

Etat d'Avancement des Travaux

Durée du Projet : 3 ans

Début du financement du Projet : Septembre 2005

Etat d'avancement des travaux : Février 2008

Fin du projet : Décembre 2008

Nom des Demandeurs

Patrick DECHERCHI

François FERON

Discipline

Neurosciences (Neurobiologie-Neurophysiologie)

Titre du projet : Récupération de la locomotion et de la sensori-motricité après lésion du système nerveux central et greffe de cellules engainantes olfactives, associée à l'administration d'un immunomodulateur (FK506) et à la pratique d'exercices sur ergomètre.

Equipe : Patrick DECHERCHI (MCU-HDR)
François FERON (PU)
Tanguy MARQUESTE (MCU)
Olivier ALLUIN (Post-Doctorant)
John Ivan BIANCO (Post-Doctorant) - du 01-11-05 au 31-07-07
Pascal ZENATTI (Technicien)
Sabine JUSTAL (Doctorante)

EXPOSE DU PROJET DE RECHERCHE

Récupération de la locomotion et de la sensori-motricité après lésion du système nerveux central et greffe de cellules engainantes olfactives, associée à l'administration d'un immunomodulateur (FK506) et à la pratique d'exercices sur ergomètre.

La régénération axonale de voies nerveuses centrales et périphériques par des greffes de cellules « engainantes » du système olfactif (CEO), associées ou non à l'administration d'un immunomodulateur et à la pratique d'exercices musculaires, sera étudiée dans le cadre d'une collaboration entre l'équipe du Dr Patrick DECHERCHI (« *Déterminants Physiologiques de l'Activité Physique* », UPRES EA3285, Université de la Méditerranée (Aix-Marseille II)) et l'équipe du Pr François FERON (« *Neurobiologie des Interactions Cellulaires et Neuropathologie* » - CNRS UMR 6184, Faculté de Médecine, Université de la Méditerranée (Aix-Marseille II)). Ces deux équipes de recherches possèdent le *savoir faire* pour i) prélever, cultiver et purifier les cellules engainantes olfactives (CEO), qu'elles soient d'origine périphérique ou centrale ; ii) quantifier une récupération fonctionnelle de la locomotion ; iii) réaliser des études électrophysiologiques pour évaluer la régénération axonale ; iv) pratiquer une étude immuno-histologique approfondie.

Ce projet de recherche associe des approches cellulaires et globales. Jusqu'à présent, la majorité des études se sont attachées à étudier isolément un seul facteur. Nous nous proposons d'adopter une démarche multifactorielle et séquentielle. Nous souhaitons étaler dans le temps trois interventions ayant pour objectifs respectifs l'inhibition des dégâts causés par la réaction inflammatoire, l'induction de la repousse axonale et le maintien en activité des afférences et des efférences nerveuses. Nous sommes en effet persuadés, à l'image de ce qui se fait pour les attaques cardiaques, que les traumatisés médullaires devront à l'avenir recevoir dès les premières heures un traitement approprié et ensuite poursuivre leur réhabilitation grâce à des interventions complémentaires, notamment la thérapie cellulaire et la kinésithérapie.

Ce projet de recherche est établi sur une durée de 3 ans. Il nécessite d'opérer 80 rats qui seront évalués pendant 20 semaines. Un suivi quotidien des rats est nécessaire, surtout pendant les trois semaines qui suivent la transsection spinale. En effet, suite au traumatisme, les rats sont incapables d'uriner et l'équipe doit se relayer pour vider leur vessie trois fois par jour, chaque jour de la semaine. La réussite du projet est en grande partie liée à l'embauche sur 3 ans d'un jeune chercheur post-doctorant, le Dr John BIANCO, qui est à la fois expert dans le modèle rat de paraplégie et la greffe de cellules olfactives nasales dans la moelle épinière.

A. Le contexte scientifique.

Les traumatismes de la moelle épinière chez l'homme ont longtemps été considérés comme inopérables. Toutefois, depuis plusieurs années, de nombreuses équipes à travers le monde ont décidé de prendre à bras le corps ce problème et ont mené des études précliniques sur des animaux, avec une attention toute particulière portée sur la thérapie cellulaire. Des essais cliniques chez l'homme sont déjà en cours. Parmi eux, citons l'essai de Phase II au cours duquel des macrophages activés sont injectés dans la moelle épinière, 14 jours après le traumatisme, afin de minimiser les dommages secondaires et d'améliorer la récupération fonctionnelle (www.spinalcordtrial.com). Cet essai fait suite à un essai de Phase I concernant 8 patients et dont les résultats n'ont pas encore été publiés. D'autre part, il a été procédé à une transplantation de moelle épinière fœtale dans le syrinx de deux patients sans qu'aucun effet négatif soit observé 18 mois après l'opération (Wirth et al., 2001).

De notre côté, suite à l'accumulation des travaux sur le potentiel thérapeutique des cellules engainantes, y compris nos propres travaux (Lu et al., 2001; Lu et al., 2002; Li et al., 2003a), nous avons mis en place un essai clinique de phase I basé sur la greffe autologue de cellules engainantes chez trois patients paraplégiques. La sélection des patients s'est faite sur trois critères : une lésion complète de la moelle épinière, un traumatisme au niveau du thorax médian afin de réduire d'éventuels risques de tétraplégie consécutifs à l'intervention et enfin des patients capables de supporter le stress et l'espoir parfois déçu que font naître de tels essais. Cet essai contrôlé est mené en simple aveugle. Un article faisant le point sur cet essai, un an après la greffe, est actuellement soumis pour publication. Les résultats définitifs seront connus dans deux ans.

Nous envisageons d'ores et déjà de mettre en place un essai Phase II. Selon toute vraisemblance, celui-ci sera multicentrique, avec des greffes qui auront lieu en Australie mais également en Europe, notamment à Marseille et à Caen. En attendant, nous devons continuer à obtenir le plus d'informations à partir de modèles animaux.

Les cellules engainantes sont des cellules gliales spécialisées qui engainent les axones des neurones olfactifs sensoriels (Doucette, 1993). Tout comme les cellules de Schwann, les cellules engainantes ont la propriété de favoriser la croissance axonale. Autre avantage qui, cette fois, les différencie des cellules de Schwann, elles vivent et s'associent avec la glie du système nerveux central (SNC), à savoir les astrocytes et les oligodendrocytes (Gudino-Cabrera et al., 2000). Ces caractéristiques exceptionnelles ont conduit de nombreux chercheurs à les utiliser dans des modèles précliniques de transplantation après contusion, transsection ou hémisection de la moelle. Depuis les premières expériences de rhizotomie

dorsale, qui ont eu lieu il y a environ 10 ans, plus de 50 études ont été publiées (Ramon-Cueto and Nieto-Sampedro, 1994; Franklin et al., 1996; Smale et al., 1996; Li et al., 1997). Fait particulièrement remarquable, il a été montré que les cellules engainantes olfactives qui ne myélinisent pas les axones olfactifs (ceux ci ont un diamètre trop petit) ont la capacité d'entourer de gaines de myéline les axones en régénération lorsqu'elles sont greffées dans des moelles épinières traumatisées, que ce soit après une lésion du tractus corticospinal (Li et al., 1998b) ou dans des modèles excito-toxiques de démyélinisation (Franklin et al., 1996; Imaizumi et al., 1998; Kato et al., 2000; Kocsis et al., 2004).

Cette régénération est associée à une amélioration de la fonction locomotrice (Cheng et al., 1997; Li et al., 1997, 1998a; Xu et al., 1999; Ramon-Cueto, 2000; Ramon-Cueto et al., 2000) et respiratoire (Li et al., 2003a). Le potentiel thérapeutique supérieur des cellules gliales olfactives par rapport à celui des cellules de Schwann a ainsi été démontré puisque le nombre d'axones traversant le site de lésion est considérablement augmenté lorsque les cellules engainantes sont placées à l'interface d'un tube rempli de cellules de Schwann et de la moelle épinière endommagée (Ramon-Cueto et al., 1998).

Dans chaque situation où la thérapie cellulaire est envisagée, de nombreuses expérimentations fondamentales doivent être réalisées avant que des essais cliniques puissent être entrepris. Un des problèmes fondamentaux est de savoir si les cellules peuvent être obtenues à partir des patients eux-mêmes, ce qui éviterait l'utilisation de traitement immunosuppresseur. Avec les cellules de Schwann, ce problème peut être facilement résolu puisqu'il est possible d'obtenir de grandes quantités de cellules de Schwann humaines à partir de petites quantités de cellules prélevées. Désormais, ceci est également possible avec les CEO (Bianco et al., 2004) sans perte de fonction, ni de prolifération incontrôlée. C'est donc une avancée considérable pour les cliniciens qui considèrent les CEO comme le type cellulaire le plus prometteur pour améliorer la régénération des fibres nerveuses après lésion du système nerveux.

Il est toutefois illusoire de croire que des greffes de cellules engainantes suffiront à rétablir toutes les connexions nerveuses chez des patients paraplégiques ou tétraplégiques. D'autres interventions seront nécessaires, au rang desquels nous comptons un traitement immuno-modulateur et des exercices musculaires (particulièrement le maintien en activité des muscles paralysés à la suite de la lésion spinale).

Le traumatisme médullaire induit i) une inflammation qui va conduire à la formation d'une cicatrice gliale dommageable à la repousse axonale et ii) une dégénérescence axonale rapide. Il est donc important de trouver des molécules qui ont la capacité de réduire à la fois

l'inflammation et la dégénérescence. Parmi les candidats les plus prometteurs, se trouvent des neuroimmunophilines telles que la cyclosporine et le FK506 (ou Tacrolimus), deux médicaments déjà utilisés chez l'humain comme immunosuppresseurs (Gold, 2000). Il a été démontré que ces deux molécules ont une action neuroprotectrice mais que seul FK506 aide à la régénération axonale (Madsen et al., 1998; Bavetta et al., 1999; Wang and Gold, 1999; Iwasaki et al., 2002; Nottingham et al., 2002; Lang-Lazdunski, 2004). Nous nous proposons d'administrer FK506 par voie systémique (cette molécule passe sans problème la barrière hémato-encéphalique) chez les animaux paraplégiques, dès le lendemain du traumatisme et jusqu'à la greffe de cellules engainantes.

Par ailleurs, il a été observé, à la fois chez l'animal et chez l'homme, que la pratique d'exercices quotidiens sur tapis roulant avait un effet bénéfique sur la récupération de la locomotion (Wernig et al., 1998; Lankhorst et al., 2001; Thota et al., 2001; Moshonkina et al., 2002). Afin de compléter notre approche multifactorielle et séquentielle dans la réhabilitation des rats paraplégiques, nous envisageons d'inclure une séance quotidienne d'entraînement actif afin de maintenir la masse musculaire mais également de favoriser la régénération des fibres motrices et sensibles.

B. Le projet de recherche.

Dans la continuité des travaux que nous avons précédemment réalisés, nous transplanterons les cellules engainantes olfactives issues de la muqueuse nasale au niveau thoracique T10, après transsection de la moelle épinière. Afin de nous rapprocher des conditions cliniques, nous utiliserons comme précédemment (Lu et al., 2002) un modèle de lésion chronique. Autrement dit, la greffe sera différée et se fera un mois après le traumatisme.

Notre étude comportera huit groupes de 10 rats. Comme cela est indiqué dans le tableau ci-dessous, nous pourrions comparer individuellement chacun des traitements mais également leur association, deux par deux ou encore lorsque les trois sont associés de manière séquentielle. L'animal sera entraîné sur l'ergomètre avant le traumatisme et poursuivra cet exercice après la transsection. L'administration de FK506 se fera dès le lendemain du traumatisme et se poursuivra jusqu'à la greffe. La greffe se fera avec des cellules cultivées et préalablement transfectées avec une protéine fluorescente (GFP) afin de pouvoir distinguer *post mortem* les cellules exogènes des cellules endogènes.

Groupes	Exercice	Immunosuppresseur	COE
1) Contrôle	non	non	non
2) Exercice	oui	non	non
3) FK506	non	oui	non
4) COE	non	non	oui
5) Exercice + FK506 + COE	oui	oui	oui

Récupération comportementale

La récupération de la fonction locomotrice chez les animaux dont la moelle épinière a été lésée sera analysée au moyen de l'échelle BBB dans des conditions de champ ouvert et lors de l'escalade d'une grille inclinée à 45 degrés. Ces observations seront réalisées en aveugle, une fois par semaine pendant 15 semaines, par deux observateurs indépendants. Par ailleurs, nous visualiserons et enregistrerons avec un équipement vidéo les mouvements des pattes postérieures des animaux placés dans un « couloir » rempli d'eau (couloir de nage). Nous pourrions ainsi mesurer la récupération de la locomotion sans interférence avec les mouvements réflexes induits par la marche sur un solide.

Récupération fonctionnelle

Il s'agira d'analyser l'efficacité des CEO sur la restauration de la boucle sensori-motrice et donc de valider cette stratégie de réparation du SNC. Quatre mois après la première intervention chirurgicale, l'électrophysiologie permettra d'étudier la restauration de la métabosensibilité, de la proprioception et des efférences motrices.

Les réflexes spinaux seront étudiés dans des conditions de repos et suite à une stimulation électrique itérative fatigante du muscle et des injections dans l'environnement de substances (KCl, lactate, bradykinine,) connues pour augmenter la décharge des métaborécepteurs. La mise en jeu des fuseaux neuromusculaires et des organes tendineux de Golgi par des vibrations appliquées au muscle, nous permettra d'évaluer le fonctionnement de la boucle sensori-motrice. L'influence des centres corticaux sur ces réflexes spinaux sera également explorée par des stimulations électriques corticales. Cette étude sera réalisée à l'aide d'électrodes d'enregistrement placées sur les racines rachidiennes dorsales et ventrales innervant le muscle étudié et par des enregistrements intraspinaux permettant de mesurer le niveau d'excitabilité des motoneurones et des interneurones de la boucle sensori-motrice. Les caractéristiques contractiles seront analysées simultanément. Des enregistrements seront

également réalisés au niveau des nerfs et des structures respiratoires et cardiovasculaires. Ainsi, nous pourrions étudier la restauration fonctionnelle de la boucle sensori-motrice et des ajustements respiratoires et cardiovasculaires induits par la mise en jeu de la sensibilité métaboceptive qui avait été altérée par la lésion spinale.

Voies nerveuses régénérant

Cette étude sera complétée par un marquage antérograde trans-synaptique des voies nerveuses à partir de l'injection d'un traceur dans le muscle étudié. Ainsi, nous pourrions avoir des informations plus précises sur les éventuelles restaurations fonctionnelles, c'est-à-dire si elles résultent de la régénération axonale de neurones axotomisés et de reconnections avec les neurones d'origine ou s'il s'agit de la mise en jeu de voies parallèles épargnées par la lésion ou d'un remodelage fonctionnel des circuits neuronaux. L'utilisation de marqueurs fins nous permettra d'obtenir des informations sur les zones de projection centrale de ces afférences. Enfin, l'étude du phénotype et des activités enzymatiques (LDH et CS) des fibres musculaires nous donnera des informations sur le degré de réinnervation motrice et les adaptations musculaires suite à la lésion spinale.

Analyse histologique

Suite à l'étude électrophysiologique, les animaux seront perfusés et les moelles épinières collectées pour être étudiées sur le plan histologique. Nous utiliserons les marquages immuno-histochimiques classiques ainsi que la technique de microscopie électronique pour quantifier i) la repousse des fibres sérotoninergiques dans la zone de lésion de la moelle épinière ; ii) la myélinisation des axones ayant régénéré ; iii) les interactions entre cellules engainantes et axones.

Références bibliographiques

- Bavetta S, Hamlyn PJ, Burnstock G, Lieberman AR, Anderson PN (1999) The effects of FK506 on dorsal column axons following spinal cord injury in adult rats: neuroprotection and local regeneration. *Exp Neurol* 158:382-393.
- Bianco JI, Perry C, Harkin DG, Mackay-Sim A, Feron F (2004) Neurotrophin 3 promotes purification and proliferation of olfactory ensheathing cells from human nose. *Glia* 45:111-123.
- Cheng HW, Rafols JA, Goshgarian HG, Anavi Y, Tong J, McNeill TH (1997) Differential spine loss and regrowth of striatal neurons following multiple forms of deafferentation: a Golgi study. *Exp Neurol* 147:287-298.
- Doucette R (1993) Glial Cells in the Nerve Fiber Layer of the Main Olfactory Bulb of Embryonic and Adult Mammals. *Microscopy Research and Technique* 24:113-130.
- Franklin RJ, Gilson JM, Franceschini IA, Barnett SC (1996) Schwann cell-like myelination following transplantation of an olfactory bulb-ensheathing cell line into areas of demyelination in the adult CNS. *Glia* 17:217-224.

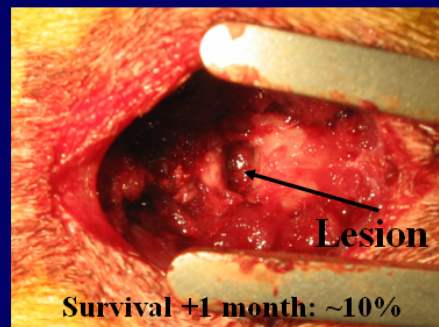
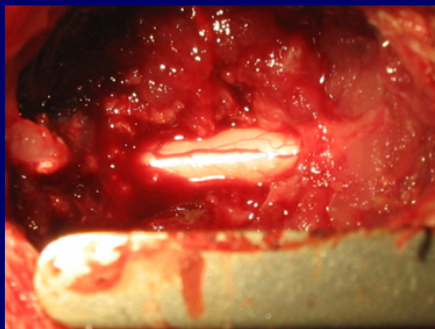
- Gold BG (2000) Neuroimmunophilin ligands: evaluation of their therapeutic potential for the treatment of neurological disorders. *Expert Opin Investig Drugs* 9:2331-2342.
- Gudino-Cabrera G, Pastor AM, de la Cruz RR, Delgado-Garcia JM, Nieto-Sampedro M (2000) Limits to the capacity of transplants of olfactory glia to promote axonal regrowth in the CNS. *Neuroreport* 11:467-471.
- Imaizumi T, Lankford KL, Waxman SG, Greer CA, Kocsis JD (1998) Transplanted olfactory ensheathing cells remyelinate and enhance axonal conduction in the demyelinated dorsal columns of the rat spinal cord. *J Neurosci* 18:6176-6185.
- Iwasaki Y, Ichikawa Y, Igarashi O, Iwamoto K, Kinoshita M, Ikeda K (2002) Neuroprotective actions of FK506 and cyclosporin A on motor neuron survival following neonatal axotomy. *Neurol Res* 24:573-576.
- Kato T, Honmou O, Uede T, Hashi K, Kocsis JD (2000) Transplantation of human olfactory ensheathing cells elicits remyelination of demyelinated rat spinal cord. *Glia* 30:209-218.
- Kocsis JD, Akiyama Y, Radtke C (2004) Neural precursors as a cell source to repair the demyelinated spinal cord. *J Neurotrauma* 21:441-449.
- Lang-Lazdunski L (2004) About the neuroprotective effects of FK-506, l-carnitine and azathioprine on spinal cord ischemia-reperfusion injury. *Eur J Cardiothorac Surg* 25:1129-1130.
- Lankhorst AJ, ter Laak MP, van Laar TJ, van Meeteren NL, de Groot JC, Schrama LH, Hamers FP, Gispen WH (2001) Effects of enriched housing on functional recovery after spinal cord contusive injury in the adult rat. *J Neurotrauma* 18:203-215.
- Li Y, Field PM, Raisman G (1997) Repair of adult rat corticospinal tract by transplants of olfactory ensheathing cells. *Science* 277:2000-2002.
- Li Y, Field PM, Raisman G (1998a) Regeneration of adult rat corticospinal axons induced by transplanted olfactory ensheathing cells. *J Neurosci* 18:10514-10524.
- Li Y, Field PM, Raisman G (1998b) Regeneration of adult rat corticospinal axons induced by transplanted olfactory ensheathing cells. *J Neurosci* 18:10514-10524.
- Li Y, Decherchi P, Raisman G (2003a) Transplantation of olfactory ensheathing cells into spinal cord lesions restores breathing and climbing. *J Neurosci* 23:727-731.
- Li Y, Sauve Y, Li D, Lund RD, Raisman G (2003b) Transplanted olfactory ensheathing cells promote regeneration of cut adult rat optic nerve axons. *J Neurosci* 23:7783-7788.
- Lu J, Feron F, Mackay-Sim A, Waite PM (2002) Olfactory ensheathing cells promote locomotor recovery after delayed transplantation into transected spinal cord. *Brain* 125:14-21.
- Lu J, Feron F, Ho SM, Mackay-Sim A, Waite PM (2001) Transplantation of nasal olfactory tissue promotes partial recovery in paraplegic adult rats. *Brain Res* 889:344-357.
- Madsen JR, MacDonald P, Irwin N, Goldberg DE, Yao GL, Meiri KF, Rimm IJ, Stieg PE, Benowitz LI (1998) Tacrolimus (FK506) increases neuronal expression of GAP-43 and improves functional recovery after spinal cord injury in rats. *Exp Neurol* 154:673-683.
- Moshonkina T, Avelev V, Gerasimenko Y, Mathur R, Bijlani RL (2002) Treadmill training accelerates restoration of locomotion after complete spinal cord transection in the rat. *Indian J Physiol Pharmacol* 46:499-503.
- Nottingham S, Knapp P, Springer J (2002) FK506 treatment inhibits caspase-3 activation and promotes oligodendroglial survival following traumatic spinal cord injury. *Exp Neurol* 177:242-251.
- Ramon-Cueto A (2000) Olfactory ensheathing glia transplantation into the injured spinal cord. *Prog Brain Res* 128:265-272.
- Ramon-Cueto A, Nieto-Sampedro M (1994) Regeneration into the spinal cord of transected dorsal root axons is promoted by ensheathing glia transplants. *Exp Neurol* 127:232-244.
- Ramon-Cueto A, Plant GW, Avila J, Bunge MB (1998) Long-distance axonal regeneration in the transected adult rat spinal cord is promoted by olfactory ensheathing glia transplants. *J Neurosci* 18:3803-3815.
- Ramon-Cueto A, Cordero MI, Santos-Benito FF, Avila J (2000) Functional recovery of paraplegic rats and motor axon regeneration in their spinal cords by olfactory ensheathing glia. *Neuron* 25:425-435.
- Smale KA, Doucette R, Kawaja MD (1996) Implantation of olfactory ensheathing cells in the adult rat brain following fimbria-fornix transection. *Exp Neurol* 137:225-233.
- Thota A, Carlson S, Jung R (2001) Recovery of locomotor function after treadmill training of incomplete spinal cord injured rats. *Biomed Sci Instrum* 37:63-67.
- Wang MS, Gold BG (1999) FK506 increases the regeneration of spinal cord axons in a predegenerated peripheral nerve autograft. *J Spinal Cord Med* 22:287-296.
- Wernig A, Nanassy A, Muller S (1998) Maintenance of locomotor abilities following Laufband (treadmill) therapy in para- and tetraplegic persons: follow-up studies. *Spinal Cord* 36:744-749.
- Wirth ED, 3rd, Reier PJ, Fessler RG, Thompson FJ, Uthman B, Behrman A, Beard J, Vierck CJ, Anderson DK (2001) Feasibility and safety of neural tissue transplantation in patients with syringomyelia. *J Neurotrauma* 18:911-929.
- Xu XM, Zhang SX, Li H, Aebischer P, Bunge MB (1999) Regrowth of axons into the distal spinal cord through a Schwann-cell-seeded mini-channel implanted into hemisectioned adult rat spinal cord. *Eur J Neurosci* 11:1723-1740.

AVANCEMENT DES TRAVAUX (janvier 2007)

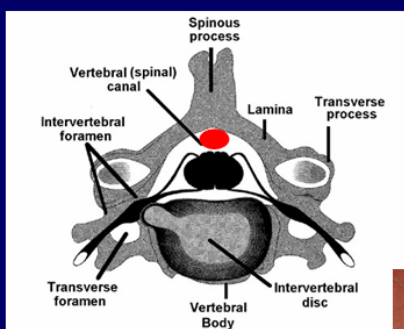
La première partie de notre étude a consisté à mettre au point un modèle de lésion spinale entraînant une paralysie totale et durable des membres inférieurs. Ainsi, nous avons réalisé chez 60 rats, une transection de la moelle épinière en T12. Malgré, tous les soins apportés aux animaux spinalisés, de nombreux animaux sont morts suite à des infections récidivantes ou à des causes inconnues. Nous avons donc changé de modèle de lésion spinale et après une phase de mise au point, nous avons réalisé une nouvelle série expérimentale de 30 rats.

Ces lésions spinales consistent à introduire un cathéter en position sous durale dont l'extrémité est munie d'un ballonnet. La pression exercée à l'extrémité du cathéter (gonflement du ballonnet) a permis de réaliser des compressions médullaires entraînant une paralysie totale des membres inférieurs.

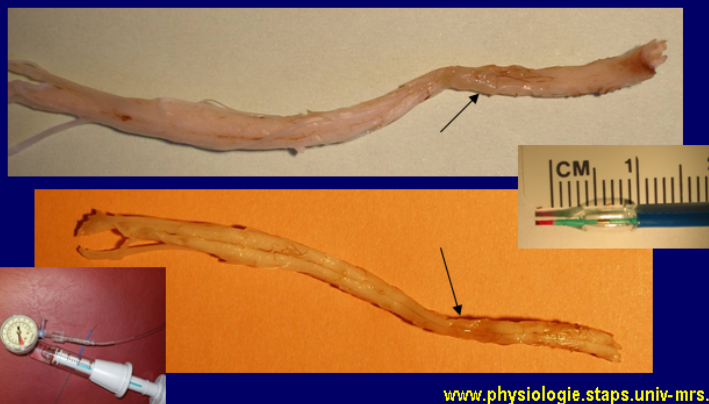
Complete Thoracic Section (T12)



Thoracic Compression (T12)



**A balloon is inflated
(5 ATM)**

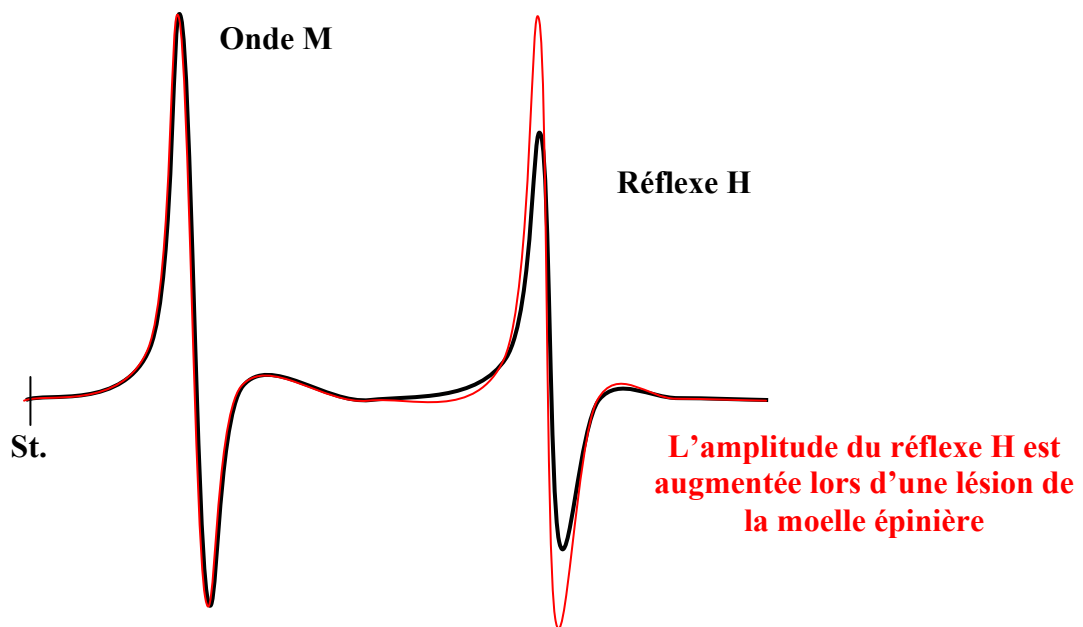


www.physiologie.staps.univ-mrs.fr

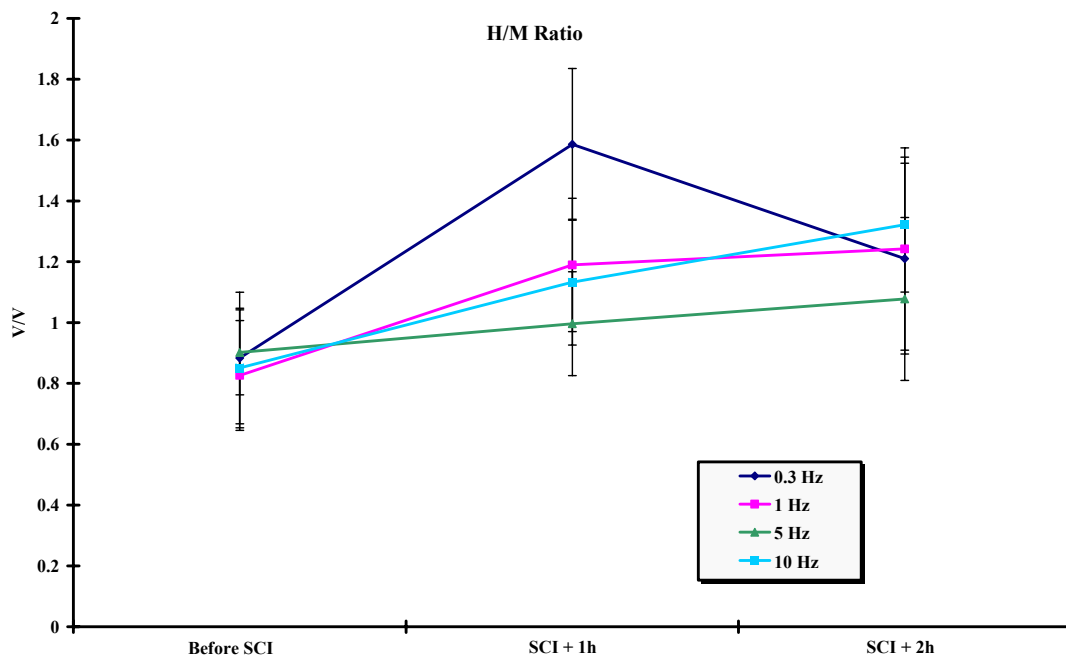
Afin de valider notre modèle de lésion spinale, nous avons étudié, dans un premier temps, chez ces rats, la réflexologie spinale. Nous avons ainsi enregistré le réflexe H maximal et l'onde M qui lui est associée.

L'onde M est l'onde de dépolarisation musculaire qui précède la contraction. Son étude permet de déterminer les propriétés contractiles d'un groupe musculaire ou d'un système musculaire in situ en provoquant une contraction après stimulation électrique du nerf ou du point moteur. Cette stimulation électrique brève (0,1 ms) synchronise l'activation d'un ensemble d'unités motrices (UM : motoneurones spinaux et fibres musculaires qui leurs sont associés) en dépolarisant simultanément leurs sarcolemmes (membrane de la fibre musculaire). La réponse groupée (onde M) de ces UM permet de juger de leurs propriétés de conduction au cours de la contraction. L'analyse de l'onde M renseigne principalement sur les caractéristiques de la réponse électrique au niveau des membranes musculaires puisque les centres nerveux supérieurs ne sont pas sollicités. Si cette stimulation est appliquée sur le trajet du nerf moteur, elle permet d'évaluer l'efficacité et la qualité de la jonction neuromusculaire (synapse) mais également des sarcolemmes (Merton, 1954).

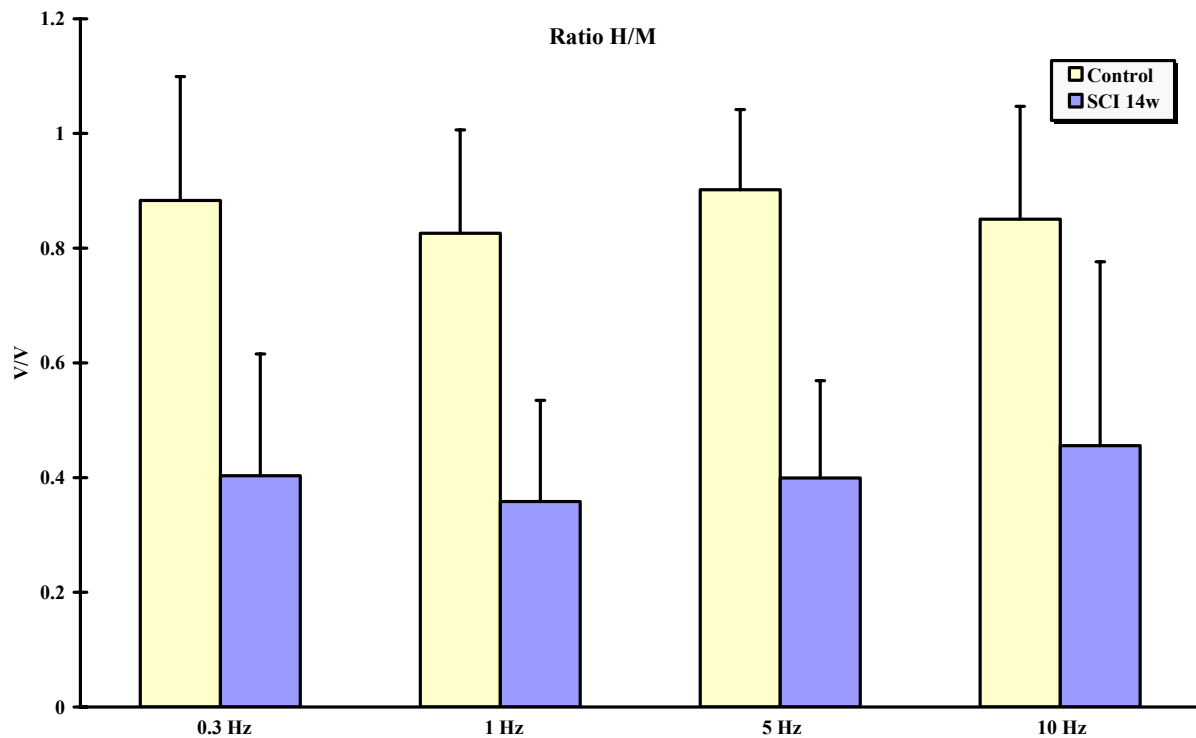
Le réflexe H (réflexe de Hoffmann) est obtenu par stimulation électrique d'un nerf. La stimulation des fibres sensorielles qui proviennent des fuseaux neuro-musculaires du muscle active directement les motoneurones spinaux qui commandent le même muscle. Cette réponse résulte donc de l'activation du circuit spinal monosynaptique du réflexe d'étirement. Le réflexe H est un indicateur direct de l'état d'excitabilité du système de commande du muscle, il permet donc l'étude de la réactivité spinale et donc du système nerveux central. L'étude des réflexes monosynaptiques a permis d'élucider certaines opérations de traitement de l'information sensori-motrice. Des influences centrales inhibitrices s'exercent par l'intermédiaire d'interneurones spinaux inhibiteurs qui projettent sur les axones des fibres sensorielles fusoriales Ia. On qualifie donc ce contrôle d'inhibition par les centres supérieurs. Lors d'une lésion de la moelle épinière, cette inhibition est levée et l'amplitude du réflexe H est augmentée.



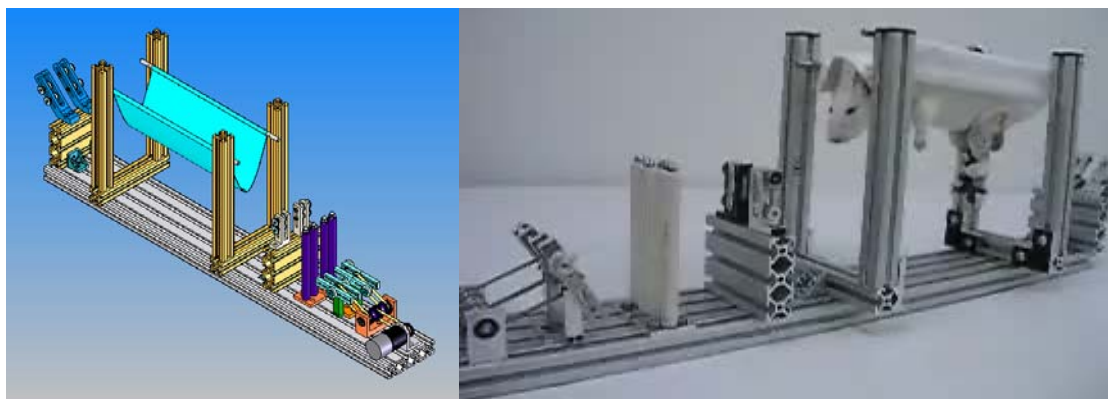
Les résultats que nous avons obtenus nous ont permis de montrer que le ratio onde H/M évoluait au cours des deux premières heures suivant la lésion spinale indiquant une levée de l'inhibition descendante des centres supérieurs sur les motoneurones spinaux.



Cependant, quatorze semaines après la compression spinale, nous observons un ratio diminué chez les animaux contrôles par rapport aux animaux contrôles indiquant de profonds changement de l'excitabilité des motoneurones spinaux.

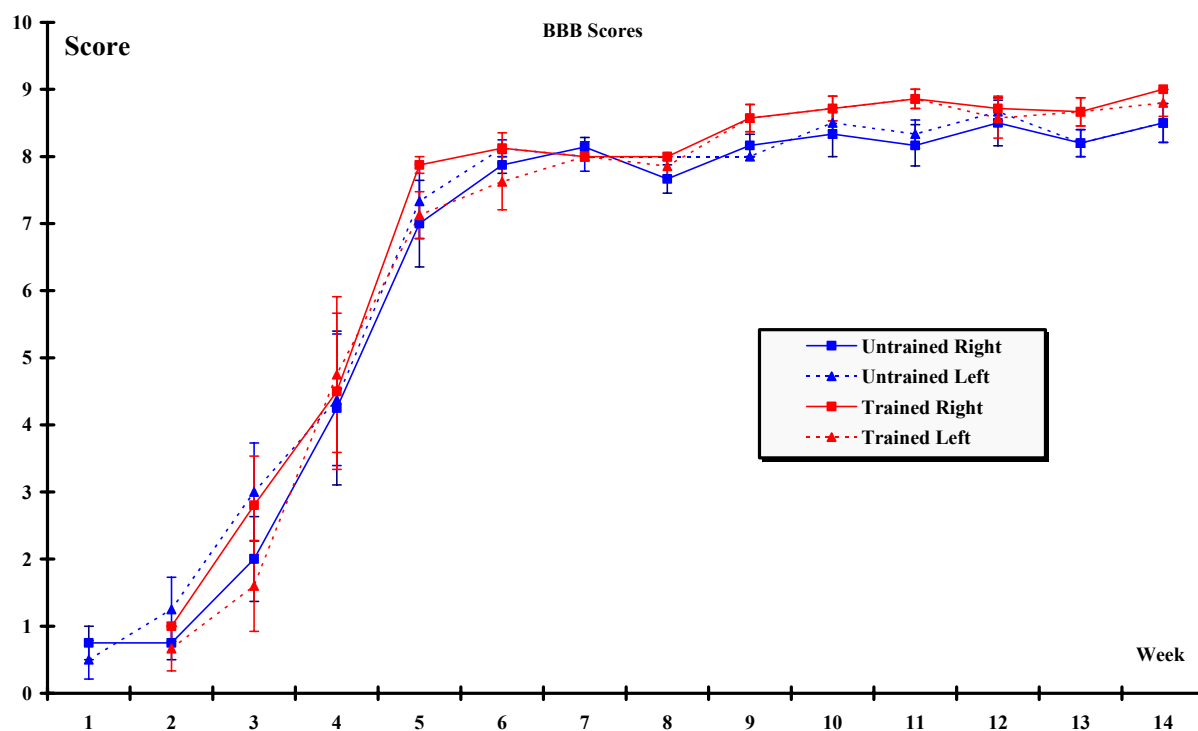


Notre étude prévoyait d'étudier les effets de l'exercice sur les récupérations sensori-motrices. Ainsi, nous avons mis au point un ergomètre spécialement destiné à entraîner les rats ayant eu une lésion de la moelle épinière.

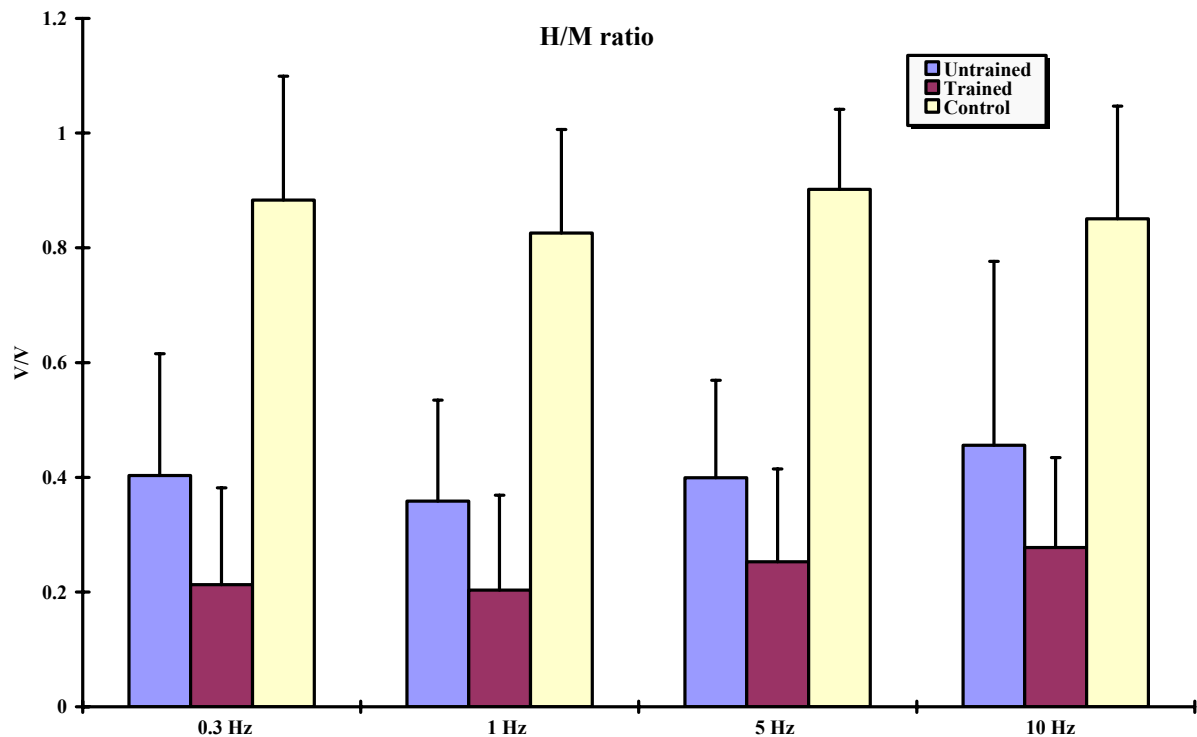


Nous avons donc entraîné quotidiennement un groupe d'animaux paralysés pendant 14 semaines. Ces animaux étaient comparés à un groupe contrôle qui avaient une compression de la moelle épinière mais qui ne suivaient pas l'entraînement. Parallèlement à cet entraînement, nous avons suivi les récupérations comportementales post-lésionnelles en utilisant le BBB score (Basso, Beattie, Bresnahan). A l'issu de ces 14 semaines, une étude électrophysiologique a été réalisée chez ces animaux ainsi que chez les animaux non entraînés.

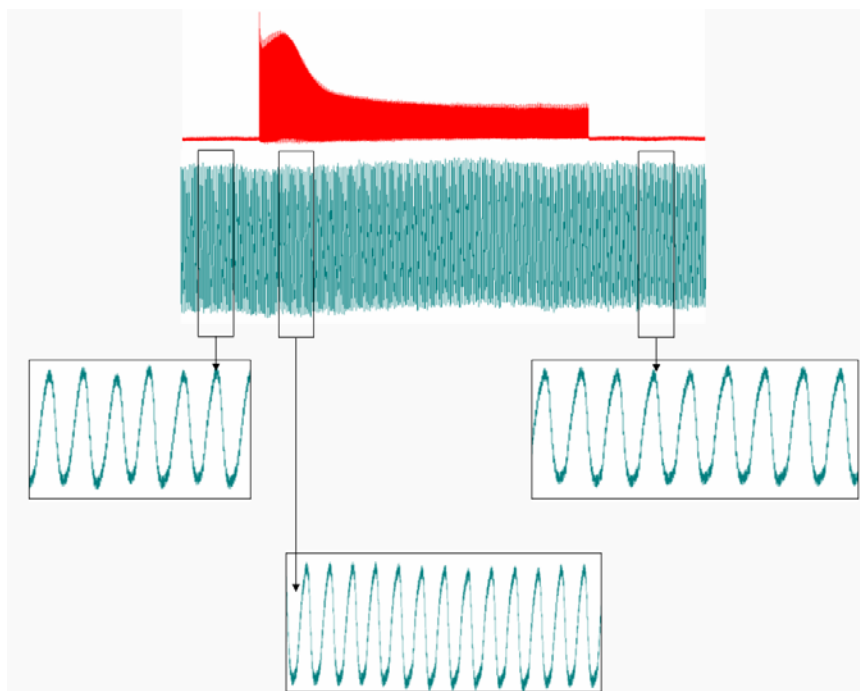
L'analyse des récupérations comportementales montre qu'il n'y a aucune différence entre les animaux entraînés et les animaux non entraînés. Tous les animaux présentèrent une légère amélioration comportementale bisymétrique avec atteinte du score de 7 (le score maximal étant 21).



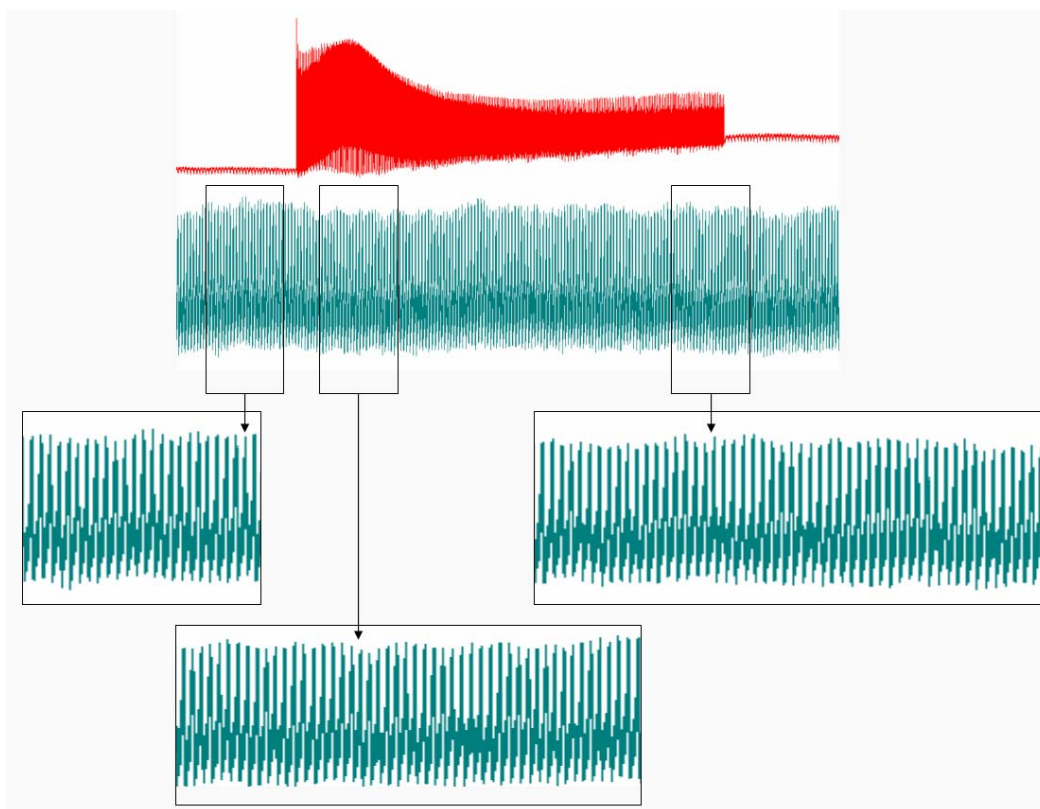
L'étude électrophysiologique des réflexes spinaux montra cependant une différence entre les animaux ayant subi un entraînement et ceux n'ayant pas été entraînés. Les animaux ayant été entraînés présentent un ration H/M très inférieur à celui des animaux contrôles et non entraînés témoignant ainsi de profondes modifications du réseau spinal chez les animaux entraînés. Nous procédons actuellement à de nouvelles expériences afin de déterminer la signification exacte de ces modifications.



Au cours de l'étude électrophysiologique nous avons également mesuré le réflexe ventilatoire mis en jeu par activation des muscles squelettiques. Chez les animaux contrôles, la fatigue induite d'un muscle des pattes postérieures entraîne une augmentation de l'activité ventilatoire (*voir photo ci-dessous*) et cardiovasculaire afin de répondre à la demande musculaire.



Chez les animaux ayant une lésion de la moelle épinière, la fatigue n'entraîne plus d'ajustement du rythme ventilatoire (*voir photo ci dessous*).



Au cours des prochains mois, nous devons poursuivre nos investigations afin de déterminer si l'action combiné de l'entraînement, la greffe de cellules olfactives engainantes et le traitement de FK506 entraîne des récupérations sensori-motrices significatives.

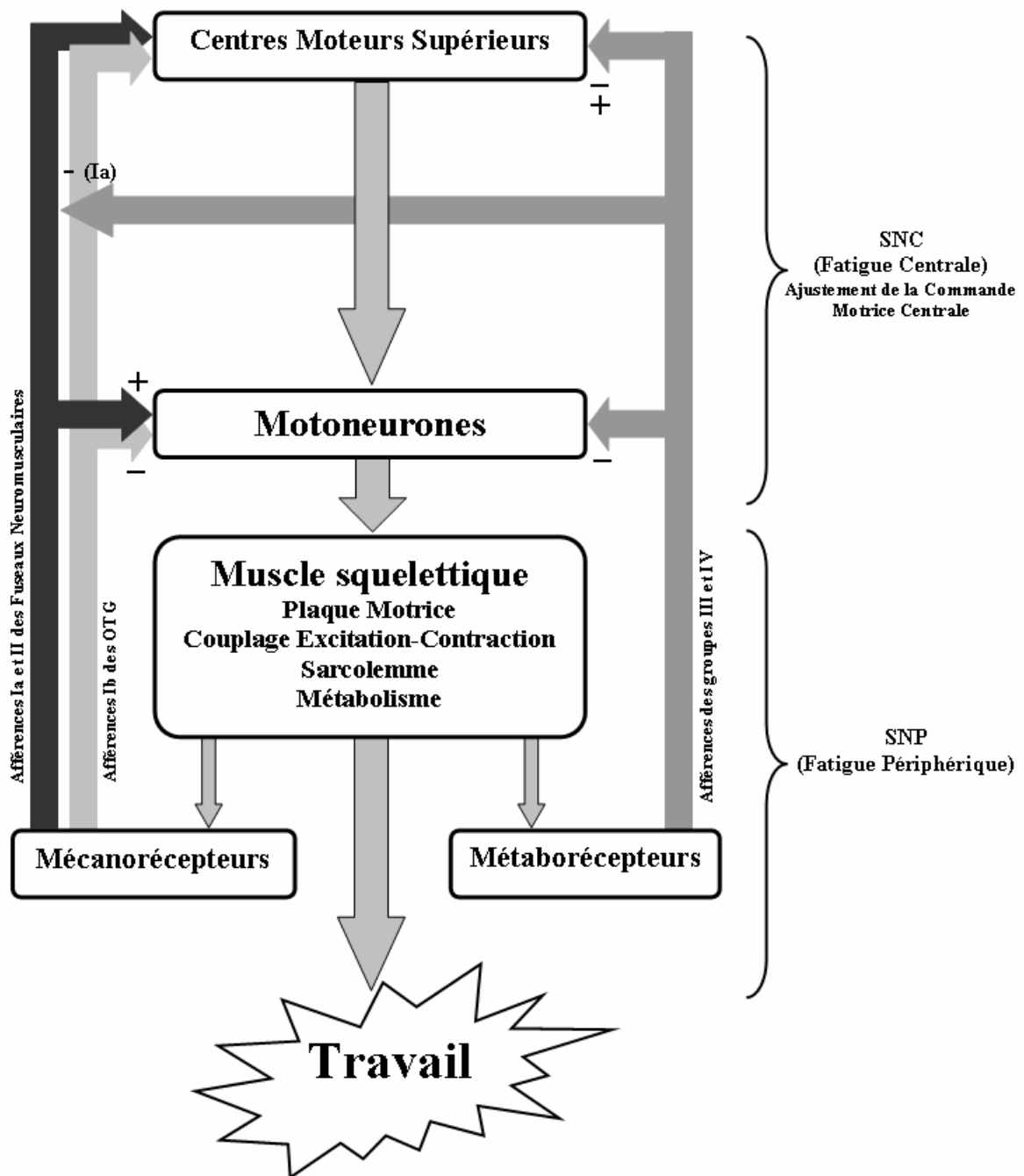
Un premier article concernant cette dernière partie vient d'être soumis à la revue scientifique internationale *Experimental Brain Research*.

AVANCEMENT DES TRAVAUX (février 2008)

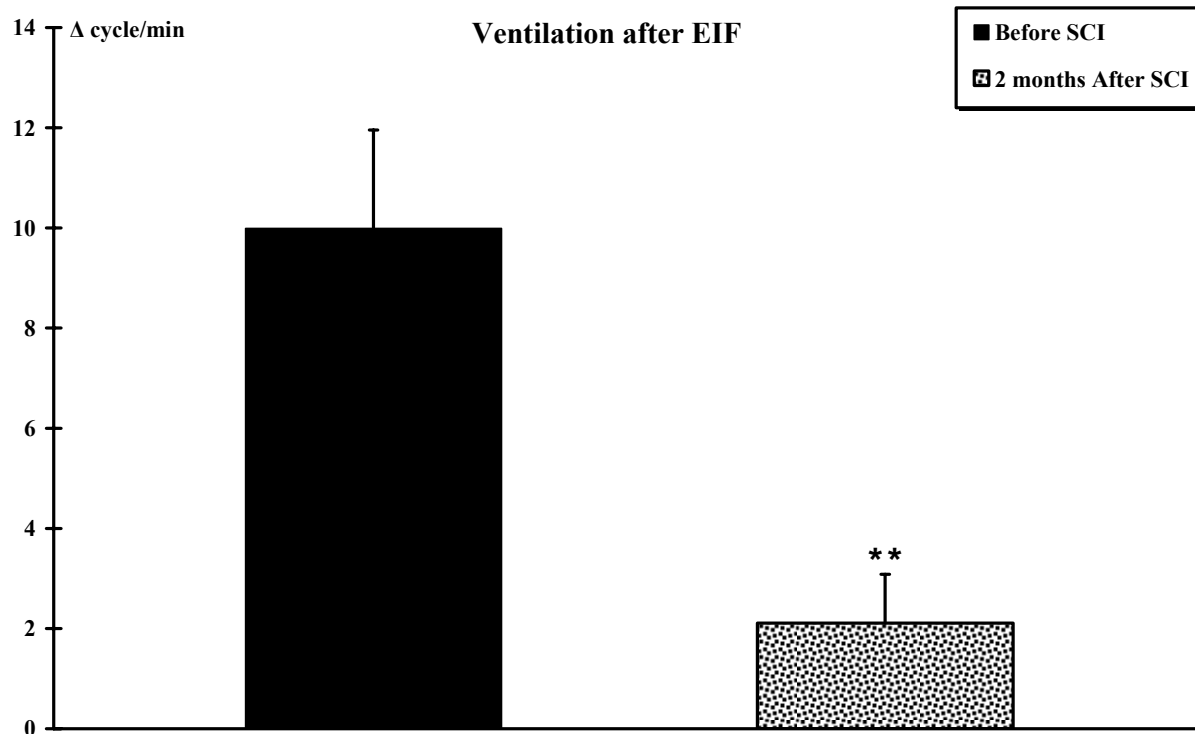
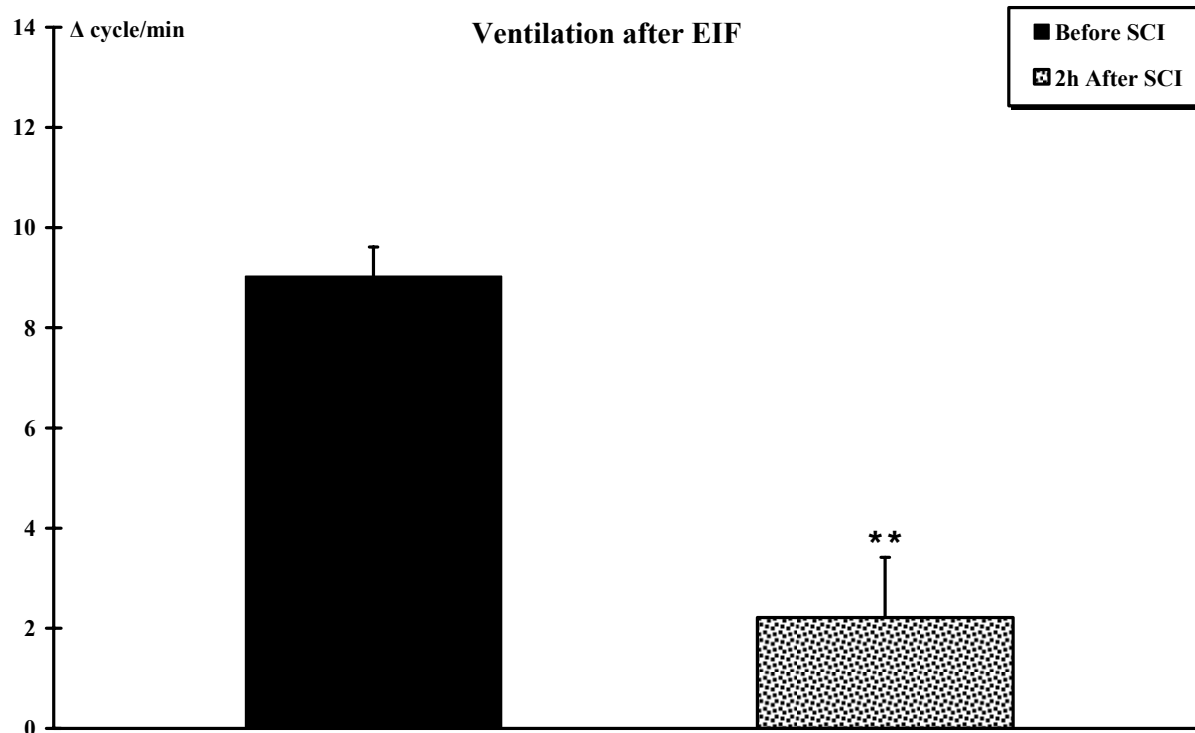
Avant propos

Depuis le 1^{er} janvier 2008, le laboratoire des « Déterminants Physiologiques de l'Activité Physique (UPRES EA3285) » auquel nous appartenions a disparu pour laisser place à l'Institut des Sciences du Mouvement (UMR CNRS 6233) de Marseille (également appelé : Institut Etienne-Jules MAREY - www.ism.univmed.fr). Cet institut résulte de la fusion de plusieurs laboratoires marseillais avec mise en commun des savoirs faire et des plateformes techniques qui appartenaient jadis aux différents laboratoires. Ce nouveau centre de recherche pluridisciplinaire, unique en France, regroupe des chercheurs de différentes disciplines : biologie, robotique, sociologie, psychologie, biomécanique, dont la thématique commune est l'étude du mouvement. Ainsi au sein de cette unité de recherche bi-labellisée CNRS et Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, je dirige une équipe intitulée « Plasticité des Systèmes Nerveux et Musculaire ». Cette équipe est composée de biologistes dont les préoccupations sont l'étude des stratégies de réparation du système nerveux et des mécanismes impliqués dans le retour du mouvement après une lésion traumatique du système nerveux.

L'année 2007 a été ponctuée par la publication de nos travaux concernant la mise au point de notre modèle expérimental (Decherchi *et al.*, Exp. Brain Research 2007, 183(3):299-312) dans laquelle nous décrivons la mise en jeu des voies de la metabosensibilité spinale. Nous rédigeons actuellement une autre publication concernant la mise au silence de ces voies de la sensibilité et les adaptations physiologiques (respiratoire et cardiovasculaire) après une lésion (compression) de la moelle épinière. En effet, suite à une lésion spinale, l'activation des muscles squelettiques n'entraîne plus des augmentations de la fréquence ventilatoire ; les voies de la sensibilité impliquées dans les adaptations physiologiques lors de la mise en activité de la musculature squelettique devenant silencieuses.



Ces dysfonctionnements présents dès la deuxième heure après la lésion sont toujours présents deux mois après.



Effet d'une stimulation musculaire répétitive fatigante sur la fonction ventilatoire immédiatement (*Before SCI*), 2 heures (*2h After SCI*) et 2 mois (*2 months After SCI*) après une compression de la moelle épinière.

Parallèlement, les analyses histologiques des moelles des animaux ayant été lésés et entraînés sur l'ergocyclomètre spécialement conçu sont en cours. Elles nous permettront de vérifier si la pratique d'exercices accroît le nombre d'axones néoformés et influe sur leur taille ainsi que leur myélinisation.

La Vitamine D

Nous avons consacré une partie de cette deuxième année à l'étude des propriétés neurotrophiques et immunomodulatrices de la vitamine D sur la récupération fonctionnelle et la repousse nerveuse dans le système nerveux périphérique et central.

L'utilisation de la vitamine D dans le cadre d'un éventuel essai clinique chez des blessés médullaires nécessite le passage obligatoire par une étude sur le système nerveux périphérique. C'est pour cette raison que nous avons étudié, dans un premier temps, la repousse des fibres nerveuses périphériques.

Les résultats de notre étude montre que 1) les animaux traités par la vitamine D ont un nombre accru d'axones dans la partie distale et la partie proximale du nerf lésé et greffé, 2) la vitamine D accroît i) la myélinisation des axones néo-formés et ii) entraîne des modifications des propriétés musculaires et améliore la réponse des afférences metabosensibles à des stimuli chimiques spécifiques.

Nous en avons conclu que cette molécule a un effet thérapeutique indéniable. Elle pourrait potentiellement être administrée à des patients ayant subi une lésion nerveuse. Les résultats de ces expériences sont présentés dans un article qui vient d'être récemment accepté pour publication à la revue scientifique internationale *Journal of Neurotrauma*.

Dear Prof. :

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "Vitamin D2 potentiates axon regeneration" in its current form for publication in Journal of Neurotrauma. The comments of the reviewer(s) who reviewed your manuscript are included at the foot of this letter.

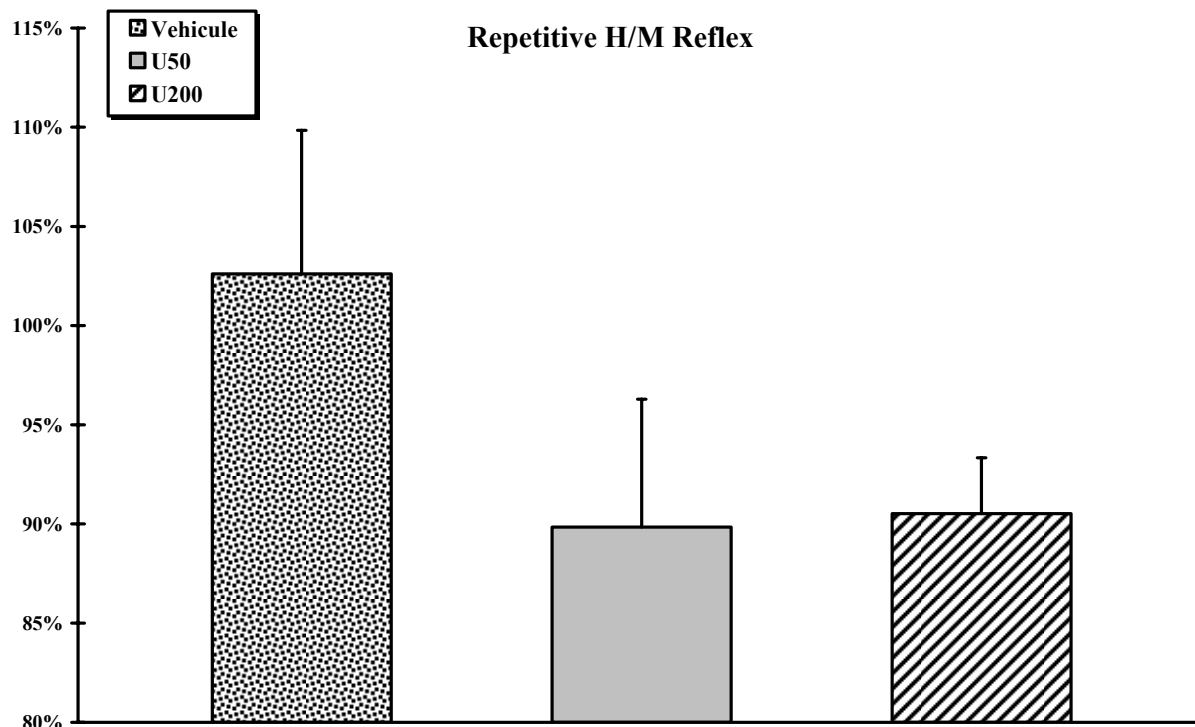
The Copyright Agreement form attached to this email should be sent to the publisher as soon as possible. Manuscripts cannot be published without this form. The corresponding author is responsible for obtaining signatures of coauthors. Authors not permitted to release copyright must still return the form signed under the statement of the reason for not releasing the copyright. Please fax the Copyright Agreement form to 914-740-2101.

Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of Journal of Neurotrauma, we look forward to your continued contributions to the Journal.

*Sincerely,
Dr. John Povlishock
Editor-in-Chief, Journal of Neurotrauma
jtpovlis@vcu.edu*

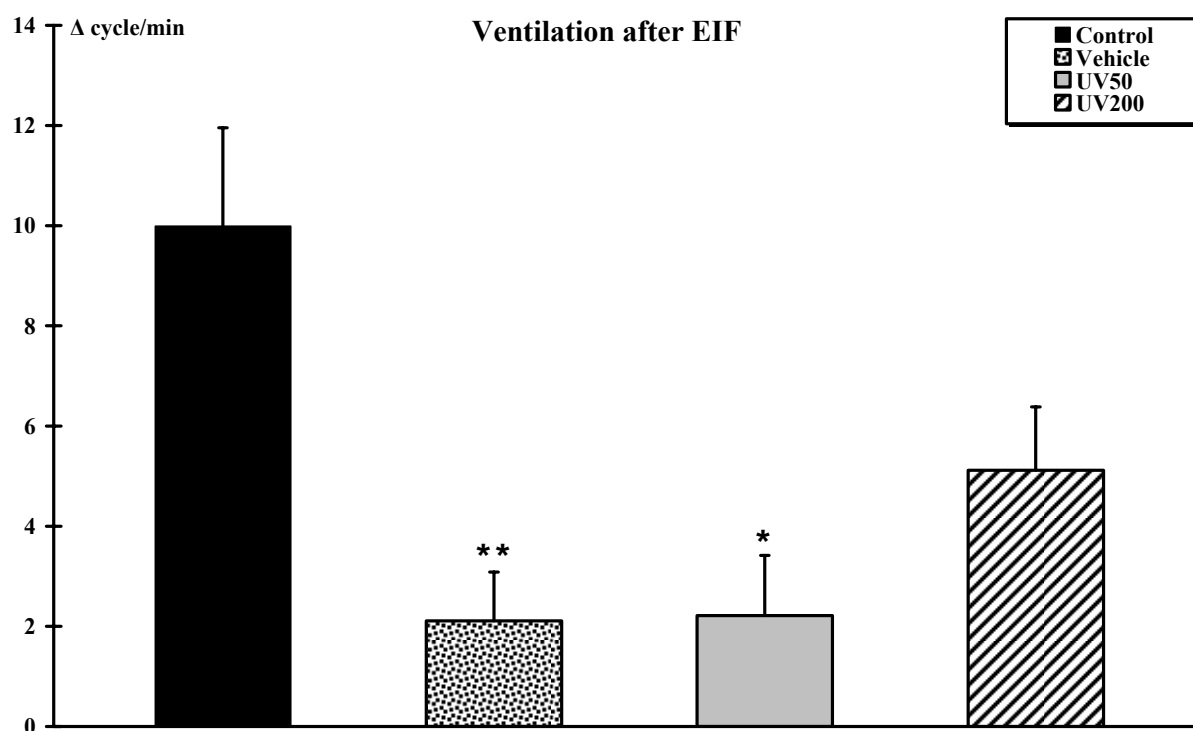
Suite aux résultats encourageants obtenus dans la précédente étude, nous avons cherché à vérifier que l'administration de vitamine D favorise la régénération axonale dans la moelle épinière après lésion. Cette deuxième série expérimentale avait pour objectif d'étudier, chez le rat, les effets de l'administration de vitamine D sur l'abolition du réflexe H (observée chez le rat non lésé) et la repousse nerveuse après une compression de la moelle épinière au niveau thoracique T10. Nous avons administré quotidiennement de la vitamine D à deux groupes de rat, à deux concentrations différentes (50 UI/kg/jour et 200 UI/kg/jour ; UI = unité internationale). Le groupe contrôle était composé de rats recevant chaque jour un même volume d'excipient, c'est-à-dire la solution dans laquelle était diluée la vitamine D.

Trois mois après, le réflexe H et son abolition suite à des décharges répétées a été mesurée chez les animaux contrôles (véhicule) et les animaux ayant reçu de la vitamine D. Le graphique ci-dessous montre une tendance à l'abolition du réflexe chez les rats ayant reçu de la vitamine D. Ces résultats témoignent de retour de la commande centrale descendante mais demandent à être affinés. Par ailleurs, l'analyse histologique en cours nous permettra de vérifier si la vitamine D a accru le nombre d'axones néo-formés et leur myélinisation.



Par ailleurs, les rats ayant reçu la vitamine D à la plus forte dose (UV200) présentent des adaptations ventilatoires conséquentes suite à la stimulation musculaire squelettique comparé aux animaux n'ayant pas reçu le traitement ou ayant reçu le traitement à plus faible

dose (UV50). Ces résultats très encourageants laissent supposer que les voies de la métabosensibilité ont soit été épargnées par la lésion secondaire, soit qu'elles ont commencé à régénérer au travers du site de lésion, soit que des mécanismes de compensation se sont mis en place sous l'effet de la vitamine D.



Nous poursuivons nos études afin de déterminer le rôle de la vitamine D dans les processus de récupération fonctionnelle et afin de déterminer les concentrations optimales qui doivent être utilisées.

Des essais cliniques préalables, portant sur l'efficacité de la vitamine D à diverses concentrations chez des patients para- ou tétraplégiques, demeurent toutefois indispensables.

Le FK506

Au cours de cette deuxième année, nous avons également réalisé une étude préliminaire afin de tester le potentiel thérapeutique du FK506 (Tacrolimus), une molécule ayant des propriétés neurotrophiques et immunomodulatrices. Cette étude, conduite chez le rat, avait pour objectif de déterminer dans quelle mesure s'effectuait la récupération fonctionnelle et la repousse des fibres nerveuses après résection d'un segment de 10 mm de

nerf péronier et sa suture en position inversée. Il nous paraissait indispensable avant toute application clinique de montrer que cette molécule pouvait avoir des effets bénéfiques à la fois sur le système nerveux périphérique et le système nerveux central. La récupération fonctionnelle a été réalisée grâce à 1) des mesures effectuées sur l’empreinte de pas des pattes arrière, 2) une analyse cinématique du mouvement de la patte lésée, 3) un enregistrement des propriétés mécaniques du muscle dénervé/réinnervé et des activités unitaires des fibres afférentes et 4) une évaluation du nombre, de la densité et de la taille des axones de part et d’autre de la lésion.

Nous avons observé que 1) les animaux traités par FK506 présentent une récupération comportementale plus précoce, 2) le FK506 i) accroît la myélinisation des axones néo-formés et ii) entraîne des modifications des propriétés musculaires et améliore la réponse des afférences métabosensibles à des stimuli chimiques spécifiques.

Les résultats de ces expériences ont fait l’objet d’un article soumis à *Journal of Neurotrauma*.

Ayant démontré le potentiel ‘neurorégénératif’ du FK506, nous avons administré cette molécule à des rats ayant une lésion de la moelle épinière. Cette étude constituera la dernière partie de notre programme de recherche.

Dans tous les articles que nous soumettons à des revues internationales à comité de lecture est mentionnée la contribution financière de l’Association ALARME. Ces expériences n’auraient pu avoir lieu sans ce soutien financier.