

# Cellules souches stromales multipotentes du sang menstruel : isolation, caractérisation et différenciation

Amit N Patel<sup>a</sup>, Eulsoon Park<sup>a</sup>, Michael Kuzman<sup>a</sup>, Federico Benetti<sup>b</sup>, Francisco J. Silva<sup>b</sup>  
Julie G. Allickson<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Center for Cardiac Cell Therapy-Heart Lung Esophageal Surgical Institute, University of Pittsburgh/UPMC/McGowan Institute of Regenerative Medicine, Pittsburgh, Pennsylvanie, États-Unis. <sup>b</sup>Benetti Foundation, Rosario, Argentine, <sup>c</sup>Cryo-Cell International, Inc. Oldsmar, Floride, États-Unis

**Adresser toute correspondance à** Amit N Patel MD MS, Director of Cardiac Cell Therapy, The Heart, Lung and Esophageal Surgery Institute, UPMC Presbyterian, McGowan Institute of Regenerative Medicine, 200 Lothrop Street, Suite C 700, Pittsburgh, PA 15213 (Etats-Unis), tél. : 412-648-6411 ; fax : 412-6478681 ; courriel : [patelan@upmc.edu](mailto:patelan@upmc.edu) ou Julie G Allickson PhD, Vice President of Laboratory Operations and Research & Development, Cryo-Cell International, Inc. 700 Brooker Creek Blvd., Suite 1800, Oldsmar, Florida 34677 (Etats-Unis), tél. : 813-749-2100 ; fax : 813-749-2207 ; courriel : [jallickson@cryo-cell.com](mailto:jallickson@cryo-cell.com).

## **Résumé**

La fraction des cellules souches stromales de nombreux tissus et organes a montré qu'elle possédait des propriétés comme la capacité à l'auto-renouvellement et à la multipotence, avec l'aptitude à la différenciation multi-lignages. Dans cette étude nous caractérisons une population de cellules souches stromales issues de sang menstruel (MenSC). Nous montrons que les MenSC se multiplient facilement jusqu'à la significativité clinique et expriment des marqueurs multipotents comme Oct-4, SSEA-4 et c-kit au niveau moléculaire et cellulaire. Nous montrons également la pluripotence des MenSC par différenciation directionnelle en lignages cellulaires chondrogènes, adipogènes, ostéogènes, neurogènes et cardiogènes. Ces études mettent en évidence la plasticité des MenSC pour la recherche en médecine régénérative.

Mots clés : sang menstruel ; cellules souches stromales ; marqueurs multipotents ; différenciation.

## **Introduction**

Les cellules souches embryonnaires (CSE) ont la capacité totipotente de se différencier en tout type de cellule issue des trois feuillets embryonnaires (14,22). Mais le potentiel de tératomes, ainsi que la disponibilité limitée des CSE pour la mise en œuvre clinique à grande échelle, les confinent actuellement à la stricte recherche scientifique.

Compte tenu toutefois du très grand nombre de patients affectés d'une multitude de maladies, on recherche de nouvelles sources de cellules souches présentant des applications cliniques pratiques. Un grand nombre d'autres sources de cellules souches identifiées en sont déjà aux essais cliniques première phase, notamment en insuffisance cardiaque (18), lésion médullaire (17), ainsi qu'en réparation osseuse et du cartilage (24). La fraction des cellules stromales de nombreux tissus et organes a montré *in vitro* une multipotence en se différenciant en cellules de type neurogène, cardiogène, ostéogène, adipogène et chondrogène (4,6,23,24,26). Le fait que les cellules stromales soient capables de se différencier en lignages ectodermique et mésodermique est un témoignage supplémentaire de leur multipotence. La question se pose alors de savoir s'il est possible d'obtenir une source de cellules souches multipotentes de manière sûre et renouvelable qui préserve la capacité de différenciation. Des cellules stromales ont été récemment identifiées dans les tissus endométriaux (3,19). L'acquisition directe de ces cellules constituerait toutefois une procédure très invasive. La paroi endométriale de l'utérus possède une remarquable capacité de régénération. Chaque cycle menstruel donne lieu à une puissante prolifération de tissus et de vaisseaux sanguins qui se détachent à la fin du cycle. Le sang et les tissus détachés contiennent une population hétérogène de cellules dont certaines possèdent une capacité régénérative (5). Les cellules stromales de l'utérus présentent des marqueurs multipotents similaires qui sont souvent présents dans les cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse et peuvent effectivement être issues pour partie de la moelle osseuse (12,20,21). Oct-4 et SSEA-4 sont des marqueurs importants de détermination de multipotence que l'on trouve souvent exprimés dans de nombreuses cellules souches multi et pluripotentes, notamment les CSE, ainsi qu'avec les

marqueurs de surface c-kit (CD 117) (8,10,25). Pour évaluer la faisabilité de l'obtention sûre et reproductible de cellules souches multipotentes de l'utérus, nous avons analysé du sang et des tissus menstruels détachés pour identifier les cellules stromales (MenSC). Nous présentons ici une population de MenSC qui exprime les marqueurs multipotents Oct-4, SSEA-4 et c-kit, avec leur aptitude à la différenciation directionnelle *in vitro* en lignages cellulaires multiples issus du mésoderme et de l'ectoderme et leur aptitude à la multiplication.

## **Matériels et méthodes**

**Obtention et traitement des cellules :** Un échantillon de cellules endométriales/menstruelles a été obtenu à l'aide d'une coupelle Divacup (Kitchener, Ontario, Canada) aux premiers jours d'un cycle menstruel. Les cellules sont recueillies avec le consentement éclairé du donneur validé par un comité d'examen institutionnel. Les cellules sont ensuite transférées dans une solution saline tamponnée au phosphate avec pénicilline/streptomycine et héparine. L'échantillon est transporté à 4 °C jusqu'au laboratoire de traitement 24 à 48 heures après l'obtention. Après centrifugation de l'échantillon le surnageant est évalué pour les bactéries. Les cellules sont mises en culture.

**Méthode de culture cellulaire :** Les cellules sont mises en culture dans le milieu de culture complet de Chang etensemencées en flacon de culture afin d'obtenir des cellules adhérentes (7). Le milieu de culture complet de Chang se compose de milieu alpha MEM (Invitrogen, Carlsbad, Californie), de Chang B (basal) (18 % en volume) (Irvine

Scientific, Santa Ana, Californie), de milieu Chang C issu de Supplement C106 (2 % en volume) (Irvine Scientific, Santa Ana, Californie), de sulfate de pénicilline et de streptomycine (Invitrogen, Carlsbad, Californie), L-glutamine 2 mM (Invitrogen, Carlsbad, Californie), sérum de veau fœtal (15% en vol) (Invitrogen, Carlsbad, Californie). Les cellules sont cultivées 7 jours, puis les milieux changés. Le 10<sup>e</sup> jour les cellules sont repiquées à l'aide de TrypLE Express (Invitrogen) et 50 000 cellules sont obtenues. Ces cellules sont repiquées jusqu'au cinquième passage, moment auquel les cellules sont traitées par tri de c-kit<sup>+</sup> (CD117) à l'aide de microbilles magnétiques (Miltenyi Biotec, Auburn, Californie) conformément aux instructions du fabricant à l'aide d'anticorps monoclonal CD117 antihumain de souris purifié (IgG<sub>1</sub>) avec le clone 104D2 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, Californie). Dix millions de cellules sont traitées avec 900 000 cellules de la fraction positive mise en culture. Les cellules c-kit<sup>+</sup> (CD117) sont repiquées à nouveau et soumises à trois nouveaux passages en milieu de cellules souches mésenchymateuses d'origine médullaire (MSC-BM) (Lonza, Bâle, Suisse). Les cellules sont repiquées à l'aide de 0,25 % trypsine (Invitrogen) et mises en culture sur flacons et plaquesensemencées à 5000–7000 cellules/cm<sup>2</sup>. Les milieux sont renouvelés tous les 2–3 jours entre les passages après les 7 premiers jours de culture.

**Analyse de caryotype :** L'analyse de caryotype a été effectuée par Cell line Genetics (Madison, Wisconsin) par protocole cytogénétique standard. 50 métaphases au total ont été préparées par séchage à l'air et colorées à la trypsine selon le protocole de coloration de Wright pour produire un marquage bande G.

**Extraction de l'ARN et analyse RT-PCR :** L'ARN cellulaire total a été isolé à l'aide d'un mini-kit RNeasy (Qiagen Inc., Valencia, Californie). L'ARN cellulaire total est recueilli de 100 000 cellules environ par expérience. Pour éliminer toute contamination d'ADN, les éprouvettes sont traitées avec 2 U de DNase I (Invitrogen) à 37 °C pendant 15 minutes puis inactivées par adjonction de 2 mM d'EDTA à 65 °C pendant 10 minutes. Les éprouvettes sont concentrées par précipitation à l'éthanol et remises en suspension dans de l'eau dépourvue de RNase. Avant la synthèse d'ADNc, les éprouvettes sont criblées sur la contamination d'ADN génomique par la PCR sur contrôles RT. L'ARN total a été transcrit en ADNc à l'aide d'un kit RT Omniscript puis purifié avec un kit de purification PCR QIAquick (Qiagen Inc.). Pour chaque réaction de PCR, 20 ng de matrice d'ADNc sont utilisés dans un volume de réaction de 25 µl avec les amorces HotStar Taq Plus et Quantitect (Qiagen Inc.). Toutes les cibles sont amplifiées à une température de renaturation de 55 °C pendant 30 cycles. Les produits d'amplification sont identifiés par taille sur un gel d'agarose à 2 %.

**Cytométrie en flux :** Pour l'analyse antigénique de surface cellulaire après enrichissement au c-kit, les cellules sont recueillies, lavées en tampon de blocage glacial (MEM/Hepes + 2% BSA), puis incubées 30 minutes sur la glace en tampon de blocage contenant les anticorps marqués spécifiques FITC, APC, phycoérythrine (PE) ou PECy5. Les anticorps des antigènes de surface cellulaire humaine CD9, CD29, CD34, CD38, CD44, CD45, CD49f, CD90, CD105, CD117, CD166, LIN, MHC I, MHC II sont fournis par Becton, Dickinson and Company, le CD133 par Miltenyi Biotec et le SSEA-4 par Chemicon. Dans toutes les expériences les anticorps recouvrant l'isotype correspondants (Becton, Dickinson & Company, Franklin Lakes, New Jersey) ont servi de contrôle

négatif. Les données (20 000 événements) ont été collectées à l'aide d'un cytomètre en flux FACS Canto (BD Biosciences, San Jose, Californie) et analysés sur logiciel FACS Diva (BD Biosciences).

**Différenciation adipogène :** Les cellules sontensemencées sur gélatine à 0,2 % (Sigma) à 20 000 cellules/cm<sup>2</sup> en hMSC Adipogenic Differentiation BulletKit (ADB) (Cambrex, East Rutherford, New Jersey). Le milieu ADB est constitué de 1mM dexaméthasone, 0,5 mM 3-isobutyle-1-méthylxanthine (IBMX), 10 µg/ml insuline humaine recombinante, 100 mM indométacine et 5 % FBS (Hyclone). Les cellules sont laissées 7 jours dans l'ADB, 3-4 jours en milieu d'entretien adipogénique (AM) (DMEM-LG/GL (Invitrogen, Carlsbad, Californie)) + 1 % de pénicilline/streptomycine (Invitrogen) + 15 % FBS (Hyclone) + 10 µM insuline (Sigma), puis alternées du milieu AM à l'ADB tous les 3-4 jours jusqu'à 20 jours maximum.

**Différenciation ostéogène :** Les cellules sontensemencées sur gélatine à 0,2 % (Sigma) à 20 000 cellules/cm<sup>2</sup> et traitées avec hMSC Osteogenic Differentiation BulletKit (ODB) (Cambrex). Le milieu ODB est constitué de 100 nM dexaméthasone, 10 mM β-glycérophosphate, 0,2 mM ascorbate et 5 % FBS, sont laissées dans l'ODB avec changement du milieu pour moitié tous les 3-4 jours jusqu'à 20 jours maximum.

**Différenciation chondrogène :** Les cellules sontensemencées sur gélatine à 0,2 % à 6000 cellules/cm<sup>2</sup> dans hMSC Chondrogenic Differentiation BulletKit (CDB) (Cambrex) + 1% FBS + 20 ng/ml TGF-β3 (R&D Systems, Inc., Minneapolis, Minnesota) ajoutés frais. Le milieu des cellules est entièrement renouvelé tous les 3-4 jours pendant 14-20 jours.

**Différenciation neurale :** Les cellules sont ensemencées sur lamelle couvre-objet traitée fibronectine (BD Biosciences, San Jose, Californie) à 10 000 cellules/cm<sup>2</sup> en milieu Neural Induction Media (NIM) constitué de DMEM-F/12 (Invitrogen) + 1 % pénicilline/streptomycine + 2mM Glutamax (Gibco) + supplément 1× N-2 (Invitrogen), plus les opérations suivantes : (1) 10 ng/ml ou 100 ng/ml de facteur de croissance fibroblastique basique (bFGF) pendant 4 jours, (2) passage par moitiés dans 10 ng/ml bFGF + 10 ng/ml facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) + 20 ng/ml facteur de croissance épidermique (EGF) pendant 5 jours, et (3) 10 ng/ml bFGF + 10 ng/ml PDGF sans EGF pendant 7 jours pour un total de 16 jours. Les cellules sont cultivées sur lamelle couvre-objet traitée fibronectine avec renouvellement complet des milieux tous les 2-3 jours par des facteurs de croissance frais (tous fournis par R&D Systems, Inc.).

**Différenciation cardiaque :** Les cellules sont ensemencées sur lamelles gélatinées à 0,2 % (VWR) à 30 000 cellules/cm<sup>2</sup> et en coupelles à faible adhérence (Fischer) à 156 000 cellules/cm<sup>2</sup> en milieu cardiaque constitué de DMEM-LG + 1 % pénicilline/streptomycine + 2mM de Glutamax (Gibco) + 1 % de FBS (Hyclone). Au bout de 2 jours, les agrégats cellulaires sont ensemencés sur monocouche cellulaire. Les milieux sont renouvelés après 2 jours en milieu cardiaque avec soit 8 µM 5-aza-2'-désoxycytidine (Aza) ou 400-800 uM S-nitrosothiol-N-acétylpénicillamine (SNAP) (tous deux fournis par Sigma). Le renouvellement complet des milieux est effectué avec de l'Aza frais et les renouvellements par moitié en SNAP frais tous les 2-3 jours pendant 12 jours. Certaines cultures de MenSC ont été induites à subir une cardiogenèse en laissant proliférer les cultures, les milieux sont changés tous les 2-3 jours.

**Immunocytochimie.** Toutes les cellules sont fixées dans 4% de paraformaldéhyde (Electron Microscopy Science, Hatfield, Pennsylvanie) pendant 10 minutes à température ambiante (TA). Les cellules induites en adipogenèse sont marquées des vacuoles adipeuses à l'aide d'un kit de marquage au rouge O en solution huileuse (American Master Tech Scientific, Lodi, Californie). En bref, les cellules sont lavées à l'éthanol 70 % (EMD Chemicals Inc., San Diego, Californie), incubées pendant 10 minutes à TA au rouge O en solution huileuse, puis contremarquées à l'hématoxyline modifiée de Mayer (MMH) (American Master Tech Scientific, Lodi, Californie). Les cellules induites en ostéogénie sont marquées des dépôts de calcium au rouge S d'alizarine (Fisher Scientific, Pittsburg, Pennsylvanie). Pour résumer ces cellules sont lavées 2 fois à l'eau, incubées 1 h à TA avec 0,0075 % de rouge d'alizarine S (Fisher Scientific) dilué dans dH<sub>2</sub>O, et contremarquées avec MMH. Les cellules induites en chondrogenèse sont marquées des protéoglycanes sulfatés au bleu alcian (Sigma). Pour résumer, les cellules sont incubées avec 1 % de bleu alcian (Sigma) dans 0,1 N HCl (Sigma) pendant 1 h à TA, lavées 1 fois avec 0,1 N HCl (Sigma) pendant 5 minutes à TA, puis contremarquées au MMH. Pour le marquage des anticorps, les cellules sont marquées au PBS et fixées dans 4 % de paraformaldéhyde pendant 10 minutes à TA. La solution de blocage, PBS/2 %BSA/10 % sérum de chèvre/Triton X-100 0,2 %, est appliquée pendant 1 h à TA puis mise à incuber avec l'anticorps primaire une nuit à 4 °C. Après lavage dans le PBS/Triton X-100 0,2 %, les cellules sont incubées avec l'anticorps secondaire 1 h à TA, lavées dans le PBS et montées sur milieu de montage Vectashield H-1000. Les cellules d'induction neurale ont été analysées à l'aide des anticorps primaires suivants : tub-III (dilution 1/100), Map2 (1/200), vimentine (1/500), O4 (1/200) (Chemicon, Temecula,

Californie), GalC (1/200) (Sigma) et GFAP (1/200) (BD Biosciences). Les cellules d'induction cardiaque sont analysées à l'aide des anticorps primaires suivants : troponine (dilution 1/200), connexine 43 (1/200) (Chemicon) et actine cardiaque (1/100) (RDI, Concord, Massachusetts). Les noyaux sont marqués avec DAPI (Invitrogen). La spécificité des anticorps a été testée par des cultures de cellules souches embryonnaires humaines avec des cellules neuronales et cardiaques humaines comme contrôles positifs. Les contrôles négatifs de marquage sont le contrôle d'isotype IgG correspondant ou l'omission d'anticorps primaire. La fluorescence est analysée au microscope Olympus BX-61 couplée au logiciel d'imagerie SlideBook, tandis que le marquage mésodermique est analysé au microscope Leica DM IRB avec le logiciel d'imagerie de la suite biologique Microsuite.

## **Résultats**

### **Croissance, expression du marqueur de multipotence et caractérisation des MenSC**

Les MenSC se multiplient rapidement et doublent en l'espace de 24-36 heures ; en commençant avec 50 000 cellules nous en obtenons 48 000 000 le jour 26. (Fig. 1A) et conservons des cellules diploïdes sans aberration chromosomique telle que déterminées par analyse du caryotype au passage 12 (Fig. 1D). Les résultats de RT-PCR montrent en outre que les MenSC expriment le marqueur multipotent Oct-4 au passage 12, mais non Sox-2 ou Nanog (Fig. 1B). L'analyse de cytométrie en flux met en évidence la positivité des MenSC pour les marqueurs de cellules stromales et/ou de cellules souches mésenchymateuses comme CD44, CD105, CD166, CD90, CD49f, MHC I, CD29 et CD9, mais la négativité pour CD38, CD133, CD45, CD34, MHC II, LIN et la positivité

moyenne pour l'adressage des cellules souches liées à CXCR4. L'analyse de cytométrie en flux confirme de plus que les MenSC expriment très fortement le marqueur pluripotent SSEA-4 et c-kit+ (CD117) (Fig. 1C). SSEA-4 et c-kit+ sont enfin co-localisés sur des clones isolés de MenSC. (Figure 2). Les MenSC cultivés paraissent présenter une morphologie de cellule stromale (Fig. 1E). Ces résultats montrent que les MenSC se multiplient facilement et expriment les marqueurs de cellules souches multipotents.

### **Les MenSC se différencient en lignage mésodermique**

Les cellules souches stromales possèdent la capacité de se différencier en tissus mésodermiques cartilagineux, adipeux et osseux. Les MenSC ont été induites en lignage adipogène (Fig. 4B), en lignage chondrogène (Fig. 4D) et en lignage ostéogène (Fig. 4F). Toutes ont présenté des caractéristiques histologiques spécifiques comme les vacuoles adipeuses des adipocytes, la coloration des protéoglycanes sulfatés pour le cartilage et les dépôts de calcium pour l'os. Les Figures 4A, B et C sont des contrôles négatifs. Ces résultats montrent que les MenSC se différencient en tissus mésodermiques à des degrés divers, par exemple 40-50 % des MenSC se sont différenciées en lignage chondrogène, 60-70 % en lignage adipogène et 45 % en lignage ostéogène, toutes de manière similaire ou légèrement meilleure que les cellules souches mésenchymateuses (MSC) d'origine médullaire.

### **Les MenSC se différencient en lignage neural**

Pour démontrer la plasticité des MenSC, nous avons différencié les cellules vers le lignage ectodermique et évalué leur expressivité comme marqueur cellulaire et

moléculaire. Quand des MenSC sont placées dans des milieux contenant du FGF pendant 4 jours, additionnés ensuite de FGF, PDGF et d'EGF pendant 7 jours, puis cultivées dans le FGF et le PDGF sans EGF pendant 5 jours, les cellules ont exprimé les marqueurs oligodendrogliaux O4 et GalC (Fig. 3A–C), le marqueur neuronal mature Map-2 (Fig. 5D) et vimentine (Fig. 5F). Les cellules ont également exprimé le marqueur astrocyte GFAP (Fig. 5E). Les données de RT-PCR appuient les résultats d'immunocytochimie en venant confirmer que les MenSC expriment plusieurs marqueurs neuronaux au niveau de l'ARN (Fig. 5G), notamment la nestine, la molécule d'adhérence cellulaire neuronale NCAM et Nurr-1. Ces résultats attestent de la plasticité des MenSC et de leur potentiel de différenciation en multiples phénotypes neuronaux à un taux de 45-50 %, comparable aux cellules souches mésenchymateuses d'origine médullaire (MSC).

### **Les MenSC se différencient en lignage cardiogène**

Les MenSC peuvent se différencier en cellules de lignage cardiaque par deux techniques différentes. L'immunocytochimie montre une coloration positive des marqueurs cardiaques actine, troponine et connexine 43 lorsque les cellules sont différenciées avec 8  $\mu$ M Aza ou 800  $\mu$ M SNAP (Fig. 6A–C). Les résultats de RT-PCR appuient les données d'immunocytochimie en démontrant que les MenSC différenciées expriment des marqueurs cardiaques au niveau de l'ARN (Fig. 6D) lorsque les cellules sont mises à proliférer avec des agrégats de MenSC. Ces données confirment que les MenSC expriment des marqueurs cardiogènes au niveau cellulaire et moléculaire au taux de 50-60 %, ce qui est comparable aux MSC d'origine médullaire.

### **Activité télomérase**

Les MenSC conservent une activité télomérase supérieure à 50 %, même au passage 12 comparé aux cellules souches embryonnaires humaines, ce qui est bien supérieur aux MSC d'origine médullaire (Figure 2).

## **Discussion**

On a montré le grand potentiel des cellules souches stromales dans la traduction clinique des thérapies régénératives (23,24,26). Nous avons présenté une population de cellules stromales isolées de sang menstruel humain (MenSC). Les MenSC sont caractérisées au niveau tant cellulaire que moléculaire par leur capacité à se multiplier et se différencier rapidement. Cette étude démontre que les MenSC représentent une population cellulaire unique qui peut être isolée sans risque et constituer une source courante de cellules souches auprès de femmes fertiles. L'expression des marqueurs multipotents Oct-4, SSEA-4 et c-kit (CD117) dans les MenSC n'est pas courante dans la plupart des autres cellules souches d'adultes. Nous avons isolé des clones à co-localisation positive c-kit et SSEA-4 (Figure 2). Cette population unique de MenSC est différente de celle récemment décrite par Cui et al. qui a démontré la différenciation en muscle squelettique (5) en mettant en évidence des cellules de sang menstruel qui expriment le profil en flux suivant : CD13, CD29, CD44, CD54, CD55, CD59, CD73, CD90, CD105, MHC-I positifs et CD14, CD31, CD34, CD45, CD50, c-kit, CD133, MHC-II négatifs. Nos cellules (Fig. 1) possèdent les marqueurs multipotents précités qui sont absents des cellules identifiées et utilisées par Cui et al. Les MenSC paraissent en outre posséder des caractéristiques similaires aux cellules souches endométriales humaines identifiées par Cho et al. avec le c-kit (CD117), par Matthai et al avec Oct-4, multipliées par clonage par Gargett et al., et aux cellules souches endométriales de souris identifiées par Cervello et al. simultanément avec c-kit+ (CD117) et Oct-4 (1,2,3,9,15,). Cela pourrait être interprété comme le fait que les MenSC sont la version détachée des cellules souches endométriales et qu'il est facile de les collecter de manière non invasive. L'expression des marqueurs multipotents est révélatrice des cellules qui possèdent la capacité de se différencier en types de cellules issues de multiples feuilletts

embryonnaires. Le facteur de transcription Oct-4 et SSEA-4 sont tous deux des marqueurs de cellules souches embryonnaires humaines exprimées (11), également fortement exprimés dans nos MenSC, et peuvent expliquer la multiplication rapide des cellules (Fig.1). Ils pourraient également expliquer la capacité à la différenciation directionnelle en plusieurs types de cellules (Fig. 4, Fig. 5 et Fig. 6). Le type des cellules différenciées démontre la plasticité des MenSC par le fait que les cellules possèdent non seulement des marqueurs de surface cellulaire phénotypiques à la cytométrie en flux et l'immunochimie, mais aussi par l'expression de mRNA.

Le besoin de thérapies régénératives faisant appel à des cellules dotées de l'aptitude à la greffe et à la différenciation est très vaste. Mais la cellule idéale devrait aussi posséder la capacité d'utilisation allogénique. Les cellules souches mésenchymateuses issues de la moelle osseuse en sont actuellement aux essais cliniques après avoir établi leur sûreté et efficacité dans les modèles animaux pour l'utilisation allogénique grâce à leurs propriétés immunosuppressives (13,16). Du fait de leur facilité de collecte et d'isolation, les MenSC pourraient être une source de cellules multipotentes d'un grand potentiel si elles devaient présenter également ces propriétés.

Nous évaluons actuellement l'utilisation de MenSC humaines *in vivo* pour les thérapies régénératives cardiovasculaires et neurodégénératives dans les modèles animaux. Nous procédons également à l'identification du mélange hétérogène des types de cellules présentes dans le sang menstruel et à l'évaluation de meilleurs moyens d'isoler et de cultiver des populations pures de MenSC. Nous poursuivons enfin les études auprès de donneurs différents afin de déterminer la reproductibilité et l'efficacité du potentiel de différenciation multipotente de ces cellules. En résumé, notre étude démontre qu'il est possible de collecter, isoler, caractériser, multiplier et différencier du sang menstruel humain une population nouvelle et unique de cellules souches stromales.

## **Remerciements**

Nous souhaitons remercier Cryo-Cell International Inc. qui a fourni les cellules à la base de cette étude de recherche, le soutien technique indispensable à cette étude et financé la validation de ces résultats. Nous adressons nos remerciements particuliers à Mercedes Walton, PDG de Cryo-Cell International Inc., pour son hypothèse relative au potentiel de collecte, d'isolation, de traitement et de cryopréservation des cellules souches menstruelles qui est à la base de cette étude de recherche. Cryo-Cell International a déposé des demandes de brevets pour la propriété intellectuelle liée aux procédés, méthodologies et composition des sujets référencés dans cette étude. Nous remercions les équipes de NewStem Biosciences (Irvine, Californie) qui ont effectué la validation de différenciation et d'analyse cellulaire et le phénotypage cellulaire, ainsi que Marin Biologic Laboratories (Tiburon, Californie) pour la validation de la différenciation cellulaire. Amit Patel est soutenu par le fonds Gamal and Cheryl Tawfik Fund.

## Références

1. Cervello I, Martinez-Conejero JA, Horcajadas JA, Pellicer A, Simon C. Identification, characterization and co-localization of label-retaining cell population in mouse endometrium with typical undifferentiated markers. *Hum. Reprod.*, 2007;22:45-51
2. Chan RW, Schwab KE, Gargett CE. Clonogenicity of human endometrial epithelial and stromal cells. *Biol. Reprod.*, 2004;70:1738-1750
3. Cho NH, Park YK, Kim YT, Yang H, Kim SK. Lifetime expression of stem cell markers in the uterine endometrium. *Fertil. Steril.*, 2004;81:403-407.

4. Cogle CR, Yachnis AT, Laywell ED, Zander DS, Wingard DR, Steindler DA, Scott EW. Bone marrow transdifferentiation in brain after transplantation: A retrospective study. *Lancet*, 2004;363:1432–1437.
5. Cui CH, Uyama T, Miyado K, Terai M, Kyo S, Kiyono T, Umezawa A. Menstrual blood-derived cells confer human dystrophin expression in the murine model of Duchenne muscular dystrophy via cell fusion and myogenic transdifferentiation. *Mol. Biol. Cell*, 2007;18:1586-1594.
6. De Coppi P, Bartsch G, Siddiqui MM, Xu T, Santos CC, Perin L, Mostoslavsky G, Serre AC, Snyder EY, Yoo JJ, Furth ME, Soker S, Atala A. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nat. Biotech.*, 2007;25:100–106.
7. Delo DM, De Coppi P, Bartsch G Jr, Atala A. Amniotic fluid and placental stem cells. *Methods Enzymology*, 2006;419:426-438.
8. Gang EJ, Bosnakovski D, Figueiredo CA, Visser JW, Perlingeiro RC. SSEA-4 identifies mesenchymal stem cells from bone marrow. *Blood*, 2007;109:1743-1751.
9. Gargett CE. Identification and characterization of human endometrial stem/progenitor cells. *Australian and New Zealand J. Obstet. Gynaecol.*, 2006;46:250-253.
10. Greco SJ, Liu K, Rameshwar P. Functional Similarities among Genes Regulated by OCT4 in Human Mesenchymal and Embryonic Stem Cells. *Stem Cells*, 2007;25:3143-3154.

11. Henderson JK, Draper JS, Baillie HS, Fishel S, Thomson, JA, Moore H, Andrews PW. Preimplantation human embryos and embryonic stem cells show comparable expression of stage-specific embryonic antigens. *Stem Cells*, 2002;20:329–337.
12. Kearns M, Lala PK. Bone marrow origin of decidual cell precursors in the pseudopregnant mouse uterus. *J. Exp. Med.*, 155:1537-54; 82.
13. Le Blanc K. Immunomodulatory effects of fetal and adult mesenchymal stem cells. *Cytotherapy* 2003;5:484–489.
14. Ludwig TE, Levenstein ME, Jones JM, Berggren WT, Mitchen ER, Frane JL, Crandall LJ, Daigh CA, Conard KR, Piekarczyk MS, Llanas RA, Thomson JA. Derivation of human embryonic stem cells in defined conditions. *Nat. Biotechnol.*, 2006;24:185-187.
15. Mattai C, Horvat R, Noe M, Nagele F, Radjabi A, Van Trotsenburg M, Huber J, Kolbus A. Oct-4 expression in human endometrium. *Mol. Hum. Reprod.*, 2006;12:7-10.
16. Minguell JJ, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cells. *Exp. Biol. Med.*, 2001;226:507–520.
17. Nandoe TR, Hurtado A, Levi AD, Grotenhuis JA, Oudega M. Bone marrow stromal cells for repair of the spinal cord: towards clinical application. *Cell Transplant.*, 2006;15:563–577.
18. Patel AN, Geffner L, Vina RF, Saslavsky J, Urschel HC Jr, Kormos R, Benetti F. Surgical treatment for congestive heart failure with autologous adult stem cell transplantation: a prospective randomized study. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 2005;130:1631-1638.

19. Schwab KE, Chan RW, Gargett CE. Putative stem cell activity of human endometrial epithelial and stromal cells during the menstrual cycle. *Fertil. Steril.*, 2005;84:1124-1130.
20. Schwab KE, Gargett CE. Co-expression of two perivascular cell markers isolates mesenchymal stem-like cells from human endometrium. *Hum. Reprod.*, 2007;22:2903-2911.
21. Taylor HS. Endometrial cells derived from donor stem cells in bone marrow transplant recipients. *JAMA*, 2004;292:81-85.
22. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 1998;282:1145-1147.
23. Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ, Kessler PD. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation*, 2002;105:93-98.
24. Vilquin JT, Rosset P. Mesenchymal stem cells in bone and cartilage repair: current status. *Regen. Med.*, 2006;1:589–604.
25. Yao S, Chen S, Clark J, Hao E, Beattie GM, Hayek A, Ding S. Long-term self-renewal and directed differentiation of human embryonic stem cells in chemically defined conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006;103:6907–6912.
26. Zurita M, Vaquero J. Functional recovery in chronic paraplegia after bone marrow stromal cells transplantation. *Neuroreport*, 2004; 15:1105–1108.

**Figure 1.** Les MenSC croissent rapidement, présentent un caryotype normal (B) et expriment les marqueurs multipotents (A). Le temps de doublement des MenSC de 24-36 heures permet la multiplication rapide à 48 millions de cellules en 8 doublements, à partir de 50 000 cellules seulement, et n'expriment pas d'aberrations chromosomiques à la détermination par analyse de caryotype au passage 12 (C). Les MenSC expriment le marqueur multipotent Oct-4 au niveau RNA jusqu'à 12 passages à l'analyse RT-PCR L, échelle ; W, eau ; CSE, cellules souches embryonnaires ; P12, passage 12. (D) Cytométrie en flux : les MenSC sont positives pour les marqueurs de cellules stromales et/ou mésenchymateuses comme CD44, CD105, CD166, CD90, CD49f, MHC I, CD29 et CD9, négatives pour CD38, CD133, CD45, CD34, MHC II, LIN et moyennement positives pour CXCR4. L'analyse de cytométrie en flux confirme en outre que les MenSC expriment fortement le marqueur pluripotent SSEA-4 et c-kit+ (CD117). (E) Les MenScs cultivés paraissent posséder une morphologie de cellule stromale.

**Figure 2.** Les MenSC immunocolorées pour ckit (A), ckit SSEA4 (c) et la colocalisation SSEA4 (E). Les contrôles négatifs n'ont coloré ni pour ckit ni SSEA4 (B, D, F)

**Figure 3.** Les MenSC expriment l'activité télomérase au passage 12. hESC = cellules souches embryonnaires humaines, MEF = fibroblastes embryonnaires de souris

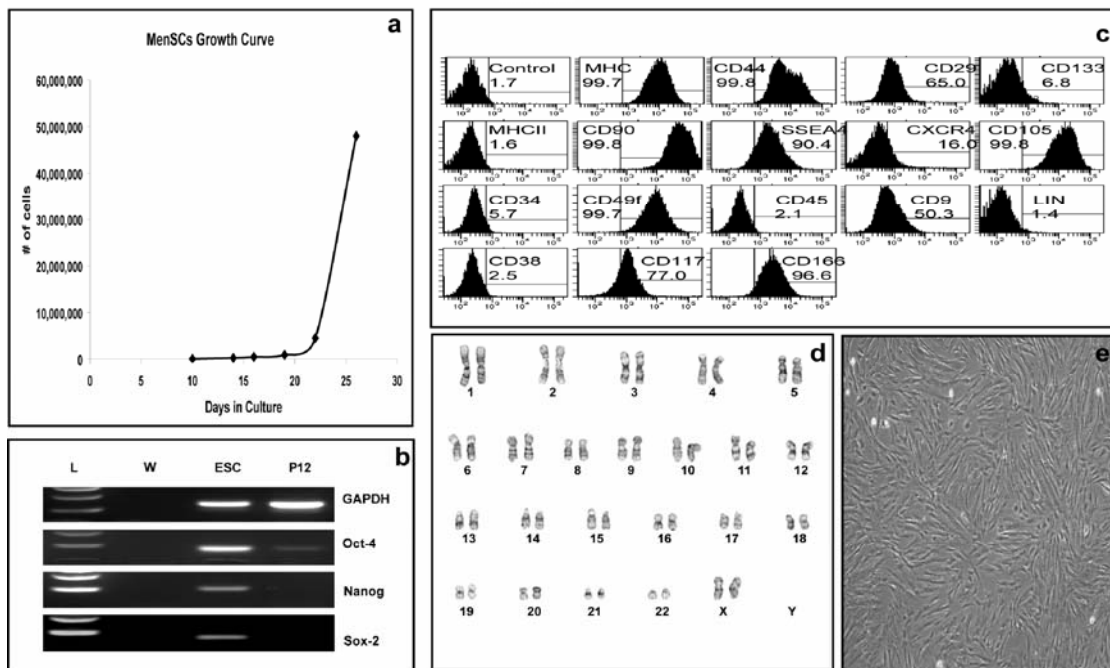
**Figure. 4.** Les MenSC se différencient facilement en types de tissus mésodermiques. Le marquage au rouge O en solution huileuse pour les vacuoles adipeuses témoigne d'une différenciation en tissus adipogènes à l'induction (B) comparé aux contrôles non induits

(A). Le marquage au bleu alcian pour les protéoglycanes sulfatés témoigne d'une différenciation en types de tissus chondrogènes à l'induction (D) comparé aux contrôles de MenSC non induits (C). La marquage au rouge d'alizarine S (F) dans les cellules induites met en évidence des dépôts de calcium comparé aux contrôles non induits (E).

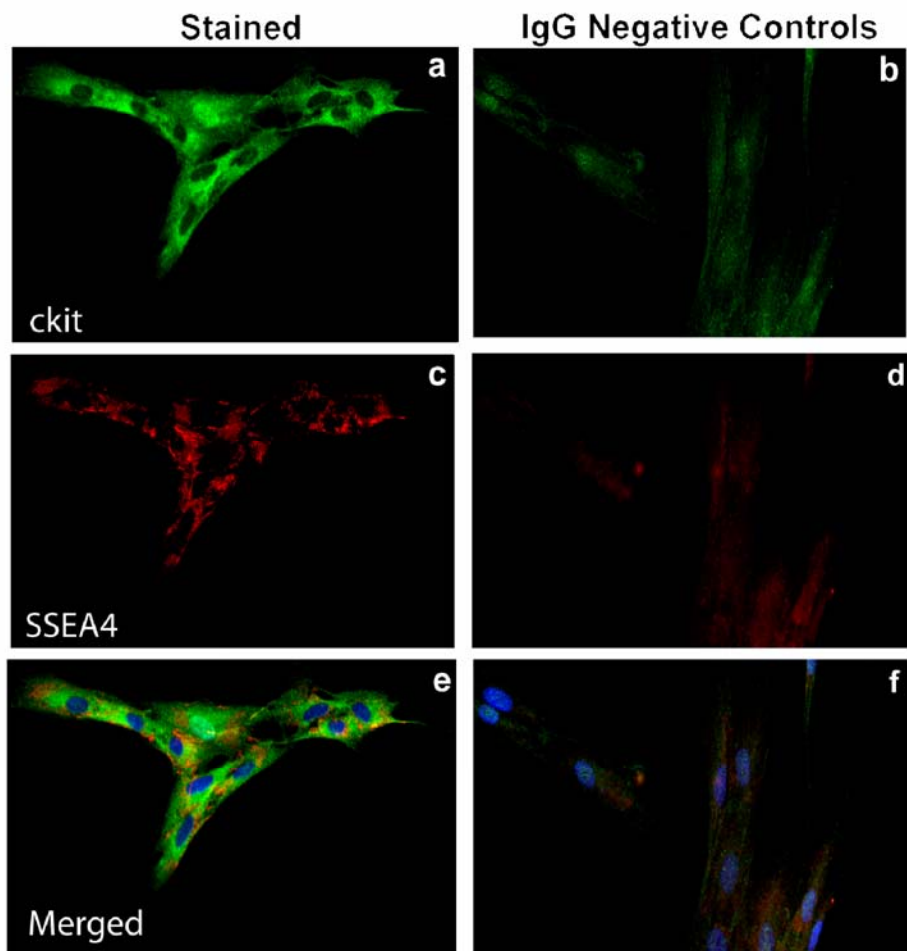
**Figure 5.** Les MenSC se différencient en tissus neuraux. Les MenSC induits en neuraux se différencient en cellules oligodendrogiales exprimant les marqueurs O4 et GalC (A–C). Elles peuvent de plus se différencier en cellules neuronales et en progéniteurs neuraux respectivement mis en évidence par l'expression de Map-2 (D), Tub-3 (E), et vimentine (F). Les résultats de RT-PCR appuient et prolongent notre marquage immunocytochimique mettant en évidence l'expression ARN des cellules neurales (G). Immunocytochimie, 20×. RT-PCR : L, échelle ; W, eau ; B, contrôle cérébral ; MenSC induites en cellules neurales

**Figure 6.** Les MenSC se différencient en tissus cardiaques. L'adjonction de 8  $\mu$ M Aza produit des cellules cardiaques avec l'expression maximum de l'actine mise en évidence par immunocytochimie (B). L'expression de la troponine (A), de la connexine 43 sont obtenues par adjonction de 800  $\mu$ M SNAP (C) mis en évidence par immunocytochimie et RT-PCR. (A–D), 20×. RT-PCR : L, échelle ; W, eau ; H, contrôle cardiaque ; MenSC induites en cellules cardiaques (prolifération).

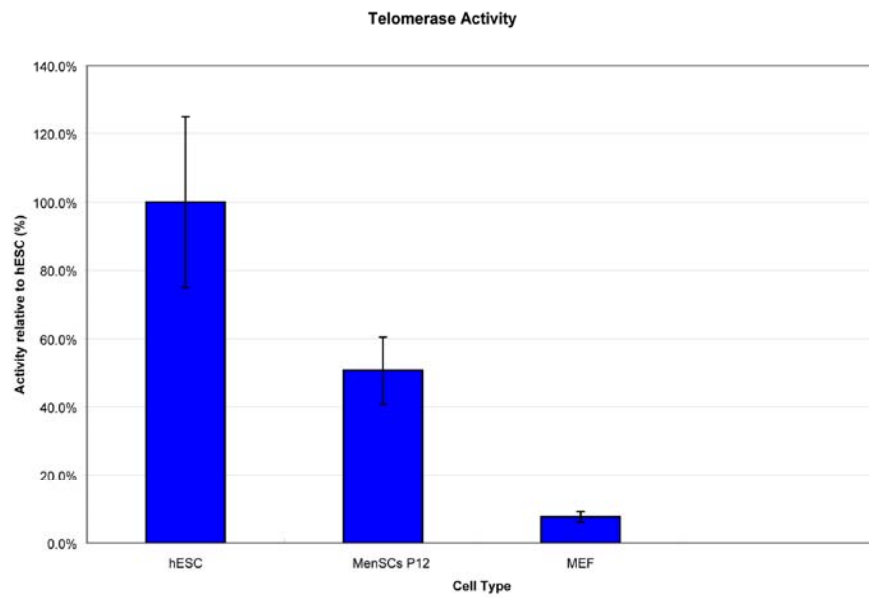
Figure 1.



**Figure 2.**



**Figure 3.**



**Figure 4.**

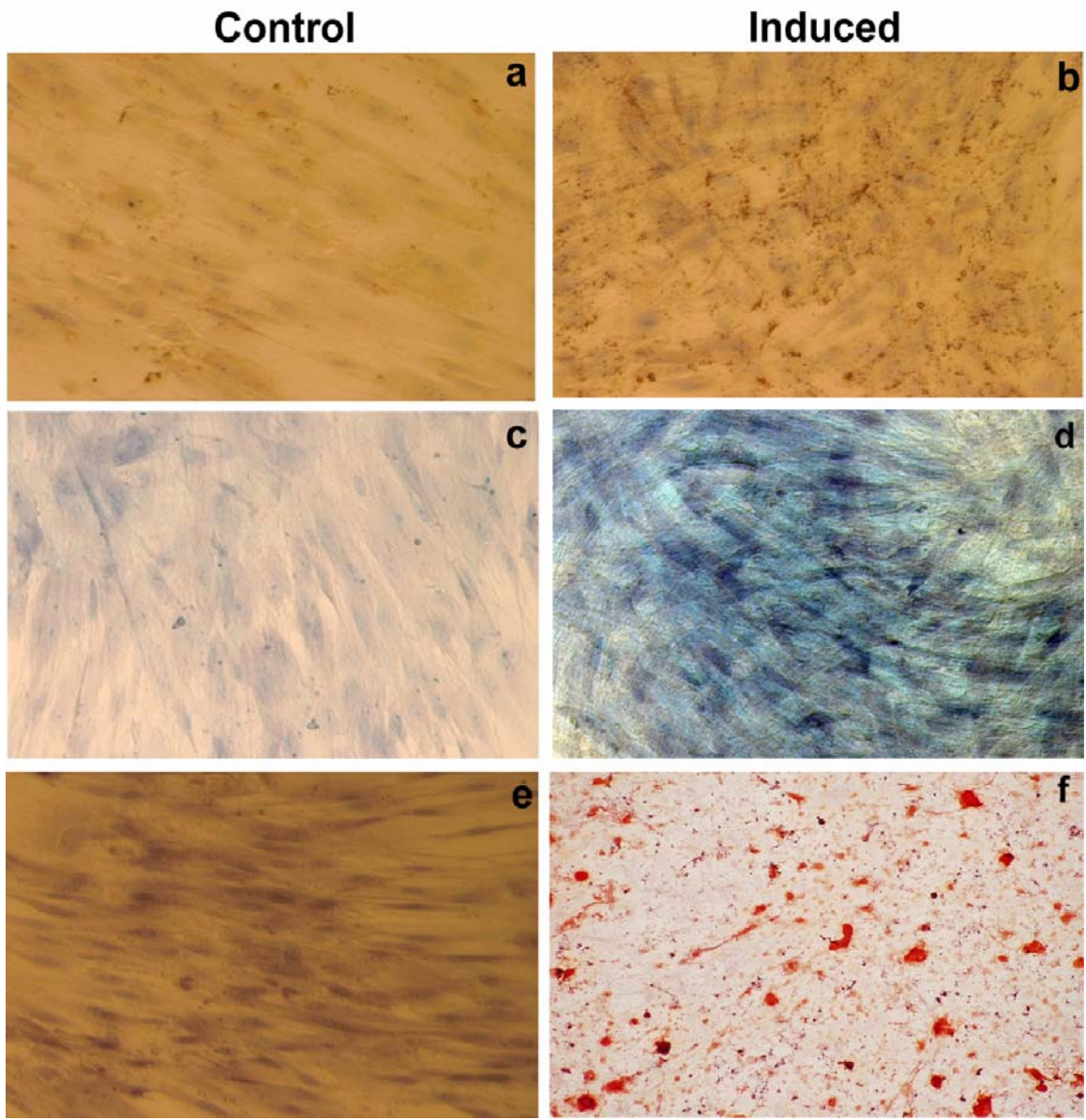
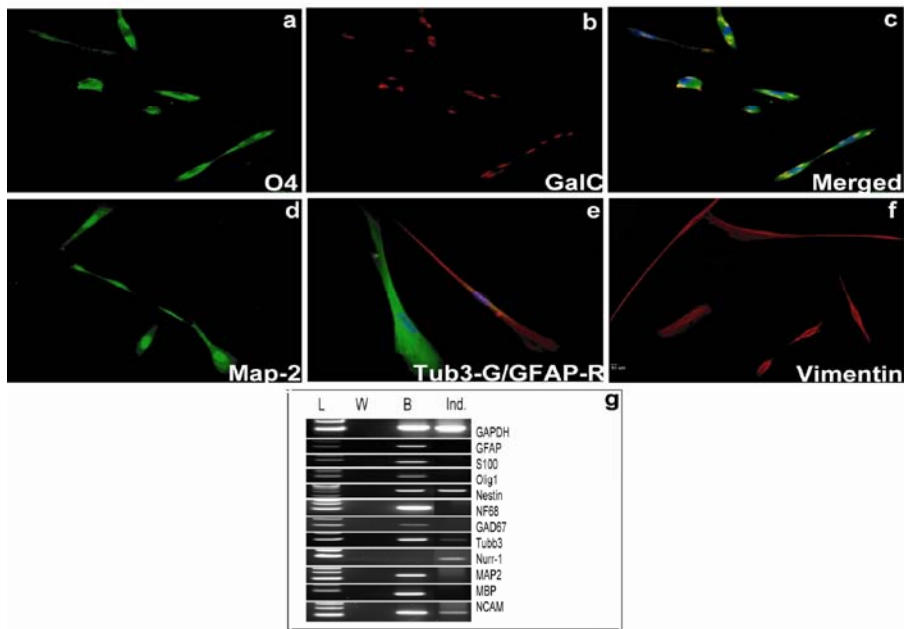


Figure 5.



**Figure 6.**

