

# Réparer la moelle épinière en combinant thérapie cellulaire et neurostéroïde

## Repairing the Spinal Cord with a Sequential Treatment Combining Cell Therapy and Neurosteroid

François Féron

1. Aix-Marseille Université - NICN - CNRS UMR 7259.

2. Inserm CBT-510 - Centre d'Investigations Cliniques en Biothérapie - Marseille.

### Mots clés

- ◆ Traumatisme médullaire
- ◆ Cellules engainantes olfactives
- ◆ Cholécalficérol
- ◆ Autogreffe
- ◆ Essai clinique

### Résumé

Dans un premier temps, nous avons démontré que les cellules engainantes olfactives nasales, transplantées chez des rongeurs ayant subi une lésion de la moelle épinière, durant la phase aiguë ou chronique, améliorent la locomotion et la spasticité. Dans un deuxième temps, nous avons effectué le premier essai clinique basé sur la transplantation autologue de cellules engainantes olfactives dans la moelle épinière de trois patients paraplégiques, souffrant d'une blessure complète. Chez l'un des trois receveurs, nous avons observé une amélioration de la sensibilité sur trois segments.

Afin d'éliminer une possible récupération spontanée, les greffes ont été réalisées dans un délai supérieur à six mois post-traumatisme. Cependant, des études menées en parallèle, basées sur la greffe, chez des patients paraplégiques, de cellules de la moelle osseuse ou de macrophages activés, indiquent qu'une amélioration est observée seulement quand la thérapie cellulaire est programmée durant les phases aiguë ou subaiguë. Il est donc essentiel de traiter les personnes blessées dès que possible.

Pour ce faire, nous avons cherché à accélérer la production de cellules tout en ralentissant la dégénérescence médullaire. Nous avons mis au point une nouvelle méthode de culture afin d'obtenir, dans un délai court (deux semaines environ), des milliards de cellules olfactives. En parallèle, nous avons évalué le potentiel thérapeutique d'une molécule - le cholécalficérol (vitamine D3) - qui possède des propriétés anti-inflammatoires, neuroprotectrices, neurotrophiques, et qui, potentiellement, peut limiter les effets secondaires liés au traumatisme. Grâce à un modèle animal de compression de la moelle épinière, nous avons observé que des rats supplémentés avec la vitamine D, exhibaient, trois mois après la lésion, une amélioration significative de la fréquence ventilatoire et une réduction du réflexe H. Ensuite, à l'aide d'un modèle d'hémisection cervicale (C2), nous avons démontré que la vitamine D induit une récupération locomotrice et un accroissement du nombre d'axones traversant le site de lésion.

Nous sommes actuellement en train de planifier un essai clinique de phase II, multicentrique, destiné à évaluer l'efficacité du cholécalficérol chez des patients présentant un traumatisme cervical. La cohorte comprendra 30 patients avec une lésion complète. Les patients seront traités pendant un an, dès le premier jour suivant le traumatisme, avec des doses décroissantes de cholécalficérol. Le principal critère d'évaluation sera le score moteur des extrémités supérieures (UEMS). Les critères secondaires comprendront seront les scores sensoriels, la spasticité, la douleur et la qualité de vie.

### Keywords

- ◆ Spinal cord trauma
- ◆ Olfactory ensheathing cells
- ◆ Cholecalciferol
- ◆ Autologous transplantation
- ◆ Clinical trial

### Abstract

We first demonstrated that nasal olfactory ensheathing cells, transplanted in rodent lesioned spinal cord, efficiently promoted locomotor and electrophysiological recovery. We then performed the first clinical trial based on the autologous transplantation of olfactory ensheathing cells into the spinal cord of 6 patients with complete, thoracic paraplegia. In one transplant recipient (out of three), there was an improvement over 3 segments in light touch and pin-prick sensitivity.

In our clinical design, we opted for a six month-delayed transplantation. However, parallel studies, based on the grafting of bone marrow cells or activated macrophages in paraplegic patients, indicate that improvement is only observed when cell therapy occurs during the acute or sub-acute phases. It is therefore critical to treat the injured individuals as soon as possible.

As a result, we devised a method for speeding up the culture process in order to raise billions of cells within a time frame of 2 to 3 weeks and we searched for a "wait a while" molecule that displays neuroprotective and neurotrophic properties, namely cholecalciferol (vitamin D3). In a first study, using a rat model of spinal cord compression, we observed that vitamin D-treated rats displayed, three months after injury, a significant improvement of ventilatory frequency and a reduction of H reflex indicating functional improvements, at three months post-injury. In a second study, we used a rat model of cervical hemisection (C2) and demonstrated an improved locomotor recovery and a significantly higher rate of axons crossing the lesion site in treated animals.

We are now planning a phase II multicentric clinical trial assessing the efficacy of cholecalciferol in patients with

### Correspondance :

François Féron, NICN - CNRS UMR 7259. Faculté de Médecine Nord - Aix Marseille Université - CS 811 - 51 Bd Pierre Dramard - 13344 Marseille Cedex 15.

E-mail : francois.feron@univ-amu.fr

a cervical trauma. The cohort will include 30 patients with a complete injury. Patients will be treated for one year, from Day 1 post-injury, with decreasing doses of cholecalciferol. The primary outcome will be the improvement of the Upper-Extremity Motor Score (UEMS) recovery. Secondary outcome measures will include sensory index scores, spasticity, pain and quality of life.

Traditionnellement, les traumatismes de la moelle épinière affectaient principalement les adultes jeunes en bonne santé, amateurs de conduites à risque. Désormais, un nombre croissant de personnes âgées sont concernées par des chutes ayant des conséquences délétères sur l'intégrité de leur moelle épinière. L'incidence de ce type de traumatismes est d'environ 40 cas pour un million, ce qui représente au moins 10 000 Nord-Américains et 11 000 européens chaque année (1,2). En France, on compte 1 000 à 1 500 nouveaux cas annuels. La médicalisation systématique et les progrès de la prise en charge pré-hospitalière ont permis d'améliorer considérablement la survie de ces blessés mais au prix d'un coût significatif pour la société. Au coût économique élevé que représentent la prise en charge post-traumatique immédiate et la réhabilitation des patients, s'ajoutent les effets dévastateurs sur les plans physique, social et psychologique, tant pour l'individu que pour la famille.

Si la décompression médullaire reste un geste chirurgical essentiel, la prévention de l'extension des lésions grâce à des mesures médicales, visant à limiter localement les perturbations cellulaires et moléculaires liées au traumatisme, est une approche complémentaire permettant d'améliorer le pronostic de ces patients. Il n'y a actuellement aucun traitement universellement reconnu et validé pour ce type d'atteinte neurologique. De fortes doses de méthylprednisolone sont encore administrées par certaines équipes après la survenue d'un traumatisme médullaire. Aux États-Unis, son administration pré-hospitalière demeure recommandée et largement répandue, dès la prise en charge initiale des traumatismes du rachis avec signes neurologiques déficitaires. Son administration est ainsi encore réalisée dans de nombreux centres, même s'il est actuellement reconnu que les corticoïdes ont une efficacité limitée dans cette indication (3,4) mais cette pratique ne relève d'aucun consensus (5). La morbidité liée à ce traitement (6), notamment l'augmentation des complications infectieuses, ont fait abandonner complètement l'utilisation des corticostéroïdes selon le protocole NASCIS 7-10 en Europe. En l'absence d'une thérapie médicale efficace, la recherche s'oriente vers de nouvelles stratégies et molécules. Afin de limiter les pertes consécutives au traumatisme et d'améliorer les fonctions vitales des patients para- ou tétraplégiques, notre équipe a exploré, indépendamment, deux voies de recherche - la thérapie cellulaire et un traitement médicamenteux - et se préoccupe désormais de les valider puis, si possible, de les combiner, de manière séquentielle.

## La muqueuse olfactive, un tissu nerveux unique

Chez le mammifère adulte, y compris chez l'homme, la muqueuse olfactive est le seul tissu nerveux capable d'auto renouvellement. Quand un neurone meurt, il est remplacé par une nouvelle cellule nerveuse; quand l'épithélium est lésé, il ne lui faut que quelques jours pour retrouver son intégrité. Il s'agit donc d'un excellent modèle d'étude de la neurogenèse et de la plasticité neuronale puisque la naissance, la différenciation, la maturation, la survie, l'élongation axonale, la reconnaissance de la cible, la formation de synapses et la mort des neurones peuvent être observées dans le tissu adulte.

La plasticité de la muqueuse olfactive est en partie assurée par des cellules souches situées dans les deux strates - *épithélium* et *lamina propria* - qui la compose. Les cellules souches du système olfactif adulte sont multipotentes. Selon les conditions, elles peuvent donner naissance à des cellules neurales

(neurones, astrocytes, oligodendrocytes) mais aussi à des cellules non nerveuses (cœur, foie, muscle) (7).

Lors de leur maturation, les nouveaux neurones émettent un axone qui doit se frayer un chemin dans la *lamina propria*, traverser la lame criblée de l'os ethmoïde avant de faire synapse avec des cellules mitrales et des cellules à panache du bulbe olfactif. Tout au long du trajet, les axones des neurones olfactifs sont accompagnés par des cellules gliales, appelées cellules engainantes, qui ont pour rôle de les guider et de les nourrir. Ces dernières possèdent donc des propriétés neurotrophiques tout à fait exceptionnelles qui en font des candidats de premier choix pour favoriser la repousse des axones endommagés (8).

## Une recherche préclinique prometteuse

Nous avons réalisé deux séries d'expériences au cours desquelles des rats rendus paraplégiques, après transection de la moelle épinière au niveau thoracique T10, ont été greffés avec des cellules engainantes nasales, soit immédiatement après la lésion, soit un mois après le traumatisme initial. Dans les deux cas, nous avons montré que les cellules engainantes favorisaient la repousse axonale et amélioraient la locomotion (9,10). Suivis pendant les dix semaines qui ont suivi la greffe, les animaux transplantés avec des cellules engainantes ont récupéré une partie de leur locomotion. Cette amélioration a été immédiatement abolie lorsque la moelle épinière a été resectionnée quelques centimètres au-dessus de la première lésion. Nous avons également observé que cette récupération du mouvement dans les pattes arrière était associée à un rétablissement partiel du réflexe H. Enfin, nous avons démontré, par analyse histologique, une régénération des efférences. La croissance d'axones du tronc cérébral à travers le site de greffe a pu être mise en évidence par la présence de fibres sérotoninergiques dans la partie caudale du site de transection et par le marquage rétrograde de cellules du Raphé Magnan après injection de Fluorogold dans la partie caudale de la moelle épinière.

D'une manière plus générale, la majorité des quelque 700 articles, publiés au cours des 30 dernières années, convergent pour affirmer que les transplantations de cellules engainantes dans des modèles de traumatisme de la moelle épinière ont des effets bénéfiques, notamment sur la croissance axonale, la myélinisation, la locomotion, la respiration, la sensibilité dans les membres et la fonction urinaire (11).

Ces résultats très prometteurs nous ont encouragés à poursuivre ce travail de recherche sur le terrain clinique. Toutefois, avant de procéder à une autogreffe de cellules engainantes nasales chez des patients paraplégiques, il importait de mettre au point des méthodes pour isoler et purifier des cellules engainantes humaines. Après avoir réalisé une cartographie des cellules engainantes dans la cavité nasale humaine (12,13), nous avons cherché à sélectionner ces cellules *in vitro* en focalisant notre attention sur le rôle de trois neurotrophines, à savoir le Nerve Growth Factor (NGF), le Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) et la Neurotrophin 3 (NT3). Lors de cette étude nous avons montré que :

- leurs récepteurs respectifs - TrkA, TrkB, TrkC, ainsi que p75NTR (le récepteur au NGF de basse affinité) sont exprimés *in vitro* par les cellules engainantes nasales ;
- les trois neurotrophines accroissent la purification et la prolifération de ces cellules gliales, avec une concentration optimale de 50ng/ml ;
- les cellules engainantes humaines peuvent être collectées

sans difficulté et purifiées grâce à un milieu de culture sans sérum et supplémenté avec du NT3 (13).

## Un premier essai clinique mondial

Forts de ces résultats expérimentaux encourageants, nous avons mis au point le premier essai clinique mondial basé sur la greffe autologue de cellules engainantes chez des patients paraplégiques. Il s'agit d'un essai randomisé, contrôlé, en simple aveugle, de phase I/IIa, au cours duquel la sécurité et la faisabilité de la transplantation de cellules olfactives dans la moelle épinière ont été testées chez des patients paraplégiques. Les principaux critères d'inclusion étaient les suivants : âge compris entre 18 et 55 ans, lésion thoracique (entre T4 et T10) complète et traumatisme datant de plus de six mois.

Plus de 600 dossiers médicaux ont été analysés et ont donné lieu à des interviews personnalisés. Seules douze personnes répondaient aux critères d'inclusion/exclusion et, après de nouveaux examens médicaux, radiologiques et psychosociaux, seuls six patients ont été recrutés. Le recrutement s'est déroulé sur une période de deux ans et l'essai clinique a duré cinq ans. L'essai a été approuvé par trois comités d'éthique ainsi que par l'Administration des bonnes pratiques. Il a été financé (A\$500 000) par la Fondation du Princess Alexandra Hospital de Brisbane (Australie).

L'essai incluait également un groupe contrôle de trois patients paraplégiques, ce qui a permis de faire en sorte que les évaluations soient réalisées en aveugle. Afin que les évaluateurs demeurent ignorants du statut du patient, un pansement a été appliqué sur le dos de chaque individu et les patients étaient évalués par paires. Chaque patient, greffé ou contrôle, a été évalué tous les trois mois, pendant trois ans, à l'aide des tests ASIA, FIM, COVS, de la mesure de potentiels évoqués somato-sensoriels, de réponses à la stimulation magnétique transcrânienne, d'évaluation de la douleur à l'aide de l'échelle numérique en 10 points, d'images IRM (1.5 Tesla) et d'une batterie de tests médicaux, neurologiques et psychosociaux (14). Aucun résultat n'a été révélé aux patients et aux évaluateurs avant la fin de l'essai.

Trois ans après la greffe autologue de cellules engainantes, nous n'avons observé ni effet secondaire, ni douleur neuropathique induite, ni détérioration de la condition, ni formation de tumeurs, ni modification de l'odorat. Il est donc possible d'affirmer que la procédure est faisable et sûre. Par ailleurs, nous avons observé une amélioration de la sensibilité sur trois dermatomes, chez l'un des trois patients greffés. Toutefois, aucun changement sur l'échelle ASIA et dans les activités de la vie quotidienne n'a été rapporté. De plus, les potentiels évoqués somato-sensoriels ne sont jamais apparus, après stimulation des nerfs, et la stimulation magnétique transcrânienne n'a jamais activé les muscles de membres inférieurs (15).

## Accélérer la culture et ralentir le temps

Pendant que nous réalisons cette étude, trois autres équipes internationales ont mené en parallèle des essais cliniques basés sur la greffe autologue de macrophages ou de cellules de la moelle osseuse chez des blessés médullaires (16-18). Cela nous a permis de comparer protocoles et résultats et de conclure que les améliorations les plus importantes étaient obtenues lorsque la thérapie cellulaire intervenait dans les phases aiguë et subaiguë, et non dans la phase chronique.

Sachant que notre protocole actuel de purification et de prolifération des cellules engainantes olfactives humaines requiert un délai d'environ trois à quatre semaines pour obtenir quelque 10 à 20 millions de cellules, nous nous sommes attachés à accélérer le processus. Nous avons testé différentes

options. L'une d'elles repose sur l'utilisation de facteurs plaquetaires qui améliorent très sensiblement la division des cellules engainantes.

En parallèle, nous avons cherché à pouvoir différer la transplantation en limitant la neuro-dégénérescence, consécutive au traumatisme médullaire. Pour améliorer le pronostic, il est en effet essentiel d'agir sur l'inflammation, l'astrogliose et la dégénérescence wallérienne. Pour ce faire, nous nous sommes tournés vers une molécule - le cholécalférol (vitamine D3) qui exerce, dans les systèmes nerveux périphérique et central, une action i) immunomodulatrice, ii) neuroprotectrice, iii) antimittotique et iv) neurorégénérative (19).

## Un neurostéroïde méconnu

La vitamine D est une hormone stéroïde impliquée dans la régulation de près d'un millier de gènes. Récemment, de nombreuses études épidémiologiques et expérimentales ont mis en évidence son rôle dans la prévention de nombreuses pathologies (certains cancers et maladies auto-immunes, événements cardio-vasculaires et hypertension, sarcopénie du sujet âgé) (20). Le cholécalférol (Vitamine D3) est synthétisé au niveau de la peau à partir du 7-déhydrocholestérol sous l'effet de certains rayonnements UVB (dont la longueur d'onde est comprise entre 290 - 315 nm). On le retrouve aussi dans des sources alimentaires animales (particulièrement le poisson gras). La vitamine D3 est biologiquement inactive. Elle est stockée au niveau du tissu adipeux et transformée au niveau du foie en 25-hydroxyvitamine D (25(OH) D) qui est la forme circulante principale de vitamine D3. La 25(OH)D est ensuite hydroxylée au niveau du rein pour former la 1,25 dihydroxy vitamine D (1,25(OH)2D) qui est le métabolite actif de la vitamine D (21). La 1,25-dihydroxy vitamine D agit via un récepteur le VDR (Vitamin D Receptor) en modulant la synthèse de nombreuses protéines. Le rôle le mieux connu de la 1,25(OH)2D est le maintien de l'homéostasie phosphocalcique mais de nombreuses études lui ont attribué d'autres rôles. La vitamine D stimule l'immunité et agit sur le système nerveux, adulte ou en développement. Elle est désormais connue pour être une molécule :

- immunomodulatrice. Les lymphocytes T CD4+ (Th1, Th2 et Th17) sont les cibles privilégiées de la vitamine D. Il a été démontré que le cholécalférol inhibe les cellules Th1 et la production de cytokines telles que IL-2, IFN- $\gamma$ , and TNF- $\alpha$ , via un mécanisme impliquant le VDR (22-24). Par ailleurs, on sait que la vitamine D i) accroît la production d'IL-4/5 et ii) inhibe la différenciation et la survie des cellules dendritiques, ce qui aboutit à une moindre activation des cellules T alloréactives (26,27), pour une synthèse (28,29).
- antimittotique et pro-apoptique. Parmi les gènes impliqués dans la prolifération cellulaire et inhibés par la vitamine D, on trouve le récepteur à l'EGF et c-myc (30). Par ailleurs, le cholécalférol agit à la fois en bloquant le cycle cellulaire au stade G0/G1 et en induisant l'apoptose (31). Lors de nos études sur les animaux carencés en vitamine D durant la grossesse, nous avons observé dans le cerveau des nouveau-nés un excès de cellules en division et une réduction du nombre des cellules apoptotiques (32). Les données sur les propriétés antimittotiques et pro-apoptotiques de cette molécule, considérées comme suffisamment convaincantes, ont conduit plusieurs équipes à mettre en place des essais cliniques avec des patients souffrant du cancer de la prostate (33-35).
- neuroprotectrice et neurorégénératrice. Dans le système nerveux central, la vitamine D, possède un effet neuroprotecteur lié à 1) la régulation de l'homéostasie du calcium intracellulaire : inhibition des canaux calciques voltage-dépendants de type L et augmentation de la synthèse de protéines de liaison du calcium (parvalbumine) et 2) la régulation des processus de détoxification : diminution de la

formation de radicaux libres et de NO par inhibition de la production de la NO synthase, augmentation du taux de glutathione et de l'activité de la  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase (36). Son action sur la régénération nerveuse est assurée par 1) la régulation de la synthèse par les cellules du SNC de neurotrophines [augmentation de la synthèse du NGF, de NT3 (37,38), de GDNF et diminution de la synthèse de NT4] ou du récepteur de basse affinité du NGF (p75NTR) (39) auquel se lient toutes les neurotrophines et 2) l'augmentation de la croissance neuritique (40) et 3) une expression accrue des protéines microtubule-associated protein-2 (MAP2), growth-associated protein-43 (GAP43) et synapsin-1 (41).

## Vitamine D et réparation du système nerveux périphérique

Dans un premier temps, nous avons utilisé un modèle de lésion du système nerveux périphérique pour apporter la « preuve de principe » de l'efficacité de la vitamine D en faveur de la repousse nerveuse. Dans un modèle rat de transection avec suture inversée du nerf péronier, nous avons montré que l'ergocalciférol (vitamine D extraite des champignons), administrée à la dose 100 UI/kg/jour, i) augmente le nombre d'axones néoformés ainsi que leur diamètre ; ii) améliore la réponse des fibres afférentes métabosensibles après injection dans le muscle d'acide lactique ou de chlorure de potassium et iii) induit une modification du *Tibialis anterior* vers un phénotype de muscle à fibres lentes (42).

À l'aide de ce même modèle, nous avons ensuite mené une étude pharmacologique destinée à comparer l'efficacité des deux formes de vitamine D (ergocalciférol vs cholécalciférol) lorsqu'elles sont administrées à la dose de 100 UI/kg/jour ou à celle de 500 UI/kg/jour. Nous avons montré que la vitamine D3 (cholécalciférol, extrait de l'animal) possède un potentiel supérieur à la vitamine D2 (ergocalciférol).

Chez l'animal, les lésions du nerf péronier se traduisent par un déficit d'extension et d'écartement des orteils, de flexion dorsale et d'éversion du pied. Grâce à la mesure de l'Index Fonctionnel du Péronier (IFP), il est possible de quantifier la récupération fonctionnelle. Les animaux traités avec la vitamine D ont été comparés à des animaux ayant subi la même chirurgie mais n'ayant reçu que l'excipient (groupe contrôle). Nous avons observé que les rats ayant bénéficié de vitamine D3 à la dose de 500 UI/kg/jour ont retrouvé au bout de trois mois une marche normale. Nous avons poursuivi l'analyse des rats traités avec les deux formes de vitamine D en procédant à des mesures électrophysiologiques, notamment la mesure de la réponse métabosensible véhiculée au travers de ce nerf mixte ainsi que la réponse ventilatoire réflexe induite. Par ailleurs, l'analyse du réflexe H nous informe sur les propriétés éfferentes et afférentes au sein du nerf régénéré ainsi que l'état d'excitabilité au niveau médullaire. Pour chacune de ces mesures, les rats traités avec la plus forte dose de vitamine D3 ont exhibé des paramètres physiologiques similaires à ceux des animaux non lésés. Enfin, nous avons observé i) une augmentation significative du nombre d'axones, aussi bien dans la partie distale que la partie proximale de la lésion, et ii) un accroissement de la myélinisation (43).

## Vitamine D et réparation du système nerveux central

Après avoir confirmé le potentiel thérapeutique de la vitamine D3 dans un modèle animal de lésion du système nerveux périphérique, nous avons mené une première étude basée sur l'administration de cette molécule chez des rats ayant subi un traumatisme médullaire. Après laminectomie, nous avons procédé à une compression de la moelle épinière au niveau

thoracique T10 pendant une minute. Le lendemain de l'opération, nous avons vérifié que les animaux ne pouvaient utiliser leurs pattes arrière pour se déplacer (score BBB = 0). Ensuite, nous avons administré de la vitamine D3 à la dose de 50 UI/kg/jour ou de 200 UI/kg/jour. Trois mois après ce traitement, les animaux ont été anesthésiés et le réflexe H a été mesuré ainsi que la réponse ventilatoire de l'animal après stimulation du nerf péronier. Les traumatismes médullaires s'accompagnent généralement d'une exacerbation des réflexes et, en particulier, d'une persistance du réflexe H qui témoigne d'une levée d'inhibition des fibres descendantes. Le rétablissement de l'inhibition du réflexe H est généralement considéré comme la preuve d'une régénération des fibres nerveuses en provenance du cortex et du tronc cérébral. Nous avons montré que les animaux traités avec la vitamine D à la dose de 200 UI/kg/jour répondent de manière similaire aux animaux non lésés (44). Après avoir mesuré les ondes M et H aux différentes fréquences de stimulation (0,3 ; 1 ; 5 et 10 Hz), nous avons stimulé de manière répétitive le muscle *Tibialis anterior* et enregistré l'activité ventilatoire. Cette fatigue induite de manière électrique nous a permis de calculer la différence entre l'activité ventilatoire pré- et post-stimulation. Nous avons constaté que les animaux traités avec la vitamine D, à la dose de 200 UI/kg/jour, ont amélioré de manière significative leur capacité ventilatoire, par rapport au groupe véhicule (44). Enfin, nous avons quantifié la repousse axonale en comptant le nombre de fibres nerveuses marquées avec un anticorps anti-neurofilament. Nous avons observé un nombre accru d'axones dans les parties centrale et distale de la lésion, chez les rats traités avec la vitamine D, à la dose de 200 UI/kg/jour. Nous avons ensuite poursuivi ce travail en utilisant un autre modèle de traumatisme médullaire : l'hémi-spinalisation cervicale (C2). Suite aux travaux menés au niveau du nerf périphérique, nous avons opté pour une administration de cholécalciférol à la dose de 500 UI/kg/jour. Enfin, dans le but de déterminer la fenêtre de temps adéquate pour le début du traitement, nous avons comparé l'efficacité de la vitamine D lorsqu'elle est administrée immédiatement ou plusieurs jours après le traumatisme. Les principaux enseignements de cette étude, qui fait l'objet d'un article en cours de rédaction, sont les suivants :

- une amélioration hautement significative de la locomotion est observée chez les animaux traités dès le lendemain du traumatisme mais pas chez ceux médicamenteusement après un délai d'une semaine ;
- une réduction de l'hyper-réflexie est observée chez les deux groupes bénéficiant d'une supplémentation en vitamine D ;
- une augmentation significative du nombre d'axones dans les parties proximale et distale de la lésion chez les animaux traités dès le lendemain du traumatisme.

## Un prochain essai clinique

Nos études menées chez des rongeurs suggèrent fortement l'existence d'un effet thérapeutique de la vitamine D dans la réparation nerveuse, après un traumatisme du système nerveux, qu'il soit central ou périphérique. Toutefois, on ne dispose pas à l'heure actuelle d'aucune donnée sur l'homme. Ainsi, nous proposons la mise en place d'un essai de phase II, évaluant l'efficacité et la tolérance du traitement sur un groupe de patients. La dose de vitamine D3 a été choisie sur la base de nos études précliniques. Les patients seront traités dès le lendemain du traumatisme car nous avons montré que si l'administration est différée d'une semaine, la récupération fonctionnelle est beaucoup moins prononcée. Les doses de vitamine D iront en décroissant : les patients recevront une dose de 100 000 unités toutes les semaines, pendant le premier mois ; une dose de 100 000 unités, toutes les deux semaines pendant les deux mois suivants ; une dose de 100 000 unités tous les mois pendant les neuf mois restants. Pour un

homme pesant 75 kg, cela correspond à un apport journalier de 190 UI/kg/jour, 95 UI/kg/jour et 48 UI/kg/jour, respectivement. Si nous obtenons l'accord d'un Comité de Protection des Personnes et de l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament (ANSM), l'essai pourrait démarrer avant la fin de l'année 2014.

## Conclusion

Réparer la moelle épinière traumatisée demeure un défi qui ne pourra être relevé avec succès qu'au prix d'un effort combiné des cliniciens, des chercheurs, des soignants mais également de spécialistes d'autres disciplines telles que la robotique, l'informatique et l'imagerie. Il y a tout lieu de penser que chaque type de traumatisme donnera lieu à un traitement spécifique, lequel résultera d'une combinaison séquentielle de soins divers. Nous avons présenté ici une option mêlant thérapie cellulaire et administration d'un neurostéroïde. Bien d'autres peuvent être envisagées. L'administration de facteurs de croissance, la thérapie génique ou encore la stimulation électrique associée à la kinésithérapie font partie des stratégies qui sont actuellement testées et pourraient faire l'objet d'une application clinique dans les prochaines années.

## Discussion en séance

### Question de J Philippon

N'y a-t-il pas autant de traumatismes que d'individus et n'observe-t-on pas des récupérations différentes selon la nature du traumatisme ?

#### Réponse

Vous avez parfaitement raison. Evelyne Emery, chirurgienne du rachis à Caen, a démontré, en utilisant l'une des très rares banques de moelles épinières humaines ayant subi un traumatisme, que chaque accident aboutit à des traumatismes différents. Les sections, partielles ou totales, sont rares. Le plus souvent, il s'agit de compressions ou d'élongations. Toutefois, la nature du choc, la vitesse à laquelle il va se produire, la zone (cervicale, thoracique ou lombaire) affectée, l'âge de l'individu... sont autant de variables qui vont modifier le pronostic. À l'avenir, l'imagerie médicale devrait nous permettre d'affiner le diagnostic et, on peut l'espérer, d'adapter le traitement à chaque patient.

### Question de J Philippon

Le cholécalciférol est-il efficace pour limiter l'étendue de la cicatrice gliale ?

#### Réponse

Excellente question. Nous menons actuellement une étude qui s'intéresse, en particulier, à ce problème. A ce stade, nous ne pouvons faire qu'une prédiction. Le cholécalciférol est utilisé par des cancérologues car il est connu pour être antimétabolite. Il est donc possible que la vitamine D agisse également en diminuant la taille de la cicatrice gliale.

### Question de P Montupet

Vous dites avoir bénéficié d'un soutien de la Fondation de l'Avenir mais l'essai clinique a eu lieu en Australie ?

#### Réponse

J'ai remercié la Fondation de l'Avenir car, après mon retour en France, elle a suivi et financé nos travaux sur, d'une part, les cellules souches olfactives, et, d'autre part, la vitamine D. Le bénéfice thérapeutique des cellules souches a été testé dans d'autres modèles animaux mimant la maladie d'Alzheimer ou encore des lésions de nerfs périphériques tandis que celui de la vitamine D a été évalué dans des modèles rongeurs de la maladie d'Alzheimer et de trauma médullaire. C'est une grande chance d'avoir pu bénéficier d'un soutien régulier de cette fondation.

### Question de P Montupet

Pourquoi des essais cliniques en simple aveugle ?

#### Réponse

L'essai clinique mené en Australie, basé sur la transplantation de cellules engainantes olfactives, comportait un groupe contrôle. Les évaluateurs étaient donc ignorants du statut - greffé ou non greffé - des patients. En revanche, les règles éthiques en vigueur en Australie (comme en Europe du reste) interdisent de mettre en péril la vie des patients en procédant à une opération jugée inutile, à savoir des insertions multiples d'aiguilles pour introduire du milieu de culture sans cellules. De fait, les six membres de la cohorte connaissaient le groupe auquel ils appartenaient et aucun effet placebo n'a pu être testé.

L'essai clinique qui devrait voir le jour cette année en France relève d'une autre logique. Il s'agit d'une étude préliminaire, de phase II, qui a pour but de tester la sécurité et la faisabilité de l'administration de cholécalciférol chez des patients para-/tétraplégiques. Nous avons choisi de nous intéresser à des cas extrêmes, à savoir des traumatismes aux niveaux cervicaux C5-C7, avec blessure complète. L'évolution naturelle de ce type de trauma est bien connue et nous savons qu'un gain à un an, supérieur à 10 points sur l'échelle UEMS, serait considéré comme un bénéfice thérapeutique. Nous avons donc choisi de ne pas constituer un groupe contrôle. Cet essai ne sera ni en double ni même en simple aveugle.

## Références

1. Sekhon LH, Fehlings MG. Epidemiology, demographics, and pathophysiology of acute spinal cord injury. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2001;26(24 Suppl):S2-12.
2. Wyndaele M, Wyndaele JJ. Incidence, prevalence and epidemiology of spinal cord injury: what learns a worldwide literature Survey? *Spinal Cord*. 2006;44:523-9.
3. Hall ED, Springer JE. Neuroprotection and acute spinal cord injury: a reappraisal. *NeuroRx*. 2004;1:80-100.
4. Sayer FT, Kronvall E et al. Methylprednisolone treatment in acute spinal cord injury: the myth challenged through a structured analysis of published literature. *Spine J*. 2006;6:335-43.
5. Fehlings MG. Summary statement: the use of methylprednisolone in acute spinal cord injury. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2001;26(24 Suppl):S55.
6. Qian T, Guo X et al. High-dose methylprednisolone may cause myopathy in acute spinal cord injury patients. *Spinal Cord*. 2005;43:199-203.
7. Murrell W, Féron F, Wetzig A, Cameron N, Splatt K et al. Multipotent stem cells from adult olfactory mucosa. *Developmental Dynamics*. 2005;233:496-515.
8. Féron F. Current cell therapy strategies for repairing the central nervous system. *Rev. Neurol*. 2007;163(Spec N°1):3S23-30.
9. Lu J, Féron F, Ho S, Mackay-Sim A, Waite P. Transplantation of nasal olfactory tissue results in partial recovery of paraplegic adult rats. *Brain Research*. 2001;889:344-57.
10. Lu J, Féron F, Mackay-Sim A, Waite P. Olfactory ensheathing cells promote locomotor recovery after delayed transplantation into transected spinal cord. *Brain*. 2002;125(Pt 1):14-21.
11. Raisman G, Barnett SC, Ramón-Cueto A. Repair of central nervous system lesions by transplantation of olfactory ensheathing cells. *Handb Clin Neurol*. 2012;109:541-9.
12. Féron F, Perry C, Mc Grath J, Mackay-Sim A. New techniques for biopsy and culture of human olfactory epithelial neurons. *Arch. Otolaryngol Head Neck Surg*. 1998;124:861-6.
13. Bianco J, Perry C, Harkin D, Mackay-Sim A, Féron F. Neurotrophin 3 promotes purification and proliferation of olfactory ensheathing cells from human nose. *Glia*. 2004;45:111-23.
14. Féron F, Perry C et al. Autologous olfactory ensheathing cell transplantation in human spinal cord injury. *Brain*. 2005;128(Pt 12):2951-60.
15. Mackay-Sim A, Féron F, Cochrane J, Bassingthwaite L, Bayliss C et al. Autologous olfactory ensheathing cell transplantation in human paraplegia: a 3 year clinical trial. *Brain*. 2008;131(Pt 9):2376-86.
16. Knoller N, Auerbach G et al. Clinical experience using incubated autologous macrophages as a treatment for complete spinal cord injury: phase I study results. *J Neurosurg Spine*. 2005;3:173-81.

17. Sykova E, Homola A et al. Autologous bone marrow transplantation in patients with subacute and chronic spinal cord injury. *Cell Transplant*. 2006;15:675-87.
18. Yoon SH, Shim YS et al. Complete spinal cord injury treatment using autologous bone marrow cell transplantation and bone marrow stimulation with granulocyte macrophage-colony stimulating factor: Phase I/II clinical trial. *Stem Cells*. 2007;25:2066-73.
19. Fernandes de Abreu DA, Eyles D, Féron F. Vitamin D, a neuro-immunomodulator: implications for brain and autoimmune diseases. *Psychoneuroendocrinology*. 2009;34S:265-77.
20. Souberbielle JC, Prié D et al. Update on vitamin D and evaluation of vitamin D status. *Ann Endocrinol (Paris)*. 2008;69:501-10.
21. VanAmerongen BM, Dijkstra CD et al. Multiple sclerosis and vitamin D: an update. *Eur J Clin Nutr*. 2004;58:1095-109.
22. Alroy IT, Towers L et al. Transcriptional repression of the interleukin-2 gene by vitamin D3: direct inhibition of NFATp/AP-1 complex formation by a nuclear hormone receptor. *Mol Cell Biol*. 1995;15:5789-99.
23. Cippitelli M, Santoni A. Vitamin D3: a transcriptional modulator of the interferon-gamma gene. *Eur J Immunol*. 1998;28:3017-30.
24. Hakim I, Bar-Shavit Z. Modulation of TNF-alpha expression in bone marrow macrophages: involvement of vitamin D response element. *J Cell Biochem*. 2003;88:986-98.
25. Cantorna MT, Woodward WD et al. 1,25-dihydroxyvitamin D3 is a positive regulator for the two anti-encephalitogenic cytokines TGF-beta 1 and IL-4. *J Immunol*. 1998;160:5314-9.
26. Griffin MD, Lutz W et al. Dendritic cell modulation by 1alpha,25 dihydroxyvitamin D3 and its analogs: a vitamin D receptor-dependent pathway that promotes a persistent state of immaturity in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98:6800-5.
27. Penna G, Adorini L. Inhibition of costimulatory pathways for T-cell activation by 1,25-dihydroxyvitamin D(3). *Transplant Proc*. 2001;33:2083-4.
28. Mathieu C, Adorini L. The coming of age of 1,25-dihydroxyvitamin D(3) analogs as immunomodulatory agents. *Trends Mol Med*. 2002;8:174-9.
29. Cantorna MT. Vitamin D and its role in immunology: multiple sclerosis, and inflammatory bowel disease. *Prog Biophys Mol Biol*. 2006;92:60-4.
30. Matsumoto K, Hashimoto K et al. Growth-inhibitory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on normal human keratinocytes cultured in serum-free medium. *Biochem Biophys Res Commun*. 1990;166:916-23.
31. Nagpal S, Na S et al. Noncalcemic actions of vitamin D receptor ligands. *Endocr Rev*. 2005;26:662-87.
32. Eyles D, Brown J et al. Vitamin D3 and brain development. *Neuroscience*. 2003;118:641-53.
33. Chen TC, Holick MF. Vitamin D and prostate cancer prevention and treatment. *Trends Endocrinol Metab*. 2003;14:423-30.
34. Trump DL, Hershberger PA et al. Anti-tumor activity of calcitriol: pre-clinical and clinical studies. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2004;89-90:519-26.
35. Ali MM, Vaidya V. Vitamin D and cancer. *J Cancer Res Ther*. 2007;3:225-30.
36. Garcion E, Thanh XD et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 regulates gamma 1 transpeptidase activity in rat brain. *Neurosci Lett*. 1996;216:183-6.
37. Neveu I, Naveilhan P et al. 1,25-dihydroxyvitamin D3 regulates NT-3, NT-4 but not BDNF mRNA in astrocytes. *Neuroreport*. 1994;6:124-6.
38. Neveu I, Naveilhan P et al. 1,25-dihydroxyvitamin D3 regulates the synthesis of nerve growth factor in primary cultures of glial cells. *Brain Res Mol Brain Res*. 1994;24:70-6.
39. Cornet AC, Baudet C et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 regulates the expression of VDR and NGF gene in Schwann cells in vitro. *J Neurosci Res*. 1998;53:742-6.
40. Brown J, Bianco I et al. 1,25-dihydroxyvitamin D3 induces nerve growth factor, promotes neurite outgrowth and inhibits mitosis in embryonic rat hippocampal neurons. *Neurosci Lett*. 2003;343:139-43.
41. Taniura H, Ito M et al. Chronic vitamin D3 treatment protects against neurotoxicity by glutamate in association with upregulation of vitamin D receptor mRNA expression in cultured rat cortical neurons. *J Neurosci Res*. 2006;83:1179-89.
42. Chabas JF, Alluin O et al. Vitamin D2 potentiates axon regeneration. *J Neurotrauma*. 2008;25:1247-56.
43. Chabas JF, Stephan D, Marqueste T, Garcia S, Lavaut MN et al. Cholecalciferol (Vitamin D3) improves myelination and recovery after nerve injury. *PLoS One*. 2013;8:e65034. doi:10.1371/journal.pone.0065034.
44. Bianco J, Gueye Y et al. Vitamin D3 improves respiratory adjustment to fatigue and H-reflex responses in paraplegic adult rats. *Neuroscience*. 2011;188:182-92.