



MOTONEURONES HUMAINS DÉRIVÉS DE CELLULES SOUCHES PLURIPOTENTES INDUITES : UNE NOUVELLE APPROCHE D'ÉTUDE ET DE TRAITEMENT DE LA SLA SPORADIQUE.

Delphine Bohl, France

Subvention : € 160 000

La SLA est une maladie neurodégénérative de pronostic sombre et actuellement incurable. Chez les patients atteints de SLA, les neurones moteurs de la moelle épinière, du tronc cérébral et le cortex moteur sont progressivement détruits et déconnectés de leurs cellules cibles. Les malades perdent ainsi le contrôle des mouvements volontaires, ce qui conduit inévitablement à la mort, le plus souvent par défaillance des fonctions respiratoires. La SLA représente également un coût socio-économique majeur. Si 10% des malades atteints de SLA ont une forme familiale, la grande majorité des patients n'ont pas de cas dans leur famille et sont considérés comme sporadique. On ne sait pourtant presque rien des mécanismes d'apparition de la forme sporadique de la SLA. Cela est dû à la difficulté d'obtention de motoneurones humains et de leur étude dans des conditions expérimentales adéquates. La recherche sur la SLA sporadique est la première priorité de ce projet. Le deuxième aspect repose sur la nécessité d'accélérer le développement de stratégies thérapeutiques.

Pour générer des motoneurones humains, nous utiliserons la technique récemment décrite de reprogrammation cellulaire. Elle consiste à reprogrammer génétiquement des fibroblastes de peau en cellules souches pluripotentes (iPS). Nous avons déjà réussi à obtenir des iPS à partir de fibroblastes de peau de sujets sains (figure A, B) qui ont été complètement caractérisées et définies en tant que cellules souches pluripotentes humaines. Des fibroblastes de peau seront obtenus à partir de patients atteints de formes familiale et sporadique de la SLA et de volontaires sains d'âge équivalent. Ces fibroblastes seront génétiquement reprogrammés en motoneurones dont l'ensemble des caractéristiques sera analysé.

Notre deuxième objectif sera de différencier ces iPS obtenues en motoneurones. Nous avons déjà mis au point les protocoles pour différencier des iPS en cellules précurseurs de neurones, neurones (figure C) et en neurones moteur exprimant le marqueur HB9 (figure D) Les protocoles seront améliorés afin d'augmenter la proportion de motoneurones dans les cultures. Pour détecter les motoneurones pendant la phase de différenciation, les cellules précurseurs des neurones seront modifiées génétiquement avec des vecteurs exprimant une protéine fluorescente sous le contrôle d'un promoteur spécifique des motoneurones. Les iPS pouvant générer plusieurs types de motoneurones, pour s'assurer que les cultures contiennent les différents types de motoneurones potentiellement atteints dans la SLA, les motoneurones en culture seront caractérisés.



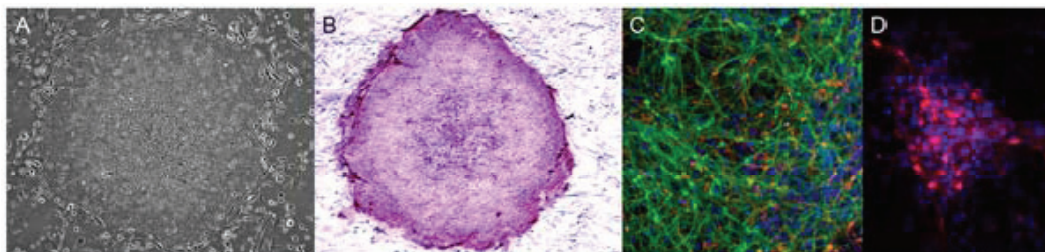


Figure. caractérisation et différenciation des iPS **A** Clone cellulaire d'iPS humain. **B** coloration cytochimique caractéristique des iPS. **C** différenciation des iPS en neurones (en vert). **D** après différenciation certaines cellules expriment le marqueur des motoneurones HB9 (en rouge)

Nous étudierons ensuite si les cellules issues des patients SLA présentent des anomalies spécifiques. A partir des cultures non purifiées contenant des motoneurones et d'autres types de cellules incluant des neurones et des cellules gliales, nous rechercherons des anomalies, comme la présence d'agrégats protéiques. Les anomalies présentes dans les motoneurones, incluant la survie cellulaire et la longueur des neurites, seront analysées en collaboration avec le Dr Georg Haase (CNRS, Université de la Méditerranée, Marseille) et dans le cadre d'autres projets. Si des anomalies intrinsèques sont détectées, nous rechercherons si elles proviennent du motoneurone ou du milieu cellulaire environnant. Enfin, le potentiel thérapeutique d'un motoneurone sain sera évalué dans un modèle rat de SLA.

Durant la dernière décennie, la thérapie cellulaire est devenue une nouvelle source d'espoir pour la SLA. En dépit des résultats encourageants obtenus après transplantation de cellules dans les modèles animaux de la SLA, la transposition à l'homme s'est avérée décevante montrant le besoin urgent d'études précliniques supplémentaires. Pour accélérer le développement d'une thérapie cellulaire utile pour la SLA, nous proposons de transplanter des précurseurs de motoneurones génétiquement reprogrammés à partir de fibroblastes de peau dans un modèle de rat de SLA, et d'en analyser les bénéfices thérapeutiques.

En conclusion, nous pensons que les motoneurones humains reprogrammés à partir de fibroblastes représentent un nouvel outil extraordinaire pour comprendre les mécanismes de la maladie et par la suite développer des thérapies cellulaires.

ÉQUIPE

Pour atteindre ces objectifs, notre projet réunit 2 équipes européennes ayant une expertise complémentaire dans le domaine de la SLA : biologie des cellules souches (D. Bohl), et transplantation de cellule (R. Pochet) bénéficiant de plateforme de recherche de pointe au sein d'institutions renommées (Institut Pasteur de Paris et Université Libre de Bruxelles).

Delphine Bohl et son équipe (Inserm, Unité Rétrovirus et Transfert Génétique, dirigée par le Dr JM Heard) est spécialisée dans la génération de cellules souches iPS et leur différenciation en neurones. Cette équipe a mis au point une technique pour obtenir des cellules souches pluripotentes (iPS) à partir



de fibroblastes de peau d'individus sains. Cette technologie a été développée pour l'étude de la SLA en contribuant à un projet de recherche financé par ERANET. Dans ce projet les fibroblastes ont été récemment prélevés de patients présentent des génotypes spécifiques et des iPS ont été générés.

Roland Pochet et son équipe (Chef de l'unité SLA du laboratoire d'histologie, de neuroanatomie et de neuropathologie) est spécialisé dans l'électrophysiologie et la morphologie de la SLA. Il a caractérisé un modèle de rats transgéniques surexprimant la protéine mutante SOD1G93A. Cette équipe est expérimentée en transplantation de cellules et dans le suivi quantitatif de leur localisation, récemment la chirurgie de la moelle épinière à l'endroit de la transplantation a été effectuée avec succès sur ces rats SOD1.



D. BOHL



S. BLANCHARD



T. LEMONNIER



D. TOLI



R. POCHE



C. NICAISE



ALS - iPSC : Motoneurones humains dérivés de cellules souches pluripotentes induites : une nouvelle approche d'étude et de traitement de la SLA sporadique

Appel à projets 2010

Subvention: 160 000 €

Durée du projet: 2 ans

Investigateurs: Delphine BOHL, Unité Retrovirus & Transfert génétique, Institut Pasteur, France

Participant: Roland POCHE, Université Libre de Bruxelles, Belgique

Point sur les résultats - Décembre 2012

Les cellules souches humaines pluripotentes induites, nommées en anglais iPSC, sont un matériau unique pour l'étude des maladies neurologiques. Cette technologie mise au point très récemment (Shinya Yamanaka, prix Nobel de médecine 2012) permet la reprogrammation de cellules comme les fibroblastes de peau en cellules pluripotentes ayant toutes les caractéristiques des cellules souches donc pouvant se différencier en n'importe quel type de cellule. Pour la première fois, il est possible de générer des motoneurones humains et de les analyser.

Nous avons observé que dans les iPSC générés à partir des fibroblastes d'un malade porteur de la mutation TDP43, il y avait une accumulation spécifique de la protéine TDP43, accumulation que l'on croit contribuer à la pathogénèse de la SLA. D'autres analyses se focalisent sur le défaut de croissance des neurites observés et sur l'identification de composés permettant de restaurer ces anomalies.

Parallèlement à ces études in vivo, nous avons évalué le potentiel thérapeutique d'iPSC précurseurs de neurones dans un modèle de rats porteurs de la mutation SOD1. Nous avons greffé ces cellules dans leur moelle épinière lombaire. Ce travail est le premier à montrer la survie pendant au moins deux mois de ces cellules ainsi que leur capacité à se différencier dans des cellules dont la morphologie est en partie semblable aux motoneurones et à générer de nouveaux neurones.

Motoneurones humains reprogrammés exprimant le marqueur spécifique HB9 (rouge) et un marqueur neuronal (vert)

