

Les progéniteurs du système nerveux immortalisés, vecteurs de thérapie génique

Les outils de thérapie interventionnelle pour le traitement de maladies touchant le système nerveux central se développent très rapidement. Les lecteurs de *médecine/sciences* ont ainsi été informés, ces toutes dernières années, des résultats des greffes intracérébrales de neurones (voir *m/s* n° 1, vol. 9, p. 76), des tentatives visant à utiliser, comme vecteurs de transfert de gène implantables dans le cerveau, des fibroblastes (voir *m/s* n° 4, vol. 5, p. 262) ou des myoblastes, et des travaux indiquant la capacité de divers vecteurs viraux d'infecter les cellules (post-mitotiques) du système nerveux central (voir *m/s* n° 2, vol. 9, p. 348 et *m/s* n° 3, vol. 11, p. 474). Une des limites les plus importantes de ces techniques paraît être, dans tous les cas, la restriction de l'effet biologique à la petite zone dans laquelle a été réalisée l'implantation ou l'infection, et à son voisinage direct dans le cerveau ou la moelle épinière. L'effet thérapeutique n'est ainsi espéré que sur un petit nombre de populations cellulaires, topographiquement organisées, et il est peu envisageable que les réinnervations ou la sécrétion de substances d'intérêt s'appliquent à de très larges régions cérébrales ou spinales, *a fortiori* à l'ensemble du système nerveux central. Il n'existe pas, en effet, de migration neuronale dans le parenchyme de l'hôte et les migrations gliales sont très limitées. Les vecteurs viraux – lorsqu'ils sont déficients pour la réplication – ne s'éloignent pas non plus significativement des zones d'injection, si ce n'est par transport rétrograde dans quelques neurones de projection.

De telles techniques peuvent donc en théorie, ou pour les greffes neuronales en pratique clinique, s'appliquer à des maladies qui s'attaquent à des populations neuronales bien regroupées mais pas à celles qui intéressent, de façon diffuse ou du moins plus dispersée, de vastes territoires. Une solution à ce problème vient d'être proposée par Evan Snyder et ses collaborateurs [1] (Harvard

Medical School, MA, et University of Pennsylvania, PA, USA), qui ont développé ces dernières années des transplantations intracérébrales de progéniteurs du système nerveux immortalisés. L'idée d'immortaliser des progéniteurs nerveux par transfert de gènes immortalisants, comme ceux codant pour v-Myc ou pour l'antigène T de SV40, a été mise en pratique avec succès dès la fin des

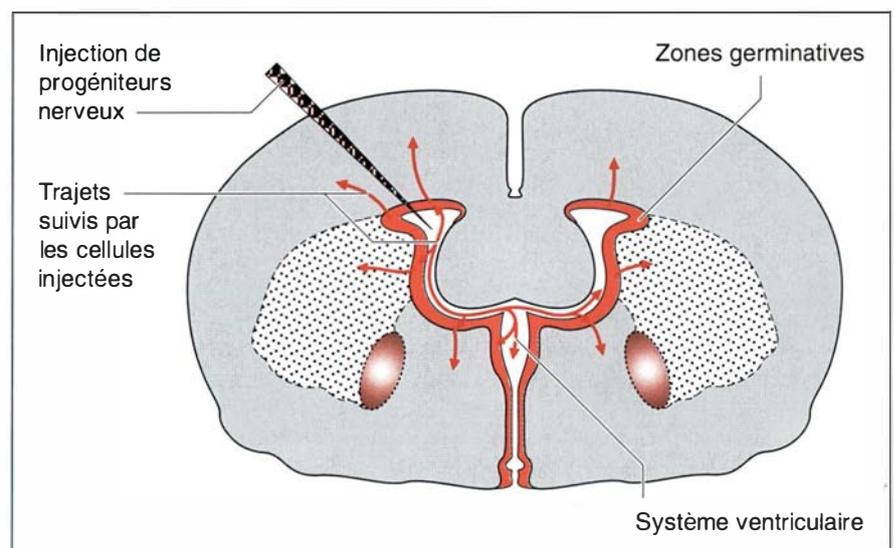


Figure 1. Voies d'accès supposées au parenchyme cérébral des progéniteurs nerveux immortalisés après injection par voie intracérébro-ventriculaire. Les cellules, portées par le flux du liquide céphalo-rachidien, semblent capables de pénétrer dans les zones germinatives paraventriculaires et de suivre les voies de migration qui conduisent normalement, à partir de ces zones, neurones et cellules macrogliales dans le parenchyme cérébral.

années 1980, avec pour objectif – à long terme – de créer des « banques » de cellules nerveuses, neurones et cellules de la macroglie, capables de se différencier spécifiquement en diverses populations utilisables en recherche (notamment sur le développement) ou en thérapeutique (par greffe) (pour revue, voir [2]). Les neurones étant incapables de proliférer après la fin de la neurogenèse, et les cellules macrogliales ne conservant que des capacités prolifératives très limitées, la création de telles banques réclamait l'accès aux cellules neuroépithéliales prolifératives du système nerveux central situées, au cours du développement fœtal essentiellement, dans les zones germinatives. La transduction de l'un des deux gènes immortalisants grâce à des vecteurs rétroviraux a permis d'obtenir des clones très variés, capables de proliférer en culture de façon permanente mais présentant une inhibition de contact et ne formant pas de tumeurs après implantation intracérébrale [3, 4].

L'étude de la différenciation de ces cellules après transplantation intracérébrale a permis d'observer des phénomènes tout à fait surprenants, dont l'intérêt thérapeutique potentiel suscite aujourd'hui beaucoup d'optimisme.

Tout d'abord, tous les auteurs qui ont réalisé ces greffes chez le rongeur – dans des régions variées du système nerveux central, et à des âges allant du nouveau-né à l'adulte – ont été frappés de constater que ces cellules, quelle que soit leur origine propre (dans une région cérébrale ou une autre), s'intègrent parfaitement dans le tissu hôte. Elles s'incorporent effectivement dans la cytoarchitecture de la région dans laquelle elles ont été transplantées et y acquièrent le phénotype local ! Des cellules progénitrices de cervelet peuvent, ainsi, devenir des neurones hippocampiques [3], et des progéniteurs neuronaux du raphé dorsal prendre le phénotype de neurones spinaux [5]. Il est probable que ces résultats, d'autant plus surprenants que des progéniteurs non immortalisés conservent une détermination phénotypique propre, sont liés à l'immortalisation. L'intervention de

v-Myc ou de T de SV40 pourrait « suspendre » artificiellement la mise en jeu des mécanismes de détermination et de différenciation. Le micro-environnement créé, soit par la confluence en culture, soit par les cellules hôtes après transplantation, jouerait alors efficacement un rôle instructeur. Les progéniteurs nerveux immortalisés pourraient donc, potentiellement, se substituer à de nombreuses populations neuronales, par différenciation « mimétique » après transplantation *in situ*.

Ensuite, ces cellules présentent la capacité très étonnante de migrer sur de longues distances dans le système nerveux central, en particulier chez le nouveau-né, c'est-à-dire à un stade où il existe encore une certaine prolifération dans les zones germinatives. Les progéniteurs nerveux, lorsqu'ils sont implantés dans ces zones germinatives, sont capables de suivre les voies de migration normales, comme le font les neurones et cellules gliales produits par ces zones germinatives, et se distribuent donc largement dans le parenchyme nerveux.

C'est cette propriété migratoire très particulière que Snyder *et al.* ont mise à profit pour utiliser les progéniteurs nerveux comme vecteurs de thérapie génique, en vue du traitement de la maladie de Sly, mucopolysaccharidose de type VII, maladie provoquée par un déficit en β -glucuronidase qui se traduit par une accumulation lysosomiale anormale (*m/s n° 6-7, vol. 10, p. 749*). Cette accumulation touche de très nombreuses cellules dans l'organisme, parmi lesquelles des neurones et des cellules macrogliales dans le cerveau. On a observé que l'apport extrinsèque de l'enzyme a un effet thérapeutique sur le désordre cellulaire. Cependant, quand cet apport a lieu en dehors du système nerveux central, l'enzyme n'y pénètre pas parce qu'elle en est empêchée par la barrière hémato-encéphalique. L'objectif thérapeutique à atteindre est donc de créer, dans l'ensemble du système nerveux central, les conditions pour que le taux de β -glucuronidase – quasi nul chez les patients – augmente dans des proportions (d'ailleurs assez faibles, < 10% de la normale) suffisantes pour prévenir l'accumulation

lysosomiale et, par voie de conséquence, l'atteinte cellulaire.

Snyder *et al.* ont eu l'idée de transférer le gène codant pour l'enzyme dans des cellules progénitrices nerveuses immortalisées (cellules de cervelet immortalisées par *v-myc*) et d'injecter ces cellules dans le cerveau de souris nouveau-nées présentant une MPS VII, non pas localement dans le parenchyme mais dans le système ventriculaire (*figure 1*). Les progéniteurs, portés par le flux du liquide céphalo-rachidien, se sont ainsi dispersés et ont atteint de nombreuses régions germinatives à partir desquelles ils ont migré dans le parenchyme nerveux, s'intégrant dans des régions diverses du cortex et du tronc cérébral. Se différenciant dans ces régions, ils y ont produit et sécrété la β -glucuronidase qui, captée par les neurones du voisinage, a pu être utilisée par ces derniers – après endocytose par la voie du récepteur du mannose-6-phosphate – pour restituer les mécanismes cataboliques normaux. Le marquage histochimique de l'activité de l'enzyme a montré, chez les différents animaux traités, que les progéniteurs nerveux implantés la synthétisaient encore jusqu'à huit mois après transplantation, indiquant la persistance au long cours de l'expression du transgène (ce qui a été difficile à obtenir avec d'autres types de cellules, en particulier avec les fibroblastes).

Les résultats thérapeutiques obtenus grâce à ce transfert de gène sont spectaculaires. Sur le plan biochimique, les souris MPS ont récupéré en moyenne 11% des taux d'enzyme dans l'ensemble du cerveau, avec des productions locales atteignant, à l'âge adulte, 2% à 163% du taux normal suivant les régions et les animaux. Sur le plan cellulaire, la présence de l'enzyme a effectivement permis de restreindre significativement, chez les animaux adultes, le nombre des cellules présentant des déficits de stockage lysosomal (qui se traduisent histologiquement par la présence de larges vacuoles dans le cytoplasme des neurones et des cellules gliales).

Les résultats présentés par Snyder *et al.* ouvrent la voie à des approches thérapeutiques originales pour un

grand nombre de maladies dans lesquelles un déficit enzymatique provoque des troubles du métabolisme cellulaire dans le système nerveux central (maladies lysosomiales mais aussi, par exemple, adrénoleucodystrophie). On peut en effet reconnaître très précocement certaines de ces maladies, alors que de larges régions germinatives paraventriculaires persistent, et envisager donc l'implantation de cellules progénitrices nerveuses par la voie décrite par les auteurs. Cependant, dans une perspective de thérapie chez l'homme, les cellules utilisées devraient à l'évidence être dépourvues d'oncogène

activé, ce qui nécessitera de mettre au point des méthodes alternatives de culture. L'application des mêmes techniques chez l'adulte se heurte, en revanche, à l'absence ou à la faiblesse de l'activité des zones germinatives paraventriculaires. On doit toutefois reconnaître que ces cellules progénitrices nerveuses immortalisées ont déjà apporté tant de résultats surprenants au cours de leurs trois années d'existence officielle que l'on ne peut qu'attendre avec optimisme ce qu'elles nous réservent encore, et pourquoi pas dans le cerveau et la moelle épinière de l'adulte !

M.P.

1. Snyder EY, Taylor RM, Wolfe JH, Neural progenitor cell engraftment corrects lysosomal storage throughout the MPS VII mouse brain. *Nature* 1995; 374: 367-70.
2. Snyder EY, Grafting immortalized neurons to the CNS. *Curr Op Neurobiol* 1994; 4: 742-51.
3. Renfranz PJ, Cunningham MG, McKay RDG, Region-specific differentiation of the hippocampal stem cell line HiB5 upon implantation into the developing mammalian brain. *Cell* 1991; 66: 713-9
4. Snyder EY, Deitcher DL, Walsh C, Arnold-Aldea S, Hartweig EA, Cepko CL, Multipotent neural cell lines can engraft and participate in development of mouse cerebellum. *Cell* 1992; 68: 33-51.
5. Onnifer SM, Whittemore SR, Holets VR, Variable morphological differentiation of a raphe-derived neuronal cell line following transplantation into the adult rat CNS. *Exp Neurol* 1993; 122: 130-42.