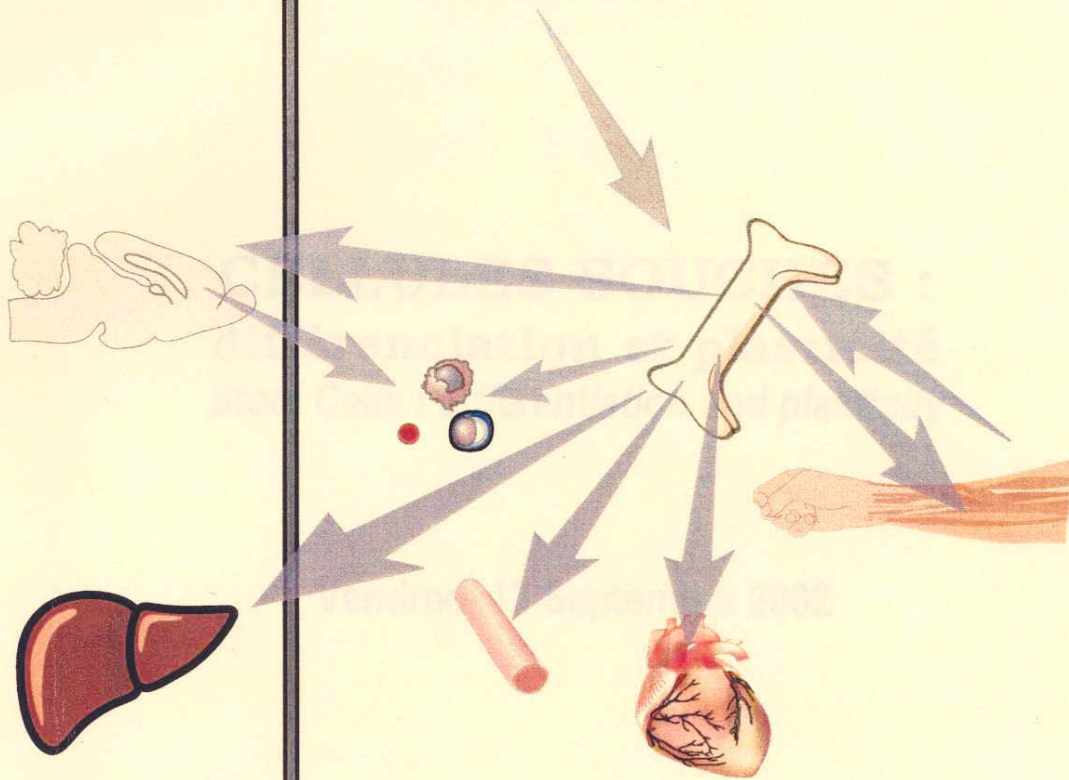


CELLULES SOUCHES



Faculté de Médecine Cochin Port-Royal

Plasticité et Différenciation



Institut Cochin

XIX^e Journée Jean-Claude Dreyfus

CELLULES SOUCHES : différenciation et plasticité *Stem cells : differentiation and plasticity*

Vendredi 13 Septembre 2002

*Grand Amphithéâtre de la Faculté de Médecine Cochin Port-Royal
24, rue du Faubourg Saint-Jacques – 75014 PARIS*

Programme

9 h Ouverture

Professeur Jean-François DHAINAUT, *Doyen de la Faculté de Médecine Cochin*
Professeur Axel KAHN, *Directeur de l'Institut Cochin*

1^{ère} Session : Cellules souches hématopoïétiques ***Hematopoietic stem cells***

Présidente : **Françoise PFLUMIO**, *Institut Cochin, INSERM, CNRS,
Université René Descartes, PARIS*

Ana CUMANO, *Unité Développement des lymphocytes, Institut Pasteur, PARIS*
Génération de cellules souches hématopoïétiques chez l'embryon de souris
Development of hematopoietic stem cells in the mouse embryo

Tsvee LAPIDOT, *The Weizmann Institute of Science, REHOVOT, Israël*
Stem cell homing and repopulation in transplanted NOD/SCID and
B2mnull NOD/SCID mice : role of SDF-1/CXCR4 interactions
*Adressage médullaire des cellules souches et repopulation des souris NOD/SCID et
B2m-/- NOD/SCID : rôle des interactions SDF-1/CXCR4*

Anne-Lise BENACEUR-GRISCELLI, *U.362 INSERM, Institut Gustave Roussy
VILLEJUIF*
Modulation de la télomérase dans les leucémies et progéniteurs
Modulation of telomerase expression in leukemic and progenitor cells

Anne DUBART-KUPPERSCHMITT, *Institut Cochin, PARIS*
Transduction de cellules souches hématopoïétiques humaines à l'aide d'un
vecteur lentiviral – applications en hématologie fondamentale et en thérapie
génique
*Transduction of human hematopoietic stem cells with a lentiviral vector – application
for hematology and gene therapy*

11h00 Pause-café (*coffee-break*)

2ème Session : Cellules souches et différenciation épithéliale
Stem cells and epithelial differentiation

Président : Yann BARRANDON, *CHUV-Université – Ecole Polytechnique Fédérale, LAUSANNE*

Michele De LUCA, Graziella PELLEGRINI, *Istituto Dermopatico dell’Immacolata ROME*

Surface epithelial stem cells : from clones to clinics

Cellules souches des épithéliums stratifiés : des clones à la clinique

Yann BARRANDON, *CHUV – Ecole Polytechnique Fédérale, LAUSANNE*

Plasticité des épithéliums stratifiés

Plasticity of stratified epithelia

Brigitte LELONG, *U.489 INSERM, Hôpital Tenon, PARIS*

Interactions épithélio-mésenchymateuses dans le développement rénal

Epithelio-mesenchymal interactions in the development of kidney

Bruno PEAULT, *U506 INSERM, PARIS*

Recherche des progéniteurs de l'épithélium respiratoire humain

Progenitors in human respiratory epithelium

Buffet (lunch)
dans le Cloître de Port Royal

13h00-14h30

3ème Session : Cellules souches et système nerveux central
Stem cells and central nervous system

**Président : Alain CHEDOTAL, U.106 INSERM,
GH Pitié Salpêtrière, PARIS**

François GUILLEMOT, IGBMC, CU STRABOURG-ILLKIRCH
Gènes proneuraux dans la neurogenèse embryonnaire et adulte
Proneural genes in adult and embryonic neurogenesis

**Harold CREMER, UMR6545 CNRS, Faculté des Sciences Luminy,
MARSEILLE**
Molecular control of cell migration in adult neurogenesis
***Contrôle moléculaire de la migration cellulaire au cours de la neurogenèse
chez l'adulte***

Anne BARON-VAN EVERCOOREN, U.546 INSERM, PARIS
**Plasticité et différenciation des cellules souches neurales dans
le SNC adulte demyélinisé**
Plasticity and differentiation of neural cells in the demyelinated CNS

John SINDEN, CSO, Reneuron, Guilford, Surrey UK
Human neural stem cells – from basic science towards clinical application
Cellules souches neurales humaines – du fondamental aux applications cliniques

16h10 Pause

4ème Session : Cellules souches : quel avenir thérapeutique ?
Which therapeutic potential for stem cells ?

Présidente: Eliane GLUCKMAN, Service de greffe de Moëlle, Hôpital St Louis, PARIS

**Domanska JANIK, Laboratory of Molecular Neuropathology, Polish Academy
of Sciences, VARSOVIE**
Alternative sources for human neural stem cells
Sources alternatives de cellules souches neurales humaines

Nathalie CARTIER, U.561 INSERM, St Vincent de Paul, PARIS
**Cellules souches hématopoïétiques : thérapie cellulaire et génique
de l'adrénoleucodystrophie**
Hematopoietic stem cells : cell therapy and gene therapy of adrenoleucodystrophy

Eliane GLUCKMAN, *Service greffe de moëlle , Hôpital St Louis, PARIS*
Utilisation des cellules souches du sang de cordon ombilical pour la greffe chez l'homme
Use of cord blood cells for BMT in human

François PATTOU, *INSERM 106 INSERM, Faculté Médecine, LILLE*
Thérapie cellulaire du diabète. Quelles cellules pour quels patients ?
Cell therapy of diabetes : which cells for whom ?

18h00 Conclusions par Axel KAHN

Introduction

par le Professeur Axel Kahn

Directeur de l'Institut Cochin

La salamandre et nous

« *Tout est perdu, fors l'honneur* » écrivait le roi François 1^{er} après la cuisante défaite qu'il avait subie face aux troupes de l'Empereur Charles Quint en 1525 à Pavie. Défait, prisonnier, son armée détruite, le roi de France avait quelques raisons de s'abandonner au pessimisme. Pourtant, il aurait pu puiser des raisons d'optimisme dans le symbole de la salamandre, animal héraldique marquant l'empreinte du roi dans tant de châteaux de France, notamment à Fontainebleau ou à Blois. En effet, cet amphibien urodèle, au même titre que le triton, est, chez les vertébrés le champion toute catégorie de la régénération. Il est capable de régénérer totalement des membres, la queue, parfois l'œil, et même de larges portions du cœur. De même, malgré le désastre, le Royaume de France devait puiser en lui les ressources nécessaires pour bientôt se redresser.

La fabuleuse capacité de régénération de la salamandre et du triton ne constitue certainement pas une exception parmi les êtres multicellulaires, métazoaires et métaphytes. Chez les vertébrés, chacun sait que le lézard peut, lui aussi, faire le sacrifice de la queue par laquelle tentent de l'attraper les enfants, puis la régénérer. Certains poissons ont, en ce domaine, également de la ressource. Le poisson zèbre, par exemple, peut efficacement réparer des nageoires largement amputées. Chez les invertébrés, la capacité de régénérer des parties du corps est très fréquemment observée, chez les crustacés, les insectes, les mollusques, les annélides, les planaires et les cnidaires tels que l'hydre. Dans ces deux derniers embranchements animaux, la capacité régénérative est même prodigieuse. Ainsi, un plathelminthe coupé en plusieurs centaines de fragments engendrera, quelques semaines après, autant de vers complets. Chez les cnidaires, l'hydre peut, comme nous le rappelle la mythologie, tout régénérer, en particulier la tête. Quant au monde végétal, la capacité de régénération y est générale et considérable. Par conséquent, les piètres performances régénératives des mammifères, des oiseaux et de la plupart des poissons fait figure d'exception dans le monde vivant, et non point de règle. Les mécanismes qui président au processus de régénération sont de deux types. Chez les hydres et les plathemintes persiste une population de véritables cellules souches totipotentes qui sont recrutées en cas de lésion et se différencient alors pour régénérer la structure éliminée. En revanche, de telles cellules souches ne semblent pas persister dans le modèle des amphibiens urodèles. Ici, les cellules à proximité de la zone lésée, en particulier les fibres musculaires, commencent à se dé-différencier pour former un blastème régénératif contenant des

progéniteurs mésenchymateux. C'est au dépend de cette structure que sont régénérés la queue ou les membres absents.

La régénération chez les plantes a plus de points communs avec le modèle des amphibiens qu'avec celui des hydres et des vers. En effet, n'importe quelle cellule somatique végétale, notamment des cellules de feuilles, a la possibilité, dans des conditions de culture et de stimulation hormonale particulières, de se dé-différencier pour former un cal embryoïde et régénérer une plante entière. Tel est le principe à la base des techniques de clonage végétal et de fabrication de plantes transgéniques.

Il apparaît que, pour l'essentiel, la plupart des vertébrés et tous les mammifères ont perdu la plus grande partie de leur remarquable capacité régénérative. L'homme, en particulier, peut perdre la tête, au sens propre comme au sens figuré. Ce n'est que dans cette seconde acception que, parfois, il la retrouve. Cependant, le tableau n'est pas si noir comme le montrent les remarquables capacités à régénérer du foie qu'illustre le mythe de Prométhée, ou bien du système hématopoïétique qui permet aux malades en aplasie médullaire thérapeutique de guérir. Personne ne doutait donc qu'existaient des cellules progénitrices spécifiques d'organes ou de lignages cellulaires, impliquées dans ces processus régénératifs. D'autres tissus semblaient plus rebelles, voire totalement réfractaires à tout phénomène de réparation. Ainsi en était-il, par exemple, du cœur et du système nerveux central. L'utilisation de l'imparfait est ici de rigueur car les preuves abondent aujourd'hui que persistent chez l'adulte des cellules souches neurales. Si le rôle de ces dernières dans les processus physiologiques ou pathologiques chez l'homme reste discuté, elles peuvent néanmoins être isolées et constituent ainsi un matériel potentiel de thérapie cellulaire. L'incapacité du cœur des mammifères à régénérer est un dogme qui vient lui-même d'être remis en question par l'observation d'une lignée particulière de souris (souris MRL). Dans ce cas, on ne sait pas encore si cette capacité régénérative est liée à la mobilisation de progéniteurs indifférenciés, qu'ils soient spécifiques du cœur ou pluripotents, ou bien, plus probablement et selon le même schéma que pour les amphibiens urodèles, à la dé-différenciation de cardiomyocytes. Cette dernière éventualité n'est pas si baroque qu'il y paraît. En effet, l'activation conditionnelle d'un transgène *msx1* dans des myotubes murins différenciés conduit ceux-ci à se fragmenter pour engendrer des progéniteurs mésodermiques qui peuvent, en fonction des conditions de culture, redonner soit du muscle, soit du tissu adipeux, de l'os ou du cartilage. Il s'agit là d'un phénomène très proche de la cellularisation de différenciation et prolifération des myotubes de salamandres et de tritons à proximité du plan de section d'un membre.

Reste que la régénération d'une structure complexe, pluri-tissulaire n'est plus possible chez les animaux à sang chaud, le secret semblant en avoir été perdu au cours de l'Evolution. La cause de cette incapacité régénérative pouvait être recherchée dans l'absence, chez ces animaux supérieurs, de cellules souches pluripotentes persistant tout au long de la vie, ou dans une limitation du niveau possible de dé-différenciation. Pourtant, la multiplication des expériences de clonage de mammifères par transfert nucléaire de noyaux somatiques dans des ovocytes énucléés, démontre que le génome cellulaire reste d'une étonnante plasticité, même dans une cellule totalement différenciée. Dans ce cas, cependant, une machinerie germinale – le cytoplasme de l'ovocyte – est impliquée, et l'on pouvait penser qu'aucun équivalent n'en persistait dans des cellules somatiques. Cette interprétation est

certainement remise en question par tout un faisceau de publications par des équipes américaines et européennes. Le laboratoire de Catherine Verfaillie dans le Minnesota est probablement le plus actif dans l'exploration de cette voie. Ces résultats récents, qui créent une effervescence légitime dans la communauté scientifique aussi bien que dans le grand public, nous apprennent que l'on peut isoler de divers tissus animaux, en particulier de la moelle osseuse, des cellules souches pluripotentes aux étonnantes capacités rappelant celles des cellules souches embryonnaires. Dans différentes expériences, la capacité de ces cellules à participer au développement embryonnaire et fœtal et, chez l'adulte, au repeuplement de la plupart des organes, a été démontrée. Un autre avantage potentiellement essentiel de ces cellules par rapport aux cellules souches embryonnaires est qu'elles ne sont pas tumorigènes. Il est possible de les injecter ou de les greffer à un organisme adulte sans dommage alors que, dans les mêmes conditions, des cellules ES indifférenciées engendreraient des tératocarcinomes.

Il semble donc que persiste chez les mammifères, y compris *Homo sapiens*, un potentiel régénératif bien plus important qu'on ne le craignait. En cela, l'homme peut-il être plutôt comparé à l'hydre ou à la salamandre ? En d'autres termes, ces cellules souches somatiques, que Catherine Verfaillie appelle les progéniteurs adultes multipotents, pré-existent-ils, comme chez les plathelminthes ou les hydres, ou sont-ils engendrés en réponse à des stimulus régénératifs ?

En fait, il n'est à ce jour pas possible de répondre à cette question, encore que je ferais bien le pari que notre ressemblance avec la salamandre l'emporte sur celle avec l'hydre. S'il en est bien ainsi, l'on peut craindre que les progrès escomptés dans la maîtrise de ce processus ne permettent pas aisément de transformer la décapitation en un processus réversible. Mon sentiment vient des conditions dans lesquelles apparaissent les MAPCs (*Multipotent Adult Progenitors Cells*) de Catherine Verfaillie. Ce n'est qu'après environ quatre semaines de mise en culture de cellules indistinguables des progéniteurs mésenchymateux, et environ vingt-cinq doublements, qu'apparaissent ces cellules aux étonnantes capacités. Ce phénomène est à rapprocher de la dé-différenciation à l'origine de la constitution du blastème régénératif des amphibiens, structure dans laquelle les progéniteurs mésenchymateux semblent justement jouer un rôle essentiel.

Au total, il apparaît que nous n'en sommes encore qu'aux balbutiements de cette exploration des phénomènes persistants de régénération chez les mammifères, l'homme en particulier. Les questions fondamentales et pratiques restent innombrables. Quel rôle jouent, en physiologie et en pathologie, ces cellules souches somatiques multipotentes ? Pré-existent-elles, ou bien sont-elles engendrées par un processus de dé-différenciation à partir d'une population de type mésenchymateux ? Leur nombre potentiel, ou bien la capacité de les obtenir à partir d'une population mésenchymateuse, décroît-il au cours de la vie ? Dans ce cas, ce phénomène intervient-il dans la sénescence ? Serait-il en pratique possible d'isoler de telles cellules chez des adultes malades, et de les utiliser chez eux à des fins de médecine régénératrice ? Ou bien, la préparation de telles populations à des fins thérapeutiques étant longue et difficile, de plus en plus incertaine à mesure que vieillissent les donneurs, faudra-t-il envisager d'en garder en réserve à partir de prélèvements systématiques effectués précocement dans la vie ?

Les quelques observations selon lesquelles de telles cellules pourraient répondre à des signaux en provenance des tissus lésés afin de s'y domicilier et de les régénérer seront-elles confirmées, et dans ce cas ce phénomène sera-t-il généralisable à tous les organes? Quel sera, dans l'avenir, le champ des maladies accessibles à la thérapie cellulaire régénératrice et, quelle part respective joueront alors les cellules souches embryonnaires et les cellules souches somatiques multipotentes ?

Autant de questions auxquelles nous ne pourrons apporter de réponses que progressivement. Peut-être certaines émergeront-elles à l'occasion de cette XIX^e Journée Jean-Claude Dreyfus consacrée aux cellules souches ?

Résumés des communications orales

Établissement du système hématopoïétique chez l'embryon de souris.

A. Cumano, J. Bertrand et I. Godin.

Unité du développement des lymphocytes. INSTITUT PASTEUR - PARIS - FRANCE.

Les cellules hématopoïétiques souches (CHS) sont fondamentales au maintien de la production de cellules sanguines. Les CHS se divisent et différencient dans les organes hématopoïétiques qui fournissent les facteurs environnementaux qui soutiennent l'auto renouvellement et la différenciation de ces cellules. On connaît bien que les CHS ou leurs précurseurs directs ne sont pas générés dans les organes hématopoïétiques (foie fœtal, moelle osseuse, thymus et rate) mais qu'elles ont une origine exogène.

Pendant le développement embryonnaire de la souris, le sac vitellin (SV) contient du mésoderme et de l'endoderme primitif alors que l'embryon est formé à partir des trois feuillets qui s'établissent pendant la gastrulation. L'aorte se développe à partir du mésoderme intra-embryonnaire, dénommé la splanchnopleure (Sp), les ébauches du mésonéphros, du mésentère et des gonades apparaissent après le 10^e jour de la gestation et cette région a alors été appelée AGM (Aorte, Gonades, Mésonéphros).

Les premières cellules hématopoïétiques qu'on puisse identifier chez l'embryon sont détectables dans les îlots sanguins du SV. La majorité de ces cellules appartiennent à la lignée érythrocytaire primitive. Nous avons identifié l'origine des précurseurs de l'hématopoïèse définitive, chez l'embryon de souris. Nous avons montré que, des précurseurs hématopoïétiques intra-embryonnaires dérivait de la Sp/AGM isolée du SV, avant l'établissement de la circulation entre le SV et le corps embryonnaire ; ces précurseurs sont donc générés *in situ*. De façon intéressante, au contraire de ce qui se passe dans la Sp/AGM, le SV était incapable de générer des cellules lymphoïdes.

Les cellules hématopoïétiques ont donc deux origines indépendantes. La première apparaît dans le SV et est plutôt orientée vers la production d'érythrocytes primitifs. La deuxième génération apparaît dans le mésenchyme autour de l'aorte. Dans d'autres espèces, à savoir, les Amphibiens, les Oiseaux, la Souris et l'Homme, une génération hématopoïétique intra-embryonnaire a été identifiée.

Alors que la Sp/AGM est le lieu de génération de CHS entre les 9.5 et 12.5^e jours de la gestation, nous avons montré qu'il ne soutient pas une différenciation hématopoïétique. Les précurseurs dans cette région constituent une cohorte de cellules hématopoïétiques indifférenciées accessibles à caractérisation.

Avant l'établissement de la circulation, les précurseurs issus du SV aussi bien que de la Sp/AGM sont incapables de reconstituer le système hématopoïétique de receveurs irradiés. Nous avons utilisé un système de transfert comparatif où nous avons utilisé comme receveurs, soit des souris sans lymphocytes ($Rag2^{-/-}$) ou bien des doubles mutantes aussi déficientes en cellules NK ($Rag2\gamma c^{-/-}$). Six à huit mois après transplantation, nous avons observé de la reconstitution à long terme de souris $Rag2\gamma c^{-/-}$, injectées avec des cellules de la Sp. Les souris injectées avec du SV ont été reconstituées transitoirement dans le compartiment myéloïde.

Les résultats que nous venons de décrire établissent que les précurseurs du mésoderme intra-embryonnaire sont les seuls capables de reconstituer à long terme l'hématopoïèse d'animaux adultes. Il s'agit donc des CHS. Les cellules du SV sont apparemment dépourvues de ce potentiel, ce qui met en cause l'hypothèse d'une deuxième génération de CHS dans le SV.

The essential roles of SDF-1/CXCR4 interactions in human stem cell homing and mobilization in transplanted NOD/SCID mice.

Tsvee Lapidot

Dept. of Immunology, The Weizmann Institute Rehovot, ISRAËL

Transplanted hematopoietic stem cells migrate in blood vessels, home to the recipient bone marrow and repopulate the marrow microenvironment with high levels of immature and maturing myeloid and lymphoid cells, followed by a continuous release of maturing cells and also low levels of progenitors back into the circulation. Stem cell migration and development involve interplay between chemokines, cytokines, adhesion molecules, proteolytic enzymes and stromal cells. The chemokine SDF-1 is constitutively expressed by the bone marrow endothelium, suggesting a major role for this CXCR4 ligand in control of leukocyte trafficking. Human and murine SDF-1 differ in one amino acid and are cross-reactive. Transplantation of enriched human CD34⁺ stem cells obtained from G-CSF mobilized PBL (MPBL), bone marrow (BM) or cord blood (CB), into immune deficient NOD/SCID mice, supports SDF-1 mediated homing to the murine BM, as well as ongoing proliferation and high levels multilineage differentiation of the engrafted stem cells into both myeloid and lymphoid cells while maintaining the potential to repeat the entire process in serially transplanted B2mnull NOD/SCID mice. Administration of neutralizing anti human CXCR4 antibodies block both stem cell homing and repopulation in transplanted NOD/SCID mice. Similarly, migration of human progenitors into the murine liver and their trans-differentiation into human hepatocytes is also dependent on SDF-1/CXCR4 interactions. Enriched human CD34⁺ cells which do not express surface CXCR4 harbor internal CXCR4 which can rapidly express on the surface and mediate limited homing and repopulation in response to SDF-1 signaling in transplanted mice. Stimulation with high doses of SDF-1 lead to CXCR4 internalization within a few hours, while 24-48hr. in vitro stimulation with cytokines such as SCF and IL-6 increase both surface and internal CXCR4 levels, SDF-1 mediated migration, homing and repopulation. Bone marrow endothelium bound SDF-1 mediates arrest of CXCR4⁺ human progenitors under shear flow conditions by activating the major adhesion molecules LFA-1, VLA-4, VLA-5 and CD44 which are essential for trans-endothelial migration and in vivo homing and repopulation. Human stem cells engrafted in the murine bone marrow continuously release low levels of CD34⁺ progenitors and maturing cells into the blood circulation. Neutralizing anti human CXCR4 antibodies administered to engrafted mice, also blocked release of human cells into the blood circulation and spleen, but did not reduce the levels of human engraftment in the murine bone marrow, demonstrating involvement of SDF-1/CXCR4 interactions also in steady state release of progenitors. Daily stimulation's with the cytokine G-CSF with and without chemotherapy drugs such as Cyclophosphamide for 4-6 days dramatically increase the levels of stem and progenitor cells in the circulation, a process termed mobilization. Stem cell mobilization is widely used for clinical transplantation, however the mechanism is poorly understood. Stimulation with G-CSF induced

mobilization of both human and murine progenitors in transplanted NOD/CID and Balb/c mice respectively. G-CSF induced a reduction of the chemokine SDF-1 and an increase in its receptor CXCR4 in the bone marrow, whereas their protein expression in the blood was less affected. The gradual decrease of BM SDF-1 correlated with stem cell mobilization and was mostly due to its degradation by neutrophil elastase, as elastase inhibition reduced both activities. Human and murine stem cell mobilization was inhibited by neutralizing CXCR4 or SDF-1 antibodies, demonstrating SDF-1/CXCR4 signaling in cell egress. We suggest manipulation of SDF-1/CXCR4 interactions to control the navigation of progenitors between the BM and blood to improve the outcome of clinical stem cell transplantation.

Modulation de la télomérase dans les leucémies et les progéniteurs hématopoïétiques.

Annelise Bennaceur-Griscelli

Inserm U 362, IFR54, Institut Gustave Roussy. PARIS - FRANCE

abenna@igr.fr

La taille des télomères à l'extrémité 3' de l'ADN chromosomique constitue une "horloge mitotique" limitant les capacités prolifératives des cellules somatiques lorsque certaines fonctions télomériques sont perdues. La longueur des télomères qui est spécifique de chaque espèce et de chaque chromosome résulte d'un équilibre dynamique entre l'élongation et la dégradation qui est contrôlé par de nombreux gènes. La dégradation progressive des télomères est associée à la réplication incomplète de l'ADN, chaque mitose entraînant un raccourcissement des télomères de 50 à 100pb jusqu'à un seuil critique signalant un arrêt de prolifération cellulaire et apoptose. Chez la plupart des eucaryotes, cette perte télomérique est corrigée essentiellement, mais non exclusivement, par la télomérase, une transcriptase inverse dont l'activité dépend d'autres protéines (dyskérine, PIN-X1). Celle-ci est très active dans les cellules embryonnaires et fœtales, et s'éteint dans les tissus adultes, sauf dans les cellules souches et les lymphocytes ayant des capacités d'autorenouvellement. Les progéniteurs CD34⁺ humains ont une activité télomérase élevée qui augmente lors de leur mise en cycle. Néanmoins, le stress réplicatif généré lors de la reconstitution hématopoïétique après greffe de CSH entraîne un raccourcissement des télomères au niveau des cellules hématopoïétiques du greffon, raccourcissement d'autant plus important que le nombre de CSH transplantées est faible. De même, un raccourcissement des télomères des cellules hématopoïétiques est observé au cours de l'ontogénèse. Ces résultats suggèrent d'une part que l'activité télomérase est partiellement inefficace ou alors présente seulement dans une minorité de cellules et, d'autre part, qu'elle joue un rôle important dans les capacités d'autorenouvellement des cellules souches. Cette hypothèse est renforcée par le fait qu'une mutation de l'ARN matrice de la télomérase ou de la dyskérine serait responsable de l'aplasie médullaire dans la dyskeratose congénitale. Il existe donc un lien entre longueur des télomères, télomérase et autorenouvellement, mais jusqu'à présent, il n'y a pas de preuve que les cellules souches qui ont les télomères les plus courts sont celles qui entrent en différenciation et assurent l'hématopoïèse à court terme. Cette démonstration est d'autant plus difficile à apporter que ce n'est pas la longueur moyenne des télomères, mais le chromosome ayant le télomère le plus court qui pourrait être responsable de la perte de fonction, de l'instabilité génétique et de la sénescence d'une cellule.

L'expression de la télomérase est également corrélée au phénotype immortel des cellules tumorales. Elle constitue une étape clé dans le processus néoplasique et en fait une cible thérapeutique de choix dans la plupart des cancers.

Nous étudions le rôle précis de la télomérase et des télomères (taille et structure) dans la régulation des potentiels de prolifération et de différenciation des progéniteurs hématopoïétiques ainsi que l'effet thérapeutique potentiel de l'inactivation de la télomérase dans les modèles de leucémies. Des vecteurs rétroviraux et lentiviraux bicistroniques e-GFP, exprimant soit la sous-unité catalytique de la télomérase (hTERT) soit un dominant négatif (DN-hTERT) ont été construits dans l'approche d'inactiver ou de surexprimer la télomérase dans les progéniteurs CD34⁺ de sang de cordon, ainsi que dans les lignées leucémiques, U937 et UT-7. Une inactivation complète de la télomérase par le DN-hTERT a été observée dans la majorité des clones leucémiques (77 % des clones U937 et 63 % des clones UT-7) entraînant un raccourcissement drastique des télomères après 15-35 jours de doublement de population avec des signes de sénescence et d'instabilité cytogénétique des anomalies de la mitose (aneuploïdie, désorganisation de la tubuline) puis une mort cellulaire. La sur-expression de hTERT dans ces lignées induit une augmentation de l'activité télomérase mesurée par le test semi-quantitatif TRAP avec un allongement des télomères, sans conséquences sur la prolifération.

Néanmoins, à plus long terme (J50 de l'infection), 50 % des clones DN-hTERT UT-7 (6 sur 11) et U937 (8 sur 18) sont capables d'échapper à la mort cellulaire, en réactivant fortement la télomérase, de rallonger les télomères et de récupérer une croissance cellulaire normale. Parmi les mécanismes d'échappement, la délétion du transgène liée à l'instabilité cytogénétique majeure (fusions chromosomiques, délétions multiples au caryotype) est l'événement préférentiel. De façon plus intéressante, un échappement a été observé pour un clone malgré la persistance de l'expression du transgène (PCR positive et expression de la protéine e-GFP) suite à l'activation transcriptionnelle du gène hTERT endogène, objectivée par RT-PCR quantitative au moment de la phase d'instabilité génétique. Cette trans-activation dont les mécanismes restent à être élucidés est indépendante des facteurs de transcription c-Myc et Sp-1 ou d'une amplification génique. L'ensemble de ces résultats montre que les stratégies anti-tumorales basée sur l'inhibition de la télomérase sont applicables aux cellules leucémiques au même titre que les tumeurs solides, ce qui n'avait pas été démontré jusqu'à maintenant. Néanmoins, l'instabilité cytogénétique induite par le raccourcissement des télomères peut être à l'origine de l'émergence de rares clones résistants, ce qui amène à proposer l'association de plusieurs agents anti-télomérase, à modes d'action différents.

L'expression DN-hTERT par un lentivirus dans les cellules CD34⁺ du sang de cordon induit l'extinction de l'activité télomérase à l'issue de 14 jours de culture en présence de SCF, IL3, TPO et FLT3-L tandis que la sur-expression de hTERT induit son augmentation d'un facteur 3 (141 unités TPG dans les cellules GFP⁺hTERT⁺ et 50 dans les cellules contrôles GFP⁺). La proportion en progéniteurs clonogéniques CFC (BFU-e et CFU GM) d'emblée dans les cellules CD34⁺ après transfection a été évaluée par les tests clonogéniques en méthylcellulose en présence de SCF, IL-3, GM-CSF et EPO. L'inactivation de la télomérase entraîne une diminution significative du nombre de CFC (60±39 versus 90±46 pour 1000 cellules CD34⁺, n=9, p=0.005) sans affecter la taille des colonies ni leurs potentiels de différenciation. En revanche, la sur-expression de hTERT n'a pas d'effet sur la clonogénicité (proportion de CFC identique), mais favorise l'expression des colonies BFU-e aux dépens des CFU-GM (66 BFU-e versus 52 dans les cellules contrôles, n= 7, p=0.02).

L'influence de la taille des télomères sur les fonctions primitives (potentiel LTC-IC, pluripotence B / Myéloïde / NK et reconstitution des souris NOD-SCID) des cellules CD34⁺CD38^{low} soumises à prolifération est en cours d'exploration.

Transfert de gènes dans les cellules souches hématopoïétiques humaines

Anne Dubart-Kupperschmitt

Institut Cochin (Inserm U 567 - CNRS 8104 – Université Paris 5), PARIS - FRANCE

L'intérêt du transfert de gènes dans les cellules souches hématopoïétiques (CSH) humaines est majeur tant du point de vue de la recherche fondamentale que du point de vue de ses applications potentielles en thérapie génique. D'une part, les CSH sont à l'origine de toutes les cellules différenciées du sang circulant et assurent leur renouvellement permanent et régulé au cours de la vie, tout en offrant des possibilités considérables d'adaptation à des accidents hématopoïétiques variés (anémie, hémorragies, infections bactériennes ou virales, parasitoses, ...). Elles représentent donc un modèle passionnant de régulation de la prolifération et de la différenciation cellulaires. D'autre part, et du fait de leurs propriétés, elles sont la cible du transfert de gène à visée de thérapie génique puisqu'elles seules peuvent à long terme assurer la pérennité du transgène dans l'ensemble du tissu hématopoïétique et qu'elles sont aussi le siège des transformations leucémiques.

Les caractéristiques de ces cellules imposent des contraintes particulières aux techniques de transfert de gènes: Ces CSH sont très rares et en petit nombre dans la moelle osseuse où elles résident et l'on sait les enrichir mais pas les purifier, il faut donc une technique de transfert de gènes très efficace.

Elles ont une très grande capacité de prolifération, il faut donc que le transgène soit intégré à leur génome pour être transmis à leur descendance. Ces contraintes ont très vite imposé l'utilisation de vecteurs rétroviraux, tels ceux qui sont dérivés du virus de Moloney, pour le transfert de gènes dans les CSH, en raison de leurs capacités infectieuses et de leur propriété d'intégrer leur génome à celui de leur cellule cible. Cependant, ces vecteurs ne peuvent intégrer leur génome dans celui de leur cellule cible qu'au cours de la mitose, quand la membrane nucléaire disparaît. Or, les CSH humaines sont majoritairement quiescentes ce qui limite largement leur transduction par ce type de vecteurs. De nouveaux vecteurs rétroviraux, dérivés des lentivirus, se sont alors imposés. En effet, les rétrovirus de la famille des lentivirus, à laquelle appartient le VIH, ont la capacité de s'intégrer dans le génome de cellules qui ne sont pas en cycle, contrairement aux onco-rétrovirus murins de type Moloney. Les premiers vecteurs rétroviraux utilisés, très peu modifiés par rapport au VIH, transduisaient effectivement des cellules hors cycle et des CSH humaines. Mais ces vecteurs peu défectifs laissaient la possibilité d'émergence de virus recombinants compétents pour la réplication, ce qui rendait leur utilisation en thérapie génique inenvisageable. Les vecteurs plus défectifs semblaient, eux, perdre leur efficacité. P. Charneau, à l'Institut Pasteur, avait démontré l'importance de la structure triplex centrale du VIH pour l'import nucléaire du génome viral (Zennou, *Cell*, 2000). En collaboration avec lui, nous avons démontré que l'introduction de cette structure dans un vecteur lentiviral entièrement délété des

séquences virales codantes compensait le défaut d'import nucléaire du génome observé avec ce dernier. De plus nous avons démontré que ce vecteur transduisait avec la même remarquable efficacité, toute la hiérarchie des cellules hématopoïétiques qu'il soit possible de tester à l'heure actuelle (NOD-SCID-RC, LTC-IC, lymphocytes T, B, NK et tous les types de cellules myéloïdes) (Sirven, *Blood*, 2000). Enfin, pour obtenir une expression optimale du transgène nous avons délété la région U3 de la LTR 3' pour supprimer totalement l'activité transcriptionnelle résiduelle du vecteur dans les cellules cibles et placé le transgène sous la dépendance transcriptionnelle du promoteur d'EF1 α , un facteur ubiquitaire d'élongation de la traduction. Nous obtenons ainsi une expression forte et homogène du transgène dans toutes les cellules hématopoïétiques y compris les CSH et les lymphocytes T dérivés des cellules CD34 transduites dans lesquelles le vecteur TRIP ne permettait pas une expression efficace (Sirven, *Mol Ther*, 2001). Enfin, des modifications du protocole de transduction nous permettent d'obtenir maintenant, en routine, la transduction de plus de 90% des cellules CD34+ de sang de cordon, mais aussi plus de 75 % de transduction des cellules CD34+ adultes de la moelle osseuse ou mobilisées dans le sang périphérique (Amsellem, soumis). Nous disposons donc, avec le vecteur TRIP Δ U3-EF1 α , d'un outil très efficace pour transduire les CSH, mais les améliorations du vecteur sont constantes et continues : nous avons développé récemment un vecteur contenant un IRES/EGFP qui permet d'identifier et de suivre le devenir des cellules transduites en détectant l'expression du transgène. De plus, nous développons maintenant des vecteurs lentiviraux pour exprimer des RNAi.

Cependant, l'outil rétroviral dont nous disposons nous permet d'ores et déjà d'étudier efficacement des aspects fondamentaux de la régulation de l'hématopoïèse avec l'étude fonctionnelle de facteurs de transcription, et d'aborder des applications du transfert de gènes à la thérapie génique.

Le premier projet à visée de thérapie génique concerne le ciblage d'une protéine transgénique dans les granules alpha des mégacaryocytes et des plaquettes. Le but est de permettre la sécrétion régulée, sous la dépendance de signaux physiologiques, de protéines transgéniques thérapeutiques stockées dans les granules de sécrétion. Les corollaires sont 1) qu'il faut identifier les signaux, non connus à l'heure actuelle, de la localisation d'une protéine dans ces granules de sécrétion. 2) Dans une perspective de thérapie génique qui s'inscrit dans la durée, il faut, pour assurer la pérennité du transgène, transduire les cellules souches hématopoïétiques. 3) Il faudra par conséquent restreindre l'expression du transgène à la lignée mégacaryocytaire pour éviter son expression dans les cellules hématopoïétiques dépourvues de granules de stockage. Nous avons réalisé une construction rétrovirale contenant la construction de ciblage consistant en la fusion des séquences codantes du PF4, protéine spécifique des granules alpha des mégacaryocytes, et de la GFP. La transduction de cellules CD34+ de sang de cordon et leur différenciation *in vitro* en mégacaryocytes nous a permis de démontrer que le PF4 est capable d'emmener la GFP dans des granules de sécrétion, et que la protéine fusion est relarguée, lors de l'activation des mégacaryocytes par la thrombine. Nous allons maintenant essayer de cibler l'expression de la protéine fusion PF4/GFP dans la lignée mégacaryocytaire en la plaçant sous la dépendance transcriptionnelle du promoteur spécifique de ce type cellulaire. Nous voulons également cerner le signal d'adressage au granule alpha en réalisant des délétions progressives de PF4. Le vecteur final sera utilisé pour l'application à un modèle de

thérapie génique de l'hémophilie B. En effet, les plaquettes s'agrègent et s'activent, en libérant le contenu de leurs granules alpha, aux sites où les facteurs de la coagulation sont nécessaires. Il semble donc tout à fait intéressant de faire sécréter brutalement par les plaquettes, lors de leur activation, le facteur de la coagulation manquant chez un hémophile. Nous clonerons donc, dans le vecteur défini par les expériences préliminaires, le facteur IX de la coagulation humain.

L'autre projet de thérapie génique, développé en collaboration avec l'équipe de N. Cartier et P. Aubourg à Saint Vincent de Paul, concerne l'adrénoleucodystrophie. Il sera exposé dans une autre présentation au cours de cette journée.

Parmi les facteurs de transcription auxquels nous nous intéressons, le mieux connu est TAL/SCL, une bHLH dont le rôle indispensable dans l'hématopoïèse a été très bien documenté chez la souris mais n'est cependant pas établi chez l'homme. Ce facteur est, de plus, impliqué dans la leucémogénèse T chez l'homme à la différence de la souris. En effet, les modèles de souris transgéniques exprimant TAL à des stades plus ou moins précoces de l'hématopoïèse ont échoué à induire des leucémies T. Ce n'est que depuis très récemment qu'on dispose chez l'homme des outils permettant la différenciation vers les lignées lymphoïdes, de l'accès à un modèle *in vivo* pour l'étude des étapes précoces de l'hématopoïèse humaine et de vecteurs efficaces pour transduire les CSH humaines. Nous étudions maintenant l'hématopoïèse dérivée des cellules CD34+ humaines transduites par des vecteurs lentiviraux exprimant TAL, ou un mutant de TAL délété de son domaine de fixation à l'ADN (Δ bTAL), au cours de la différenciation des lignées rouge et mégacaryocytaire, et bien sûr de la différenciation T dans des expériences de reconstitution à long terme d'une hématopoïèse humaine dans la moelle des souris NOD-SCID. Nos premiers résultats montrent que le domaine de liaison à l'ADN de TAL n'est pas toujours nécessaire à son action puisque nous observons le même effet de TAL et de son mutant sur la prolifération des cellules CD34+ mais des effets différents au cours de la différenciation vers les lignées érythrocytaire et mégacaryocytaire. En effet, la surexpression de TAL dans ces lignées entraîne une augmentation de la différenciation, alors que Δ bTAL qui n'a plus le domaine de liaison à l'ADN a l'effet inverse. Par contre, dans la lignée lymphocytaire B, ce domaine de liaison à l'ADN ne semble pas indispensable, TAL et Δ bTAL ont le même effet : une diminution drastique de la quantité de lymphocytes B produits. Ce résultat est cohérent avec l'hypothèse d'une titration de la protéine E2A, indispensable à la différenciation des lymphocytes B, par la protéine TAL surexprimée. En ce qui concerne la différenciation lymphocytaire T, les résultats sont encore trop préliminaires, mais nous étudions cette différenciation à la fois par la technique maintenant classique de culture organotypique de thymus fœtaux (FTOC) de souris NOD-SCID, mais nous développons aussi un nouveau modèle de lymphopoïèse T humaine *in vivo*, après xénogreffe dans la souris NODSCID.

Ce modèle a l'avantage de permettre une étude sur un temps plus long et aboutira peut-être à un modèle de leucémogénèse T humaine *in vivo* par greffe de CSH humaines transduites avec le vecteur lentiviral codant TAL/SCL.

Interactions épithélio-mésenchymateuses dans le développement rénal

Brigitte Lelongt

U.489 Inserm, Hôpital Tenon, PARIS - FRANCE

Le rein adulte est un organe particulièrement complexe, formé d'au moins 26 types cellulaires différents. Cette diversité cellulaire, de même que les diverses étapes de l'embryogenèse rénale, mettent en question l'existence d'une population unique de cellules souches, qui donnerait naissance aux différentes structures du néphron.

Chez les vertébrés supérieurs, le développement rénal s'effectue en trois stades successifs, le long d'un axe crânio-caudal : le pronéphros, le mésonéphros, enfin le métanéphros d'où dérive le rein définitif des reptiles, des oiseaux et des mammifères. Dans toutes les espèces, le canal néphrique est formé dans le mésoderme intermédiaire en même temps que les tubules pronéphriques par un processus de conversion de mésenchyme en épithélium. Il va ensuite migrer à partir du pronéphros et induire la formation d'une série de tubules qui vont fusionner avec le canal mésonéphrique formant ainsi le mésonéphros. Le pronéphros est rudimentaire et n'est fonctionnel que chez les poissons et les amphibiens. En revanche, le mésonéphros est un organe plus complexe, constituant le rein définitif des vertébrés inférieurs. Chez les vertébrés supérieurs, le mésonéphros commence à régresser par apoptose au moment où apparaît le métanéphros qui est formé lorsque le bourgeon urétéral, excroissance de l'extrémité distale du canal de Wolff, envahit un petit domaine de mésenchyme dense, le blastème métanéphrique. Le bourgeon urétéral effectue ensuite un premier branchement en forme de T pendant qu'une partie du mésenchyme métanéphrique se condense à chacune de ses extrémités distales. Chaque agrégat mésenchymateux est alors converti en épithélium et subit plusieurs étapes de maturation séquentielles conduisant à la formation des composants épithéliaux du néphron, alors que le bourgeon urétéral continue à croître et à se diviser pour engendrer l'ensemble du système collecteur.

La complexité du développement rénal passant par la formation de 3 reins successifs peut expliquer l'absence d'information précise sur les cellules souches rénales et plusieurs questions fondamentales doivent-être posées :

1- A quelle étape doit-on étudier les cellules souches rénales ?

En d'autres termes, doit-on rechercher les cellules souches rénales dans le métanéphros, en considérant que le développement rénal s'effectue lors de la conversion épithéliale des cellules du blastème métanéphrique sous l'influence du bourgeon urétéral, ou doit-on traquer les cellules souches au premier stade de développement, le pronéphros, puisque le canal néphrique, indispensable à la formation du mésonéphros puis du métanéphros, est formé à cette étape par la conversion de cellules du mésoderme en cellules épithéliales. L'origine du signal qui spécifie la formation du pronéphros commence à être déterminée chez le poisson zèbre. La position axiale et l'expression cellulaire de certains gènes tels que *WT1*, *Pax2* et *Sim1* dans le mésoderme intermédiaire prédisent le devenir des

cellules du pronéphros. Chez le poulet, l'absence d'ectoderme superficiel réduit l'expression de *Sim1* et *Pax2* dans les progéniteurs du canal néphrique et inhibe la formation du canal. L'expression de *Sim1* et *Pax2* et la formation du canal néphrique peuvent être restaurées par l'addition de BMP4, qui est produit par l'ectoderme superficiel.

2- Dans le métanéphros, existe-il des précurseurs de chacun des 4 types cellulaires principaux ?

A la première étape du développement du métanéphros, en plus des cellules du bourgeon urétéral contenant les précurseurs des cellules du système collecteur, il devrait théoriquement exister 4 types de cellules précurseurs pour les cellules épithéliales, les cellules endothéliales ou les angioblastes, les cellules musculaires lisses et les cellules stromales. Les résultats utilisant un marqueur de lignage montrent qu'il existe effectivement un compartiment pré-épithélial dans le mésenchyme métanéphrique. Qu'en est-il des autres types cellulaires ? La question n'est pas encore résolue.

3- Le rein embryonnaire et adulte peut-il être colonisé par des cellules souches extérieures ?

Il est également possible que certains types cellulaires dérivent de cellules souches rénales et d'autres de cellules souches provenant d'autres organes. Par exemple, des données récentes suggèrent que les reins embryonnaires contiennent les angioblastes. Cependant, on ne sait pas si ces angioblastes représentent une population cellulaire distincte des cellules à devenir épithélial dans le mésenchyme métanéphrique et dérivent de différentes cellules progénitrices, ou proviennent d'un autre tissu. De même, la colonisation du rein adulte par des cellules souches de la moëlle osseuse reste controversée.

4- Persiste-t-il des cellules souches dans le rein adulte ?

Cette question n'est pas résolue mais la présence de cellules souches dans le rein adulte est suggérée par les processus de réparation faisant suite à une nécrose tubulaire où des cellules adjacentes aux cellules nécrosées sont capables de se diviser rapidement et de régénérer l'épithélium.

Searching for respiratory epithelium progenitor cells within the human airway

Bruno Péault

U 506 Inserm, Villejuif, PARIS - FRANCE

Renewal of the respiratory epithelium in the steady state as well as repair ability in desepithelializing pathologies such as asthma and cystic fibrosis suggest the existence in the respiratory tract of stem cells which have not been characterized yet. In a prospective search for epithelial progenitors in the human airway mucosa, we first aimed at identifying surface markers for differentiated and mature cells, by immunocytochemistry and flow cytometry, using lectins and a wide array of antibodies to adhesion molecules, tetraspannins and molecule transporters. We have notably identified a novel subset of basal cells in the airway epithelium which express the aquaporin 3 (AQP3) water channel.

No surrogate assay in culture for the ontogeny of the human respiratory epithelium being presently available, we have mimicked the renewal of the respiratory mucosa in a SCID-hu xenochimeric mouse. In that setting, human embryonic or fetal airway rudiments implanted surgically into immuno-deficient SCID mice develop normally into a trachea or bronchus surrounded by cartilage rings and lined internally with a ciliated, pseudostratified and secretory epithelium to which numerous submucosal glands are abducted. Such human airways developed in SCID mice are also functional, secrete mucus and their surface epithelium acts as a selective barrier to ion transport. In that system we have developed an ablation/reconstitution model in which epithelium development can be resumed, following intraluminal injection of donor epithelial progenitors within human fetal airways deprived of their own native epithelium and implanted in SCID mice.

We have combined these experimental approaches and we here report, for the first time, that a subpopulation of basal cells sorted by flow cytometry from the human respiratory epithelium by expression of AQP3 and absence of the CD166 adhesion molecule can restore on the long term a normal pseudostratified, mucociliary epithelium as well as submucosal glands in the SCID-hu airway.

Epidermal stem cell

Corinne Ferraris

Centre recherché L'OREAL

Pluristratified epithelia of vertebrate skin and cornea, which share a common ectodermal embryonic origin, continuously regenerate from stem cells. Both these tissues contain two types of proliferating keratinocytes: pluripotent stem cells with a long term capacity of self-renewing and transient amplifying cells which are destined to undergo terminal differentiation after a few rounds of divisions. These latter are generally considered as irreversibly committed. The present study describes the isolation and partial characterization of a stem cell enriched human epidermal keratinocyte fraction. The fractionation was based on the criteria of a low growth factor receptor expression on the cell surface, characteristic for other stem cells types (hematopoietic stem cells). The isolation criterion was a low expression of the epidermal growth factor receptor (EGF-R^{low}). In culture conditions without feeder accessory cells, outputs obtained with the EGF- EGF-R^{low} cell population reached 10¹⁶-10¹⁷. Furthermore the EGF-R^{low} keratinocytes fraction was able to generate a fully differentiated reconstructed epidermis even at high passage numbers.

We address the question as to whether transient amplifying cells already committed to one cell lineage can activate different genetic programs in response to their environment. In the corneal epithelium, stem and transient amplifying cells are segregated into 2 separated localities- stem cells in the limbus and transient amplifying cells more central- and thus can be dissected from each other. Central adult corneal epithelium was associated with a embryonic dermis before grafting onto nude mice. The results showed that the basal cells from central cornea gave rise to a fully differentiated epidermis with pilosebaceous units. Thus transient amplifying cells already committed to one cell lineage can be reprogrammed.

Proneural genes in embryonic and adult neurogenesis

François Guillemot

IGBMC, BP10142, 67404 Illkirch cedex, ILLKIRCH - FRANCE

francois@igbmc.u-strasbg.fr

How the different cell types of the nervous system are generated remains poorly understood. Recently, neurons and glial cells have been shown to derive from multipotent progenitors with characteristics of neural stem cells. Most neurons are produced during the embryonic and perinatal periods, but neurogenesis continues in the adult in restricted regions of the forebrain. The fate of embryonic and adult progenitors can be influenced by various extracellular signals, but the nature of the transcriptional mechanisms that ultimately determine the fate of progenitors, and whether the same mechanisms operate in the embryo and the adult, is largely unknown.

A subset of neural bHLH genes have been shown to act as proneural genes to promote the selection of neural progenitor cells in the embryo. Focusing on the development of the telencephalon in the mouse as a model, we have shown that *Mash1* and *Neurogenin2* (*Ngn2*) are also involved in the lineage restriction and neuronal commitment of multipotent neural progenitors. Although they have redundant roles, *Mash1* and *Ngn2* are expressed in largely distinct progenitor populations, and both loss-of-function and gain-of-function studies demonstrate that *Mash1* and *Ngn2* induce neurons with distinct identities. Thus, proneural genes couple the selection of progenitor cells with the specification of the cell types and particular neuronal subtypes in which progenitors will differentiate.

In the adult, stem cells located in the periventricular region of the telencephalon produce a neuronal lineage that includes sequentially, transit amplifying progenitors, neuroblasts migrating to the olfactory bulb, and interneurons. Both *Mash1* and *Ngn2* are expressed in subsets of rapidly dividing progenitors, revealing a molecular heterogeneity in this lineage. Neurospheres derived from the periventricular region of *Mash1* mutant neonates produce drastically reduced numbers of neurons and oligodendrocytes, indicating that *Mash1* i) has conserved a proneural function in postnatal progenitors, and ii) is involved in the generation of both neurons and oligodendrocytes in this system. This result suggests that *Mash1* expression alone is not sufficient to commit cells to a neuronal fate, and that other signals must be involved in the choice between neuronal and glial fates. In agreement with this idea, *Mash1*⁺ progenitors isolated from the brain of *Mash1::LacZ* transgenic mice, have the capacity to generate neurospheres which can differentiate into neurons, oligodendrocytes and astrocytes.

In conclusion, proneural genes have a central role in cell fate specification in the nervous system, by integrating neurogenic and gliogenic cues and cooperating with other determinants to specify temporally and spatially appropriate differentiation programmes.

Molecular control of cell migration in adult neurogenesis

Harold Cremer

IBDM, NMDA (UMR 6156), MARSEILLE - FRANCE

Over the past years it has become clear that new neural cells, generated by stem cell populations located in the subventricular and/or ventricular zones, continue to be added to particular regions of the adult nervous system. This adult neurogenesis is most obvious in the rodent forebrain, where large numbers of new neuronal precursors are generated and migrate from their place of birth, the subventricular zone (SVZ), into the olfactory bulb (OB). During this migration they follow a well-defined pathway, the rostral migratory stream (RMS) and use a particular mode of translocation in a chain like organization. A particular feature of this pathway is that the migratory chains are separated from the surrounding parenchyma by tunnels of specialized astrocytes. After their arrival in the OB, the neuronal precursors react to a so far unidentified signal, to change from tangential chain migration to individual radial migration before their differentiation into GABAergic neurons of the granule and periglomerular layers.

Recently, this biological system attracted considerable attention. On one hand, the available data suggests that adult neurogenesis relies, at least in part, on molecules and mechanisms that are also used during embryonic development. Thus, the SVZ-RMS-OB system allows studying such mechanisms in the adult animal. A major advantage of the system is its accessibility to manipulations like *in vitro* culture assays, grafting experiments as well as genetic or pharmacological manipulations. A variety of histological markers are available and allow a detailed morphological analysis after such interventions. Thus, the system is an interesting model to study generation, migration, differentiation and integration into functional circuits of new neuronal cells. On the other hand, the system harbours an important reservoir of stem cell and progenitor populations that could be used for repair following neurodegenerative diseases or brain trauma.

Our group is interested in the molecular mechanisms that regulate cell migration and differentiation in this system. We found that the polysialylated form of the neural cell adhesion molecule (PSA-NCAM) is essential for chain migration of neural progenitors. Using animal models as well as *in vitro* migration assays we found that PSA-NCM is crucial for the correct bundling of neuronal precursors in migratory chains. A surprising conclusion of these findings is that PSA-NCAM, which has originally been proposed to be a factor that inhibits cell-cell interactions, acts as a promoter of cell recognition and/or adhesion in this system.

Another question that we addressed is how the migrating precursors switch from tangential chain migration to radial individual migration and subsequent differentiation as they enter the olfactory bulb. We found that in the adult mouse, strongest expression of Reelin, an extracellular molecule that has been involved in a variety of neuronal migration events, is found in the olfactory bulb.

Furthermore, Dab1 and ApoER2, two components of the Reelin signalling pathway, are strongly expressed by the chain migrating neuronal precursors arriving via the RMS. Using different animal models such as *reeler* (Reelin-deficient) and *scrambler* (Dab1-deficient) mice, grafting studies and in vitro cell migration assays, we demonstrated that the Reelin protein acts as a detachment signal for chain migrating neuronal precursors in the olfactory system. These findings strongly suggest comparable functions of Reelin during development.

Plasticity and mobilization of neural stem cells in the adult demyelinated CNS.

A. Baron-Van Evercooren

*INSERM U546, Institut Fédératif des Neurosciences
CHU Pitié-Salpêtrière 105 bd de l'Hôpital, 75 634, PARIS CEDEX 13 – FRANCE*

The identification of neural stem cells in the adult rodent and human CNS opens new perspectives for self repair of brain damages. Multipotent and self-renewable cells are located in the spinal cord ependyma, the hilus of the hippocampus, and the subventricular zone (SVZ) of the lateral and third ventricle of the forebrain. In vitro, cells from the adult SVZ can differentiate into neurons, astrocytes, and oligodendrocytes. In vivo, the destiny of these mitotically active cells is to migrate in a web-like pattern to the olfactory bulb, where they contribute essentially to the renewal of the granular and periglomerular neurons of the olfactory bulb. However, lesioned-derived signals are able to activate the subependymal cells. Cortical trauma triggers their migration in the lesioned cortex where they differentiate into astrocytes (Holmin *et al.*, *Eur. J. Neurosci* 9, 65-75, 1997). They also replace specific neuronal populations when loss of neurons occurs (Fallon *et al.* *PNAS* 97, 14 686-91, 2000).

We have demonstrated that focally-induced demyelination promotes mobilization of the adult SVZ cells in the white matter and differentiation in astrocytes and oligodendrocytes (Nait-Oumesmar *et al.* *Eur. J. Neurosci.* 11, 4357-66, 1999). Moreover, using experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), we have studied the behavior of the subependymal precursors in response to diffuse inflammation and multifocal demyelination. We show that EAE (i) promotes the proliferation of the subependymal precursors as well as of white matter oligodendrocyte progenitors, (ii) enhances the migration of the subependymal precursors towards the olfactory bulb and triggers their mobilization to multiple sites of the diseased white matter, and (iii) induces their differentiation in neurons, astrocytes and oligodendrocytes in the olfactory bulb (neurogenic region) but only in oligodendrocytes and astrocytes in the lesioned white (Picard-Riera, *PNAS*, 2002, *in Press*). Since neural precursors express the PSA-NCAM, a marker of cell plasticity which facilitates their migration in the RMS (Chazal *et al.*, *J. Neurosci.* 20, 7585-7590), we have studied the consequences of the loss of PSA residues on the behavior of the subventricular neural precursors in response to LPC-induced demyelination of the corpus callosum. Combining cell tracing and immunohistochemistry for cell specific markers, we showed that in the absence of PSA-NCAM or PSA, migration of the subependymal precursors was delayed, and massive accumulation and/or disruption of the neural precursor chains in the RMS enhanced their recruitment by the lesion. Moreover, the lack of PSA-NCAM or PSA favored their differentiation into the oligodendroglial fate both in the RMS and the lesion.

The adult SVZ could thus be a source of oligodendrocytes and contribute with oligodendrocyte progenitors to the replacement of oligodendrocytes in demyelinating diseases of the adult CNS. In addition, our data indicate that by preventing adhesion, the involvement of PSA residues in neural precursor plasticity is of two fold: 1) facilitate directional cell movement in the adult CNS environment,

and 2) prevent their premature differentiation maintaining the migrating cell in a stage of optimal plasticity (Decker *et al.*, *Mol. Cell. Neurosci*, 2002, 19-2, 225-238). This work was supported by INSERM-AFM. L.D and N.P are supported by FRM and Berlex respectively.

Stem Cells: From Basic Science towards Clinical Application

Dr John Sinden

Chief Scientific Officer

ReNeuron, Guildford, SURREY, U.K

Stem cell research is currently fixed at the stage of demonstrating the clinical potential of the various embryonic, fetal and adult cell types that are emerging from a variety of laboratories worldwide. "Versatile Cells against Intractable Diseases" (*Science*, News Focus, 26 July 2002) captures the popular zeitgeist. From a commercial and clinical development standpoint, however, several potentially intractable hurdles are appearing on the roadmap to clinical development. Many companies are recognising the future development of the more high-profile stem cell therapies may be at least a decade away. The major hurdles include the difficulty of obtaining sufficient quantities of human cells with requisite purity, potency and identity; a problem now publicly recognised by the commercial embryonic stem cell therapy developers. Further, the regulatory requirements for stem cells as therapeutics remain largely unexplored. Other problems that will delay embryonic stem cells as therapy include uncertainties about control of tissue-specific cellular differentiation and potential tumorigenic overgrowth.

Therefore the earliest stem cell candidates for allogeneic cellular therapy will most likely be derived from adult and fetal tissue sources. ReNeuron is developing neural stem cell derived clonal cell lines, which we believe represent the closest route to the clinic, since it builds on establish precedents in cell and gene therapy. Moreover, there is now good evidence that neural stem cell lines can induce functional efficacy in animal models of neurological disease. In this talk, I will describe the various technologies we have applied to the generation of neural stem cell clonal lines and some of the difficulties we have encountered in applying these technologies to human cells. I will demonstrate the potential of rodent and human neural stem cell lines in animal models of neurological disease developed in our laboratories over the last few years and conclude by describing a likely roadmap to the clinic, using precedents established for other cell-based therapies.

Alternative sources for human neural stem cells.

Lenora Buzanska, Krystyna Domańska-Janik

Laboratory of Molecular Neuropathology

Institute of Medical Research, Polish Academy of Sciences, POLAND

[\(kd-j@cmdik.pan.pl\)](mailto:kd-j@cmdik.pan.pl)

While stem cells from embryos (ESC) give rise to every cell type in the body cell, the repertoire of those derived from adults (ASC) has long been considered to be confined to the tissue/organ in which they reside - contributing to the tissue renewal and maintenance throughout adulthood. There are growing hopes to use stem cells of both origins to repair or replace diseased or damaged organs, leading to new treatments for incurable human disorders including those of CNS. While current data do not allow to settle the hot discussion as to the superiority of adult-versus-embryo stem cells with regard to their potential practical use, they suggest several new and promising alternatives for further research. Many laboratories have documented the capacity of human ASCs to omit tissue- restricted specifications and to undergo sc. transdifferentiation giving rise to developmentally unrelated progeny. For example, Miller & co.¹ reported last year isolation and characterisation of multipotent adult stem cells from dermis of mammalian skin. More recently, Verfaillie & co.² have identified a rare pluripotent precursor cells in bone marrow that can grow into any other cell. In a work directed toward neural differentiation, we³, and concurrently the Sanchez-Ramos's team⁴, have proven that the cells of human umbilical cord blood (HUCB) subpopulation, have capacity to transdifferentiate, giving rise to the multipotent neural precursors (NPs) that normally originate from the neuroectoderm. The HUCB-NPs, negatively selected for hematopoietic (CD34⁺) and endothelial (CD45⁺) precursor cell- specific antigens, when treated with mitogenes (EGF) displayed high potency to expand and to grow clones. About 50% of clone-forming cells express nestin- a neural stem cell marker. The expression of nestin in the growing clones was confirmed with molecular (RT-PCR) and immunohistochemical data. The progeny of these cells, in the presence of selected growth factors or in primary rat brain culture system, can differentiate into three main CNS cell types: neurones, astrocytes and oligodendrocytes (in 30%, 40% and 11% of the population respectively) as confirmed by immunocytochemical and western blot analysis. Importantly, after additional passaging, the expanded HUCB-NPs can form small, floating clusters. These clusters, after dissociation, can be transferred to new wells, where they grow in monolayer as well as form new spheres. The cultured cells do not stop dividing and maintain unchanged phenotype, caryotype and differentiation potential up to passage 20, the latest tested sofar. This high plasticity and proliferative efficiency of HUCB-NPs

¹ Toma J.G. *et al.*; 2001, *Nature Cell Biol.*, 3, 778- 784.

² Jiang Y. *at al.*; 2002, *Nature*, advance online publication, 23 June 2002 doi:10.1038/nature00870.

³ Sanchez-Ramos J. *et al.*; 2001, *Exp. Neurol.*, 171,109- 115.

⁴ Buzańska L. *et al.*; 2002, *J. Cell Sci.*, 115 (10), 2132- 2138.

render them a promising source of human neural progenitors, alternative to embryos or fetuses. Further experiments should specify their therapeutic usefulness for repopulating of injured CNS.

Thérapie génique de l'adrénoleucodystrophie par transfert de gène dans les cellules souches hématopoïétiques

Nathalie Cartier

Inserm U561 - Paris

L'adrénoleucodystrophie est la maladie génétique démyélinisante la plus fréquente. Elle est liée à l'X et concerne 1/15 000 hommes et 1/10 000 hommes et femmes. La forme cérébrale (45%), de pronostic très grave, touche les garçons, entre 5 et 12 ans chez lesquels elle entraîne une démyélinisation progressive du cerveau qui évolue vers un état végétatif ou le décès en deux à quatre ans. La forme adulte ou adrénomyélongueopathie (AMN), atteint la moelle épinière et évolue vers une paraplégie sévère, qui peut se compliquer d'atteinte cérébrale. Enfin, la moitié des femmes hétérozygotes développent, après 40 ans, des signes cliniques d'AMN qui peuvent évoluer sévèrement. L'imagerie par résonance magnétique (IRM) et les tests neuropsychologiques permettent de détecter la démyélinisation précocement, à un stade où une intervention thérapeutique est possible. Le gène de l'ALD code un transporteur ABC exprimé dans la membrane peroxysomale, qui intervient dans le transport des acides gras à très longue chaîne dans le peroxysome, qui s'accumulent dans les cellules et le plasma des patients ALD.

Le seul traitement efficace dans l'ALD est la greffe de moelle osseuse, qui permet, lorsqu'elle est réalisée à un stade précoce de l'évolution de la maladie, de stabiliser ou de faire régresser les lésions de démyélinisation. L'efficacité de la greffe est liée au renouvellement des cellules microgliales du cerveau qui dérivent des cellules souches hématopoïétiques. Elle est cependant limitée par le manque de donneurs et par les complications graves, en particulier la réaction du greffon contre l'hôte. Ces limites nous ont conduits à développer une stratégie alternative de transfert de gène à visée thérapeutique dans les cellules CD34+ de patients à l'aide de vecteurs viraux, afin de proposer une autogreffe de cellules corrigées.

Nous avons initialement démontré la faisabilité de cette approche avec un vecteur rétroviral murin classique. Jusqu'à 30% des cellules CD34+ ont ainsi été transduites et corrigées biochimiquement. Cependant, en l'absence davantage sélectif des cellules corrigées sur les cellules déficientes dans l'ALD, ce pourcentage est probablement insuffisant pour espérer un bénéfice thérapeutique chez les patients. Un vecteur lentiviral dérivé de HIV a donc été développé, dans lequel l'ADNc de l'ALD est placé sous le contrôle du promoteur ubiquitaire EF1

alpha. Les lentivirus sont en effet capables de transduire beaucoup plus efficacement les cellules hématopoïétiques, dans des conditions qui préservent mieux les capacités des cellules souches (protocoles courts, absence de préstimulation par des cytokines). Après transduction des cellules à l'aide du vecteur HIV-ALD, 56-75% des cellules CD34+ expriment la protéine ALD ainsi que les monocytes dérivés après culture à long terme. Cette expression corrige l'accumulation des acides gras à très longue chaîne dans les cellules.

Après greffe de ces cellules CD34+ transduites chez la souris SCID-NOD, la présence de monocytes macrophages humains exprimant la protéine ALD est retrouvée dans la moelle des animaux analysés 18 semaines après la greffe. Enfin et surtout, la présence de cellules microgliales humaines exprimant la protéine recombinante est démontrée dans le cerveau des animaux greffés.

Ces résultats démontrent la faisabilité de notre approche de thérapie génique de l'adrénoleucodystrophie et nous conduisent au développement d'un essai thérapeutique qui pourrait être proposé aux patients présentant une atteinte cérébrale débutante en l'absence de donneur de moelle compatible. De façon plus générale, ces données démontrent l'intérêt de l'utilisation des cellules souches hématopoïétiques pour la thérapie cellulaire et génique des maladies du système nerveux central.

Utilisation des cellules souches du sang de cordon ombilical pour la greffe chez l'homme

Eliane Gluckman

Hôpital Saint Louis (AP/HP, Université Paris VII) - PARIS

La cellule souche et son utilisation thérapeutique est un concept relativement récent lié aux progrès de la recherche sur le développement de l'embryon. On devrait dire plutôt les cellules souches car dès la fécondation, on distingue plusieurs étapes de développement :

- la première est la cellule souche totipotente quiescente et indifférenciée,
- la seconde est la cellule souche progéniteur aux propriétés d'auto renouvellement et de différenciation en différents tissus,
- enfin, la cellule souche différenciée qui ne fabrique plus que les cellules d'un tissu comme par exemple les cellules du sang ou cellules souches hématopoïétiques.

Les cellules les plus étudiées, car elles peuvent être utilisées en thérapeutique, sont les cellules souches hématopoïétiques. Au cours du développement embryonnaire, elles sont d'abord produites dans le sac vitellin puis dans la région centrale aortique de l'embryon, elles migrent ensuite dans le foie, circulent dans le sang jusqu'à la naissance puis sont ensuite produites exclusivement dans la moelle osseuse jusqu'à la fin de la vie. Ces cellules sont donc mobiles, ont une capacité de renouvellement et de différenciation très importante ce qui explique leur utilisation pour les greffes de moelle osseuse dans le traitement des maladies hématologiques.

Les propriétés des cellules souches varient en fonction de l'âge : plus les cellules sont jeunes, mieux elles se divisent et sont capables de se différencier. Leurs propriétés immunologiques sont différentes, elles entraînent moins de réaction de rejet et sont moins réactives lorsqu'elles sont greffées dans un organisme étranger.

Les cellules souches hématopoïétiques les plus souvent utilisées sont issues de la moelle osseuse prélevées chez un adulte ou un enfant et plus récemment, les cellules du sang de cordon ombilical. Ces cellules sont destinées à être greffées à des patients atteints de maladies hématologiques comme les leucémies, certaines maladies héréditaires ou liées à des arrêts de fonctionnement de la moelle osseuse, il s'agit alors de greffes allogéniques (d'un sujet à un autre). Il est possible dans certains cas de les utiliser pour soi même, on parle alors de greffe autologue.

Aujourd'hui, la greffe hématopoïétique allogénique permet de guérir plus de la moitié des patients atteints de maladies presque toujours mortelles. Les enjeux sont donc importants et chaque année en Europe plus de 10 000 patients peuvent ainsi bénéficier d'une greffe.

Les recherches actuelles s'orientent vers une meilleure utilisation des propriétés de ces cellules et l'exploration de nouvelles indications thérapeutiques

- Transplantation : traitement des leucémies, des aplasies médullaires et des maladies congénitales du système hématopoïétique et, de façon plus expérimentale, maladies auto immunes, des tumeurs solides, des maladies dégénératives et la facilitation des transplantations d'organes
- Immunothérapie anti-infectieuse et anti-tumorale
- Régénération et remplacement de cellules et de tissus : muscle, cellules nerveuses, os, cartilage etc....
- Thérapie génique
- Usine de cellules pour la fabrication de cellules ou de tissus doués de propriétés nouvelles

Notre équipe a particulièrement étudié l'utilisation des cellules de sang de cordon ombilical pour la greffe de cellules souches hématopoïétiques en situation allogénique non apparentée.

Dans ce but le groupe Eurocord a constitué une banque de cellules de sang placentaire destinée aux échanges internationaux. Actuellement plus de 100 000 unités placentaires sont ainsi stockées et disponibles. Par ailleurs, un registre des patients a été établi par Eurocord afin d'évaluer les résultats de ces greffes et de les comparer aux résultats des greffes de moelle. Nous avons ainsi pu démontrer que le sang de cordon ombilical avait un avantage de prolifération par rapport aux cellules adultes compensant ainsi le problème de la dose de cellule injectée inférieure d'1 log comparée à la dose obtenue à partir d'une moelle adulte. Le second avantage est lié à l'immatunité du système immunitaire à la naissance réduisant les risques de réaction du greffon contre l'hôte en situation HLA incompatible. Nous avons ainsi démontré que le succès des greffes de sang placentaires est lié avant tout au nombre de cellules injectées alors que les différences HLA ne jouent qu'un rôle mineur. Une analyse récente a démontré que les résultats des greffes de sang de cordon HLA incompatible dans les leucémies aiguës donnaient des résultats comparables à ceux d'une greffe de moelle HLA identique.

Cette technique permet donc d'étendre les indications de greffe aux patients n'ayant pas de donneur compatible.

Cette révolution biologique, technologique et médicale n'est pas sans poser des problèmes d'ordre législatifs, économiques et éthiques.

- Sur le plan juridique quel est le statut d'une cellule à usage thérapeutique ?

Selon les lois, il peut s'agir soit d'un déchet opératoire, d'un organe, d'un produit sanguin ou d'un médicament. Comment donc s'assurer que la cellule greffée ne transmettra pas d'agent infectieux ou une maladie héréditaire ? Comment savoir si les cellules embryonnaires ne vont pas devenir cancéreuses ? Quelles sont les précautions à prendre qui assurera leur contrôle et à quel prix ?

- Les produits du corps humain sont-ils uniques et ne peuvent en aucun cas faire l'objet de commerce et donc de profit ?

Si c'est le cas, la société accepte-t-elle de financer une recherche dans un but purement altruiste ?

Des dépôts de brevets sur les cellules humaines ainsi que la commercialisation de cellules autologues de sang de cordon ont ouvert la discussion sans qu'aucune solution n'ait été apportée. La distinction entre découverte et invention n'est pas toujours facile à cerner.

- Jusqu'ou peut-on manipuler la vie ?

Lorsqu'un enfant est malade et ne peut guérir que par une greffe de moelle que répondre à des parents qui créent un enfant dans le but de donner sa moelle ?

Que penser du diagnostic pré-implantatoire et de la naissance d'enfants dont les caractéristiques génétiques seront prédéterminées ?

Faut-il créer des embryons pour la recherche ou au contraire interdire toute recherche sur l'embryon ?

Thérapie cellulaire du diabète : Quelles cellules pour quels patients ?

François Pattou

*Inserm ERIM 0106, Faculté de Médecine, Université de Lille 2
et Service de Chirurgie générale et endocrinienne, CHR, LILLE*

fpattou@univ-lille2.fr

La thérapie cellulaire apparaît particulièrement adaptée à la correction du déficit des sécrétions endocrines. Dans le cas du diabète de type 1 ou insulino-dépendant, la transplantation ectopique d'îlots endocrines pancréatiques allogéniques permet la restauration prolongée d'une sécrétion endogène d'insuline et d'un équilibre glycémique satisfaisant sinon parfaitement physiologique, au prix d'une immunosuppression prolongée (Ryan, *Diabetes*, 2002). Une fois ces résultats récents confirmés, la thérapie cellulaire pourrait devenir une thérapeutique de choix pour les patients atteints des formes les plus sévères du diabète de type 1.

En théorie et sous réserve du développement probable de techniques permettant d'éviter l'immunosuppression du receveur (induction de tolérance spécifique, immunomodulation ou immunoprotection des cellules) cette approche thérapeutique pourrait rapidement intéresser un nombre considérable de patients atteints de diabète de type 1, voire de type 2.

En pratique, la faible disponibilité de cellules insulino-sécrétrices humaines interdit cependant pour l'instant tout espoir de développement à grande échelle de cette approche. Les îlots de Langerhans utilisés pour l'allogreffe sont en effet isolés à partir de donneurs d'organes et le faible rendement des techniques disponibles obligent dans la plupart des cas à recourir aux cellules de plusieurs donneurs pour chaque receveur. La description d'une source alternative de cellules insulino-sécrétrices moins limitée apparaît donc cruciale.

Plusieurs des approches envisagées comme la manipulation génétique de cellules somatiques, l'immortalisation de lignées cellulaires β ou l'utilisation de cellules animales, se heurtent aujourd'hui à l'extrême complexité de la régulation de la sécrétion d'insuline (Halban, *Diabetes*, 2001) et/ou aux risques potentiels liés à l'utilisation clinique de cellules transformées ou d'origine animale.

En revanche, les avancées récentes dans la compréhension du développement du pancréas permettent aujourd'hui d'envisager la production *in vitro* de cellules insulino-sécrétrices humaines (Serup, *Br Med J.*, 2001).

Sous réserve des dilemmes éthiques qu'elles soulèvent encore les cellules souches embryonnaires humaines pourraient représenter une nouvelle source de cellules homologues. L'apparition spontanée de quelques cellules insulino-sécrétrices a été décrite *in vitro* au sein des corps embryonnaires humains (Assady, *Diabetes*, 2001). Cette voie peut aussi être favorisée par des stratégies de sélection conditionnelle (Soria, *Diabetes*, 2000) ou dans les conditions de culture similaires à celles utilisés pour les cellules souches neuronales (Lumelsky, *Science*, 2001). De nombreuses inconnues persistent cependant comme la susceptibilité à la réaction allogénique et/ou

autoimmune de ces cellules qui expriment fortement les antigènes du CMH (Drukker, *PNAS*, 2002), le maintien de leur fonction *in vivo*, ou leur tumorigénicité potentielle a fortiori chez un receveur immunodéprimé.

Une autre stratégie envisageable repose sur la persistance de cellules progénitrices au sein du pancréas adulte. Différents modèles reproduisent en effet à l'âge adulte le mode de formation embryonnaire des cellules endocrines du pancréas, c'est à dire la prolifération de cellules précurseurs au sein de l'épithélium canalaire suivie de leur différenciation endocrine. Ce phénomène également appelé nésioblastose n'est pas spécifique d'espèce et existe chez l'homme dans certaines circonstances pathologiques. La capacité des cellules canalaire adultes à se différencier *in vitro* en cellules insulino-sécrétantes a été suggérée par notre équipe (Kerr-Conte, *Diabetes*, 1996), puis confirmée chez le rongeur (Ramiya, *Nature Med*, 2000) et l'homme (Bonner-Weir, *PNAS*, 2000). D'autres cellules au sein du pancréas exocrine sont également capables de ré-exprimer *in vitro* le PDX-1, un facteur de transcription indispensable à la différenciation endocrine des cellules canalaire, et dans certaines conditions de culture les marqueurs neuro endocrines (Gmyr, *Diabetes*, 2000). Dans la perspective thérapeutique, l'utilisation de cellules progénitrices somatiques permettrait d'envisager la greffe de cellules autologues, néoformées *in vitro* à partir de tissus prélevé chez le patient lui-même.

D'autres populations de cellules souches somatiques, capable d'auto renouvellement et de différenciation endocrine, ont depuis été identifiées au sein du pancréas (Zulewski, *Diabetes*, 2001), mais aussi du foie (Yang, *PNAS*, 2002) et de l'intestin (Kojimma, *Diabetes*, 2002). L'isolement de cellules souches totipotentes à partir d'autres tissus plus accessibles ouvre même des perspectives encore plus larges (Verfaillie, *Nature*, 2002).

Il est aujourd'hui difficile de prédire quand et laquelle de ces voies permettra la production de cellules insulino-sécrétrices susceptibles d'être greffées chez l'homme. Le cahier des charges est en effet particulièrement astreignant : 3 ou 4 milliards de cellules sécrétant de l'insuline humaine, parfaitement régulées dans les conditions physiologiques, si possible autologues afin d'éviter la réaction allogénique, et capables une fois greffées de rester fonctionnelles au moins quelques années malgré la persistance de la maladie auto immune. La description d'une telle source de cellules est cependant une des conditions nécessaires avant d'envisager la thérapie cellulaire comme une véritable alternative à l'insulinothérapie dans le traitement du diabète.