

Université de Montréal

**Étude des effets du Facteur de croissance
épidermique sur la neurogénèse après une
irradiation.**

par

Kerstin Killer

Département de pharmacologie, Université de Montréal
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maître es Sciences (M.Sc.)
en pharmacologie
option pharmacogénomique

Février 2015

© Kerstin Killer, 2015

Université de Montréal

Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire est intitulé:

Étude des effets du Facteur de croissance épidermique sur la neurogénèse après une irradiation

Présenté par:
Kerstin Killer

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Dr Louis Éric Trudeau, président-rapporteur
Dr Christian Beauséjour, directeur de recherche
Dr Karl Fernandes membre du jury

Résumé

Les patients atteints de cancers reçoivent différents traitements, tels que la radiothérapie ou la chimiothérapie. Actuellement, environ 60% des enfants survivants du cancer développent des effets secondaires cognitifs, consécutifs aux traitements énoncés précédemment. Compte tenu de la perspective du développement psychomoteur de l'enfant et de l'immaturation du système nerveux central (SNC) chez ces patients, il s'avère particulièrement pertinent d'étudier les effets secondaires que provoquent les traitements anticancéreux sur le développement cognitif de cette population de malades. Des études ont démontrées l'existence de liens étroits entre ces effets secondaires et l'abolition de la neurogénèse provoquée principalement par l'irradiation. Ce projet de maîtrise porte sur les effets du facteur de croissance épidermique, l'EGF (un facteur de croissance impliqué dans la prolifération cellulaire) sur la neurogénèse de la souris. Nous avons également cherché un vecteur de sécrétion efficace pour permettre une diffusion continue d'EGF à long terme (2 à 4 semaines). **Notre hypothèse est que l'EGF serait capable de stimuler la neurogénèse et protéger les cellules de l'apoptose dans le cerveau de la souris, suite à une irradiation.** Nous avons montré un effet positif de l'EGF sur la formation et la prolifération des neuroblastes Dcx(+) dans la zone sous ventriculaire (ZSV) et non dans l'hippocampe (Hi), suite à l'injection de l'EGF, directement dans le cerveau à l'aide d'une pompe osmotique. Nous avons observé que cette augmentation de la quantité de jeunes neurones est indépendante de la capacité de l'EGF à les protéger de l'apoptose. L'EGF ne protège pas non plus les blastes leucémiques, issus de lignées de cellules humaines, des effets secondaires d'une irradiation. Les cellules souches mésenchymateuses (CSM) modifiées génétiquement et générées pour sécréter l'EGF ne montrent aucun effet sur la stimulation de la neurogénèse quand elles sont directement injectées dans le cerveau. Finalement, nos résultats indiquent que l'EGF pourrait être un bon candidat pour le développement de nouvelles thérapies pour traiter les effets secondaires que provoque une irradiation du cerveau. L'utilisation de pompes pour permettre l'administration d'EGF dans le cerveau devient alors très intéressante pour améliorer la qualité de vie des patients.

Mots-clés : Cancers, radiothérapie, neurogénèse, EGF, CSM

Abstract

Patients with cancer receive different treatments such as radiotherapy (ionizing radiation) or chemotherapy. Currently about 60% of children surviving cancer are prone to the development of treatment-related delayed side effects, such as neurocognitive impairments. Given the prospect of psychomotor development of children and central nervous system (CNS) immaturity in these patients, it is especially relevant to study the adverse effects related to cognitive impairment caused by cancer treatments on this population of patients. Studies have shown the existence of close links between this delayed side effects and the abolition of neurogenesis caused mainly by irradiation. This masters degree project concerns the effects of epidermal growth factor, EGF (a growth factor involved in cell proliferation), on neurogenesis in the C57BL/6 mice, which drastically decrease after exposure to ionizing radiation. We also sought a vector of efficient secretion to allow continuous long-term secretion of EGF (2-4 weeks). **Our hypothesis is that EGF will stimulate neurogenesis and protect cells from apoptosis in the brain of mice following radiation.** We have shown a positive effect of EGF on the formation and proliferation of young neurons Dcx (+) in the subventricular zone (SVZ) but not in the hippocampus (Hi) following EGF injection directly in the brain using an osmotic pump. We also observed that the increase of young neurons is independent of the ability of EGF to protect them from apoptosis. Moreover, EGF doesn't protect leukemic human blasts after irradiation. Mesenchymal stem cells (MSC) genetically engineered to secrete EGF did not stimulate neurogenesis when injected directly in the brain. Finally our results indicate that EGF could be a good candidate for the development of new therapies to treat the side effects that irradiation causes in the brain. The use of pumps to allow the administration of recombinant EGF in specific brain regions becomes very interesting. Indeed this delivery system is increasingly used and effective to help improve the quality of life of patients.

Keywords : Cancers, radiotherapy, neurogenesis, EGF, MSC

Table des matières

Résumé	i
Abstract	ii
Table des matières	iv
Liste des tableaux	vii
Liste des figures	viii
Liste des abréviations	x
Remerciements	xiii
CHAPITRE I : INTRODUCTION.....	1
1.1 MISE EN CONTEXTE.....	1
1.2 CONTENU DU MÉMOIRE.....	4
CHAPITRE II.....	5
2.1 LES CANCERS PÉDIATRIQUES.....	5
2.1.a Les leucémies	5
2.2.b Les neuroblastomes et les cancers du système nerveux central	6
2.2 LES TRAITEMENTS DES CANCERS PÉDIATRIQUES	7
2.2.a La radiothérapie.....	7
2.2.b La chimiothérapie.....	9
CHAPITRE III : LES EFFETS SECONDAIRES LIÉS À L'IRRADIATION	10
3.1. Effets secondaires immédiats à court terme.....	11
3.2 Effets secondaires à moyen et long terme.....	11
3.3 Signes d'altération clinique après l'irradiation	12
3.4 Les dysfonctions cognitives associées à la radiothérapie	13
CHAPITRE IV	15
4.1 LA NEUROGÉNÈSE	15
4.1.a Définition.....	15
4.1.b Les deux zones neurogéniques.....	16
4.2 LA RECHERCHE APPLIQUÉE À LA NEUROGENÈSE.....	18
CHAPITRE V	21
5.1 LE FACTEUR DE CROISSANCE ÉPIDERMIQUE	21
5.1.a La grande famille des protéines EGF	21

5.1.b	Interactions avec les récepteurs à l'EGF	22
5.1.c	L'EGF : implication dans la genèse cellulaire	25
5.2	LES CELLULES SOUCHES MÉSENCHYMATEUSES	26
CHAPITRE VI	27
6.1	HYPOTHÈSE DE TRAVAIL.....	27
6.2	OBJECTIFS	28
6.3	PLAN EXPÉRIMENTAL.....	29
CHAPITRE VII : MATÉRIELS ET MÉTHODES	30
Chirurgie des souris.....		30
Irradiation		31
Sacrifice.....		31
Mise en évidence de l'apoptose		31
<i>TEST TUNEL (Terminal transferase d'UTP nick and labelling)</i>		31
<i>Culture cellulaire de lignées leucémiques (LAL T et LAL B)</i>		32
<i>Cytométrie en flux</i>		32
Injection d'EGF recombinant.....		32
<i>Injections simples d'EGF recombinant</i>		32
<i>Infusion intra cérébro-ventriculaire d'EGF recombinant</i>		32
<i>Injection de BrdU (2mg/ml) en IP</i>		33
<i>Perfusion intracardiaque</i>		33
<i>Marquages immunofluorescents</i>		33
Sécrétion continue via les CSM modifiées génétiquement.....		35
<i>Culture cellulaire de CSM-C1</i>		35
<i>Biologie moléculaire: Clonage de CSM-C1 avec le gène de l'EGF</i>		35
<i>Cytométrie en flux</i>		36
<i>ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)</i>		36
<i>Injection en IP et ICV de cellules souches mésenchymateuses dans la souris</i>		
<i>C57BL/6, irradiée vs non irradiée</i>		36
Quantification.....		38
Statistiques		39
CHAPITRE VIII : RÉSULTATS.....		40

8.1	L'EGF recombinant induit la formation de neuroblastes une semaine après l'irradiation dans la ZSV.....	40
8.2	La ZSV est riche en cellules exprimant l'EGF-R à leur membrane	44
8.3	L'injection d'EGF recombinant ne protège pas de l'apoptose causée par l'irradiation.....	48
8.4	La formation de neuroblastes est associée à une prolifération par un effet mitotique qui dépend de l'EGF	51
8.5	L'EGF ne protège pas les blastes leucémiques contre l'irradiation.....	53
8.6	Évaluation de l'effet des CSM sur la formation de neuroblastes.....	55
8.7	Évaluation du devenir et de l'effet sur la neurogénèse des CSM IRES GFP/EGF dans le ventricule droit de la ZSV en fonction du temps	57
CHAPITRE IX : DISCUSSION ET PERSPECTIVES		62
9.1	Effet à court terme de l'EGF sur la neurogénèse et l'apoptose post-irradiation	63
9.2	Effet de l'EGF à plus long terme sur la neurogénèse post-irradiation via un vecteur de sécrétion.....	66
CONCLUSION.....		74
Bibliographie.....		xiii
Annexes		xx

Liste des tableaux

Tableau 1. Les facteurs de croissance de la famille de l'EGF et leurs récepteurs	22
---	----

Liste des figures

Figure 1. Taux d'incidence normalisés selon l'âge (TINA) pour tous les cancers, Canada, 1985 à 2014.....	1
Figure 3. Schématisation de la ZSV (A) et de l'Hi (B) chez la souris et zone spécifique où l'on observe de la neurogénèse	17
Figure 4. Les principaux marqueurs intracellulaires ou membranaires caractéristiques des différents types cellulaires impliqués dans le lignage neural[62]......	20
Figure 5. Principales voies de signalisations activées par les récepteurs à l'EGF	24
Figure 6. Schématisation des expériences qui ont été réalisées sur des souris C57BL/6 d'une durée de 6h pour le test TUNEL et de une semaine pour les marquages à la Dcx. à la GFP et au BrdU	29
Figure 7. Schéma représentant les trois coupes coronales de la ZSV et de l'Hi chez la souris qui sont les zones spécifiques où ont été observé et quantifié les cellules immunoréactives Dcx(+), BrdU(+), TUNEL(+)......	38
Figure 8. Effet de l'infusion d'EGF sur la formation de neuroblastes Dcx(+)	43
Figure 9. Marquage des EGF-R présents au niveau de la ZSV du cerveau de souris non irradié.	46
Figure 10. Marquage des EGF-R présents au niveau de la ZSG de l'Hi du cerveau de souris non irradié.....	47
Figure 11. Marquage des cellules apoptotiques grâce au test TUNEL	50
Figure 12. Effet de l'EGF sur la formation et la prolifération des jeunes neurones Dcx(+)	52
Figure 13. Évaluation de l'effet protecteur de l'EGF sur des lignées leucémiques humaines.	54
Figure 14. Effet de l'infusion d'EGF et des CSM sur la formation de neuroblaste.....	56
Figure 15. Dosage ELISA de la quantité d'EGF sécrété.....	59
Figure 16. Effet de l'injection de CSM, GFP/EGF injectées dans le ventricule droit de la ZSV de la souris sur la formation de neuroblastes Dcx(+)	60
Figure 17. Étude du devenir des CSM, GFP/EGF injectées dans le ventricule droit de la ZSV de la souris irradiée.....	61

Liste des abréviations

Ac : Anticorps

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AVC : Accident Vasculaire Cérébral

BHE : Barrière Hémato-Encéphalique

BrdU : Bromodéoxyuridine

CDK : Cyclines Dépendantes des Kinase

CNP : Cellules Neurales Progénitrices

CSM : Cellules Souches Mésoenchymateuses

CSN : Cellules Souches Neurales

DAPI : 4',6'-diamidino-2-phénylindole

Dcx : Doublecortine

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium

EGF : Facteur de Croissance Épidermique

EGF-R : Récepteur du Facteur de croissance Épidermique

ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

EPO : Érythropoïétine

FCI : Facteur de Croissance à l'Insuline

FCN : Facteur de Croissance Nerveux

GABA : Acide γ -Aminobutyrique

GFAP : Glial Fibrillary Acidic Protein

GFP : Green Fluorescent Protein

GTP : Guanosine Triphosphate

Hi : Hippocampe

ICH : Immunohistochimie

ICT: Irradiation Corporelle Totale

ICV : Intra-Cérébro-Ventriculaire

IP : Intra-Péritonéale

IV : Intra-Veineux

LAL : Leucémie Aiguë Lymphoblastique

LAM : Leucémie Aiguë Myéloblastique

LCR : Liquide Céphalo-Rachidien

O/N : Toute la nuit

OCT : Température de Coupe Optimale

PBS : Phosphate Buffered Saline

RI : Rayon Ionisant

RPMI : Roswell Park Memorial Institute medium

RTK : Récepteur à Tyrosine Kinase

SVF : Sérum de Veau Foetal

TUNEL : Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling

ZSG : Zone Sous granulaire

ZSV : Zone Sous ventriculaire

*Je dédie ce mémoire à ma famille et à mes amis. Ce mémoire est aussi le vôtre.
Merci pour votre soutien, votre amour et la fierté que je peux lire chaque jour dans vos
yeux.*

Remerciements

L'écriture de ces quelques lignes de remerciements annonce la fin de ma maîtrise. Toute la difficulté de cet exercice d'écriture réside dans le fait de n'oublier personne. C'est pourquoi, je tiens à remercier par avance ceux dont le nom n'apparaît pas dans cette page et qui m'ont aidé, d'une manière ou d'une autre.

La première personne que je souhaite remercier est mon directeur de mémoire, Christian Beauséjour. Merci de m'avoir donné la chance de poursuivre mes études de second cycle dans votre laboratoire. Ces deux années de maîtrise m'ont énormément apporté sur le plan professionnel mais également sur le plan personnel. J'ai réellement apprécié la liberté d'action que vous m'avez accordée pour mener à bien ce projet de recherche, tout en gardant un œil critique et constructif.

Ce projet n'aurait pas pu aboutir sans l'aide de mes collègues de laboratoire. Je souhaite donc également remercier Pascal Bardeau, Basma Benabdallah, Lina Palacio Munoz, Gaël Moquin-Beaudry et Oanh Lee pour leur gentillesse, leur disponibilité et leur aide précieuse dans le déroulement de cette maîtrise.

Je tiens aussi à remercier tout particulièrement les membres du laboratoire du Dr Elie Haddad : Mame Massar Dieng, William Lemieux, Silvia Selleri et Panos pour leur bonne humeur infaillible et leur grand soutien au quotidien et dans les moments difficiles. Simon Nicoletti, pour son aide précieuse dans le fonctionnement d'un FACS, ses conseils sur la rédaction de mon mémoire et le temps passé à sa relecture.

Je souhaite aussi remercier tous mes amis en France et, ici, au Québec. Les mois peuvent parfois sembler interminables lorsque l'on est expatrié, loin de chez soi. Mais j'ai toujours pu compter sur votre grand soutien et, malgré la distance, vous avez toujours fait partie de ma vie. À Maëva, Raphie, Maryon, Laura, Anne-Lise, Eva, Leila, Johanna, Tezio, Gaétan, Mathias, Guillaume, Raph et Basile, sans vous l'expérience n'aurait pas été la même.

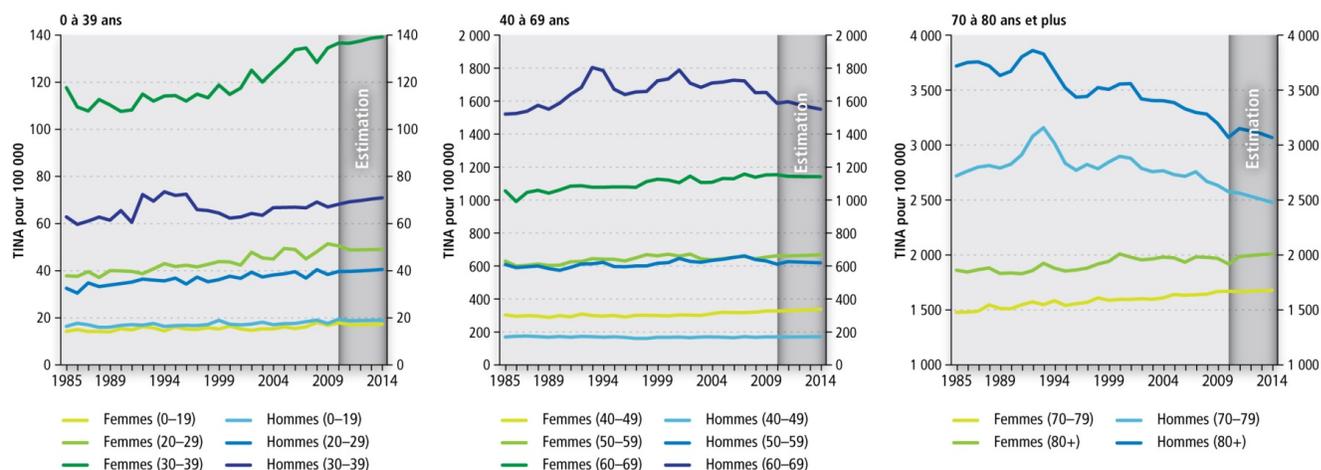
Je tiens à exprimer tout mon amour à ma famille qui, malgré les 8000 km qui nous séparent, a toujours été à mes côtés. Toute mon affection vient à ma grand-mère, à mon père et à mon frère, Maxime. Et, je remercie tout particulièrement ma mère pour tout le temps qu'elle a pu consacrer à la lecture de mon manuscrit et pour ses corrections et suggestions visant à améliorer ce travail.

CHAPITRE I : INTRODUCTION

1.1 MISE EN CONTEXTE

Au Canada, on estime à 191 300 le nombre de nouveaux cas de cancer (à l'exclusion de 76 100 cas de cancer de la peau autres que le mélanome) et à 76 600 celui des décès causés par cette maladie en 2014[1-3]. Ces nombres ne cessent d'augmenter, parallèlement à l'accroissement et au vieillissement de la population.

Les patients atteints de cancers reçoivent différents traitements[4], tels que la radiothérapie ou la chimiothérapie utilisés seuls ou en combinaison pour leurs effets anti-tumoraux afin d'éradiquer les cellules cancéreuses. Ils engendrent de nombreux effets secondaires tels que la mort des cellules du système immunitaire.



Analyse : Division de la surveillance des maladies chroniques, CPSC, Agence de la santé publique du Canada

Figure 1. Taux d'incidence normalisés selon l'âge (TINA) pour tous les cancers, Canada, 1985 à 2014[2]. Analyse effectuée par la division de la surveillance des maladies chroniques, agence de la santé publique du Canada.

Les données épidémiologiques démontrent que, tous types de cancers confondus, les deux principaux pics d'incidence correspondent aux âges extrêmes de la vie c'est-à-dire les enfants et les personnes âgées de plus de 60 ans[5](Figure 1).

La majorité des cancers retrouvés chez les moins de 14 ans sont des leucémies, des neuroblastomes et des cancers touchant le système nerveux central (SNC). Compte tenu de la perspective du développement psychomoteur de l'enfant et de l'immaturation du SNC chez ces patients, il s'avère particulièrement pertinent de s'intéresser aux effets secondaires que provoquent les traitements anticancéreux sur le développement cognitif de cette population de malades (**Figure 2**).

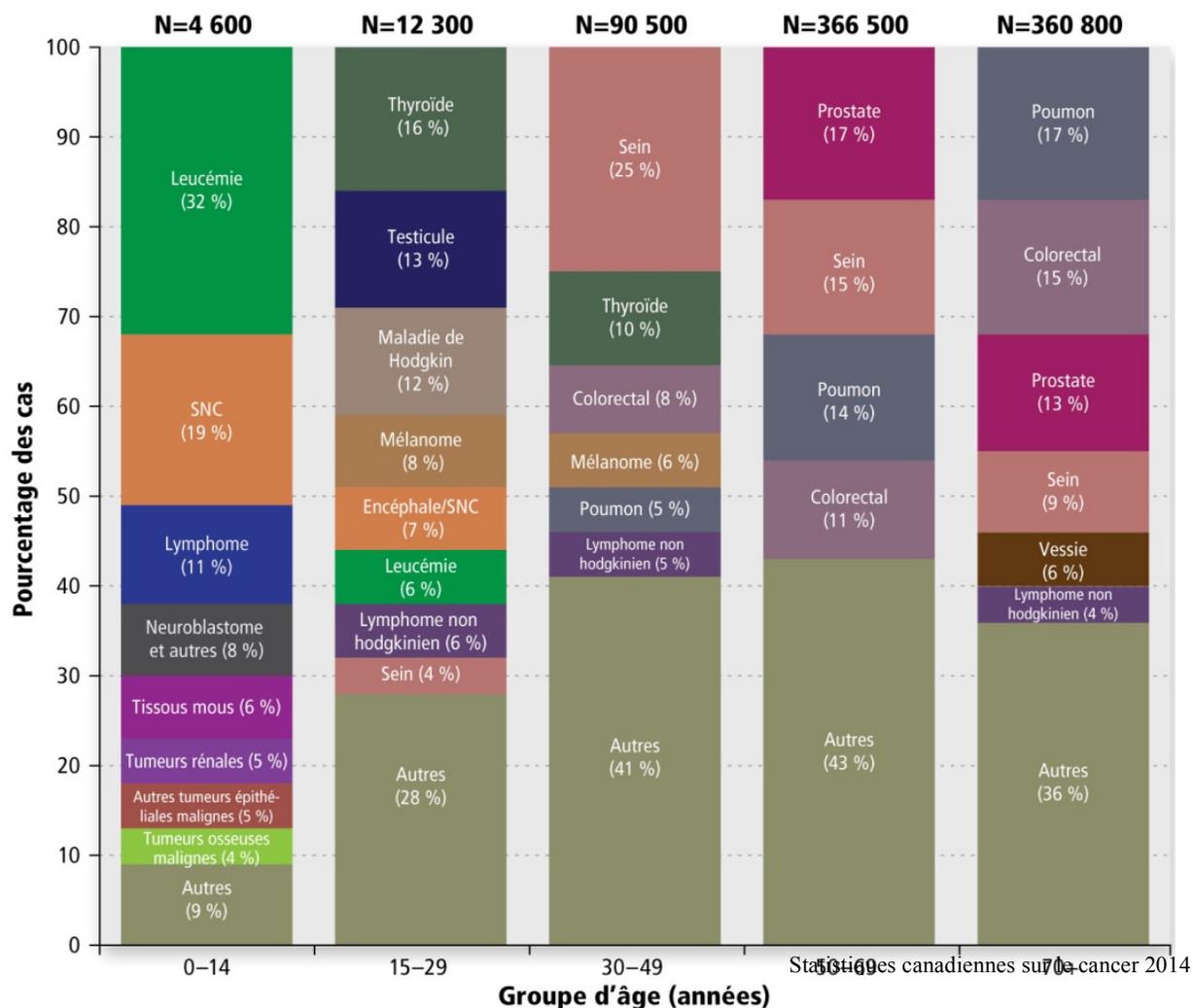


Figure 2. Distribution des nouveaux cas de certains cancers selon le groupe d'âge, Canada, 2006 à 2010[2]. 'N' correspond au nombre total de cas sur cinq ans (2006 à 2010) pour chaque groupe d'âge (SNP = Système nerveux périphérique). Analyse effectuée par la division de la surveillance des maladies chroniques, agence de la santé publique du Canada.

Environ 60% des enfants survivants du cancer sont sujets au développement d'effets secondaires cognitifs, consécutivement aux traitements énoncés précédemment. L'origine moléculaire de ces effets reste encore largement inconnue. On pense que la diminution de la prolifération des cellules souches et progénitrices dans les tissus joue un rôle important dans l'apparition d'effets secondaires relatifs aux traitements des cancers. À cet effet, on peut noter une augmentation de l'expression du gène suppresseur de tumeurs $p16^{INK4a}$ dans les tissus exposés à la radiothérapie. L'augmentation de l'expression de ce gène est considérée comme un mécanisme moléculaire jouant un rôle important dans la diminution de la prolifération cellulaire. Plusieurs études, dont celles réalisées dans notre laboratoire, ont montré que l'expression de $p16^{INK4a}$ augmente dans les tissus de souris ainsi que dans les tissus humains à la suite d'une irradiation aux rayons ionisants (RI). Ce mécanisme permet probablement de prévenir la prolifération de certaines cellules endommagées. Nous croyons également qu'une proportion importante de cellules exprimera le gène $p16^{INK4a}$ en réaction aux modifications du microenvironnement induites par l'irradiation (par exemple suite au stress oxydatif). En effet, le rôle de $p16^{INK4a}$ ne se limite pas seulement à la régulation du cycle cellulaire. Il a également été démontré que $p16^{INK4a}$ était impliqué dans la régulation intracellulaire des espèces réactives à l'oxygène (ROS). Dans un contexte oxydatif où le gène $p16^{INK4a}$ serait inhibé, une accumulation de mutations a été observée prédisposant à un développement tumoral[6]. L'expression de $p16^{INK4a}$, bien que nécessaire pour nous protéger contre le cancer, restreint également la prolifération de cellules importantes à l'homéostasie tissulaire[7, 8].

Notre intérêt s'est porté sur l'effet de l'irradiation sur le cerveau et plus particulièrement sur la neurogenèse qui diminue drastiquement après une irradiation. Nous nous questionnons particulièrement sur s'il serait possible de **restaurer la neurogenèse consécutivement à une irradiation.**

Le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques dans l'optique de contrer les effets secondaires liés à l'irradiation permettrait alors d'augmenter fortement la qualité et l'espérance de vie des patients atteints du cancer.

1.2 CONTENU DU MÉMOIRE

Ce projet de maîtrise porte sur les effets de l'EGF, un facteur de croissance, sur la neurogénèse de la souris après une exposition aux RI. Pour cela, notre premier objectif a été de tester l'effet de l'EGF, un facteur mitogénique activant la voie mTOR. Il permet d'induire la prolifération de la niche de cellules souches neurales (CSN) dans le cerveau adulte [9] et de réduire l'apoptose des cellules souches hématopoïétiques irradiées par l'inhibition de protéines pro-apoptotiques[10].

Nous avons évalué son effet dans le cerveau de souris en utilisant différentes voies d'injections: intra- péritonéal, (IP), intra-veineux (IV) et intra cérébro-ventriculaire, (ICV). Notre second objectif a été de trouver un vecteur de sécrétion. Nous avons donc utilisé des cellules souches mésenchymateuses (CSM) génétiquement modifiées pour ensuite les injecter à des souris afin de sécréter de l'EGF à long terme et de manière continue.

La suite de ce mémoire contient une revue de la littérature couvrant des sujets qui sont pertinents dans le cadre de notre étude. Tout d'abord, le chapitre II aura pour but de passer en revue les différents types de cancers pédiatriques et les traitements associés. Dans le chapitre III, nous verrons que l'irradiation provoque de nombreux effets secondaires et altère les tissus touchés. Nous poursuivrons, dans le chapitre IV, avec le concept de neurogénèse et la recherche qui y est appliquée. Le chapitre V, quant à lui, sera consacré à l'EGF et aux CSM. Les hypothèses du projet de recherche, les différents objectifs et le plan expérimental associé seront abordés dans le chapitre VI. Les chapitres VII et VIII exposeront respectivement les matériels et méthodes et les résultats obtenus tout au long de ce projet de maîtrise. Finalement, le chapitre IX sera réservé à la discussion de ces résultats, aux conclusions et aux perspectives futures liées au projet.

CHAPITRE II

2.1 LES CANCERS PÉDIATRIQUES

2.1.a Les leucémies

Les études statistiques les plus récentes sur la leucémie chez les jeunes âgés de 0 à 19 ans indiquent plus de 1700 cas de leucémie lymphoblastique (LAL) et myéloblastique (LAM). Elles représentent 30% des cancers de l'enfant, mortelles dans 16% des cas, elle surviennent le plus souvent entre 2 et 10 ans[1, 3].

La leucémie est un cancer de la moelle osseuse qui fabrique les cellules du sang. Les cellules souches du sang peuvent se différencier en cellules souches myéloïdes ou en cellules souches lymphoïdes. Les cellules myéloïdes se différencient ensuite en globules rouges, globules blancs ou en plaquettes. Les cellules souches lymphoïdes se transforment en lymphocytes qui sont un type de leucocytes chargés, par exemple, de produire des anticorps et de combattre les infections. Ils possèdent une multitude d'autres fonctions très importantes telle que l'implication dans la lutte contre les cellules cancéreuses qui a donné lieu à de nombreuses études cliniques[11-13].

On distingue plusieurs types de leucémies, qui sont d'abord classées selon le type de cellules souches du sang à partir duquel elles se développent:

- la leucémie myéloïde
- la leucémie lymphoïde ou lymphoblastique (précurseurs des lymphocytes B ou T)

Chaque type se divise ensuite en sous-catégories selon la rapidité avec laquelle la maladie se développe et évolue:

- la leucémie aiguë qui débute soudainement et évolue très rapidement (quelques jours à quelques semaines)
- la leucémie chronique qui se développe lentement (plusieurs mois ou années)

Ces principales caractéristiques ont permis de classer les leucémies en 4 grandes familles:

- la leucémie aiguë lymphoblastique (LAL)
- la leucémie aiguë myéloblastique (LAM)
- la leucémie lymphoïde chronique (LLC)
- la leucémie myéloïde chronique (LMC)

La plus couramment diagnostiquée chez les jeunes enfants est la LAL, suivie de la LAM. Chaque type de leucémie nécessite un traitement particulier et spécifique car chacune évolue de façon distincte[1].

2.2.b Les neuroblastomes et les cancers du système nerveux central

Le neuroblastome est la tumeur maligne solide extra-cérébrale la plus fréquente chez les jeunes enfants. Elle est caractérisée par une grande variabilité clinique et évolutive, allant de la régression spontanée sans aucun traitement à la progression très rapide menant au décès des patients. La chimiothérapie intensive associée à la radiothérapie suffit généralement à la diminution, voire à la disparition de la tumeur. La cause du neuroblastome est inconnue dans la majorité des cas. Il se développe principalement à partir du système nerveux sympathique, principalement le long de l'abdomen et parfois le long de la colonne vertébrale[14]. Les symptômes les plus courants apparaissent car la tumeur exerce une pression sur les tissus voisins en se développant ou dans le cas où le cancer s'est propagé aux os. Dans la plupart des cas, le neuroblastome n'engendre pas de problèmes fonctionnels du système nerveux périphérique. Le traitement dépend de l'âge de l'enfant, du stade d'extension, de la possibilité d'une chirurgie pour extraire la tumeur, ainsi que de l'amplification du gène N-myc. La présence de multiples copies de cet oncogène est associée à un risque élevé de développer des métastases. Pour les tumeurs opérables, la chirurgie seule est souvent suffisante. Pour les tumeurs non-opérables, une chimiothérapie est nécessaire. La radiothérapie reste réservée aux formes de neuroblastomes les plus graves [15].

Les tumeurs cérébrales telles que les médulloblastomes ou les astrocytomes, font également partie des cancers les plus fréquents chez l'enfant. Ces tumeurs se manifestent

par des pertes d'équilibre, des troubles moteurs et sensitifs et/ou une hypertension intracrânienne causée par le blocage de la circulation du liquide céphalo-rachidien (LCR) au niveau du ventricule accompagnés d'une hydrocéphalie. Pour traiter ce genre de tumeurs, la neurochirurgie et la radiothérapie s'imposent car les chimiothérapies s'avèrent peu efficaces.

2.2 LES TRAITEMENTS DES CANCERS PÉDIATRIQUES

Le caractère hétérogène des leucémies et des autres cancers pédiatriques a permis l'utilisation de traitements ciblés selon le phénotype, le génotype et le pronostic. Beaucoup de facteurs affectent le choix et le résultat du traitement incluant le sous-type de leucémies, le dénombrement des cellules leucémiques dans le sang, l'immunophénotype ou la composition chromosomique, l'atteinte du système nerveux central, les antécédents du patient, l'âge et la santé du patient. Pour la majorité des cancers, les approches de traitements spécifiques diffèrent, mais consistent généralement en un traitement d'induction (par chimiothérapie et radiothérapie), suivi d'un traitement de consolidation et d'entretien pour éliminer les traces de tumeurs[16].

2.2.a La radiothérapie

Depuis près d'un siècle, la radiothérapie fait partie de l'arsenal thérapeutique pour combattre le cancer[17]. En cas d'irradiation corporelle totale, elle était auparavant utilisée seule puis a ensuite été combinée avec la chimiothérapie[18]. Le fait de fractionner la dose d'irradiation reçue par le patient a permis de réduire la toxicité de cette procédure de façon significative mais de nombreux effets secondaires à court, moyen et long terme persistent.

La technique consiste à utiliser les rayons gamma (γ), de même nature que les rayons X, pour tuer les cellules cancéreuses, tout en préservant les cellules saines. Les rayonnements γ sont des rayonnements électromagnétiques très énergétiques qui sont

issus du noyau de l'atome radioactif lors de sa désintégration. L'unité de dose absorbée par la matière est le Gray (Gy). Dans les traitements d'induction standard associés à la chimiothérapie, l'irradiation corporelle totale (ICT) est pratiquée à des doses de 12 Gy[19].

La radiothérapie endommage l'ADN des cellules, du fait de l'ionisation des atomes qui composent l'ADN. Des radicaux libres sont alors formés, notamment hydroxyles, qui endommagent la double hélice d'ADN en créant des cassures. Les cellules normales possèdent des mécanismes puissants de réparation pour pallier ce genre de lésions. Les cellules cancéreuses, en revanche, possèdent de nombreuses instabilités génomiques en raison de mutations fréquentes. Leur système de réparation de l'ADN est beaucoup moins efficace et ne parvient pas à réparer les nombreuses lésions causées par les rayons ionisants. Ces cellules sont donc plus sensibles à la radiothérapie et, en s'accumulant, les dommages entraînent leur entrée en apoptose ou diminuent fortement leur prolifération.

L'irradiation crânienne peut causer beaucoup de complications à court et long terme, incluant des cancers secondaires, dus aux effets indésirables sur les cellules des tissus sains, ou des déficits cognitifs[16]. Cependant, dans la plupart des centres cliniques, l'irradiation est toujours recommandée pour les patients à très haut risque de rechute ayant des blastes leucémiques dans le LCR. Lorsqu'elle est appliquée aux neuroblastomes et aux cancers du SNC, la radiothérapie peut être prescrite avant ou après la chimiothérapie. Elle permet, entre autres, de réduire la taille de la tumeur, de soulager la douleur et de maîtriser les symptômes. Elle peut aussi être utilisée dans le cadre d'un traitement préparatoire avant une greffe de cellules souches.

2.2.b La chimiothérapie

La chimiothérapie est un traitement systémique médicamenteux ralentissant ou bloquant la division, la prolifération et la propagation des cellules cancéreuses. Il existe de nombreux agents chimiothérapeutiques, employés seuls ou en association. Ils possèdent une structure chimique unique mais leurs mécanismes d'action et les effets secondaires qu'ils engendrent peuvent être différents.

La première phase de la chimiothérapie est appelée induction. Les drogues, leur dosage et la durée de leur administration, dépendent de plusieurs facteurs incluant les caractéristiques spécifiques du cancer traité ainsi que l'âge et la santé du patient. Étant donné la gravité de la maladie et les effets secondaires de la thérapie, le patient est hospitalisé entre quatre et six semaines. Dans le cas des leucémies, l'objectif du traitement d'induction est d'éradiquer plus de 99% du nombre initial de cellules leucémiques et de restaurer une hématopoïèse normale. En général, ce traitement d'induction consiste à administrer une chimiothérapie, c'est-à-dire à utiliser une combinaison de plusieurs médicaments (méthotrexate, cytarabine, cyclophosphamide, dexaméthasone ou prednisone, vincristine, L-asparaginase, et/ou un anthracycline) qui vise à tuer et stopper la croissance des cellules cancéreuses [20].

D'autres options dans le traitement de la leucémie ou des neuroblastomes sont couramment pratiquées, comme la greffe de cellules souches. Cette dernière est presque systématiquement associée à de fortes doses de cyclophosphamide et à une irradiation corporelle totale qui est, le plus souvent, prescrite pour traiter ou pour prévenir la propagation de la maladie[21, 22]. Dans le cas du traitement de cancers du SNC, la chimiothérapie est décevante et peu utilisée.

Même lorsqu'un patient est en rémission, il subsiste toujours quelques cellules leucémiques. De ce fait, d'autres traitements, à savoir le traitement de consolidation et le traitement d'entretien, sont nécessaires pour éradiquer toutes les cellules cancéreuses et éviter les rechutes. Le traitement de consolidation est administré en cycles de quatre à six mois et est généralement suivi d'une thérapie d'entretien qui s'étend sur une période de deux ans[23]. Les médicaments utilisés pendant ces deux phases sont, en général, différents de ceux utilisés lors du traitement d'induction.

CHAPITRE III : LES EFFETS SECONDAIRES LIÉS À L'IRRADIATION

L'homme est exposé en permanence à des rayonnements d'origine naturelle ou artificielle. Les effets des rayonnements ionisants sur l'organisme varient en fonction de la dose reçue et de différents facteurs : la source (activité ou intensité de fonctionnement, nature, énergie ...), le mode d'exposition (temps, débit ...) et la cible (tissus ou organes touchés, âge de l'individu ...).

Il existe deux types d'effets biologiques:

- Les effets à court terme (effets déterministes) : une forte irradiation par des rayonnements ionisants provoque des effets immédiats sur les organismes tels que des brûlures plus ou moins importantes. En fonction de la dose et selon l'organe touché, le délai d'apparition des symptômes varie de quelques heures (nausées, radiodermite) à plusieurs mois.
- Les effets à long terme (effets aléatoires ou stochastiques) : les expositions à des doses plus ou moins élevées de rayonnements ionisants peuvent avoir des effets à long terme sous la forme de cancers, de troubles endocriniens et de troubles du développement chez l'enfant[24]. La probabilité d'apparition de ces effets est de plusieurs années après l'exposition et augmente avec la dose

3.1. Effets secondaires immédiats à court terme

Les rayons ionisants entraînent une destruction massive des cellules proportionnellement à la dose d'irradiation reçue par l'organe ou le tissu touché. À court terme (quelques heures), l'irradiation provoque des lésions. Au niveau cellulaire, cela se traduit par de nombreux dommages à l'ADN, entraînant la surexpression du gène p53, impliqué dans le cycle cellulaire et responsable de l'entrée en apoptose des cellules[25]. Ce sont les effets déterministes. Le délai d'apparition des symptômes peut varier de quelques heures (entraînant l'apparition d'érythèmes ainsi qu'une réaction inflammatoire) à plusieurs mois et de nombreux effets secondaires tels que des fibroses ou encore la cataracte[26] peuvent survenir des années plus tard.

Le gène p53 est un régulateur important assurant l'intégrité du génome. Il est communément appelé le «gardien du génome». La protéine p53 est activée en présence de dommages à l'ADN et arrête le cycle cellulaire en augmentant la protéine p21 qui inhibe les kinases dépendantes des cyclines, ce qui permet à la cellule de réparer les dommages génétiques avant la division cellulaire. Le gène p53 peut aussi activer la voie de mort cellulaire programmée (apoptose)[27, 28].

3.2 Effets secondaires à moyen et long terme

Les effets à plus long terme sont appelés effets stochastiques. Ils sont associés aux dommages persistants de l'ADN ainsi qu'à la transformation néoplasique des cellules. L'effet dépend de la dose reçue (unique ou fractionnée) et le délai d'apparition des symptômes, après l'exposition, est de plusieurs années[29]. Il s'agit principalement d'atteintes du système endocrinien telles que des dysfonctionnements thyroïdiens entraînant la formation de nodules et de cancers solides secondaires, associés à des troubles gonadiques ainsi qu'à des troubles du développement osseux[24]. L'apparition d'autres types de cancers secondaires a également été mise en évidence. Après un traitement de chimiothérapie combiné à la radiothérapie, certains patients, initialement traités pour une LAL ou LAM, ont développé des cancers de l'œsophage et de la cavité

orale, des tumeurs ovariennes et de l'urètre, des cancers gastriques ainsi que des cancers touchant le SNC[30].

En plus des dommages à l'ADN qui s'accumulent, on observe une réduction du potentiel répliatif des cellules progénitrices et des cellules souches. Ce phénomène contribue à l'apparition de complications à long terme, à une accélération du vieillissement et donc à une réduction de l'espérance de vie chez les patients. De nombreux autres stimuli, comme le stress oxydatif ou la surexpression d'oncogènes, peuvent provoquer l'entrée des cellules dans un stade de quiescence communément appelé sénescence.

Ces stimuli sont à l'origine de l'activation de plusieurs voies de signalisation telles que l'activation de p53 et d'inhibiteurs de cycline kinase (CDK), par exemple, p16^{INK4a}, p21 et p27. L'inhibition des complexes CDK- cycline quant à elle, entraînerait un arrêt de la prolifération[31].

3.3 Signes d'altération clinique après l'irradiation

Une étude rétrospective à long terme, nommée « Childhood Cancer Survivor Study », a montré que les effets secondaires à long terme affectaient la fonction cardiaque, engendraient des problèmes de fertilité et pouvaient provoquer le déclenchement de nouveaux cancers.

Plus de 40% des 10 000 adultes survivants participant à l'étude clinique ont développé un problème de santé majeur et environ 33% souffrent de problèmes de santé multiples[32].

Cependant, le risque de développer ces problèmes de santé est influencé par de nombreux autres facteurs incluant le type de cancer, l'âge auquel débute le traitement, le type de traitement, les prédispositions génétiques, les antécédents médicaux ou encore le mode de vie avant le développement du cancer (comme par exemple le fait de pratiquer une activité sportive)[33]. Les jeunes enfants sont plus particulièrement touchés par les effets secondaires neurotoxiques, cardiovasculaires ou encore par des troubles de la fonction endocrinienne étant donné qu'ils n'ont pas encore terminé leur croissance[34].

Au niveau du cerveau, certaines thérapies vont altérer la substance blanche, les fonctions intellectuelles, psychomotrices et sensorielles[35]. Le processus de myélinisation, qui s'étend de la naissance jusqu'à l'âge de 20 ans, peut aussi être interrompu[36]. Des dommages de la substance blanche ou des leuco-encéphalopathies surviennent en raison d'une immunosuppression profonde qui induit le développement d'infections opportunistes, entre autres, suite à la réactivation de poliovirus. Cette dernière pathologie est l'une des manifestations et causes de morbidité les plus fréquentes suite aux traitements des cancers. Elle survient après l'irradiation crânienne et l'administration de fortes doses de méthotrexate, connu pour être neurotoxique[37]. L'association d'agents de chimiothérapie et de radiothérapie entraîne des changements de structure dans le cerveau, incluant des modifications vasculaires, des calcifications cérébrales ainsi qu'une augmentation de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique (BHE). Ceci pourrait expliquer des effets neurotoxiques directs, une neuro-inflammation et l'obstruction de vaisseaux sanguins[38]. Outre ces problèmes neurologiques, viennent s'ajouter des problèmes moteurs et sensoriels entraînant des déficits cognitifs chez les patients survivants au cancer[39].

3.4 Les dysfonctions cognitives associées à la radiothérapie

La cognition désigne l'ensemble des processus mentaux tels que la mémoire, le langage, le raisonnement, l'apprentissage, l'intelligence, la capacité à résoudre des problèmes, la rapidité dans la prise de décision, la perception ou encore l'attention.

Depuis l'augmentation du taux de survie des enfants aux cancers pédiatriques, un nombre croissant d'enfants deviennent des survivants du cancer à long terme. Ces survivants éprouvent aujourd'hui des déficits neurocognitifs à long terme, tels que des troubles de l'apprentissage, des troubles de l'attention et des troubles de la mémoire. Les troubles de la mémoire, de la rapidité de traitement de l'information et d'attention surviennent chez 40% des enfants survivants du cancer et nuisent souvent au fonctionnement scolaire, social et professionnel[40]. Au niveau cognitif on remarque plus particulièrement une réduction globale du QI chez ces enfants comparés à des enfants qui n'ont jamais été traité pour un cancer[41]. Il a également été observé des déficits de certaines fonctions cognitives spécifiques incluant la parole, les aptitudes spatio-visuelles, l'attention, la mémoire et la vitesse psychomotrice. Plus récemment,

des études ont évalué sur la vitesse de la prise de décision et la mémoire qui sont des domaines particulièrement touchés chez les enfants survivant du cancer. Ceci serait dû au fait que ces fonctions seraient plus sensibles aux dommages que l'irradiation crânienne inflige à la matière blanche[41].

De nombreuses études sont aujourd'hui en cours et de nombreux enfants survivants du cancer sont suivis sur plusieurs années suite à la fin de leur traitement. Une meilleure compréhension des mécanismes conduisant aux déficits cognitifs observés permettrait de mieux cibler les traitements anti-cancéreux ou de mettre en place des nouvelles thérapies ciblant les effets secondaires qu'engendre l'irradiation.

CHAPITRE IV

4.1 LA NEUROGÉNÈSE

4.1.a Définition

On entend par neurogénèse l'ensemble du processus qui permet la création d'un neurone fonctionnel au sein du système nerveux central (SNC), et ce, à partir d'une cellule souche neurale[42]. La neurogénèse permet la formation et le développement du cerveau. Elle peut aussi répondre à un traumatisme[43] (AVC, ischémie,...) et permettre la réparation ou la cicatrisation de cellules endommagées du cerveau via l'activation de cellules souches neurales endogènes[44-46].

En plus de la formation de nouveaux neurones, on observe aussi la formation de nouvelles cellules qui sont essentielles au sein du SNC. Ce processus est rendu possible grâce à la migration de cellules souches qui vont générer des précurseurs neuronaux qui vont à leur tour migrer et proliférer. En fonction de différents facteurs génétiques et environnementaux, ils vont se différencier en oligodendrocytes, en astrocytes ou encore en neurones qui ne se divisent plus.

Si le cerveau est soumis à d'importantes modifications au cours de son développement, il reste cependant encore très «plastique» après sa maturation. C'est en 1969 que sa capacité à produire de nouveaux neurones a été démontrée[47] et que l'existence d'une neurogénèse adulte a été observée chez de nombreuses espèces, y compris chez l'Homme.

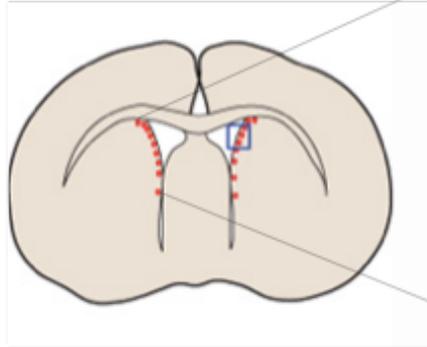
On distingue deux types de neurogénèses:

- primaire, qui est le processus de développement du cerveau chez l'embryon et le jeune enfant.
- secondaire, qui perdure chez l'adulte et peut se manifester en réponse à un traumatisme ou à une maladie.

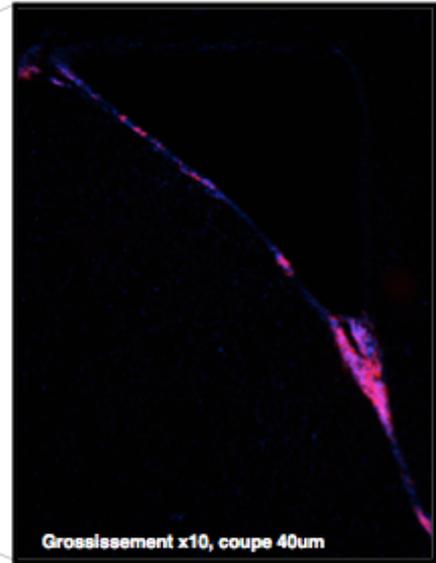
4.1.b Les deux zones neurogéniques

L'une des zones de neurogénèse les plus importantes chez l'adulte se trouve dans la zone sous ventriculaire (ZSV)[48]. Les précurseurs des neurones produits dans cette région migrent vers le bulbe olfactif et se différencient en interneurones[49]. D'autres cellules souches sont aussi localisées dans d'autres structures du cerveau telles que la zone sous granulaire (ZSG) de l'hippocampe (Hi) [50, 51], (**Figure 3**). La neurogénèse dans le cerveau est associée à des processus d'apprentissage et de mémorisation dans l'hippocampe et dans le bulbe olfactif, par exemple. Ces régions sont donc importantes pour le développement cognitif. Malgré un intérêt majeur pour l'étude de la neurogénèse secondaire, des interrogations persistent, notamment sur son existence dans d'autres régions du cerveau[52] ou sur l'intégration des nouveaux neurones formés dans un réseau mature. Ces neurones peuvent-ils alors s'intégrer aux autres cellules sans altérer la stabilité d'un réseau neuronal pré-existant ? La neurogénèse dépend de processus variés comme la prolifération, la migration, la différenciation et la mort cellulaire. Peut-on affirmer pour autant que l'ensemble de ces mécanismes présents au stade embryonnaire sont identiques chez l'adulte[53] ?

A

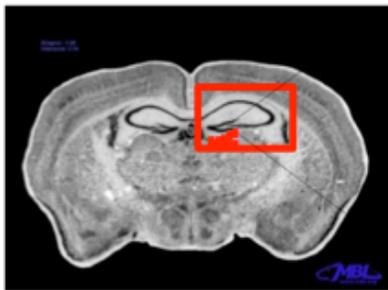


Coupe coronales du cerveau de souris

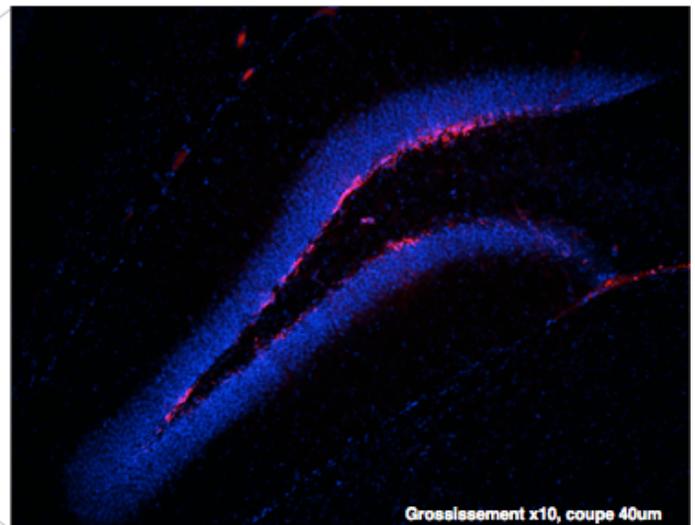


Prolifération des NPC coté latéral du ventricule

B



Coupe coronales du cerveau de souris



Prolifération des NPC dans la zone subgranulaire (SGZ)

Figure 3. Schématisation de la ZSV (**A**) et de l'Hi (**B**) chez la souris et zone spécifique où l'on observe de la neurogénèse. Le marqueur utilisé ici est la doublecortine (en rouge), exprimée par les neuroblastes.

4.2 LA RECHERCHE APPLIQUÉE À LA NEUROGENÈSE

La neurogénèse adulte est un processus séquentiel, durant lequel une cellule souche neurale quiescente peut être activée et entamer les étapes de prolifération, différenciation, maturation et d'intégration fonctionnelle. Chaque phase se distingue avec une morphologie caractéristique, des marqueurs membranaires spécifiques et une régulation positive de certains gènes. L'identification de ces différentes phases est importante afin de comprendre les mécanismes de régulation qui sont mis en jeu ainsi que toute modification dans ces processus qui pourrait être à l'origine du déclenchement de pathologies. Les méthodes traditionnelles de l'immunohistochimie (IHC), qui suivent la fixation des tissus, permettent de visualiser les différents types de cellules présentes. C'est généralement par l'action d'anticorps, qui lient leurs antigènes, que l'on peut identifier les cellules correspondantes. Dans la région ZSV par exemple, on note plusieurs types de cellules progénitrices comme les cellules gliales, les progéniteurs de cellules neurales et les neuroblastes qui possèdent respectivement, entre autres, les marqueurs cellulaires de surface de la nestine, de mash1 et de la doublecortine (Dcx) (**Figure 4**). Les progéniteurs de cellules neuronales ont également une capacité de migration[54]. Le glial fibrillary acidic protein (GFAP) est un marqueur membranaire pour les astrocyte de type 1 et 2. En effet, il est le constituant majeur des filaments intermédiaires gliaux retrouvés dans les astrocytes différenciés du SNC. Ces derniers produiraient les molécules de la matrice extracellulaire qui joueraient un rôle de protection contre le milieu externe et fourniraient des facteurs pour la survie et la direction de la migration des nouveaux neurones[55] (**Figure 4**).

La découverte d'une neurogénèse dans les cerveaux adultes génère beaucoup d'espoirs pour le développement de nouveaux traitements pour différentes pathologies touchant le tissu nerveux. Le but des recherches actuelles serait de rediriger la neurogénèse vers des sites de lésions spécifiques et d'être ainsi capable de combler le manque de neurones avec les propres cellules du patient et/ou en limitant les interventions chirurgicales. Il existe de nombreuses pathologies qui seraient associées à un déficit de la neurogénèse comme celles liées au développement, au vieillissement ou encore d'autres qui touchent essentiellement l'adulte. Nous avons par exemple toutes les

pathologies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer (atteintes des voies cholinergiques)[56], la maladie de Parkinson (atteintes des neurones dopaminergiques et de la substance noire)[57], ou encore la maladie de Huntington (atteinte des neurones GABA inhibiteurs)[58]. On peut également citer des pathologies démyélinisantes comme la sclérose en plaque (atteinte des oligodendrocytes), ou bien des tumeurs telles que les gliomes[59].

Récemment, l'attention s'est portée sur l'implication de la neurogénèse, de la ZSG, de l'hippocampe et de la ZSV dans différentes pathologies ainsi que dans les troubles de l'humeur[60]. De nombreux facteurs améliorent la neurogénèse dans l'hippocampe comme par exemple, certains médicaments (antidépresseurs)[60], des neurotransmetteurs, ou encore l'exercice physique. En revanche, d'autres la suppriment, tels l'âge, le stress mais aussi les glucocorticoïdes[52].

D'autres études ont montré que des facteurs de croissance tels que l'EGF jouaient un rôle important dans la neurogénèse. Ce dernier serait capable de stimuler les cellules neurales progénitrices (CNP) quiescentes dans la ZSV de souris âgées par l'activation de la voie de signalisation mTOR[9]. Plus encore, des chercheurs ont montré l'existence d'une interaction des voies de signalisation Notch et EGF-R avec le maintien des niches de CSN et de CNP dans la ZSV. Notch régule plus particulièrement l'identité et l'auto-renouvellement des CSN tandis que l'EGF-R impacte directement la prolifération et la migration des CNP[61]. Ces découvertes ont permis d'établir l'existence de liens fondamentaux entre la voie de signalisation de l'EGF-R, la prolifération et la quiescence associée à l'âge dans la niche de CSN et de CNP du cerveau adulte. Le maintien de ces niches cellulaires est essentiel pour garder une genèse cellulaire dynamique en réponse à des changements physiologiques ou pathologiques comme le vieillissement ou suite à des dommages au cerveau[62, 63].

La transplantation de CSN ou encore de CSM, est également un gros espoir thérapeutique et pourrait éventuellement être utilisée pour traiter une variété de troubles psychiatriques et neurologiques. Ces cellules présentent un énorme potentiel et pourraient permettre de réparer des lésions cellulaires causées par divers traumatismes ou maladies neurodégénératives[52].

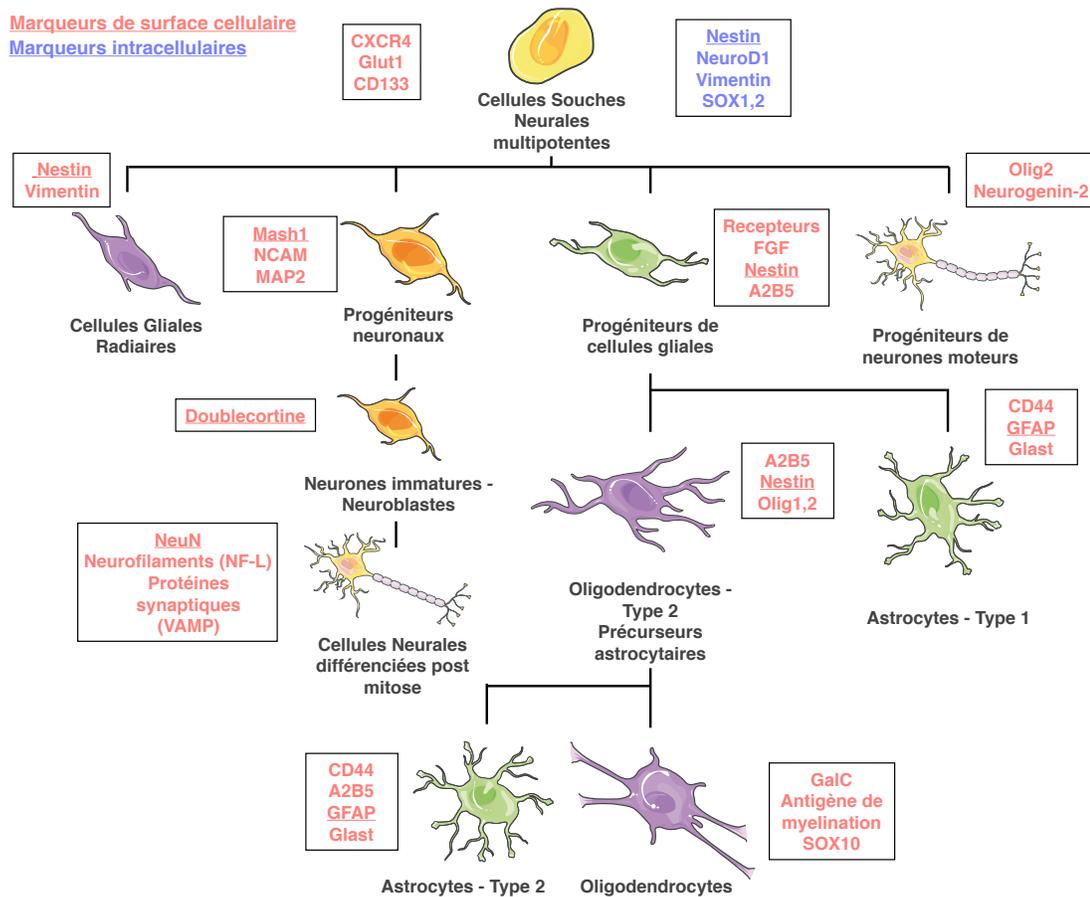


Figure 4. Les principaux marqueurs intracellulaires ou membranaires caractéristiques des différents types cellulaires impliqués dans le lignage neural[64].

CHAPITRE V

5.1 LE FACTEUR DE CROISSANCE ÉPIDERMIQUE

5.1.a La grande famille des protéines EGF

L'EGF est un facteur de croissance aux multiples actions faisant partie d'une grande famille protéique. Son rayon d'action s'étend sur l'ensemble des tissus. Stanley Cohen a découvert l'EGF à partir de glandes salivaires de souris[65], ce qui lui a valu de remporter le prix Nobel de médecine, en 1986. Il a ainsi mis en évidence l'existence d'un précurseur à l'EGF dont l'ARMm fait environ 4800 pb. Ce dernier devient alors un pré-EGF qui est une protéine de 1217 acides aminés [66]. Des études ont montré que la forme pré-EGF était également présente sous forme de protéine glycosylée à la surface des cellules. Il est intéressant de noter qu'au départ, une molécule de pré-EGF[67] clivée donne la forme mature de 53 acides aminés qui est la forme active de l'EGF. Elle représente seulement 4% de la masse du précurseur (pré-EGF).

La famille des molécules d'EGF regroupe onze facteurs de croissance connus possédant des structures et des fonctions très similaires[68]. Leur séquence protéique contient 6 résidus cystéines, formés de 3 ponts disulfures qui génèrent une structure tridimensionnelle essentielle pour la forte affinité de liaison avec leur récepteur cellulaire à la surface de la cellule.

Cette famille comprend par exemple les protéines suivantes: TGF α (le facteur de croissance transformant alpha), HB-EGF (le facteur de croissance lié à l'héparine ressemblant à l'EGF), amphiregulin (AR) et neuregulin-1 (NRG1) (**Tableau 1**).

Ces molécules, toutes semblables à l'EGF, possèdent trois caractéristiques principales:

- elles se lient à l'un des quatre récepteurs à l'EGF
- elles sont à l'origine d'une réponse mitogénique sur des cellules sensibles à l'EGF
- leur structure est d'environ 50 à 60 acides aminés

Les six résidus cystéines se retrouvent à la surface d'un grand nombre de cellules. Ceci explique l'engouement et le succès de la recherche sur les antagonistes du récepteur à l'EGF du fait qu'ils ciblent tout ce qui concerne le développement, l'adhésion et les interactions cellulaires[67].

5.1.b Interactions avec les récepteurs à l'EGF

L'action des facteurs de croissance de la famille de l'EGF est médiée par une famille de quatre récepteurs membranaires ubiquitaires appelés ErbB (analogie avec un oncogène du virus d'érythroblastose aviaire) ou HER (human EGF receptor related) (**Tableau 1**).

Facteurs de croissance	Récepteurs reconnus
EGF (Facteur de croissance épidermique)	EGF-R
AR (Amphiréguline)	EGF-R
TGF-alpha	EGF-R
EPG (Epigène)	EGF-R
BTC (Bêtacelluline)	EGF-R, ErbB4
HB-EGF (heparin-binding EGF)	EGF-R, ErbB4
EPR (Epiréguline)	EGF-R, ErbB4
NRG (Neuréguline, 4 gènes, nombreux isoformes)	ErbB3, ErbB4
Récepteurs de facteurs de croissance	Ligands reconnus
EGF-R (récepteur à l'EGF) = ErbB1, HER1	Tous sauf NRG
ErbB2 ou HER2	Aucun
ErbB3 ou HER3	NRG1 et 2
ErbB4 ou HER4	BTC, HB-EGF, EPR, NRG1 à 4

Tableau 1. Les facteurs de croissance de la famille de l'EGF et leurs récepteurs. Tableau adapté de Hubert P. Les facteurs de croissance de la famille de l'EGF et leurs récepteurs. Bull Cancer. 2006:17-24.

Les quatre récepteurs ErbB sont des récepteurs transmembranaires et font partie de la famille des récepteurs à tyrosine kinase possédant une forte homologie de structure primaire (40-45%). Nombre de ces récepteurs sont des proto-oncogènes impliqués dans l'oncogenèse et suscitent un grand intérêt en ce qui concerne le développement de nouvelles thérapies anti-cancéreuses. Suite à la liaison de leur ligand respectif tel que l'EGF, on observe une dimérisation du récepteur. Une activation de l'activité tyrosine kinase est induite après la dimérisation, ce qui se traduit par la phosphorylation de résidus tyrosine présents sur les récepteurs, puis par le recrutement de protéines possédant des motifs de reconnaissance pour ces phosphotyrosines (domaines SH2). Ces événements vont entraîner l'activation de diverses voies de signalisation, telles que les voies MAP kinases, PI3 kinase, phospholipase C, etc... Les récepteurs ErbB possèdent des sites de phosphorylation sur des tyrosines différentes, ce qui crée de la diversification au niveau des voies de signalisation activées en fonctions des ligands[69]. On a ainsi une très grande variabilité pour la génération de signaux intercellulaires. Les voies principales que sont les voies des MAP kinase et PI3K/AKT/mTOR sont décrites plus en détails ci-dessous:

C'est par le domaine SH3 de la protéine GRB2 que le facteur RAS-GEF est recruté, ce qui induit l'activation de RAS-GTP qui recrute la protéine RAF au niveau de la membrane. RAF phosphorylé, active à son tour une MAP kinase (activateur de mitose). Les facteurs de transcription nommés JUN et TCF sont alors phosphorylés, permettant ainsi l'expression de certains gènes. La voie des MAP kinases induit principalement une augmentation de l'activité de transcription de la cellule et une augmentation de la réplication de l'ADN. Ceci provoque une stimulation de la division et de la croissance cellulaire (mitose).

La voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR, quant à elle, est importante dans la régulation du cycle cellulaire. La phosphorylation de PI3K active AKT qui peut alors phosphoryler et activer mTOR et CREB. CREB régule la transcription de gènes anti-apoptotiques comme par exemple Mcl-1, Bcl-2 ou c-Jun. L'activation de cette voie de signalisation provoque la diminution de l'entrée des cellules en apoptose et permet donc la survie cellulaire [70](**Figure 5**).

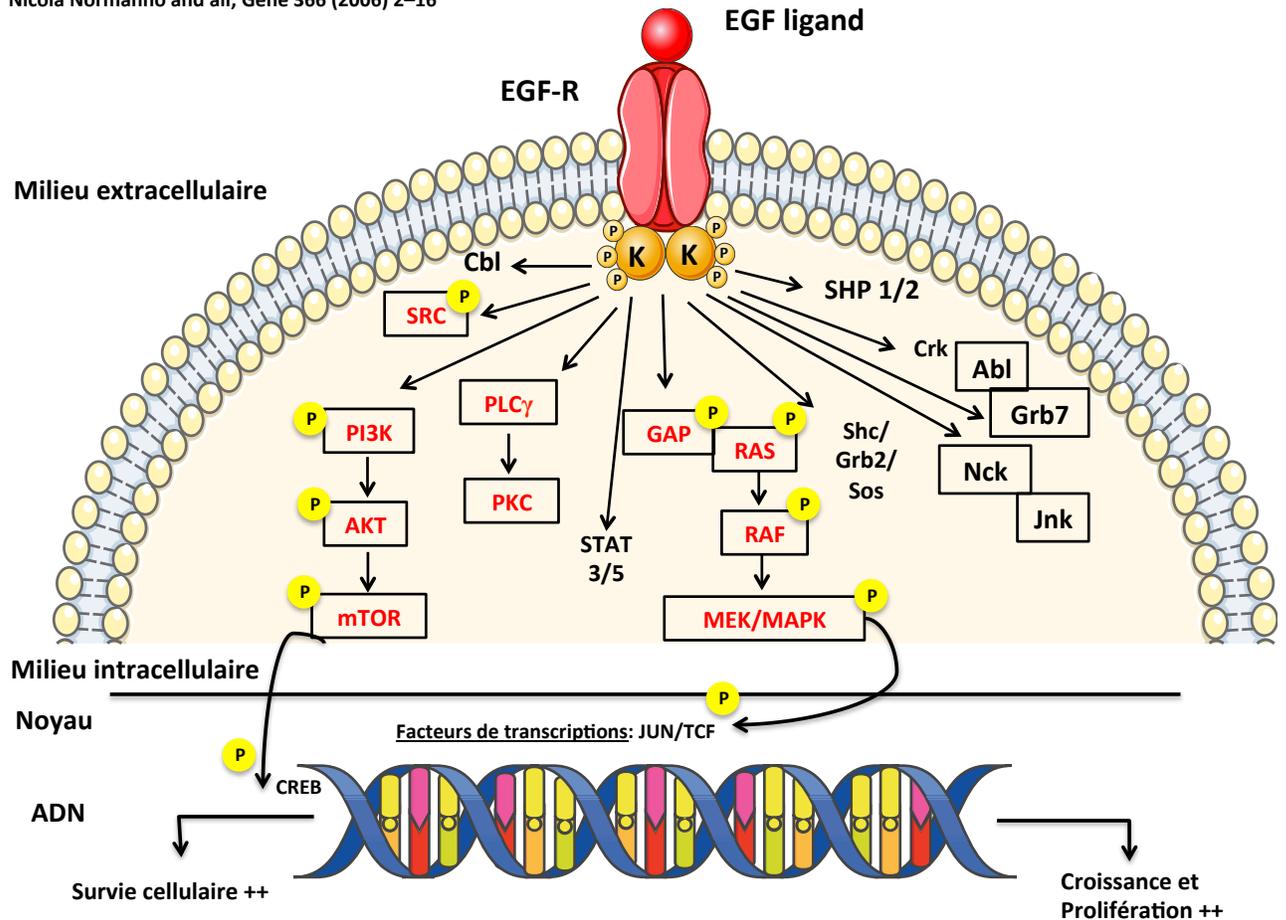


Figure 5. Principales voies de signalisations activées par les récepteurs à l’EGF. La liaison du ligand EGF au domaine extracellulaire du récepteur induit sa dimérisation, menant à l’activation de cascades de phosphorylation (P) via des kinases. Le récepteur à l’EGF permet d’activer la survie via la voie PI3K/STAT et la prolifération/croissance via la voie MAPK. Schéma adapté de Normanno N, De Luca A, Bianco C, Strizzi L, Mancino M, Maiello MR, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. Gene. 2006;366(1):2-16.

La répartition tissulaire des récepteurs ErbB et de leurs ligands indique leur rôle très important dans le développement du système cardiovasculaire (ErbB2 en particulier), du système nerveux et d'autres épithéliums[71].

Nous nous intéresserons principalement à l'EGF-R (ErbB1 ou HER1) qui est le récepteur le plus connu et décrit dans la littérature.

5.1.c L'EGF : implication dans la genèse cellulaire

Malgré son implication dans de nombreux cancers, l'effet de l'EGF sur son récepteur peut avoir des effets bénéfiques. Par exemple, sur la prolifération de progéniteurs neuronaux ou sur l'expansion et la production de neuroblastes différenciés dans la ZSV qui migrent en réponse à un dommage, dans d'autres zones du cerveau (bulbe olfactif ou autres régions lésées)[63]. L'interaction de ligand EGF avec son récepteur joue un rôle particulièrement important dans l'expansion et la prolifération des cellules neurales progénitrices[9]. En effet, l'EGF-R est exprimé à la surface de ces progéniteurs ainsi que d'autres sous-populations de cellules souches neurales[72, 73]. L'EGF est notamment utilisé de manière routinière en culture cellulaire pour isoler et permettre l'expansion des progéniteurs neuronaux isolés à partir du cerveau adulte[73]. De plus, il a été démontré que les souris modifiées génétiquement pour ne plus métaboliser la forme active du TGF α (un autre ligand du EGF-R), avaient une réduction significative de la neurogenèse dans la ZSV[74].

Une étude a également montré que l'EGF est capable de réguler la prolifération et la régénération des cellules hématopoïétiques après une irradiation, par l'activation des voies de signalisations des MAPK et PI3k/Akt[10, 75, 76]. Elle suggère également qu'une administration systémique d'EGF pourrait avoir un potentiel thérapeutique pour accélérer la récupération de la capacité hématopoïétique des patients ayant reçu une irradiation corporelle totale (ICT) avant, par exemple, une greffe de moelle osseuse[10].

Ceci démontre bien l'importance de la voie de signalisation de L'EGF-R. Elle représente potentiellement une cible thérapeutique quant à la modulation de la neurogenèse chez les personnes âgées, dans un cas pathologique ou encore suite à des dommages affectant le SNC.

5.2 LES CELLULES SOUCHES MÉSENCHYMATEUSES

Les thérapies géniques, couplées aux thérapies cellulaires, sont devenues des approches très intéressantes pour traiter des maladies chroniques telles que les insuffisances rénales[77] ou en médecine régénérative[78]. Ces nouvelles thérapies offrent une alternative aux thérapies géniques classiques, beaucoup moins sûres d'utilisation, et ont été utilisées dans diverses études cliniques[79, 80]. Les cellules souches mésenchymateuses (CSM) sont des cellules progénitrices non hématopoïétiques originaire de la moelle osseuse. Elles sont connues pour leur capacité d'adhérence, leur grand pouvoir prolifératif, leur inertie et la facilité avec laquelle on peut les modifier génétiquement *in vitro*. Elles sont très faciles d'utilisation en laboratoire et sont aussi très faciles à prélever chez les patients, sans causer de douleurs majeures puisqu'elles sont également présentes en grande quantité dans le tissu adipeux[55]. Les stratégies thérapeutiques, basées sur la transplantation autologues de CSMs, permettent d'éviter tout problème lié au risque de rejet immunitaire. Toutes ces caractéristiques font d'elles des candidates de premier choix pour les thérapies géniques associées aux thérapies cellulaires. Il a déjà été démontré que des CSM autologues générées pour sécréter de l'érythropoïétine (EPO), étaient capable de la produire pour traiter une anémie avec insuffisance rénale chronique chez la souris [81, 82]. Cependant, malgré le succès de ces études, les effets à long terme sont limités car la viabilité des CSM est relativement courte *in vivo*, ce qui compromet l'efficacité de la thérapie[83]. Il est donc intéressant d'améliorer la viabilité et la survie des cellules implantées. Le facteur de croissance 1 ressemblant à l'insuline (IGF-1) est une protéine intéressante pour l'amélioration de la viabilité des cellules *in vivo*. Il permet de réguler un certain nombre de voies de signalisations (MAPKinases/Akt) impliquées dans la prolifération, la croissance et la migration de l'apoptose cellulaire. De plus, il a été démontré que les MSC étaient susceptibles d'exprimer le récepteur à l'IGF et donc d'être sensible à une stimulation par l'IGF[84].

Il est important de noter le potentiel des cellules souches pouvant être utilisées comme vecteur de sécrétion pour divers traitements pharmacologiques.

Ce nouveau style de thérapies s'applique particulièrement bien dans notre cas où nous souhaitons produire l'EGF de manière continue, sur du long terme et localement dans le cerveau.

CHAPITRE VI

6.1 HYPOTHÈSE DE TRAVAIL

Lors de greffes hématopoïétiques, les patients atteints de cancer pédiatriques sont habituellement traités par chimiothérapie et subissent fréquemment une irradiation qui peut être crânienne ou totale, afin d'éliminer toutes les cellules hématopoïétiques potentiellement cancéreuses.

Aujourd'hui, nous savons que ces traitements sont la cause de nombreux effets secondaires et nous nous intéressons essentiellement au déficit du développement cognitif qu'ils entraînent. Les causes moléculaires ne sont pas encore toutes élucidées mais nous supposons que ce déficit est en partie dû à un arrêt de la neurogénèse dans les zones du cerveau impliquées, comme la ZSV et l'Hi qui sont les deux zones principales où se poursuit la neurogénèse chez l'adulte. Nous croyons que la diminution de la neurogénèse après une irradiation serait la conséquence de deux principaux phénotypes, soit une entrée massive de cellules (précurseurs neuronaux) en apoptose par un mécanisme dépendant de p53 et/ou leur induction dans un stade de sénescence cellulaire par un mécanisme irréversible dépendant de p16^{INK4a}. À cela s'ajoute une augmentation de l'inflammation dans les tissus irradiés par d'autres mécanismes encore peu connus[85].

Notre première hypothèse est que L'EGF serait capable de stimuler par un effet mitogénique la neurogénèse dans des cerveaux irradiés.

Enfin, notre seconde hypothèse est que L'EGF serait capable de protéger les cellules neuronales de l'apoptose causée par l'irradiation tel que démontré dans la littérature pour les cellules hématopoïétiques.

6.2 OBJECTIFS

Notre projet de recherche a été élaboré dans le but de restaurer la neurogénèse suite à l'exposition aux rayons ionisants.

- Notre premier objectif a été de déterminer si le facteur de croissance EGF était capable de stimuler la formation et la prolifération des neuroblastes dans les régions de la ZSV et de l'Hi du cerveau de souris irradiées.
- Notre deuxième objectif a été de valider si l'EGF avait pour effet de prévenir l'induction d'apoptose des cellules de la niche de CSN et des blastes leucémiques irradiés.
- Notre troisième et dernier objectif a été d'utiliser des cellules de type CSM comme vecteur de sécrétion afin de pouvoir administrer l'EGF dans le cerveau de manière continue et sur du long terme.

6.3 PLAN EXPÉRIMENTAL

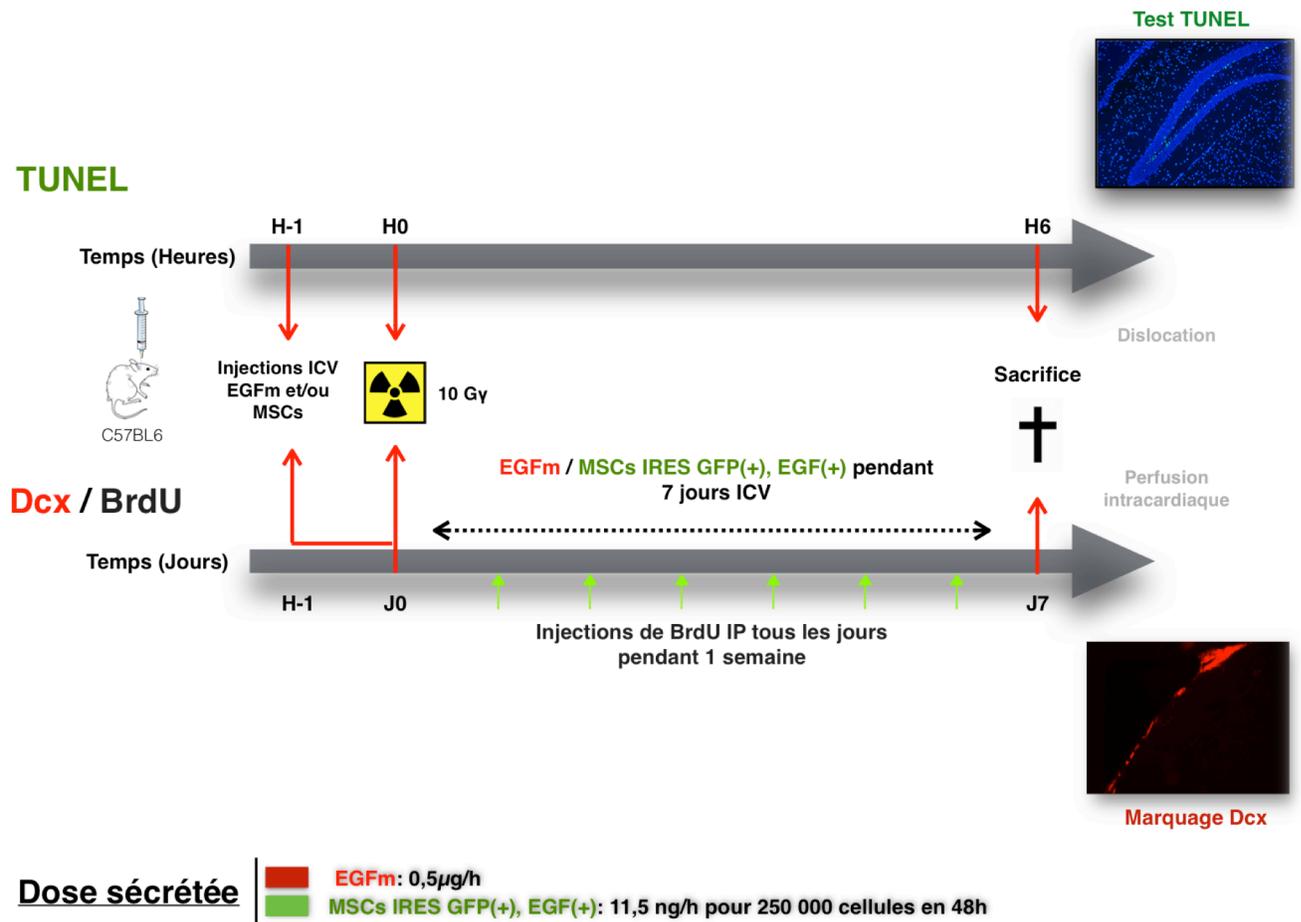


Figure 6. Schématisation des expériences qui ont été effectuées sur des souris C57BL/6 d'une durée de 6h pour le test TUNEL et d'une semaine pour les marquages à la Dcx. à la GFP et au BrdU. À H-1, selon les expériences, une pompe à EGF a été implantée ou une simple injection d'EGF ou CSM a été effectuée. À H0/J0 les souris ont été irradiées localement à 10Gy. La dose d'EGF sécrétée par la pompe était de 0,5µg/h. 40µg/mL d'EGF ont été administrés lors des injections simples et une concentration de 11,5ng/h d'EGF est sécrétée par 250 000 CSM injectées en 48h. La durée des traitements effectués avant le sacrifice des animaux était variable selon les marquages effectués.

CHAPITRE VII : MATÉRIELS ET MÉTHODES

Toutes les expériences sur les animaux se sont déroulées en accord avec les principes exposés par le Conseil canadien de protection des animaux et ont été approuvées par le comité de déontologie de l'expérimentation sur les animaux de l'Université de Montréal. Pour les expériences présentes dans ce mémoire, des femelles et des mâles C57BL/6 (Charles River) ainsi que des souris L/L de base génétique C57BL/6, âgés entre 7 et 8 semaines, ont été utilisées.

Chirurgie des souris

Les animaux ont été anesthésiés à l'aide de solutions de kétamine du laboratoire Wyeth (10mg/ml), DIN : 02173239 et xylazine (1mg/ml) de chez Bayer, DIN : 02169592, en IP à raison d'une dose de 0,1ml pour 10g de souris. Pendant toute la durée de la chirurgie et de la phase de réveil, les souris ont été maintenues sur un tapis chauffant à 39°C pour maintenir une température corporelle idéale. La chirurgie a inclus des injections simples intraveineuses (IV), intra-cérébro-ventriculaires (ICV) et intra péritonéales (IP) ainsi que la pose de pompes à infusion qui administrent l'EGF en ICV. Une seringue Hamilton de microchirurgie a été utilisée pour les injections simples ICV d'EGF ou de suspensions cellulaires (CSM/DMEM)(**Annexe 1**). Pour une plus grande précision, toutes les injections ICV ont été réalisées à l'aide d'un appareil stéréotaxique en utilisant toujours les mêmes coordonnées évaluées de bregma[86] :

- antéropostérieur (AP) :2,0mm, latéral (L) : 1,5mm, profondeur (P) : -2,3mm ; pour l'Hi
- AP : 0mm ; L : 0,9mm ; P : 3,3mm ; pour la ZSV

Une injection d'analgésique (buprénorphine, 10µg/ml) a systématiquement été effectuée après la chirurgie. Cette substance pharmacologique strictement contrôlée a été utilisée sous étroite surveillance.

Irradiation

Nos groupes de souris traités à l'EGF ont subi une irradiation ciblée du cerveau afin d'abolir la neurogénèse dans les régions de l'Hi et de la ZSV. Les animaux ont été protégés par un blindage de plomb couvrant l'intégralité du corps, laissant la tête à découvert pour être exposée aux RI. La dose était de 1Gy en 1,03 min. La procédure a été effectuée au sein de l'animalerie de l'hôpital Sainte Justine et a duré 10 min et 18 secondes, délivrant un total de 10 Gy.

Sacrifice

Les souris ont été sacrifiées six heures ou une, deux ou quatre semaines après l'irradiation locale et les différentes injections d' EGF.

Différentes méthodes ont été utilisées,

- une perfusion intracardiaque pour permettre l'élimination du sang et la fixation des tissus au formaldéhyde avant des marquages immunohistochimiques. Les souris ont été anesthésiées avec du pentobarbital des laboratoires CEVA (5,47mg/ml) en IP.

- l'utilisation de CO₂ puis une dislocation cervicale.

Mise en évidence de l'apoptose

TEST TUNEL (Terminal transferase d'UTP nick and labelling)

Les souris ont été sacrifiées par l'action du CO₂ et dislocation cervicale. Les cerveaux ont ensuite été extraits et placés immédiatement sur glace sèche pour préserver les tissus et être par la suite conservés à -80°C. Les coupes ont été réalisées à l'aide d'un cryostat en section de 10µm d'épaisseur. Les coupes ont par la suite été fixées directement sur lames préalablement gélatinées et conservées ensuite à -20°C avant de procéder au marquage. Le test TUNEL a été pratiqué sur des sections d'Hi et de ZSV de cerveaux de souris avec le kit de détection *in situ* d'apoptose des Laboratoires Roche Applied Science, (USA), a été utilisé en accord avec le protocole fourni par le fabricant. Les neurones en apoptose ont été estimés en quantifiant le pourcentage de neurones TUNEL positifs.

Culture cellulaire de lignées leucémiques (LAL T et LAL B)

Nous avons travaillé avec les lignées de cellules leucémiques REH, NALM6, JURKAT et KASUMI qui sont respectivement issues de leucémies de type LAL B, LAL T et LAM. Elles ont été cultivées dans du RPMI, 10%SVF, (20% SVF pour KASUMI), pénicilline/streptomycine. Les cellules en suspension ont été comptées à l'aide d'un compteur à cellules (COUNTER®) et maintenues à une concentration de 300 000 cellules/mL tous les 2 jours.

Cytométrie en flux

Un marquage au 7-AAD (Marque) a été effectué pour détecter le pourcentage de cellules mortes. Le suivi de l'intensité de fluorescence a été effectué à l'aide d'un cytomètre en flux, BD FACSLSR II Fortessa® (Becton Dickinson).

Injection d'EGF recombinant

Injections simples d'EGF recombinant

L'EGF recombinant à 40µg/mL (solvant NaCl 0,9%) a été injecté dans le côté droit du cortex de la souris par voie ICV: 2,0mm; 1,5mm; -2,3mm pour l'Hi et 0mm; 0,9mm; 3,3mm pour la ZSV. Pour les injections IV, l'EGF recombinant (20µg/mL) a été dilué dans du NaCl 0,9%. Nous avons utilisé une seringue BD® de 1mL munie d'une aiguille 26G^{3/8} pour injecter l'EGF dans la queue de la souris à une dose de 150µg/kg.

Pour l'injection ICV, après anesthésie totale sous kétamine/xylazine, un trou de 1 mmx1mm a été réalisé à l'aide d'une perceuse de la marque DREMEL® au coordonnées 2,0mm; 1,5mm; -2,3mm où se trouve l'Hi ou de la ZSV (0mm; 0,9mm; 3,3mm). Une seringue Hamilton de microchirurgie a ensuite été utilisée pour injecter de 2 à 3µL de EGF (40µg/mL).

Infusion intra cérébro-ventriculaire d'EGF recombinant

Les pompes osmotiques ALZET® (model 1007D), de chez DURECT™, nécessitent d'être chargées avec de l'EGF et activées dans du NaCl 0,9% 24h avant l'implantation chez la souris. La mise en place de la pompe a ensuite été réalisée en utilisant toujours les mêmes coordonnées de bregma de l'Hi et de la ZSV. Le réservoir a été placé sous la peau du dos de l'animal et relié à une canule directement insérée dans le cerveau (kit 2,

3-5mm). L'EGF (20µg/ml) a été dilué dans du NaCl 0,9% et a été sécrété à raison de 0,5µL/heure dans la ZSV ou dans l'Hi pendant 7 jours.

Injection de BrdU (2mg/ml) en IP

Après l'irradiation les souris ont reçu une injection de BrdU sept jours avant d'être sacrifiées. L'administration s'est faite en IP à partir d'une solution stérile de BrdU à 2mg/ml dans du PBS1X, à raison de 100µL pour 20g de souris. La détection est possible, dans la majorité des tissus, 24 heures après l'injection mais le traitement a été optimisé pour être à un seuil de détection optimal au niveau du cerveau, pour le bon déroulement de l'expérience.

Perfusion intracardiaque

Les souris ont préalablement été anesthésiées avant d'être perfusées en intracardiaque avec 10mL de PBS 1X, héparine (10U/mL) suivi de 25ml de formaldéhyde 3,7%. Les cerveaux ont ensuite été prélevés puis immergés dans du formaldéhyde O/N, 4°C avant d'être équilibrés dans une solution de 30% de sucrose pour 24 heures à 4°C. Les tissus ont ensuite été inclus dans de l'OCT et congelés à -80°C avant d'être coupés à 40µm d'épaisseur au cryostat en vue d'effectuer différents marquages.

Marquages immunofluorescents

Les anticorps (Ac) primaires qui ont été utilisés dans cette étude sont les suivants :

- Anti-doublecortine (C-18) de chèvre, Invitrogen™, (1:500)
- Anti-GFP de lapin, Invitrogen™, (1 :500)
- Anti-BrdU de souris, BD®, (1 :250)
- Anti-EGF-R, ThermoScientifique™, (1 :500)
- Anti-GFAP de lapin, Dako®, (1 :500)

Les anticorps secondaires qui ont ensuite été utilisés sont les suivants :

- Ac d'âne, anti-chèvre (1:200) / anti-souris ou anti-lapin couplé à un fluorochrome (Alexa fluor 594) dilution 1:750 de chez Lifetechnologie
- Ac d'âne, anti-chèvre / anti-lapin couplé à un fluorochrome (Alexa fluor 488) dilution 1:750 de chez Lifetechnologie

L'anticorps secondaire a été dilué dans du PBS contenant du DAPI dilution 1:1000 qui permet la coloration des noyaux de toutes les cellules dans le cas du marquage à la double cortine.

Les coupes, marquées, ont ensuite été montées sur lame à l'aide de vectashield et conservées à 4°C.

Marquage de coupe du cerveau de souris à la double cortine (dcx)

Les tissus ont été extraits des souris après la perfusion intracardiaque. Les tissus ont ensuite été coupés en section transversale de 40µm à l'aide d'un cryostat (LEICA CM 1950) et stockés à -20°C dans une solution d'antifreeze contenant un tampon phosphate[87].

Marquage de coupe de cerveau de souris au 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)

Suite à l'injection et à l'irradiation les souris ont reçu durant les sept jours précédant le sacrifice une dose de BrdU (2mg/ml) en IP.

Les tissus ont été extraits et conservés de la même manière que lors du marquage à la double cortine. La dénaturation des brins d'ADN ayant incorporé le BrdU s'est effectuée par un traitement au HCl 0,5N 30 min à 37°C. L'acide a ensuite été neutralisé par un traitement avec un tampon borate pH 8,5 pendant 10 min. Un anticorps primaire anti-BrdU de souris (BD) a ensuite été utilisé ainsi qu'un anticorps secondaire anti-souris qui émet dans le vert ou le rouge en fonction des expériences effectuées.

Sécrétion continue via les CSM modifiées génétiquement

Culture cellulaire de CSM-C1

Les cellules CSM-C1 dérivent d'un clone de CSM murine immortalisé. Elles ont été cultivées dans du DMEM, 10% Fetal Bovin Serum (SVF), pénicilline/streptomycine.

Biologie moléculaire: Clonage de CSM-C1 avec le gène de l'EGF

Construction d'un plasmide contenant le gène de l'EGF :

Pour cela nous sommes partis de deux plasmides:

- pCMVSPORT6 (Clone ID: 4164289, Accession: BC060741) de chez Thermo Scientific, contenant le gène à l'EGFm (4892pb) inséré avec les enzymes Sall/NotI (5'→3')
- Vecteur lentiviral de troisième génération contenant une cassette d'expression IRES-GFP. Le gène à l'EGF a été cloné à partir du plasmide pCMVSPORT6 dans le vecteur lentiviral en deux étapes. Un premier fragment coupé à l'aide des enzymes de restrictions Sall/SmaI a été introduit, puis un second à bout franc coupé par SmaI et XbaI

La sélection des bactéries avec le gène d'intérêt a été effectuée sur des géloses Kanamycine (25µg/ml). Nous avons mis au point cette stratégie de clonage pour avoir de plus petit inserts à cloner car nous avons beaucoup de difficultés à obtenir des bactéries résistantes à la Kanamycine lors de l'étape de transformation étant donné la taille importante de l'insert initial de 4892 pb (EGFm)(**Annexe 2**).

Production du virus recombinant :

Des cellules HEK293T ont d'abord été incubées avec quatre plasmides : REV (protéine REV), VSVG (Vesicular Stomatitis Virus) qui ont permis la création de l'enveloppe virale, pMDL (gag-pol étant les gènes en codants les protéines virales) et avec le plasmide PGK-IRES GFP contenant l'insert EGF de 4892pb. L'incubation des cellules avec les différents plasmides s'est fait toute la nuit (O/N) à 37°C. Le lendemain le milieu RPMI a été changé pour du milieu DMEM 10% SVF, P/S afin de permettre la prolifération des cellules productrices de virus. L'attente a alors été de 30 heures avant de pouvoir collecter le surnageant contenant le lentivirus nouvellement produit. Les

aliquots ont ensuite été conservés à -80°C. Le PEI (Polyéthylèneimine linéaire) a été utilisé comme agent de transfection (MW2500 ; Polyscience inc) à 1mg/mg, pH: 6,8 et en accord avec le protocole fourni par le fabricant sur des cellules HEK293T (Human Embryonic Kidney). Ce même surnageant a été utilisé pour transduire des cellules CSM afin qu'elles sur-expriment le gène de l'EGF et de la GFP. Les lentivirus ont pour propriété de s'intégrer dans le génome des cellules à un ou plusieurs endroits de façon stable.

Cytométrie en flux

Le suivi de l'intensité de l'expression de la GFP a été effectué par cytométrie en flux, BD FACSLSR II Fortessa® (Becton Dickinson) à chaque passage de cellules puis avant l'injection aux souris.

Le tri des cellules transduites s'est effectué par cytométrie en flux (BD FACS Aria®).

ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

Afin de doser la quantité d'EGF murin sécrété par les CSM recombinantes EGF (+), IRES GFP (+) murines, un kit ELISA (Mouse EGF ELISA Kit) de chez Sigma-Aldrich a été utilisé. Le surnageant de culture a été prélevé après 48 heures, filtré puis dosé. Parallèlement à cela, des surnageants de CSM WT, GFP(+) cultivés dans les mêmes conditions, ainsi que du milieu seul ont également été dosés et utilisés comme contrôles négatifs lors de notre test ELISA.

Injection en IP et ICV de cellules souches mésenchymateuses dans la souris C57BL/6, irradiée vs non irradiée

Toutes les souris utilisées dans le cadre de cette expérience ont été sacrifiées à une, deux ou quatre semaines par la méthode de perfusion intracardiaque. Des marquages immuno-fluorescent anti-GFP, anti-Dcx et anti-BrdU ont ensuite été réalisés.

Injection en IP de CSM-C1

Les CSM ont été injectées en IP à raison de 20×10^6 cellules ($80 \mu\text{L}$ d'une suspension cellulaire à $250\,000 \text{ cells}/\mu\text{L}$ dans du NaCl 0,9% (PBS1X) et conservées sur glace pendant toute la durée de la chirurgie). Les souris ont ensuite été irradiées localement avec une dose de 10Gy et sacrifiées sept jours après.

Injection ICV de CSM-C1 GFP (+)

Toutes les injections en ICV suivantes ont été effectuées en suivant rigoureusement le même protocole expérimental. Après anesthésie totale à l'aide d'une injection de kétamine/xylazine. Les cellules sont concentrées dans du DMEM sans sérum ou du NaCl 0,9% et injectées avec une seringue Hamilton dans le côté droit du cortex de la souris au niveau de la ZSV (0mm; 0,9mm; 3,3mm).

Les CSM ont injectées dans la ZSV à raison de 400 000 à 500 000 cellules, dans un volume de 2 à $3 \mu\text{L}$ de suspension cellulaire $200\,000 \text{ cells}/\mu\text{L}$ à $250\,000 \text{ cells}/\mu\text{L}$ (diluées dans du DMEM et conservées sur glace pendant toute la durée de la chirurgie). Les souris ont ensuite été irradiées localement avec une dose de 10Gy et sacrifiées une, deux ou quatre semaines après. Les sept jours précédents le sacrifice, les souris ont été traitées par des injections en IP de BrdU (2mg/mL).

La même procédure à été suivie pour l'injection en ICV des CSM-C1 GFP (+), EGF (+).

Quantification

Les régions correspondant à l'Hi et la ZSV ont été délimitées selon l'atlas stéréotaxique du cerveau de souris de Franklin et Paxinos. Les cellules immunoréactives ont été observées bilatéralement dans trois coupes par région : bregma 0,62mm à 0,14mm pour la ZSV et bregma -1,28 à 2,30 pour l'Hi[86], (**Figure 7**).

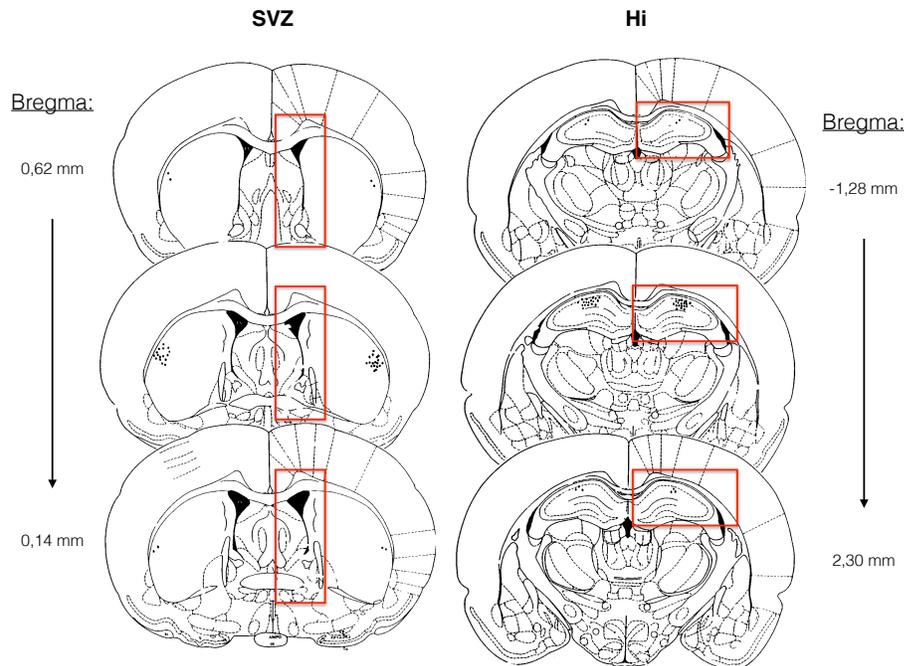


Figure 7. Schéma représentant les trois coupes coronales de la ZSV et de l'Hi chez la souris qui sont les zones spécifiques où ont été observé et quantifié les cellules immunoréactives Dcx(+), BrdU(+), TUNEL(+). Le côté droit est le site d'injection de l'EGF recombinant et des CSM recombinantes.

Toutes les coupes ont été observées avec un objectif 10X ou 20X à l'aide d'un microscope à fluorescence OLYMPUS® et les photos prises avec une caméra Retiga 2000R.

Les cellules immunoréactives pour la protéine Dcx ont été quantifiées avec le logiciel ImageJ en mesurant l'intensité de fluorescence proportionnellement à la surface de la zone du cerveau étudiée afin d'exprimer les résultats en densité de cellules positives. Dans le but d'étudier l'effet de l'EGF sur la neurogénèse de chacune des régions

observées nous avons restreint la quantification au côté droit de la ZSV ou de l'Hi qui a reçu l'injection. La densité de cellules positives des coupes de souris n'ayant pas reçu d'injection d'EGF a également été quantifiée.

Statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées grâce au logiciel Graph Pad version 6.0 en utilisant les tests statistiques de Student (t test) et ANOVA à un facteur. Les résultats ont été considérés comme significatifs avec des valeurs de $p < 0.05$.

CHAPITRE VIII : RÉSULTATS

La neurogénèse secondaire se poursuit après l'embryogénèse dans la ZSV et dans la ZSG de l'hippocampe de manière très spécifique. La présence de jeunes neurones, aussi appelés neuroblastes, exprimant le marqueur doublecortine est très caractéristique. Ces jeunes neurones sont présents le long du côté latéral des ventricules de la ZSV ainsi que dans la ZSG de l'Hi, dans les cerveaux non irradiés et dérivent des CSN puis des CNP. On observe une disparition de cette population de cellules Dcx(+) (neuroblastes) dans les cerveaux irradiés, aussi bien dans la ZSV que dans l'Hi.

8.1 L'EGF recombinant induit la formation de neuroblastes une semaine après l'irradiation dans la ZSV

Nous avons souhaité tester les effets de l'EGF, qui est un facteur de croissance possédant un pouvoir mitogénique puissant et connu dans la littérature. Notre hypothèse était que l'EGF entraînerait la différenciation des CNP en neuroblastes et stimulerait la neurogénèse.

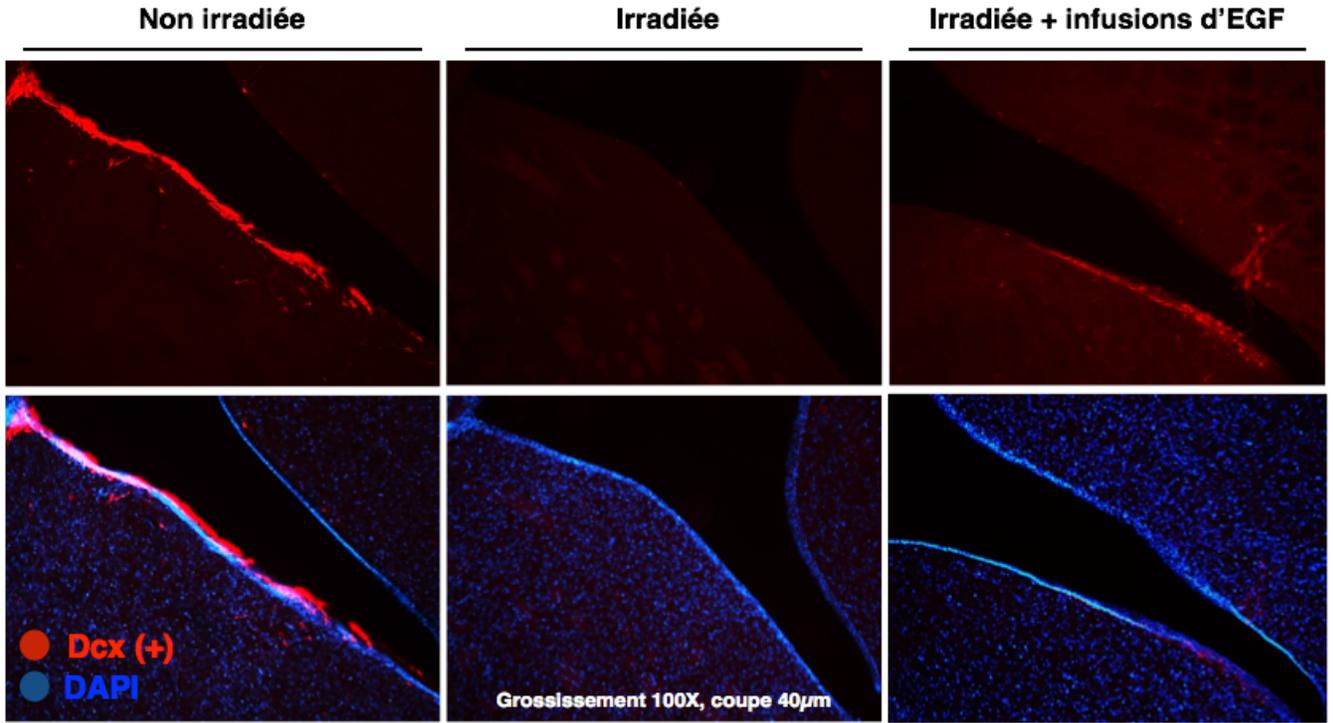
Des injections en IV et ICV ont été effectuées. Entre 125 et 130 μ L d'EGF à 20 μ g/mL ont été injectés en IV, environ une heure avant une irradiation locale du cerveau de 10Gy. Pour ce qui est des injections en ICV, nous avons injecté deux groupes de souris différents. L'un a reçu une dose unique de 2 à 3 μ L d'EGF concentré à 20 μ g/mL et l'autre des doses d'EGF par infusion continue de même concentration à raison de 0,5 μ L/h pendant sept jours, à l'aide d'une pompe. Les souris ont été sacrifiées une semaine après et des marquages immunofluorescents ont été effectués par la suite. Les injections IV et ICV n'ont montrées aucun effet de l'EGF sur la formation de neuroblastes Dcx(+). En revanche, les infusions d'EGF en ICV, sur une semaine, ont eu un effet positif sur la formation de neuroblastes au niveau de la ZSV. En comparant nos groupes de souris non irradiées à nos souris irradiées traitées par infusion d'EGF, nous observons de nouveau la présence de cellules Dcx(+), caractéristiques des neuroblastes (**Figure 8A**). En ce qui concerne la région ZSG de l'hippocampe, aucune cellules exprimant la Dcx n'a été observée, et ce, quel que soit le type d'injection/infusion (**Figure 8C**). Les cellules de

cette région du cerveau ne semblent pas être sensibles aux doses d'EGF administrées, contrairement à la ZSV.

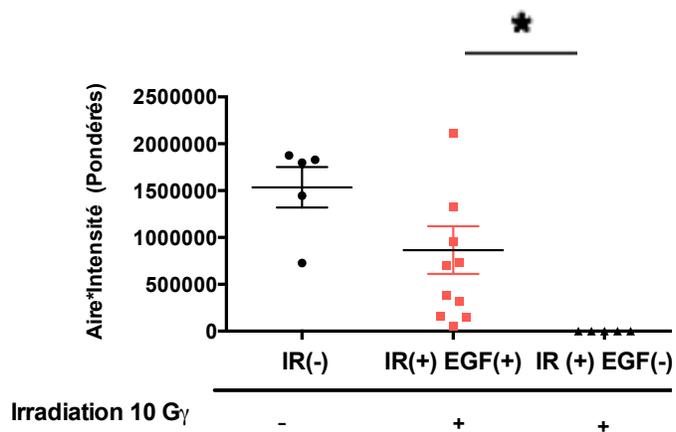
Des injections de NaCl 0,9%, sur des souris irradiées seulement, nous ont servis de témoins. Aucune présence de cellules Dcx(+) n'a été observée. Ceci démontre que l'augmentation de la formation de neuroblastes est bien spécifique aux injections d'EGF réalisées.

Nous avons ensuite rassemblé et quantifié les résultats de quatre expériences où le signal Dcx a été détecté, à l'aide du logiciel IMAGEJ. C'est-à-dire les groupes de souris où des pompes à infusions ont été utilisées pour administrer l'EGF au niveau de la ZSV et de l'Hi du cerveau. La quantification a été normalisée sur la première expérience effectuée afin d'homogénéiser les résultats. L'aire de la surface observée a été multipliée par l'intensité du signal mesuré. Nous avons remarqué un effet significatif de l'EGF sur la formation de populations de cellules Dcx(+) caractéristiques des neuroblastes dans la ZSV (**Figure 8B**).

A



B



C

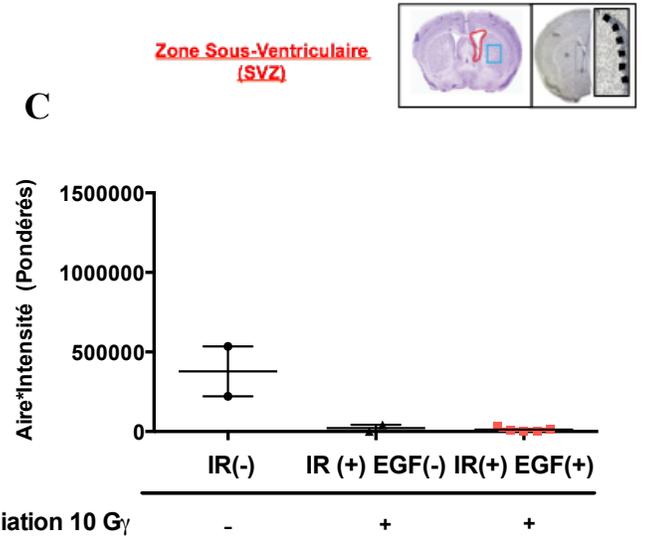


Figure 8. Effet de l'infusion d'EGF sur la formation de neuroblastes Dcx(+).(A) Observation microscopique de coupes de ZSV du cerveau de souris marquées avec un Ac anti-Dcx (rouge), caractéristique des neuroblastes et au DAPI (bleu). Épaisseur 40µm, grossissement 100X. Différents groupes de souris ont été utilisés : non irradiés, irradiés et irradiés suivi d'infusions d'EGF en ICV **(B)(C)**. Quantification de la population de cellules Dcx(+) dans la partie droite de la ZSV et de l'hippocampe irradié localement avec une dose de 10Gy. Les souris ont reçu des infusions d'EGF en ICV (20µg/mL). Les données sont obtenues par la répétition de 4 expériences, n= 2 à 3 par groupe. La quantification s'est effectuée à partir de 2 à 3 coupes coronales par souris. Test t de student *p<0.05.

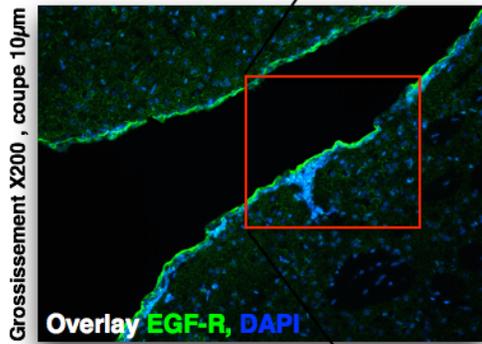
* Les injections d'EGF en ICV ont été effectuées à l'aide de pompes ALZET® afin d'administrer l'EGF (20µg/mL) à raison de 0,5µL/h pendant 7 jours.

8.2 La ZSV est riche en cellules exprimant l'EGF-R à leur membrane

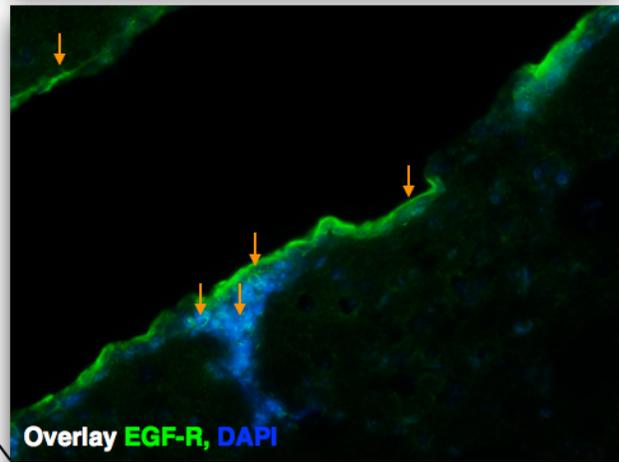
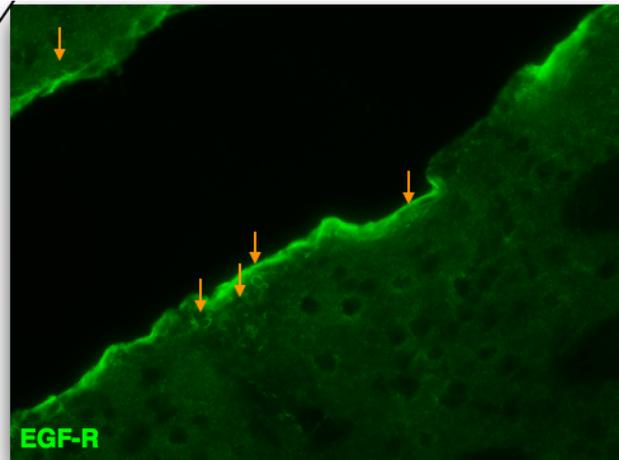
Il est connu que les récepteurs à l'EGF soient présent dans le cerveau dans la ZSV et l'Hi. Nous avons cependant cherché à vérifier leur présence et avons effectué un marquage à l'aide d'anticorps anti-EGF-R, sur des coupes de 10µm d'épaisseur. Ces dernières ont été issues de souris non irradiées, perfusées afin d'éliminer toute trace de sang et optimiser les marquages immunofluorescents. La **figure 9A** représente la superposition du marquage EGF-R et DAPI au niveau de la zone ZSV en grossissement 100X. Deux photos composent la **figure 9B**, la première est la représentation du marquage EGF-R seul. La seconde représente la superposition du marquage EGF-R et DAPI en grossissement 200X. La **figure 9C**, quant à elle, est un schéma paru dans l'article publié par E. Pastrana représentant de manière simplifiée les principaux marqueurs exprimés par les cellules issues de la lignée neurale, qui sont pertinents pour retracer les différents types cellulaires impliqués lors de la neurogénèse[72]. Nous savons que les cellules souches astrocytaires et des cellules progénitrices neurales (CNP) expriment l'EGF-R à leur surface. Dans cette expérience nous avons voulu examiner les récepteurs à l'EGF situés du côté latérale du ventricule de la ZSV et dans la ZSG de l'Hi. Nous avons observé la présence de ces récepteurs dans la ZSV ainsi que dans l'Hi. Les cellules qui expriment l'EGF-R à leur surface sont soit des cellules souches astrocytaires, soit des cellules progénitrices intermédiaires et semblent plus nombreuses et localisées le long du ventricule de la ZSV (**Figure 9A**). Pour ce qui est des cellules positives au récepteur à l'EGF dans l'Hi, on remarque qu'elles sont plus dispersées, moins nombreuses et peu présentes au sein même de la ZSG (**Figure 10**). Notons que ces marquages ont été effectués sur 2 souris seulement et nécessitent d'être répétés.

A

Souris non irradiée
SVZ



B



C

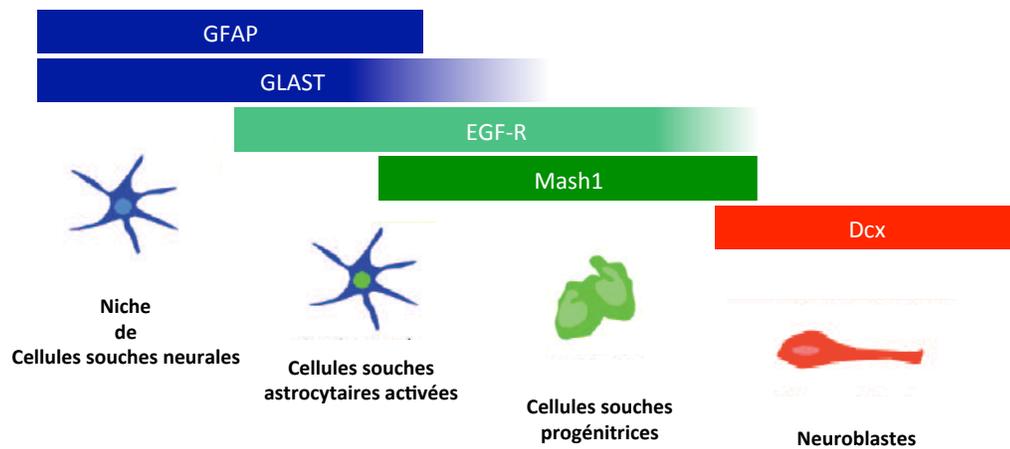


Figure 9. Marquage des EGF-R présents au niveau de la ZSV du cerveau de souris non irradié. (A)(B) Marquage de la région ZSV avec un Ac anti-EGF-R en vert (alexa 488). Tous les noyaux cellulaires sont colorés au DAPI en bleu. Les coupes sont de 10µm d'épaisseur et le grossissement utilisé lors de l'observation en microscopie à fluorescence est de 200X et 400X. Les souris ont été sacrifiées par méthode de perfusion intra-cardiaque. **(C)** Schématisation de l'expression de différents marqueurs/récepteurs dont l'EGF-R, à la surface des cellules présentes au niveau de la ZSV (Schéma adapté de Pastrana E, Cheng LC, Doetsch F. Simultaneous prospective purification of adult subventricular zone neural stem cells and their progeny. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(15):6387-92.).

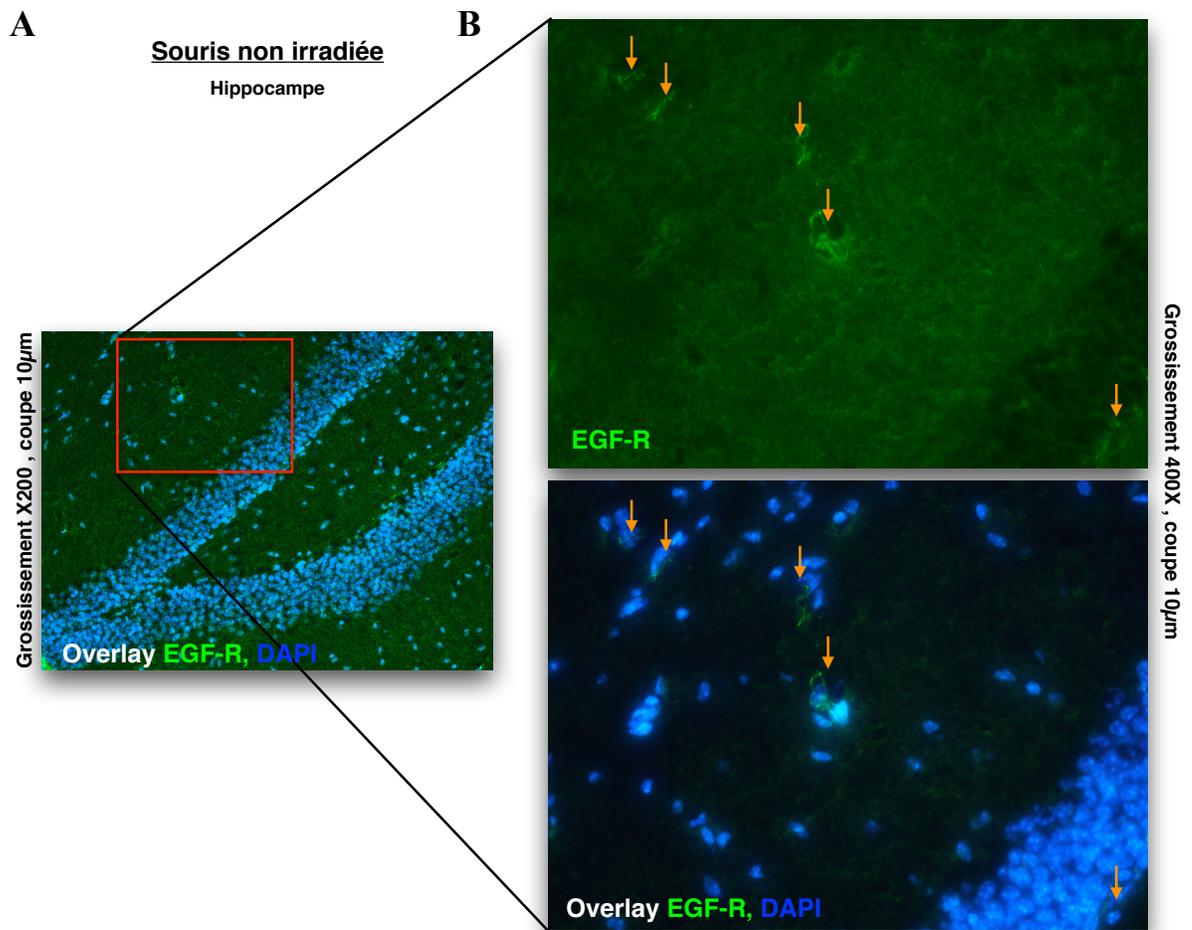


Figure 10. Marquage des EGF-R présents au niveau de la ZSG de l'Hi du cerveau de souris non irradié. Marquage réalisé avec Ac anti-EGF-R en vert (alexa 488). Tous les noyaux cellulaires sont colorés au DAPI en bleu. Les coupes sont de 10µm d'épaisseur et le grossissement utilisé lors de l'observation en microscopie à fluorescence est de 200X(A) et 400X(B). Les flèches ciblent les cellules exprimant l'EGF-R. Les souris utilisées non pas été irradiées et ont été sacrifiées par la technique de perfusion intra-cardiaque.

8.3 L'injection d'EGF recombinant ne protège pas de l'apoptose causée par l'irradiation

Les effets secondaires notables d'une irradiation sont la disparition des cellules Dcx(+) et l'entrée massive de cellules en apoptose, 6 heures après l'irradiation, un peu partout dans le cerveau mais également dans la ZSV et dans l'Hi. Nos premiers résultats indiquent un effet positif de l'EGF sur la formation de neuroblastes. Dans une deuxième étape, nous avons voulu savoir si l'EGF était également capable de protéger les cellules du cerveau de l'entrée en apoptose. Pour cela nous avons effectué un test TUNEL après avoir effectué une injection simple de 2 à 3µL d'EGF à 40µg/mL en ICV, dans la ZSV et l'Hi.

Les souris ont été irradiées 1 heure après l'injection et sacrifiées 6 heures après (connu pour être le pic apoptotique après une irradiation). Des marquages immunofluorescents ont ensuite été effectués sur les différents groupes de souris : non irradiés ayant subi une injection de NaCl 0,9%, irradiés seulement ou traités avec une dose unique d'EGF. Chez les souris irradiées seulement et traitées à l'EGF, on observe une quantité importante de cellules TUNEL positives, caractéristique des cellules apoptotiques, aussi bien dans la ZSV que dans la ZSG de l'Hi (**Figure 11A**). Après quantification des cellules TUNEL (+), comptées à la main dans chacune des trois sections de coupes de la ZSV et de l'Hi observées au microscope, nous n'avons pas observé de protection significative de l'EGF contre l'apoptose sur les cellules irradiées dans ces régions du cerveau. Aucune cellule apoptotique n'est observée dans les cerveaux du groupe de souris non irradiées qui constitue notre groupe témoins (**Figures 11B et 11C**).

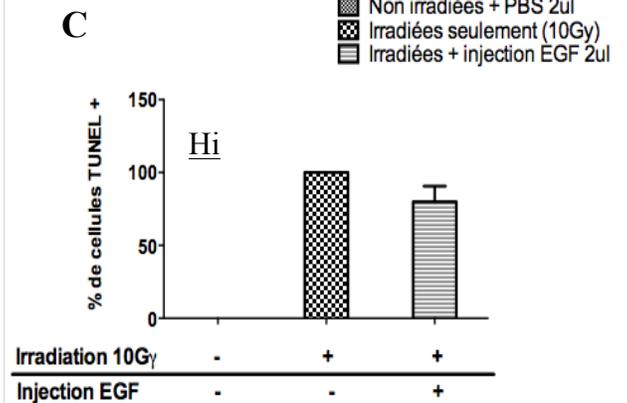
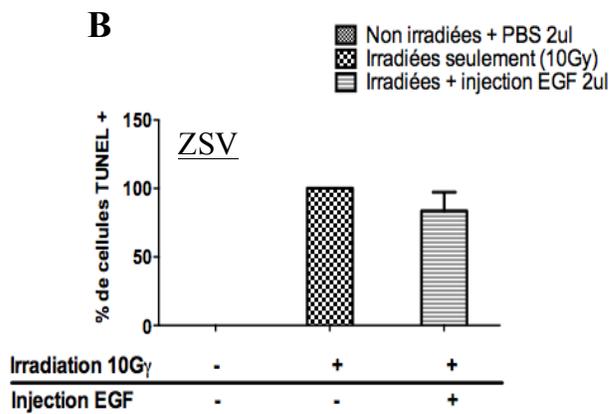
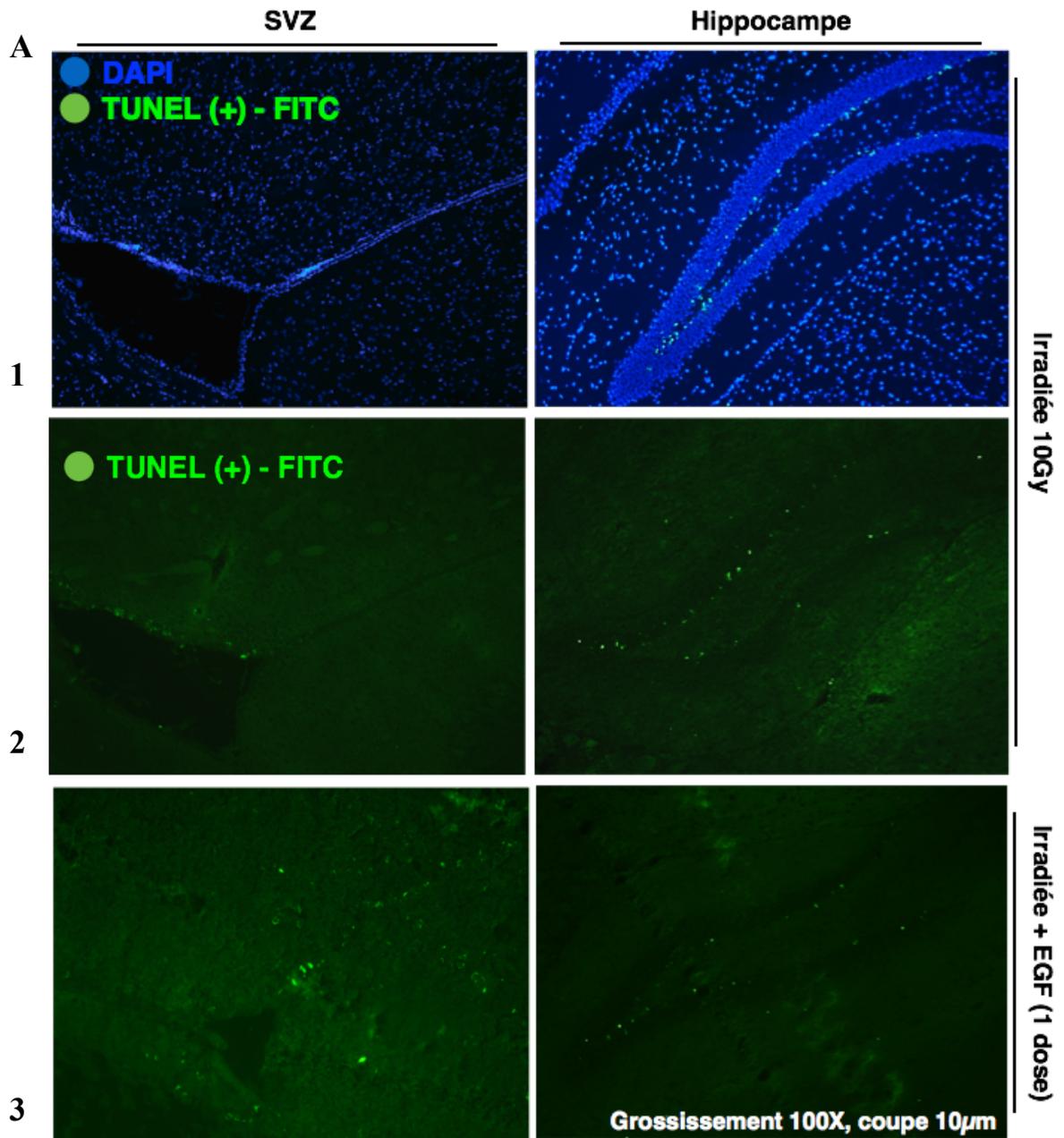


Figure 11. Marquage des cellules apoptotiques grâce au test TUNEL. (A) Observation microscopique au grossissement 100X des régions droites de la ZSV et d'Hi du cerveau de souris suite à des injections simples en ICV d'EGF (40µg/mL), suivie d'une irradiation locale de 10Gy. Les nucléotides (UTP) couplés à la fluorescéine, se sont incorporés au niveau des brisures dans les brins d'ADN. Le signal fluorescent émet dans le vert. **(A1)** Régions de l'Hi et de la ZSV de souris irradiées où les cellules sont TUNEL(+) en vert et où tous les noyaux des cellules ont incorporés le DAPI (bleu). La photo représente la superposition des deux marquages. **(A2)** Photos de ces mêmes régions montrant seulement les cellules TUNEL (+) en vert. **(A3)** Marquages des régions de l'Hi et de la ZSV de souris irradiées et traitées à l'EGF. Les cellules TUNEL(+) sont en vert **(B)(C)** Différents groupes de souris ont été utilisés pour la quantification des cellules TUNEL(+) des régions droites de la ZSV et de l'Hi : non irradiés, irradiés et irradiés suivi d'une injection unique d'EGF. Les souris ont été sacrifiées 6 heures après irradiation n=6; Hi n=3 *p<0.05. Test t de student.

8.4 La formation de neuroblastes est associée à une prolifération par un effet mitotique qui dépend de l'EGF

Nous avons ensuite cherché à savoir si les neuroblastes formés étaient capables de proliférer pendant la semaine d'infusions continues d'EGF. Pour cela, nous avons procédé à des injections IP de BrdU à 2mg/mL pendant 7 jours précédant le sacrifice des souris. Des marquages anti-BrdU et anti-Dcx ont également été effectués ensemble, afin d'observer la colocalisation entre les cellules Dcx(+) nouvellement formées et les cellules qui ont proliféré, Brdu(+).

Pour ce qui est des groupes de souris non irradiés et irradiés infusés pendant 1 semaine avec de l'EGF, les signaux de fluorescence correspondant aux marquages à la Dcx et au BrdU colocalisent. Chez les souris irradiées seulement qui nous ont servi de témoin pour cette expérience, nous n'avons observé aucune trace de cellules Dcx(+), ni de signal BrdU(+), synonyme de prolifération. Ces résultats nous indiquent bien que les cellules Dcx(+), caractéristiques des neuroblastes nouvellement formés, ont proliféré durant la semaine où l'EGF a été infusé (**Figure 12**).

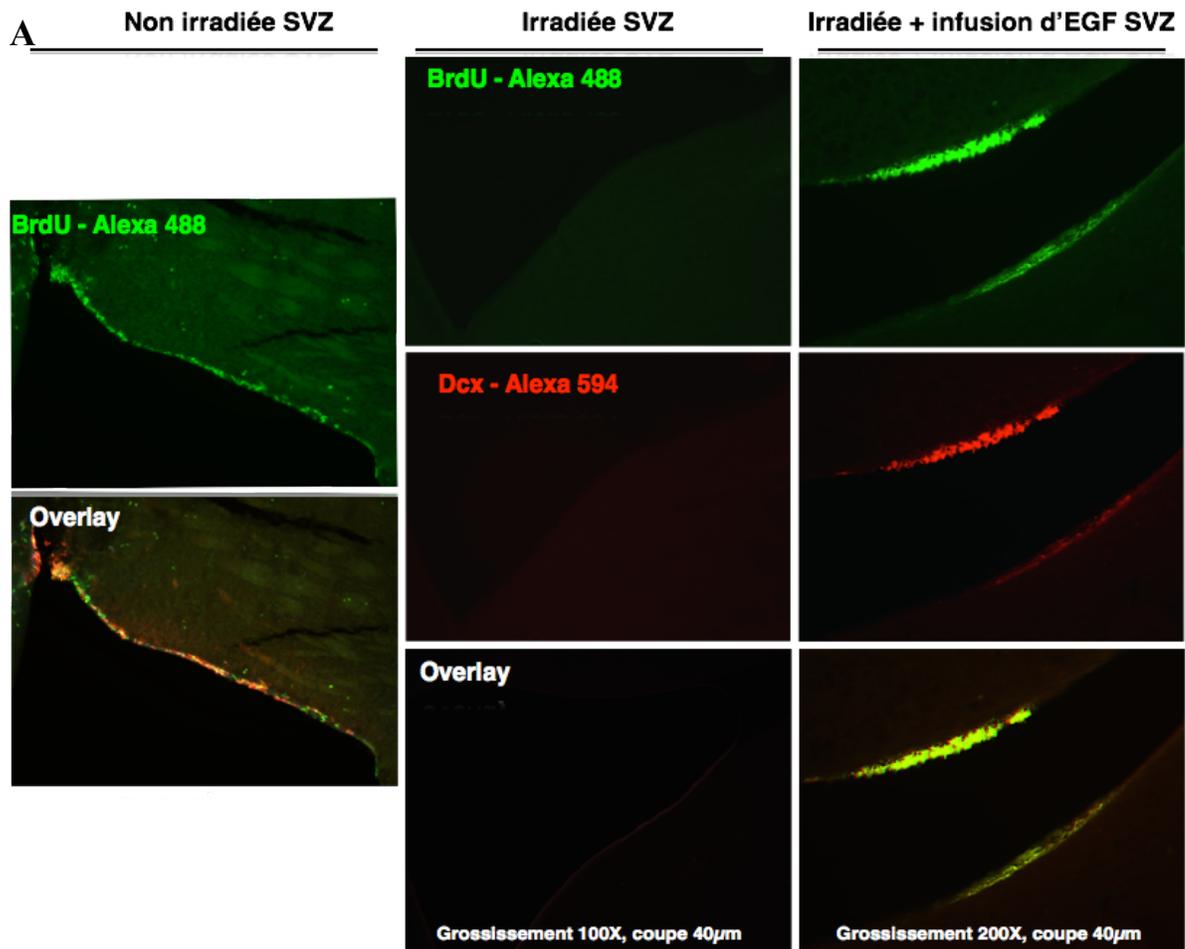


Figure 12. Effet de l'EGF sur la formation et la prolifération des jeunes neurones Dcx(+). Observation microscopique de coupes de ZSV du cerveau de souris marquées avec un Ac anti-Dcx (rouge) et un Ac anti-BrdU (vert). Épaisseur 40µm, grossissement 100X et 200X. Différents groupes de souris ont été utilisés : non irradiés, irradiés et irradiés suivi d'infusions d'EGF en ICV*. Les souris ont été sacrifiées 7 jours après une irradiation locale de 10Gγ et d'une injection en IP quotidienne de BrdU (2mg/mL), n= 3 par groupe.

* Les injections d'EGF en ICV ont été effectuées à l'aide de pompes ALZET® afin d'administrer l'EGF (20µg/mL) à raison de 0,5µL/h, pendant 7 jours.

8.5 L'EGF ne protège pas les blastes leucémiques contre l'irradiation

Après avoir testé l'effet protecteur de l'EGF sur les cellules qui composent la ZSV et l'Hi du cerveau de souris, nous avons voulu savoir si cet effet protecteur pouvait se retrouver sur les blastes leucémiques. Le fait que l'EGF ait un pouvoir mitogénique et que l'activation de son récepteur soit impliquée dans de nombreux cancers nous a poussé à tester son pouvoir de protection sur différentes lignées leucémiques humaines, telles que les LAL (lymphocytes B ou T) et les LAM. Étant donné que nous souhaitons améliorer la condition de vie des patients survivants du cancer, nous avons voulu vérifier que l'EGF n'ait pas d'impact positif sur des blastes leucémiques ayant éventuellement échappés à la chimiothérapie et aux doses de radiothérapie. Pour effectuer cette expérience, des doses d'irradiation de 10, 5 et 0 Gy, ont été utilisées ainsi que différentes concentrations d'EGF (10ng/mL et 100ng/mL). Plus précisément, nous avons utilisé des cellules LAL de type B, nommées REH, et de type T, nommées NALM6 (**Figures 13A et 13B**). Nous avons également utilisé des cellules issues d'une lignée LAM, nommées KASUMI (résultats non montrés). La **Figure 13C** une expérience effectuée avec la lignée REH ayant subi des doses décroissantes d'irradiation, allant de 10 à 0 Gy, afin de tester l'effet protecteur de l'EGF même à de très faibles doses d'irradiation (entre 0 et 2 Gy). Ces cellules ont été mises en culture dans du RPMI 10% SVF, pendant 7 jours. Un comptage et un passage ont été effectués tous les deux jours, afin de maintenir une concentration constante de cellules en suspension (300 000 cellules/mL), évitant ainsi un effet plateau dû à la confluence trop importante dans les flasques de culture, ce qui causerait la mort anticipée des cellules et donc apporterait un biais important aux comptes cellulaires. Après comptage des cellules et analyse de nos résultats, nous n'avons pas remarqué d'effet anti-apoptotique sur des blastes leucémiques irradiés, suite à un traitement répété à l'EGF (**Figure 13**).

8.6 Évaluation de l'effet des CSM sur la formation de neuroblastes

Puisque l'EGF est de nature protéique et n'est pas capable de traverser la BHE, il nous a donc été nécessaire de trouver une solution pour l'administrer dans le cerveau de manière durable et le moins invasif possible pour la souris. Dans la première partie de ce mémoire, nous avons utilisé des pompes à infusion qui permettaient la sécrétion continue d'EGF, sur 7 jours, afin d'étudier son effet sur la formation et la prolifération des jeunes neurones Dcx(+).

Dans la seconde partie, nous avons trouvé intéressant de chercher un vecteur de sécrétion nous permettant d'étudier l'effet d'une sécrétion d'EGF continue et plus physiologique sur la neurogénèse à plus long terme (4 semaines et plus). L'idéal est un vecteur pratique et facile d'utilisation, *in vitro* comme *in vivo* et aisément injectable dans le cerveau, sans provoquer de réaction inflammatoire. Nous avons alors choisi d'utiliser des CSM issues d'une lignée murine immortalisée (CSM-C1) comme vecteur de sécrétion de l'EGF pour être injectées suite à une irradiation causant de nombreuses lésions cérébrales, comme l'altération de la neurogénèse. Dans cette étude, nous voulions voir si ces cellules étaient capables d'avoir un effet sur la neurogénèse. En effet, nous suspicions que ces dernières soient capables de sécréter naturellement des facteurs de croissance tel que l'EGF et d'avoir un effet positif sur la formation de neuroblastes. Pour cela, comme pour l'EGF, nous avons testé différentes voies d'injections : en IP et ICV. Nous avons utilisé des CSM modifiées génétiquement pour sur-exprimer le gène de la GFP, afin de pouvoir les retracer lors des marquages immunologiques. Environ 500 000 cellules CSM-GFP, resuspendues dans du NaCl 0,9%, ont été injectées en ICV et 20×10^6 cellules ($80 \mu\text{L}$ d'une suspension cellulaire à $250\,000 \text{ cells}/\mu\text{L}$ dans du NaCl 0,9%) ont été injectées en IP dans la souris. Les souris ont été sacrifiées une semaine après et des marquages immunofluorescents ont été réalisés par la suite. Les injections IP et ICV de CSM-GFP n'ont montrées aucun effet significatif sur la formation de neuroblastes Dcx(+) en comparaison avec l'infusion d'EGF ICV effectuée (**Figure 14**). Ce qui veut dire que les CSM ne sécrètent pas de facteur de croissance, tel que l'EGF, en quantité suffisante permettant de stimuler la formation de neuroblastes.

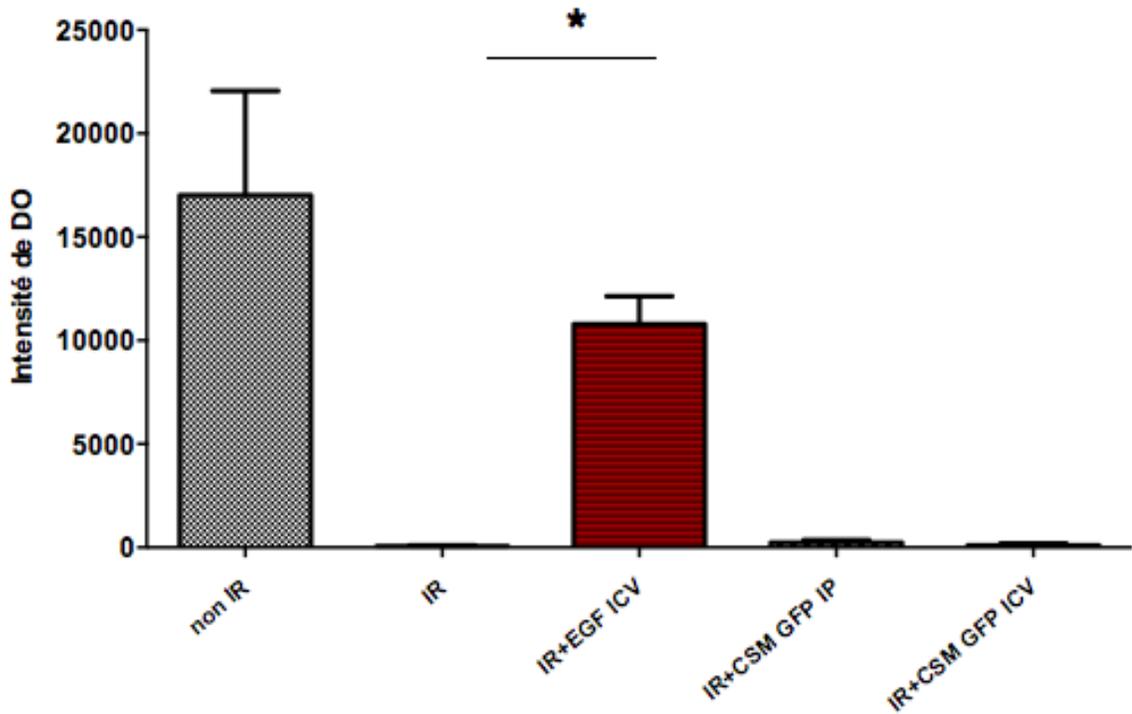


Figure 14. Effet de l'infusion d'EGF ICV et des CSM sur la formation de neuroblastes. Quantification de la population de cellules Dcx(+) dans la partie droite de la ZSV après irradiation locale de 10Gy suivant une infusion ICV d'EGF (20µg/mL) ou des injections de CSM GFP IP (20x10⁶ cellules) et en ICV (environ 500 000 cellules). n=3 à 5 par groupe. Test t de student *p<0.05.

8.7 Évaluation du devenir et de l'effet sur la neurogénèse des CSM IRES GFP/EGF dans le ventricule droit de la ZSV en fonction du temps

Nos résultats précédents ont montré que les CSM seules n'étaient pas capables de stimuler la neurogénèse. Nous avons alors créé des CSM qui surexpriment l'EGF afin de réaliser des injections simples en ICV dans le cerveau de nos souris. Pour ce faire, nous avons utilisé des techniques classiques de clonage à l'aide d'enzymes de restrictions et d'expansions bactériennes. Nous avons préparé un lentivirus de 13 239 pb, que nous avons appelé pLenti-EGFm-IRES-GFP (**Annexe 1**). Il nous a permis d'infecter les CSM avec un taux d'environ 50% (résultats non montrés analysés en cytométrie en flux). La cassette IRES GFP nous a permis de trier les cellules à l'aide d'un appareil de cytométrie en flux pour ne garder que les GFP positives. Nous avons ensuite dosé l'EGF qui est logiquement sécrété en plus grande quantité dans le surnageant de culture cellulaire des cellules qui le sur-expriment que dans celui des CSM GFP. Selon la technique ELISA et nos résultats obtenus, les CSM IRES GFP/EGF surexpriment bien l'EGF à raison d'une sécrétion de l'ordre de 45ng en 48 heures par million de cellules, c'est-à-dire aussi 11,5ng en 48 heures pour 250 000 cellules (**Figure 15**). Nous avons préféré nous concentrer sur leur effet en injection ICV étant donné l'effet déjà remarqué de l'EGF recombinant sur la formation et la prolifération de neuroblastes. Pour effectuer nos injections nous avons étudié en parallèle deux groupes de souris. Les premières ont reçu des CSM IRES GFP/EGF afin d'étudier l'effet de l'EGF sécrété par des CSM, de manière continue pendant 4 semaines, sur la neurogénèse. Les secondes ont reçu des CSM GFP nous servant de groupe témoins. Nous avons choisi de nous concentrer sur la ZSV, région dans laquelle nous avons observé un effet de l'EGF sur la population de jeunes neurones Dcx(+), lors des précédentes expériences. Après analyses des résultats, aucun effet des CSM IRES GFP/EGF sur la formation de neuroblastes n'a été observé, que ce soit à une, deux ou quatre semaines après l'injection et l'irradiation (**Figure 16**). Cependant, nous avons trouvé intéressant de noter le devenir de ces CSM injectées au cours du temps. Celles-ci

s'infiltrant dans l'espace ventriculaire droit de la ZSV puis, au fil du temps, forment une masse volumineuse qui vient se greffer aux cellules de la ZSV bordant le ventricule. Cette masse finit par s'atrophier et disparaître 4 semaines après l'injection initiale (**Figure 17**). Aucune détérioration de la santé des animaux n'a été constatée durant toute la durée de l'expérience.

Concentration d'EGFm dans le surnageant de culture cellulaire de CSM

Cellules	Moyenne ELISA (pg)	Qté totale dans le milieu de culture après 48h (pg)	Qté totale dans le milieu de culture après 48h / 1000000 de cellules (pg)
GFP(+)	ND*	ND*	ND*
MSC IRES GFP(+), EGFm (+); triées le 1-10-14	3385,47	16927,36	45019,58

***ND : Non Detecté**

Figure 15. Dosage ELISA de la quantité d'EGF sécrété. Évaluation de la concentration d'EGF sécrétée par les CSM IRES GFP/EGF, en 48 heures par million de cellules, en comparaison avec les CSM GFP. On calcule une concentration de 11,5ng pour 250 000 cellules en 48 heures a été mesurée.

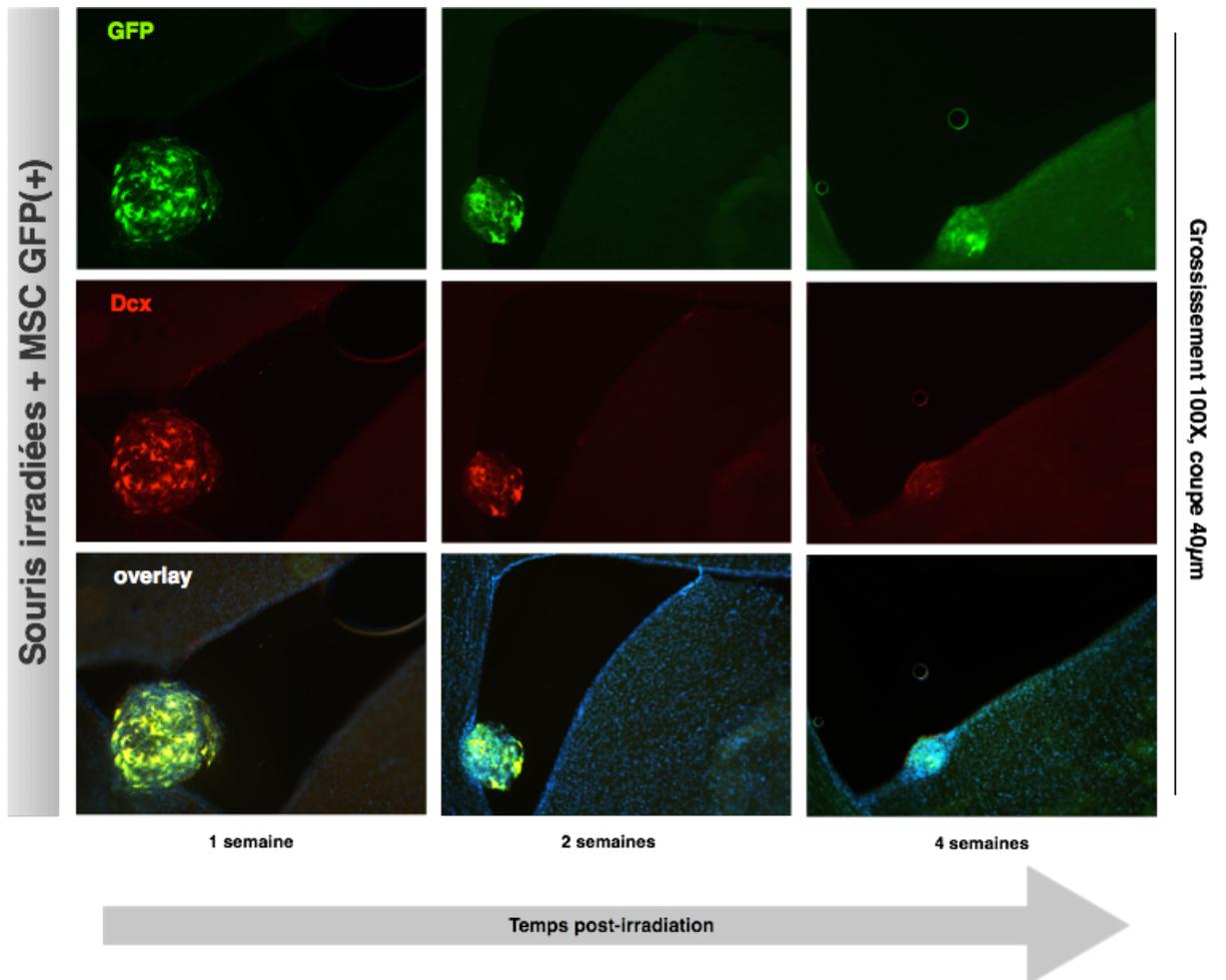


Figure 16. Effet de l'injection de CSM, GFP/EGF injectées dans le ventricule droit de la ZSV de la souris sur la formation de neuroblastes Dcx(+). Injection unique d'environ 400 000 cellules/ μ L en ICV dans le cerveau de souris irradié avec une dose locale de 10Gy. Les souris ont ensuite été sacrifiées à 1 semaine, 2 semaines et 4 semaines après l'irradiation et l'injection des cellules. Des marquage anti-GFP (vert), anti-Dcx (rouge) on été réalisé et tous les noyaux des cellules sont marqués au DAPI (bleu).

Devenir des MSC GFP(+) injectées coté droit de la SVZ

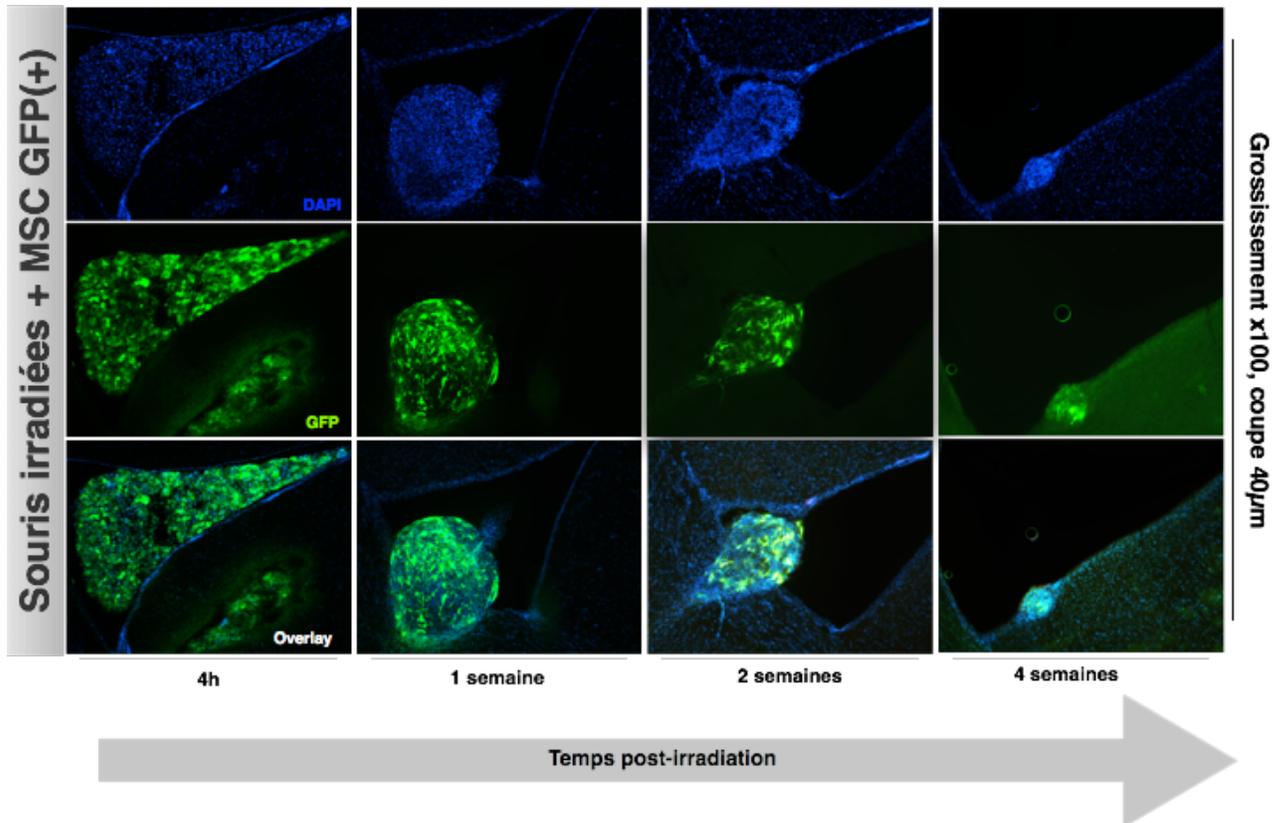


Figure 17. Étude du devenir des MSC, GFP/EGF injectées dans le ventricule droit de la ZSV de la souris irradiée. Injection unique d'environ 400 000 cellules/ μ L en ICV dans le cerveau de souris irradié avec une dose locale de 10Gy. Les souris ont ensuite été sacrifiées 4 heures, 1 semaine, 2 semaines et 4 semaines après l'irradiation et l'injection des cellules. Des marquage anti-GFP (vert) on été réalisé et tous les noyaux des cellules sont marqués au DAPI (bleu).

CHAPITRE IX : DISCUSSION ET PERSPECTIVES

La neurogénèse correspond à l'ensemble des processus de prolifération et de différenciation cellulaire conduisant à la formation de réseaux neuronaux. Chez l'adulte, seuls quelques foyers de neurogénèse sont maintenus, notamment au niveau de la ZSV et de la ZSG de l'hippocampe.

Les traitements anticancéreux tels que l'irradiation, provoquent un arrêt de la neurogénèse menant possiblement à des effets secondaires à long terme. L'EGF est un facteur mitogénique qui active la voie mTOR, permettant d'induire la prolifération de la niche des cellules souches neurales dans le cerveau adulte [9]. Il permet aussi de réduire l'apoptose des cellules souches hématopoïétiques irradiées, par l'inhibition de protéines pro-apoptotiques[10].

La niche de CSN est composée de cellules qui expriment des récepteurs à l'EGF, notamment les cellules progénitrices neurales. Le maintien de cette population de cellules est essentiel pour une régulation dynamique de la genèse cellulaire, en réponse à des changements physiologiques et pathophysiologiques.

Notre hypothèse était donc que la voie de signalisation de l'EGF-R représenterait une cible de thérapie potentielle pour stimuler la neurogénèse adulte. Dans cette étude nous souhaitons mettre en évidence un effet mitotique et/ou anti-apoptotique de l'EGF sur la niche de cellules CSN irradiées.

9.1 Effet à court terme de l'EGF sur la neurogénèse et l'apoptose post-irradiation

Effet de l'EGF sur la formation des neuroblastes

Premièrement, nous avons cherché à administrer l'EGF dans le cerveau en utilisant différentes voies d'injections, en IV et ICV, pour évaluer son effet sur les cellules neurales composant la ZSV et l'hippocampe. Les souris ont été irradiées localement à 10Gy, similairement aux doses d'irradiation utilisées en pratique clinique. Tel qu'attendu, aucune augmentation significative de la formation de cellules Dcx(+) n'a été remarquée suite aux injections en IV (résultats non montrés). En effet, il est établi dans la littérature que l'EGF traverse difficilement la barrière hémato-encéphalique (BHE)[88]. Suite aux injections continues d'EGF par infusions en ICV, nos résultats suggèrent un effet positif sur la formation de neuroblastes Dcx(+) dans la ZSV (**Figures 8, A et B**). Néanmoins, nous n'avons observé aucune augmentation significative de la formation de neuroblastes dans la région de l'Hi après une semaine de traitement (**Figure 8C**). Une des explications possibles de ce phénomène serait que cette région soit moins riche en EGF-R que la ZSV, ce que nos résultats préliminaires suggèrent (**Figure 9, Figure 10**)[72]. Par ailleurs, il n'est pas exclu que les CPN soient mortes par apoptose suite à l'irradiation dans la région de l'Hi alors qu'il en reste suffisamment dans la ZSV pour répondre à l'EGF. En appui à cette hypothèse, nous avons remarqué qu'il y a toujours plus de neurosphères dans la ZSV que dans l'Hi, que se soit avant ou après irradiation (observations non publiées).

Effet de l'EGF sur l'apoptose des cellules de la niche de CSN

Le récepteur à l'EGF est connu pour activer des voies de survie cellulaire (PI3K/Akt) et pour réduire l'apoptose des cellules souches hématopoïétiques irradiées[10]. Nous avons voulu évaluer si l'EGF pouvait également prévenir la mort

des cellules composant la niche de CSN, à l'origine du processus de neurogénèse. Un test TUNEL a alors été effectué sur des cerveaux de souris ayant subi une injection d'EGF avant d'être irradiés. Cette expérience n'a pas révélé d'effet anti-apoptotique de l'EGF dans la ZSV (**Figure 11**).

Le récepteur à l'EGF est également impliqué dans l'activation des voies de prolifération et de croissance cellulaire (MAP Kinases). Ceci suggère que l'EGF pourrait avoir un effet direct sur les cellules progénitrices ayant survécu à l'irradiation de part ses fortes propriétés mitogéniques.

Il est aussi important de noter le fait que nous n'avons effectué dans nos expériences qu'une seule administration unique d'EGF. Il serait intéressant de tester si une administration multiple ou prolongée serait plus efficace pour induire un effet anti-apoptotique.

Effet mitotique de l'EGF

Dans un second temps nous avons voulu confirmer que l'augmentation de la formation de neuroblastes était également synonyme d'une prolifération cellulaire. Pour cela nous avons procédé à des injections quotidiennes de BrdU, pendant toute la durée du traitement à l'EGF, dans la région de la ZSV. Les marquages immuno-histochimiques effectués ont révélé que l'augmentation de la formation de neuroblastes était en effet associée à une incorporation de BrdU dans les noyaux des cellules de la ZSV du cerveau de souris, après irradiation (**Figure 12**). L'EGF a donc un effet mitotique sur les neuroblastes. Les expériences avec le BrdU nous permettent seulement de conclure que les neuroblastes ont effectivement été générés et qu'ils ont proliférés durant la semaine d'injections. Nous ne pouvons pas savoir s'ils sont toujours en prolifération suite à l'arrêt d'administration quotidienne de BrdU. On ne peut également pas conclure à l'effet direct de l'EGF sur les neuroblastes car nous n'avons pas vérifié la prolifération des CNP. Nous aurions pu effectuer, en parallèle, un marquage ciblant le marqueur membranaire Mash1, exprimé par ces cellules et, ainsi, voir si la prolifération des neuroblastes est préalablement associée à la prolifération des CNP, elles-mêmes dépendantes de l'effet de l'EGF.

Effet de l'EGF sur l'apoptose des blastes leucémiques

Malheureusement, nous savons aussi que le récepteur de l'EGF est impliqué dans de nombreux cancers lorsqu'il est muté et activé de manière constitutive. Ainsi, nous avons également évalué son effet sur des lignées de cellules cancéreuses *in vitro*, afin de simuler la présence de cellules leucémiques qui pourraient subsister dans le cerveau de patients suite à la radiothérapie.

L'effet mitogénique observé précédemment nous a amené à évaluer si l'EGF avait un éventuel pouvoir de protection sur des lignées leucémiques humaines, telles que les LAL (lymphocytes B ou T) et les LAM. Notre but est d'améliorer les conditions de vie des patients survivants du cancer après les traitements anticancéreux et d'éviter une reprise de la leucémie suite à l'administration d'EGF dans le cerveau. Après un traitement répété à l'EGF, nous n'avons pas remarqué d'effet anti-apoptotique sur les blastes leucémiques irradiés (**Figure 13**). L'EGF ne semble donc pas interférer avec l'irradiation pour provoquer l'entrée en apoptose des cellules cancéreuses. Il est important de mentionner que seulement quelques lignées ont été évaluées ici et que des études plus poussées seront nécessaires si cette approche devait un jour être appliquée chez le patient.

Des interrogations persistent cependant. Les neuroblastes produits conduisent-ils à la formation de neurones matures et fonctionnels ? Le fait d'induire cette prolifération ne provoquerait-il pas, à long terme, un épuisement prématuré de la niche de cellules souches neurales, à l'origine du phénomène de neurogénèse ? Autant de questions qu'il serait pertinent d'étudier en effectuant d'autres expériences. Par exemple, en évaluant l'effet de l'EGF dans le cerveau irradié sur du plus long terme, ou encore, en effectuant des tests cognitifs sur les souris. De nombreux tests existent pour évaluer leur motricité, leur capacité d'attention ou encore de mémorisation et d'apprentissage, comme le test de « Morris Water Maze » et « Radial Arm Maze ». Le premier consiste à placer le rongeur dans un bassin d'eau dans lequel se trouve une plateforme qu'il doit parvenir à rejoindre. Le second se compose d'un labyrinthe dans lequel le rongeur doit retrouver

son chemin[89]. La souris n'étant pas le modèle animal de prédilection pour l'étude du développement cognitif, nous pourrions utiliser un autre modèle comme le rat.

Nos premiers résultats nous ont encouragés à poursuivre nos expériences et à trouver un moyen d'étudier l'effet de l'EGF, dans la ZSV et l'Hi, à plus long terme. En effet, il est davantage intéressant d'observer un effet prolongé plutôt que des effets à court terme qui nécessiteraient des injections répétées. Nous avons alors la possibilité d'utiliser des pompes conçues pour sécréter l'EGF, de manière continue, pendant plus de deux semaines. Cependant, nous cherchions une méthode d'administration moins invasive pour les souris et permettant d'étudier l'effet de l'EGF, en sécrétion continue, pendant au moins quatre semaines. Étant donné que la majorité des facteurs de croissance ont de faibles demi-vies, il nous semblait plus intéressant de pouvoir obtenir une sécrétion continue de facteur frais, chaque jour, au lieu d'un facteur recombinant qui reste à 37 degrés tout au long de l'expérience[68]. Un vecteur cellulaire capable de sécréter de l'EGF en continu nous a alors semblé idéal.

9.2 Effet de l'EGF à plus long terme sur la neurogénèse post-irradiation via un vecteur de sécrétion

Nous avons tout d'abord cherché un vecteur de sécrétion qui nous permettrait d'étudier l'effet de l'EGF sur la neurogénèse à plus long terme, pendant 2 à 4 semaines. L'idéal serait un vecteur pratique, aussi facile d'utilisation *in vitro* qu'*in vivo* et facilement injectable dans le cerveau sans provoquer de réaction inflammatoire[90].

Les thérapies cellulaires montrent des résultats très prometteurs dans les études concernant les lésions cérébrales[91, 92]. Les CSM sont également bien connues pour leurs propriétés anti-inflammatoires[93]. Il a été démontré qu'elles sont capables de sécréter de nombreux facteurs qui génèrent un environnement immunosupprimé (diminution de la sécrétion de facteur de nécrose tumorale α (TNF- α), interleukine 12 (IL12) et d'interférons- γ et augmentation de la production de IL-10 de la part des cellules dendritiques)[94]. De plus, il est également connu que de nombreux facteurs neurotrophiques sont sécrétés par les CSM et favorisent l'angiogenèse et la

myélinisation dans l'environnement neuronal, ainsi qu'une diminution de la mort cellulaire.

Nous avons alors choisi d'utiliser des CSM issues d'une lignée murine immortalisée (CSM-C1) comme vecteur de sécrétion d'EGF. En plus d'être d'excellentes candidates en matière de transplantation (notamment dans le cerveau)[90], ces cellules sont très faciles à manipuler et amplifier *in vitro*.

Effet des CSM sur la formation de neuroblastes

Nous avons supposé que les CSM seraient capables de migrer dans les régions du cerveau lésées par l'irradiation[90, 95-97] et de stimuler la neurogénèse[98]. Il est très important de choisir une voie d'administration adaptée, étant donnée le lieu (cerveau) et le type d'injection (cellules CSM). Nous n'avons pas considéré les injections par voie IV car il est démontré que les CSM sont naturellement piégées dans les poumons et ne peuvent donc pas migrer vers le cerveau[99]. À forte concentration, celles-ci provoquent des embolies pulmonaires fulgurantes et entraînent la mort des souris. Nous avons donc choisi de tester des injections de CSM par voie IP et ICV. La première permet l'injection d'un grand nombre de cellules sans risque majeur pour l'animal et la seconde permet une injection très localisée dans le cerveau.

Suite à ces deux types d'injections de CSM, nous n'avons pas remarqué d'effet positif sur la neurogénèse (**Figure 14**). Pour vérifier la migration des CSM, injectées en IP jusqu'aux dommages causés par l'irradiation, nous avons utilisé des CSM GFP. Après une semaine, aucune cellule n'a été observée dans le cerveau suite aux marquages immunofluorescents. Pour ce qui est des facteurs qu'elles sécrètent, il a été difficile de les retracer *in vivo*, en raison de leur grand nombre et du fait qu'ils ne sont pas encore tous identifiés. Nous avons préféré nous concentrer sur les injections en ICV, étant donné l'effet déjà remarqué de l'EGF recombinant sur la neurogénèse en utilisant cette voie d'administration. En outre, l'injection en ICV est déjà utilisée et répandue dans la littérature pour les transplantations cellulaires dans le cerveau[96]. Malheureusement, aucun effet positif des CSM sur la formation de neuroblastes n'a pu être mis en évidence. Il se peut que cela soit dû au temps de latence entre l'étape de concentration

des cellules et l'étape où elles sont injectées en ICV dans la souris. Le fait que les cellules soient très concentrées dans une quantité de milieu très faible peut avoir provoqué la mort de beaucoup d'entre elles, limitant ainsi leurs effets après injection. Nous supposons aussi que la quantité d'EGF sécrétée par ces dernières a été trop faible pour stimuler la formation de neuroblastes. Pour vérifier notre hypothèse, nous pourrions utiliser différentes stratégies issues de la biologie moléculaire nous permettant d'augmenter l'expression du gène de l'EGF des CSM.

Effet de l'EGF sécrété par les CSM sur la formation de neuroblastes

L'absence d'effet positif des précédentes injections de CSM sur la neurogénèse nous a poussés à générer des CSM surexprimant l'EGF, afin de les injecter en ICV dans le cerveau des souris. Pour ce faire, nous avons utilisé des techniques classiques de clonage, à l'aide d'enzymes de restriction. Nous avons réussi à obtenir un lentivirus que nous avons appelé pLenti-EGFm-IRES-GFP (**Annexe 2**). Le surnageant de culture a ensuite été prélevé pour doser l'EGF produit. Les résultats obtenus montrent que les CSM-GFP/EGFm surexpriment bien l'EGF, à raison d'une sécrétion de l'ordre de 45ng en 48 heures, par million de cellules. Nous avons injecté environ 250 000 cellules par microlitre, équivalant à une concentration de 11,5ng en 48 heures pour 250 000 cellules (**Figure 15**).

Pour effectuer nos injections de cellules par voie ICV, nous avons formé et étudié, en parallèle, deux groupes de souris. Les premières ont reçu des CSM GFP/EGF, afin d'étudier l'effet sur la neurogénèse de l'EGF sécrété par des CSM, de manière continue, pendant 4 semaines. Les secondes ont reçu des CSM GFP et ont servi de groupe témoins. Nous avons choisi de nous concentrer sur la ZSV, car c'est précisément dans cette région que nous avons observé un effet de l'EGF sur les neuroblastes lors des expériences précédentes. Malheureusement, aucun effet des CSM GFP/EGF sur la neurogénèse n'a été observé que ce soit à une, deux ou quatre semaines après l'injection et l'irradiation (**Figure 16**).

Nous émettons plusieurs hypothèses pour expliquer ces observations, la première étant que nos CSM GFP/EGF ne secrèteraient pas d'assez grandes quantités d'EGF. Selon notre dosage par la méthode ELISA, nous sommes bien loin des doses administrées à l'aide de nos pompes lors des premières expériences. En effet, si l'on compare la dose administrée à la souris au bout d'une semaine par la pompe (1680 µg, soit 240 µg/24h) à la dose administrée par les CSM injectées (3,8 µg, soit 22,5ng/24h) il faudrait alors plus de 100×10^6 cellules (en supposant que la sécrétion soit continue) pour que les doses soient équivalentes. Or, la pression intracrânienne nous contraint à injecter un volume maximal de 2µL. Ceci n'est pas réalisable en pratique, étant donné que les CSM sont des grosses cellules qui se concentrent au maximum à 300 000 cellules/µL. Pour augmenter la sécrétion d'EGF par nos CSM, il faudrait alors envisager, par exemple, de générer un lentivirus doté d'un promoteur plus puissant et/ou d'insérer des séquences d'ADN en amont de ce promoteur, spécifiquement connues pour le protéger d'une éventuelle inhibition *in vivo* et pour accentuer l'expression des gènes en aval. En effet, des études ont montré l'existence de séquence UCOE (Élément ubiquitaire d'ouverture de la chromatine), capables de maintenir des niveaux élevés d'expression de transgènes de façon stable et à long terme, lorsqu'elle est intégrée aux vecteurs lentiviraux[100, 101].

La seconde hypothèse serait que l'EGF recombinant produit par nos CSM ne soit pas fonctionnel. Ceci empêcherait alors l'activation de son récepteur. Nous pourrions tester cette hypothèse facilement en stimulant des cellules connues pour surexprimer la voie de signalisation de l'EGF-R avec de l'EGF sécrété par nos cellules CSM IRES GFP(+), EGFm(+). Puis, en utilisant la technique d'immunobuvardage, nous pourrions détecter la phosphorylation de protéines comme Ras ou Rak, composantes de la voie des MAP Kinases. Cette expérience permettrait de montrer si l'EGF produit est capable d'activer la voie de signalisation de l'EGF-R, c'est-à-dire de voir s'il est fonctionnel ou non.

De plus, nos précédents résultats suggèrent une dose d'EGF à administrer tous les jours pour observer un effet positif sur la neurogénèse. Nous pourrions également rechercher une relation dose-effet de l'EGF pour obtenir une information quantitative sur l'importance de son effet pharmacologique en utilisant des doses croissantes. Nous obtiendrions alors une courbe dose-effet qui nous permettrait de déterminer deux

paramètres importants que sont : la dose seuil (dose à partir de laquelle un effet apparaît) et la dose à partir de laquelle l'effet maximal est atteint. Ces deux doses limites encadreraient alors les doses efficaces ou nous pourrions observer un effet sur la neurogénèse.

Nous aurions pu également effectuer d'autres expériences dans le but d'évaluer l'effet de l'EGF sur des gènes dont l'expression est connue pour être modifiée suite à l'exposition aux rayons ionisants. Nous pouvons noter, par exemple, le gène suppresseur de tumeurs p16^{INK4a}, dont l'expression est connue pour augmenter en réponse au stress oxydatif provoqué par l'irradiation[6].

Concernant les expériences effectuées sur les CSM, nous avons trouvé intéressant de noter, par la suite, leur devenir au cours du temps.

Étude du devenir des CSM après injections

Lors de nos dernières expériences, nous avons observé que les CSM injectées s'étaient infiltrées dans l'espace ventriculaire de la ZSV. Elles avaient progressivement formé une masse volumineuse. Celle-ci est venue se greffer aux cellules de la ZSV bordant le ventricule et a fini par s'atrophier et disparaître 4 semaines après l'injection initiale (**Figure 17**). Ce phénomène pourrait être relié à l'activité de la microglie dans le cerveau. Les CSM seraient alors phagocytées, ce qui pourrait expliquer leur disparition progressive. L'apoptose induite, liée au manque d'attachement des cellules à une matrice extracellulaire, pourrait également être à l'origine de leur disparition. Ce mécanisme s'appelle l'anoïkose [102].

Malgré la formation de caillots dans les ventricules suite à l'injection des CSM, aucune détérioration de la santé des animaux n'a été constatée, mais il se pourrait que leur présence ait d'autres conséquences néfastes.

Notre idée de vouloir utiliser des cellules pour la sécrétion à long terme d'une protéine comme l'EGF est intéressante, pratique et innovante à l'heure où les scientifiques orientent leurs travaux vers de nouvelles thérapies cellulaires. Mais, il existe aussi un risque qui est la perte de contrôle de la prolifération et de la

différenciation des cellules injectées. Dans notre cas, les CSM se sont infiltrées dans le ventricule rempli de LCR et se sont agglutinées en formant un caillot. On peut présumer que ceci aurait de graves conséquences si le caillot se formait dans le ventricule d'un cerveau humain. En effet, le LCR étant un liquide acellulaire dans des conditions non pathologiques, on peut supposer que l'infiltration de cellules et la formation d'un caillot au sein de ces ventricules causeraient une obstruction mécanique des voies de circulation et provoqueraient une hydrocéphalie, qui est une anomalie neurologique sévère. Anomalie qui s'accompagne, par ailleurs, d'une hypertension intracrânienne et nécessite une prise en charge immédiate. Par conséquent, cette méthode pour sécréter l'EGF de manière continue n'est, actuellement, pas envisageable en clinique.

Il est important de noter que dans le cas d'une action de courte durée, nous n'avons pas pu étudier les effets de l'EGF au-delà de 4 semaines, à moins d'injections répétées, étant donné que les CSM disparaissent au-delà de ce laps de temps. Leur présence dans le cerveau devient alors indispensable pour une sécrétion répétée et continue. Il est cependant très intéressant d'utiliser un vecteur de sécrétion qui disparaît spontanément et ne nécessite pas de seconde chirurgie pour être extrait du cerveau.

Finalement, pour valider le concept d'administration d'EGF dans le cerveau, via un vecteur de sécrétion, il serait envisageable d'injecter notre lentivirus, pLenti-EGFm-IRES-GFP, directement dans les régions de la ZSV et de l'Hi du cerveau de souris. L'EGF serait alors sécrété par les cellules du cerveau elles-mêmes, faisant ainsi augmenter sa concentration. Les limites seraient que le promoteur lentiviral ne soit pas assez fort pour exprimer l'EGF à une concentration suffisamment élevée pour induire un effet positif sur la formation de neuroblastes. Nous pourrions alors rajouter une séquence UCOE pour intensifier l'expression de ce gène, tel qu'énoncé précédemment. Il est également connu que le lentivirus s'intègre définitivement dans le génome des cellules qu'il infecte. L'une des autres limites majeures serait alors la création de mutations, dues à l'intégration aléatoire du virus dans l'ADN, entraînant des instabilités génomiques qui pourraient avoir des conséquences désastreuses, comme par exemple la formation de tumeurs. Il pourrait alors être intéressant d'utiliser un vecteur d'expression épisomale, comme un virus adéno-associé (AAV), qui ne s'intègre pas de manière

définitive dans le génome des cellules infectées. Ce dernier est un petit virus à ADN, non pathogène et très attractif pour tout ce qui a trait aux transferts de gènes. Il possède, en plus, la capacité de traverser la BHE et pourrait donc permettre, via la circulation sanguine, d'apporter des agents thérapeutiques dans le cerveau.

Il faut cependant noter que l'activation en continu de la voie de signalisation de l'EGF-R dans des cellules astrocytaires pourrait également entraîner des lésions cérébrales, comme la formation de tumeurs cérébrales malignes que sont les gliomes [103]. Par conséquent, ces technologies issues de la biologie moléculaire doivent être utilisées avec beaucoup de précautions et de façon très localisée dans le cerveau.

L'injection de cellules modifiées génétiquement peut entraîner beaucoup de complications. L'utilisation de pompes pour permettre l'administration d'EGF recombinant reste alors très intéressante, d'autant qu'il existe maintenant des pompes capables de sécréter de l'EGF directement dans le cerveau jusqu'à six semaines après son implantation sur l'animal.

Le mode d'administration de substances pharmacologiques à l'aide de pompes est de plus en plus employé et se développe grâce à la mise au point de nombreux polymères qui entrent dans la composition de nouveaux matériels médicaux, toujours plus innovants et performants visant à améliorer la qualité de vie des patients. Pour citer quelques applications cliniques, nous pouvons notamment évoquer l'apparition sur le marché de la pompe à insuline, pour les patients atteints de diabète de type 1 ou 2, ainsi que, plus récemment, de la pompe à apomorphine, pour les patients souffrant de fluctuations motrices invalidantes dans la maladie de Parkinson[104].

Néanmoins, appliquée au cerveau, cette technique d'administration ne semble pas aussi prometteuse. En effet, une étude clinique de phase 1 sur des patients atteints de la maladie d'Alzheimer a été suspendue en raison des effets systémiques indésirables suite à l'injection directe de NGF dans le cerveau[105].

D'autres méthodes d'administration d'EGF pourraient être considérées. La voie intranasale pourrait être une alternative intéressante à l'injection en ICV. Il s'agit d'une méthode non invasive, capable de contourner les problèmes d'imperméabilités liées à la BHE et de délivrer des agents thérapeutiques au cerveau. Par cette méthode, il est

possible d'administrer des substances pharmacologiques qui ne traversent pas la BHE directement dans le SNC. De plus, cela nous permettrait de ne pas utiliser la voie systémique, évitant ainsi les nombreux effets indésirables associés tels que les surdosages médicamenteux[106]. En utilisant cette voie d'administration, de nombreux scientifiques ont réussi à réduire la neurodégénérescence associée à la maladie d'Alzheimer, réduire l'anxiété et stimuler la neurogénèse[107]. De nombreuses protéines thérapeutiques ont pu être administrées dans le cerveau grâce à une injection intranasale dans différents modèles d'animaux. Nous pouvons citer en exemple le facteur de croissance nerveux (NGF)[106, 108], l'érythropoïétine (EPO)[109], ou encore le facteur de croissance à l'insuline (IGF)[110]. Les agents thérapeutiques injectés se rendent jusqu'au cerveau via les nerfs olfactifs et trijumeaux qui innervent la cavité nasale la connectant avec le SNC[111, 112].

Pour notre étude, la voie intranasale pourrait donc constituer une fenêtre pour l'accès de substance thérapeutiques au cerveau et représenterait la possibilité d'administrer facilement l'EGF de façon non invasive, afin d'observer son effet à long terme. Les faibles quantités administrables et absorbable par l'organisme restent cependant une des limites principale de cette voie d'administration.

CONCLUSION

L'EGF, comme de nombreux autres facteurs de croissance, traverse difficilement la barrière hémato-encéphalique. Néanmoins, il est à l'origine de l'activation de nombreuses voies de signalisation, induisant la survie ou la prolifération cellulaire, notamment celle des CNP. Le maintien de cette population de cellules est essentiel pour une régulation dynamique de la genèse cellulaire en réponse à des changements physiologiques et pathophysiologiques.

Nous sommes partis de l'hypothèse que la voie de signalisation de l'EGF-R représenterait une cible de thérapie potentielle pour réguler la neurogénèse adulte. Dans cette étude, nous souhaitons mettre en évidence un effet mitotique et/ou anti-apoptotique de l'EGF sur la niche de cellules CSN irradiées.

Nos expériences ont montré que l'EGF induit la formation et la prolifération de neuroblastes dans le cerveau de souris irradiés, suite à infusion en ICV dans la ZSV du cerveau de souris. Son rôle dans la protection des cellules contre l'apoptose n'a pas été démontré. Étant donné le caractère invasif des injections en ICV et l'administration à court terme que permettaient d'effectuer les pompes à infusion, nous avons cherché à utiliser des CSM comme vecteur de sécrétion afin d'étudier les effets de l'EGF, en sécrétion continue à long terme. Cependant, les expériences effectuées ne nous ont pas permis de tirer de conclusions positives quant au choix du vecteur de sécrétion utilisé. En effet, aucun effet sur la neurogénèse n'a été observé et les cellules ont disparu spontanément après 4 semaines.

Suite à nos travaux, il faut maintenant considérer d'autres possibilités pour optimiser les méthodes d'administration de l'EGF dans le cerveau. La mise en place de thérapies géniques à base de virus est envisageable mais comporte beaucoup de risques et de problèmes d'éthique. C'est pourquoi la combinaison de thérapies génique et cellulaire reste une bonne alternative. Dans notre étude la sécrétion de l'EGF par les CSM doit être optimisée et l'emploi d'AVV reste à être exploré.

Nous pourrions également envisager d'autres stratégies pour permettre à l'EGF de traverser la BHE. Notons, par exemple, l'utilisation de nanoparticules formées de polymères biocompatibles, ou encore l'action directe sur les jonctions serrées de la BHE. Toutes ces stratégies restent à l'étude et sont encore loin d'être généralisées. Nous pourrions également envisager une autre voie d'administration de l'EGF comme la voie intranasale. Cette dernière est de plus en plus répandue dans le monde scientifique comme moyen de contourner la BHE, afin de délivrer des agents thérapeutiques au cerveau. À moyen court terme, l'implantation d'une pompe permettant la sécrétion continue d'EGF pendant plus de 4 semaines reste la méthode la plus prometteuse pour évaluer son effet sur une longue durée chez la souris.

Pour finir, le récepteur à l'EGF représente une cible intéressante pour permettre une régulation de la neurogénèse, mais des problèmes persistent quant à son utilisation, son implication dans les cancers et son administration dans le cerveau. Ces paramètres doivent donc être optimisés avant de pouvoir prétendre au développement d'un éventuel traitement clinique. Les thérapies innovantes et ciblées à base d'EGF sont très prometteuses, notamment pour permettre la régulation de la neurogénèse après une irradiation. Elles permettraient d'améliorer grandement la qualité de vie des patients survivants du cancer.

Bibliographie

1. cancer, S.c.d., *Signes et symptômes de la leucémie chez l'enfant*
Read more: <http://www.cancer.ca/fr-ca/cancer-information/cancer-type/leukemia-childhood/signs-and-symptoms/?region=on - ixzz30Dc4n9hO>. 2014.
2. Société, C.c.d.l. and c.d. cancer, *Statistiques canadiennes sur le cancer Toronto (Ontario) : Société canadienne du cancer, 2014.* 2014.
3. Société canadienne du cancer, S.C. and R.p.e.t.d.c. Agence de la santé publique du Canada, *Statistiques canadiennes sur le cancer.* 2013.
4. Schwartz, C.L., *Long-term survivors of childhood cancer: the late effects of therapy.* *Oncologist*, 1999. **4**(1): p. 45-54.
5. International Agency for Research on Cancer, W.H.O. *GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012.* 2012; Available from: <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>.
6. Jenkins, N.C., et al., *The p16(INK4A) tumor suppressor regulates cellular oxidative stress.* *Oncogene*, 2011. **30**(3): p. 265-74.
7. Ressler, S., et al., *p16INK4A is a robust in vivo biomarker of cellular aging in human skin.* *Aging Cell*, 2006. **5**(5): p. 379-89.
8. Havelek, R., et al., *Ionizing radiation induces senescence and differentiation of human dental pulp stem cells.* *Folia Biol (Praha)*, 2013. **59**(5): p. 188-97.
9. Paliouras, G.N., et al., *Mammalian target of rapamycin signaling is a key regulator of the transit-amplifying progenitor pool in the adult and aging forebrain.* *J Neurosci*, 2012. **32**(43): p. 15012-26.
10. Doan, P.L., et al., *Epidermal growth factor regulates hematopoietic regeneration after radiation injury.* *Nat Med*, 2013. **19**(3): p. 295-304.
11. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation.* *Cell*, 2011. **144**(5): p. 646-74.
12. Naidoo, J., D.B. Page, and J.D. Wolchok, *Immune modulation for cancer therapy.* *Br J Cancer*, 2014.
13. Shih, K., H.T. Arkenau, and J.R. Infante, *Clinical impact of checkpoint inhibitors as novel cancer therapies.* *Drugs*, 2014. **74**(17): p. 1993-2013.
14. Giustranti, C., *Cancers de l'enfant : Le neuroblastome - Institut Curie.* 2014.
15. Patients., N.C.I.N.P.T.-. (2008, February).
16. Pui, C.H. and W.E. Evans, *Treatment of acute lymphoblastic leukemia.* *N Engl J Med*, 2006. **354**(2): p. 166-78.
17. Le CHUQ, D.d.c. *La radiothérapie.* 2014; Available from: http://www.chuq.qc.ca/fr/les_soins/cancerologie/radiotherapie/.
18. Thomas, E.D., et al., *Marrow transplantation for acute nonlymphoblastic leukemia in first remission.* *N Engl J Med*, 1979. **301**(11): p. 597-9.
19. Mothersill, C. and C. Seymour, *Radiation-induced bystander effects: past history and future directions.* *Radiat Res*, 2001. **155**(6): p. 759-67.
20. Pui, C.H., et al., *Treating childhood acute lymphoblastic leukemia without cranial irradiation.* *N Engl J Med*, 2009. **360**(26): p. 2730-41.

21. Onciu, M., *Acute lymphoblastic leukemia*. Hematol Oncol Clin North Am, 2009. **23**(4): p. 655-74.
22. Johnson, F.L., et al., *A comparison of marrow transplantation with chemotherapy for children with acute lymphoblastic leukemia in second or subsequent remission*. N Engl J Med, 1981. **305**(15): p. 846-51.
23. Pui, C.H. and W.E. Evans, *Acute lymphoblastic leukemia*. N Engl J Med, 1998. **339**(9): p. 605-15.
24. Sanders, J.E., et al., *Growth and development following marrow transplantation for leukemia*. Blood, 1986. **68**(5): p. 1129-35.
25. Fei, P. and W.S. El-Deiry, *P53 and radiation responses*. Oncogene, 2003. **22**(37): p. 5774-83.
26. nucléaire, I.d.r.e.d.s. *Rayonnements ionisants et santé*. 2004; Available from: http://www.irsn.fr/FR/base_de_connaissances/librairie/Documents/publications_pour_les_professionnels/IRSN_ColPro_rayonnements_ionisants_sante.pdf.
27. Lee Goldman, A.I.S., *Goldman's Cecil Medicine Cancérologie*. 2013, ELSEVIER MASSON. p. 40.
28. Le, O.N., et al., *Ionizing radiation-induced long-term expression of senescence markers in mice is independent of p53 and immune status*. Aging Cell, 2010. **9**(3): p. 398-409.
29. Thomas, E.D., et al., *Marrow transplantation for acute nonlymphoblastic leukemic in first remission using fractionated or single-dose irradiation*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1982. **8**(5): p. 817-21.
30. Omori, M., et al., *Eleven secondary cancers after hematopoietic stem cell transplantation using a total body irradiation-based regimen in 370 consecutive pediatric and adult patients*. Springerplus, 2013. **2**: p. 424.
31. Munoz-Espin, D. and M. Serrano, *Cellular senescence: from physiology to pathology*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014. **15**(7): p. 482-96.
32. Oeffinger, K.C., et al., *Chronic health conditions in adult survivors of childhood cancer*. N Engl J Med, 2006. **355**(15): p. 1572-82.
33. Oeffinger, K.C., et al., *Breast cancer surveillance practices among women previously treated with chest radiation for a childhood cancer*. Jama, 2009. **301**(4): p. 404-14.
34. Anderson, F.S. and A.S. Kunin-Batson, *Neurocognitive late effects of chemotherapy in children: the past 10 years of research on brain structure and function*. Pediatr Blood Cancer, 2009. **52**(2): p. 159-64.
35. Goldsby, R.E., et al., *Late-occurring neurologic sequelae in adult survivors of childhood acute lymphoblastic leukemia: a report from the Childhood Cancer Survivor Study*. J Clin Oncol, 2010. **28**(2): p. 324-31.
36. Mulhern, R.K. and S.L. Palmer, *Neurocognitive late effects in pediatric cancer*. Curr Probl Cancer, 2003. **27**(4): p. 177-97.
37. Ziereisen, F., et al., *Reversible acute methotrexate leukoencephalopathy: atypical brain MR imaging features*. Pediatr Radiol, 2006. **36**(3): p. 205-12.
38. Saykin, A.J., T.A. Ahles, and B.C. McDonald, *Mechanisms of chemotherapy-induced cognitive disorders: neuropsychological, pathophysiological, and neuroimaging perspectives*. Semin Clin Neuropsychiatry, 2003. **8**(4): p. 201-16.
39. Dean, C.A.N.a.R.S., *The Neurophychology of cancer and Oncology*. 2013.

40. Ellenberg, L., et al., *Neurocognitive status in long-term survivors of childhood CNS malignancies: a report from the Childhood Cancer Survivor Study*. Neuropsychology, 2009. **23**(6): p. 705-17.
41. Mabbott, D.J., et al., *Core neurocognitive functions in children treated for posterior fossa tumors*. Neuropsychology, 2008. **22**(2): p. 159-68.
42. Blackmore, D.G. and R.L. Rietze, *Distribution of neural precursor cells in the adult mouse brain*. Methods Mol Biol, 2013. **1059**: p. 183-94.
43. Bernal, G.M. and D.A. Peterson, *Neural stem cells as therapeutic agents for age-related brain repair*. Aging Cell, 2004. **3**(6): p. 345-51.
44. Thored, P., et al., *Persistent production of neurons from adult brain stem cells during recovery after stroke*. Stem Cells, 2006. **24**(3): p. 739-47.
45. Zhang, R., et al., *Activated neural stem cells contribute to stroke-induced neurogenesis and neuroblast migration toward the infarct boundary in adult rats*. J Cereb Blood Flow Metab, 2004. **24**(4): p. 441-8.
46. Zhang, R.L., et al., *Proliferation and differentiation of progenitor cells in the cortex and the subventricular zone in the adult rat after focal cerebral ischemia*. Neuroscience, 2001. **105**(1): p. 33-41.
47. Altman, J., *Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb*. J Comp Neurol, 1969. **137**(4): p. 433-57.
48. Alvarez-Buylla, A. and J.M. Garcia-Verdugo, *Neurogenesis in adult subventricular zone*. J Neurosci, 2002. **22**(3): p. 629-34.
49. Lazarini, F., et al., *Adult neurogenesis restores dopaminergic neuronal loss in the olfactory bulb*. J Neurosci, 2014. **34**(43): p. 14430-42.
50. Yao, J., Y. Mu, and F.H. Gage, *Neural stem cells: mechanisms and modeling*. Protein Cell, 2012. **3**(4): p. 251-61.
51. Eriksson, P.S., et al., *Neurogenesis in the adult human hippocampus*. Nat Med, 1998. **4**(11): p. 1313-7.
52. Elder, G.A., R. De Gasperi, and M.A. Gama Sosa, *Research update: neurogenesis in adult brain and neuropsychiatric disorders*. Mt Sinai J Med, 2006. **73**(7): p. 931-40.
53. Lledo, M.L.e.P.-M., *Le cerveau adulte: un perpétuel chantier! New neurons can be created in the adult brain*. médecine sciences, 2003. **19**: p. p. 664-666.
54. Kan, I., et al., *Mesenchymal stem cells stimulate endogenous neurogenesis in the subventricular zone of adult mice*. Stem Cell Rev, 2011. **7**(2): p. 404-12.
55. Frederiksen, K. and R.D. McKay, *Proliferation and differentiation of rat neuroepithelial precursor cells in vivo*. J Neurosci, 1988. **8**(4): p. 1144-51.
56. Wang, J.M., et al., *Regeneration in a degenerating brain: potential of allopregnanolone as a neuroregenerative agent*. Curr Alzheimer Res, 2007. **4**(5): p. 510-7.
57. Berg, J., et al., *Human adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Improve Motor Functions and are Neuroprotective in the 6-Hydroxydopamine-Rat Model for Parkinson's Disease when Cultured in Monolayer Cultures but Suppress Hippocampal Neurogenesis and Hippocampal Memory Function when Cultured in Spheroids*. Stem Cell Rev, 2014.

58. Kohl, Z., et al., *Impaired adult olfactory bulb neurogenesis in the R6/2 mouse model of Huntington's disease*. BMC Neurosci, 2010. **11**: p. 114.
59. Swartling, F.J., et al., *Deregulated proliferation and differentiation in brain tumors*. Cell Tissue Res, 2014.
60. Petrik, D., D.C. Lagace, and A.J. Eisch, *The neurogenesis hypothesis of affective and anxiety disorders: are we mistaking the scaffolding for the building?* Neuropharmacology, 2012. **62**(1): p. 21-34.
61. Aguirre, A., M.E. Rubio, and V. Gallo, *Notch and EGFR pathway interaction regulates neural stem cell number and self-renewal*. Nature, 2010. **467**(7313): p. 323-7.
62. Arvidsson, A., et al., *Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke*. Nat Med, 2002. **8**(9): p. 963-70.
63. Thored, P., et al., *Long-term neuroblast migration along blood vessels in an area with transient angiogenesis and increased vascularization after stroke*. Stroke, 2007. **38**(11): p. 3032-9.
64. Hugnot, J. *Cellules souches Neurales*. 2006. Montpellier.
65. Cohen, S. and G. Carpenter, *Human epidermal growth factor: isolation and chemical and biological properties*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1975. **72**(4): p. 1317-21.
66. Scott, J., et al., *The structure and biosynthesis of epidermal growth factor precursor*. J Cell Sci Suppl, 1985. **3**: p. 19-28.
67. Carpenter, G. and S. Cohen, *Epidermal growth factor*. J Biol Chem, 1990. **265**(14): p. 7709-12.
68. Hubert, P., *Les facteurs de croissance de la famille de l'EGF et leurs récepteurs*. Bull Cancer, 2006: p. 17-24.
69. Bennisroune, A., et al., *Tyrosine kinase receptors as attractive targets of cancer therapy*. Crit Rev Oncol Hematol, 2004. **50**(1): p. 23-38.
70. Steelman, L.S., et al., *Contributions of the Raf/MEK/ERK, PI3K/PTEN/Akt/mTOR and Jak/STAT pathways to leukemia*. Leukemia, 2008. **22**(4): p. 686-707.
71. Casalini, P., et al., *Role of HER receptors family in development and differentiation*. J Cell Physiol, 2004. **200**(3): p. 343-50.
72. Pastrana, E., L.C. Cheng, and F. Doetsch, *Simultaneous prospective purification of adult subventricular zone neural stem cells and their progeny*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(15): p. 6387-92.
73. Doetsch, F., et al., *EGF converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells*. Neuron, 2002. **36**(6): p. 1021-34.
74. Tropepe, V., et al., *Transforming growth factor-alpha null and senescent mice show decreased neural progenitor cell proliferation in the forebrain subependyma*. J Neurosci, 1997. **17**(20): p. 7850-9.
75. Minder, P., et al., *Meprialpha transactivates the epidermal growth factor receptor (EGFR) via ligand shedding, thereby enhancing colorectal cancer cell proliferation and migration*. J Biol Chem, 2012. **287**(42): p. 35201-11.
76. Cao, C., et al., *Galpha(i1) and Galpha(i3) are required for epidermal growth factor-mediated activation of the Akt-mTORC1 pathway*. Sci Signal, 2009. **2**(68): p. ra17.

77. Kucic, T., et al., *Mesenchymal stromal cells genetically engineered to overexpress IGF-I enhance cell-based gene therapy of renal failure-induced anemia*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2008. **295**(2): p. F488-96.
78. Alessandri, G., C. Emanuelli, and P. Madeddu, *Genetically engineered stem cell therapy for tissue regeneration*. *Ann N Y Acad Sci*, 2004. **1015**: p. 271-84.
79. Giordano, A., U. Galderisi, and I.R. Marino, *From the laboratory bench to the patient's bedside: an update on clinical trials with mesenchymal stem cells*. *J Cell Physiol*, 2007. **211**(1): p. 27-35.
80. Sasaki, T., et al., *Gene and cell-based therapy for diabetes mellitus: endocrine gene therapeutics*. *Endocr Pathol*, 2003. **14**(2): p. 141-4.
81. Eliopoulos, N., et al., *Erythropoietin delivery by genetically engineered bone marrow stromal cells for correction of anemia in mice with chronic renal failure*. *J Am Soc Nephrol*, 2006. **17**(6): p. 1576-84.
82. Benabdallah, B.F., et al., *Targeted gene addition to human mesenchymal stromal cells as a cell-based plasma-soluble protein delivery platform*. *Cytotherapy*, 2010. **12**(3): p. 394-9.
83. Menasche, P., *Cellular transplantation: hurdles remaining before widespread clinical use*. *Curr Opin Cardiol*, 2004. **19**(2): p. 154-61.
84. Thomas, T., et al., *Response of bipotential human marrow stromal cells to insulin-like growth factors: effect on binding protein production, proliferation, and commitment to osteoblasts and adipocytes*. *Endocrinology*, 1999. **140**(11): p. 5036-44.
85. Li, T., et al., *X-ray irradiation accelerates senescence in hippocampal neural stem/progenitor cells via caspase-1 activation*. *Neurosci Lett*, 2014. **585c**: p. 60-65.
86. Paxinos G, F.K., *The mouse brain in stereotaxic coordinates* Academic Press: San Diego, CA, 2001: p. 124pp.
87. Bouab, M., et al., *Aging of the subventricular zone neural stem cell niche: evidence for quiescence-associated changes between early and mid-adulthood*. *Neuroscience*, 2011. **173**: p. 135-49.
88. Nave, K.A., R. Probstmeier, and M. Schachner, *Epidermal growth factor does not cross the blood-brain barrier*. *Cell Tissue Res*, 1985. **241**(2): p. 453-7.
89. Douglas, I.U.e.S.m. *Test de mémoire et d'apprentissage*. 2011; Available from: <http://www.douglas.qc.ca/page/neurophenotypage-memoire-apprentissage>.
90. Ahn, S.Y., Y.S. Chang, and W.S. Park, *Mesenchymal stem cells transplantation for neuroprotection in preterm infants with severe intraventricular hemorrhage*. *Korean J Pediatr*, 2014. **57**(6): p. 251-6.
91. Cao, Q., R.L. Benton, and S.R. Whitemore, *Stem cell repair of central nervous system injury*. *J Neurosci Res*, 2002. **68**(5): p. 501-10.
92. Pluchino, S., et al., *Neurosphere-derived multipotent precursors promote neuroprotection by an immunomodulatory mechanism*. *Nature*, 2005. **436**(7048): p. 266-71.
93. Rasmusson, I., et al., *Mesenchymal stem cells inhibit the formation of cytotoxic T lymphocytes, but not activated cytotoxic T lymphocytes or natural killer cells*. *Transplantation*, 2003. **76**(8): p. 1208-13.

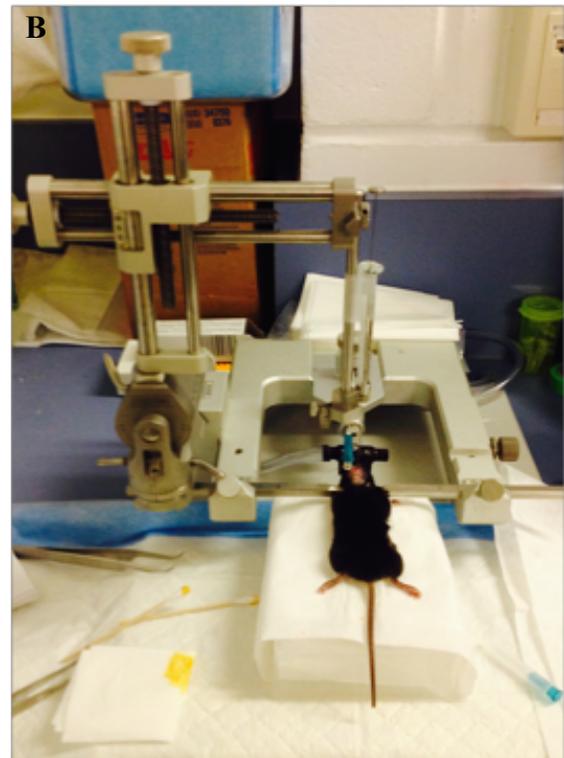
94. Aggarwal, S. and M.F. Pittenger, *Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses*. Blood, 2005. **105**(4): p. 1815-22.
95. Sharma, R.R., et al., *Mesenchymal stem or stromal cells: a review of clinical applications and manufacturing practices*. Transfusion, 2014. **54**(5): p. 1418-37.
96. van Velthoven, C.T., A. Kavelaars, and C.J. Heijnen, *Mesenchymal stem cells as a treatment for neonatal ischemic brain damage*. Pediatr Res, 2012. **71**(4 Pt 2): p. 474-81.
97. van Velthoven, C.T., et al., *Mesenchymal stem cell transplantation attenuates brain injury after neonatal stroke*. Stroke, 2013. **44**(5): p. 1426-32.
98. Donega, V., et al., *The endogenous regenerative capacity of the damaged newborn brain: boosting neurogenesis with mesenchymal stem cell treatment*. J Cereb Blood Flow Metab, 2013. **33**(5): p. 625-34.
99. Ortiz, L.A., et al., *Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(14): p. 8407-11.
100. Dighe, N., et al., *Long-term reproducible expression in human fetal liver hematopoietic stem cells with a UCOE-based lentiviral vector*. PLoS One, 2014. **9**(8): p. e104805.
101. Bandaranayake, A.D., et al., *Daedalus: a robust, turnkey platform for rapid production of decigram quantities of active recombinant proteins in human cell lines using novel lentiviral vectors*. Nucleic Acids Res, 2011. **39**(21): p. e143.
102. Gilmore, A., P., *Anoikis*. Cell Death and Differentiation, 2005. **12**: p. 1473-1477.
103. Holland, E.C., et al., *A constitutively active epidermal growth factor receptor cooperates with disruption of G1 cell-cycle arrest pathways to induce glioma-like lesions in mice*. Genes Dev, 1998. **12**(23): p. 3675-85.
104. V erin M, D.L., *La maladie de Parkinson*, in Elsevier-Masson, I.d.N.C.d.R. (INCR), Editor. 2011.
105. Eriksdotter Jonhagen, M., et al., *Intracerebroventricular infusion of nerve growth factor in three patients with Alzheimer's disease*. Dement Geriatr Cogn Disord, 1998. **9**(5): p. 246-57.
106. De Rosa, R., et al., *Intranasal administration of nerve growth factor (NGF) rescues recognition memory deficits in AD11 anti-NGF transgenic mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(10): p. 3811-6.
107. Hanson, L.R. and W.H. Frey, 2nd, *Strategies for intranasal delivery of therapeutics for the prevention and treatment of neuroAIDS*. J Neuroimmune Pharmacol, 2007. **2**(1): p. 81-6.
108. Chen, X.Q., et al., *Delivery of Nerve Growth Factor to the Brain via the Olfactory Pathway*. J Alzheimers Dis, 1998. **1**(1): p. 35-44.
109. Garcia-Rodriguez, J.C. and I. Sosa-Teste, *The nasal route as a potential pathway for delivery of erythropoietin in the treatment of acute ischemic stroke in humans*. ScientificWorldJournal, 2009. **9**: p. 970-81.
110. Liu, X.F., et al., *Intranasal administration of insulin-like growth factor-I bypasses the blood-brain barrier and protects against focal cerebral ischemic damage*. J Neurol Sci, 2001. **187**(1-2): p. 91-7.

111. Thorne, R.G., et al., *Delivery of insulin-like growth factor-I to the rat brain and spinal cord along olfactory and trigeminal pathways following intranasal administration*. *Neuroscience*, 2004. **127**(2): p. 481-96.
112. Thorne, R.G. and W.H. Frey, 2nd, *Delivery of neurotrophic factors to the central nervous system: pharmacokinetic considerations*. *Clin Pharmacokinet*, 2001. **40**(12): p. 907-46.

Mode opératoire de la chirurgie des souris : perçage et injections



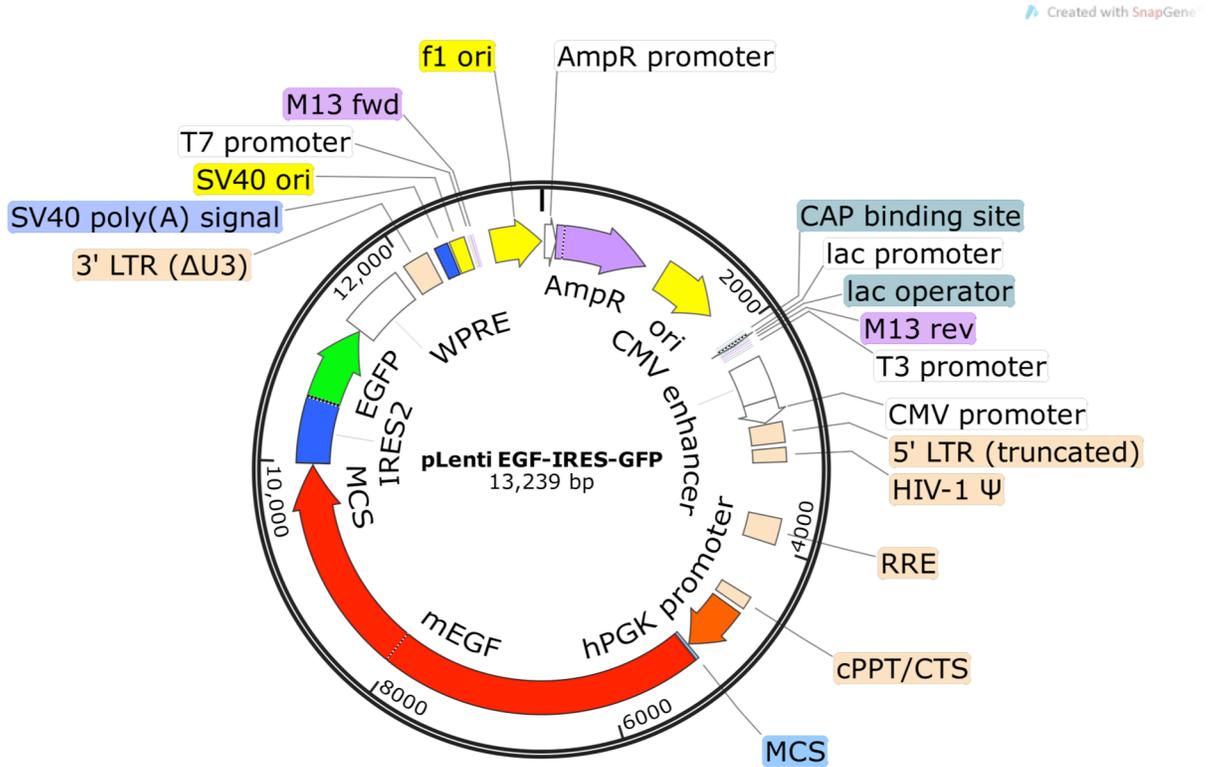
Trou 1mmx1mm : perceuse DREMEL®



Injections : seringue Hamilton®

Annexe 1. Photos récapitulatives du mode opératoire de la chirurgie des souris. (A) représente le perçage de la boîte crânienne à l'aide d'une perceuse et (B) l'injection d'EGF ou de CSM à l'aide d'une seringue Hamilton.

Carte de restriction du lentivirus EGF-IRES-GFP



Annexe 2. Carte de restriction du lentivirus pLenti EGF-IRES GFP utilisé lors des transfections pour infecter les CSM