



MODÉLISER LA SLA AVEC DES CELLULES SOUCHES PLURIPOTENTES DÉRIVÉES DE PATIENTS ATTEINTS DE SLA

Niels Geijsen, Hollande

Subvention : € 60 000

La SLA est l'une des maladies neurologiques les plus graves. Dans la majorité des cas il n'y a pas d'autres cas retrouvés dans la famille et la SLA est désignée comme sporadique (sSLA), tandis qu'un faible pourcentage de patients a une histoire familiale de SLA et l'on parle alors de forme familiale (fSLA). La plupart de nos connaissances sur les causes moléculaires de la SLA vient d'études génétiques chez des patients atteints de la forme familiale, 12 loci et 8 gènes ont été identifiés pour les fSLA.

La forme sporadique est considérée comme étant une maladie multifactorielle complexe avec l'existence de multiples gènes de susceptibilité ou de mutations multiples ainsi que de nombreux facteurs de risques environnementaux agissant sur l'expression des signes cliniques. Dans la sSLA, des gènes impliqués ont été identifiés en utilisant les approches gène candidat et screening du génome. Actuellement, les mécanismes moléculaires qui déclenchent l'apparition de la maladie et sa progression demeurent encore inconnus, à cause principalement du manque de systèmes modélisables d'étude de la maladie basée sur des cellules humaines.

La similarité des signes cliniques et formes pathologiques des formes familiales et sporadiques impliquent l'existence de voies communes conduisant à la dégénérescence des motoneurones. Les gènes associés à la SLA suggèrent une interaction de différentes voies dans le développement de la maladie : transport axonal ((*KIFAP3*, *DCTN1*, *UNC13A* et *SOD1*), métabolisme ARN (*FUS*, *TDP-43*, *ELP3*, *SMN* et *ANG*), Stress oxydatif (*SOD1* et *HFE*) et angiogénèse (*VEGF* and *ANG*). Les facteurs environnementaux ou liés au style de vie incluent peut-être le tabagisme, une activité physique excessive, l'exposition aux métaux lourds, formaldéhyde et champs électromagnétiques. Il reste à élucider comment ces facteurs et voies interagissent et si ces voies sont vraiment la cause de la SLA.

Une importante découverte dans notre connaissance de la pathogénèse de la SLA a été l'identification de la protéine 43 kDa TAR DNA-binding protein (TDP-43) comme composant majeur des agrégats de protéines trouvés de façon ubiquitaire dans 95% des patients atteints de SLA. Les inclusions de TDP-43 sont retrouvées dans le cytoplasme et le noyau aussi bien des neurones que des cellules gliales. Fait intéressant, les mutations du gène codant pour la protéine TDP-43 sont la cause de la SLA chez une minorité de patients atteint de la forme familiale de la maladie. Avec l'exception des patients dont la SLA familiale est due à des mutations *SOD1* et *FUS*, les inclusions TDP-43 sont maintenant reconnues comme une caractéristique commune des patients atteints de SLA sporadique et familiale, et fournissent ainsi un lien déterminant entre les pathophysiologies des 2 formes de SLA.

La plupart des efforts de recherche pour l'élucidation des bases moléculaires de la SLA ont été basées sur l'étude de souris portant des mutations du gène *SOD1* (trouvées chez 20 % des patients atteints de

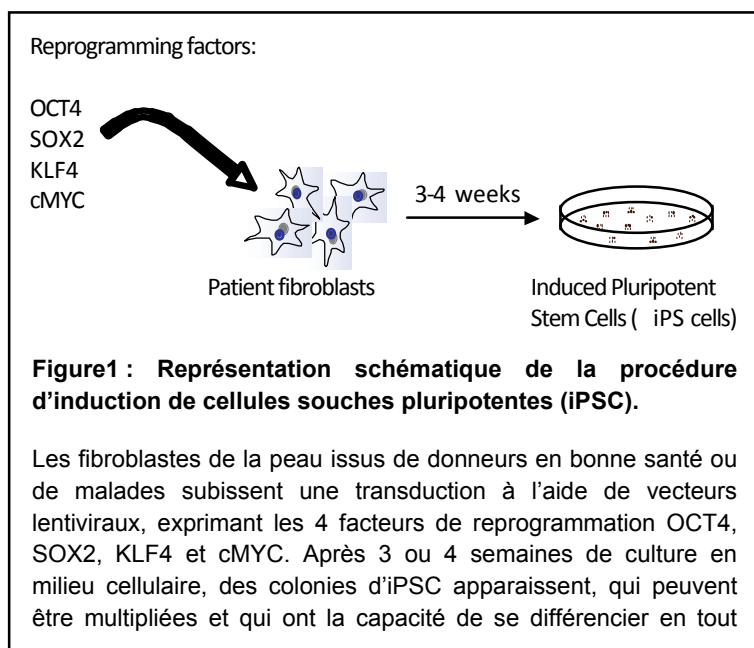




SLA familiale, soit 1% des patients atteints de SLA). Pourtant, il n'a pas été montré que les mutations SOD1 jouent un rôle majeur dans la SLA sporadique. Aussi, il doit exister des voies additionnelles menant aux mêmes symptômes cliniques. Un manque d'outils expérimentaux modélisables, en premier lieu notre incapacité à étudier les motoneurons des patients in vitro, a sévèrement entravé l'exploration des bases moléculaires de la SLA. Cependant, les nouveaux développements dans la recherche sur les cellules souches offrent une nouvelle approche passionnante pour étudier cette maladie.

Dans notre projet, nous prévoyons d'utiliser une nouvelle approche en nous servant des cellules souches pour modéliser la maladie. Les nouvelles technologies permettent désormais la production de cellules souches à partir de fibroblastes de patients, générant des lignes cellulaires qui portent

l'empreinte génétique de maladies du motoneuron telles que la SLA. Jusque récemment, travailler avec des cellules souches humaines était un vrai challenge puisque, contrairement aux cellules souches de souris, les manipulations génétiques étaient très compliquées à réaliser sur les cellules humaines. Notre laboratoire a récemment fait d'importants progrès dans la méthode de création de cellules souches pluripotentes induites humaines (iPSC), qui facilitent grandement la transgénèse dans les cellules souches humaines. Les cellules pluripotentes induites ont la capacité de



se différencier en tout type de cellules humaines, y compris en neurones et cellules gliales. Elles nous permettent donc, pour la 1^{ère} fois, de produire du tissu neural in vitro, fournissant ainsi une vue complète des voies moléculaires intervenant dans la SLA. De plus, il a récemment été démontré que les cellules souches pluripotentes peuvent être dérivées de simples cellules de peau, appelées cellules souches pluripotentes induites ou iPSC (Figure 1). Comme les iPSC issues de patients portent les caractéristiques génétiques de la SLA, elles peuvent être différenciées en neurones et cellules gliales in vitro, qui présentent les anomalies de dégénérescence observées dans la maladie.

Avec cette méthode, nous projetons de générer des lignées cellulaires iPSC issues de patients atteints de forme familiale et sporadique de SLA. Les cellules souches pluripotentes vont permettre la production de quantités illimitées de ces cellules et offrir pour la 1^{ère} fois un outil malléable pour la recherche sur la SLA. De plus, la production d'iPSC issus de patients SLA nous permet maintenant de fabriquer des lignes de cellules souches pluripotentes qui portent la prédisposition génétique à cette maladie et de vérifier le lien causal entre différentes voies moléculaires et la dégénérescence des motoneurons dans



la SLA. Enfin, la méthode (ci-dessus) de manipulation génétique de cellules souches pluripotentes humaines que nous avons développée récemment nous permet de façon exclusive aussi bien de produire des lignées cellulaires pour l'isolation de motoneurones et cellules gliales depuis des cellules souches différenciées que de chercher comment des changements dans l'expression du gène ou des mutations spécifiques conduisent à la mort des motoneurones, comme cela est observé chez les patients atteints de SLA.

Le Département de Neurologie du Centre Universitaire Médical d'Utrecht est à la pointe en matière de recherche sur la génétique de la SLA, il a constitué une base de données nationale, unique, ainsi qu'une banque de cellules issues de plus de 1500 patients. Cette banque de cellules contient des lignées cellulaires de fibroblastes de plus de 150 patients ayant des caractéristiques génétiques variées, patients ayant déjà donné leur consentement pour l'utilisation de ces lignées pour la recherche a , nous fournissant une boîte à outils inédite d'échantillons de divers patients pour modéliser et explorer cette maladie. L'expertise combinée de la banque de cellules du Centre Médical d'Utrecht et des nouvelles technologies développées dans notre laboratoire de l'Université de Harvard, maintenant transféré à l'Institut Hubrecht d'Utrecht permet de générer des lignées cellulaires d'iPSC issues de patients atteints de SLA, une approche nouvelle prometteuse et essentielle pour modéliser cette maladie dans le cadre d'un laboratoire. De plus nos découvertes récentes concernant les cellules iPSC humaines facilitent la production de mutations génétiques spécifiques dans ces lignées cellulaires.

Les résultats de ces expérimentations pourraient fournir de nouveaux éclairages sur les voies moléculaires impliquées dans la progression de la SLA et potentiellement former les bases initiales pour développer le criblage à haut débit de petites molécules et de si-ARN (small interférent) afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

ÉQUIPE

Ce projet est une nouvelle collaboration qui combine de façon unique l'expertise de Leonard van den Berg dans la SLA et la génétique (Centre Universitaire Médical d'Utrecht, Hollande), de Niels Geijsen pour les cellules iPS (Institut Hubrecht, Utrecht, et Harvard Stem Cell Institute, Boston, MA, USA), et de Jeroen Pasterkamp pour le screening et la biologie moléculaire (Centre Universitaire Médical d'Utrecht, HT screening, Molecular Neurobiology). Cette expertise combinée fournit une plateforme unique pour l'étude de la SLA afin de développer de nouvelles cibles thérapeutiques .