurs de croissance neurotrophiques.

### ***II2C – La migration neuronale chez l'adulte : la voie Slit.***

Dans le cerveau de certains Vertébrés (comme les rongeurs) le renouvellement d'interneurones du bulbe olfactif se déroule tout au long de la vie. Ces interneurones prennent naissance dans la zone sous ventriculaire puis migrent vers le bulbe olfactif suivant un trajet « courant rostral de migration ». Ce mode de migration est singulier en ce sens que les cellules se déplacent les unes sur les autres, alors que la majorité des cellules précurseurs des neurones utilisent pour migrer les fibres de la glie radiale ou des projections axonales. Plusieurs facteurs de guidage ont été identifiés (éphrines, sémaphorines ou slit). En se fixant sur leur récepteur membranaires, ces facteurs activent des protéines G RhoGTPases modulant l'architecture cellulaire par des voies de signalisation intracellulaires complexes, par la mise en place de structures cytomembranaires. Les protéines Slit – 1 et Slit – 2 sécrétées par le septum caudal, constituent un signal répulsif vis-à-vis des précurseurs neuronaux de la ZSV. Des études récentes recherchent une possibilité d'utiliser des molécules, qui interviennent lors de la mise en place embryonnaire du système nerveux, appartenant aux familles Sémaphorine, Ephrines, Slit, pour induire des déplacements de précurseurs nerveux vers des zones endommagées.

### **Flux de migration neuronale du bulbe olfactif.**



*Schéma en coupe sagittale d'un cerveau de souris adulte.*

### II3 – Intégrations physiologiques de la neurogenèse chez l’adulte.

Au début des années 1960, Mark Rosenzweig et ses collègues de l’université de Berkeley étudièrent des rongeurs placés dans des conditions environnementales différentes afin d’éprouver leur hypothèse selon laquelle un environnement enrichi peut optimiser l’apprentissage.

Il plaça un lot de rongeurs dans une petite cage sans aucun objet dedans. Un second lot de rongeur fut placé dans une grande cage contenant des roues, des tunnels en plastiques,... Cette amélioration des conditions de vie permit d’optimiser la réussite aux tests d’apprentissage des rongeurs du lot 2, qui avaient un cerveau légèrement plus gros.

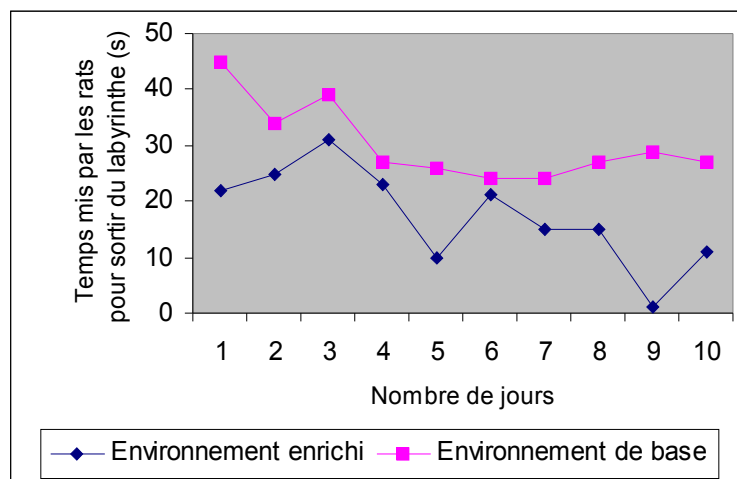
De puis ces expériences, de nombreux neurobiologistes avaient la conviction que l’environnement pouvait agir sur les connexions synaptiques neuronales.

En 1997, Fred Gage et Gerd Kempermann montrèrent que des rats adulte élevées dans des conditions stimulantes possèdent 60% de cellules granulaires de plus dans le gyrus denté, que des souris témoins. Leur capacité d’apprentissage était également accrue. Ainsi, les stimulations fonctionnelles de cellules souches neurales in vivo surviennent dans un contexte physiologique de stimulations (physiques, sensorielles,...) améliorant les conditions d’apprentissage.

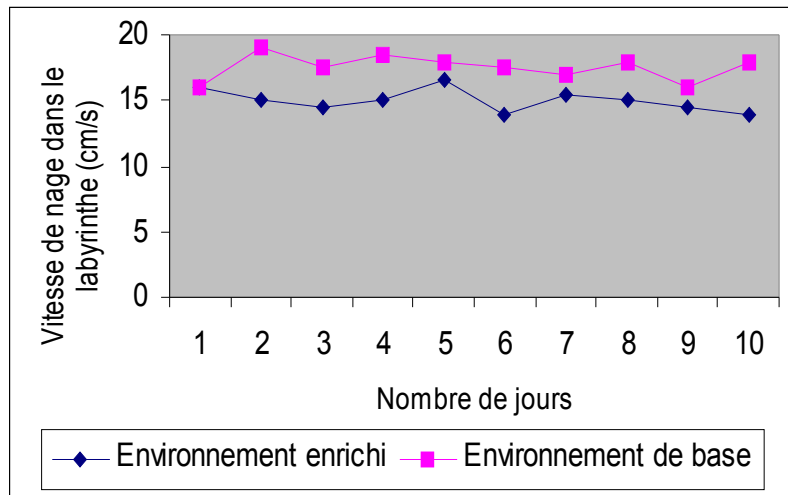
Les documents suivants représentent les paramètres relatifs à l’apprentissage étudiés ainsi que les études réalisées sur différentes populations de cellules neurales de l’hippocampe. (d’après G. Kempermann et F. Gage)

#### A – Effets d’un environnement enrichi sur l’apprentissage de rats.

**A1** – *Evolution du temps mis pour sortir d’un labyrinthe par des rats adultes selon l’environnement dans lesquels ils se développèrent.*

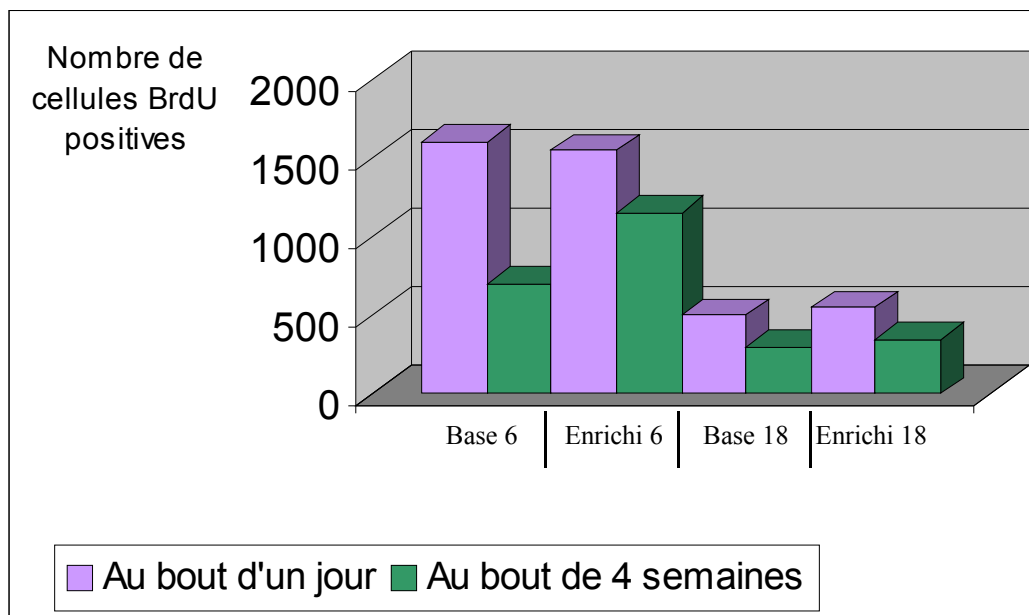


**A2** – Evolution de la vitesse de nage de rats adultes placés dans un environnement de base ou dans un environnement enrichi.



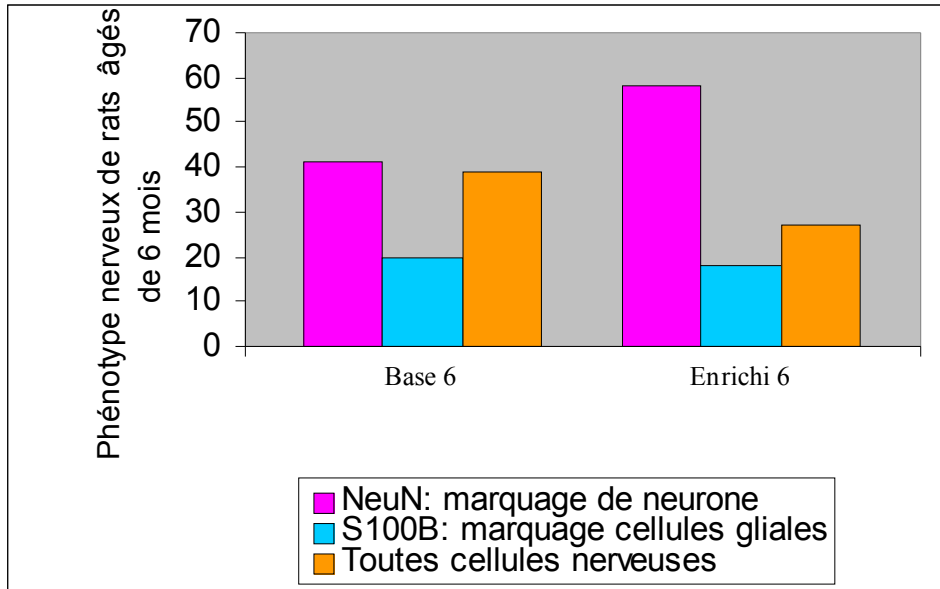
**B – Etude des variations des population de cellules neurales dans l’hippocampe de rats adultes (6 mois) ou de rats vieux ( 18 mois).**

**B1**

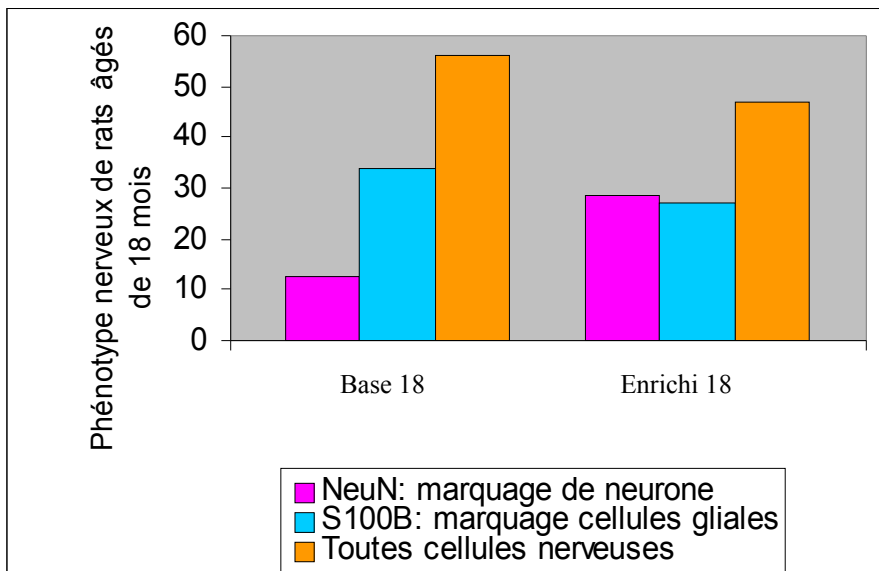


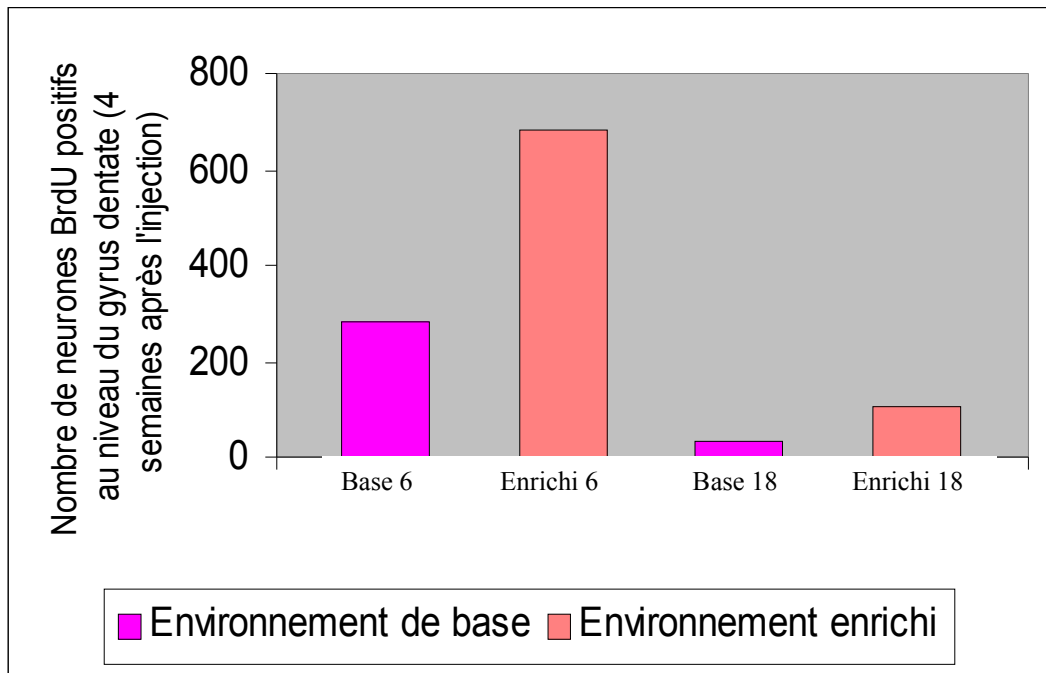


B2



B3





Si l'on considère les graphes B1, on constate que le nombre de cellules marquées au BrdU est plus important au bout de 4 semaines dans l'hippocampe de rats placés dans un milieu enrichi, quelque soit leur âge. Toutefois, si les rats sont plus jeunes ( 6 mois ), le nombre de cellules marquées est plus important que pour des rats plus âgés.

Les graphes B2 et B3 permettent de préciser les types cellulaires marqués précédemment.

Si l'on considère les graphes B2, on constate qu'il y a plus de neurones formés dans un environnement enrichi que de cellules gliales, ce qui permet d'expliquer l'optimisation de l'apprentissage observés chez les rats placés dans un environnement enrichi (graphes A1 et A2).

Les graphes B4 montrent qu'un rat adulte a une capacité plus importante de générer des néo-neurones qu'un rat plus vieux.

Cependant, si l'on compare les rapports Enrichi 6 / Base 6 et Enrichi 18 / Base 18, on constate qu'ils sont très voisins. Ceci signifie qu'un rat âgé conserve toute potentialité d'apprentissage, aussi bien qu'un rat plus jeune. Placer des personnes âgées dans des structures au sein desquelles elles ne sont pas stimulées, relève donc de l'hérésie.

### III – Les applications des cellules souches neurales.

#### III1 – Plasticité de la différenciation des cellules souches neurales.

Les cellules souches du système nerveux s'avèrent être d'excellents instruments potentiels pour soigner différentes maladies du système nerveux en vertu de différentes caractéristiques :

- ♦ elles peuvent se différencier en plusieurs types cellulaires après transplantation dans le cerveau.

- ◆ elles peuvent se différencier de façon appropriée en fonction du lieu de transplantation (environnement moléculaire spécifique) mais si ce lieu diffère de leur lieu d'origine.
- ◆ elles peuvent se propager abondamment en milieu de culture, malgré des risques d'altération de leurs propriétés.
- ◆ elles peuvent servir de vecteur pour l'expression de gènes exogènes dans le cerveau, par exemple des gènes optimisant la survie, la croissance, la migration des cellules transplantées.

Des études ont été menées chez la souris et chez l'Homme afin de tester le potentiel de différenciation des cellules souches neurales. Chez les rongeurs, la production de neurones se poursuit dans deux régions du cerveau, le gyrus dentatus et l'hippocampe, au cours de la vie adulte. Dans le reste du cerveau, la neurogenèse s'arrête pendant la vie embryonnaire. Après prélèvement et dissociation du tissu neurogénique, les cellules souches cultivées dans un milieu à faible densité en présence de facteurs mitogènes (FGF et EGF) prolifèrent et engendrent chacune une neurosphère (une neurosphère est très hétérogène et composée de cellules déjà engagées dans la différenciation neuronale et/ou gliale ; seules 5-10% des cellules pourront redonner des neurosphères secondaires). Lorsqu'elles sont cultivées en l'absence de facteurs mitogènes, elles se différencient en neurones ou cellules gliales (astrocytes ou oligodendrocytes).



Vue à l'œil nu des neurosphères (petites billes blanches) se formant à partir des cellules tumorales. Ces neurosphères se décollent facilement du fond de la boîte



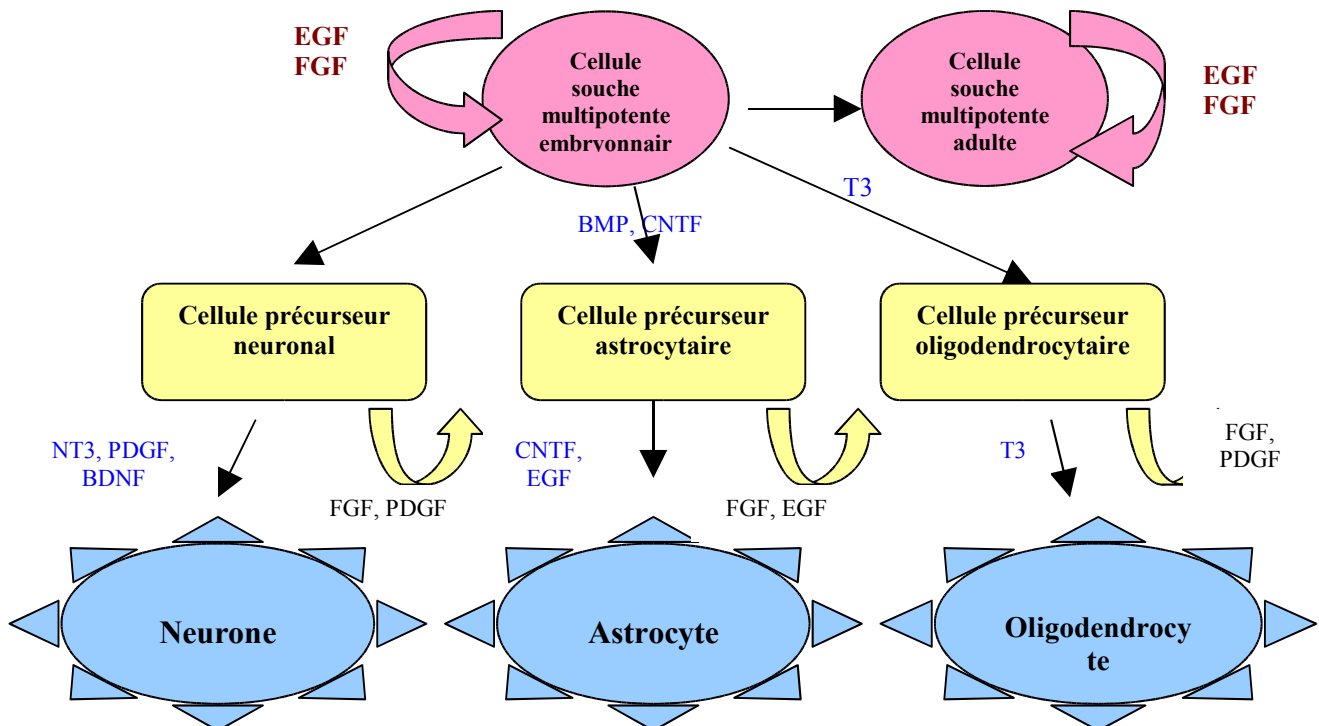
Neurosphères vues au microscope. Les cellules souches tumorales se multiplient en formant de petits amas, d'aspect très différent des cellules stromales (en bas à droite).

Afin de tester le potentiel de différenciation des cellules souches, des transplantations dans différentes régions du cerveau de cellules prélevées dans l'hippocampe puis propagées en présence de FGF et EGF, ont été réalisées. Le tableau suivant consigne les protocoles et les résultats obtenus.

|  | LOT A  | LOT B  | LOT C  | LOT D  |
|--|--|--|--|--|
| <b>Zone de transplantation des cellules souches cultivées.</b> | Gyrus dentatus de rats adultes                               | Zone sous ventriculaire de rats adultes                        | Cervelet de rats nouveau-nés (zone neurogénique)             | Cervelet de rats adultes (zone non neurogénique) |
| <b>Résultats</b>   | Migration et différenciation en cellules grains d'hippocampe | Migration et différenciation en neurones TH+ du bulbe olfactif | Migration et différenciation en cellules grains du cervelet. | Pas de migration et de différenciation           |

Ces expériences ont permis de conclure que les cellules souches neurales transplantées dans le cerveau se mélangent aux cellules progénitrices endogènes, migrent et participent au développement spécifique du système nerveux en se différenciant en types de cellules neurales adaptés. La différenciation d'une cellule souche greffée dépend d'une combinaison de signaux locaux extrinsèques plutôt que de propriétés intrinsèques à la cellule.

**Relations entre les différenciations des différents lignages cellulaires du système nerveux et les facteurs extracellulaires.**



## III2 – Perspectives thérapeutiques de l'utilisation des cellules souches neurales

Des expériences de transplantation récentes ont montré que les cellules souches neurales humaines ont les mêmes propriétés que les cellules progénitrices murines : en fonction de leur environnement moléculaire, elles peuvent survivent, migrer, s'intégrer et se différencier en types cellulaires approprié au stade de développement présent et au site de greffe.

Le succès des greffes dépend de plusieurs paramètres :

- ◆ Il est d'autant plus important que les greffes dans le cerveau d'un adulte sont réalisées dans des zones qui ont été endommagées.
- ◆ Il dépend aussi des conditions de cultures des cellules transplantées. Les résultats des greffes sont meilleurs quand des cellules neurales plus mures sont intégrées. En effet, dans la cas de patients atteints de la maladie de Parkinson, souffrant notamment d'un déficit en neurones dopaminergiques, la greffe de cellules souches fœtale n'est pas très efficace en raison du nombre restreint de neurones dopaminergiques issus des cellules transplantées. La différenciation des cellules progénitrices avant leur transplantation permettrait une survie à plus long terme des neurones. Il faut cependant que les signaux moléculaires contrôlant la différenciation des cellules neurales impliquées dans une maladie neurodégénératives soient identifiés.

Un des problèmes actuels relatifs à l'utilisation de cellules souches pour le traitement de maladies neurologiques provient du fait que l'on doit isoler les cellules souches à partir de tissus fœtaux (dans les greffes de neurones fœtaux, les cellules souches ne sont pas isolées, d'ailleurs on ne sait pas le faire ; on injecte l'ensemble de la zone prélevée chez le fœtus). Aussi, une stratégie de traitement alternative consisterait à utiliser des cellules souches embryonnaires (ES) pour permettre la différenciation de précurseurs nerveux qui seraient ensuite transplantés dans le cerveau (des expériences ayant corrigé un défaut de myélinisation chez des souris mutantes ont été réalisées avec succès)

Les transplantations posent également un problème de rejet des cellules greffées en fonction de la compatibilité immunologique entre le donneur et le receveur. Dans le futur, le remplacement de cellules dans des zones du cerveau endommagée, pourrait reposer sur des programmes d'activation neurogéniques ou gliogéniques in situ, grâce à l'action de signaux extrinsèques de synthèse ou de culture, injectés dans la zone lésée. Des expériences récentes ont étudié la régénération des neurones hippocampiques suite à une ischémie provoquée (Regeneration of Hippocampe pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors – H. Nakatomi, T. Kuriu, S. Okabe et al – Cell – August 23, 2002). Elles ont montré qu'une injection de facteurs mitogènes FGF-2 et EGF au niveau du ventricule latéral entraînant l'apparition de nouveaux neurones granulaires dans le gyrus dentatus, mettant ainsi en évidence un phénomène de migration de cellules du ventricule latéral vers la zone CA1, et la différenciation appropriée des cellules progénitrices en cellules granulaires du gyrus dentatus.

Toutes ces stratégies pour le traitement de maladies neurologique reposent sur des progrès importants qui devront encore être réalisés sur la connaissance fondamentale relative aux mécanismes de différenciation des divers types cellulaires du système nerveux.