

Utilisation de cellules souches embryonnaires pour réparer le système nerveux.

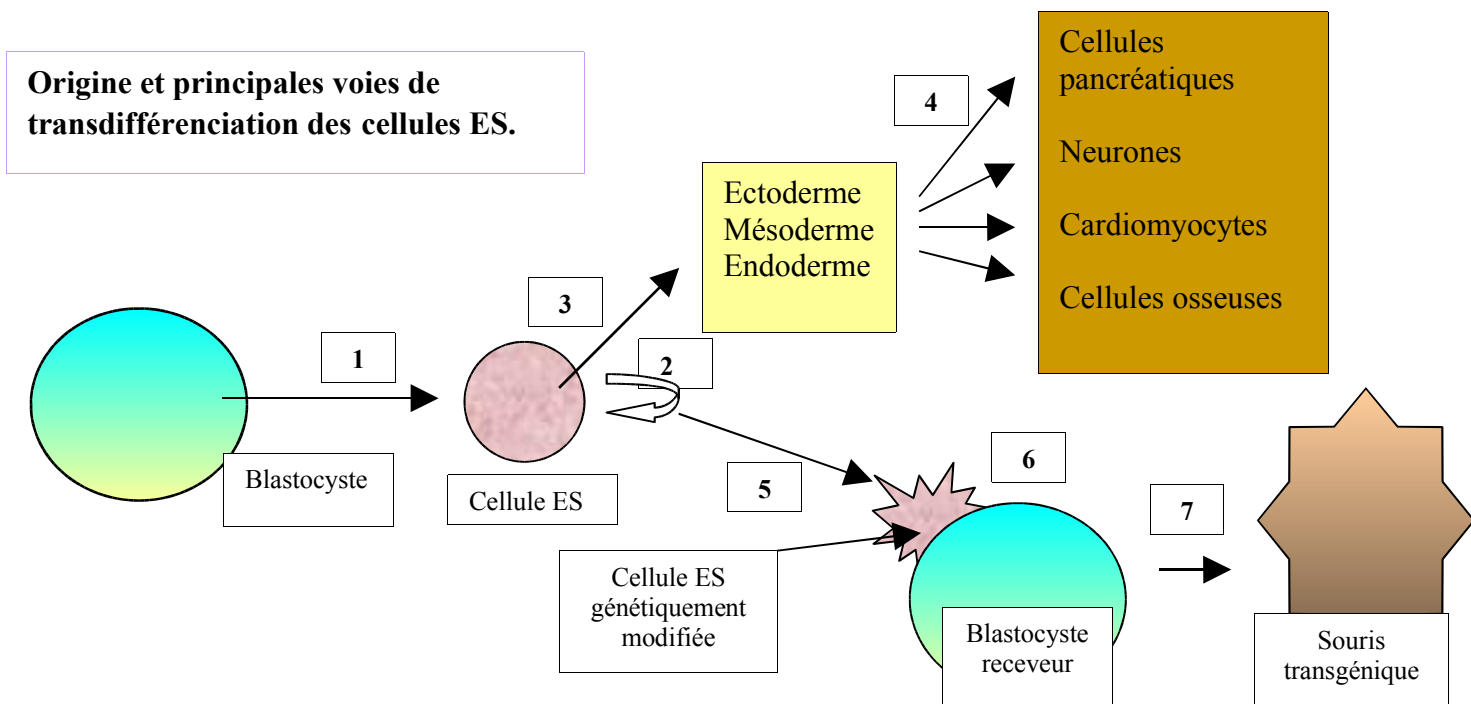
Les cellules ES représentent un outil de choix pour le remplacement de cellules au sein de l'organisme et notamment au niveau du système nerveux. En effet, ces cellules ont la capacité de s'autorenouveler de façon illimitée lorsqu'elles sont placées dans un milieu approprié (contenant du LIF -Leukemia Inhibitory Factor- par exemple). Ce sont des cellules **pluripotentes**, c'est-à-dire qu'elles peuvent se différencier en tous types de lignages cellulaires, in vitro.

Ces cellules peuvent ainsi se différencier en divers types de cellules nerveuses : neurones, astrocytes et oligodendrocytes. La différenciation des cellules ES humaines (hES) en cellules nerveuses et leur administration dans le cerveau font l'objet de très nombreuses recherches compte tenu du vaste champ d'applications possibles. Nous allons tout d'abord expliquer les modalités selon lesquelles les cellules ES peuvent se différencier in vitro en plusieurs types cellulaires, puis nous envisagerons les différents essais cliniques réalisés et les obstacles corrélatifs.

A – Différenciation in vitro des cellules ES en divers lignages cellulaires.

A1 – Caractéristiques des cellules ES cardinales de souris.

Privées de facteurs permettant leur auto-renouvellement (LIF), les cellules ES de souris se différencient spontanément en cellules exprimant des marqueurs neuro-épithéliaux. Ces faits ont conduit à penser que la voie de différenciation en cellules neurales était une voie « par défaut », à la différence des voies de différenciation vers les autres lignages, nécessitant des inducteurs spécifiques.

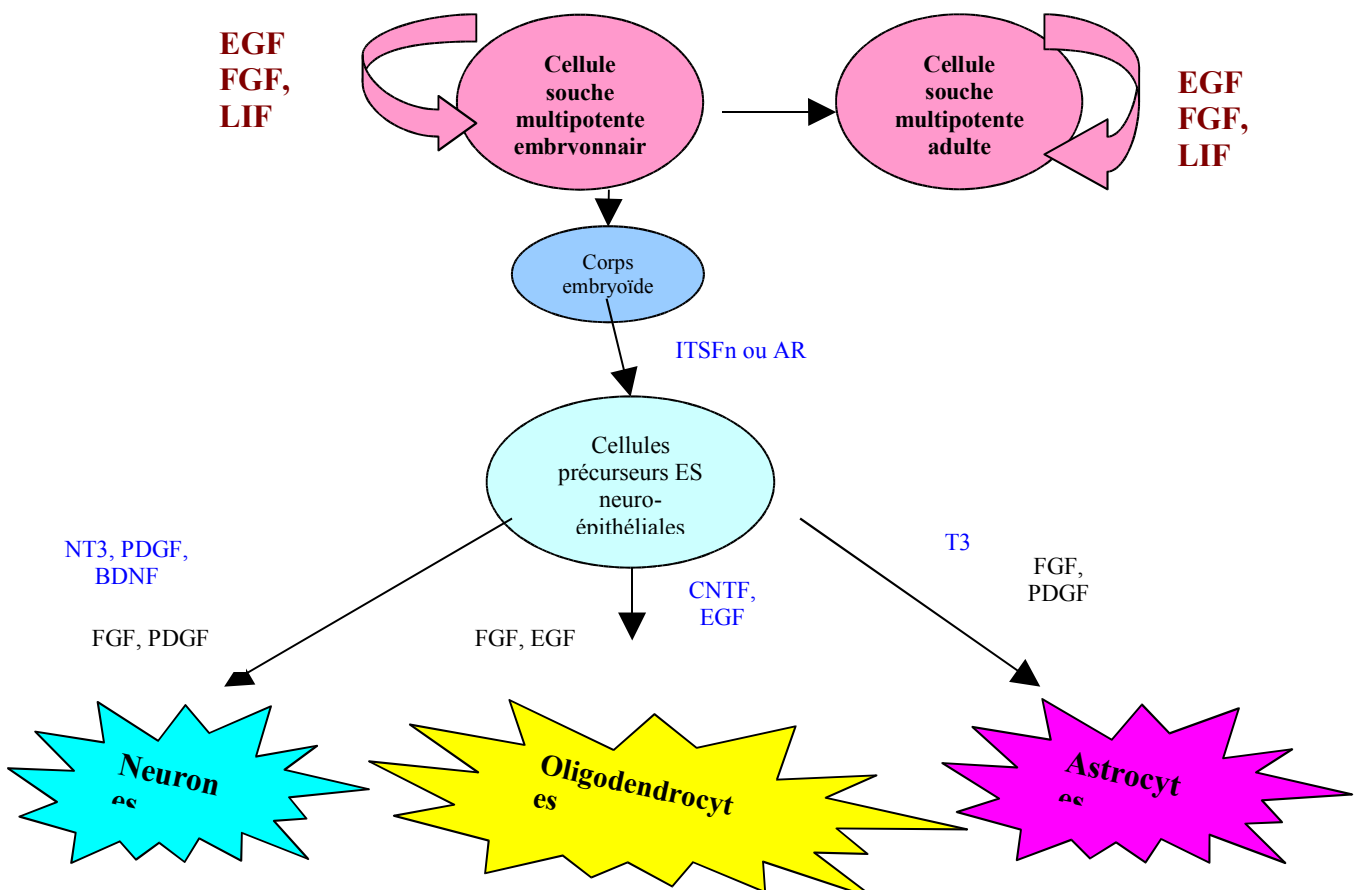


Différentes étapes correspondant au schéma ci-dessus.

1. Prélèvement de cellules ES à partir de la masse interne de blastocystes.
2. Autorenouvellement des cellules ES par une mise en culture avec des facteurs LIF.
3. Différenciation des cellules ES en corps embryoïde (composé de cellules représentatives des trois feuillets embryonnaires).
4. Différenciation des cellules précurseurs en divers types cellulaires suivant les molécules inductrices utilisées (se référer à un paragraphe ultérieur).
5. Transgénèse d'une cellule ES par incorporation d'un gène spécifique.
6. Implantation d'une cellule ES modifiée génétiquement dans un blastocyste receveur dans lequel elle poursuivra son développement et sa différenciation.
7. Formation d'une souris adulte.

Une fois prélevées à partir de la masse interne d'un blastocyste, les cellules ES peuvent se différencier en diverses populations de cellules nerveuses, voire en sous types neuronaux spécifiques (neurones dopaminergiques, sérotoninergiques, motoneurone...). Cette différenciation repose sur la succession d'étapes précises qui sont représentées ci-dessous.

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



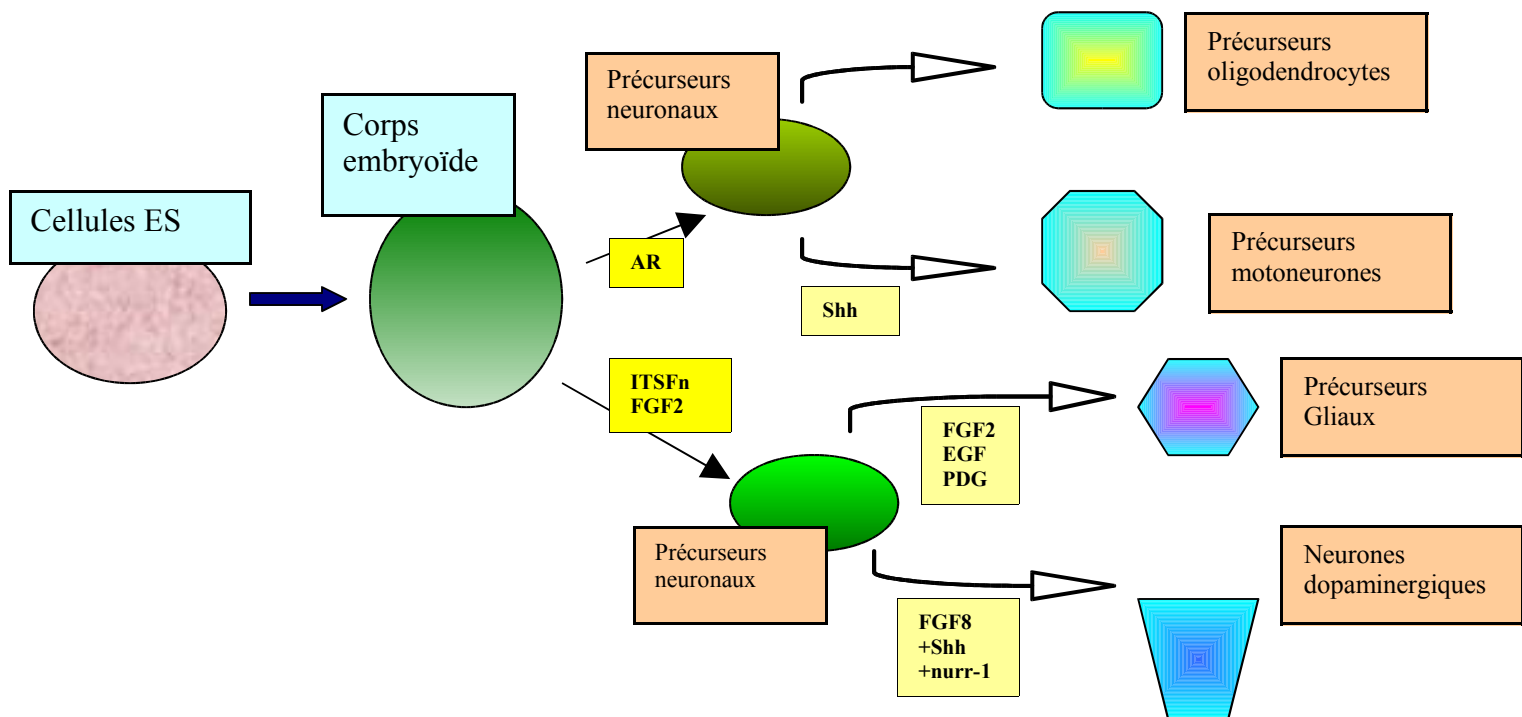
La différenciation terminale des cellules précurseurs ES en cellules neuro-épithéliales matures résulte de l'ajout de facteurs de croissance ou d'hormones spécifiques. Les neurones expriment le marqueur β_{III} – tubuline, les oligodendrocytes expriment le marqueur *O1* et les astrocytes le marqueur *GFAP* (Glial Fibrillary Acidic Protein).

A2 – Modalités de différenciation des cellules ES en différents sous types neuronaux spécifiques.

Nous allons considérer la différenciation in vitro des cellules ES de souris dont les modalités sont les plus connues et maîtrisées. Concernant les cellules ES humaines, il est possible de les engager dans différentes voies de différenciation, mais la maîtrise de cette différenciation en est encore à ses balbutiements.

Le schéma suivant va préciser les conditions sous lesquelles il est possible d'orienter les cellules ES vers une voie de différenciation.

Schéma de différenciation des cellules ES en différents sous-types cellulaires neuronaux



Légendes :

- AR : Acide Rétinoïque.
- ITSFn : Insuline + transferrine + sélénite + fibronectine.
- FGF2: Fibroblast Growth Factor 2.
- EGF: Epidermal Growth Factor.
- PDGF: Platelet Derived Growth Factor.
- Shh: Sonic Hedgehog.

Ces cellules différenciées *in vitro*, à partir de cellules ES, doivent être capables de restaurer, après leur colonisation de la zone lésée, une fonction biologique défectueuse ou annihilée. Afin d'évaluer ces capacités, quatre stratégies ont été mises en place et évaluées. Ces stratégies et leur efficacité corrélative seront développées dans le paragraphe B.

B – Des greffes de cellules neuronales différenciées aux problèmes potentiels.

Parmi les quatre stratégies envisagées, trois portent sur la transplantation de cellules immatures dont la différenciation repose sur l'environnement dans lequel elles seront transplantées, et la quatrième consiste à greffer des neurones post-mitotiques déjà engagés dans la voie de différenciation souhaitée.

B1 – Transplantation de cellules immatures.

▪ *Greffes de précurseurs de motoneurones spinaux.*

Des précurseurs de motoneurones produits à partir de cellules ES ont été transplantés dans la moelle épinière de poulet afin d'évaluer leur capacité à s'intégrer et innover les muscles appropriés.

Ces expériences ont montré que les motoneurones issus de ces précurseurs se localisent, comme les motoneurones endogènes, au niveau ventrolatéral et émettent des axones se développant dans la corne ventrale de la moelle épinière. Ces axones atteignent les cibles musculaires au niveau desquelles ils développent une arborisation terminale dense différenciée, suggérant une possibilité de jonctions neuro-musculaires fonctionnelles.

▪ *Transplantation de précurseurs gliaux.*

Des cellules précurseurs gliaux issues des cellules ES *in vitro*, ont été transplantées dans la moelle épinière de rats, préalablement lésée. Cinq semaines plus tard, on assiste à l'apparition, au niveau de la zone lésée, de néo-cellules neuronales (43% d'oligodendrocytes, 19% d'astrocytes et 8% de neurones). Les rats adultes présentent une récupération fonctionnelle importante, qui serait liée à l'augmentation de la vitesse de conduction des messages le long des axones non lésés, provoquée par une activité myélinisante des oligodendrocytes.

Afin d'éprouver cette hypothèse et d'évaluer le potentiel de remyélinisation des néo-oligodendrocytes, deux expériences ont été réalisées :

1 - Des cellules précurseurs gliaux ont été injectées dans la moelle épinière de rats *md* (*myelin deficient*). Deux semaines après, des zones de remyélinisation apparaissent à la périphérie des lieux d'injection.

2 - Des précurseurs oligodendrocytaires ont été injectés dans le segment thoracique de la moelle épinière de souris *shiverer* (déficiences en *myelin basic protein*).

Deux semaines après, on assiste à une localisation des néo-oligodendrocytes comparable à celle présente chez des souris normales, accompagnée de la myélinisation des axones présents au voisinage du site d'injection.

Ainsi, ces résultats montrent que des précurseurs gliaux ont la capacité de se différencier en oligodendrocytes lorsqu'ils sont injectés dans la moelle épinière, et de myéliniser les axones périphériques. Cependant, la durée de vie de cette régénération n'est pas encore étudiée.

B2 – Transplantation de neurones dopaminergiques mésencéphaliques (TH⁺).

Ces expériences visent à étudier les possibilités de restauration de la neurotransmission striatocorticale dans le cadre de la maladie de Parkinson, en utilisant un modèle de rat.

Les neurones dopaminergiques de la substance noire d'un rat et leurs projections striatales, sont détruits par l'administration de 6'-hydroxy dopamine (6'-OHDA), mimant la dégénérescence observée dans la maladie de Parkinson.

Des neurones TH⁺ produits in vitro à partir de cellules ES, sont greffés dans le striatum de rats trois jours après la lésion provoquée par l'injection de 6'-OHDA. Des analyses électrophysiologiques réalisées quelques mois plus tard, montrent que 5% des neurones ont survécu et sont capables de produire des potentiels d'action et de provoquer au niveau post-synaptique des potentiels post-synaptiques inhibiteurs comme les neurones à dopamine. Ces neurones greffés sont donc capables d'établir des zones synaptiques fonctionnelles.

Les rats lésés présentent des troubles du comportement moteur analogues à ceux observés dans le cadre de la maladie de Parkinson. Pour évaluer les bénéfices issus de la greffe, un comportement moteur a été évalué : la fréquence d'utilisation de la patte antérieure ipsilatérale à la zone lésée, lors de la réception de saut ou pour obtenir de la nourriture. Chez les rats greffés, la fréquence d'utilisation augmente sensiblement montrant ainsi que les cellules injectées permettent la restauration d'une fonction précise.

D'autres expériences reposant sur la greffe de cellules de corps embryonnaire dans le striatum de rats lésés par la 6'-OHDA, ont été réalisées. Quatre mois après la greffe, une fraction des cellules greffées s'est différenciée en neurones exprimant des marqueurs de neurones TH⁺, et l'IRM révèle une augmentation de l'activité striatale dans le cortex sensorimoteur après administration d'amphétamine.

On ne dispose pas actuellement d'informations électrophysiologiques ou fonctionnelles... au-delà de trois mois.

Un problème se pose cependant dans le cas des greffes de cellules différenciées : il y a, dans 20% des cas, développement d'un tératome au niveau du site d'injection.

C – Des études expérimentales aux applications cliniques sur l'Homme.

C1 – Les obstacles liés à la maîtrise de la différenciation des cellules ES.

La greffe de précurseurs issus de cellules ES serait préférable à celle de cellules matures pour une réparation tissulaire car l'innocuité de cette dernière n'est

pas atteinte. Ces précurseurs neuronaux sont en effet capables de se différencier en différents lignages en fonction de leur environnement moléculaire. Le problème repose sur le fait que les populations de cellules précurseurs sont hétérogènes : elles sont constituées de précurseurs de nature et de degré de maturité différents. Ainsi, ces précurseurs peuvent se différencier en de nombreux types cellulaires, une fois transplantés. Il faudra donc apprendre à maîtriser les caractéristiques spécifiques des précurseurs et contrôler leur différenciation après une transplantation. Actuellement, aucune méthode inductive ne permet d'obtenir un seul type de lignée cellulaire à partir de cellules ES. Une stratégie de sélection génétique, utilisant des éléments de régulation de gènes spécifiques d'un lignage cellulaire, a été menée avec succès. Elle a permis un enrichissement en certaines cellules différenciées (précurseurs neuronaux, cardiomyocytes et cellules β pancréatiques) en utilisant des éléments de régulation de gènes codant respectivement pour le facteur de transcription pan-neural *sox2*, la myosine et l'insuline.

C2 – Les obstacles liés aux transferts des technologies aux cellules hES.

Les étapes maîtrisées pour les cellules ES (amplification, autorenouvellement, différenciation, modification génétique...), ne le sont pas encore pour les cellules hES.

D'autre part, il faut absolument prouver, évaluer l'innocuité de la transplantation des cellules hES en recherche préclinique dans un primate non humain. Le modèle singe rhésus constitue le modèle privilégié en raison des fortes similitudes dans les régions corticales et sous corticales avec le cerveau humain.

C3 – Les obstacles liés aux phénomènes de rejets immunologiques.

Comme dans toute greffe, le rejet représente une cause d'échec importante dans le cas d'allogreffe. Les risques peuvent être diminués par un traitement immunodépresseur ou un choix du donneur assurant une proximité immunologique.

Des stratégies visant à modifier les gènes sur système d'histocompatibilité du greffon ont été envisagées et testées chez la souris, comme l'inactivation des gènes du CMH, mais le rejet n'a pas pu être évité.