

Section 1. Cellules souches dérivées de tissus adipeux

Résumé

La transplantation de cellules et la régénération de tissus endommagés pourrait fournir des traitements salvateurs pour les individus souffrant de troubles neurologiques incurables. Cependant, l'utilisation de greffes de cellules souches embryonnaires (CSE) continue d'être problématique car il est difficile d'amener toutes ces CSE à se différencier en phénotypes cellulaires souhaités. Une lésion de la moelle épinière (SCI)- provoque la paralysie en dessous du niveau de la lésion. Bien que de nombreux types de cellules aient été utilisés, aucun des procédés n'a été pleinement satisfaisant. Les cellules souches adultes détiennent un potentiel curatif pour traiter les lésions de la moelle épinière et du cerveau, et le tissu adipeux humain peut présenter une solution alternative : les hASCs (human Adipose Stem Cells) répondent aux critères requis (i) elles sont abondantes (ii) elles peuvent être prélevées et cultivées grâce à un procédé minimalement invasif ; (iii) elles pourraient se différencier en multiples voies de lignées cellulaires reproductibles ; (iv) et elles pourraient être transplantées sans risques, aussi bien dans un hôte autologue qu'allogène. Cependant, afin d'éviter soit une expression de gène inappropriée lors de la transplantation de cellules, soit une tumorigénèse, il faut étudier le rôle de la méthylation CpG sur l'ensemble du génome dans le processus des programmes spécifiques de différenciation.

Buts spécifiques

- 1) Optimiser la méthodologie visant à isoler et purifier les hASCs provenant du tissu adipeux des patients (plus tard, patients souffrant de lésions médullaires).
- 2) Établir des protocoles adéquats in vitro, pour la transdifférenciation de cellules hASCs en phénotypes précurseurs d'oligodendrocytes et de tissu neural, dans le but d'améliorer la survie des cellules et leur protection après la transplantation. Différents facteurs seront évalués dans le but d'augmenter la survie des cellules.
- 3) Évaluer le rôle éventuel de l'épigénétique dans la différenciation et dans le potentiel tumorigène des hASCs.
- 4) Étudier le degré de préservation et la récupération fonctionnelle des tissus obtenue par transplantation de hASCs dans un modèle de lésion de la moelle épinière par contusion chez la souris.
- 5) Évaluer la survie, la différenciation, l'intégration et la migration des cellules transplantées au sein de la moelle épinière lésée et les effets sur la réponse inflammatoire, la réactivité gliale, la production de cytokines et la régénération axonale.
- 6) Mettre en place les conditions optimales pour la transplantation d'hASCs suite à une lésion médullaire : nombre de cellules, mode de greffe et délai d'injection après la lésion.
- 7) Évaluer les IRM et caractéristiques électrophysiologiques des greffes de hASCs dans la lésion.

Historique

Une lésion de la moelle épinière a un effet dévastateur pour le patient en tant qu'individu et est coûteuse pour la société puisqu'elle entraîne des dépenses de santé à long terme. Une lésion de la moelle épinière (ou traumatisme médullaire) entraîne deux types de conséquences. En premier lieu, le traumatisme lui-même provoque une lésion directe du tissu nerveux, ce qui entraîne des effets secondaires qui amplifient la lésion initiale primaire. La lésion médullaire génère des réponses complexes qui vont de réactions inflammatoires massives, à la formation d'une cicatrice gliale, et à des changements de signalisation intracellulaire. L'administration d'érythropoïétine ou d'IL-8 antagonistes ont provoqué une atténuation de la réaction inflammatoire, amélioré la production de facteurs neurotrophiques et réduit la dégénérescence secondaire en promouvant la récupération fonctionnelle suite à une lésion de la moelle épinière (Gorio et al 2002, 2005, 2007). De la même manière, l'administration i.v. de cellules adultes neurales précurseurs (NPCs) ou ES dans un délai de 24 heures suivant la lésion ont favorisé la récupération fonctionnelle et aidé la production de facteurs neurotrophiques (Bottai et al 2008, 2010) ; cependant, leur survie au niveau de la lésion a duré moins de 3 semaines en raison de la phagocytose causée par les macrophages activés. Ceci a contribué à l'arrêt de la récupération fonctionnelle progressive. La reprogrammation originale de cellules spécialisées par Yamanaka a changé ce que la communauté scientifique pensait, en renversant le dogme selon lequel de telles cellules conservaient une identité immuable. Dans cette étude, nous démontrerons qu'une légère induction de cellules pluripotentes humaines dérivées du tissu adipeux (hASCs) pourrait présenter un certain degré de flexibilité et offrir au patient une thérapie de transplantation cellulaire moins immunogène.

Les cellules souches mésenchymateuse (MSCs) sont capables de provoquer des effets neuroprotecteurs (10), immunomodulateurs (18) ainsi que des effets régénérateurs dans les modèles animaux (3,23), mettant en évidence l'énorme potentiel de ce type de cellules en tant qu'agents thérapeutiques pour les lésions médullaires et autres troubles nerveux. Les MSCs sont des cellules somatiques multipotentes capables de se différencier en phénotypes neuraux, pouvant provenir de divers tissus, le plus souvent de la moelle osseuse, qui peut être facilement isolée et développée (22).

Elles présentent des avantages significatifs, dont l'absence de controverse éthique en ce qui concerne la source, et un potentiel de greffes autologues qui permettent d'éviter le risque de rejet ou d'effets secondaires associés à une immunosuppression(19).

Destinés à la transplantation autologue, les MSCs ont en effet de nombreux avantages, par rapport aux autres cellules souches adultes, dont celui d'être relativement faciles à isoler et à développer in vitro pour faire augmenter le nombre de cellules extraites de la propre moelle osseuse des patients, sans créer de plus amples dommages(13). En outre, les MSCs sont utilisées depuis des années dans le traitement des maladies hématopoïétiques, les protocoles d'isolement, de demande et de sécurité sont déjà bien établis en utilisation clinique (4).

Néanmoins, les critères établis pour définir les MSCs sont hétérogènes, ce qui explique les résultats variables des effets fonctionnels entre les études, et de la capacité de ces cellules à survivre, à s'intégrer et à se différencier. Dans la majorité des études récentes, dans lesquelles les MSCs ont été transplantées dans un système nerveux central adulte endommagé, l'amélioration fonctionnelle a été moyenne et n'a pas été suivie par un remplacement des cellules neurales perdues.

L'incapacité des MSCs à produire des cellules neurales peut s'expliquer par l'environnement hostile de la moelle épinière lésée, qui réduit la durée de survie des cellules transplantées.

Donc, le microenvironnement et l'état intrinsèque des cellules transplantées peuvent tout deux jouer un rôle décisif dans la survie et dans l'intégration des cellules greffées, ainsi que dans la fonctionnalité. On a suggéré l'importance de la pré-induction de MSCs avant la transplantation dans la moelle épinière lésée pour promouvoir la régénération et la récupération fonctionnelle associées au destin cellulaire, en **raison de son rôle** dans la préservation du tissu (10,12, 16).

Des études précédentes ont signalé la faible survie des cellules MSCs transplantées (ainsi que celle d'autres types de cellules) au sein de la lésion de la moelle épinière plusieurs semaines après l'injection, suggérant une corrélation entre le degré de survie cellulaire et l'étendue de la récupération fonctionnelle (2). Dans l'ensemble, les rapports précédents indiquent tous qu'augmenter la survie cellulaire et induire la différenciation des MSCs transplantées permettra d'améliorer le remplacement neuronal et le résultat fonctionnel des lésions médullaires. Dans notre étude, les MSCs seront obtenues à partir de graisse humaine traitée avec un dispositif particulier (Lipogems®) qui réduit les particules issues de la liposuction des graisses à 500 micromètres afin que les cellules adipeuses (hASC) soient diffusées sans avoir besoin de traitement enzymatique. Ces cellules portent des antigènes neuraux, survivent dans le SNC lésé plus d'un mois après la transplantation et se transdifférencient selon le site d'injection. Injectées dans le striatum, les cellules adipeuses (hASCs) deviennent toutes des cellules Th-positives, alors que les hASCs exposées à l'acide valproïque inhibiteur HADC migrent de manière très efficace vers la moelle lésée, où elles se différencient et expriment des antigènes neuronaux.

Objectifs

La transplantation de cellules pour le traitement de personnes souffrant de lésions médullaires (SCI) est un nouveau domaine prometteur de la recherche fondamentale et clinique qui offre la possibilité de développer des approches de traitements d'approches en régénérant les tissus de la moelle épinière lésée soit en induisant potentiellement la reconstitution des cellules neurales perdues ou en fournissant une structure de support et des facteurs facilitant la croissance axonale. Dans ce contexte, nous pensons que les cellules souches humaines mésenchymateuses adipeuses (hASCs) semblent détenir un potentiel particulièrement élevé par rapport aux cellules actuellement disponibles pour la thérapie cellulaire en utilisation clinique.

L'hypothèse de départ est qu'une greffe de hASCs constitue une méthode prometteuse pour la réparation de la moelle épinière lésée en modulant et réduisant les effets secondaires de la lésion par la combinaison d'une neuroprotection, d'une recolonisation cellulaire et de régénération centrale des voies spinales.

Pour tester cette hypothèse, le projet comprend quatre sous-projets qui fournissent une recherche de pointe pour :

- 1) Optimiser la méthodologie visant à isoler et purifier les hASCs provenant du tissu adipeux des patients (puis les patients avec des lésions médullaires).
- 2) Établir, in vitro, des protocoles adéquats pour la transdifférenciation de cellules hASCs en phénotypes précurseurs d'oligodendrocytes et de tissu neural dans le but d'améliorer la survie des cellules et leur protection après la transplantation. Différents facteurs seront évalués dans le but d'augmenter la survie des cellules.
- 3) Évaluer le rôle éventuel de l'épigénétique dans la différenciation et le potentiel tumorigène des hASCs.
- 4) Étudier le degré de préservation des tissus et la récupération fonctionnelle obtenue par transplantation de hASCs dans un modèle de lésion de la moelle épinière par contusion chez la souris.
- 5) Évaluer la survie, la différenciation, l'intégration et la migration des cellules transplantées dans la moelle épinière lésée et les effets sur la réponse inflammatoire, la réactivité gliale, la production de cytokines et la régénération axonale.
- 6) Mettre en place les conditions optimales pour la transplantation d'hASCs suite à une blessure médullaire: en fonction du nombre de cellules, de la méthode de greffe et du délai d'injection après la lésion.
- 7) Évaluer les caractéristiques et électrophysiques des greffes d'hASCs dans les lésions médullaires.

Originalité

Ces hASCs présentent des avantages significatifs, dont l'absence de controverse éthique en ce qui concerne la source et un potentiel de greffes autologues ce qui évite le risque de rejet ou d'effets secondaires associés à l'immunosuppression(19). Destinés à la transplantation autologue, les MSCs ont en effet l'avantage, par rapport aux autres cellules souches adultes, d'être relativement faciles à isoler et à développer in vitro pour faire augmenter le nombre de cellules extraites de la propre moelle osseuse des patients, sans créer de nouveau traumatisme. En outre, les MSCs ayant été utilisées depuis des années dans le traitement des maladies hématopoïétiques, les protocoles d'isolement, d'utilisation et de sécurité sont déjà bien établis en utilisation clinique (4).

En particulier, ces hASCs adhérentes au plastique peuvent être facilement cultivées in vitro et développées à l'échelle clinique. En outre, la différenciation multilignée observée dans les MSCs a

permis à des essais thérapeutiques de réparer divers types de lésions tissulaires en utilisant des MSCs développées en ex-vivo.

Ces essais sur la thérapie cellulaire pour la régénération du myocarde dans l'infarctus du myocarde ischémique, la régénération des vaisseaux sanguins dans la maladie de Buerger, la régénération des os dans le cadre de l'ostéogenèse imparfaite ou malformation des gros os, ainsi que certaines applications immunologiques, telles que l'amélioration de la réaction du greffon, ont tous donné des résultats encourageants, mais ni le degré d'amélioration fonctionnelle ni les contributions des hASCs à la structure des tissus régénérées n'ont été aussi satisfaisants que prévus.

Par exemple, alors qu'un grand nombre d'études expérimentales ont démontré leur différenciation en cellules de type myocardique exprimant des marqueurs spécifiques myocardes, peu d'études ont démontré une différenciation réussie en myocarde mature, ou une intégration fonctionnelle dans le myocarde endommagé. De même, alors que les hASCs peuvent exprimer différents types de marqueurs neuraux comme le nestin, Tuj1, Oct4, elles n'acquièrent que très rarement une particularité neuronale, même in vitro.

Dans la plupart des études récentes dans lesquelles les MSCs ont été transplantées dans un SNC adulte lésé, on a obtenu une amélioration fonctionnelle modérée, mais les cellules nerveuses perdues n'ont pas été remplacées. L'incapacité des MSCs à produire des cellules neurales s'explique par l'environnement hostile de la moelle épinière lésée, qui diminue aussi le temps de survie des cellules transplantées. Néanmoins, certaines études ont rapporté que lorsque des précurseurs en stade avancé (progéniteurs neuraux) ont été transplantés dans une moelle épinière intacte ou lésée, on pouvait observer une différenciation neurale. (2)

Le microenvironnement et l'état intrinsèque des cellules transplantées peuvent donc jouer un rôle décisif dans la survie des cellules greffées et leur intégration, tout comme dans le résultat fonctionnel. L'importance d'une pré-induction des MSCs avant la transplantation sur le site lésionnel a été suggérée pour favoriser la régénération et la récupération fonctionnelle en associant le destin cellulaire en relation avec la survie tissulaire » (10, 12, 16).

Une autre question pertinente est le sort de la cellule transplantée et son rôle dans la préservation des tissus et la récupération fonctionnelle. Des études antérieures avaient signalé que plusieurs semaines après l'injection, le taux de survie des cellules MSCs (et des autres types de cellules) transplantées au sein du site de la lésion de la moelle épinière était faible, ce qui suggère une corrélation entre le taux de survie de la cellule et le taux de récupération fonctionnelle (2).

Les rapports précédents suggèrent tous l'hypothèse qu'augmenter la survie cellulaire et induire la différenciation des MSCs transplantées continuera d'améliorer le remplacement neuronal et le résultat fonctionnel dans les cas de blessure médullaire. Cependant, il faut poursuivre les expériences sur des modèles de lésions médullaires cliniquement pertinents et, surtout, à des stades chroniques post-lésion (20, 25). Nos cellules dérivées de hASCs non-enzymatiques portent des antigènes neuraux. Très résistantes aux états inflammatoires, elles survivent plus d'un mois dans le SNC et se transdifférencient selon la région. Injectées dans le striatum les hASCs deviennent toutes positives au Tyrosine

Hydroxylase ; après avoir été exposées à l'acide valproïque, les hASCs migrent très efficacement vers la moelle lésée ou elles s'accumulent sur les bords du site de la lésion et y expriment des antigènes neuronaux.

Étant donné que le traitement avec des inhibiteurs HADC affecte considérablement les propriétés in vivo des hASCs, notre projet est également attentif au contrôle épigénétique de ces cellules. Bien que les cellules souches humaines adultes représentent un outil prometteur pour nouveaux concepts cliniques de thérapie cellulaire dans la moelle épinière et les lésions cérébrales, de nombreuses questions restent à explorer afin de garantir l'assurance qualité et le contrôle de ces cellules, afin d'éviter l'expression de gènes inappropriés lors de la transplantation des cellules. Le potentiel d'expression de gènes dans la différenciation des cellules souches est régi par des processus épigénétiques qui confèrent une conformation spécifique de la chromatine du génome, la méthylation de dinucléotides CpG étant le meilleur exemple de modification épigénétique. En conséquence, il importe non seulement de préserver le génome, mais aussi de bien tenir compte du profil épigénétique afin de garantir l'identité cellulaire après la reprogrammation.

Un des principaux objectifs du projet sera d'enquêter sur l'implication de la méthylation de l'ADN dans la différenciation neurale des cellules souches dérivées du tissu adipeux. Les modèles épigénétiques des cellules neurales dérivées de ces cellules souches nous permettront de mieux comprendre le processus de neurogenèse. L'ADN poubelle du génome mammalien encode des milliers d'importantes transcriptions non codantes, y compris une catégorie d'ARN longs non codants intergéniques (lincRNAs), dont certains ont été fonctionnellement caractérisés selon leur rôle biologique par le Dr. Guttman, (Nature 477, 295–300 Sept 2011 PMID : 21874018) qui a réalisé des études de perte de fonction sur des LincRNAs exprimés dans les cellules souches embryonnaires de souris (CSE) et a caractérisé leurs effets sur l'expression génique.

On a identifié des douzaines de LincRNAs qui provoquaient la fin de l'état pluripotent au moment de la perte de fonction, ainsi que des douzaines de lincRNAs qui intervenaient pour réprimer des programmes d'expression génique de lignées cellulaires spécifiques des cellules souches embryonnaires (CSE). Dans la publication de Guttman, les LincRNAs ont été intégrés dans les circuits moléculaires de ces CSE et il a démontré que les gènes des LincRNAs étaient régulés par des facteurs de transcription clefs, les transcriptions de lincRNAs se liant elles-mêmes à plusieurs protéines régulatrices de la chromatine pour influencer ensuite sur les programmes d'expression de gène au niveau de l'épigénétique.

L'objectif moléculaire de ce projet est d'identifier le mécanisme qui dirige les hADSC tout au long de la différenciation après avoir été placées dans un récepteur blessé afin, si possible, d'aider le processus par la pharmacologie. On sait que la mémoire épigénétique dirige les cellules au cours de la division cellulaire et de la réparation et qui plus est, durant tout le processus de différenciation et de tumorigénèse. Le premier point que je veux étudier est l'implication possible de la mémoire épigénétique dans les processus de différenciation des cellules hADSC après transplantation et le rôle des lincRNAs et des enzymes modifiant la chromatine. Cette connaissance pourrait contribuer à l'amélioration et à la conception de nouveaux guides assurant la stabilité dans les thérapies à base de cellules souches.

Données préliminaires

Les micelles dérivées de Lipogems® libèrent les hASCs portant des marqueurs mésenchymateux typiques; leur taux de croissance est similaire à ceux issus des hASCs traitées aux enzymes mais leur différenciation en phénotypes neuraux ou adipeux est nettement supérieure.

L'activation du récepteur hérissé bloque la différenciation adipocytaire. Excellente survie après la transplantation, bien supérieure à nos constatations précédentes avec les cellules du derme et MSCs de la moelle osseuse, cellules souches adultes neurales ou embryonnaires, puisque la plupart d'entre elles meurent dans les 3-4 semaines qui suivent (Fofana et al. 2004, Bottai et al, 2008, 2010). Nos cellules hASCs dérivées de façon non enzymatique portent des antigènes neuraux, survivent dans le SNC lésé à plus d'un mois, sont hautement résistantes aux états inflammatoires et se transdifférencient selon la région. Injectées dans le striatum, les hASCs deviennent toutes des cellules positives à l'Hydroxylase Tyrosine et, après avoir été exposées à l'acide valproïque inhibiteur HDAC, les hASCs migrent très efficacement vers la moelle lésée et comme prévu, elles s'accumulent sur les bords du site de la lésion et expriment des antigènes neuronaux.

En pièce jointe à cette demande, vous trouverez des résultats préliminaires montrant des immunoprécipitations d'ARN (RIP) et des immunoprécipitations de Chromatine (ChIP) pratiquées dans un modèle de cellule souche cancéreuse (figures 1,2 mammosphères et CD24^{low}/CD44⁺⁺ cellules souches cancéreuses) dans lequel j'ai détecté la formation d'un complexe ribonucléoprotéique nucléaire à base de lincRNA dans des régions régulatrices de gènes impliqués dans le développement et dans la tumorigénèse.

Dans la figure 2, je montre que certaines lincRNAs (MEG3 et CCND1linc) sont surexprimées dans les mammosphères, si on les compare avec la lignée cellulaire parentale mammaire adénocarcinome (MCF7) et que les HDAC6 (d'histone-désacétylases 6), une enzyme modifiant la chromatine (désacétylase), associée à une protéine stabilisatrice d'ARN, appelée HuR, sont capables de se lier spécifiquement dans la sous-population de cellules souches cancéreuses CD24^{low} / CD44⁺⁺ (Fig. 3, 4). En outre, je montre que l'HuR et la HDAC6 sont localisés dans la chromatine au niveau des régions régulatrices d'un gène (P21-cip) impliqué dans la tumorigénèse ainsi qu'un membre du groupe polycomb, ENX, et SOX2, facteur de transcription essentiel pour le maintien de l'auto-renouvellement (figure 5). Ces résultats préliminaires sur les cellules souches cancéreuses peuvent être facilement appliqués aux hADSCs lors de la transplantation et les interactions moléculaires seront toutes de bonnes cibles pour les traitements médicamenteux, qui je l'espère, conduiront à la modulation du processus global de différenciation.

Ainsi qu'il a été mentionné précédemment, une lésion de la moelle épinière (SCI) se traduit par des déficits fonctionnels qui entraînent généralement une paralysie sévère et permanente. La thérapie cellulaire a pour but de provoquer chez les patients atteints de SCI une induction des lésions tissulaires, la restitution des connexions neuronales perdues et un support de croissance axonale. Parmi les types de cellules actuellement disponibles pour l'usage clinique, les cellules souches mésenchymateuses dérivées du tissu adipeux (hADSCs) ont un intérêt particulier, car il a été rapporté qu'elles induisaient

des effets neuroprotecteurs, immunomodulateurs et régénérateurs dans des modèles animaux ; elles ont donné des résultats prometteurs dans plusieurs essais cliniques. Les principaux objectifs sont d'améliorer les transplantations d'hADSCs transdifférenciées utilisées pour réparer le CSI dans des modèles expérimentaux par administration concomitante de médicaments, et de concrétiser ces résultats par un essai pilote chez des patients atteints de SCI. Comprendre le mécanisme moléculaire par lequel les hADSCs se différencient conduit à une amélioration dans le sauvetage de la lésion par transplantation autologue.

On fera des études basées sur la technologie des bio-puces RIP-on-chip et ChIP-on-chip au niveau de l'ensemble du génome et du transcriptome. On comparera des profils des cellules souches adipeuses, de cellules souches primaires et des neurosphères dérivées de lignées de cellules de neuroblastomes. Des modèles in vitro seront utilisés pour la validation des propriétés tumorales des neurones dérivées de cellules souches.

Résultats escomptés et impact social

Les lésions médullaires (SCI) causent des déficits fonctionnels qui entraînent généralement une paralysie grave et permanente. La thérapie cellulaire pour les patients atteints de SCI a pour but de provoquer une induction des lésions tissulaires, une restitution des connexions neuronales perdues et un soutien pour la croissance axonale. Parmi les types de cellules actuellement disponibles pour l'usage clinique, les cellules souches mésenchymateuses (hASCs) dérivées du tissu adipeux présentent un intérêt particulier, car il a été rapporté qu'elles induisaient des effets neuroprotecteurs, immunomodulateurs et régénérateurs dans des modèles animaux et qu'elles donnaient des résultats prometteurs dans plusieurs essais cliniques. Les principaux objectifs sont :

- De prouver que l'on peut utiliser des greffes de hASCs transdifférenciées pour réparer le CSI dans des modèles expérimentaux et de concrétiser ces résultats par un essai pilote chez des patients atteints de SCI.
- De prouver qu'une greffe d'hASC améliore la lésion médullaire (SCI) en réduisant les tissus lésés et en induisant une récupération fonctionnelle dans le modèle expérimental et démontrer que cette procédure est sûre et réalisable pour traiter les patients atteints de SCI....
- D'élaborer des méthodes de transdifférenciation de hASCs en cellules neuronales ou OPCs et d'évaluer leur capacité à augmenter les effets bénéfiques des hASCs transplantées dans une SCI, constituant ainsi une alternative prometteuse pour les futurs essais.

Des études basées sur la méthylation de biopuces et d'expression de gènes au niveau du génome seront effectuées à l'aide de la technologie la plus avancée. On comparera les caractéristiques de cellules souches adipeuses, de cellules neuronales dérivées de cellules souches, des lignées de cellules issues de neuroblastomes et de neurones primaires normaux. Des modèles in vitro seront utilisés pour la validation des propriétés des neurones dérivées de cellules souches tumorales. Cette connaissance pourrait aider à l'amélioration et à la conception de nouveaux guides pour assurer la stabilité dans les thérapies axées sur les cellules souches. En outre, étudier les voies par lesquels une fonction déficiente

de certains gènes spécifiques conduit à un risque accru de cancer pourrait nous permettre de mieux comprendre les risques de tumorigénèse dans la thérapie de cellules souches.

SECTION 2) Cellules souches neurales libératrices d'érythropoïétine post-mortem

Historique

La transplantation de cellules et la régénération de tissus d'organes endommagés est extrêmement prometteuse pour l'humanité. Elle peut offrir des traitements salvateurs pour les lésions aiguës ainsi que pour les maladies chroniques. La transplantation de cellules offre des perspectives nouvelles et prometteuses pour le traitement des troubles neurologiques jusqu'aujourd'hui incurables. Cependant, avoir recours à une transplantation de cellules souches embryonnaires (CSE) en tant que thérapie de remplacement neuronal dans le cerveau postnatal pose encore des problèmes car il est difficile d'inciter toutes les ESC au sein d'une colonie à se différencier en phénotypes de cellules souhaitées. Bien que de nombreux types cellulaires aient été utilisés dans la neurotransplantation, y compris des cellules souches pluripotentes, aucune de ces procédures n'a été entièrement satisfaisante. Par exemple, les cellules souches embryonnaires pluripotentes sont capables de générer une grande variété de types de cellules mais elles présentent un potentiel tumorigène accru lors de la transplantation cellulaire dans le système nerveux (1).

En revanche, les cellules progénitrices ont réduit le potentiel tumorigène car elles sont mitotiquement actives, mais elles produisent des cellules précurseurs à lignées restreintes, et seulement de manière transitoire. Ainsi, dans l'utilisation de cellules progénitrices neurales ayant déjà subi une restriction de lignage, nous avons moins d'inquiétudes au regard des phénotypes aberrants (non-neurogliaux) dans les cellules filles complètement différenciées, bien que leur capacité à générer une variété de phénotype neuronal soit moins certaine. Dans le SNC adulte et postnatal, des progéniteurs neuronaux situés dans la zone sous-ventriculaire antérieure (SVZ) génèrent normalement des neuroblastes et possèdent plusieurs caractéristiques qui les rendent idéales pour la transplantation. Bien que les cellules progénitrices SVZ post-natales génèrent principalement un nombre limité de cellules qui migrent vers le striatum (2-4), leur nombre augmente considérablement en réponse à l'ischémie (5-9).

Les lésions du système nerveux central et en particulier de la moelle épinière sont caractérisées par un processus secondaire de dégénérescence, qui est un état complexe d'un syndrome de type ischémique et de neuro-inflammation menant à une vaste expansion de la lésion initiale (10, 11, 12, 13, 14). Une transplantation réussie des précurseurs neuronaux nécessite leur survie dans un environnement aussi

défavorable. Nous avons déjà signalé que les cellules précurseurs neurales (PNJ), s'accumulaient au site de lésion (SCI) de la moelle épinière et amélioreraient le taux de récupération fonctionnelle des membres postérieurs. Toutefois, leur durée de viabilité dans la moelle épinière lésée n'est que de 12 à 20 jours, après quoi les PNJs sont phagocytées par les macrophages (15). Un résultat similaire a été observé avec les cellules souches embryonnaires (16). Compte tenu de ces résultats, nous avons cherché à isoler des cellules souches neurales adultes de la zone sous-ventriculaire (SVZ) après une ischémie globale prolongée.

L'isolement de précurseurs neuraux résistants à l'ischémie peut fournir des cellules avec des propriétés différentes des PNJs et capables de survivre dans l'environnement défavorable d'une lésion traumatique du système nerveux central. Nous avons d'ailleurs décrit récemment l'isolement de la SVZ des cellules souches adultes neurales résistantes à l'état ischémique et prélevables sur le cerveau de souris plusieurs heures après la mort de l'animal (6 heures). Ces cellules ont été appelées cellules précurseurs neurales Post-Mortem (PM-PNJs). Leur prolifération est similaire à celles des PNJs obtenues au moment de la mise à mort (T0) (17,18), tandis que leur différenciation donne environ 33 % de β tubulin III - et 36 % de cellules MAP2 positives par rapport aux 10 à 12 % des PNJs (19). Les PM-PNJs différenciées montrent un taux d'activation HIF-1 supérieur, expriment à la fois de l'EPO et de l'EPO-R, ainsi que des canaux actifs Ca^{++} voltage-dépendants (19).

Une différenciation aussi supérieure nécessite la fonctionnalité des systèmes de mTOR MAPK et est bloquée par l'exposition aux anticorps anti-EPO et anti-EPO-R. Ainsi, les cellules souches adultes neurales EPO-dépendantes, prélevées sur des cerveaux de cadavres et purifiées, peuvent présenter une approche efficace dans le traitement d'affections dégénératives du SNC.

STRATÉGIE ET IMPORTANCE DE LA RECHERCHE Une lésion traumatique de la moelle épinière (SCI) est dévastatrice pour le patient en tant qu'individu, et coûteuse pour la société car elle nécessite d'importantes dépenses de soins de santé à long terme. La réponse à la lésion médullaire (SCI) passe par deux étapes bien définies, la première étant le traumatisme lui-même à l'origine une lésion directe des tissus nerveux, tandis qu'une lésion secondaire se caractérise par des événements qui amplifient la lésion primaire du début. La lésion médullaire (SCI) entraîne des réponses complexes allant de réactions inflammatoires massives et de la formation d'une cicatrice gliale à des changements de signalisation intracellulaire. L'administration d'érythropoïétine ou d'IL-8 antagonistes a apporté une atténuation de la réponse inflammatoire, amélioré la production de facteurs neurotrophiques et conduit à une réduction de la dégénérescence secondaire, avec promotion de récupération fonctionnelle suite à la lésion médullaire (SCI) (Gorio et al 2002, 2005, 2007).

De même, l'administration en i.v. de cellules précurseurs neurales adultes (PNJ) dans les 24 heures suivant la lésion SCI a entraîné une récupération fonctionnelle et amélioré la production de facteurs neurotrophiques (Bottai et al., 2008) ; par contre, leur survie au site de lésion a duré moins de 3 semaines, en raison de la phagocytose par les macrophages activés. Cet événement a contribué à arrêter la récupération progressive de la fonction, qui a cessé de s'améliorer. Nous avons signalé que les cellules souches embryonnaires mouraient elles aussi au droit de la lésion en l'espace de quelques semaines et ne promouvaient qu'un petit rétablissement fonctionnel, bref, mais significatif. Il demeure

que ces cellules colonisent et se différencient en parties saines, vierges de lésions, dans cette même moelle épinière (Bottai et al, 2010). Ici, nous vous proposons d'étudier un nouveau clone de PNJ obtenu six heures après la mort de la souris donneuse (DR-PNJs). Ces cellules se différencient principalement en neurones, et l'événement est régulé par l'érythropoïétine auto sécrétée (Marfia et al, 2011). Les résultats préliminaires suggèrent leur accumulation à l'endroit de la lésion où elles promeuvent la récupération fonctionnelle. (FIGs 1 and 2).

Fig 1. Qualité de l'image IRM du site de lésion de la moelle épinière, 60 jours après la lésion. La taille de la moelle épinière est beaucoup plus mince au niveau du site de la lésion par rapport aux portions rostrales et caudales, lorsque les animaux ont été traités avec une solution saline. Par contre, la supplémentation par i.v. de DR-PNJ a permis de préserver une quantité plus importante de moelle épinière et l'œdème (signal hyper intense : couleur blanche) est considérablement réduit. Cette image correspond bien à une meilleure récupération comportementale.

Il semble donc que les DRNPCs soient capables de surmonter les problèmes fondamentaux, causés par la lésion médullaire (SCI) grâce à une atténuation de la dégénérescence secondaire avec survie accrue des tissus nerveux au niveau du site de la lésion et formation de nouvelles cellules neuronales qui pourraient remplacer celles perdues en raison du traumatisme. De plus, la création d'un environnement favorable devrait améliorer la régénération axonale dans l'ensemble du site de lésion. Ainsi que nous l'avons observé dans tous les traitements capables de réduire l'étendue de la dégénérescence secondaire, les DRNPCs devraient également promouvoir la préservation de matière blanche en réduisant l'apoptose des oligodendrocytes. Vu les caractéristiques des DR-PNJs et les résultats préliminaires encourageants, nous proposons cette étude visant à déterminer la faisabilité et l'efficacité de l'usage des précurseurs neuronaux adultes résistants à l'ischémie dans un modèle de réparation de tissus et de récupération fonctionnelle, comme dans les cas de lésions médullaires.

Fig 2. Accumulation de DR-PNJs de type Endorem à l'endroit de la lésion, un mois après le début de la création de la lésion et de la transplantation.

CONCEPTION ET METHODES DE RECHERCHE.

La préparation de cellules neuronales précurseurs résistantes à l'ischémie (DR-PNJs) à partir du cerveau de souris. Les DR-PNJs de la zone sub ventriculaire de jeunes souris adultes CD1, soit de type sauvage, soit transgéniques GFP (Green Fluorescent Protein) 6 heures après la mort. Les animaux seront tués conformément aux directives du Comité d'Éthique de l'Université de Milan. Le cerveau sera extrait et conservé dans une solution PBS composée de glucose (0,6 %), de pénicilline (100 U/ml), et de streptomycine (100 U/ml). Dissection des régions d'intérêt. Le cerveau sera prélevé et plongé dans du Sol de 1 à 4 °C. Dissection de la SVZ. À 2 mm de la section coronale du cerveau de la souris au niveau de la longueur rostro-caudale. La région autour du ventricule latéral est disséquée en faisant attention d'éviter le corps calleux et le striatum. Le tissu d'intérêt est isolé et coupé en petits morceaux pour améliorer la digestion enzymatique suivante.

La digestion enzymatique est réalisée à 37 °C pendant une heure, à 5 % de CO₂, dans une solution contenant 0,2 mg/ml de cystéine (Sigma), 0,2 mg/ml d'EDTA (Sigma), 1mg/ml de papaine (Worthington

DBA) dans de l'EBSS (Enhanced Balanced Salt Solution - Solution Saline Équilibrée Améliorée)(Gibco), nommée Sol2. On utilisera 5 ml de Sol2 pour chaque région du cerveau. À la fin de la digestion, le tissu est centrifugé à 123 g pendant 10 minutes et le surnageant est supprimé et remplacé par 1 ml de milieu EBSS. Le culot est désagrégé à l'aide d'une pipette de Gilson de 1000 µl. 7 ml d'EBSS seront ajoutés et une autre centrifugation sera effectuée avec les mêmes paramètres que précédemment. Le surnageant sera retiré, en laissant 200 µl et le culot sera de nouveau désagrégé par pipetage vertical, de haut en bas, avec une pipette Gilson de 200 µl. 5 ml d'EBSS seront ajoutés et on fera une nouvelle centrifugation à 17 g pendant 10 minutes.

Puis le surnageant sera retiré et le culot concentré remis en suspension dans 200 µl d'un milieu contenant de l'EGF (20ng/ml) (facteur de croissance épidermique), du bFGF (10ng/ml) (Basic Fibroblast Growth Factor = Facteur De Croissance Fibroblastique de Type 1), DMEM/F12 medium 2 mM L-glutamine, 0,6 % de glucose, putrescine 9,6/mg/ml 6.3 progestérone ng/ml, 5,2 sélénite de sodium ng/ml, 0,025 mg/ml d'insuline, transferrine à 0,1 mg/ml et héparine à 2 mg/ml. Le culot est dissocié en dix fois à l'aide d'une pipette de Gilson de 200 µl et les cellules sont comptées dans une chambre de Burkert et plaquées en cellules 3500 /cm² dans le volume approprié du milieu susmentionné. Dans ces conditions, les cellules souches commencent à proliférer, formant ce qu'on appelle communément neurosphères, et après 3 à 5 jours, elles atteignent 100-150 µm adéquat pour passer à la phase suivante. Dans ce but, les neurosphères seront transférées dans un tube falcon de 15 mL et centrifugées à 17 gs pendant 15 minutes. Le surnageant sera retiré, laissant 200 µm et le culot sera dissocié mécaniquement avec une pipette de Gilson 200 µl.

Le passage répétitif des neurosphères à la pointe déterminera la déségrégation des neurophères dans les cellules individuelles. Les cellules serontensemencées avec concentration de 10000 cellules/cm² et maintenues à 37° C et 5 % de CO₂. Isolement des NSCs (Cellules Souches Neurales) résistantes à l'ischémie. L'ischémie est obtenue en disloquant la colonne cervicale de souris, avec mort subite de l'animal. Six heures plus tard, le cerveau est retiré et la SVZ isolée et placée dans une solution froide contenant 100 U/ml de streptomycine et 0,6 % de glucose ; puis la SVZ est digérée enzymatiquement par incubation pendant 45 min à 1mg/ml de papaïne et 0,2 mg/ml d'EDTA. Après centrifugation à 123 g, le culot est remis en suspension dans 1 ml d'EBSS et dissocié mécaniquement ; les cellules isolées sont remises en suspension dans le DMEMF-12 contenant des FGF (10 ng/ml) et EGF (20 ng/ml). Les cellules sont alorsensemencées à une densité de 3500 cellules/cm² ; des neurosphères se forment et sont collectées dans les 7 jours. La dissociation mécanique de neurosphères, permet l'isolement de cellules individuelles, qui sontensemencées telles quelles. Cette procédure est répétée trois fois. Modèle animal. Des souris adultes de 25 grammes seront suivies dans nos animaleries dans des conditions d'hébergement aux normes. Les souris seront au régime sec normal avec de l'eau à volonté.

Toutes les expériences seront effectuées selon les protocoles approuvés par le Comité d'Étude de l'Université de Milan. La lésion traumatique de la moelle épinière sera effectuée au moyen du « dispositif Horizon infini"(H). Nous avons l'intention d'appliquer aux souris la force Newton 0,4 pendant 1 s, suivie d'une barre de retour automatique. Les animaux sont sous anesthésie par inhalation d'halothane et avant le réveil, ils sont traités avec de la buprénorphine pour la douleur et par de la

pénicilline G comme agent antimicrobien. Après la lésion SCI, les animaux sont logés deux par cage et, si nécessaire, on pratique une évacuation manuelle de la vessie. Des sphères flottantes, dérivées de clonage et isolées au troisième passage, seront dissociées, et 1 million de cellules injectées par i.v. seront administrées dans les 30 minutes suivant la lésion médullaire traumatique (TSCI). Nous utiliserons deux groupes témoins. L'un sera traité avec des fibroblastes vivants et l'autre avec les DR PNCs morts. Chaque groupe expérimental sera composé d'au moins 10 animaux. Ceci constitue la procédure standard appliquée ces dernières années. Les évaluations seront faites à l'aveugle.

MÉTHODES ET OBJECTIFS SPÉCIFIQUES

OBJECTIF 1) Caractérisation in vitro. Des puits sont recouverts de matrigel et incubés à 37° C pendant 2 heures. Ensuite, le matrigel est retiré et 25 000 CNS/cm² sont ensemencés en présence de DMEM F-12 privés des facteurs proliférants et additionné de 1 % de sérum. La différenciation neurale sera évaluée par immunocytochimie avec des anticorps appropriés aux études de différenciation. Des cellules sur lamelles seront fixées dans du PBS à pH 7.2 contenant 4 % de paraformaldéhyde pendant 30 minutes ; cette opération sera suivie de trois lavages (10 min) dans du PBS à pH 7,2. Toutes les lamelles seront incubées avec l'anticorps pendant 1 h, à température ambiante. Après avoir été lavées avec du PBS, les lamelles seront exposées aux anticorps IgG secondaires appropriés pendant 1h dans du PBS, à température ambiante, et des noyaux cellulaires seront teints au DAPI pendant 5 min à température ambiante.

OBJECTIF 2) Transplantation et évaluation de la migration et du retour vers le site de la lésion et la différenciation in vivo des DR-PNJs. Trente, soixante ou quatre vingt dix jours plus tard, la moelle épinière sera prélevée, figée dans de l'isopentane refroidi e à l'azote liquide, conservée à – 80 ° C jusqu'à la section. Certains animaux seront traités par perfusion d'aldéhydes et ensuite placés dans de la paraffine. Des coupes sériées de 12-15 µm d'épaisseur seront pratiquées au moyen d'un cryostat tout au long du segment T7-L1 de la moelle épinière, ou par microtome dans le cas d'enrobage de paraffine. Pour l'immunocoloration des marqueurs neuronaux, des sections seront fixées dans du paraformaldéhyde à 4 %, puis incubés avec des anticorps Nestin, MAP2, beta-tubuline III, neurofilaments et marqueurs neurotransmetteurs. Pour la détection des cellules astrogliales, nous utilisons les anticorps anti-GFAP. Pour évaluer l'expression de marqueurs inflammatoires, des sections seront traitées, puis incubées avec des IL-1beta ; MAC-1, CD14, CD4 et CD8. Vimentine et PECAM-1 seront également utilisées pour évaluer la différenciation en cellules de types fibroblaste et endothéliale. Les noyaux cellulaires seront colorés au DAPI. L'atténuation de l'apoptose est également une cible principale de tout traitement pharmacologique et de transplantation visant à promouvoir la récupération après une lésion médullaire. Nous utiliserons la technique TUNEL comme précédemment. L'évaluation sera effectuée 7, 14 et 28 jours après la lésion de la moelle épinière au niveau des fascicules gracilis et cuneatus (3 mm rostralement à partir du siège de la lésion de contusion) pour les oligos et à la périphérie de la lésion pour les neurones.

OBJECTIF 3) Évaluation de la récupération de l'invalidité. La récupération du handicap du membre postérieur sera évaluée au moyen de tests comportementaux qui seront effectués à 24 heures, 4, 7 et tous les 4 jours après la lésion SCI. L'évaluation de la récupération motrice. Les 9 points de l'Échelle Souris de Basso (BMS) sera utilisée. Un tel test permet la quantification des déficits de locomotion libre du membre postérieur du rat, par l'observation des mouvements dans un espace ouvert, sans obstacles.

OBJECTIF 4) Suivi in vivo du site de la lésion et de l'évolution cellulaire. Les images multicoupes IRM en T2 en spin écho seront obtenues selon l'orientation anatomique coronale et longitudinale. Les séquences prendront entre 40 à 60 minutes par souris. Les images IRM seront ensuite étudiées afin d'évaluer la zone de la lésion. La même méthode peut être appliquée pour déterminer la localisation des DR-PNJs transplantées. À cette fin, les DR-PNJs sont marquées avec des particules SPIO Endorem (AMI-25 ; Guerbet ; la taille des particules, 80-150 nm, solution mère, 11,2 mg Fe/ml). Le marquage sera effectué en incubant les cellules à 37 °C pendant 24h dans une solution Endorem en présence de l'agent de transfection poly-L-lysine dans le milieu de culture. Après incubation, l'Endorem en excédent est lavé. Un système d'IRM horizontal creux Bruker T 7 Tesla / 40cm, avec un insert de gradient de diamètre intérieur de 400 Tm/m, 120mm est utilisé avec un bobine Helmholtz de 3cm de diamètre construite en laboratoire pour transmettre et recevoir les signaux de l'IRM.

Les souris seront alignées (en position ventrale) sur un support en plexiglas construit en laboratoire et qui intègre également l'équilibrage et l'accord des circuits électroniques de la bobine de radiofréquence (RF). La région dorsale de l'animal est placée entre et parallèlement aux deux boucles de la bobine RF et est maintenue en place à l'aide d'un ruban adhésif. On utilise des points de repère extérieurs (os occipital et omoplates) pour s'assurer que T9 est bien au centre de la bobine. L'anesthésie est réalisée chez tous les animaux par inhalation d'isoflurane à 1 ou 2 %. La température corporelle est maintenue entre 33 à 37° C à l'aide d'une couverture d'eau tiède (TP12 ; Parkland, Coral Springs, FL) connectée à un circulateur. La fréquence respiratoire est surveillée en permanence, à l'aide d'un système de suivi et contrôle pour petits animaux (modèle 1024 ; S.A. Instruments Inc., Stony Brook, NY). Le site de la blessure (T9) est soigneusement positionné à l'isocentre de ces deux antennes RF et au sein de l'aimant.

Pour chaque animal, on équilibre et règle la bobine de Helmholtz, avant et après l'insertion dans l'aimant. L'acquisition d'un localisateur sur trois plans pour identifier la colonne vertébrale et un gradient sagittal écho, à résolution supérieure 2,2 minutes, et avec faisceau pondéré T1 (TR/TE=500/4.5ms ; angle de bascule = 90) a permis la représentation des corps vertébraux servant de repères anatomiques. Des études IRM axiales couvrent une région de 16,4 mm de la moelle épinière. Des séries consécutives d'images pondérées de coupes axiales T1, T2 et PD seront acquises. T1 pondéré (écho de gradient: TR/TE/ angle de bascule =500/4.9ms/90°, 5 moyennes) et des images à densité de proton pondéré (PD ; Écho de spin: TR/TE = 2000/15ms, 2 moyennes) seront acquises avec 175 × 175µm dans le plan de résolution avec une épaisseur de coupe de 1 mm et un écart de 0,1 mm entre les coupes. Les images 3D de T2 (écho de Spin, facteur TR/TE/RARE = 1629.2/59.7ms/16, 2 moyennes) seront obtenues avec une résolution de 179 × 175 × 625µm.

Analyse des données. Des images de résonance axiales seront utilisées pour quantifier l'évolution de la pathologie dans les deux groupes SCI. Des images axiales seront reconstruites à partir des données brutes, grossies 4 fois et recadrées pour conserver uniquement la colonne vertébrale avec IDL (système de recherche Inc., Boulder, CO, EU). Les données seront analysées à l'aveugle par rapport à l'état du traitement. Sept images T1 et PD consécutives pondérées autour de la lésion se superposeront et les régions d'intérêt seront tracées manuellement en utilisant le logiciel MetaMorph (vs.6.3 ; Molecular Devices Corporation, Downingtown, PA, EU). Cette combinaison d'images fournit le maximum de détails permettant de déterminer clairement les zones de la moelle entière et les endroits de signaux hypointenses (que l'on pense habituellement refléter l'hémorragie) et de signaux hyperintenses (œdèmes) dans la moelle lésée. Les (nombres de) pixels sont convertis en unités de surface (mm²) mises à l'échelle de la taille du pixel dans le plan. Les mesures de volume (mm³) sont obtenues en ajoutant les surfaces des coupes et en multipliant par épaisseur de coupe 1,1 mm plus l'épaisseur de l'écart entre les coupes.

OBJECTIF 5) Évaluation de la préservation de la myélinisation à l'endroit de la lésion.

La préservation de la myéline sera évaluée en comparant les niveaux de myéline dans la matière blanche ventrale à 0,4 mm de l'épicentre de la lésion, puisqu'il a été démontré que la préservation des voies motrices segmentales et descendantes, situées dans le funiculus ventral et latéral contenant les voies motrices descendantes, contribue considérablement à la fonction locomotrice chez le rat ayant subi une lésion de la moelle épinière. Nous avons déjà rapporté que la quantification de la myéline ventrale saine, évaluée dans une lame semi mince, donne des résultats comparables lorsqu'on a utilisé de la fluoromyéline (Vitellaro-Zuccarello, et al., 2007). Pour une analyse homogène, on effectuera une coloration avec du fluoromyéline sur des sections d'animaux contrôles, traités, et placés sur la même lamelle. Les images de microscope confocales seront obtenues avec les mêmes intensité, sténopé, longueur d'onde et épaisseur d'acquisition.

OBJECTIF 6) Évaluation de la reconstruction du site de la lésion et régénération axonale.

Notre paradigme de lésion provoque la dégénérescence complète de la matière grise et la destruction partielle de la substance blanche avec la préservation partielle du composant ventral. Par le biais de techniques quantitatives, nous évaluerons la capacité des DR-PNJs à restaurer les tissus perdus et à améliorer la préservation de la myéline. On déterminera et on évaluera la régénération dans la lésion, estimant l'étendue des axones 5-HT et TH-positifs dans la moelle, caudalement à la lésion. De plus, l'injection dorsale en T1 de Red Ruby permettra l'estimation du nombre d'axones dorsaux caudaux à la lésion. Le rétablissement de la connexion entre le nerf sciatique et les centres supérieurs sera déterminé par l'injection de toxine bêta choléra dans le nerf sciatique; 72 heures plus tard, on devrait trouver le marquage au niveau rostral par rapport à la lésion et, éventuellement, dans les noyaux gracilis et cuneatus.

OBJECTIF 7) Site de la lésion, infiltration cellulaire et cytokines inflammatoires.

Les effets de la transplantation sur la formation de cicatrices gliales et sur l'infiltration de macrophages est évaluée par immunocytochimie avec des anticorps GFAP et ED-1 respectivement. Les neutrophiles présentent un intérêt : leur migration vers le site de la lésion commence dans les 24 heures suivant la lésion, entraînée par la surproduction d'IL-8. L'évaluation sera effectuée 24, 48 et 72 heures et 7 jours suivant la lésion médullaire. Nous allons doser par analyse PCR et ELISA la production systémique et in situ du MIP-2 (IL-8), de TNF-alpha et d'autres cytokines majeures. Des dosages seront effectués 6, 24 et 48 heures et 7 jours après le début de la lésion. Une analyse PCR sera effectuée à l'aide de $\Delta\Delta Ct$: cette procédure peut être utilisée, car nous avons déjà déterminé que l'efficacité de réplification (pentes de calibration ou courbes standard) pour nos gènes d'intérêt et gènes domestiques est très proche. Le choix des amorces est effectué au moyen d'un programme DNASTAR Lasergene.

OBJECTIF 8) Les traitements pharmacologiques affectent-ils le devenir et l'action des cellules souches neurales? L'administration de NPCs résistantes à l'ischémie sera accompagnée d'un traitement concomitant de méthylprednisolone à 35 mg/kg, administrée quotidiennement pendant les 3 jours suivant la lésion médullaire. L'EPO peut représenter un agent synergique intéressant avec les cellules souches neurales, comme cela s'est produit quand il a été administré avec des cellules souches par voie cutanée, et il sera injecté en i.p. (piqûre intraperitoneale) à 5000 u/kg, une fois par jour pendant 3 jours suivant le traumatisme. La récupération fonctionnelle des membres postérieurs jusqu'à 28 jours après le traumatisme servira d'instrument de suivi standard pour évaluer toute interférence du médicament avec l'action des cellules souches neurales ; la morphologie du site de la lésion et la différenciation des paradigmes des cellules souches seront évalués.

OBJECTIF 9) Pose de DR-NPCs chez des animaux souffrant de lésions médullaires chroniques. Les objectifs 2 à 8 seront aussi valables pour l'administration de DR-NPCs chez des souris souffrant d'une lésion chronique de la moelle épinière. Un mois après la lésion, l'étendue de la récupération fonctionnelle des membres postérieurs est plutôt stable ; à ce moment, les cellules (250,000 cellules dans 15 μm de PBS) seront injectées stéréotactiquement dans un fascicule gracilis et cunéiforme à l'endroit de la lésion ou caudalement à 1 mm de la lésion. Le site de la lésion sera suivi in vivo par IRM et des tests comportementaux aideront à évaluer si les DR-NPCs transplantés affectent ou non la fonction du membre postérieur. Trente jours après la transplantation, nous évaluerons les gains 2, 5, 6 et 7.

SECTION 3) Préparation du NEUROGEL.

En bref, la matrice est produite par polymérisation radicalaire des monomères méthacrylates et à base de méthacrylamide, en présence d'un agent de réticulation et d'eau (ISO 9001: 2008 et ISO 13485: 2003). Le pHPMA est un hydrogel synthétique biocompatible qui n'affiche aucun signe de toxicité, d'inflammation chronique ou de risques de transmission de maladie. Cet hydrogel est un réseau macromoléculaire hydrophile réticulé avec une fraction d'eau de 95,66 %, qui présente une distribution multimodale de tailles de pores allant de <2 nm à >50 <300 μm .></300 μm .>

L'implant d'hydrogel sera taillé et adapté à la dimension de la lésion puis placé pour permettre la décantation du gel sur le tissu de la colonne vertébrale. Le gel sera hydraté avec des gouttes de solution

saline stérile afin d'assurer la complète apposition des surfaces entre l'implant polymère et la moelle. Les HADSCs et DR-NPCs adultes seront placées dans et au-dessus du Neurogel hydraté. En outre, une préparation brute de graisse traitée au Lipogem sera appliquée par dessus. Les résultats préliminaires sont très encourageants.

REFLEXIONS GLOBALES

L'impact global des troubles neurodégénératifs, les problèmes sociaux insoutenables et les coûts qu'ils génèrent, sont des rappels constants du besoin urgent de trouver des stratégies nouvelles et efficaces pour atténuer et/ou guérir ces affections. Dans ce sens, les thérapies cellulaires, les cellules souches et la médecine régénérative pourraient offrir une solution définitive et une alternative aux traitements médicamenteux avec toutes leurs limites. Il est donc impératif que nous poursuivions des stratégies alternatives. Alors que l'ultime source de cellules souches est encore à définir, il est extrêmement important que les scientifiques du monde entier continuent d'explorer le potentiel des différentes sources de cellules souches et les technologies connexes, jusqu'à ce que les meilleures sources pour le traitement de maladies neurodégénératives soient définies.

Budget pour 3 ans (en Euros)

Salaire d'Assistant de Recherche Senior	150 000
Post-doctorant	75 000
Consommables (réactifs, gaz, verrerie, équipement standard de laboratoire)	400 000
Équipement de labo	775 000
TOTAL	

Participation et organisation du groupe

Titre	Participation	
(Month/person)*		
Alfredo Gorio	Professeur	6
Carelli Stephana	Assistant	12
Giallongo Toniella		10
Messaggio Fanuel		12
Danuta Hebda	Post-doctorant	12
Elisa Latorre		6