

## Table ronde 4 : Thérapie cellulaire, 2/ cellules souches

### I. Dr. Alain Privat (INSERM, Montpellier ; IRME)

Notre réflexion à la base de la recherche sur la thérapie substitutive est partie du constat suivant : la moelle épinière sous-lésionnelle est intacte, mais elle ne reçoit plus d'afférences supraspinales, c'est-à-dire d'informations venant du cerveau et d'autres structures situées au-dessous de celui, en particulier certains noyaux du tronc cérébral. Il y a presque 20 ans, nous avons commencé à prélever des neurones embryonnaires du raphé et à les greffer sous une lésion médullaire pour réactiver la moelle épinière - et ainsi recréer une activité réflexe de celle-ci.



Nous nous sommes intéressés à la sérotonine, car ce neurotransmetteur est très présent dans la corne ventrale de la moelle épinière - où sont situés les motoneurones connectés aux muscles - et dans les colonnes intermédiolatérales, où sont situés les neurones pré-ganglionnaires qui contrôlent l'activité des vicaires.

Une analyse cinématique de la locomotion d'un animal intact peut être extrêmement précise en termes de temps, d'espace, etc. Sur une section complète de la moelle épinière (au niveau thoracique bas (T8)), on constate que l'innervation de la sérotonine - qui vient du cerveau - est intacte au-dessus de la moelle épinière, alors qu'elle est absente en dessous de celle-ci quelques jours après la lésion. Lorsque le rat est mis sur un tapis roulant, il est incapable de se mouvoir (cas de paraplégie flasque). Si on réalise, une semaine après la section de la moelle épinière, une greffe des neurones embryonnaires venant de la région du raphé au niveau D11-D12 (à proximité de la région lombaire où se situe le centre locomoteur), on observe un mois et demi après la lésion une réinnervation de la corne antérieure, de la colonne intermédiolatérale et - à un moindre degré - de la corne dorsale. Le rat, mis sur un tapis roulant, est alors capable d'une motricité réflexe. Cette locomotion présente toutes les caractéristiques cinématiques et électrophysiologiques d'une locomotion normale. Ce travail a été réalisé en collaboration avec le groupe de Didier Orsal à Paris et le groupe de Serge Rossignol à Montréal.

En partant de ces constats, nous nous sommes demandé si nous pouvions aller plus loin en essayant de rétablir cette fonction, ainsi que d'autres fonctions. Les rats transplantés présentent une amélioration sensible de leur état vésical, ainsi qu'une séquence érection/éjaculation normale. A partir de cette preuve de principe, nous nous sommes demandé si nous pouvions trouver une stratégie thérapeutique applicable à des patients, en sachant que pour des raisons éthiques et techniques, il est impossible d'avoir recours à des millions de cellules embryonnaires prélevées sur des fœtus. Pour suppléer à cela, nous étudions actuellement trois alternatives :

- les cellules non-neuronales transfectées ;
- les cellules souches ;

- les neurones NT2-humains.

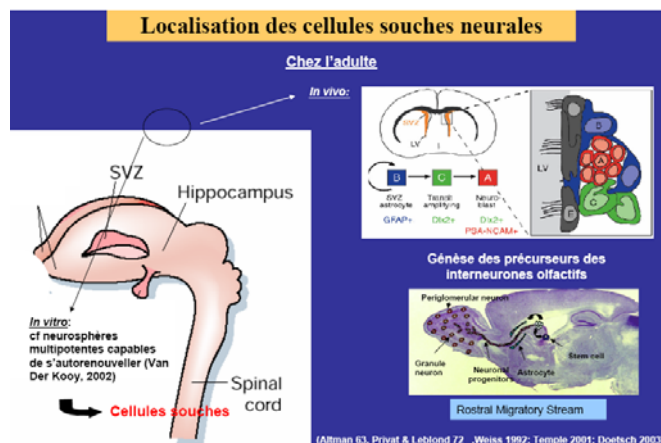
Je vous parlerai aujourd’hui de la deuxième alternative. Les cellules souches neurales sont capables de se différencier en un type intermédiaire - appelé ‘progéniteur’ - et de donner naissance à des précurseurs de trois types cellulaires que l’on trouve dans le système nerveux central : les neurones, les astrocytes et les oligodendrocytes. Il y a quelques années, on se posait deux questions qui demeurent d’actualité : existe-t-il des marqueurs spécifiques des différentes étapes de ce lignage ? Des facteurs contrôlant la formation de ce lignage existent-ils ?

En outre les cellules souches sont capables de s’auto renouveler, en réalisant des divisions asymétriques, c’est-à-dire en faisant en sorte qu’une des cellules filles ait un précurseur d’astrocyte, d’oligodendrocyte ou de neurone - ou des trois à la fois.

Pendant longtemps, nous avons pensé que le système nerveux ne comportait pas de cellules souches, et constituait ainsi une exception parmi les tissus organiques. En 1972, j’ai montré avec Charles Leblond que certaines zones du cerveau de la souris et du rat présentaient toutes les caractéristiques de cellules souches. Toutefois il existe une petite différence entre la couche sous-ventriculaire et l’hippocampe, la première comportant de véritables cellules souches pouvant donner les trois types cellulaires, alors que les cellules précurseurs du second ne sont capables de donner naissance qu’à des neurones et - peut-être - à des astrocytes.

Concernant la moelle épinière, des travaux ont été réalisés au début des années 2000 par le groupe de Rusty Gage en Californie, qui a montré que la souris présentait des cellules précurseurs au niveau de la moelle épinière.

Nous nous sommes interrogés sur le potentiel thérapeutique des cellules souches neurales en biothérapies. Des questions essentielles se posent alors. Comment contrôler leur devenir ? Ces cellules vont-elles se différencier dans le bon sens ? Vont-elles donner naissance à des tumeurs ? Quelles stratégies utilisées pour la régénération/réparation ? Comment les utiliser dans des lésions traumatiques et/ou des pathologies neurodégénératives ?

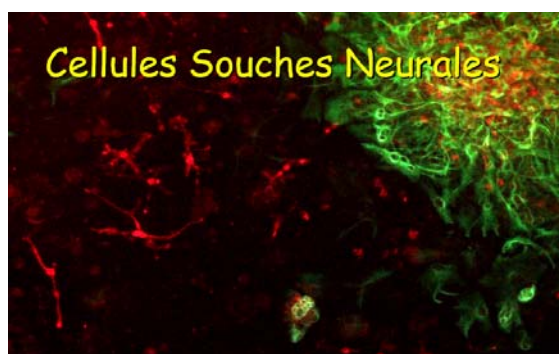


Extrait du diaporama du Dr Privat

Les cellules souches neurales sont présentes chez l’Homme adulte dans le cerveau. Elles peuvent potentiellement se différencier en neurones et cellules gliales. Les possibilités thérapeutiques reposent sur deux approches : la transplantation de neurosphères - cultures de cellules souches - ou l’activation de cellules quiescentes locales. Des cellules souches

sont-elles présentes dans la moelle épinière humaine adulte ? Peuvent-elles se transformer en neurones et en glie ?

Grâce à l'Établissement Français des Greffes au CHU de Montpellier, nous avons pu accéder à des moelles épinières provenant de patients en état de mort cérébrale, sur lesquelles nous avons pu réaliser des prélèvements dans d'excellentes conditions. Nous avons tout particulièrement examiné la structure de la région péri-épendymaire qui présente une couche de cellules de l'épendyme qui joue un rôle d'interface entre le canal central et le tissu environnant. Nous avons examiné des cellules sous-épendymaires au microscope électronique ; nous avons pu en identifier de deux types : les cellules C qui se multiplient activement, et les cellules B qui sont des précurseurs de cellules neurales. Ensuite nous avons regardé un certain nombre de marqueurs de cellules de souches (Nestin, Olig2, CD15, GFAP, PSA-NCAM).



Extrait du diaporama du Dr Privat

A partir de sept prélèvements, nous avons réalisé des cultures et avons incorporé un marqueur (Br DU) des cellules qui se divisent. Lorsque ces cellules sont placées dans des conditions de culture différentes sur un substrat adhérent, des éléments - présentant toutes les caractéristiques morphologiques de ce que pourraient être des axones - poussent après seulement quelques heures. En utilisant différents marqueurs, nous avons pu observer que la moelle épinière adulte humaine comporte des cellules capables de se différencier en neurones, astrocytes, oligodendrocytes.

Nos travaux nous ont permis d'aboutir aux conclusions suivantes.

- La moelle épinière sous-lésionnelle comporte des réseaux fonctionnels pouvant rétablir une locomotion réflexe.
- La transplantation de cellules embryonnaires sérotoninergiques réactive le centre locomoteur.
- Une stratégie thérapeutique applicable en clinique serait d'utiliser des cellules souches indigènes et de les activer par les outils de la thérapie génique pour réaliser une autothérapie cellulaire.
- Alternativement, des cellules souches prélevées par micro-biopsie peuvent être cultivées, transformées si nécessaire, et greffées.

Dans le contexte précis des lésions traumatiques importantes de la moelle épinière - sans communication entre les structures supraspinales et cette dernière - nous savons qu'il existe un potentiel au niveau d'une moelle épinière sous-lésionnelle, avec des cellules souches qui peuvent, dans des conditions très précises, se transformer en neurones, en astrocytes et en oligodendrocytes. Il reste maintenant à poursuivre notre travail en exploitant des outils dont nous ne soupçonnions même pas l'existence il y a cinq ans. Nous allons mener d'autres

expérimentations avec ces cellules, notamment en les greffant sur des petits singes. Nous devons progresser étape par étape. L'espoir existe, mais les résultats de nos travaux ne seront pas opérationnels demain. Les cellules souches constituent un outil potentiellement important dont nous n'avons pas fini d'explorer les possibilités et les dangers. Il nous faut donc encore du temps.

## II. Contrepoint : question d'un blessé

Audrey HENOQUE, ALARME

Vous avez parlé de l'activation de la marche réflexe et d'un fonctionnement vésical et sexuel. A long terme, l'intérêt thérapeutique serait pour les patients d'avoir une baisse de leur niveau de lésion. Sur les rats, avez-vous pu réaliser plusieurs niveaux de lésion et observer une baisse de leur niveau de lésion ?



Dr. PRIVAT

Notre laboratoire mène trois stratégies convergentes :

- **la protection**  
Il convient de faire en sorte qu'une moelle épinière ou un cerveau ne subisse pas les dommages d'une lésion secondaire après une lésion primaire. On réduit l'étendue de la lésion. Il est plus simple de réduire une mort cellulaire que de réparer.
- **la régénération**  
Celle-ci concerne la possibilité de gagner un à trois étages, et ainsi de faire repousser quelque chose et de récupérer une fonction volontaire.
- **une troisième approche**  
Cette stratégie doit permettre de rétablir certaines fonctions réflexes (ex : contrôle vésical, contrôle de la défécation, locomotion réflexion, etc.). Elle s'adresse à des patients anciens chez lesquels il est uniquement possible d'agir sur ce qui reste, c'est-à-dire sur une moelle épinière sous-lésionnelle, dont on peut essayer de tirer le meilleur parti. Cette approche n'exclut pas celle consistant à contourner la cicatrice ou à la rendre perméable.

**Audrey HENOQUE**

Cette approche concerne donc les patients touchés assez gravement au niveau de la blessure, mais peu au niveau des cervicales.

**Dr. PRIVAT**

Il peut s'agir d'une lésion - haute ou basse - complète, thoracique ou cervicale, car dans les deux cas, une moelle sous-lésionnelle peut être réorganisée. Nous avons observé de bonnes évidences sur l'existence de patrons de contrôle de la motricité vésicale qui sont normalement stimulés par des signaux volontaires venant du cortex cérébral et d'autres régions, et qui peuvent, dans certaines conditions, être réactivés et rééduqués.

**Audrey HENOQUE**

Aujourd'hui nous avons vu que des greffes de cellules souches ont commencé au Portugal et en Australie. Elles s'appuient sur des essais préalables sur l'animal. Parallèlement, d'autres thérapies sont développées. L'une d'elles, concernant les anti-Nogo, est en essai de phase II par le Pr. Schwab en Suisse. Par ailleurs il existe des molécules permettant de stimuler la repousse. Ces trois types de recherche complémentaire ayant fait leur preuve sur l'animal, serait-il possible de les combiner et de les tester sur l'animal ?

**Dr. PRIVAT**

Des essais de combinaison sur l'animal ont d'ores et déjà débuté, dans notre laboratoire et ailleurs. Il faut toutefois comprendre que l'interprétation de ce type de travail est extraordinairement complexe puisque les variables sont multiples.

### III. Questions réponses avec la salle

#### De la salle

Les travaux de recherche sur la moelle épinière sont-ils assez nombreux ? Où restent-ils un parent pauvre de la recherche ?

#### Dr. PRIVAT

Il y a 25-30 ans, 2 chercheurs en France et 15 dans le monde travaillaient sur la moelle épinière. Actuellement, nous comptons plusieurs centaines d'équipes. La moelle épinière est donc devenue un sujet à la mode. Lorsque nous avons débuté nos travaux, nous avons eu beaucoup de mal à convaincre les instances qui nous accordent des crédits de l'intérêt de nos recherches et de leur faisabilité. Depuis, les effectifs ont sensiblement augmenté en France et dans le monde. Cette évolution est liée au fait que nos travaux ont abouti à des résultats intéressants ; en outre un grand nombre de nos collègues se sont rendu compte que la moelle épinière pouvait servir de preuve de principe pour des recherches relevant d'autres domaines de recherche plus complexes, comme les traumatismes cérébraux, les maladies dégénératives, etc. Ainsi une partie des travaux que nous menons sur les cellules souches intéresse beaucoup des collègues qui s'occupent d'une maladie neurodégénérative de la moelle épinière (la sclérose latérale amyotrophique).

#### Dr. DECHERCHI

Force est toutefois d'admettre que la recherche sur la moelle épinière demeure le parent pauvre de la recherche française.

#### De la salle

Lorsque des essais cliniques seront éventuellement mis en place en France, quelle sera la démarche à suivre pour « postuler » ?

#### Dr. BAUCHET

Ces essais cliniques concerneront des patients respectant des critères très précis (20-40 ans, lésions complètes). Les inclusions dans des protocoles se font en fonction de la « clientèle » du médecin. En France, le domaine de la paraplégie est bien structuré ; c'est appréciable car cela donne du poids pour obtenir des subventions et avancer dans la recherche. Sur Internet, vous trouverez des sites d'association qui peuvent vous informer de la tenue des essais cliniques. En outre les médecins qui s'occupent de manière spécifique de la paraplégie ont connaissance de ces essais cliniques. En France, nous sommes plutôt bons puisque l'essai clinique sur le GK11 était français ; l'intervention de la reconnexion de la moelle épinière sus-lésionnelle à des muscles sous lésionnels, chez un patient paraplégique, était française ; la France implante des stimulateurs de Brindley ; le projet SUAW est français. C'est grâce à vous que nous avançons, car vous nous poussez.



### Audrey HENOQUE

Lors des essais cliniques, on cherche des patients au profil idéal pour prouver que la technique fonctionne. La question de la généralisation doit également être abordée. Si des essais comparables à ceux réalisés en Australie sont menés en France d'ici deux-trois ans, on pourrait peut-être prouver que les patients opérés ont eu quelques récupérations. Ces techniques seront-elles alors généralisées aux patients ou continuera-t-on à chercher une thérapie idéale durant de nombreuses années supplémentaires ?

### Philippe MONTAY

Il s'agit probablement des deux.

### Dr. PRIVAT

Dans le domaine des essais cliniques, la collaboration internationale est exemplaire et peu comparable à celle que l'on observe dans d'autres domaines. L'ICCP a édicté des règles précises sur les essais cliniques dans quatre articles de 30 pages chacun.

### De la salle

Dans le cadre de vos travaux, vous implantez des cellules souches sous la lésion de la moelle épinière et développez ainsi un certain potentiel qui n'existait pas. Vous êtes donc en train de créer une super moelle épinière. Jusqu'où peut aller ce potentiel ?

### Dr. PRIVAT

Si vous suspendez un nouveau-né par les bras et posez ses pieds sur une surface dure, il commencera à marcher, car son centre locomoteur médullaire est en fonction, mais il n'y a pas encore de connexion fonctionnelle entre son cerveau et sa moelle épinière lui permettant d'avoir une locomotion volontaire précise. Ce réflexe disparaît durant les premiers jours suivant la naissance. Chez l'adulte, un centre de la moelle épinière existe toujours et peut, s'il est bien stimulé, contrôler ces fonctions. Nous rétablissons un certain nombre de fonctions qui existent dans la moelle épinière, alors qu'elle n'est pas encore connectée fonctionnellement avec le cerveau.

