

Quels espoirs thérapeutiques pour les cellules souches dans les maladies neurologiques ?

B.Rogister

Centre de Neurobiologie Cellulaire et Moléculaire et Service de Neurologie, Université de

Liège

17, place Delcour, 4020 Liège. Bernard.Rogister@ulg.ac.be

1. Introduction :

Ce n'est pas par hasard que les premiers essais de thérapie de remplacement cellulaire dans le cadre des maladies du système nerveux central ont été réalisés dans le cas de la maladie de Parkinson. Cette maladie neuro-dégénérative est en effet caractérisée par la perte progressive d'un seul type neuronal, les neurones dopaminergiques de la *pars compacta* du *locus niger*, qui se projettent vers une seule cible, le striatum. Cette relative simplicité de la systématisation lésionnelle, tant sur le plan anatomique que neurochimique, se prêtait donc particulièrement bien à cette approche. Ont d'abord été réalisées des auto-greffes de cellules prélevées au niveau de la médullosurrénale et injectées par voie stéréotaxique au niveau striatal. Ces cellules neuro-sécrétrices sont en effet catécholaminergiques et en l'absence de l'influence des cellules des corticosurrénales, on observe une synthèse préférentielle de dopamine par ces cellules chromaffines. Cette approche s'est avérée rapidement décevante notamment en raison du nombre limité de cellules disponibles et capables de survivre aux diverses manipulations de prélèvement, d'isolement, de culture et de réimplantation des neurones (Anglade et coll., 1993).

C'est pourquoi d'autres sources cellulaires ont été envisagées. Actuellement, les cellules sont isolées par microdissection à partir de région mésencéphalique d'embryons humains âgés de 6 à 10 semaines. C'est en effet dans cette région cérébrale que se

différencient les neurones dopaminergiques qui vont former la substance noire. Nonobstant la qualité des résultats et l'importance des effets secondaires observés chez les patients greffés (Freed et coll., 2001), cette approche est toutefois sujette à des écueils d'ordre technique. Le premier est lié à la faible survie des cellules greffées qui n'excède pas 10% dans les meilleurs cas. Or les premiers résultats indiquent qu'existerait une relation entre le nombre de cellules greffées survivantes et l'éventuel effet thérapeutique. Cet obstacle peut être contourné en greffant un plus grand nombre de cellules. En pratique, ceci revient donc à utiliser une suspension cellulaire provenant de deux à quatre mésencéphales par striatum-receveur, et donc de quatre à huit embryons par patient. On dénombre dans notre pays à peu près 40 000 patients parkinsoniens et même si seulement une partie d'entre eux est greffée, il est probable que le nombre d'embryon disponible risque d'être un facteur limitant, surtout si l'on considère que cette approche pourrait également s'appliquer à d'autres pathologies soit neurodégénératives comme la maladie de Huntington soit aiguës comme les traumatismes de la moelle épinière, certaines formes d'accident ischémiques ou dans certains cas de maladies démyélinisantes. Il est par ailleurs évident que ce type d'approche soulève des questions d'ordre éthique. Enfin, bien que dans certaines études cliniques aucune immunosuppression n'ait été administrée au patient après la greffe, se pose également la question de la tolérance après l'injection cellulaire intra-striatale.

Ce bref rappel illustre parfaitement le problème principal lié aux greffes cérébrales dans le cadre des maladies neurologiques, à savoir la source cellulaire. La population neuronale idéale utilisée dans ces greffes devrait rencontrer un nombre relativement élevé de contraintes : 1) un haut pouvoir de prolifération en culture de manière à permettre l'obtention de quantités suffisante de cellules; 2) une haute capacité à se différencier de manière à permettre l'obtention de divers types neuronaux en fonction des besoins (microneurones versus macroneurones; phénotypes divers en matière de neurotransmetteurs;...), voire de

d'oligodendrocytes dans le cas des maladies démyélinisantes; 3) une relative "naïveté" immunologique permettant d'éviter l'utilisation de drogues immunosuppressives chez ces malades souvent âgés; 4) l'absence de prolifération et une plasticité phénotypique faible, après greffe, pour éviter à la fois certains effets secondaires tardifs mais également le risque d'une transformation maligne des cellules greffées.

Dans notre lecture, nous envisagerons successivement différentes sources cellulaires utilisées comme matériel de greffes pour des pathologies neurologiques en phase expérimentale. Nous envisagerons successivement les premiers résultats obtenus à l'aide des cellules embryonnaires totipotentes (cellules ES), les cellules souches nerveuses et enfin, les cellules souches dérivées de la moelle osseuse. Ces travaux réalisés dans plusieurs laboratoires, dont le notre, ont permis d'actualiser un concept ancien, énoncé par les premiers embryologistes expérimentaux, à savoir la plasticité phénotypique des cellules souches somatiques ou adultes, encore appelé le destin prospectif et les potentialités prospectives des cellules immatures.

2. Les cellules souches embryonnaires :

Les premiers essais de greffes de cellules souches embryonnaires (cellules ES) à des rats chez qui avait été provoqué expérimentalement un héli-parkinson par destruction des neurones dopaminergiques homo latéraux au site d'injection de 6-hydroxydopamine, ont été très décevants. En effet, tous les rats mourraient en hypertension intra-cranienne dans les jours qui suivaient la greffe car les cellules embryonnaires provoquaient des tumeurs, le plus souvent des tératocarcinomes très agressifs.

Pour éviter cette complication, deux stratégies ont été envisagées. La première a consisté à injecter les cellules ES à une dilution limite (Bjorklund et coll., 2002). Le

raisonnement à la base de cette stratégie est le suivant : la différenciation anarchique à la base du tératocarcinome est probablement le reflet d'interactions des cellules ES entre elles plutôt qu'avec le tissu du receveur. Dès lors, en diminuant le nombre de cellules ES injectées, on devrait diminuer ces interactions et limiter le risque de tératocarcinome. Cette approche s'est révélée efficace dans une certaine mesure puisque la fréquence des décès chez les animaux greffés est passée de 100 à 25%. Cependant, l'apport intéressant de cette approche est l'observation que chez les animaux survivants, les cellules ES se sont spontanément différenciées en neurones dopaminergiques fonctionnels avec comme conséquence une amélioration clinique nette des animaux. L'autre stratégie a consisté à "pré-différencier" en culture les cellules ES en neurones dopaminergiques avant de les injecter ceux-ci (Kim et coll., 2002). Dans ce cas, on observe une correction parfaite des déficits cliniques et l'absence totale de développement de tumeurs. Le problème actuel de cette approche est que l'étape in vitro de "pré-différenciation" inclut une transfection des cellules ES à l'aide d'un plasmide permettant l'expression de Nurr-1, un facteur transcriptionnel essentiel à leur différenciation en neurones dopaminergiques. En d'autres termes, les neurones dopaminergiques obtenus et injectés sont des cellules manipulées sur le plan génétique et à la thérapie cellulaire, on associe ici une étape de thérapie génique. Cette étape de transfection, nécessaire à l'heure actuelle représente un frein à l'expérimentation humaine même sur un nombre limité de cas.

3. Les cellules souches nerveuses :

Il existe à l'heure actuelle de nombreux exemples dans la littérature de l'utilisation de cellules souches nerveuses dans des modèles animaux de pathologie neurologique. J'ai choisi un exemple issu de nos travaux. Il y a quelques années, nous avons caractérisé un sous-type de cellules souches nerveuses qui expriment spécifiquement une forme poly-

sialylée de “Neural Cell Adhesion Molecule” et qui, lorsqu’elle est isolée à partir de cerveau de nouveau-né de rats ou de souris, prolifèrent très activement, comme les cellules souches nerveuses classiques, mais sont restreintes sur le plan de leur destin cellulaire, à savoir, qu’elles ne sont plus capables de se différencier en neurones comme les cellules souches nerveuses. Elles sont uniquement capables de se différencier en cellules gliales, astrocytes ou oligodendrocytes (Ben-Hur et coll., 1998; Rogister et coll., 1999). Etant donné leurs capacités prolifératives, ces cellules représentent une source utile d’oligodendrocytes qui pourraient être utilisés dans des approches thérapeutiques par greffe de lésion de démyélinisation responsables d’un handicap particulièrement lourd pour le patient. Lorsque l’on greffe ces cellules dans des lésions de démyélinisation expérimentale chez le rat, on observe une remyélinisation importante (95 à 100 % des axones présents sont remyélinisés après la greffe) (Figure 1). De façon surprenante, cette remonétisation est due à la néoformation à partir des cellules greffées de nouveaux oligodendrocytes mais aussi de cellules de Schwann, la cellule myélinisante du système nerveux périphérique et qui n’est jamais présente dans le système nerveux central (Keirsteadt et coll., 1999). Cette observation est un des premiers exemples du concept évoqué ci-dessus, à savoir la plasticité phénotypique des cellules souches : celles-ci, placées dans des conditions tissulaires particulières rencontrées in vivo, sont capables d’adopter un phénotype cellulaire différent de celui rencontré dans l’organe dont elles sont issues. Plusieurs autres exemples de cette plasticité phénotypique ont été rapportés dans la littérature au cours des trois à quatre dernières années (Verfaillie, 2002). Parmi ceux-ci, mentionnons la possible différenciation nerveuse de cellules issues de moelle osseuse. Celle-ci constitue le troisième type d’approche que nous souhaitons aborder dans cette lecture.

4. Les cellules souches mésenchymateuses :

Ces cellules qui résident dans la moelle osseuse se différencient normalement en ostéocytes, en chondrocytes, en adipocytes et en fibroblastes. On pense par ailleurs qu'elles interviennent dans la régulation de l'hématopoïèse en créant des "niches" ou microenvironnements favorables à certaines activités des cellules souches hématopoïétiques. Au cours des trois dernières années, on a décrit plusieurs exemples de différenciation nerveuse de ces cellules : lorsqu'elles sont greffées dans le système nerveux au cours du développement ou chez l'animal adulte après une lésion cérébrale, ces cellules sont capables d'adopter un destin soit astrocytaire, soit oligodendrocytaire, soit encore neuronal. On ne sait cependant pas actuellement si ces neurones sont fonctionnels, c'est-à-dire capables d'être intégrés dans un circuit neuronal, c'est-à-dire être activés par un neurone pré-synaptique et en réponse, activer un neurone situé en aval.

Cependant, cette réserve étant faite, ces observations sont néanmoins particulièrement importantes. Si on reprend l'exemple du patient parkinsonien évoqué au cours de l'introduction, on peut imaginer le prélèvement, l'isolement et la culture des cellules souches mésenchymateuses de ce patient par une simple ponction de moelle osseuse réalisée sous anesthésie locale. Les cellules prolifèrent en culture ce qui permet ainsi d'en produire une quantité importante. Ces cellules seraient ensuite soumises à un processus de différenciation neuronale et les neurones dopaminergiques seraient sélectionnés. Ces derniers pourraient ensuite être injectés au malade réalisant ainsi une autogreffe. On voit que ce type d'approche permet d'éviter les écueils techniques et éthiques évoqués plus haut : les cellules prolifèrent activement, il est possible d'obtenir les quantités requises; on injecte au patient des cellules hautement différenciées, non susceptibles de proliférer ou d'adopter un autre destin cellulaire

que celui sélectionné; par cette approche autogreffe, on évite les problèmes liés à un éventuel rejet immunologique; enfin, les problèmes d'ordre éthique sont également évités.

C'est pourquoi, dans le contexte d'un programme TELEVIE qui regroupe plusieurs laboratoires d'hématobiologie et de neurobiologie de trois institutions universitaires de la communauté française de Belgique, nous avons entrepris un programme de recherche visant à mieux comprendre sur les plans moléculaires et cellulaires les mécanismes responsables de cette plasticité phénotypique nerveuse des cellules souches mésenchymateuses ou encore les raisons moléculaires du choix du destin nerveux dans les potentialités prospectives de ces cellules. Nous avons mis au point les techniques d'isolement et de culture de cellules souches mésenchymateuses de rats adultes. Nous avons démontré que dans certaines circonstances de culture, ces cellules sont capables d'exprimer la nestine, une protéine de filaments intermédiaires exprimée aussi par les cellules souches nerveuses (Wislet-Gendebien et coll., 2003). Nous avons également démontré que les cellules souches mésenchymateuses nestine(+) (au contraire des cellules nestine (-)) sont capables de répondre à un stimulus de différenciation nerveuse en culture : en conditions de co-culture, on peut obtenir à partir des cellules souches mésenchymateuses des astrocytes lorsqu'elles sont cultivées en présence de cellules souches nerveuses, et des cellules de type neuronal lorsqu'elles sont cultivées en présence de neurones matures (figure 2). Nous avons utilisé ici l'expression "cellules de type neuronal" car jusqu'à présent ces cellules morphologiquement semblables à des neurones en culture, qui sont reconnues par différents marqueurs antigéniques spécifiques de ce type cellulaire et sont capables que de répondre sur le plan électrophysiologique à l'application de neurotransmetteurs (GABA, glycine, acétylcholine, glutamate et sérotonine) ne sont pas capables de faire des potentiels d'action. En revanche, on observe après 1 ou 2 jours de co-culture l'expression par ces cellules de canaux potassiques voltage-dépendants et il faut attendre 8 jours pour observer la présence de canaux sodiques voltage-dépendants.

Ces deux types de canaux sont à la fois nécessaires et suffisants pour observer des potentiels d'action. Nous pensons qu'à terme, il sera possible d'induire un nombre suffisant de ces canaux pour rendre ces cellules excitables.

5. Conclusion :

A l'heure actuelle, les espoirs de thérapie cellulaire à l'aide de cellules souches soient embryonnaires, soit somatiques nerveuses ou mésenchymateuses sont considérables. C'est à notre avis, l'utilisation de cellules souches mésenchymateuses, prédifférenciées in vitro, qui représente l'espoir le plus concret pour envisager ces traitements en semi-routine clinique. De nombreux travaux fondamentaux doivent encore être réalisés de manière à mieux comprendre la biologie de ces cellules immatures.

6. Bibliographie :

- Anglade, P., Hirsch, E.C., Brandel, J.P., Javoy-Agid, F. Duyckaerts, C., Hauw, J.J. and Agid, Y. (1993) Adrenal transplant, dopaminergic neurons and Parkinson's disease. *Ann.Neurol.*, 33, 662-663.
- Ben Hur, T., Rogister, B., Murray, K., Rougon, G. and Dubois-Dalcq, M. (1998) Growth and fate of PSA-NCAM+ precursors of the postnatal brain,, *Journal of Neuroscience*, 18, 5777-5788.
- Bjoklund, L.M., Sanchez-Pernaute, R., Chung, S., Andersson, T., Chen, I.Y., McKaught, K.S., Brownell, A.L., Jenkins, B.G., Wahlestedt, C., Kim, K.S., Isacson, O. (2002) Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*, 99, 1755-1757.
- Freed, C.R., Greene, P.E., Breeze, R.E., Tsai, W.Y., Dumouchel, W., Kao, R., Dillon, S., Winfield, H., Culver, S., Trojanowski, J.Q., Eidelberg, D. And Fahn, S. (2001) Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *N.Engl.J.Med.*, 344, 710-719.
- Keirsteadt, H.S., Ben Hur, T., Rogister, B., O'leary, B., Dubois-Dalcq, M. and Blakemore, W.F. (1999) Polysialylated neural cell adhesion molecule-positive CNS precursors generate both oligodendrocytes and Schwann cells to remyelinate the CNS after transplantation,, *Journal of Neuroscience*, 19, 7529-7536

- Kim, J.H., Auerbach, J.M., Rodriguez-Gomez, J.A., Velasco, I., Gavin, D., Lumelsky, N., Lee, S.H., Nguyen, J., Sanchez-Pernaute, R., Bankiewicz, K. And McKay R. (2002) Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature*, 418, 50-56.
- Rogister, B. Ben Hur, T. and Dubois-Dalcq, M. (1999) From neural stem cells to myelinating oligodendrocytes, *Molecular and Cellular Neurosciences*, 14, 287-300.
- Verfaillie, C. (2002) Adult stem cells : assessing the case for pluripotency. *Trends in Cell Biology*, 12, 502-508.
- Wislet-Gendebien, S., Leprince, P., Moonen, G. and Rogister, B (2003) Regulation of neural markers nestin and GFAP expression by cultivated bone marrow stromal cells. *Journal of Cell Science* (In Press).

Résumé :

Depuis quelques années, la greffe de neuroblastes dans le striatum de malades atteints de Parkinson peut être réalisée. Ces neuroblastes sont prélevés au niveau de région mésencéphalique d'embryons humains âgés de 6 à 10 semaines. Les résultats cliniques obtenus sont cependant mitigés suite à l'existence d'écueils techniques et la source de donneurs est par ailleurs limitée. Dès lors, l'utilisation de cellules souches apparaît comme une alternative possible pour pallier à ces différents problèmes. En effet, les cellules souches, qu'elles soient embryonnaires ou somatiques, ont des possibilités d'auto-renouvellement et de différenciation quasi illimitées. Dans cette lecture, l'auteur discute en détails des propriétés biologiques respectives des cellules souches embryonnaires et somatiques, ceci dans le but de définir à priori la meilleure source cellulaire à utiliser pour des greffes en cas de maladies neurologiques. A ce titre, les cellules souches somatiques représentent un espoir certain étant donné leur plasticité phénotypique insoupçonnée jusqu'il y a peu.

Abstract :

For several years, in Parkinson's disease patients, immature neuroblasts grafts could be realized. Those immature cells come from mesencephalic regions of 6 to 10 weeks-old embryos. Given several technical problems, clinical outcome of the patients is not favourable and moreover, it appears that the cell source is very limited. That's the reason why the use of embryonic or somatic stem cells could be promising. Stem cells are able to self-renew and could differentiate into several cell types. In this lecture, the author reviews the biological properties of different stem cells types in order to be used in cerebral graft in several neurological diseases. Given their recently unravelled phenotypic plasticity, somatic stem cells could be the best candidate for such a clinical use for auto-grafts.

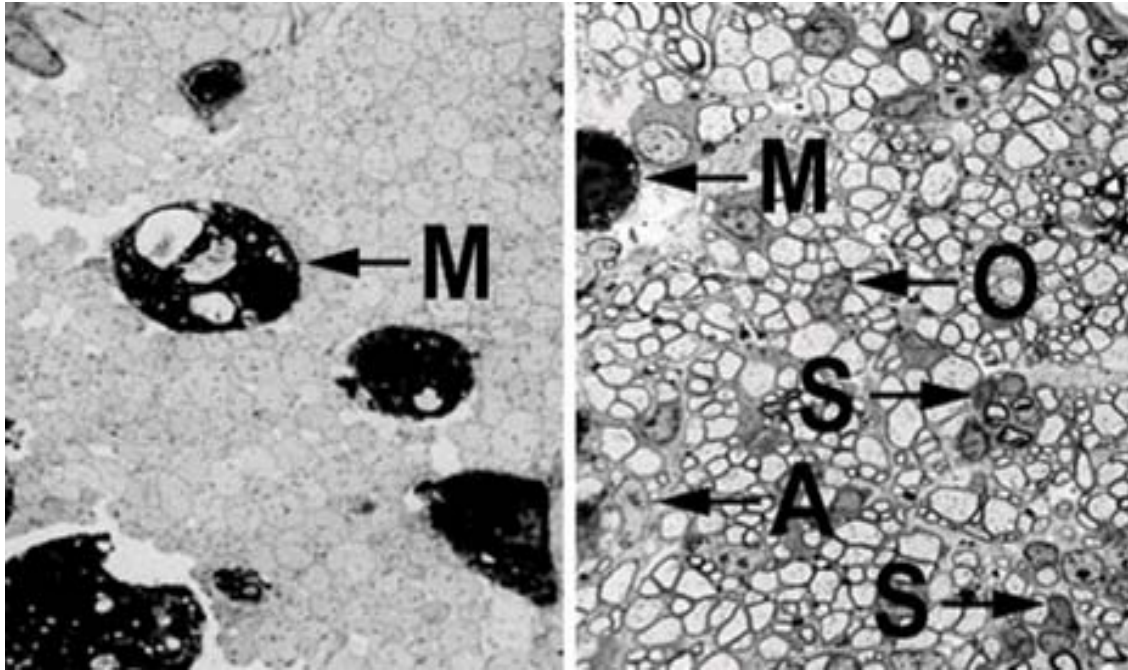


Figure 1: La greffe de cellules PSA-NCAM favorise la remyélinisation. Une lésion de démyélinisation a été réalisée chez des rats adultes par une irradiation aux rayons X suivie par l'injection de bromure d'éthidium au niveau des cordons dorsaux de la moelle épinière, à hauteur de la région dorso-lombaire (L1). La greffe de cellules PSA-NCAM est réalisée en injectant dans la lésion 60 000 cellules 48 heures après la lésion. Le rat est ensuite sacrifié après 1 mois et les sections transverses de la moelle épinière sont colorées au bleu de toluidine et examinées en microscopie classique (grossissement 600X). A gauche, on observe qu'en l'absence de greffe, les axones sont présents mais démyélinisés. Plusieurs macrophages (M) sont également visibles. A droite, chez le rat greffé, la plupart des axones sont à nouveau remyélinisés à la fois par des oligodendrocytes (O) et par des cellules de Schwann (S). Quelques astrocytes (A) sont également visibles. (tiré de la référence Keirstead et coll.).

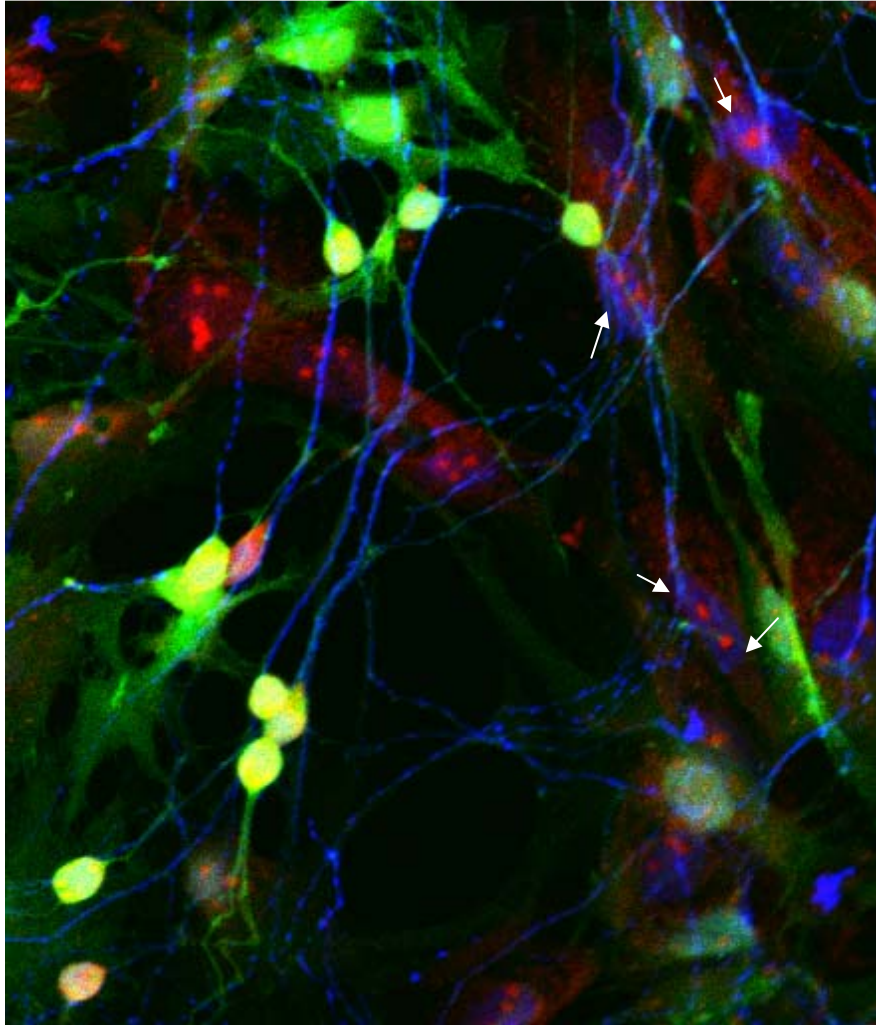


Figure 2 : Co-culture de grains cérébelleux à partir de souris transgéniques exprimant la Green Fluorescent Protein (GFP) sous le contrôle du promoteur actine (cellule vertes) et de cellules souches mésenchymateuses (cellules non-vertes). Une analyse par immunofluorescence a été réalisée en utilisant successivement un anticorps anti-neurofilament marquant spécifiquement les neurones et un anticorps secondaire couplé au fluorochrome bleu Cy5. Un marquage nucléaire aspécifique a été réalisé par une incubation en éthidium homodimère conférant une couleur rouge aux noyaux cellulaires. On observe plusieurs cellules ayant une morphologie neuronale, exprimant les neurofilaments mais n'exprimant pas la GFP (flèches) : ces cellules correspondent à des cellules souches mésenchymateuses ayant adopté une morphologie neuronale et exprimant un marqueur antigénique spécifiquement neuronal (Wislet-Gendebien, S. et Rogister, B., observations non publiées).