



En collaboration avec le laboratoire INSERM d'Afsaneh Gaillard, à Poitiers, des chercheurs de l'ULB ont testé le potentiel thérapeutique de neurones corticaux générés en laboratoire, puis transplantés dans le cerveau de souris adultes. Ces travaux, dont les résultats furent publiés en mars 2015 dans la revue américaine *Neuron*, ouvrent de nouvelles perspectives pour la réparation du cortex cérébral. Le professeur Pierre Vanderhaeghen, responsable de l'étude, nous parle de ces recherches.

DU LABORATOIRE AU CERVEAU



Interview du Pr Pierre Vanderhaeghen
par Philippe Lambert



Pr Pierre Vanderhaeghen

Tout commence en 2008 par un article publié dans la revue *Nature* (1). Au départ de cellules souches embryonnaires (ES) de souris, une équipe européenne dirigée par le professeur Pierre Vanderhaeghen, de l'Institut de Recherche Interdisciplinaire en Biologie Humaine et Moléculaire (IRIBHM) et de l'*ULB Neuroscience Institute* (UNI), est parvenue à générer *in vitro* des progéniteurs* corticaux, puis, à partir de ces derniers, des neurones spécifiques du cortex cérébral.

Tout laisse supposer l'existence d'une horloge biologique régulant la façon dont les neurones se différencient.

Le cortex étant constitué de 85% de neurones pyramidaux (excitateurs) et de 15% de neurones inhibiteurs, appelés interneurons inhibiteurs, les chercheurs orientèrent la production des neurones générés expérimentalement vers une identité pyramidale en inhibant, au moyen de cyclopamine, un facteur protéique du nom de *Sonic Hedgehog*

(en français, Sonic le hérisson) qui, *in vivo*, est produit à un stade très précoce de la neuro-embryogenèse par certaines cellules du tube neural ventral.

Chez la souris comme chez l'homme, le cortex comporte six couches. Chacune d'elles est générée à un moment différent de l'embryogenèse et abrite des neurones pyramidaux présentant des spécificités morphologiques et fonctionnelles qui lui sont propres. Mais qu'en était-il dans la boîte de Pétri? Il apparut que des neurones pyramidaux spécifiques des six couches corticales y étaient produits et, de surcroît, selon le même schéma temporel que lors du développement fœtal. Ceux de la couche VI – la plus profonde – d'abord, ceux de la couche I – la plus superficielle – pour finir. «*Tout laisse supposer l'existence d'une horloge biologique régulant la façon dont les neurones se différencient*», indique Pierre Vanderhaeghen.

Une façon simple pour engendrer un cerveau plus complexe pourrait être de lui accorder plus de temps pour se constituer.

En collaboration avec le laboratoire INSERM d'Afsaneh Gaillard, à Poitiers, les neurobiologistes de l'IRIBHM pratiquèrent ensuite des greffes neuronales chez des souris nouveau-nées. Non seulement les cellules greffées établirent des connexions dans le cerveau hôte, mais, qui plus est, préférentiellement avec certaines couches du cortex selon le moment de leur éclosion en culture, mimant ainsi ce qui se passe durant la neuro-embryogenèse «naturelle». «*En outre, en transplantant ces cellules, nous nous sommes aperçus que la plupart d'entre elles avaient une identité visuelle*, rapporte Pierre Vanderhaeghen. *Ce qui nous a amené à émettre l'hypothèse que le*

Les chercheurs de l'ULB et de l'Université de Poitiers ont testé le potentiel thérapeutique de neurones corticaux murins générés en laboratoire.

cortex visuel est l'option par défaut du développement cortical, étant donné que les cellules que nous avons développées en boîte de culture l'ont été sans information particulière» (2).

Le facteur temps

Vu le développement considérable du cortex dans l'espèce humaine se posait toutefois la question de l'applicabilité du modèle murin à des études centrées sur le cerveau de l'homme. Aussi l'équipe réunie autour de Pierre Vanderhaeghen décida-t-elle de soumettre des cellules souches embryonnaires pluripotentes humaines (prélevées sur des embryons surnuméraires produits dans le cadre de la fécondation *in vitro*) à une procédure expérimentale analogue à celle définie précédemment pour les cellules ES de souris.

Certes, la protéine *Sonic Hedgehog* ne s'exprime pas aussi abondamment dans les cellules pluripotentes humaines, mais, sur le plan conceptuel, les résultats obtenus se révélèrent similaires entre l'animal et l'homme. Sauf au niveau temporel. En effet, au moment où les neurones spécifiques des six couches du cortex murin sont déjà apparus dans le milieu de culture, les neurones humains de la couche corticale la plus précoce commencent seulement à être générés. Selon le professeur Vanderhaeghen, il faut en déduire que les cellules ES et leur descendance (les progéniteurs corticaux) possèdent bel et bien une horloge interne qui détermine le timing de leur développement. Le cortex de la souris, rappelons-le, se constitue en 15 jours lors de l'embryogenèse, mais la période correspondante est de 5 à 6 mois chez l'être humain.

Dans notre espèce, le caractère plus tardif de la neurogenèse permet la constitution d'un pool de progéniteurs corticaux plus important. De fait, ces derniers bénéficient d'un temps accru pour proliférer avant d'acquérir la compétence de générer des neurones (2). De surcroît, ils conservent cette capacité durant plusieurs mois, alors qu'elle est perdue chez la souris au bout d'environ trois semaines. «*Peut-être est-ce pour cela que l'espèce humaine dispose d'un cortex plus développé*, suggère le professeur Vanderhaeghen. *Une façon simple pour engendrer un cerveau plus complexe pourrait être de lui accorder plus de temps pour se constituer.*»

L'emploi de cellules souches embryonnaires humaines à des fins expérimentales ou médicales soulève des questions non seulement éthiques, mais également logistiques, notamment le nombre insuffisant d'embryons surnuméraires disponibles. Aussi le groupe européen dirigé par Pierre Vanderhaeghen s'efforça-t-il de contourner l'écueil en mettant à profit la technologie des cellules pluripotentes induites (IPS) (3), dont la découverte valut le prix Nobel de médecine et physiologie en 2012 au professeur Shinya Yamanaka, de l'Université de Kyoto. Ce dernier était parvenu à générer des cellules souches pluripotentes à partir de cellules somatiques adultes (en l'occurrence, des fibroblastes de la peau). Pierre Vanderhaeghen et son équipe, quant à eux, utilisèrent la technique des IPS pour produire des neurones corticaux similaires à ceux qu'ils avaient engendrés précédemment en s'appuyant sur des cellules souches embryonnaires. Cette première fit l'objet d'une publication dans la revue américaine *Neuron* en 2013 (4).



Cerveau adulte

Une question majeure taraudait les chercheurs: comment allaient se comporter les neurones ainsi produits en cas de greffe? Pour répondre à cette question, ils eurent recours à la xénotransplantation de cellules corticales humaines dans le cerveau de souris nouveau-nées. Chez des individus «normaux», la greffe se solda par un échec, les cellules humaines étant rejetées par le système immunitaire de l'animal. En revanche, elle fut une réussite chez des souris transgéniques immunodéficientes. Non seulement le contingent de neurones humains proliféra, mais la connectivité de ceux-ci, initialement rudimentaire (ébauche d'axones et de dendrites), se révéla foisonnante après neuf mois, attestant ainsi leur intégration anatomique dans le cerveau de la souris. Mieux encore: ils répondaient à distance à des stimulations électriques émanant de certaines tranches du cortex murin, auquel ils se connectaient donc sur le plan fonctionnel.

Les travaux publiés en 2008 et 2013, respectivement dans *Nature* et dans *Neuron*, faisaient appel à des souris nouveau-nées. Par conséquent, la question de l'applicabilité

des découvertes susmentionnées à des thérapies par remplacement cellulaire chez l'adulte demeurerait entière. Au cours d'une étude récente, parue en mars 2015 dans *Neuron* (5), les chercheurs de l'ULB et de l'Université de Poitiers ont testé, pour une première évaluation, le potentiel thérapeutique de neurones corticaux murins générés en laboratoire, en les transplantant dans le cerveau de souris adultes ayant subi une lésion neurotoxique dans le cortex visuel à la suite de l'injection d'acide iboténique. «*Les souris ne sont pas rendues aveugles, précise Pierre Vanderhaeghen. Comme nous n'effectuons que des lésions unilatérales, seule une partie de leur champ visuel est affectée. Elles souffrent donc d'une hémianopsie sélective.*»

Comment réagissent des cellules jeunes (de surcroît générées en laboratoire) quand elles sont implantées dans un cerveau adulte qui, par définition, ne suit plus un programme développemental naturel? Cette interrogation en appelle d'autres. Les cellules transplantées survivent-elles? Conservent-elles leur identité de neurones? Envoyent-elles des projections (axones) vers le reste du cerveau? Sont-elles pourvues de dendrites leur permettant de recevoir des informations en

Une cellule d'identité visuelle transplantée dans le cortex moteur ne répond pas.

provenance d'autres neurones? Sont-elles fonctionnelles, c'est-à-dire ont-elles une activité électrique analogue à celle des neurones du cortex visuel sain? La réponse à toutes ces questions est positive. «*En particulier, nos collègues de l'Université de Poitiers ont testé l'activité électrique des neurones transplantés lorsqu'on allume la lumière alors que l'animal était plongé dans le noir, rapporte Pierre Vanderhaeghen. Devant l'afflux de lumière, la fréquence de leurs décharges augmente de la même manière que celle des neurones du cortex visuel sain.*»

La loi de la spécificité

Comme le souligne le biologiste, cela ne permet cependant pas de savoir si les neurones transplantés restaurent la fonction, bref s'il y a réparation du cortex visuel lésé. Il y a assurément un substrat et, partant, un potentiel, mais on ne peut rien

affirmer de plus à l'heure actuelle. Pour démêler l'écheveau, des tests comportementaux et une analyse fine de tout le circuit du transplant seront indispensables. Une tâche qui prendra plusieurs années, selon notre interlocuteur.

Il est important de noter que, dans l'étude publiée en mars 2015 dans *Neuron*, les zones corticales innervées par le transplant correspondent à celles qui l'étaient préalablement par la région corticale qui allait subir une lésion neurotoxique expérimentale à la suite d'une injection d'acide iboténique. Il existe donc une spécificité des cibles des projections axonales issues des neurones greffés.

Spécificité, le mot est à l'ordre du jour. Car une autre question capitale abordée par l'équipe européenne concerne précisément la spécificité des cellules greffées elles-mêmes: leur identité de départ conditionne-t-elle la réussite de la transplantation, c'est-à-dire l'établissement de connexions fonctionnelles? La réponse est à nouveau affirmative. «*Une cellule d'identité visuelle transplantée dans le cortex moteur ne répond pas*», indique le professeur Vanderhaeghen.

Les chercheurs de l'Université de Poitiers testèrent les deux autres combinaisons: greffe de neurones d'identité motrice respectivement dans le cortex visuel et dans le cortex moteur. Les neurones générés en laboratoire à partir de cellules souches embryonnaires étant d'identité visuelle par défaut, c'est à partir de précurseurs en provenance de tissu fœtal que les biologistes français produisirent des neurones moteurs. Il apparut que ceux-ci possédaient un caractère fonctionnel quand ils étaient transplantés dans le cortex moteur, alors qu'ils en étaient dépourvus quand ils étaient placés dans le cortex visuel.

Miser sur la parenté

Dès lors, un des défis de la recherche sera d'orienter la différenciation cellulaire à partir de cellules ES ou de cellules IPS vers un type de neurones déterminé. En laboratoire, l'obtention de neurones d'identité visuelle se réalise dans un environnement par défaut, c'est-à-dire en l'absence de tout agent extérieur dans le milieu de culture. C'est a priori à ce niveau qu'il faudra agir. «*Mais, sur le plan expérimental, cela nécessitera un travail de bénédictin, car il faudra déterminer quelles sont les substances idoines à ajouter, en quelle concentration, à quel moment, durant combien de temps, en combinaison avec quelles autres substances, etc.*», insiste Pierre Vanderhaeghen. *Certains laboratoires ont déjà commencé ce travail qui, en principe, devrait déboucher sur des résultats dans les prochaines années.*»

Reste que plusieurs études récentes suggèrent qu'une aire corticale déterminée – par exemple, l'aire visuelle primaire (V1) – abriterait de nombreuses catégories différentes de neurones visuels. Ce qui est de nature à décupler la difficulté. Toutefois, au sein d'une aire spécifique, peut-être peut-on miser sur la parenté unissant les types de neurones qui y sont représentés... Par ailleurs, il existe un certain degré de diversité dans la population des neurones du cortex visuel générés artificiellement.

Les biologistes de l'équipe belge s'attachent depuis quelques mois à la transplantation de cellules corticales humaines générées en laboratoire dans le cortex de souris adultes. Selon des résultats préliminaires, ces «pièces de rechange» seraient fonctionnelles dans le cerveau murin. Des outils sont en voie de développement afin d'étudier finement les divers aspects du problème: nature des connexions et des infor-

En laboratoire, l'obtention de neurones d'identité visuelle se réalise dans un environnement par défaut.

mations perçues et transmises, impact comportemental chez la souris, etc.

À l'horizon se profile la perspective, fondée ou non, de produire artificiellement des neurones dans des boîtes de culture et de les employer dans des thérapies de remplacement cellulaire par greffes intracérébrales. De telles «réparations» concerneraient théoriquement tant les cerveaux endommagés à la suite d'un AVC ou d'un traumatisme crânien, par exemple, que ceux en proie à une maladie neurodégénérative. Dans ce dernier cas, il conviendrait, pour que la thérapie ait un sens, que l'affection ne se transmette pas au greffon ou, du moins, qu'elle ne le fasse qu'après un temps de latence suffisamment long pour que la greffe se justifie. Mais avant d'engager des essais thérapeutiques chez l'homme en faisant appel à des greffes de neurones générés en laboratoire au départ de cellules IPS, elles-mêmes induites au départ de cellules somatiques, de nombreuses questions fondamentales doivent encore être résolues. C'est d'ailleurs l'un des enjeux et l'une des promesses des découvertes de l'équipe européenne: l'étude détaillée, sur la base d'un modèle expérimental, de la fonction des neurones humains *in vivo*.

Note

* Cellules souches engagées dans une lignée cellulaire.

Références

1. Gaspard N, et al. An intrinsic mechanism of corticogenesis from embryonic stem cells. *Nature* 2008;455:351-7.
2. Vanderheyden JE. De la cellule souche aux réseaux neuronaux, les mécanismes du développement du cortex cérébral. *Neurone* 2014;19(1):45-7.
3. Okita K, et al. A more efficient method to generate integration-free human IPS cells. *Nature Methods* 2011;8:409-12.
4. Espuny-Camacho I, et al. Pyramidal Neurons Derived from Human Pluripotent Stem Cells Integrate Efficiently into Mouse Brain Circuits In Vivo. *Neuron* 2013;77:440-56.
5. Michelsen KA, et al. Area-specific reestablishment of damaged circuits in the adult cerebral cortex by cortical neurons derived from mouse embryonic stem cells. *Neuron* 2015;85:982-97.