

Université de Montréal

**Les cytokines inflammatoires modulent la prolifération et la différenciation
in vitro des cellules souches/progénitrices de la moelle épinière**

par Alexandre Vaugeois

Département de Pathologie et biologie cellulaire, Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine en vue de
l'obtention du grade M.Sc. en Pathologie et biologie cellulaire
option système nerveux

Avril, 2013

© Alexandre Vaugeois, 2013

Résumé en français

La moelle épinière (MÉ) est essentielle pour relier les informations motrices et sensorielles entre le cerveau et la périphérie. Malheureusement, elle peut facilement être endommagée suite à un traumatisme médullaire (TM) ou des pathologies comme la sclérose en plaques. Chez les vertébrés inférieurs, tels les amphibiens, la MÉ lésée se régénère via ses cellules souches endogènes, alors que celle des mammifères démontre une très faible habileté régénératrice post-traumatique. Des travaux récents ont démontré que la MÉ des mammifères contient des cellules souches neurales latentes correspondant aux cellules épendymaires du canal central. D'autres études ont prouvé qu'à la suite d'un TM, les cellules souches épendymaires (cSÉ) prolifèrent, migrent vers le site de la lésion et se différencient principalement en cellules gliales. Promouvoir la régénération de la MÉ endommagée via la modulation des cellules souches endogènes devient donc une voie thérapeutique intéressante. Isolant des cellules souches/progénitrices de la MÉ via la culture de neurosphères (NS), nos études *in vitro*, en présence de cytokines inflammatoires ou de milieu conditionné aux macrophages, suggèrent que la réponse inflammatoire influence fortement la prolifération et la différenciation des cSÉ. Dans l'objectif de définir le programme génétique relié à l'activation des cSÉ de la MÉ, nous avons débuté l'élaboration d'un protocole d'isolement des cSÉ à l'aide d'un modèle de souris transgénique.

Mots clés : moelle épinière, traumatisme médullaire, cellules épendymaires, cellules souches neurales, neurosphères, neuro-inflammation, cytokines, FACS.

Résumé en anglais

The spinal cord is essential to link motor and sensory information between the brain and its periphery. However, it can be easily damaged following a traumatic injury or hit by pathology such as multiple sclerosis. In lower vertebrates, such as amphibians, the spinal cord has the ability to regenerate its endogenous stem cells, contrary to mammals that have a very limited capacity of post-traumatic regeneration. Recent works have shown that mammalian spinal cord contains quiescent neural stem corresponding to the ependymal cells localized in the central canal. Following spinal cord injury, ependymal stem cells proliferate, migrate towards the injury site and mainly differentiate into glial cells. Promoting spinal cord regeneration through modulation of its endogenous stem cells can be an interesting therapeutic solution. Isolating the spinal cord stem/progenitor cells through neurosphere culture in presence of inflammatory cytokines and conditioned macrophages media, our *in vitro* studies suggest that neuro-inflammatory response modulate proliferation and differentiation of spinal cord stem/progenitor cells. In order to define the genetic program related to ependymal stem cell activation, we have started the establishment of an experimental protocol for ependymal stem cell isolation with a transgenic mouse model.

Key words: spinal cord, spinal cord injury, ependymal cells, neural stem cells, neurosphere, neuroinflammation, cytokines, FACS

Table des matières

Résumé en français	ii
Résumé en anglais.....	iii
Table des matières.....	iv
Liste des figures	vi
Liste des abréviations	vii
Dédicace.....	ix
Remerciements	x
Chapitre Premier	1
1. Introduction	2
1.1 Les cellules souches adultes de la moelle épinière	3
1.1.1 <i>Caractérisation des cellules souches adultes de la moelle épinière</i>	7
1.1.2 <i>Le micro-environnement des cellules souches de la moelle épinière</i>	10
1.1.3 <i>Les cellules souches de la MÉ chez l'Humain</i>	11
1.1.4 <i>L'avenir des cellules souches/progénitrices de la moelle épinière</i>	12
1.2 La moelle épinière et ses pathologies	13
1.2.1 <i>Les traumatismes médullaires</i>	13
1.2.2 <i>La description patho-physiologique du traumatisme médullaire</i>	14
1.2.3 <i>Les rôles de la neuro-inflammation à la suite d'un traumatisme médullaire</i>	15
1.3 Problématique, hypothèse et objectif	18
2. Procédures expérimentales	22
2.1 Animaux	22
2.2 Isolement des cellules souches/progénitrices de la moelle épinière via la culture de neurosphères	22
2.2.1 <i>Extraction de la moelle épinière via pression hydraulique</i>	22
2.2.2 <i>Dissociation de la moelle épinière et mise en culture</i>	23
2.2.3 <i>Passage de neurosphères primaires</i>	23
2.2.4 <i>Dissociation de neurosphères secondaires et différenciation</i>	24
2.2.5 <i>Traitements aux cytokines inflammatoires et milieu conditionné aux macrophages</i>	24
2.2.6 <i>Quantification des neurosphères</i>	25
2.3 Immunobuvardage de type Western	25
2.4 Immunocytochimie par fluorescence	27
2.5 Géotypage	27
2.6 Immunohistochimie par fluorescence	28
2.7 Cytométrie de flux et triage cellulaire	28
2.8 Microscopie	29
2.9 Analyse statistique	29

3. Résultats	30
3.1 Isoler les cellules souches/progénitrices de la moelle épinières via la culture de neurosphères.....	30
3.2 Des cytokines inflammatoires influencent la prolifération des cellules souches/progénitrices de la moelle épinière.....	33
3.3 Les cytokines inflammatoires modulent directement la croissance des neurosphères.....	36
3.4 Les cytokines inflammatoires modulent la différenciation <i>in vitro</i> des cellules souches/progénitrices de la moelle épinière.....	38
3.5 Le milieu conditionné aux macrophages module la prolifération et la différenciation des cellules souches/progénitrices de la moelle épinière.	41
3.6 Établissement d'un protocole expérimental visant à isoler les cellules épendymaires de la moelle épinière.	44
4. Discussion	49
4.1 La culture de neurosphères : une méthode appropriée pour étudier les cellules souches/progénitrices de la moelle épinière.....	49
4.2 Les cytokines inflammatoires modulent directement la croissance des neurosphères.....	50
4.3 Les cytokines inflammatoires inhibent la différenciation gliale des cellules souches progénitrices de la MÉ <i>in vitro</i>.	52
4.5 Isolement des cellules épendymaires de la moelle épinière par FACS.....	54
5. Conclusion	56
Sources documentaires	57
Annexe 1	66

Liste des figures

1-1. Figure 1-1 Régions du SNC adulte examinées pour la présence de cellules souches activées par les facteurs de croissances (Weiss et al., 1996).	p.5
1-2. Neurosphères générées à partir d'un segment thoracique de moelle épinière adulte (Weiss et al., 1996)	p.5
1-3. Nombre de neurosphères générées par des sections de 100µm coupées au vibratome d'un segment cervical de moelle épinière (Martens et al., 2002)	p.8
1-4. Caractérisation des cellules épendymaires de la moelle épinière (Meletis et al., 2008)	p.10
1-5. Corrélation temporelle entre la cascade inflammatoire, les évènements neurodégénératifs secondaires et le recouvrement fonctionnel suite à un traumatisme médullaire chez les rongeurs (Donnely & Popovich, 2007).	p.17
3-1. Isolement des cellules souches progénitrices de la moelle épinière via la culture de NS.	p.31
3-2. Les cytokines inflammatoires influencent la croissance des neurosphères primaires.	p.34
3-3. Les cytokines inflammatoires affectent directement la croissance des neurosphères.	p.37
3-4. Les cytokines inflammatoires modulent la différenciation <i>in vitro</i> des cellules/progénitrices de la moelle épinière.	p.39
3-5. Un médium conditionné aux macrophages activés module la prolifération et la différenciation des cellules souches/progénitrice de la moelle épinière.	p.42
3-6. Caractérisation du canal central d'une souris porteuse du transgène FoxJ1-eGFP.	p.45
3-7. Isolement des cellules épendymaires de la moelle épinière via le FACS.	p.48

Liste des abréviations

µm	: micromètre
BrdU	: bromodéoxyuridine
BSA	: albumine sérique bovin (<i>bovine serum albumin</i>)
bFGF	: facteur de croissance fibroblastique de base (<i>basic fibroblast growth factor</i>)
CNPase	: 2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase
cSÉ	: cellule souche épendymaire
EDTA	: acide éthylène diamine tétra-acétique
EGF	: facteur de croissance épidermique (<i>epidermal growth factor</i>)
FBS	: sérum bovin fœtal (<i>fœtal bovine serum</i>)
FGF2	: facteur de croissance fibroblastique de type 2 (<i>fibroblast growth factor-2</i>)
GFAP	: protéine gliale acide fibrillaire (<i>glial fibrillary acidic protein</i>)
GFP	: protéine verte fluorescente (<i>green fluorescent protein</i>)
HBSS	: solution saline de Hank (<i>Hank's balanced salt solution</i>)
HRP	: peroxydase du raifort (<i>horseradish peroxydase</i>)
ICC	: immuno-cytochimie
IgG	: immunoglobuline type G
IHC	: immuno-histochimie
IL-1β	: interleukine-1- <i>bêta</i>
IL-6	: interleukine-6
MB	: milieu de culture de base
mCM	: milieu conditionné aux macrophages
MD	: milieu de différenciation
MÉ	: moelle épinière
ml	: millilitre
mM	: milli-molaire
MP	: milieu de prolifération
NaOH	: hydroxyde de sodium

ng	: nanogramme
NGS	: sérum normal de chèvre (<i>normal goat serum</i>)
n-S	: non-stimulés
NS	: neurosphère
PBS	: tampon salin phosphaté (<i>phosphate buffered saline</i>)
PBS-T	: tampon salin phosphaté avec 0,1% Triton-X 100
PCNA	: antigène nucléaire de prolifération cellulaire (<i>proliferating cell nuclear antigen</i>)
PCR	: réaction en chaîne par polymérase (<i>polymerase chain reaction</i>)
PM	: poids moléculaire
SEM	: erreur standard de moyenne (<i>standard error of the mean</i>)
SNC	: système nerveux central
STAT3	: signal transducer and activation of transcription-3
TBS-T	: tampon salin tris – Tween20 (<i>tris buffer saline-Tween20</i>)
TNF α	: <i>tumor necrosis factor-alpha</i>
WB	: immuno-buvardage de type Western

Je dédie ce travail

À ma famille,

pour leurs encouragements,

À mon cher ami Marius,

pour ses prodigieux conseils

et sa sagesse qui m'ont guidé,

À mon Amour,

pour son support et sa présence,

et surtout un modèle de discipline et d'éthique de travail

qui m'a donné l'inspiration et la persévérance

à compléter ce mémoire

Alexandre Vaugeois

Remerciements

Je tiens à remercier mon directeur de recherche, Karl Fernandes, pour m'avoir donné l'opportunité de travailler sur ce projet, pour le temps qu'il m'a accordé, ainsi que pour son encadrement et ses conseils pertinents.

Je remercie Anne Aumont qui m'a encadrée depuis mon arrivée au laboratoire, toujours disponible pour répondre à mes questions, et surtout, qui permet au laboratoire de fonctionner à merveille.

Je remercie tous les membres du laboratoire pour leurs commentaires et leurs conseils durant les longues heures de réunions hebdomadaires.

Je remercie les membres de mon comité de parrainage, Nathalie Arbour, présidente-rapporteur du jury de mon mémoire, ainsi qu'Adriana Di Polo, sans oublier tous les membres du département de pathologie et biologie cellulaire pour leur support.

Alexandre Vaugeois

Chapitre Premier

1. Introduction

Le système nerveux central (SNC), composé de l'encéphale et de la moelle épinière (MÉ), soulève de grandes interrogations depuis des siècles. C'est au tout début du XXe siècle que la recherche fondamentale en neuroscience a vu le jour grâce à Santiago Ramón y Cajal et sa description sur l'unité fonctionnelle du système nerveux, le neurone. La propriété fondamentale du neurone consiste à communiquer avec d'autres cellules à l'aide de jonctions, appelées synapses. Ces jonctions permettent une transmission rapide du signal aux cellules avec lesquelles elles sont en contact. La cellule qui reçoit le signal peut être un autre neurone qui déclenchera à son tour un potentiel d'action nécessaire à la transmission du signal. La cellule réceptrice peut aussi être une cellule qui ne fait pas partie du SNC, par exemple une cellule musculaire qui lorsqu'elle est activée répond au signal en se contractant (Kandel et al., 2000).

Cependant, les neurones ne sont pas les résidents uniques du SNC. Les cellules gliales, retrouvées à près de 90% dans le cerveau humain, ne génèrent pas de potentiel d'action, mais leurs fonctions sont tout aussi vitales pour le bon fonctionnement du SNC : support, apport nutritionnel, maintien de l'homéostasie, protection et participation à la transmission du signal. Les trois types de cellules gliales sont les oligodendrocytes, les astrocytes et les microglies. Les oligodendrocytes produisent une membrane riche en lipide qui enveloppe les axones des neurones et permettent au signal nerveux de se propager plus rapidement. Les astrocytes ont pour rôle principal de maintenir l'homéostasie dans le SNC. En étant en contact avec les vaisseaux sanguins, les astrocytes sont en mesure de contrôler l'apport en nutriments nécessaires aux neurones. En plus de jouer un rôle de barrière physique aux synapses, les astrocytes permettent un réglage précis de la neurotransmission synaptique en captant les neurotransmetteurs excédentaires. Il y a aussi les cellules immunitaires résidentes du SNC, les microglies. Ces cellules patrouillent le SNC à la recherche d'infections ou de dommages cellulaires et phagocytent les cellules mortes et les débris cellulaires. Lors du développement du SNC, les microglies modulent également la formation des synapses (Allen et Barres, 2009). Contrairement à d'autres organes, le SNC des mammifères, a longtemps été considéré comme un système post-mitotique, ayant une capacité de régénération inexistante. Ce dogme fut

modifié au début des années 1960 ; Joseph Altman avait observé à l'aide de marquage à la thymidine tritiée (thymidine- H^3) et de l'imagerie auto-radiographique des signes de prolifération cellulaire dans des cerveaux de rats ayant subi un traumatisme (Altman, 1962). Cette percée neuroscientifique fut l'élément déclencheur d'une série de découvertes qui permit d'établir que la neurogénèse se produisait dans le cerveau des vertébrés tels que les oiseaux (Goldman et Nottebohm, 1983), les rongeurs (Bayer et al., 1982), les primates (Kornack et al., 1999) et l'humain (Eriksson et al., 1998). Au cours des vingt dernières années, la compréhension de la neurogénèse adulte s'est développée à un rythme effréné. Il est maintenant bien établi dans la littérature que les deux principales niches neurogéniques chez les mammifères sont la zone sous-ventriculaire, contribuant au renouvellement des interneurons du bulbe olfactif et le gyrus dentelé de l'hippocampe (Lledo et al., 2006). En plus de ces deux sous-régions, plusieurs évidences suggèrent que la neurogénèse serait présente de manière constitutive dans d'autres régions du cerveau comme l'amygdale (Bernier et al., 2002), la substance noire (Zhao et al., 2003) et l'hypothalamus (Kokoeva et al., 2005).

Au niveau de la moelle épinière (MÉ), il existe une région dans laquelle des cellules exhibent les deux principales caractéristiques des cellules souches : la capacité d'auto-renouvellement et la multipotentialité. Les quinze dernières années de recherches ont mené à l'identification des cellules souches de la MÉ (Meletis et al., 2008; Barnabé-Heider et al., 2010) et la caractérisation de son micro-environnement (Hamilton et al., 2009). Nous devons maintenant élucider les mécanismes régulant le comportement des cellules souches de la MÉ. D'un point de vue médical à long terme, une meilleure compréhension de cette niche mènera éventuellement à l'élaboration de traitements médicaux qui auront le pouvoir par exemple de faciliter la régénération d'une MÉ lésée (Hawryluk et Felhings, 2008).

1.1 Les cellules souches adultes de la moelle épinière

Historiquement, les premières observations publiées sur l'activité mitotique dans la moelle épinière chez un modèle animal adulte ont été réalisées par Adrian et Walker (1962). En utilisant le même procédé que Joseph Altman, i.e l'injection de thymidine- H^3 , ils ont remarqué une prolifération cellulaire en induisant une lésion à la MÉ d'une souris adulte. Une

autre étude démontrait qu'un pourcentage considérable d'oligodendrocytes contenus dans la MÉ de souris adulte sont marqués à la thymidine- H^3 , signe d'une prolifération cellulaire (Kraus-Ruppert et al., 1975).

Durant les années 1990, plusieurs équipes de chercheurs ont fait avancer la recherche sur les cellules souches chez le mammifère adulte. En s'inspirant des travaux de Reynolds et al. (1992), Ray et Gage (1994) font la démonstration *in vitro* que le facteur de croissance bFGF (*basic Fibroblast Growth Factor*) a un effet mitogène chez une population cellulaire de MÉ embryonnaire exprimant un phénotype neuronal. Au même moment, une étude sur les traumatismes du SNC démontre l'induction rapide et prolongée du marqueur nestin, un filament intermédiaire caractéristique des cellules neuroépithéliales non-différenciées, et sa contribution à la formation de la cicatrice gliale à la suite d'une laminectomie (Frisén et al., 1995). Le marqueur *nestin* avait été identifié chez une population cellulaire provenant du striatum de souris adulte ayant la capacité d'auto-renouvellement et de se différencier en neurones et en cellules gliales. (Reynolds et Weiss, 1992).

En 1996, Weiss et ses collaborateurs isolèrent *in vitro* des cellules de la MÉ qui étaient capables de s'auto-renouveler et multipotentes. Pour isoler ces cellules, ils dissocièrent un segment de MÉ thoracique (Fig.1-1E, p.5) et le mit en culture en présence de deux facteurs mitogéniques : EGF (*Epidermal Growth Factor*) et bFGF (*basic Fibroblast growth factor*). Dans ces conditions de culture, une petite population de cellules généraient des sphères qui furent nommées neurosphères (NS) (Fig.1-2A, p.5). Elles étaient majoritairement composées de cellules exprimant le marqueur nestin (Fig.1-2C,D, p.5). La présence de nestin et l'absence de marqueur de différenciation ne constituaient pas une preuve assez solide pour démontrer que ces cellules prolifératives du SNC étaient des cellules souches adultes. Ils devaient prouver que ces cellules exhibaient les principales caractéristiques des cellules souches. Il y a la capacité d'auto-renouvellement qui se définit par la capacité d'une cellule à se diviser symétriquement de manière à générer une progéniture identique à elle-même. Il y a aussi la

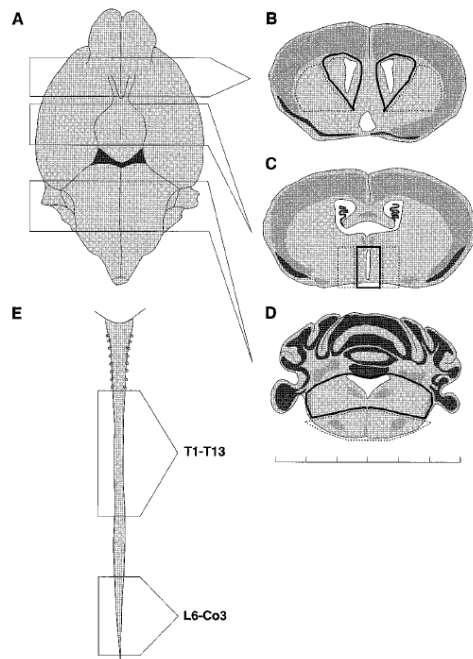


Figure 1-1 Régions du SNC adulte examinées pour la présence de cellules souches activées par les facteurs de croissances (Weiss et al., 1996). A) Vue ventrale d'un cerveau de souris adulte illustrant les sections frontales qui furent utilisées pour disséquer B) les ventricules latéraux, C) le troisième ventricule et D) le quatrième ventricule. Les traits noir foncés illustrent les régions considérées comme les ventricules. E) Moelle épinière de souris adulte, illustrant les régions thoraciques (T1-T13) et lombosacrées (L6-Co3).

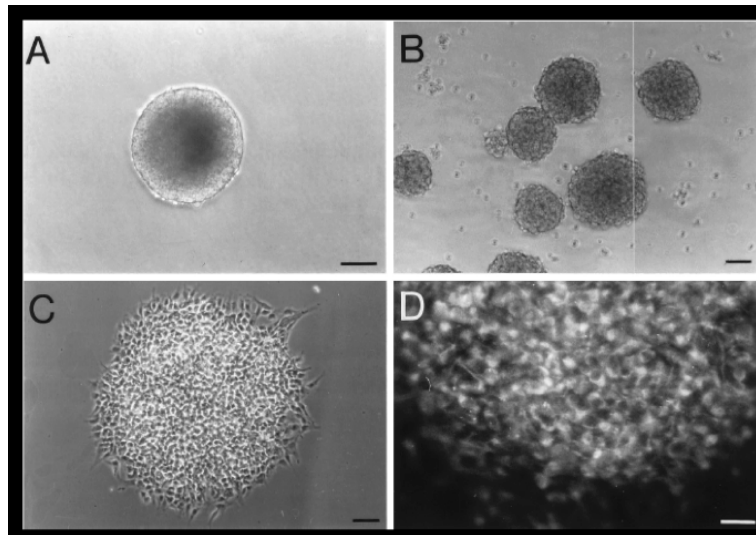


Figure 1-2 Neurosphères générées à partir d'un segment thoracique de moelle épinière adulte (Weiss et al., 1996). A) Neurosphère primaire B,C,D. Neurosphères secondaires générées à partir d'une NS primaire dissociée. C) NS secondaire exprimant le marqueur nestin. D) Grossissement d'une NS secondaire exprimant nestin. Échelle de grandeur : A, 100µm; B,C 50µm; D.30µm.

multipotentialité, c'est-à-dire une cellule ayant le pouvoir de donner une progéniture différenciée révélant des phénotypes cellulaires caractéristiques de l'organe dans lequel elle se situe (Hall et Watt, 1989).

Ils ont été en mesure de prouver qu'il s'agissait de cellules souches à l'aide d'une analyse clonale développée pour les cellules souches neurales (Stemple et Anderson, 1992; Gritti et al., 1996; Reynolds et Weiss, 1996). Il était question de démontrer qu'une cellule souche neurale pouvait s'auto-renouveler, prendre de l'expansion et que la progéniture d'un clone secondaire exhibait les mêmes propriétés que les cellules provenant de NS primaire. Tout d'abord, ils transfèrent une NS primaire dissociée sur une lame préalablement enduite de poly-L-ornithine afin de faciliter l'adhérence des cellules. En retirant les facteurs de croissance et en ajoutant du sérum, les cellules de la NS se différencient en neurones, astrocytes et oligodendrocytes. Deuxièmement, ils dissocièrent une NS primaire et déposèrent les cellules dans une plaque multi-puits à une densité de 1 cellule/puits. Un certain pourcentage de ces cellules individuelles formaient des NS secondaires qui étaient dissociées et transférées sur lames. La différenciation résultait encore une fois en une production des trois principaux types de cellules du SNC. Troisièmement, ils mirent une NS primaire dissociée en condition de culture en présence des facteurs de croissance. Il y avait alors génération de NS secondaires, une d'entre-elles était dissociée et transférée sur une lame pour éventuellement se différencier en neurones, astrocytes et oligodendrocytes (Weiss et al, 1996). Depuis la sortie de cet article, la culture de NS est devenu, malgré les limites de la technique, un outil indispensable pour étudier le comportement des cellules souches neurales *in vitro* (Singec et al., 2006; Conti et Cattaneo, 2010).

1.1.1 Caractérisation des cellules souches adultes de la moelle épinière

La prochaine étape dans la quête des cellules souches de la MÉ était la localisation de cette famille de cellules tant convoitées. Quelques études émirent l'hypothèse qu'il s'agissait probablement d'un groupe de cellules localisé au niveau du canal central. Durant l'embryogénèse, les cellules souches neurales identifiées par le marqueur nestin tapissent la lumière du tube neural (Lendahl et al., 1990). Celles-ci correspondent effectivement aux cellules épendymaires tapissant le canal central de la MÉ chez l'animal adulte. Il avait été observé, qu'à la suite d'un traumatisme médullaire (TM), l'expression de nestin augmente chez la population de cellules épendymaires et qu'au fil du temps, cette expression se retrouve même à l'extérieur de la couche de cellules épendymaires (Frisén et al., 1995). Pour prouver cette hypothèse, Johansson et al. (1999) ont tenté d'observer la prolifération des cellules tapissant le canal central en administrant de la bromodéoxyuridine (BrdU) sur une période de deux semaines chez le rat adulte. Ils ont effectivement remarqué l'incorporation du BrdU, un analogue de la thymidine, dans quelques cellules localisées dans le canal central, indiquant une fréquence de division cellulaire très faible. Ce résultat appuyait les hypothèses avancées par Morrison et al. (1997) sur les cellules souches adultes qui stipulaient que cette population de cellules se divisent lentement ou très rarement afin de ne pas épuiser le réservoir de cellules souches. Ensuite, ils ont découvert qu'en effectuant une incision du *funiculus dorsalis* de la MÉ, l'incorporation du BrdU chez les cellules épendymaires étaient considérablement supérieur par rapport à une MÉ non-lésée, signe d'une augmentation de la prolifération des cellules épendymaires suite à TM.

Une autre étude suggérait que les cellules souches neurales de la MÉ se localisaient en périphérie du canal central, correspondant ainsi aux cellules sous-épendymaires (Martens et al., 2002). Ils ont tout d'abord fait la démonstration qu'en mettant des sections de 100 µm d'épaisseur de la MÉ dans des conditions de culture de NS, les seules sections qui étaient en mesure de générer des NS primaires étaient celles contenant le canal central (Fig.1-3, p.7).

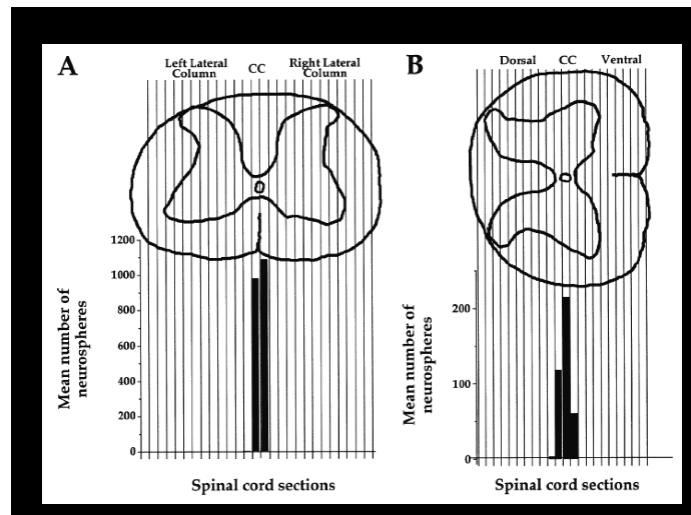


Figure 1-3 Nombre de neurosphères générées par des sections de 100µm coupées au vibratome d'un segment cervical de moelle épinière (Martens et al., 2002). A) Section coupée de gauche à droite (n=2). B) Sections de la surface dorsale à la surface ventrale (n=4).

Dans la même étude, ce groupe avait fait la démonstration qu'il était possible de stimuler la prolifération des cellules tapissant le canal central en injectant les facteurs EGF, FGF2 et héparine dans le quatrième ventricule (Fig.1-1D, p.5) du cerveau. Suite à cette stimulation, ils avaient observé en immunohistochimie une co-localisation du marqueur BrdU avec des marqueurs astrocytaires ou oligodendrocytaires. Ils en avaient conclu que les cellules souches et progénitrices des cellules aux alentours du canal central produisaient uniquement de nouveaux astrocytes ou oligodendrocytes. Cependant cette étude ne démontrait pas clairement l'origine cellulaire de cette différenciation cellulaire.

La prolifération et la différenciation cellulaire n'avaient pas seulement été observées au niveau du canal central et sa périphérie. D'autres études évoquaient la possibilité d'une présence de cellules souches/progénitrices au niveau du parenchyme. Gage et son équipe (Horner et al., 2000) suggérait un modèle où des progéniteurs astrocytaires et oligodendrocytaires se différenciaient *in situ* au niveau des tracts de la matière blanche d'une MÉ intacte. Un groupe japonais (Yamamoto et al., 2001) a observé la prolifération de progéniteurs neuronaux dans le parenchyme de MÉ lésée chez les rats. Un autre groupe a démontré que l'injection de facteurs

de croissance au niveau du parenchyme de moelle épinière lésée chez le rat stimulait la neurogénèse et l'oligodendrogénèse de ces progéniteurs (Ohori et al., 2006).

Après quelques articles démontrant différentes identifications et localisations des cellules souches/progénitrices de la MÉ, Meletis et al. (2008) ont réussi à identifier les cellules souches de la MÉ adulte en employant une méthode *in vivo* de *fate-mapping* génétique. Cette technique ingénieuse permet d'induire l'expression d'un gène (par exemple la *GFP* ou la β -*galactosidase*) de façon permanente et de transmettre cette expression à toute la progéniture d'une cellule initialement marquée. Dans cette étude, ils ont utilisé un modèle de souris transgénique inductible à la *Cre-recombinase* sous le contrôle du promoteur *FoxJ1*. L'expression de *FoxJ1* est spécifique aux cellules ayant des cils motiles ou des flagelles (Ostrowski et al, 2003), ce qui est le cas des cellules épendymaires. À l'aide de ce modèle, ils ont fait la démonstration que les cellules épendymaires, suite à une lésion de la MÉ au niveau du *funiculus dorsalis*, prolifèrent et migrent vers le site lésé. De plus, elles participent à la formation de la cicatrice gliale en se différenciant en astrocytes et quelque peu en oligodendrocytes. De manière générale, les cellules épendymaires (*Vimentin*⁺) ayant migrées au site de la lésion conservent leur phénotype de cellules souches, démontré par la colocalisation de *Vimentin* avec *Sox9*. L'expression de *Sox9* est associée au maintien de la population des cellules souches neurales multipotentes (Scott et al., 2010).

Malgré cette étude, la communauté scientifique n'était pas totalement convaincue. Il a fallu l'étude de Barnabé-Heider et ses collègues (2010) pour établir une nouvelle population cellulaire dans la MÉ : les cellules souches épendymaires (CSÉ). Ils ont utilisé le même modèle transgénique inductible avec le promoteur FoxJ1 (FoxJ1-CreER), mais cette fois-ci ils ont comparé avec deux autres lignées de souris transgénique inductible : une lignée Cx30-CreER (associés aux astrocytes) et une lignée Olig2-CreER (associées aux oligodendrocytes). Des conclusions très intéressantes et prometteuses pour le domaine ont été tirées de cet article. Premièrement, lorsque la MÉ est intacte, les progéniteurs oligodendrocytaires constituent le principal groupe de cellules qui s'auto-renouvèlent, prolifèrent et donnent naissance à des oligodendrocytes matures. Deuxièmement, les cellules épendymaires et les astrocytes sont les deux groupes cellulaires qui prolifèrent le plus, suite à un TM. Troisièmement, les cellules

épendymaires sont les seules cellules ayant la capacité de générer une progéniture multipotente et de conserver des propriétés de cellules souches neurales.

1.1.2 Le micro-environnement des cellules souches de la moelle épinière

Une niche de cellules souches se définit comme un micro-environnement dans lequel les cellules adjacentes, les molécules de la matrice extra-cellulaire, les facteurs solubles et les signaux circulants régulent la prolifération, la survie et la différenciation des cellules souches (Hamilton et al., 2009). La niche des cellules souches de la MÉ est évidemment localisée le long du canal central ; plus précisément, la niche est formée des cellules épendymaires et ses cellules adjacentes. Des images prises en microscopie électronique nous démontre une hétérogénéité morphologique des cellules qui sont en contact avec la lumière du canal central de la MÉ (Meletis et al., 2008)(Fig.1-4, p.10). Les cellules épendymaires de forme cuboïde et

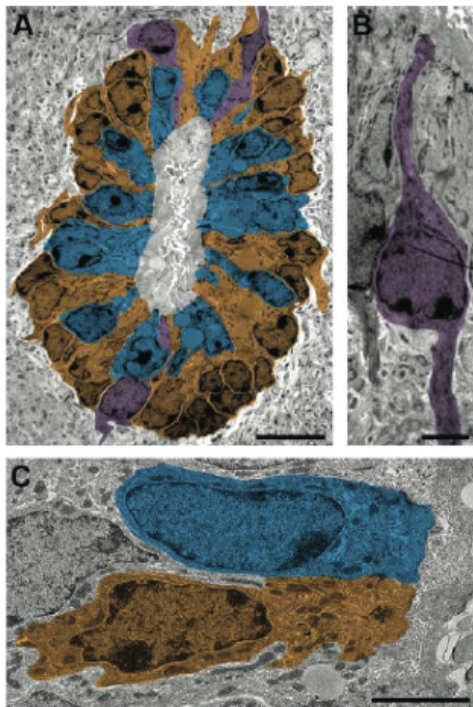


Figure 1-4 Caractérisation des cellules épendymaires de la moelle épinière (Meletis et al., 2008) Caractérisation des cellules épendymaires de la moelle épinière (Meletis et al., 2008). A-C) Microscopie immuno-électronique du canal central d'une souris FoxJ1-CreER. Pseudo-coloration en A) illustrant la localisation des cellules immuno-réactives. B) Cellule épendymaire radiaire colorée en mauve. C) Cellule épendymaire de forme cuboïde (jaune) et tanycyte (bleu).

les tanocytes (variété de cellule tapissant le canal épendymaire et possédant un cil) représentent la majorité à près de 95%. Les cellules épendymaires radiaires, caractérisées par la présence d'un long prolongement de leurs corps cellulaires, sont un troisième type de cellules épendymaires localisées dans les pôles dorsal et ventral du canal central.

En sachant qu'il y a différents types de cellules épendymaires, il est tout à fait normal d'émettre comme hypothèse que les cellules souches de la MÉ correspondent à un sous-type bien précis de cellules épendymaires. Lors de leur étude sur l'organisation cellulaire de la niche, Hamilton et al., (2009) ont observé une prolifération des épendymocytes au niveau du pôle dorsal du canal central chez un sous-type exprimant des marqueurs de cellules souches neurales. Une reconstruction ultra-structurale tridimensionnelle par microscopie électronique à balayage ou à transmission a permis d'identifier une sous-population de cellules épendymaires proliférative et responsable de la croissance de la MÉ post-naissance (Alfaro-Cervello et al., 2012). Ce sous-type se caractérise par des cellules épendymaires bi-ciliées et identifiées par différents marqueurs dont *FoxJ1*, *vimentin*, *CD34*. Ce dernier marque les cellules épendymaires différenciées (Mirzadeh et al., 2008) et il identifiait environ 95% des cellules tapissant le canal central. Le marqueur de cellule souche/progénitrice neurale *nestin* était exprimé de manière prédominante dans les pôles dorsal et ventral du canal central. Ils ont aussi remarqué une sous-population située uniquement dans le pôle dorsal identifié par *nestin* et GFAP, deux marqueurs de cellules souches/progénitrices neurales.

Avec des outils techniques plus puissants, nous serons certainement en mesure d'identifier et de localiser précisément le sous-type d'épendymocytes possédant les caractéristiques des cellules souches neurales.

1.1.3 Les cellules souches de la MÉ chez l'Humain

Il est évident que pour des questions éthiques et morales, la recherche sur les cellules souches neurales chez l'humain ne progresse pas aussi vite que celle sur les rongeurs ou les primates. Les tissus nerveux humain disponibles proviennent habituellement d'avortements thérapeutiques (Carpenter et al, 1999; Roy et al, 2004; Vescovie et al, 1999) et de spécimens

de biopsies chirurgicales ou de tissus post-mortem (Palmer et al, 2001; Nunes et al, 2003). Les premières études sur l'isolement des cellules souches/progénitrices du SNC étaient axées sur le cerveau. Palmer et ses collègues (2001) ont été en mesure de mettre des cellules progénitrices en culture qui avaient la capacité de proliférer et de se différencier en neurones, astrocytes et oligodendrocytes. Un autre groupe (Nunes et al, 2003) a isolé par cytométrie en flux des progéniteurs de la matière blanche provenant de lobectomie temporale ayant la capacité de générer des NS et de produire une progéniture multipotente.

Quinn et al. (1999) ont réussi à générer des NS composées de cellules non-différenciées en présence de EGF et FGF2 en dissociant des MÉ provenant d'avortement thérapeutique. La première culture de NS primaire provenant de MÉ adulte a été produite en 2008 (Dromard et al.). Ces derniers ont cependant été incapables de générer des NS secondaires après une dissociation de NS primaires. Ils ont émis deux hypothèses qui pourraient expliquer cette incapacité à générer des NS secondaires : les conditions de culture seraient inadéquates pour l'auto-renouvellement des cellules souches ou les NS ont pour origine un progéniteur ayant une capacité restreinte de prolifération et d'auto-renouvellement.

C'est seulement quelques années plus tard, que des cellules souches/progénitrices de la MÉ humaine furent isolées en culture (Mothe et al., 2011). Ce groupe a démontré que les cellules souches/progénitrices, en plus d'un milieu riche en EGF et FGF2, requéraient un substrat adhérent afin de les sélectionner et promouvoir leur expansion. Ces cellules étaient en mesure de survivre et proliférer durant plusieurs passages jusqu'à une période de neuf mois. Lorsqu'elles étaient mises dans des conditions de culture flottante, des NS étaient générées. En présence de sérum (condition de différenciation), les cellules différenciées exprimaient des marqueurs neuronaux et gliaux, signe d'une multipotentialité.

1.1.4 L'avenir de la recherche des cellules souches/progénitrices de la moelle épinière

En passant de vertébrés inférieurs jusqu'à l'homme, le progrès au cours des vingt dernières années sur l'identification, la localisation et la caractérisation des cellules souches/progénitrices de la MÉ est impressionnant. L'objectif ultime réside dans une

compréhension plus approfondie de cette population cellulaire afin d'être en mesure de les moduler à notre guise. Malgré plusieurs tentatives de greffes de cellules souches/progénitrices neurales dans des MÉ lésées chez des rongeurs et des résultats encourageants, nous sommes encore loin d'une MÉ régénérée et fonctionnelle. Pour se faire, nous devons étudier davantage les pathologies de la MÉ pour comprendre comment celles-ci peuvent moduler le comportement des cellules souches/progénitrices de la MÉ.

1.2 La moelle épinière et ses pathologies

Il existe différentes pathologies de la MÉ qui ont souvent comme conséquences la paralysie ou la mort. Il y a des malformations du SNC durant le développement du fœtus menant à une condition pathologique, le spina bifida, caractérisée par la non-fermeture du tube neural. Il y a des maladies neuro-dégénératives comme la sclérose latérale amyotrophique ou la sclérose en plaques. Certains cancers se développent dans la MÉ, par exemple la formation d'épendymome. Ces différentes maladies ont deux points en commun ; premièrement sur le plan médical, lorsque nous serons en mesure de moduler les cellules souches neurales, l'arrêt de croissance d'un épendymome ou la régénération d'une MÉ atteinte de sclérose en plaque sera peut-être possible. Le deuxième point en commun se trouve dans la difficulté à développer des modèles d'études de ces maladies, puisque les causes de ces pathologies sont encore nébuleuses. Le modèle d'étude *in vivo* du traumatisme médullaire (TM) est reproductible et permet de reproduire certaines des pathologies de la MÉ.

1.2.1 Les traumatismes médullaires

Au Canada, 86 000 personnes vivent avec une blessure à la MÉ d'origine traumatique ou pathologique. À chaque année, plus de 4000 Canadiens souffrent d'une blessure à la MÉ et la majorité des blessures à la MÉ d'origine traumatique se produisent chez les hommes âgés de 16 à 34 ans. Au Canada uniquement, il en coûte 3,6 milliards de dollars en soins de santé et en équipements (Institut Rick Hansen). Dans les pays développés, puisque le taux de survie à long terme est bon, les patients souffriront toutes leurs vies d'un handicap physique chronique caractérisé par une paralysie (Sekhon et Fehlings, 2001). Actuellement, les soins prodigués

lors de la phase aigüe d'un TM se résument à la décompression et à la stabilisation du tissu de manière chirurgicale pour prévenir d'éventuels dommages, ainsi que des traitements anti-inflammatoires puissants. Les soins à long terme focalisent sur le soulagement des symptômes associés à la douleur et les traitements de physiothérapie (Baptiste et Fehlings, 2007).

1.2.2 La description patho-physiologique du traumatisme médullaire

Les dommages occasionnés à la MÉ suivant un TM sont divisés en deux catégories : les dommages primaires et secondaires (Allen, 1911; Tator et Fehlings, 1991; McDonald et Sadowsky, 2002). La phase aigüe est associée aux dommages mécaniques induits par le traumatisme. Elle peut être induite de plusieurs manières : une lacération, une compression, une contusion. Au point d'impact de la lésion, des vaisseaux sanguins sont endommagés, des axones et des membranes de cellules neurales sont rompues (McDonald et Sadowsky, 2002). Ces dommages mécaniques primaires engendrent une cascade d'évènements secondaires associée à l'inflammation, l'ischémie, l'excitotoxicité glutamatergiques et le stress oxydatif qui endommagent les cellules nerveuses avoisinantes (Leal-Fihlo, 2011).

Cette phase secondaire implique les deux types de mort cellulaire : la nécrose et l'apoptose (Beattie et al., 2000). La perte d'oligodendrocytes démyélinise les axones, ce qui bouleverse grandement la conduction du potentiel d'action et entraîne la dégénérescence des axones distales au site de la lésion, un phénomène communément appelé la dégénérescence wallérienne (Bush et Schwab, 2003). De plus, les dommages cellulaires et moléculaires entraînent la formation d'une cicatrice gliale (CG). Cette structure évolue au fil du temps et différentes cellules participent à sa formation (Fawcett et Asher, 1999). La structure finale de cette cicatrice se compose principalement d'astrocytes, de microglies/macrophages et de chondroïtine sulfatée protéoglycane (CSPG) (Rolls et al., 2009). Cette cicatrice est reconnue pour être néfaste à la régénération du tissu nerveux lésé. À la suite d'un TM, les astrocytes s'activent en modifiant leur morphologie ; ils prolifèrent, s'hypertrophient et s'enchêtrent pour former la CG (Sofroniew, 2009). Ce phénomène d'astroglie réactive est l'une des principales raisons qui explique la présence des CSPG, des molécules de la matrice extracellulaire, qui ont un effet inhibiteur sur la croissance axonale (Silver et Miller, 2004).

Cependant, plusieurs travaux de recherche démontrent que cette cicatrice a aussi des effets bénéfiques ; elle scelle le site de la lésion et protège le tissu environnant (Rolls et al., 2009). Il a été démontré que les CSPG sécrétés par les astrocytes réactifs forment une barrière qui prévient la propagation de la neurotoxicité (Roitback et Sykova, 1999). Mais le plus important à retenir dans la phase secondaire est la réaction inflammatoire qui débute de manière quasi-simultanée avec la lésion tissulaire, qui évolue dans une chronologie bien précise et dont les médiateurs inflammatoires régulent le développement des lésions secondaires (Rossignol et al., 2007; Leal-Filho, 2011).

1.2.3 Les rôles de la neuro-inflammation à la suite d'un traumatisme médullaire

La réaction immunitaire déclenchée par un TM est souvent considérée comme un frein à la régénération de la MÉ lésée. Par contre, plusieurs chercheurs considèrent qu'une réponse immunitaire innée et adaptative bien contrôlée pourrait jouer un rôle important dans la réparation du tissu (Profyris et al., 2004; Rossignol et al., 2007). Chez les rongeurs, la réaction neuro-inflammatoire suit un profil chronologiquement bien orchestré ; elle corrèle temporellement avec les lésions neuro-dégénératives secondaires et le peu de recouvrement fonctionnel (Donnelly et Popovich, 2008) (Fig.1-5, p.18). De manière générale, une lésion attire des leucocytes qui sécrètent des cytokines, des modulateurs immunitaires qui coordonnent la réaction inflammatoire (Klusman et Schwab, 1997). Pineau et Lacroix (2007) ont démontré que dans les modèles murins de TM, la majorité des cellules neurales occupant la MÉ (i.e. neurones, astrocytes, oligodendrocytes, microglies) transcrivent très rapidement l'ARNm de diverses cytokines inflammatoires, alors que les cellules immunes recrutées contribuent à maintenir cette réaction inflammatoire. Ils ont démontré que dans les minutes post-TM, les microglies (cellules immunitaires résidentes du SNC) et les astrocytes exprimaient rapidement l'ARNm de l'interleukine-1 β (IL-1 β) et du *tumor necrosis factor* (TNF). De plus, les ARNm de l'interleukine-6 (IL-6) et du *leukemia inhibitory factor* (LIF) sont fortement régulés à la hausse entre 3h et 24h post-TM. Chez l'humain, des analyses biochimiques du liquide céphalo-rachidien jusqu'à 72h post-TM nous indiquent la présence de la cytokine IL-6 et du récepteur TNF (TNF-R1) (Kwon et al., 2010).

Dans les premières heures post-TM, les neutrophiles sont attirés au site de la lésion par les cytokines pro-inflammatoires, les molécules d'adhésion et les eicosanoïdes. Ceux-ci phagocytent les débris de myéline ou autres débris cellulaires (Guth et al., 1999; Saiwai et al., 2010). À leur entrée au site de la lésion, les neutrophiles, stimulés par les médiateurs pro-inflammatoires, sécrètent leurs propres cytokines. Cette sécrétion supplémentaire de cytokines perméabilise davantage les vaisseaux sanguins occasionnant une infiltration plus prononcée de leucocytes, une activation de la gliose et une augmentation des dommages neuronaux (Carlson et al., 1998). Du côté des microglies (les cellules immunes résidentes du SNC), celles-ci sont activées au site de la lésion généralement dans l'heure suivant le TM. Cette activation est généralement causée par les DAMPs (*Damage-associated molecular pattern molecules*), des protéines cytosoliques ou nucléaires se retrouvant dans l'environnement extracellulaire et qui initient et maintiennent la réponse immunitaire (Rubartelli et Lotze, 2007). Par exemple, la concentration élevée d'ATP (un nucléotide) extracellulaire activent les microglies et stimulent la production de diverses protéines microgliales, dont l'AIF-1 (*allograft inflammatory factor-1*) (Schwab et al., 2001). Il y aussi une infiltration progressive de macrophages et ceux-ci, en équipe avec les microglies, phagocytent les débris apoptotiques et nécrotiques présents au site de la lésion et sa périphérie (Guth et al., 1999). Contrairement au passage transitoire rapide des neutrophiles (entre 24 et 48h), les microglies/macrophages peuvent être présents et actifs jusqu'à une période de 4 semaines (Popovich et al., 1997). En plus d'éliminer les débris myélinisés qui ont un effet inhibiteur sur la croissance axonale, les microglies/macrophages stimulent les astrocytes à sécréter des médiateurs neurotrophiques tels que NGF (*nerve growth factor*) ou BDNF (*brain-derived growth factor*) (Nguyen et al., 2002).

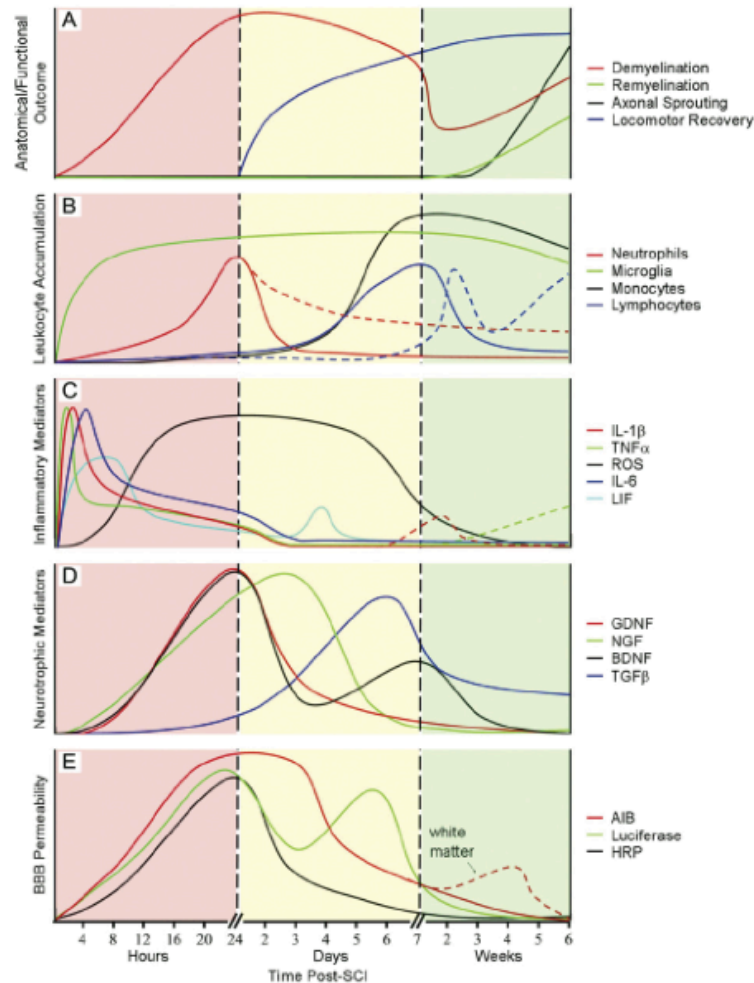


Figure 1-5. Corrélation temporelle entre la cascade inflammatoire, les événements neurodégénératifs secondaires et le recouvrement fonctionnel suite à un traumatisme médullaire chez les rongeurs (Donnelly & Popovich, 2007). A) Modifications anatomiques et fonctionnelles post-traumatique. B) Accumulation des cellules immunitaires au site de la lésion et sa périphérie. C) Expression des cytokines pro-inflammatoires : interleukine1- β (IL-1 β), interleukine-6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF α), leukemia inhibitory factor (LIF), et des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS). D) Expression des médiateurs neurotrophiques : facteur neurotrophe dérivé de la glie (GDNF), facteur de croissance neural (NGF), facteur neurotrophe dérivé du cerveau (BDNF), facteur de croissance de transformation (TGF β). E) Perméabilité de la barrière hémato-encéphalique à l'acide α -aminoisobutyrique (AIB; 104 Da), la peroxydase du raifort (HRP; 44,000 Da) et la luciférase (61,000 Da).

L'immunité adaptative entre aussi en jeu à la suite d'un TM. Les macrophages phagocytant les débris deviennent des cellules présentatrices d'antigènes exprimant le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH-II) qui activent les cellules T auxiliaires (Schmitt et al., 2000). Pour prévenir le phénomène d'auto-immunité, le SNC possède quelques mécanismes pour réagir contre les cellules T auxiliaires (Profyris et al., 2004). Par exemple, les cellules gliales expriment davantage le ligand FAS à la surface de leurs membranes, ce qui induit l'apoptose des lymphocytes (Moalem et al., 1999). Cette immunité adaptative stimulerait la phagocytose des débris de myéline par les macrophages et stimulerait aussi la libération de facteurs neurotrophiques (David, 2002). Les travaux de Schwartz et son équipe (Hauben et al., 2000) ont démontré qu'une immunisation active ou passive des cellules T auto-réactives envers le MBP (*myelin basic protein*) résultait en un recouvrement fonctionnel significatif chez des rats ayant subi un TM. Les diverses recherches de Schwartz lui ont permis de démontrer qu'une réponse immunitaire bénéfique pour le SNC doit inclure les deux types d'immunités : innée et adaptative (Schwartz et al., 2009).

Qu'il s'agisse d'un vertébré inférieur ou d'un humain, une lésion du SNC déclenche une réaction immunitaire et inflammatoire puissante et structurée. Cependant, il semble y avoir un lien très étroit entre la complexité du SNC, la réponse immunitaire et la capacité de régénération du tissu nerveux lésé. Il a été démontré que des vertébrés inférieurs (ex. urodèles) possédant un SNC et une réponse inflammatoire moins complexes que les mammifères ont une meilleure capacité de régénération du SNC lorsque celui-ci subit un traumatisme (Popovich et Longbrake, 2008). Il est donc important de comparer les différences cellulaires et moléculaires du système immunitaire chez chacune des espèces afin de démystifier la réaction neuro-inflammatoire chez l'homme.

1.2.4 Les cytokines inflammatoires et le système nerveux central

Les cytokines sont considérées comme des hormones polypeptidiques régulant l'homéostasie dans le tissu dans lequel elle est sécrétée ; elles possèdent un mode d'action local (autocrine, paracrine) ou bien elles font appel à d'autres systèmes qui rétabliront l'homéostasie locale. Elles sont divisées en différentes familles (p.ex. interleukines,

interférons) et sont souvent associées aux réponses immunitaires (Hopkins et Rothwell, 1995). Certaines études ont démontré qu'à la suite d'un traumatisme du cerveau, les cytokines IL-6, IL-1 β et TNF α étaient rapidement sécrétées et particulièrement concentrées au niveau de la lésion. Les données indiquaient cependant que ces cytokines n'étaient sécrétées que par les microglies et macrophages (Woodrooffe et al., 1991; Taupin et al, 1993). Des années plus tard, Pineau et Lacroix (2007) ont fait la démonstration que l'ARNm de ces trois mêmes cytokines étaient rapidement exprimés chez le modèle murin de TM. Ils ont aussi été en mesure d'identifier les cellules de la MÉ qui exprimaient fortement ces ARNm : les neurones, les astrocytes, les oligodendrocytes et les microglies.

Balasingal et al. (1994) ont découvert que l'injection des trois cytokines inflammatoires IL-6, IL-1 β et TNF α au site d'une lésion au cerveau stimule l'astroglie. Un autre groupe a d'ailleurs fait des observations intéressantes en injectant un cocktail des trois cytokines (IL-6, IL-1 β et TNF α) au site de la lésion chez souris ayant subi un TM. Ils ont remarqué que lorsqu'ils injectaient le mélange de cytokines inflammatoires, il y avait une augmentation du recrutement et de l'activation des macrophages et des microglies. De plus, la perte de tissu était moins grande lorsqu'il y avait injection des cytokines (Klusman et Schwab, 1997). Une équipe de chercheurs a également démontré que l'IL-1 β est nécessaire pour initier le phénomène d'astroglie. En induisant des traumatismes médullaires à des souris mutantes IL-1 β -/-, le phénomène d'astroglie était retardé et l'étanchéité de la barrière hémato-encéphalique et de la cicatrice gliale faisaient défaut (Herx et Yong, 2001).

Ces trois cytokines inflammatoires possèdent des caractéristiques qui les différencient. Le TNF α possède des effets multiples sur les fonctions cellulaires en passant de la prolifération à l'apoptose. Il a deux récepteurs distincts, le p55 (TNF-R1) et le p75 (TNF-R2) qui ont des voies de signalisation différentes. Des études *in vitro* démontrent que ces récepteurs se retrouvent sur les oligodendrocytes et que la présence de TNF α induit l'apoptose de ceux-ci (Wilt et al., 1995; Akassoglou et al., 1998; Lee et al, 2000). D'autres travaux ont démontré que le TNF α stimule fortement la prolifération des cellules souches/progénitrices neurales de

la zone sous-ventriculaire via l'activation de la voie de signalisation NF- κ B (Widera et al., 2006).

L'IL-1 β est une cytokine importante pour le SNC ; elle régule les fonctions neuroendocriniennes, le sommeil, la fièvre et le métabolisme (Rothwell, 1991). Lorsque l'IL-1 β se lie à son récepteur (IL-1R), une séquence complexe de signalisation s'ensuit, menant à l'activation de la voie NF- κ B, tout en induisant l'expression des gènes cibles de l'IL-1, dont l'IL-6. (Weber et al., 2010).

L'IL-6 et son récepteur (IL-6R) sont responsables de la voie de signalisation de JAK/STAT qui stimule la prolifération, la différenciation, la migration cellulaire et l'apoptose (Rawlings et al., 2004). Il a été démontré *in vivo* qu'en utilisant un anticorps monoclonal contre le récepteur d'IL-6, le phénomène d'astrogliose est altéré à la suite d'un traumatisme médullaire (Okada et al., 2004). Lacroix et al (2002) ont par ailleurs démontré qu'une sur-activation du récepteur IL-6R augmente l'infiltration de cellules immunitaires et augmente le site de la lésion en plus d'inhiber davantage la croissance axonale.

1.3 Problématique, hypothèse et objectif

Nous savons depuis longtemps que les TM mènent à la paralysie ; des papyrus égyptiens datant de 1550 B.C. en faisait même la description (McKerracher et David, 2004). Les conséquences d'un TM chez l'humain sont la plupart du temps chronique et irréversible en raison de l'incapacité de régénération de la MÉ. Encore aujourd'hui, il n'existe aucune thérapie curative qui permet de régénérer le tissu nerveux lésé et retrouver une mobilité fonctionnelle. Depuis quelques années, les avancées sur les cellules souches embryonnaires et la découverte des cellules souches adultes neurales ont ravivé l'espoir sur la découverte d'une thérapie régénérative. La modulation des cellules souches endogènes de la MÉ pourrait faire partie de la solution (Barnabé-Heider et Frisén, 2008). Il a été démontré qu'à la suite d'un TM les CSÉ prolifèrent, migrent vers le site de la lésion et se différencient principalement en astrocytes (Johanson et al., 1999, Martens et al., 2002; Meletis et al., 2008; Barnabé-Heider et al., 2010). Nous ne savons pas par quels moyens ces CSÉ sont modulées. En contrepartie, nous connaissons bien la réaction immunitaire déclenchée par un TM. Nous émettons donc l'hypothèse que la réaction immunitaire causée par un TM serait responsable de la prolifération et la différenciation des CSÉ. Afin de vérifier cette hypothèse, nous nous sommes fixés comme objectif de projet de maîtrise de démontrer *in vitro* les effets des principales cytokines inflammatoires sur les cellules/souches progénitrices de la MÉ.

2. Procédures expérimentales

2.1 Animaux

Les expériences ont été effectuées en suivant les lignes directrices du Conseil canadien de protection des animaux et approuvées par le Comité de déontologie de l'expérimentation sur les animaux (CDEA) de l'Université de Montréal. Un total de 44 souris mâle C57BL/6 (Laboratoires Charles River, Saint-Constant, Québec, Canada) fut utilisé pour les expériences nécessitant la culture de neurosphères. Une colonie de souris transgénique FoxJ1-eGFP fut établie dans le but d'élaborer un protocole expérimental visant à isoler les cellules épendymaires du canal central de la MÉ par cytométrie de flux et triage cellulaire. Un mâle B6;C3-Tg(FOXJ1-EGFP)85Leo/J et une femelle de type sauvage (*The Jackson Laboratories, USA*) furent commandés afin de les accoupler et débiter la colonie. Un total de 7 souris de la colonie FoxJ1-eGFP a été utilisé afin de caractériser le canal central de la MÉ et de développer le protocole d'isolement des cellules épendymaires par FACS (*fluorescent activated cell sorting*).

2.2 Isolement des cellules souches/progénitrices de la moelle épinière via la culture de neurosphères

2.2.1 Extraction de la moelle épinière via la pression hydraulique

La souris est euthanasiée en recevant une première injection de 0,4 ml d'hydrate de chlorale 7% au niveau de la cavité péritonéale, suivi d'une seconde injection de 0,1ml xylazine. La tête est ensuite coupée et la peau du dos est scalpée. Avec une petite paire de ciseaux, la colonne vertébrale est sectionnée à deux endroits, au niveau des membres supérieurs ainsi que légèrement au-dessus de l'articulation des hanches. La MÉ est finalement expulsée via la pression hydraulique en insérant une seringue de 10ml remplie de HBSS (*Hank's balanced salt solution; Wisent*) stérile et une aiguille 18¹/₂G dans le canal de la colonne vertébrale (côté inférieur) contenant la MÉ. Une fois expulsée, elle est recueillie dans du HBSS stérile et froid, afin d'être dissociée pour la culture de neurosphères.

2.2.2 Dissociation de la moelle épinière et mise en culture

La culture de neurosphères s'effectue sous une hotte à flux laminaire afin de travailler dans un environnement stérile et éviter tout type de contamination pouvant mettre un terme à la culture.

Un segment variant entre 15mm et 20mm, composé majoritairement de la région lombaire de la MÉ, est coupé en morceaux dans le HBSS. Ils sont ensuite transférés dans une solution filtrée de papaïne (EDTA 0,5mM, 10mM L-cystéine, papaïne (Worthington) (15µl/ml de solution)) préalablement activée 30 minutes à 37°C. La MÉ est dissociée mécaniquement par trituration et enzymatiquement par l'ajout de déoxyribonucléase I (Dnase I, Sigma) et quatre incubations à 37°C, totalisant 60 minutes. Les cellules dissociées sont suspendues dans un milieu de culture de base (MB) contenant du DMEM+Glutamax (Invitrogen)/F12+Glutamax (Invitrogen) dans un rapport 3:1, 1%^{V/V} pénicilline (5000U) /streptomycine (5000µg/ml) (Wisent), 1 µg/ml Fungizone (anti-fongique) (Invitrogen). Pour la génération de NS, il faut ajouter au MB 20 ng/ml de facteur de croissance épidermique (EGF) (Sigma), 25 ng/ml de facteur de croissance fibroblastique de type 2 (FGF2) (Sigma) et 2%^{V/V} supplément B27 (Invitrogen). Ce milieu de prolifération (MP) contenant les cellules dissociées est déposé dans un flasque de culture (pour les passages et la génération de NS secondaires) ou dans une plaque multi-puits (pour la quantification). Le tout est déposé dans un incubateur stérilisé, à une température de 37°C et une concentration de 5% de CO₂. À un intervalle de 3 ou 4 jours, du MP frais est rajouté à la culture primaire. Une période de deux semaines est allouée afin de générer des neurosphères primaires.

2.2.3 Passage de neurosphères primaires

Le passage de NS primaires permet de purifier la culture de NS afin d'éliminer les débris cellulaires comme la myéline et augmenter la population de NS. Pour se faire, les NS primaires sont dissociées mécaniquement par trituration en cellules individuelles. La suspension cellulaire est filtrée et suspendue dans du MP frais, contenant 20%^{V/V} de milieu

conditionné filtré provenant de la culture de NS primaires. Le MP contenant les cellules dissociées est une fois de plus déposée dans un flasque de culture ou une plaque multi-puits. Le tout est incubé à 37°C, à une concentration de 5% de CO₂. L'ajout de MP frais peut être nécessaire pour accélérer la croissance de NS secondaires et celles-ci sont prêtes à être dissociées entre 10 et 14 jours.

2.2.4 Dissociation de neurosphères secondaires et différenciation

Les NS secondaires sont dissociées mécaniquement par trituration et suspendues dans un milieu de différenciation (MD) contenant du MB, 2% ^V/_V de supplément B27 ainsi que 2% ^V/_V de sérum de bovin fœtal (FBS). Le MD contenant les NS secondaires dissociées est déposé sur des lames à chambre (pour les immunocytochimies) ou des pétris (pour la lyse cellulaire et les immunos-buvardages de type Western) dont le fond est revêtu de poly-L-lysine (0.02 mg/ml dans l'eau stérile ; Sigma). Le tout est déposé dans un incubateur stérile à 37°C, à une concentration de 5% de CO₂. Du MD frais doit être ajouté à tous les 2/3 jours et ce, jusqu'à ce que les cellules différenciées soient prêtes pour la lyse cellulaire ou l'immunocytochimie.

2.2.5 Traitements aux cytokines inflammatoires et milieu conditionné aux macrophages

Afin d'étudier l'effet de cytokines inflammatoires sur les cellules souches/progénitrices de la MÉ *in vitro*, de l'interleukine-6 (IL-6), de l'interleukine-1-bêta (IL-1β) ou le *tumor necrosis factor alpha* (TNFα) (Sigma Aldrich), diluée dans une solution stérile BSA 0,1% (bovine serum albumine), furent ajoutée aux différentes étapes de la culture de NS. En trio, en paires ou individuellement, les cytokines inflammatoires sont ajoutées au MP en culture primaire et secondaire ou au MD en condition de différenciation à une concentration de 5ng/ml, et parfois 30 ng/ml. Les cytokines sont additionnées une seule fois au jour 0 de chacune des étapes de la culture de NS, moment où les cellules sont bien dissociées et individuelles. La solution stérile BSA 0,1% (solution dans laquelle les cytokines sont diluées) agit à titre de condition témoin pour les expériences de traitements aux cytokines.

Pour comparer l'effet des traitements aux cytokines, nous avons traité les cellules souches/progénitrices de la MÉ avec du milieu conditionné aux macrophages (mCM) non-stimulés ou stimulés. La culture de macrophages RAW 264.7 (*American Tissue Type Culture*) et la récolte de mCM non-stimulés ou stimulés avaient été effectuées par Stéfanny Beaudoin (ex-étudiante à la maîtrise dans le laboratoire de Karl Fernandes, Ph.D.). L'ajout d'IL-1 β [10ng/ml] active les monocytes/macrophages (English et al., 2009). Après une stimulation à l'IL-1 β de 24 heures, le milieu de macrophages était retiré et remplacé par du milieu frais, qui est considéré comme le mCM stimulés. Le mCM était ajouté à une concentration de 2,5% ou 5% (v/v) pour les cultures primaires et secondaires de NS ou 25% (v/v) pour la différenciation de NS secondaires dissociées.

2.2.6 Quantification des neurosphères

Au moment de la mise en culture primaire, la MÉ dissociée est diluée dans 24ml de MP. Cette suspension cellulaire est distribuée également dans une plaque multi-puits qui en contient 48 (500 μ l/puit). Les NS primaires sont quantifiées en NS par millimètre de MÉ et normalisé par rapport à la condition contrôle. Pour la quantification des NS secondaires, les NS primaires dissociées sont mises en culture à une densité de 0,75 cellule/ μ l (plaque 48 puits (500 μ l/puit)). Les NS secondaires sont quantifiées en nombre absolu moyen de NS par puits et normalisé par rapport à la condition contrôle. Pour les différents traitements aux cytokines inflammatoires et au mCM, il y a 6 puits traités par condition pour un échantillonnage où n=1. Toutes les expériences de quantification de NS primaires et secondaires comptent un échantillonnage de n=3. La quantification des NS s'effectue après 14 jours de croissance en culture. Le diamètre des NS est également mesuré pour chaque condition. À l'aide du logiciel informatique *NIH ImageJ 64-bit Java* pour Mac, nous mesurons le diamètre de 100 NS primaires et 250 NS secondaires.

2.3 Immunobuvardage de type Western

L'immunobuvardage de type Western (WB) est un excellent outil technique pour détecter la présence de diverses protéines contenues dans les cellules. Les NS secondaires

dissociées ayant différenciées sont lysées avec un tampon RIPA (1M Tris pH8, 5M NaCl, NP-40 10%, SDS 10%, désoxycholate de sodium 10%, eau distillée) contenant du vanadate de sodium (25µl par 5ml de tampon RIPA) et un inhibiteur de protéase (*Complete Mini, Roche Diagnostics*). Le dosage protéique pour chacun des échantillons est effectué avec un kit BCA (*Pierce*). Une quantité équivalente de protéine pour chacun des échantillons est diluée dans un tampon 0,5M Tris-HCl pH 6.8 contenant du glycérol, du SDS 10%, du bleu de bromophénol et du β -mercaptoéthanol. Ces échantillons sont ensuite chauffés 5 minutes à une température de 95°C. Sur un gel SDS-PAGE, les échantillons sont déposés dans des puits et migrent à l'aide d'un courant électrique au travers d'un gel de séparation (acrylamide 10%). Par après, le gel est transféré sur une membrane de nitrocellulose qui sera immergée dans une solution de rouge de Ponceau (rouge de Ponceau 0,2%, acide trichloroacétique 11%, H₂O) afin de vérifier si la migration et le transfert des protéines a fonctionné correctement. À l'aide d'une lame de rasoir, la membrane est coupée à différentes hauteurs de poids moléculaire (PM) pour être en mesure d'effectuer des marquages avec plusieurs anticorps simultanément. Ensuite, la membrane est bloquée dans une solution de TBS-T (*Tris buffer saline-Tween20*) contenant de la poudre de lait écrémé à une concentration de 5%. Après le blocage, les membrane sont incubées toute la nuit à 4°C en présence d'anticorps primaires qui reconnaissent les protéines de souris : souris anti-rat β III tubuline (1:500, *Covance*), souris anti-humain 2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNPase, 1:500; *Chemicon*), lapin anti-vache *glial fibrillary acidic protein* (GFAP, 1:1000, *Dako*), souris anti-humain *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA, 1:500, *BD Biosciences*), souris anti-Xenopus β -Actine (1:5000; *Abcam*). Le marquage secondaire est effectué avec les anticorps suivants : IgG anti-souris (1:5000, *Bio-Rad*) ou IgG anti-lapin (1:5000, *Chemicon*). Les deux sont conjugués au HRP (*Horseradish peroxidase*). La révélation de l'anticorps secondaire se détecte en utilisant une trousse réactive chimioluminescente (*GE Healthcare*) et des films X-Omat bleu. Les membranes sont lavées avec le *Re-Blot Plus Mild* (Millipore), bloquées de nouveaux et marquées avec de nouveaux anticorps primaire. La quantification densitométrique des bandes est faite à l'aide du logiciel *NIH ImageJ 64-bit Java* pour Mac.

2.4 Immunocytochimie par fluorescence

Les immunocytochimie (ICC) sont effectuées sur des neurosphères secondaires dissociées ayant différenciées sur des lames à chambres. Le tout débute avec une étape de perméabilisation membranaire avec du Triton-X 100 0,2%. S'ensuit un blocage avec une solution de BSA 0,5% et du sérum normal de chèvre (NGS) 6%. Il y a ensuite une incubation à 4°C toute la nuit avec les anticorps primaires suivant (diluées dans une solution BSA 0,25% et NGS 3%) : souris anti-rat β III tubuline (1:500, *Covance*), souris anti-humain CNPase (1:500, *Chemicon*), lapin anti-vache GFAP (1:1000, *Dako*). La détection par fluorescence est effectuée avec les anticorps secondaires suivants : CY3 chèvre anti-lapin (1:400, *Jackson ImmunoResearch*) et chèvre anti-souris Alexa 488 (1:1000, *Invitrogen*). Les noyaux cellulaires sont marqués au Hoechst 33342 (0,2 μ M, *Sigma*).

2.5 Génotypage

Le génotypage est nécessaire afin d'identifier les souris porteuses du transgène FoxJ1-eGFP. Des segments de queues de souris qui ont été sevrées entre 21 et 25 jours post-naissance doivent être prélevés. L'ADN est extrait en immergeant les segments de queues dans une solution aqueuse contenant 25 mM d'hydroxyde de sodium (NaOH) et 0,2 mM d'EDTA et incubé vingt minutes à 100°C et se termine par l'ajout d'une solution aqueuse 40 mM Tris-HCl. L'amplification de l'ADN par la réaction en chaîne à la polymérase (PCR) du transgène s'effectue à l'aide de deux amorces (oIMR0872 (AAG TTC ATC TGC ACC ACC G) et oIMR1416 (TCC TTG AAG AAG ATG GTG GG)), un mélange *One Taq 2X Mastermix*, de l'eau *RNase free* et l'ADN extraite. L'amplification par PCR est effectuée sur un appareil *Eppendorf*, programmé sur 35 cycles : 1,5 min à 94°C (dénaturation), 30sec à 94°C (dénaturation), 1 min à 58°C (hybridation), 1 min à 72°C (élongation) et 2min supplémentaires à 72°C. Les échantillons d'ADN amplifié sont déposés sur un gel d'agarose contenant du bromide d'éthidium et migrent par électrophorèse. La détection du transgène (173pb) s'effectue à l'aide d'un trans-illuminateur équipé d'une lampe à rayon ultraviolet.

2.6 Immunohistochimie par fluorescence

Les immunohistochimies (IHC) sont utilisées pour la caractérisation du canal central des souris FoxJ1-eGFP. Des sections (épaisseur: 40µm) de MÉ coupées au vibratome sont lavées dans une solution PBS pH 7.4 et bloquées avec une solution BSA 4% diluée dans du PBS-T (PBS avec 0,1% Triton-X 100). Une incubation d'une nuit à température ambiante avec les anticorps primaires (dilués 50% solution bloquante/50% PBS-T) suivants : souris anti-rat nestin (1:400, *BD Biosciences*), poulet anti-vimentin (1:1000, *Chemicon*), lapin anti-vache GFAP (1:1000, *Dako*). Pour la détection par fluorescence, les anticorps secondaires appropriés sont utilisés : CY3 chèvre anti-lapin (1:400, *Jackson ImmunoResearch*), *DyLight₆₄₉* infrarouge anti-poulet (1:400, *Thermo Fisher Scientific*), CY3 chèvre anti-souris (1:400, *Jackson ImmunoResearch*). La dernière étape consiste à déposer les sections sur des lames à microscope et de la couvrir avec une fine lame de verre.

2.7 Cytométrie de flux et triage cellulaire

Le triage cellulaire est un objectif secondaire à mon projet de maîtrise qui se définit comme suit ; tenter d'établir un protocole de triage cellulaire des cellules épendymaires de la moelle épinière via le FACS. La méthode décrite correspond au dernier essai de triage cellulaire.

L'extraction de la MÉ et la dissociation est identique au protocole de culture de NS. Cependant, plutôt d'être suspendue dans du MP, la MÉ dissociée est suspendue dans une solution HBSS stérile avec 25 mM d'HEPES (*Wisent*) et mise sur glace dans des tubes à FACS stérile (*BD Falcon Tube, BD Bioscience*). La suspension cellulaire est triée avec un trieur BD FACSARIA III SORP (*BD Bioscience*) équipé d'un laser bleu 488nm et d'un filtre de détection pour la GFP 530/30. Lors du triage cellulaire, des cellules GFP positives et GFP négatives sont recueillies séparément dans des tubes à FACS contenant du MP. Une souris provenant de la colonie FoxJ1-eGFP et ne portant pas le transgène est utilisée à titre de souris témoin. Le MP contenant les cellules triées est immédiatement déposé dans une plaque multi-puits et incubé à 37°C, à une concentration de 5% de CO₂. De la même manière que la culture

primaire de NS, du MP frais est rajouté à un intervalle de 3 ou 4 jours. Une période de deux semaines est allouée pour permettre la génération des NS primaires. Les données obtenues avec le trieur BD FACSAria III SORP sont analysées avec le logiciel *FlowJo Version X for Mac* (Tree Star, Inc., OR, USA).

2.8 Microscopie

Les NS sont quantifiées sur un microscope inversé à contraste de phase IMT2 de marque Olympus. Les photos des NS (pour les mesures de diamètre) sont prises à l'aide d'un microscope inversé à contraste de phase CKY41 de marque Olympus équipé d'une caméra. L'observation des ICC a été effectuée sur un microscope épifluorescent motorisé *Olympus IX81* équipé d'une caméra noire et blanche CCD. L'usage d'un microscope confocal *Leica SP1* équipé d'un système à balayage laser a aussi été nécessaire pour l'observation des IHC. La manipulation des images fut limitée au contraste et à la brillance des images, et ce, de manière standard pour toutes les images à l'aide du logiciel Photoshop CS6 pour Mac (Adobe).

2.9 Analyse statistique

L'échantillonnage pour chacune des expériences (quantification des NS et différenciation) correspond à un $n=3$. Dans la section Résultats, les données sont illustrées dans des graphiques à colonne, où chacune des colonnes représente la moyenne de l'échantillonnage \pm SEM (erreur standard de moyenne) normalisée par rapport à la condition contrôle. L'analyse statistique est effectuée comme suit : un premier test d'analyse de variance à un seul facteur de variabilité (*one-way ANOVA*), suivi d'un second test de comparaison multiple, le test de différence significative minimale de Fischer (Fisher's LSD). Une valeur de probabilité $p < 0.05$ est considérée statistiquement significative. La mise des résultats en graphique et l'analyse des données statistiques sont effectuées à l'aide du logiciel GraphPad Prism Version 6.0 pour Mac (*GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA*).

3. Résultats

3.1 Isoler les cellules souches/progénitrices de la moelle épinières via la culture de neurosphères

Bien que le protocole de culture de NS soit bien établi dans la littérature scientifique depuis le milieu des années 1990, il n'en demeure pas moins que cette technique demande du temps et de la minutie. Il est important de spécifier que cette technique est le cœur de ce projet de recherche. Il était donc nécessaire de bien maîtriser la technique (Fig.3-1A, p.31). Les premières étapes consistent à extraire la MÉ de souris C57BL/6 mâles âgés entre 2 et 3 mois, dissocier mécaniquement et enzymatiquement un segment de 15 à 20mm et mettre la suspension cellulaire en culture. Le milieu de culture (MP) contient des facteurs de croissance (EGF, FGF2) qui sont essentiels à la croissance des NS de MÉ (Weiss et al., 1996, Martens et al., 2002).

Les premières NS visibles au microscope apparaissent environ 7 jours suivant la mise en culture. Après deux semaines, les NS primaires (Fig.3-1A, p.31) atteignent un diamètre suffisant pour être dissociées. En culture primaire, le nombre de NS peut être quantifié en fonction de la longueur du segment de MÉ dissociée (NS/mm MÉ). En condition contrôle de prolifération, nous retrouvons une moyenne variant entre 10 et 20 NS/mm MÉ (Fig.3-1B, p.31). Les NS primaires doivent ensuite être passées pour quelques raisons. Premièrement, une NS trop volumineuse bloque l'apport en nutriments nécessaires à la survie des cellules situées en son centre. De plus, un manque d'approvisionnement en facteurs de croissance aux cellules occupant le centre de la NS peut stimuler la différenciation des cellules souches/progénitrices plutôt que la prolifération de celles-ci. Un passage primaire permet aussi d'éliminer les débris myélinisés, les neurones, les cellules gliales et les microglies qui peuvent moduler le comportement des cellules souches/progénitrices de la MÉ.

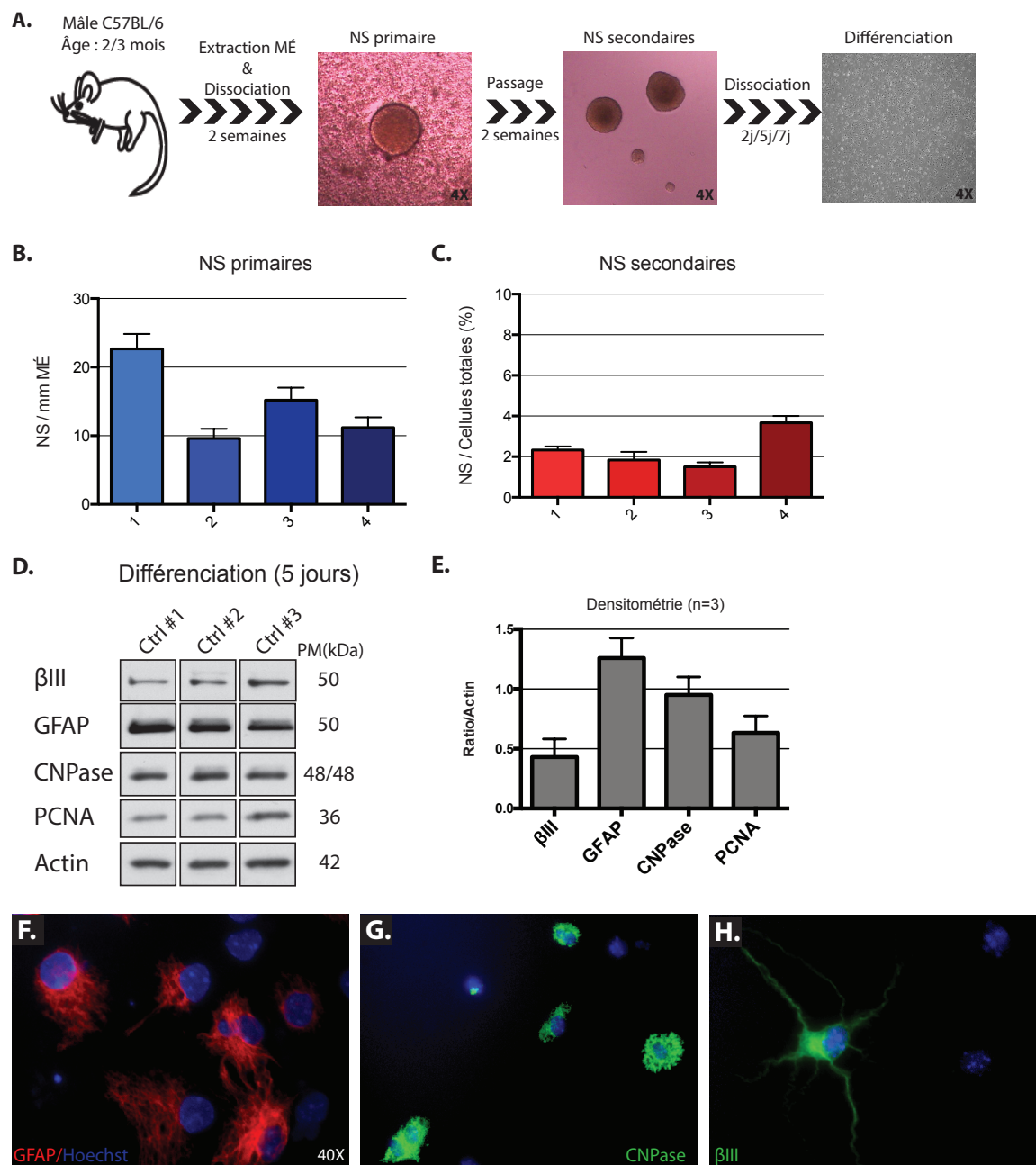


Figure 3-1. Isolement des cellules souches progénitrices de la moelle épinière via la culture de NS.
(voir légende p.32)

Légende Figure 3-1 (p.31). A) Schéma représentant la procédure expérimentale de culture de neurosphères. B) Nombre moyen de NS primaires par millimètre de moelle épinière en conditions contrôles (EGF/FGF2/Supplément B27) (n=4). C) Pourcentage de NS secondaires obtenus en fonction du nombre total de cellules mises en culture (0,75 cellule/ul) en conditions contrôle (n=4). D) Immunobuvardage de type Western de lysats protéiques de NS secondaires dissociées et différenciées 5 jours sous les conditions normales de différenciation (2% FBS/2% supplément B27). E) Densitométrie de D) pour chacun des marqueurs, ratio calculé sur le contrôle de chargement *Actin* (n=3). F)G)H) Immunocytochimie par fluorescence de NS secondaires dissociées et différenciées 5 jours en condition normale avec F) un marqueur astrocytaire (*GFAP*), G) un marqueur oligodendrocytaire (*CNPase*) et H) un marqueur neuronal (*β III-tubuline*).

Après quatorze jours en culture, les NS secondaires générées (Fig.3-1A, p.27) sont quantifiées ou dissociées pour l'étape de différenciation. Pour une quantification de NS secondaires, les cellules sont mises en culture à faible densité cellulaire (0,75 cellule/ μ l). En conditions contrôles de prolifération (Fig.3-1C, p.27), environ 2% de ces cellules ont la capacité de générer des NS secondaires. Cette petite population cellulaire possède donc une bonne capacité d'auto-renouvellement et sont les cellules souches/progénitrices de la MÉ. La majorité des cellules (98%) qui ne sont pas en mesure de générer des NS secondaires sont habituellement des progéniteurs en différenciation qui ne prolifèrent pas. Les observations faites sur la formation de NS primaires et secondaires à la suite de divers traitements nous permettent donc d'étudier leurs effets sur la capacité d'auto-renouvellement des cellules souches/progénitrices de la MÉ.

La dernière étape de la culture de NS vise à étudier la capacité de différenciation des cellules souches/progénitrices. Il faut dissocier les NS secondaires, les mettre en culture sur des pétris en plastiques ou des lames à chambres et retirer les facteurs de croissances (Fig.3-1A, p.27). La différenciation des cellules est arrêtée par une lyse cellulaire (pour WB) ou à l'aide d'une solution bloquante (pour ICC). Le WB (Fig.3-1D,E, p.27) nous indique que les cellules souches/progénitrices de la MÉ ont la capacité de se différencier en astrocytes (*GFAP*), en oligodendrocytes (*CNPase*) et en neurones (*β III*). Elles sont également en mesure de se proliférer, comme le démontre la présence du marqueur PCNA. La multipotentialité de ces cellules est aussi observé par ICC (Fig3-1F,G,H, p.27), comme le démontre ces marquages au *GFAP*, *CNPase* et *β III*. Ce type d'expérience est un modèle intéressant pour étudier les effets des traitements sur le processus de différenciation des cellules souches/progénitrices de la MÉ.

3.2 Des cytokines inflammatoires influencent la prolifération des cellules souches/progénitrices de la moelle épinière

À la suite d'un TM, il se produit une forte réaction inflammatoire qui possède des effets autant néfastes que bénéfiques sur la MÉ. Nous nous sommes intéressés à comprendre les effets de cette réaction inflammatoire sur la prolifération des cellules souches/progénitrices de la MÉ *in vitro*. Pour étudier les effets cette réaction neuro-inflammatoire nous avons choisi trois cytokines inflammatoires sécrétées dans les premières heures post-TM chez la souris ; IL-6, IL-1 β et TNF α (Fig.1-5, p.17, Donnely et Popovich, 2007).

Nous avons donc traité une culture primaire avec les cytokines inflammatoires séparément (Fig.3-2A,D, p.30). Les concentrations de cytokines choisies pour ces expériences *in vitro* sont comparables aux concentrations que l'on retrouve dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) chez des patients ayant subi un TM complet, gradé A sur l'échelle de l'ASIA (*American Spinal Injury Association*). Par exemple, dans les 72h suivant un TM, la concentration de l'IL-6 dans le LCR varie entre 5 et 40 ng/ml (Kwon et al., 2010).

Après 14 jours de culture, la seule différence significative s'observe entre les traitements à faible concentration (5ng/ml) d'IL-6 et IL-1 β . Le ratio de NS/mm MÉ est supérieur lorsque les NS primaires sont traités à l'IL-1 β plutôt qu'avec l'IL-6 (Fig.3-2A, p.34). Les diamètres des NS primaires traitées à l'IL-6, l'IL-1 β et TNF α ont aussi été mesurés (Fig.3-2D, p.34). À une concentration de 5ng/ml, chacune des cytokines augmente très faiblement le pourcentage de NS primaires possédant un diamètre inférieur à 200 μ m. Ces résultats suggèrent que les traitements individuels de cytokines n'influencent pas la croissance des NS en culture primaire. Ces données peuvent être dû au fait que les cellules des NS de la MÉ n'exprimeraient pas les récepteurs de ces cytokines. Cependant une étude a démontré, à l'aide de la technique de RT-PCR, que les cellules formant les NS provenant de striatum de souris expriment l'ARNm des récepteurs de l'IL-1 β , l'IL-6 et le TNF α (Benoit et al., 2000). Le même type d'expérience fut effectué sur des NS de MÉ provenant de souris embryon ; l'ARNm des récepteurs IL-6R et TNF-R1 étaient présentes (IL-1R n'a tout simplement pas été étudié dans cette étude) (Deleyrolle et al., 2006).

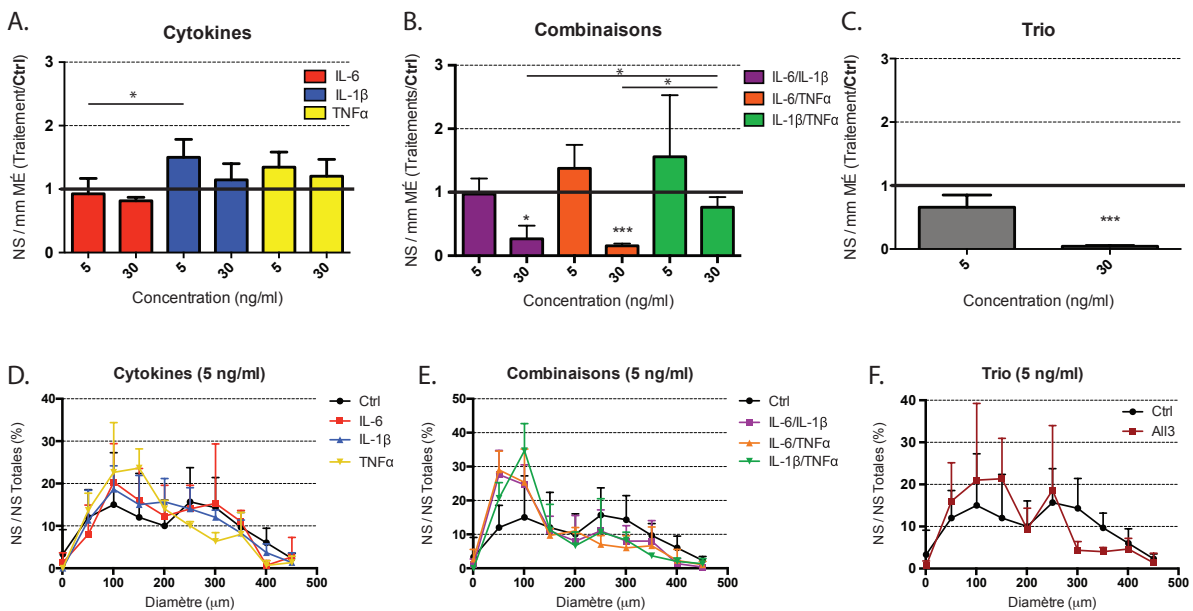


Figure 3-2. Les cytokines inflammatoires influencent la croissance des neurosphères primaires. A)B)C) Nombre de NS par millimètre de moelle épinière présenté sur ratio en fonction du Ctrl (BSA 0,1%). Les NS primaires sont en présence A) des cytokines IL-6, IL-1 β ou TNF α , B) des cytokines en combinaison ou C) les trois ensembles (trio). La concentration pour chacune des cytokines présentes est de 5 ng/ml ou 30 ng/ml. D)E)F) Mesure du diamètre en micromètre (μm) des NS primaires en présence D) des cytokines IL-6, IL-1 β ou TNF α , E) des cytokines en combinaison ou F) les trois ensembles (trio) à une concentration de 5 ng/ml chacune. Chacune des expériences possède un échantillonnage où $n=3$. Test statistique à comparaison multiple de type Fisher's LSD ($p^* < 0,05$, $p^{***} < 0,001$).

Même si les cytokines inflammatoires sont sécrétées à différents moments, elles finissent par se retrouver dans le même environnement. Nous avons observé les effets sur la prolifération des NS primaires en traitant celles-ci avec des combinaisons de cytokines (Fig.3-B, E, p.30). La quantification révèle une diminution significative du ratio de NS/mm MÉ par rapport au contrôle, seulement lorsque l'IL-6 est présente avec IL-1 β ou TNF α , à forte concentration (30ng/ml). De plus, le traitement avec la combinaison IL-1 β /TNF α (à 30ng/ml) est moins nocif que les combinaisons incluant l'IL-6. Malgré un effet négligé des combinaisons à faible concentration (5ng/ml) sur le ratio des NS/mm MÉ, chacune des combinaisons augmente le pourcentage de NS primaires ayant des diamètres inférieurs à 100 μ m (Fig.3-2E). Ces résultats semblent indiquer que l'IL-6 pourrait avoir un effet négatif dominant sur la croissance des NS primaires. De plus, des NS plus petites peuvent nous indiquer que les traitements de cytokines combinées peuvent influencer la prolifération ou la survie des cellules souches progénitrices de la MÉ.

À la suite d'un traumatisme médullaire chez la souris, les trois cytokines inflammatoires IL-6, IL-1 β et TNF α sont rapidement sécrétées (Donnelly et Popovich, 2007). Nous avons donc traité les cultures de NS primaires avec les trois cytokines (Trio) pour observer leurs effets sur la croissance des NS (Fig.3-2C,E, p.30). La quantification du ratio de NS/mm MÉ révèle une diminution significative par rapport au contrôle avec le traitement en Trio à forte concentration (Fig.3-2C, p.30). Lorsque les NS primaires sont traitées avec le Trio à faible concentration, nous observons une augmentation du pourcentage de NS primaires ayant des diamètres inférieurs à 100 μ m (Fig.3-2E, p.30). Les traitements au trio de cytokines semblent nous indiquer, tout comme les combinaisons de cytokines, qu'ils ont un effet inhibiteur sur la croissance des NS. La diminution du nombre de NS peut aussi s'expliquer par les effets apoptotiques qu'induisent de fortes concentrations en cytokines. Des expériences *in vitro* effectuées avec des cellules souches/progénitrices de la zone sous-ventricule et des traitements au TNF α démontrent qu'à des concentrations de 1 et 10ng/ml, le TNF α stimule la différenciation. Cependant, à partir de 10ng/ml et en montant, le TNF α induit l'apoptose cellulaire (Bernardino et al., 2008).

3.3 Les cytokines inflammatoires modulent directement la croissance des neurosphères

Les résultats précédents démontrent que les traitements de cytokines inflammatoires ont des effets sur les cellules souches/progénitrices de la MÉ. Cependant il est possible que les effets de ces traitements soient indirects par la présence de neurones, de cellules gliales, de microglies et de débris de toute sorte que l'on retrouve dans une culture primaire de NS. Le passage des NS primaires flottantes purifie la culture en ne conservant que les cellules souches/progénitrices de la MÉ. Des traitements aux cytokines dans une culture secondaire permettent d'observer si les effets ont une action directe sur la croissance des NS (Fig.3-3, p.37). La présence des cytokines individuelles (Fig.3-3A), en combinaison (Fig.3-3B) et en trio (Fig.3-3C) à faible et forte concentration diminue significativement le nombre de NS secondaire par rapport à la condition contrôle. Nous n'observons aucune différence significative entre les différentes combinaisons de cytokines (Fig.3-3B). Les traitements aux cytokines individuelles à forte concentration varient de manière significative ; le traitement à l'IL-6 est le moins nocif, suivi du traitement à l'IL-1 β et du TNF α (Fig.3-3A). Les mesures des diamètres des NS secondaires n'indiquent aucune variabilité notable à la suite des différents traitements (Fig.3-3D,E,F, p.37).

Ces résultats suggèrent que les traitements aux cytokines ont un effet direct sur la croissance des NS. De plus, le traitement aux cytokines individuelles nous permet de constater que le TNF α à forte concentration a un effet négatif direct sur la croissance des NS plus important que les traitements à l'IL-6 ou l'IL-1 β .

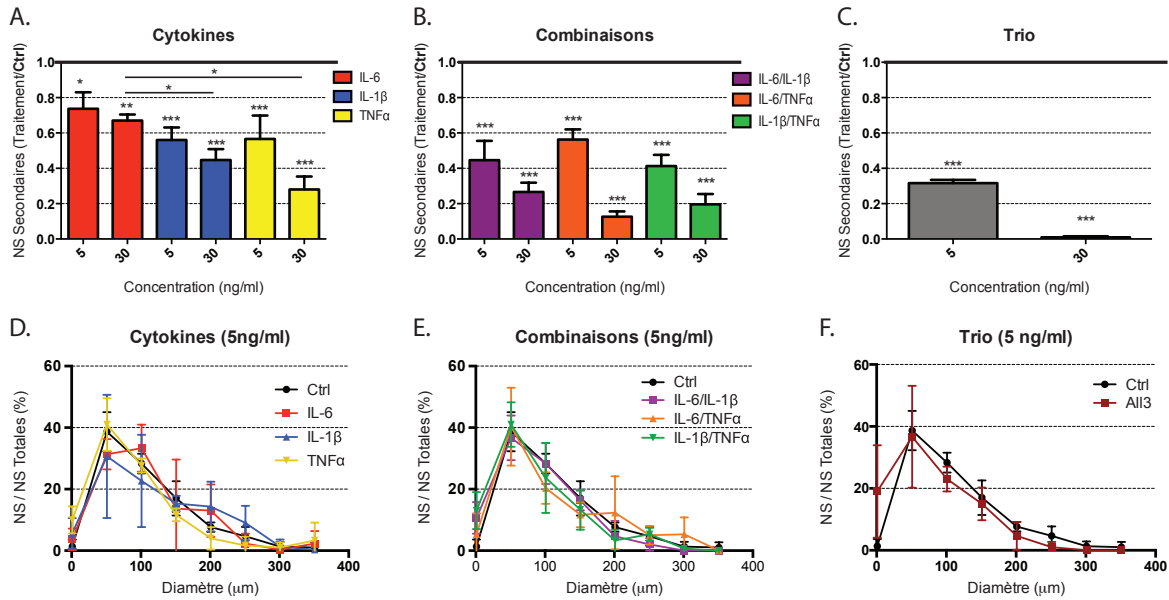


Figure 3-3 Les cytokines inflammatoires affectent directement la croissance des neurosphères. A)B)C) Quantification des NS secondaires traitées en fonction du Ctrl (BSA 0,1%). Les NS secondaires sont traitées avec A) les cytokines IL-6, IL-1β ou TNFα, B) les cytokines en combinaison ou C) les trois ensembles (trio), à une concentration de 5ng/ml ou 30ng/ml pour chaque cytokine. D)E)F) Mesure des diamètres en micromètre (μm) des NS secondaires en présence D) des cytokines IL-6, IL-1β ou TNFα, E) des cytokines en combinaison ou F) des trois ensembles (trio) à une concentration de 5 ng/ml chacune. Chacune des expérience possède un échantillonnage où n=3. Test statistique à comparaison multiple de type Fisher's LSD ($p^* < 0,05$, $p^{**} < 0,01$, $p^{***} < 0,001$).

3.4 Les cytokines inflammatoires modulent la différenciation *in vitro* des cellules souches/progénitrices de la moelle épinière.

La multipotentialité est l'une des principales caractéristiques qui défini une cellule souche adulte. Après un TM, les cellules souches épendymaires activées se différencient exclusivement en cellules gliales et ne génèrent aucun neurone. Il est donc important de déterminer si les cytokines inflammatoires modulent la différenciation *in vitro* des cellules souches/progénitrices de la MÉ (Fig.3-4, p.39). Les expériences de différenciation ont été faites sur des cellules en condition de différenciation provenant de NS secondaires dissociées. Après 5 jours de différenciation, les cellules étaient lysées afin de recueillir leurs protéines. Les traitements aux cytokines (à une concentration de 5ng/ml) ont été administrés de façon ponctuelle, soit au premier jour de la différenciation.

Nous avons premièrement observé les effets des traitements avec les cytokines individuelles (Fig.3-4A,B, p.39). La présence de TNF α inhibe la différenciation gliale (CNPase, GFAP) et neuronale (β III) de manière significative. Le traitement avec l'IL-1 β module significativement à la baisse la différenciation oligodendrocytaire (CNPase). Le traitement à l'IL-6 module à la hausse la différenciation neuronale, sans toute fois avoir d'effet sur la différenciation gliale. Les traitements avec chacune des cytokines ne modulent pas de manière significative la prolifération (PCNA) des cellules souches/progénitrices de la MÉ en condition de différenciation.

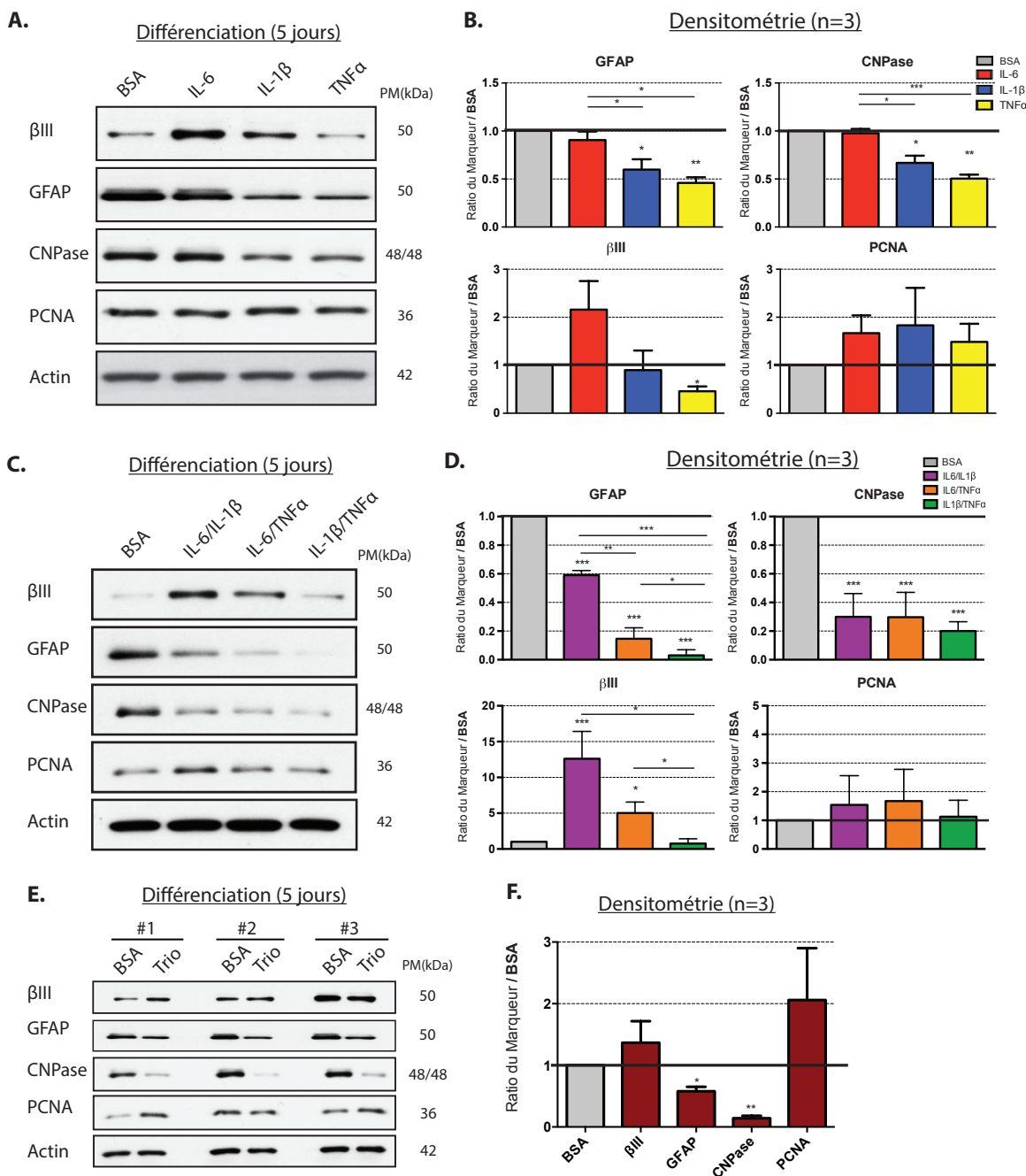


Figure 3-4. Les cytokines inflammatoires modulent la différenciation *in vitro* des cellules souches/progénitrices de la moelle épinière (voir légende p.40).

Légende Figure 3-4 (p.39). Immuno-buvardage de type Western de lysats protéiques provenant de neurosphères secondaires dissociées, différenciées sur une période de 5 jours et traités avec A) les cytokines IL-6, IL-1 β ou TNF α , C) les cytokines en combinaison et E) les trois ensembles (trio), à une concentration de 5ng/ml. Les cultures Ctrl sont traitées avec le véhicule BSA 0,1%. Les marqueurs de différenciation β III-tubuline (neurones), GFAP (astrocytes), CNPase (oligodendrocytes) et le marqueur de prolifération (PCNA) ont été utilisés. La densitométrie B)D)F) pour chacun des marqueurs fut effectué en fonction du contrôle de chargement *Actine* et ensuite normalisé en fonction de la condition contrôle. Échantillonnage $n=3$. Test statistique à comparaison multiple de type Fisher's LSD ($p^*<0,05$, $p^{**}<0,01$, $p^{***}<0,001$).

Afin de vérifier si une cytokine inflammatoire a une effet dominant par rapport à une autre, nous avons traité les cellules en différenciation en combinant les cytokines (Fig.3-4C,D, p.39). Peu importe de quelle combinaison de cytokines il s'agit, nous observons une inhibition significative de la différenciation gliale. L'inhibition astrocytaire (GFAP) est significativement plus importante lorsque la combinaison de cytokines inclut TNF α . De plus, la différenciation neuronale est stimulée à la hausse lorsque l'IL-6 est présente dans la combinaison. Une fois de plus, peu importe le traitement de cytokines combinées, la prolifération des cellules souches/progénitrices en condition de différenciation n'est pas affectée.

Tout comme les deux types de traitements précédents, le traitement du trio de cytokines inflammatoires (Fig.3-4E,F, p.39) diminue significativement la différenciation astrocytaire (GFAP) et oligodendrocytaire (CNPase). Le trio de cytokines module légèrement à la hausse la différenciation neuronale et la prolifération des cellules souches/progénitrices de la MÉ.

Ces différents traitements nous indiquent premièrement que les cytokines inflammatoires modulent directement la différenciation des cellules. Cette expérience nous démontre également que des cytokines peuvent avoir un effet dominant. De plus, lorsque les cytokines inflammatoires sont combinées, certaines d'entre elles peuvent avoir un effet synergique sur la différenciation des cellules souches/progénitrices de la MÉ.

3.5 Le milieu conditionné aux macrophages module la prolifération et la différenciation des cellules souches/progénitrices de la moelle épinière.

La réaction neuro-inflammatoire post-TM *in vivo* n'est pas uniquement composée des cytokines Il-6, Il-1 β et TNF α . Les microglies et les macrophages activés et tous les autres leucocytes infiltrant le site de la lésion sécrètent différents médiateurs majoritairement inflammatoires. Certains de ces médiateurs sécrétés ont des effets reconnus comme étant neurotrophiques. Nous étions curieux de savoir si les macrophages activés et ce qu'ils sécrètent ont des effets *in vitro* similaires aux trois cytokines utilisées précédemment. Pour répondre à cette interrogation, nous avons recueilli du milieu de culture conditionné aux macrophages (mCM) non-stimulés (n-S) ou stimulés (S) avec IL-1 β . Par la suite, ce mCM a été utilisé comme traitement sur des cultures de NS primaires et secondaires ainsi que des cellules en différenciation (Fig.3-5., p.42). Les expériences avec les traitements au mCM suivent le même modèle expérimental que les traitements avec les cytokines inflammatoires.

La première expérience consistait à traiter une culture primaire de NS avec du mCM [n-S] ou [S]. Dans ce cas-ci, la condition contrôle correspond à une culture de NS normale, en présence uniquement des facteurs de croissance (EGF, FGF2) et du supplément B27. À une concentration de 2,5% v/v , il n'y a aucune différence significative du ratio NS/mm MÉ entre le mCM [n-S] et celui [S] (Fig.3-5A, p.42). Par contre, le traitement au mCM[S] augmente le pourcentage de NS primaires ayant un diamètre inférieur à 100 μ m en comparant avec le traitement au mCM[n-S] (Fig.3-5B, p.42).

Il est fort probable que l'action du mCM sur la croissance des NS primaires soit indirecte en raison de la présence de cellules neurales et de débris cellulaire. Le passage de NS primaires en culture secondaire nous donne la possibilité d'observer les effets directs du mCM sur la croissance des NS (Fig.3-5C, p.42). Le traitement de la culture secondaire avec du mCM [n-S] ne semble pas influencer la croissance de NS secondaires. À l'opposer, le traitement au mCM [S] inhibe complètement la croissance des NS.

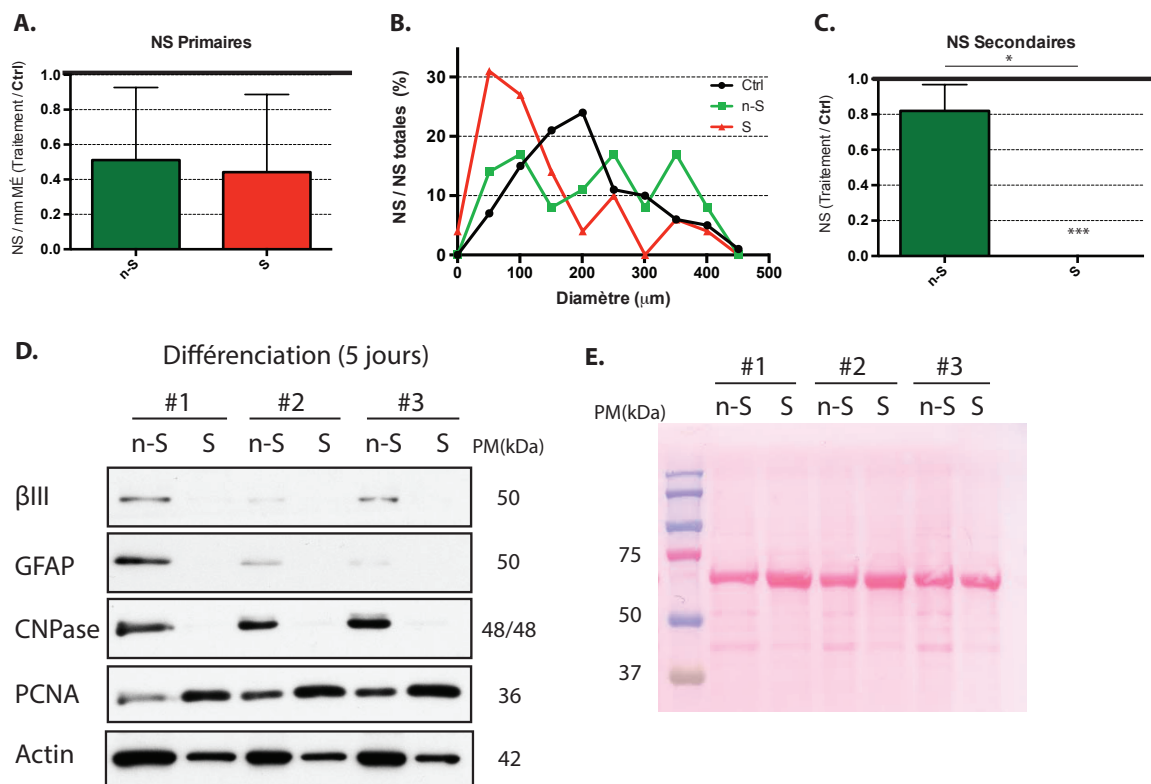


Figure 3-5. Un médium conditionné aux macrophages activés module la prolifération et la différenciation des cellules souches/progénitrice de la moelle épinière. A) Ratio du nombre de NS primaire/mm de MÉ en présence de mCM [n-S] ou [S] avec IL-1 β à une concentration de 2,5% v/v. B) Mesure des diamètres (μ m) de NS primaires traitées au mCM. C) Ratio du nombre de NS secondaires générés par rapport au contrôle traité avec du mCM. D) Immuno-buvardage de type Western de lysats protéiques provenant de cellules NS secondaires dissociées, différenciées 5 jours et traitées avec du mCM. Des marqueurs de différenciation neuronale (β III-Tubuline), astrocytaire (GFAP) et oligodendrocytaire (CNPase) ainsi qu'un marqueur de prolifération cellulaire (PCNA) sont utilisés. Le marqueur actine est aussi utilisé à titre de témoin de chargement E) Membrane de l'immunobuvardage de type Western D) colorée au rouge Ponceau utilisé à des fins de contrôle de chargement. Échantillonnage $n=3$. Test statistique à comparaison multiple de type Fisher's LSD ($p^*<0,05$, $p^{***}<0,001$).

Pour compléter l'expérience comparative, nous avons traité des cellules en différenciation avec du mCM (Fig.3-5D,E, p.42). Les cellules différenciées traitées avec le mCM[n-S] semble conserver un patron de différenciation semblable aux conditions contrôles : une différenciation axée principalement sur la gliose, avec une faible différenciation neuronale et prolifération cellulaire. Le traitement au mCM[S] chamboule complètement la différenciation des cellules souches/progénitrices de la MÉ. Tout d'abord, une absence totale des marqueurs GFAP, CNPase et β III nous indique une inhibition de la différenciation gliale et neuronale. Ensuite, la prolifération cellulaire (PCNA) semble être modulé à la hausse lorsque les cellules différenciées ont été traitées avec le mCM[S]. De plus, l'actine, qui est habituellement utilisée comme marqueur de chargement en WB, semble elle aussi être modulée par la présence du mCM[S]. Une modulation de l'actine nous empêche de faire la densitométrie ; la membrane colorée au rouge de Ponceau nous sert de témoin de chargement des puits (Fig.3-5E, p.42). La différenciation cellulaire implique une réorganisation du cytosquelette, composée d'actine, de filaments intermédiaire et de microtubules. Il est possible que le mCM[S] induirait des changements morphologiques rapides des cellules souches/progénitrices de la MÉ et modulerait l'actine (Neuhuber et al, 2004). L'utilisation d'un marqueur, comme le GAPDH, qui n'implique pas les protéines du cytosquelette pourrait s'avérer être un choix judicieux comme témoin de chargement.

Le traitement du mCM[S] altère directement la croissance des NS. Il inhibe également la différenciation gliale et neuronale, tout en stimulant la prolifération. Ces données nous indiquent que certains des médiateurs sécrétés par les macrophages activés modulent la prolifération et la différenciation des cellules souches/progénitrices de la MÉ de façon similaire au trio (Il-6, Il-1 β , TNF α) de cytokines.

3.6 Établir un protocole expérimental visant à isoler les cellules épendymaires de la moelle épinière.

Dans la MÉ, il a été démontré que les cellules exhibant les principales caractéristiques des cellules souches adultes (capacité d'auto-renouvellement et multipotentialité) sont les cellules épendymaires tapissant le canal central (Meletis et al, 2008; Barnabé-Heider et al, 2010). Dans le cadre d'un projet de recherche plus poussé sur les cellules souches/progénitrices de la MÉ, nous avons voulu développer un protocole expérimental visant à isoler les cellules épendymaires cytométrie en flux. L'isolement des cellules épendymaires par cytométrie en flux permettra d'étudier directement l'expression des gènes et leur profil protéique, sans avoir à mettre ces cellules en culture sur plusieurs semaines, ce qui change probablement leurs propriétés. Dans l'étude de Barnabé-Heider (2010), ceux-ci avaient utilisés un modèle de souris transgénique conditionnel exprimant la GFP (*Green fluorescent protein*) sous le contrôle du promoteur FoxJ1, un marqueur spécifique aux cellules ciliées, dont les cellules épendymaires de la MÉ. Pour développer le protocole de FACS, nous avons élevé une colonie de souris transgénique non-conditionnel exprimant la eGFP (*enhanced green fluorescent protein*) sous le contrôle du promoteur FoxJ1. Le transgène inséré compte 3.3kb. Le fragment promoteur est composé de 1008pb de la région génomique FOXJ1 et inclus un site de départ de transcription d'ARN et un îlot CpG (Ostrowski et al., 2003) (Fig.3-6A, p.45). Un mâle (B6;C3-Tg(FOXJ1-EGFP)85Leo/J) et une femelle de type sauvage ont été commandés pour démarrer la colonie (*The Jackson Laboratory, Maine, USA*) Sur le gel (Fig.3-6B., p.45).

Nous avons analysé le canal central de la MÉ de souris FoxJ1-eGFP positives par IHC à fluorescence (Fig.3-6C-J, p.45). Le transgène est fortement exprimé au niveau du canal central comme le démontre la forte présence de GFP (Fig.3-6C,F,I, p.45). De plus l'expression du transgène se localise uniquement au niveau de cette région de la MÉ (résultat non-affiché). Il nous est difficile de déterminer de manière précise quelles sont les cellules possédant le transgène FoxJ1-eGFP, puisque la fluorescence est très puissante et diffuse. Des marquages avec différents anticorps ont été utilisés afin de caractériser le canal central. Un marquage avec vimentin (Fig.3-6D), un marqueur spécifique aux cellules épendymaires, nous indique que les

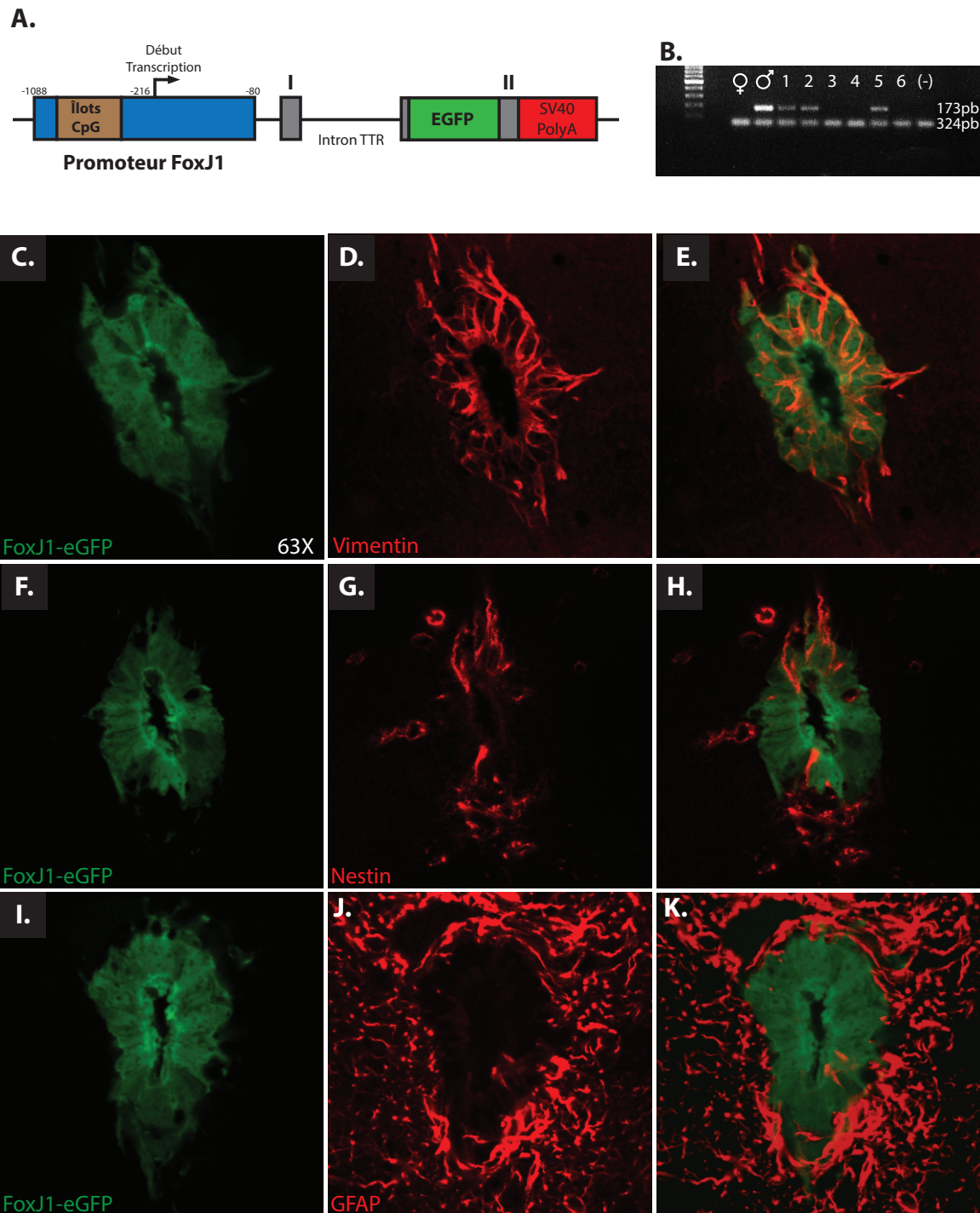


Figure 3-6 Caractérisation du canal central d'une souris porteuse du transgène FoxJ1-eGFP.

(voir légende p.40)

Légende figure 3-6 (p.39) A) Construction du transgène inséré dans le génome de la souris transgénique FoxJ1-eGFP (Ostrowski et al., 2003). B) Révélation sur gel d'agarose d'un géotypage d'une portée de 6 souris provenant d'une mère de type sauvage et d'un père porteur du transgène (173pb). Les bandes apparaissant à 324pb correspondent aux contrôles positifs internes. C) à K) Immunohistochimie sur des sections 40µm de MÉ coupées au vibratome d'une souris transgénique FoxJ1-eGFP. Marquage des cellules épendymaires avec le marqueur vimentin (D) et superposition en E) de vimentin et de l'expression unique du transgène eGFP (C). Marquage des cellules avec le marqueur nestin (G) et superposition en H) de nestin et du transgène eGFP (F). Marquage des cellules avec le marqueur GFAP (J) et superposition en K) de GFAP et du transgène eGFP (I). Images prises à l'aide d'un microscope confocal Leica à une résolution de 63X.

cellules FoxJ1-eGFP positives sont des cellules épendymaires (Fig.3-6E). Les marquages avec nestin et GFAP permettent d'observer la population spécifique de cellules souches au niveau du canal central (Hamilton et al, 2009). Le marqueur nestin se retrouve au niveau des régions ventrale et dorsale du canal central (Fig.3-6G, p.45). Nous avons aussi observé quelques cellules marquées par la GFAP au niveau du canal central (Fig.3-6J, p.45). Cependant la co-localisation de nestin et GFAP avec FoxJ1-eGFP (Fig.3-6K) n'est pas très concluante.

Une fois la caractérisation par IHC complétée, la prochaine étape consistait à vérifier si les cellules épendymaires GFP positives étaient détectables par la cytométrie en flux. En se basant sur le protocole de Meletis et al. (2008), une MÉ de souris femelle FoxJ1-GFP positive fut extraite et dissociée, de la même manière qu'en culture de NS. La MÉ dissociée fut suspendue dans une solution de HBSS et analysée au cytomètre de flux (Fig.3-7A,B, p.48). Il est important de mentionner qu'avant la cytométrie en flux, la suspension cellulaire n'a subi aucun traitement : élimination des débris de myéline, marquage des cellules mortes. Le profil cytométrique (FSC vs SSC) de la suspension cellulaire (Fig.3-7A) comprend donc toutes les cellules, vivantes ou mortes, sans oublier les débris qui peuvent aussi être détectés. Sur une analyse de 50 000 cellules, près de 0,1% des cellules exprimaient la GFP (Fig.3-7B). Malgré le manque d'une souris contrôle de type sauvage, nous sommes en mesure de constater que les cellules épendymaires exprimant fortement la GFP peuvent être détectées.

Il fallait ensuite tenter de trier par FACS, les cellules GFP positives et négatives, afin de déterminer si la formation de NS est strictement réservée à la population cellulaire GFP positive. L'expérience se résumait à dissocier une MÉ de souris FoxJ1-eGFP, trier les cellules

positives et négatives par FACS, mettre les cellules triées dans du MP pour la culture de NS et espérer la génération de NS primaires (Fig.3-7C-F, p.48). La MÉ dissociée d'une souris de la colonie FoxJ1-eGFP, mais n'exprimant pas le transgène, servait de contrôle pour le triage. L'histogramme du triage cellulaire montre clairement qu'aucune cellule ne se retrouve au-delà d'une valeur logarithmique 10^3 , sur l'axe d'intensité fluorescente GFP-A (Fig.3.7C, p.48). À l'opposé, le triage d'une MÉ dissociée d'une souris porteuse du transgène FoxJ1-eGFP nous indique la présence d'une population cellulaire GFP positives (fraction P2, Fig.3-7D, p.48). Nous avons isolé 500 000 cellules GFP négatives (fraction P3, Fig.3-7D) et 7000 cellules exprimant la GFP (fraction P2, Fig.3-7D). Ces 7000 cellules GFP positives représentent environ 0,1% de la population cellulaire provenant d'un segment de MÉ de 20mm. Par la suite, les cellules GFP+ et les cellules GFP- ont été mises en culture de NS. Malgré une fluorescence indétectable des cellules GFP+ en microscopie (Fig.3-7E, p.48), uniquement la fraction P2 contenant les cellules GFP+ a généré un total de trois NS primaires après deux semaines de culture (Fig.3-7F, p.48).

Une NS se définit comme une sphère flottante de cellules ayant pour origine une seule cellule souche/progénitrice. La présence des 3 NS, nous indique qu'à la suite de ce triage, 0,04% des cellules GFP+ ont la capacité de générer des NS et que ces cellules sont potentiellement des cellules souches/progénitrices de la MÉ. Malgré ces résultats encourageants, il n'en demeure pas moins que le protocole d'isolement des cellules épendymaires de la MÉ doit être optimisé afin d'augmenter la population de cellules souches/progénitrices viables.

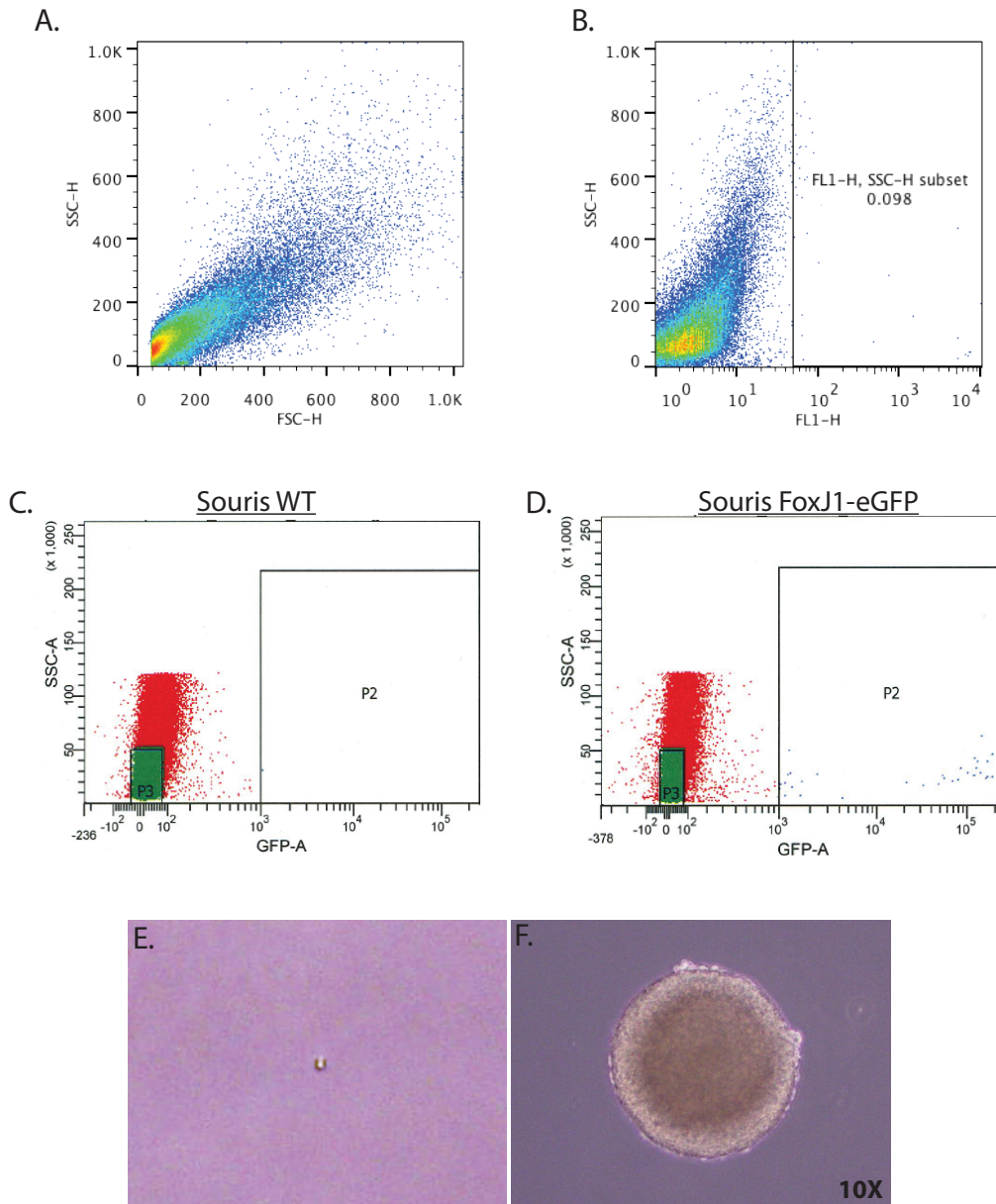


Figure 3-7 Isolement des cellules épendymaires de la moelle épinière via le FACS. A) Moelle épinière d'une souris transgénique FoxJ1-eGFP dissociée et analysée au cytomètre de flux. Un total de 50 000 cellules ont passé dans le cytomètre. B) à E) Isolement des cellules épendymaires par triage cellulaire à l'aide FACS. B) Graphique d'un événement de FACS représentant 100000 cellules provenant d'une moelle épinière dissociée d'une souris de type sauvage (C57/Bl6). C) Graphique d'un événement de FACS représentant 100000 cellules provenant d'une moelle épinière dissociée d'une souris transgénique FoxJ1-eGFP. D) Cellule obtenue dans la fraction de cellules GFP positives ayant été isolée par triage cellulaire. E) Neurosphère primaire provenant de la fraction de cellules GFP positives ayant été isolées par triage cellulaire. Image obtenue par microscopie à contraste de phase.

4. Discussion

4.1 La culture de neurosphères : une méthode appropriée pour étudier les cellules souches/progénitrices de la moelle épinière.

Il a été démontré à maintes reprises qu'une population de cellules souches/progénitrices occupait la M^É (Weiss et al, 1996; Johansson et al, 1999; Meletis et al, 2008, Barnabé-Heider et al., 2010). La culture de NS est une technique intéressante pour étudier la capacité d'auto-renouvellement et la différenciation des cellules souches neurales *in vitro*. Étant donné que cette méthode est au cœur de mon projet de recherche, il est important de bien comprendre ses limites afin d'interpréter les données le plus justement possible (Pastrana et al., 2011).

La culture primaire de NS peut être quantifiée de deux manières ; en tenant compte d'une densité cellulaire lors de la mise en culture, ou en tenant compte de la longueur du segment de M^É dissociée. Nous avons opté pour la seconde option car elle génère plus de NS primaires. De plus, calculer le ratio de NS par millimètre de M^É nous donne une meilleure idée du nombre de cellules souches/progénitrices que peut contenir une M^É. Malgré un protocole suivi à la lettre, nous remarquons une certaine variabilité du ratio de NS/mm M^É pour chacune des M^É dissociée (Fig.3-1B). Il est possible que les conditions de culture de NS modulerait uniquement les cellules souches/progénitrices activées et prêtes à proliférer. Ces conditions laisseraient donc de côté les cellules souches latentes (Pastrana et al., 2009). Évidemment, une culture primaire n'indique pas si les cellules qui forment des NS ont la capacité de s'auto-renouveler en générant de nouvelle NS. Il faut donc faire un passage de NS.

Lors des passages, quelques règles de bases doivent être appliquées pour éviter la formation d'agrégats, qui peuvent être confondus avec de vraies NS et fausser la quantification. Les NS primaires doivent être bien dissociées en cellules individuelles, être mises en culture à une très faible densité et il faut éviter tout mouvement inutile durant l'incubation. En respectant

ces quelques consignes (densité cellulaire de 0,75 cellule/ μ l, laisser les plaques 14 jours dans l'incubateur sans les déplacer), nous augmentons la probabilité d'obtenir une population de NS secondaires dont chacune a pour origine une seule cellule souche/progénitrice. Le faible pourcentage de cellules qui ont la capacité de générer des NS secondaires (Fig.3-1C), nous indique que des cellules de la MÉ dans des conditions particulières de culture ont la capacité de s'auto-renouveler et que celles-ci pourraient être des cellules souches/progénitrices de la MÉ. L'expérience de différenciation démontre que cette petite population cellulaire, qui s'auto-renouvele, est aussi multipotente. Les données démontrent clairement que ces cellules peuvent se différencier en neurones, en astrocytes et en oligodendrocytes (Fig.3-1D-H).

En ayant suivi le protocole de culture de NS de la MÉ de manière rigoureuse, nous en sommes arrivés à des résultats qui se comparent à la littérature. Après 14 jours en culture primaire, nous obtenons une moyenne oscillant entre 10 et 20 NS/mm MÉ (Fig.3-1B). Hamilton et al. (2009) obtinrent une moyenne variant de 5 jusqu'à 30 NS/mm MÉ, alors que Weiss et son équipe (1996) furent en mesure d'avoir des résultats se situant entre 10 et 25 NS/mm MÉ. Au niveau du pourcentage de cellule provenant de NS primaire ayant la capacité de générer des NS secondaires, Weiss et al. (1996) obtinrent des pourcentages très faibles (<1%), tout comme nos résultats obtenus en culture secondaire.

4.2 Les cytokines inflammatoires modulent directement la croissance des neurosphères.

Deux caractéristiques cellulaires sont essentielles à la croissance des NS : la prolifération et la survie. La quantification des NS primaires et secondaires traitées aux cytokines inflammatoires IL-6, IL-1 β et TNF α (individuelle, combinées ou en trio) nous permet uniquement d'affirmer que ces cytokines modulent directement la croissance des NS.

Plusieurs études démontrent que chacune des cytokines inflammatoires utilisées dans le cadre de ce projet de recherche activent des voies de signalisation propre à chacune. Il serait intéressant d'étudier quelles sont les voies de signalisation modulées chez les cellules souches/progénitrices de la MÉ lorsqu'elles sont traitées avec des cytokines. Des résultats

préliminaires (voir Annexe 1) nous démontre qu'un traitement de 24 heures avec le trio de cytokines (IL-6, IL-1 β , TNF α) sur des NS secondaires induit la phosphorylation du facteur de transcription STAT3 (*Signal transducer and activation of transcription-3*). Il est évident que des expériences supplémentaires seront nécessaires en tenant compte de la durée de la stimulation, car certaines voies de signalisation ne sont activées que quelques minutes. Il a été démontré que l'IL-6 sécrétée par les microglies activées promeut la différenciation astrocytaire chez les cellules souches/progénitrices neurales embryonnaire via l'activation de la voie JAK/STAT (Nakanishi et al., 2007). Les cellules souches qui se différencient perdent leur capacité d'auto-renouvellement et ne prolifèrent plus ; cette promotion de la différenciation des cellules souches/progénitrices pourrait être en partie responsable de la réduction du volume des NS lorsqu'elles sont traitées en présence d'IL-6 ou du mCM [S]. Il s'agit d'une hypothèse intéressante qui mériterait une investigation plus poussée.

Une seconde voie de signalisation serait très intéressante à étudier, celle du facteur nucléaire *kappa* B (NF- κ B). Cette famille de facteur de transcription est responsable de l'activation d'une multitude de gènes régulant l'inflammation, la prolifération et la mort cellulaire, sans oublier qu'il a été démontré que les TM induisent l'activation de NF- κ B (Bethea et al., 1998). NF- κ B pourrait aussi être impliqué dans la différenciation précoce des cellules souches neurales (Zhang et al., 2012). Plusieurs facteurs activent NF- κ B, dont l'IL-1 et le TNF α . Les traitements *in vitro* sur les cellules souches/progénitrices de la MÉ avec ces cytokines inflammatoires pourraient activer ce facteur, qui à son tour activerait la transcription de différents gènes, dont ceux de l'IL-6, l'IL-1 β et le TNF α (Pahl, 1999). Pour pousser à un niveau supérieur la recherche sur l'effet de l'inflammation sur les cellules souches/progénitrices de la MÉ, il faudrait déterminer si les cellules épendymaires du canal central et les cellules formant les NS possèdent les récepteurs cellulaires des trois cytokines étudiées et d'autres médiateurs inflammatoires. En connaissant les récepteurs cellulaires, nous serions certainement en mesure de focaliser nos énergies sur des facteurs inflammatoires spécifiques aux cellules souches/progénitrices de la MÉ.

La capacité d'auto-renouvellement d'une cellule souche repose sur son habileté à se diviser de manière symétrique et ainsi avoir une copie identique à elle-même. La division cellulaire asymétrique donne deux cellules filles non-identiques : une cellule souche avec une grande capacité de prolifération et un progéniteur prêt à se différencier (Morin et Bellaïche, 2011; Izumi et al., 2012). La promotion d'une division cellulaire asymétrique pourrait aussi être à l'origine de la réduction du volume des NS. Pour vérifier cette hypothèse, une analyse clonale serait appropriée : dissocier une NS traitée aux cytokines, mettre en culture des cellules de cette NS à une densité de 1 cellule/puits et quantifier les NS (Weiss et al., 1996). À cette densité cellulaire, la NS générée a nécessairement pour origine l'unique cellule initialement déposée dans le puits. Si les cellules de la NS traitée généreraient moins de sphères qu'une NS non traitée, cela pourrait signifier que le traitement aux cytokines stimule un mode de division asymétrique en générant un plus grand nombre de progéniteurs.

Les traitements de NS avec le mCM [S] nous ont permis de constater que leurs effets sur la croissance des NS sont similaires aux divers traitements de cytokines. Il serait intéressant d'effectuer d'autres expériences de cultures de NS traitées au mCM[S] en y ajoutant des anticorps bloquants fonctionnels. En bloquant l'effet de l'une des trois cytokines étudiées, nous pourrions déterminer si ses effets sur les cellules souches/progénitrices de la MÉ sont prépondérants aux autres médiateurs sécrétés par les macrophages activés.

4.3 Les cytokines inflammatoires inhibent la différenciation gliale des cellules souches/progénitrices de la MÉ *in vitro*.

L'étude *in vitro* de la différenciation des cellules souches/progénitrices de la MÉ suggère un modèle plus comparable au modèle *in vivo* que l'étude de croissance des NS. Il est plus comparable dans la mesure où les cellules adhèrent à une matrice, dans ce cas-ci un pétri en plastique. De plus, aucun facteur de croissance n'est ajouté aux conditions de différenciation. Suite à un TM, il a été démontré que les cellules souches épendymaires prolifèrent abondamment et se différencient exclusivement en cellules gliales (Johanson et al., 1999; Barnabé-Heider et al., 2010). Certaines observations intéressantes ressortent de nos expériences de différenciation *in vitro*.

Il est étonnant de voir que la présence d'IL-6 dans les traitements de cytokines semble promouvoir la différenciation neuronale des cellules souches/progénitrices de la MÉ. Des études sur l'IL-6 démontre que cette cytokine a des propriétés anti-neurogéniques (Monje et al, 2003; Mathieu et al., 2010) ou que sa présence est néfaste pour la régénération de la MÉ après un TM (Lacroix et al., 2002; Mukaino et al., 2010). Cependant d'autres travaux démontrent les effets bénéfiques de l'IL-6 sur la survie et la croissance neuronale (Horton et al., 1998; Zhong et al., 1999). Les études *in vitro* sur les effets des cytokines ont principalement été faites sur les cellules souches neurales localisées dans le cerveau. Étant donnée que les cellules souches/progénitrices de la MÉ sont différentes de leurs équivalents du cerveau, il est donc possible que l'IL-6 soit bénéfique pour la différenciation neuronale dans des conditions particulières de culture *in vitro*.

Les traitements aux cytokines inhibent la différenciation gliale. Cette inhibition est encore plus puissante lorsque les cellules sont traitées avec le mCM [S]. Cependant, les traitements aux cytokines ou mCM ne semblent pas affecter la prolifération des cellules. Il aurait été intéressant d'utiliser un ou deux marqueurs de cellules épendymaires (ex. FoxJ1, vimentin) en WB ou ICC pour vérifier si les cellules souches/progénitrices de la MÉ, ayant été traitées, conservent leur phénotype de cellules épendymaires. En théorie, à la suite d'un TM, la majorité des cellules souches épendymaires vont uniquement proliférer et conserver leurs propriétés de cellules épendymaires (Barnabé-Heider et al., 2010). Ce qui pourrait expliquer en partie les données observées suite aux traitements : la présence d'une prolifération cellulaire et l'absence d'une différenciation neuro-gliale.

Il serait de plus, fort intéressant de refaire les expériences de culture de NS et de différenciation, mais cette fois-ci en utilisant des concentrations très faibles de cytokines (inférieurs ou égales à 1ng/ml). Étant donné que les fortes doses de cytokines induisent l'apoptose (Bernardino et al., 2010), en utilisant de faible concentration, les effets bénéfiques des cytokines inflammatoires pourraient être mises davantage en avant plan.

La CG est essentielle dans la mesure où elle protège le tissu sain environnant de différents éléments de la réaction inflammatoires dont les radicaux libres. Une approche thérapeutique intéressante consisterait à contrôler la réaction inflammatoire de manière à favoriser la régénération du tissu lésé, mais sans éliminer les effets bénéfiques de la CG. Contrairement à l'activation et la prolifération des astrocytes qui forment la CG à la suite d'un TM, les trois cytokines inflammatoires inhibent partiellement la différenciation astrogliale *in vitro* des cellules souches/progénitrices de la MÉ. En utilisant des concentrations de cytokines plus faibles lors d'expériences *in vitro*, nous serions peut-être en mesure d'observer une prolifération des astrocytes. Nous devons par ailleurs faire des expériences *in vivo* en bloquant ces trois ou une des trois cytokines inflammatoires afin de déterminer si leurs effets sur la prolifération et la différenciation des cellules souches épendymaires sont significatifs. Par exemple, en bloquant *in vivo* le TNF α à la suite d'un TM, nous observerons peut-être une différenciation axée sur la différenciation neuronale, tout comme nous l'avons observé *in vitro* avec l'IL-6 et l'IL-1 β combiné. Il est important, voir même essentiel de promouvoir la différenciation neuronale lors des TM dans le processus de régénération puisque celle-ci va permettre de reconstruire les circuits neuronaux qui ont été endommagés. Avant de se lancer dans les expériences de TM *in vivo*, nous devons s'assurer que les cellules souches épendymaires du canal central expriment les récepteurs des cytokines IL-6, IL-1 β et TNF α , puisqu'aucune étude dans la littérature ne le démontre jusqu'à maintenant.

4.5 Isolement des cellules épendymaires de la moelle épinière par FACS

Établir un protocole expérimental visant à isoler une très petite population cellulaire logée au cœur de la MÉ est un excellent défi à relever (figure 7-8). Certaines équipes de recherche ont réussi à isoler des cellules souches/progénitrices du SNC (Pastrana et al., 2009; Pfenninger et al., 2011). Le protocole d'isolement des cellules épendymaires par cytométrie en flux de Meletis et ses collaborateurs (2008) était intéressant puisqu'ils travaillaient avec des souris transgénique qui marquait les cellules épendymaires. En s'inspirant de leur protocole, nous avons été en mesure d'isoler des cellules épendymaires exprimant la GFP. Malgré le très faible pourcentage (0,043%) de cellules pouvant générer des NS, il est tout de même

encourageant de savoir que ces cellules proviennent uniquement de la fraction GFP+, donc les cellules épendymaires.

En sachant que Meletis a obtenu 0,18% de cellules triées générant des NS, des expériences de triage supplémentaires devront être faites. Afin de purifier sa population cellulaire, Meletis avait utilisé le marqueur 7AAD qui marquent les cellules mortes. Nous pourrions donc faire de même avec notre protocole pour purifier notre population cellulaire viable. Nous pourrions aussi enrichir le milieu dans lequel les cellules sont suspendues (i.e. avant le triage) avec facteurs de croissance, ce qui permettrait aux cellules d'être en contact avec des facteurs nutritifs tout le long du processus de triage. Lorsque le protocole sera optimisé, il serait intéressant de faire des triages avec un second marqueur (par exemple nestin) afin d'isoler précisément les CSÉ. Ce protocole nous permettra éventuellement d'étudier le génome des CSÉ et de comprendre comment celles-ci sont modulées après un TM.

5. Conclusion

Ce projet de recherche est probablement l'une des premières études qui portent sur l'influence de la neuro-inflammation sur les cellules souches/progénitrices de la MÉ. Habituellement, les études sur les effets de l'inflammation sur les cellules souches endogènes neurales se concentrent sur le cerveau. Nous étions intéressés à étudier les cellules souches épéndymaires de la MÉ, car d'un point de vue thérapeutique à long terme, les options peuvent être très prometteuses.

Dans ce projet de recherche, nous avons démontré *in vitro* que les cellules souches/progénitrices de la MÉ peuvent être modulés dans des conditions particulières de cultures. Les divers traitements *in vitro* avec les cytokines inflammatoires et le mCM[S] démontrent que des éléments de la neuro-inflammation modulent la croissance et la différenciation des cellules souches/progénitrices de la MÉ.

Malgré ces quelques données intéressantes, il est encore trop tôt pour tirer de grandes conclusions. Plusieurs hypothèses devront être vérifiées et consolidées par d'autres expériences. Des études *in vivo* sur les cSÉ de la MÉ seront également requises. Ces expériences aideront à développer des approches thérapeutiques basées sur la régénération de la moelle épinière par ses cellules souches endogènes en modulant la réaction neuro-inflammatoire.

Sources documentaires

Adrian Jr EK, W. B. (1962). "Incorporation of thymidine-H3 by cells in normal and injured mous spinal cord." Journal of Neurophatology & Experimental Neurology **21**: 597-609.

Akassoglou, K., et al. (1998). "Oligodendrocyte apoptosis and primary demyelination induced by local TNF/p55TNF receptor signaling in the central nervous system of transgenic mice: models for multiple sclerosis with primary oligodendroglipathy." The American journal of pathology **153**(3): 801-813.

Akesson, E., et al. (2007). "Long-term culture and neuronal survival after intraspinal transplantation of human spinal cord-derived neurospheres." Physiology & behavior **92**(1-2): 60-66.

Alfaro-Cervello, C., et al. (2012). "Biciliated ependymal cell proliferation contributes to spinal cord growth." The Journal of comparative neurology **520**(15): 3528-3552.

Allen, N. and B. Barres (2009). "Neuroscience: Glia - more than just brain glue." Nature **457**(7230): 675-677.

Altman, J. (1962). "Are New Neurons Formed in the Brains of Adult Mammals." Science **135**(3509): 1127-1128.

AR, A. (1911). "Surgery of experimental lesion of spinal cord equivalent to crush injury of fracture dislocation of spinal column. A preliminary report." Journal of the American Medical Association **57**: 878-880.

Balasingam, V., et al. (1994). "Reactive astrogliosis in the neonatal mouse brain and its modulation by cytokines." The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience **14**(2): 846-856.

Baptiste, D. and M. Fehlings (2007). "Update on the treatment of spinal cord injury." Progress in brain research **161**: 217-233.

Barnabé-Heider, F. and J. Friséen (2008). "Stem cells for spinal cord repair." Cell stem cell **3**(1): 16-24.

Barnabé-Heider, F., et al. (2010). "Origin of new glial cells in intact and injured adult spinal cord." Cell stem cell **7**(4): 470-482.

Bayer, S. A. (1982). "Changes in the Total Number of Dentate Granule Cells in Juvenile and Adults Rats: A Correlated Volumetric and H-Thymidine Autoradiographic Study." Experimental Brain Research **46**: 315-323.

Beattie, M., et al. (2000). "Review of current evidence for apoptosis after spinal cord injury." Journal of neurotrauma **17**(10): 915-925.

Benoit, B., et al. (2001). "Neurotrophin channeling of neural progenitor cell differentiation." Journal of neurobiology **46**(4): 265-280.

Bernardino, L., et al. (2008). "Tumor necrosis factor-alpha modulates survival, proliferation, and neuronal differentiation in neonatal subventricular zone cell cultures." Stem cells (Dayton, Ohio) **26**(9): 2361-2371.

Bernier, P., et al. (2002). "Newly generated neurons in the amygdala and adjoining cortex of adult primates." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **99**(17): 11464-11469.

Bethea, J., et al. (1998). "Traumatic spinal cord injury induces nuclear factor-kappaB activation." The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience **18**(9): 3251-3260.

Braumüller, H., et al. (2013). "T-helper-1-cell cytokines drive cancer into senescence." Nature **494**(7437): 361-365.

Buss, A. and M. Schwab (2003). "Sequential loss of myelin proteins during Wallerian degeneration in the rat spinal cord." Glia **42**(4): 424-432.

Carlson, S., et al. (1998). "Acute inflammatory response in spinal cord following impact injury." Experimental neurology **151**(1): 77-88.

Carpenter, M., et al. (1999). "In vitro expansion of a multipotent population of human neural progenitor cells." Experimental neurology **158**(2): 265-278.

Conti, L. and E. Cattaneo (2010). "Neural stem cell systems: physiological players or in vitro entities?" Nature reviews. Neuroscience **11**(3): 176-187.

David, S. (2002). "Recruiting the immune response to promote long distance axon regeneration after spinal cord injury." Progress in brain research **137**: 407-414.

Deleyrolle, L., et al. (2006). "Exogenous and fibroblast growth factor 2/epidermal growth factor-regulated endogenous cytokines regulate neural precursor cell growth and differentiation." Stem cells (Dayton, Ohio) **24**(3): 748-762.

Donnelly, D. and P. Popovich (2008). "Inflammation and its role in neuroprotection, axonal regeneration and functional recovery after spinal cord injury." Experimental neurology **209**(2): 378-388.

Dromard, C., et al. (2008). "Adult human spinal cord harbors neural precursor cells that generate neurons and glial cells in vitro." Journal of neuroscience research **86**(9): 1916-1926.

English, L., et al. (2009). "Autophagy enhances the presentation of endogenous viral antigens on MHC class I molecules during HSV-1 infection." Nature immunology **10**(5): 480-487.

Eriksson, P., et al. (1998). "Neurogenesis in the adult human hippocampus." Nature medicine **4**(11): 1313-1317.

Frisén, J., et al. (1995). "Rapid, widespread, and longlasting induction of nestin contributes to the generation of glial scar tissue after CNS injury." The Journal of cell biology **131**(2): 453-464.

Goldman, S. and F. Nottebohm (1983). "Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **80**(8): 2390-2394.

Gritti, A., et al. (1996). "Multipotential stem cells from the adult mouse brain proliferate and self-renew in response to basic fibroblast growth factor." The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience **16**(3): 1091-1100.

Guth, L., et al. (1999). "The unique histopathological responses of the injured spinal cord. Implications for neuroprotective therapy." Annals of the New York Academy of Sciences **890**: 366-384.

Hall, P. and F. Watt (1989). "Stem cells: the generation and maintenance of cellular diversity." Development (Cambridge, England) **106**(4): 619-633.

Hama, T., et al. (1991). "Interleukin-6 improves the survival of mesencephalic catecholaminergic and septal cholinergic neurons from postnatal, two-week-old rats in cultures." Neuroscience **40**(2): 445-452.

Hamilton, L., et al. (2009). "Cellular organization of the central canal ependymal zone, a niche of latent neural stem cells in the adult mammalian spinal cord." Neuroscience **164**(3): 1044-1056.

Hauben, E., et al. (2000). "Passive or active immunization with myelin basic protein promotes recovery from spinal cord contusion." The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience **20**(17): 6421-6430.

Hawryluk, G. and M. Fehlings (2008). "The center of the spinal cord may be central to its repair." Cell stem cell **3**(3): 230-232.

Herx, L. and V. Yong (2001). "Interleukin-1 beta is required for the early evolution of reactive astrogliosis following CNS lesion." Journal of neuropathology and experimental neurology **60**(10): 961-971.

Hopkins, S. and N. Rothwell (1995). "Cytokines and the nervous system. I: Expression and recognition." Trends in neurosciences **18**(2): 83-88.

Horner, P., et al. (2000). "Proliferation and differentiation of progenitor cells throughout the intact adult rat spinal cord." The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience **20**(6): 2218-2228.

Horton, A., et al. (1998). "Cytokines promote the survival of mouse cranial sensory neurones at

different developmental stages." The European journal of neuroscience **10**(2): 673-679.

Hugnot, J. and R. Franzen (2011). "The spinal cord ependymal region: a stem cell niche in the caudal central nervous system." Frontiers in bioscience : a journal and virtual library **16**: 1044-1059.

Izumi, H. and Y. Kaneko (2012). "Evidence of asymmetric cell division and centrosome inheritance in human neuroblastoma cells." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **109**(44): 18048-18053.

Johansson, C., et al. (1999). "Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system." Cell **96**(1): 25-34.

Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM, ed. (2000). "Ch. 2: Nerve cells and behavior". *Principles of Neural Science*. McGraw-Hill Professional.

Klusman, I. and M. Schwab (1997). "Effects of pro-inflammatory cytokines in experimental spinal cord injury." Brain research **762**(1-2): 173-184.

Kokoeva, M., et al. (2005). "Neurogenesis in the hypothalamus of adult mice: potential role in energy balance." Science (New York, N.Y.) **310**(5748): 679-683.

Kornack, D. and P. Rakic (1999). "Continuation of neurogenesis in the hippocampus of the adult macaque monkey." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **96**(10): 5768-5773.

Kraus-Ruppert R, L. J., Bürki H, Odartchenko N (1975). "Kinetic studies on glial, Schwann and capsular cells labelled with [3H] Thymidine in cerebrosplinal tissue of young mice." Journal of Neurological Sciences **26**(4): 555-563.

Kwon, B., et al. (2010). "Cerebrospinal fluid inflammatory cytokines and biomarkers of injury severity in acute human spinal cord injury." Journal of neurotrauma **27**(4): 669-682.

Lacroix, S., et al. (2002). "Delivery of hyper-interleukin-6 to the injured spinal cord increases neutrophil and macrophage infiltration and inhibits axonal growth." The Journal of comparative neurology **454**(3): 213-228.

Leal-Filho, M. (2011). "Spinal cord injury: From inflammation to glial scar." Surgical neurology international **2**: 112.

Lee, Y., et al. (2000). "Role of tumor necrosis factor-alpha in neuronal and glial apoptosis after spinal cord injury." Experimental neurology **166**(1): 190-195.

Lendahl, U., et al. (1990). "CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein." Cell **60**(4): 585-595.

Lledo, P.-M., et al. (2006). "Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits." Nature reviews. Neuroscience **7**(3): 179-193.

Louvi, A. and S. Artavanis-Tsakonas (2006). "Notch signalling in vertebrate neural development." Nature reviews. Neuroscience **7**(2): 93-102.

Martens, D., et al. (2002). "In vivo infusions of exogenous growth factors into the fourth ventricle of the adult mouse brain increase the proliferation of neural progenitors around the fourth ventricle and the central canal of the spinal cord." The European journal of neuroscience **16**(6): 1045-1057.

Mathieu, P., et al. (2010). "The more you have, the less you get: the functional role of inflammation on neuronal differentiation of endogenous and transplanted neural stem cells in the adult brain." Journal of neurochemistry **112**(6): 1368-1385.

McKerracher, L. and S. David (2004). "Easing the brakes on spinal cord repair." Nature medicine **10**(10): 1052-1053.

Meletis, K., et al. (2008). "Spinal cord injury reveals multilineage differentiation of ependymal cells." PLoS biology **6**(7).

Meletis, K., et al. (2006). "p53 suppresses the self-renewal of adult neural stem cells." Development (Cambridge, England) **133**(2): 363-369.

Mirzadeh, Z., et al. (2008). "Neural stem cells confer unique pinwheel architecture to the ventricular surface in neurogenic regions of the adult brain." Cell stem cell **3**(3): 265-278.

Moalem, G., et al. (1999). "Differential T cell response in central and peripheral nerve injury: connection with immune privilege." FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology **13**(10): 1207-1217.

Monje, M., et al. (2003). "Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis." Science (New York, N.Y.) **302**(5651): 1760-1765.

Morin, X. and Y. Bellaïche (2011). "Mitotic spindle orientation in asymmetric and symmetric cell divisions during animal development." Developmental cell **21**(1): 102-119.

Morrison, S., et al. (1997). "Regulatory mechanisms in stem cell biology." Cell **88**(3): 287-298.

Mothe, A., et al. (2011). "Neural stem/progenitor cells from the adult human spinal cord are multipotent and self-renewing and differentiate after transplantation." PloS one **6**(11).

Mukaino, M., et al. (2010). "Anti-IL-6-receptor antibody promotes repair of spinal cord injury by inducing microglia-dominant inflammation." Experimental neurology **224**(2): 403-414.

Nakanishi, M., et al. (2007). "Microglia-derived interleukin-6 and leukaemia inhibitory factor promote astrocytic differentiation of neural stem/progenitor cells." The European journal of neuroscience **25**(3): 649-658.

Nguyen, M., et al. (2002). "Innate immunity: the missing link in neuroprotection and neurodegeneration?" Nature reviews. Neuroscience **3**(3): 216-227.

Nunes, M., et al. (2003). "Identification and isolation of multipotential neural progenitor cells from the subcortical white matter of the adult human brain." Nature medicine **9**(4): 439-447.

Ohori, Y., et al. (2006). "Growth factor treatment and genetic manipulation stimulate neurogenesis and oligodendrogenesis by endogenous neural progenitors in the injured adult spinal cord." The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience **26**(46): 11948-11960.

Okada, S., et al. (2004). "Blockade of interleukin-6 receptor suppresses reactive astrogliosis and ameliorates functional recovery in experimental spinal cord injury." Journal of neuroscience research **76**(2): 265-276.

Ostrowski, L., et al. (2003). "Targeting expression of a transgene to the airway surface epithelium using a ciliated cell-specific promoter." Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy **8**(4): 637-645.

Pahl, H. (1999). "Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors." Oncogene **18**(49): 6853-6866.

Palmer, T., et al. (2001). "Cell culture. Progenitor cells from human brain after death." Nature **411**(6833): 42-43.

Pastrana, E., et al. (2009). "Simultaneous prospective purification of adult subventricular zone neural stem cells and their progeny." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **106**(15): 6387-6392.

Pastrana, E., et al. (2011). "Eyes wide open: a critical review of sphere-formation as an assay for stem cells." Cell stem cell **8**(5): 486-498.

Pfenninger, C., et al. (2011). "Prospectively isolated CD133/CD24-positive ependymal cells from the adult spinal cord and lateral ventricle wall differ in their long-term in vitro self-renewal and in vivo gene expression." Glia **59**(1): 68-81.

Pineau, I. and S. Lacroix (2007). "Proinflammatory cytokine synthesis in the injured mouse spinal cord: multiphasic expression pattern and identification of the cell types involved." The Journal of comparative neurology **500**(2): 267-285.

Popovich, P. and E. Longbrake (2008). "Can the immune system be harnessed to repair the CNS?" Nature reviews. Neuroscience **9**(6): 481-493.

Popovich, P., et al. (1997). "Cellular inflammatory response after spinal cord injury in Sprague-Dawley and Lewis rats." The Journal of comparative neurology **377**(3): 443-464.

Profyris, C., et al. (2004). "Degenerative and regenerative mechanisms governing spinal cord injury." Neurobiology of disease **15**(3): 415-436.

Quinn, S., et al. (1999). "Lineage restriction of neuroepithelial precursor cells from fetal human spinal cord." Journal of neuroscience research **57**(5): 590-602.

Rawlings, J., et al. (2004). "The JAK/STAT signaling pathway." Journal of cell science **117**(Pt 8): 1281-1283.

Ray, J. and F. Gage (1994). "Spinal cord neuroblasts proliferate in response to basic fibroblast growth factor." The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience **14**(6): 3548-3564.

Reynolds, B., et al. (1992). "A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes." The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience **12**(11): 4565-4574.

Reynolds, B. and S. Weiss (1992). "Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system." Science (New York, N.Y.) **255**(5052): 1707-1710.

Reynolds, B. and S. Weiss (1996). "Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell." Developmental biology **175**(1): 1-13.

Roitbak, T. and E. Syková (1999). "Diffusion barriers evoked in the rat cortex by reactive astrogliosis." Glia **28**(1): 40-48.

Rothwell, N. (1991). "Functions and mechanisms of interleukin 1 in the brain." Trends in pharmacological sciences **12**(11): 430-436.

Rolls, A., et al. (2009). "The bright side of the glial scar in CNS repair." Nature reviews. Neuroscience **10**(3): 235-241.

Rossignol, S., et al. (2007). "Spinal cord injury: time to move?" The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience **27**(44): 11782-11792.

Roy, N., et al. (2004). "Telomerase immortalization of neuronally restricted progenitor cells derived from the human fetal spinal cord." Nature biotechnology **22**(3): 297-305.

Rubartelli, A. and M. Lotze (2007). "Inside, outside, upside down: damage-associated molecular-pattern molecules (DAMPs) and redox." Trends in immunology **28**(10): 429-436.

Saiwai, H., et al. (2010). "The LTB4-BLT1 axis mediates neutrophil infiltration and secondary injury in experimental spinal cord injury." The American journal of pathology **176**(5): 2352-2366.

Schmitt, A., et al. (2000). "Major histocompatibility complex class II expression by activated microglia caudal to lesions of descending tracts in the human spinal cord is not associated with a T cell response." Acta neuropathologica **100**(5): 528-536.

Schwab, J., et al. (2001). "AIF-1 expression defines a proliferating and alert microglial/macrophage phenotype following spinal cord injury in rats." Journal of neuroimmunology **119**(2): 214-222.

Schwartz, M., et al. (2009). "Boosting T-cell immunity as a therapeutic approach for neurodegenerative conditions: the role of innate immunity." Neuroscience **158**(3): 1133-1142.

Scott, C., et al. (2010). "SOX9 induces and maintains neural stem cells." Nature neuroscience **13**(10): 1181-1189.

Sekhon, L. and M. Fehlings (2001). "Epidemiology, demographics, and pathophysiology of acute spinal cord injury." Spine **26**(24 Suppl): 12.

Silver, J. and J. Miller (2004). "Regeneration beyond the glial scar." Nature reviews. Neuroscience **5**(2): 146-156.

Singec, I., et al. (2006). "Defining the actual sensitivity and specificity of the neurosphere assay in stem cell biology." Nature methods **3**(10): 801-806.

Sofroniew, M. (2009). "Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation." Trends in neurosciences **32**(12): 638-647.

Stammers, A., et al. (2012). "Expression of inflammatory cytokines following acute spinal cord injury in a rodent model." Journal of neuroscience research **90**(4): 782-790.

Stemple, D. and D. Anderson (1992). "Isolation of a stem cell for neurons and glia from the mammalian neural crest." Cell **71**(6): 973-985.

Taupin, V., et al. (1993). "Increase in IL-6, IL-1 and TNF levels in rat brain following traumatic lesion. Influence of pre- and post-traumatic treatment with Ro5 4864, a peripheral-type (p site) benzodiazepine ligand." Journal of neuroimmunology **42**(2): 177-185.

Tator, C. and M. Fehlings (1991). "Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms." Journal of neurosurgery **75**(1): 15-26.

Vescovi, A., et al. (1999). "Isolation and cloning of multipotential stem cells from the embryonic human CNS and establishment of transplantable human neural stem cell lines by epigenetic stimulation." Experimental neurology **156**(1): 71-83.

Weiss, S., et al. (1996). "Multipotent CNS stem cells are present in the adult mammalian spinal cord and ventricular neuroaxis." The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience **16**(23): 7599-7609.

Widera, D., et al. (2006). "Tumor necrosis factor alpha triggers proliferation of adult neural stem cells via IKK/NF-kappaB signaling." BMC neuroscience **7**: 64.

Wilt, S., et al. (1995). "In vitro evidence for a dual role of tumor necrosis factor-alpha in human immunodeficiency virus type 1 encephalopathy." Annals of neurology **37**(3): 381-394.

Woodroffe, M., et al. (1991). "Detection of interleukin-1 and interleukin-6 in adult rat brain, following mechanical injury, by in vivo microdialysis: evidence of a role for microglia in cytokine production." Journal of neuroimmunology **33**(3): 227-236.

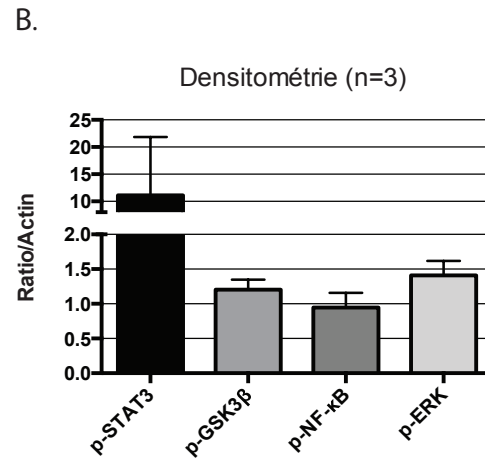
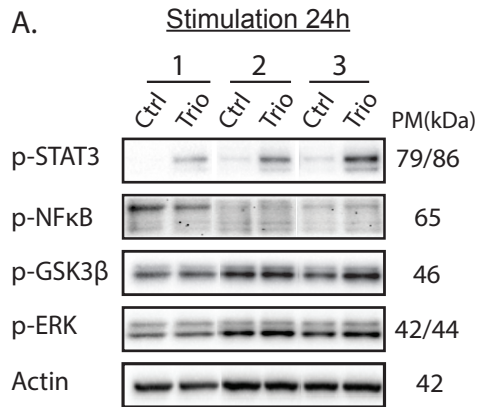
Yamamoto, S., et al. (2001). "Proliferation of parenchymal neural progenitors in response to injury in the adult rat spinal cord." Experimental neurology **172**(1): 115-127.

Zhang, Y., et al. (2012). "Nuclear factor kappa B signaling initiates early differentiation of neural stem cells." Stem cells (Dayton, Ohio) **30**(3): 510-524.

Zhao, M., et al. (2003). "Evidence for neurogenesis in the adult mammalian substantia nigra." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **100**(13): 7925-7930.

Zhong, J., et al. (1999). "Sensory impairments and delayed regeneration of sensory axons in interleukin-6-deficient mice." The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience **19**(11): 4305-4313.

Annexe 1



Modulation des voies de signalisation des cellules souches/progénitrices de la moelle épinière. A) Immunobuvardage de type Western de lysat protéique provenant de neurosphères secondaires traitées 24h avec le trio de cytokines IL-6, IL-1β et TNFα. B) Densitométrie du WB. Échantillonnage n=3.