

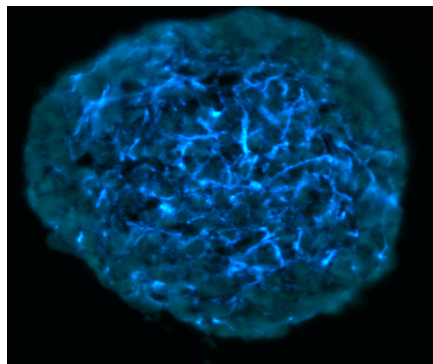


Centre de Recherches en Neurobiologie
cellulaire et moléculaire
Université de Liège

Faculté de Médecine

Les espoirs actuels de remyélinisation dans le système nerveux central.

BERNARD ROGISTER
DOCTEUR EN MÉDECINE
AGRÉGÉ



Mémoire déposé à l'Académie Royale de Médecine de Belgique
Dans le cadre des Questions Posées par la II^{ème} Section
"On demande de nouvelles recherches sur la démyélinisation du système nerveux
central"

Décembre 2002

1. Introduction :

Chez l'individu adulte jeune, la cause la plus fréquente de lésions de démyélinisation dans le système nerveux central est la sclérose en plaques et au cours de la dernière décennie, les progrès thérapeutiques dans le contrôle des réactions auto-immunes responsables de ces lésions sont remarquables (Compston et Coles, 2002). Citons notamment pour les formes classiques de la maladie l'avènement de l'interféron-bêta, l'utilisation du co-polymère, l'optimisation des cures de corticoïdes en cas de poussées, et dans les formes à évolution lentement progressive, le recours à des drogues immunosuppressives telles que l'azathioprine et la cyclophosphamide. Dans le même temps cependant, on doit bien admettre que les progrès en matière de réparation des lésions myéliniques sont nettement plus modestes (Franklin, 2002). Or, une fois la maladie maîtrisée ou en phase involutive à partir d'un certain âge, l'absence de régénération de la myéline, avec comme conséquence une perturbation ou une perte fonctionnelle sur le plan neurologique, conditionne la qualité du vie du malade. Rappelons en effet que la myéline, cette membrane lipo-protéique élaborée dans le système nerveux central (SNC) par les extensions cytoplasmiques et membranaires des oligodendrocytes, est plus qu'une simple « gaine isolante » des axones : ses propriétés moléculaires sous-tendent la conduction saltatoire de l'influx nerveux. Cette conduction saltatoire, rapide et efficace, est à la base du fonctionnement harmonieux du système nerveux chez les mammifères évolués, leur permettant entre autres des activités motrices particulièrement élaborées comme la marche par exemple.

Pourtant, il est bien établi qu'une ébauche de remyélinisation demeurant incomplète apparaît spontanément dans les lésions démyélinisantes du SNC (Ludwin,

1987; Prineas et coll., 1993; Raine, 1997; Keirsteadt et Blakemore, 1999). L'identité des cellules potentiellement remyélinisantes du SNC reste débattue actuellement mais l'hypothèse la plus raisonnable consiste à considérer que ce ne sont pas les oligodendrocytes matures résiduels mais plutôt les progéniteurs oligodendrocytaires (OPCs ou Oligodendrocyte-Progenitor Cells) qui remplissent cette fonction aux niveau des sites lésionnels. Par ailleurs, on sait maintenant que persistent à l'âge adulte et dans diverses régions discrètes du système nerveux, des cellules souches totipotentes, capables de générer de manière continue de nouveaux neurones, notamment dans l'hippocampe (Wexler et Palmer, 2002). On estime ainsi que chaque jour et pour deux mille neurones existants, un nouveau neurone est formé au niveau du *gyrus dentatus* dans l'espèce humaine (Song et coll., 2002). Jusqu'à présent cependant, aucune évidence d'une néoformation d'oligodendrocytes à partir de cellules souches n'a encore été apportée chez l'adulte.

Dans notre travail, nous nous sommes particulièrement intéressés à la genèse des oligodendrocytes au cours du développement embryonnaire. En effet, une meilleure connaissance des mécanismes moléculaires et cellulaires qui sous-tendent l'apparition des oligodendrocytes lors de l'ontogenèse du système nerveux devrait nous permettre à terme de définir des stratégies thérapeutiques efficaces en vue de favoriser une remyélinisation des axones persistants. Nos observations permettent d'envisager sur le plan conceptuel deux approches différentes en vue de stimuler la remyélinisation : 1) soit le recrutement des OPC ou des cellules souches résidentes par un moyen pharmacologique quelconque; 2) soit la greffe de cellules immatures au niveau des sites lésionnels.

2. Le recrutement de progéniteurs endogènes :

Les OPCs du cerveau adulte représentent 5 à 8 % de la totalité des cellules gliales (Dawson et coll., 2000; Levine et coll., 2001) mais leurs potentialités sont encore largement méconnues en conditions lésionnelles rencontrées dans les affections démyélinisantes. De même, dans la substance blanche comme dans la substance grise normale, leur fonction n'apparaît pas encore clairement. Ces OPCs adultes sont très lentement prolifératifs et constituent la grande majorité des cellules encore mitotiques parmi le contingent glial du cerveau adulte. La relative quiescence de ce comportement contraste avec l'importante activité mitotique et migratoire des OPCs observée au cours du développement (Rogister et coll., 1999 ; Annexe 1). On sait que les OPCs embryonnaires sont sensibles à de nombreux facteurs de croissance au cours de la fin de la période embryonnaire et au début de la vie extra-utérine et que ceux-ci stimulent la prolifération de ces cellules, leur survie et leur maturation en oligodendrocyte myélinisant. A côté de cette sensibilité aux facteurs de croissance, nous avons démontré dans nos précédents travaux que les OPCs embryonnaires ainsi que les cellules souches nerveuses expriment des récepteurs aux neurotransmetteurs et notamment le récepteur ionotrope à la glycine (GlyR) (Belachew et coll., 1998, Belachew et coll., 2000a ; Nguyen et coll., 2002). Nous avons montré que l'activation de GlyR provoquait une entrée de Ca^{2+} dans les OPCs par induction d'une dépolarisation déclenchant l'ouverture de canaux calciques voltage-dépendants (Belachew et coll., 2000a) L'activation de GlyR par la glycine stimule par ailleurs la prolifération des OPCs *in vitro* par un mécanisme apparaissant strictement Ca^{2+} -dépendant (Belachew et coll., 2000b). Cette sensibilité à certains neurotransmetteurs laissent entrevoir la

possibilité d'utiliser certains médicaments, connus pour moduler l'une ou l'autre voie de neurotransmission, dans le but de favoriser le recrutement des OPCs. Une telle approche est cependant subordonnée à la démonstration que les OPCs adultes sont sensibles à ces neurotransmetteurs de la même manière que les OPCs embryonnaires.

D'autre part, nous avons démontré que persistaient des cellules précurseurs immatures dans le cortex cérébral des mammifères au début de la vie extra-utérine. Ces cellules que nous avons appelées cellules gliales progénitrices sont caractérisées par l'expression de la forme poly-sialilée de la Neural-Cell Adhesion Molecule (PSA-NCAM). Elles peuvent se différencier en astrocytes ou en OPCs puis dans ce cas en oligodendrocytes, mais apparaissent incapables de se différencier en neurones (Ben-Hur et coll., 1998 ; Annexe 2). Cependant, ces cellules restent encore très immatures et sont capables de proliférer de manière importante, permettant d'obtenir ainsi de grandes quantités de progéniteurs gliaux à partir de quelques cellules. Ce caractère immature est illustré par le fait qu'elles sont cultivées en suspension à l'instar des cellules souches nerveuses et qu'elles forment dans ces conditions des sphères. Cette observation permet évidemment d'envisager la constitution de banques cellulaires en vue de greffes cellulaires (voir paragraphe 3).

Plus récemment, nous nous sommes intéressés aux signaux cellulaires permettant aux cellules souches nerveuses (NSC) d'évoluer vers le phénotype OPC. Nous avons ainsi démontré le rôle important que joue un groupe de facteurs de croissance, les neurégulines, qui sont capables de stimuler à la fois la prolifération et la survie des NSC mais aussi leur différenciation en oligodendrocytes (Calaora et coll., 2001 ; Annexe 3). Les neurégulines forment une famille de facteurs de croissance encodés

par quatre gènes différents et qui agissent sur des récepteurs doués d'une activité tyrosine kinase (Buenano et Fischbach, 2001 ; Yarden et Sliwkowski, 2001). Nous n'avons abordé dans un premier temps que l'étude de l'expression et du rôle du premier de ces gènes, *NRG1*. Ce dernier contient un grand nombre d'exons qui se recombinent par épissage alternatif. De cette façon, *NRG1* code pour une quinzaine de protéines différentes, regroupées dans trois groupes en fonction de la structure de leur extrémité amino-terminale. Chacun de ces facteurs de croissance est caractérisé par la présence d'un domaine EGF par lequel il interagit avec ses récepteurs erbB2, erbB3 ou erbB4. Nous avons démontré que les NSC expriment la forme SMDF-TM (Somato-Sensory neurons Derived Factor – TransMembranaire) encore appelées NRG3-TM lorsqu'elles prolifèrent tant *in vitro* qu'*in vivo*. Les autres formes protéiques issues de l'épissage différentiel de *NRG1* ne sont pas ou très peu exprimées dans ces conditions. Cette expression de SMDF-TM cesse lorsque les NSC se différencient. Nous avons également démontré que les NSC expriment deux formes de récepteurs aux neurégulines, erbB2 et erbB4, lorsqu'elles prolifèrent ou se différencient. En utilisant une forme soluble, recombinante de erbB3 (qui correspond en fait à son domaine extracellulaire), nous avons réalisé une inhibition des neurégulines dans les cultures de NSC. Dans ces conditions, on observe à la fois une diminution de la survie et de la prolifération des NSC. Dans le même temps, on observe que les NSC qui survivent se différencient préférentiellement en oligodendrocytes.

Actuellement une comparaison des effets de ces facteurs de croissance sur les cellules souches adultes est en cours. En effet, chez l'adulte, l'absence ou la faible réponse des NSCs observée suite à une lésion de démyélinisation peut être due soit à l'absence de ces facteurs de croissance dans le SNC adulte, soit à une absence de

sensibilité des NSC adultes. En tout état de cause, le recours à ces facteurs en vue d'une utilisation thérapeutique passerait très vraisemblablement par le développement d'agonistes spécifiques non peptidiques, tant leur organisation au niveau génomique et protéique est complexe.

3. Les greffes de cellules immatures :

A nos yeux, cette approche dans la sclérose en plaques est grevée d'une difficulté quasi insurmontable et constituée par le nombre de lésions de démyélinisation : il est en effet illusoire d'imaginer de greffer des cellules capables de reformer de la myéline au niveau de toutes les lésions à tout le moins observables en résonance magnétique. Cependant, on pourrait imaginer réserver cette approche à des cas particuliers dans lesquels on aurait pu attribuer de manière certaine l'origine d'un handicap fonctionnel tout à fait significatif à une lésion. Dans ce contexte restrictif, chez l'animal adulte, la greffe de cellules immatures (OPCs embryonnaires ou cellules souches) dans des lésions expérimentales de démyélinisation apparaît relativement prometteuse (Keirstead et coll., 1999 ; Annexe 4).

Ainsi que nous l'avons signalé ci-dessus, les cellules progénitrices gliales PSA-NCAM sont caractérisées entre autres par des capacités prolifératives importantes en culture. Cette observation laisse envisager la possibilité d'obtenir de grandes quantités de cellules capables de se différencier en oligodendrocytes à partir d'une quantité limitée de cellules. Nous avons donc utilisé cette population cellulaire comme matériel de greffes dans des lésions expérimentales de démyélinisation chez l'animal. Cette population de progéniteurs gliaux PSA-NCAM s'est avérée être un excellent matériel cellulaire : alors que chez les animaux non greffés, aucune

remyélinisation n'est observée dans une lésion de démyélinisation chimiquement induite, chez les animaux greffés 95 à 100 % des axones sont remyélinisés. Cependant, cette remyélinisation est due pour 20% des axones à des cellules de Schwann, la cellule myélinisante du système nerveux périphérique. Ces cellules de Schwann ne se retrouvent jamais en temps normal dans le système nerveux central. Leur présence dès lors pouvait résulter soit d'une différenciation des cellules PSA-NCAM greffée, soit de la migration le long des racines nerveuses des cellules de Schwann de l'animal receveur, attirées par la greffe de cellules PSA-NCAM. Pour déterminer quelle était la bonne hypothèse, nous avons cultivé des cellules PSA-NCAM isolées uniquement à partir de rats mâles. Ensuite, nous les avons greffées dans des lésions de démyélinisation réalisées uniquement chez des rates femelles adultes. Les résultats de ces greffes ont été analysés à la fois par immunocytochimie à l'aide d'un anticorps anti-P0 (un marqueur spécifique des cellules de Schwann) et par hybridation *in situ* à l'aide d'une sonde dirigée contre le chromosome Y. De cette façon, nous avons pu démontrer que ces cellules de Schwann se différenciaient à partir des cellules PSA-NCAM greffées. En culture cependant, nous n'avons jamais pu obtenir une différenciation schwannienne des cellules PSA-NCAM. Ceci souligne le rôle inducteur particulier des conditions locales rencontrées par les cellules PSA-NCAM dans la lésion de démyélinisation. En outre, cette observation est un des premiers exemples de la plasticité phénotypique des cellules souches et immatures observée dans d'autres situations à l'heure actuelle et qui laisse entrevoir d'autres possibilités en matière de thérapie cellulaire (voir ci-dessous).

4. Conclusion :

La réparation de la myéline dans le système nerveux central reste à l'heure

actuelle un défi. Dans notre travail, nous avons envisagé d'abord le « recrutement » de cellules immatures, précurseurs immédiats ou non, des oligodendrocytes et dont on sait qu'ils persistent dans le SNC des individus adultes. Nous avons démontré le rôle que joue un groupe important de facteurs de croissance, les neurégulines, et en collaboration avec le Dr Belachew, nous avons également démontré le rôle potentiel que pourraient jouer certains neurotransmetteurs. Cette dernière observation pourrait s'avérer rapidement utile en matière de traitements : en effet, tant dans certaines pathologies neurologiques que dans les pathologies psychiatriques, on dispose à l'heure actuelle de nombreux médicaments capables de moduler positivement ou négativement et de manière relativement spécifique certains aspects la transmission nerveuse due à plusieurs neurotransmetteurs et dès lors, il n'est pas utopique d'envisager une expérimentation clinique rapide.

Dans un second temps, nous avons exploré les possibilités de greffes de cellules immatures dans des lésions de démyélinisation et, tout faisant certaines réserves sur l'utilisation clinique routinière d'une telle approche, nous avons démontré la faisabilité de celle-ci. Cependant, ne perdons pas de vue que ce traitement reste toutefois une allogreffe, imposant à la fois une immunosuppression du receveur dont le statut immunologique est déjà particulier, et un prélèvement embryonnaire de cellules immatures, ce qui en soi constitue un problème éthique peu compatible encore une fois avec une pratique clinique routinière. Au cours des trois dernières années, on a rapporté plusieurs exemples de plasticité phénotypique de cellules souches somatiques. En d'autres termes, des cellules souches prélevées au niveau d'un organe, sont capables, une fois greffées dans un autre tissu, de se « transdifférencier » en quelque sorte et d'adopter le phénotype caractéristique du tissu receveur. Nous avons déjà mentionné

notre observation personnelle concernant les cellules gliales progénitrices PSA-NCAM du SNC qui, peuvent se différencier en cellules de Schwann lorsqu'elles sont confrontées à un environnement particulier constitué par la lésion sub-aiguë de démyélinisation. De même, les cellules souches mésenchymateuses présentes dans la moelle osseuse et normalement à l'origine des ostéocytes, des fibroblastes, des adipocytes et des chondrocytes, sont capables après greffe dans le système nerveux de se différencier en neurones (Brazelton et coll., 2000 ; Mezey et coll., 2000) et en oligodendrocytes si elles sont greffées au niveau de lésion de démyélinisation (Sasaki et coll., 2000). Ces observations laissent entrevoir la possibilité d'autogreffes qui rendent caduques les réserves mentionnées ci-dessus quant à l'immunosuppression et au prélèvement embryonnaire. Récemment, nous avons entrepris d'étudier ce phénomène de transdifférenciation des cellules souches mésenchymateuses en cellules du système nerveux et nous avons démontré que celui-ci passe par différentes étapes : l'expression par les cellules souches mésenchymateuses de la nestine, une protéine de filament intermédiaire, est le signe d'une « réceptivité » des cellules à des influences moléculaires de transdifférenciation (Wislet-Gendebien et coll., 2002). Nous travaillons actuellement à l'identification de ces signaux.

Remerciements :

BR est Maître de Recherches du Fonds National de la recherche Scientifique (FNRS). Ses travaux sont soutenus par le FNRS, TELEVIE, la Fondation Médicale Reine Elisabeth, la Fondation Charcot et la Ligue Belge de la Sclérose en Plaques.

Bibliographie :

- Belachew S, Rogister B, Rigo J-M, Malgrange B, Mazy-Servais C, Xhaufaire G, Coucke P, Moonen G: (1998) Cultured oligodendrocyte progenitors derived from cerebral cortex express a glycine receptor which is pharmacologically distinct from the neuronal isoform. *Eur.J.Neurosci.*, 10, 3556-3564.
- Belachew S, Malgrange B, Rigo J-M, Rogister B, Leprince P, Hans G, Nguyen L and Moonen G: (2000a) Glycine triggers an intracellular calcium influx in oligodendrocyte progenitor cells which is mediated by the activation of both the ionotropic glycine receptor and Na⁺-dependent transporters. *Eur. J. Neurosci.* , 12, 1924-1930.
- Belachew S, Rocher V, Nguyen L, Hans G, Rogister B, Rigo JM, Malgrange B and Moonen G: (2000b) Glycine can regulate the proliferation and differentiation of oligodendrocyte progenitor cells. Abstract of 30th annual Meeting of the *American Society for Neuroscience*, New Orleans.
- Belachew, S., Yuan, X. and Gallo, V. (2001) Unraveling oligodendrocyte origin and function by cell-specific transgenesis. *Dev.Neurosci.*, 23, 287-298.
- Ben Hur, T., Rogister, B., Murray, K., Rougon, G. and Dubois-Dalcq, M. (1998) Growth and fate of PSA-NCAM⁺ precursors of the postnatal brain, *Journal of Neuroscience* 18, 5777-5788.
- Brazelton, T.R., Rossi, F.M., Keshet, G.I. and Blau, H.M. (2000) From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science*, 290, 1775-1779.
- Buonanno A, Fischbach GD (2001) Neuregulin and ErbB receptor signaling pathways in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 11: 287-296.
- Calaora, V. Rogister, B., Bismuth, K. Murray, K. Brandt, H. Leprince, P. Marchionni, M. and Dubois-Dalcq, M. (2001) Neuregulin signaling regulates neural precursor growth and

- the generation of oligodendrocytes in vitro. *J.Neurosci.*, 21, 4740-4751.
- Compston, A. and Coles, A. (2002) Multiple sclerosis. *The Lancet*, 359, 1221-1231.
- Dawson MR, Levine JM, Reynolds R: (2000) NG2-expressing cells in the central nervous system: are they oligodendroglial progenitors? *J Neurosci Res.* , 61,471-479.
- Franklin, R. (2002) Why does remyelination fail in Multiple Sclerosis? *Nature Rev.Neurosci.*, 3, 705-714.
- Keirstead HS, Blakemore, WF (1999) The role of oligodendrocytes and oligodendrocytes progenitors in CNS remyelination. *Adv.Exp.Med.Biol.*, 468, 183-197.
- Keirsteadt, T. Ben Hur, B. Rogister, M. O'leary, M. Dubois_Dalcq, and W.F. Blakemore (1999) Polysialylated neural cell adhesion molecule positive CNS precursors generate both oligodendrocytes and Schwann cells to remyelinate the CNS after transplantation, H.S. *Journal of Neuroscience*, 19, 7529-7536.
- Levine JM, Reynolds R, Fawcett JW: The oligodendrocyte precursor cell in health and disease. *Trends Neurosci.* 2001, 24, 39-47.
- Ludwin SK: (1987) Regeneration of myelin and oligodendrocytes in the central nervous system. *Prog Brain Res.*, 71, 469-484.
- Mezey, E., Chandross, K.J., Harta, G., Maki, R.A. and McKercher, S.R. (2000) Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science*, 290, 1779-1782.
- Nguyen, L., Malgrange, B., Belachew, S., Rogister, B., Rocher, V., Moonen, G. and Rigo, J.M. (2002) Functional glycine receptors are expressed by postnatal nestin positive neural stem/progenitor cells.. *Eur.J.Neurosci.*, 15 , 1299-1305.
- Prineas JW, Barnard RO, Kwon EE, Sharer LR, Cho ES: (1993) Multiple sclerosis: remyelination of nascent lesions. *Ann Neurol.*, 33, 137-151.
- Raine CS: (1997) The Norton Lecture: a review of the oligodendrocyte in the multiple sclerosis lesion. *J Neuroimmunol.*, 77, 135-152.
- Rogister, B., Ben Hur, T. and Dubois_Dalcq, M. (1999) From neural stem cells to myelinating oligodendrocytes, *Molecular and Cellular Neurosciences*, 14, 287-300.
- Sasaki, M., Honmou, O., Akiyama, Y., Uede, T., Hashi, K. and Kocsis, J.D. (2001) Transplantation of an acutely isolated bone marrow fraction repairs demyelinated adult rat spinal cord axons. *Glia*, 35, 26-33.
- Song, H.J., Stevens, C.F. and Gage, F.H. (2002) Neural stem cells from adult hippocampus develop essential properties of functional CNS neurons. *Nature Neurosci.*, 5, 438-445.
- Wexler, E. and Palmer, T. (2002) Where, oh where, have my stem cells gone? *Trends In Neurosci.*, 25, 225-227.
- Wislet-Gendebien, S., Leprince, P., Moonen, G. and Rogister, B Regulation of nestin expression by cultivated bone marrow mesenchymal stem cells. *Cellular and Molecular Neuroscience*, (soumis).
- Yarden Y, Sliwkowski MX (2001) Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 127-137.