



HAL
open science

Utilisation des cellules souches olfactives dans la régénération des nerfs périphériques*

C. Jaloux, M. Witters, J. Véran, L. Giraudo, F. Sabatier, R. Lacroix, F.
Dignat-George, M. Bonnet, T. Marqueste, P. Decherchi, et al.

► To cite this version:

C. Jaloux, M. Witters, J. Véran, L. Giraudo, F. Sabatier, et al.. Utilisation des cellules souches olfactives dans la régénération des nerfs périphériques*. Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine, 2021, 10.1016/j.banm.2021.06.015 . hal-03285395

HAL Id: hal-03285395

<https://hal.science/hal-03285395>

Submitted on 4 May 2022

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Utilisation des cellules souches olfactives dans la régénération des nerfs périphériques

Using olfactory stem cells for repairing peripheral nerves

C. Jaloux a,b,*, M. Witters a,b, J. Vérand, L. Giraudo d, F. Sabatie rd, R. Lacroix e, F. Dignat-George e, M. Bonnet a,c, T. Marqueste c, P. Decherchi c, M. Montava a, G. Guiraudie Capraz a, F. Féron a

Séance du 1er juin 2021. *Auteur correspondant .Adresse e-mail : drcharlottejaloux@gmail.com (C. Jaloux).

a Université Aix-Marseille, CNRS, INP, UMR 7051 Institut de NeuroPhysiopathologie, Équipe Nasal Olfactory Stemness and Epigenesis (NOSE), 13344 Marseille cedex 15, France

b Service de Chirurgie de la main et plastique réparatrice des membres, Hôpital Timone, APHM, 264, rue saint pierre, 13005 Marseille, France

c Université Aix-Marseille, CNRS, ISM, UMR 7287, Institut des Sciences du Mouvement : Etienne-Jules MAREY, Équipe Plasticité des Systèmes Nerveux et Musculaire (PSNM), Parc Scientifique et Technologique de Luminy, Faculté des Sciences du Sport de Marseille, 13288 Marseille cedex 09, France

d Laboratoire de Culture et Thérapie Cellulaire, Hôpital de la Conception, APHM, 147, boulevard Baille, 13005 Marseille, France

e Laboratoire d'Hématologie, Hôpital de la Conception, APHM, 147, boulevard Baille, 13005 Marseille, France

MOTS CLÉS *Système nerveux périphérique ; Régénération ; Muqueuse olfactive ; Cellules souches ; Vésicules extracellulaires*

Résumé *Les traumatismes des nerfs périphériques peuvent être extrêmement invalidants et l'efficacité des traitements existants demeure très insuffisante. La greffe de cellules souches apparaît comme une alternative prometteuse. Notre équipe travaille sur les cellules souches olfactives, localisées dans la cavité nasale, appartenant au système nerveux périphérique et facilement accessibles chez tout individu vigile (sans altérer le sens de l'olfaction). Elles sont apparentées aux cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse, présentent une activité mitogène élevée et détiennent un fort potentiel de différenciation vers des cellules neurales. Nous avons validé un nouveau procédé de fabrication en grade clinique de ces cellules souches humaines isolées à partir d'une biopsie de 2 mm². Récemment, nous avons montré, chez le rat, que la greffe de cellules souches olfactives, adjuvante à la chirurgie de réparation du nerf facial et du nerf péronier, améliore la récupération fonctionnelle et ce grâce aux pouvoirs immuno-modulateur et trophique des cellules transplantées. Aucune migration des cellules exogènes n'a été observée, ce qui, couplé à l'absence de prolifération des cellules greffées, indique un très faible risque de tumorigénicité et de métastases. Suite à ces résultats concluant chez l'animal, nous allons lancer un essai clinique multicentrique de phase I/IIa. Les vésicules extracellulaires sont des nanoparticules produites par les cellules. Leur utilisation permettrait de conserver les bénéfices paracrines des cellules souches sans leurs inconvénients (immunocompatibilité ou culture longue). Nous avons validé leur extraction et sommes en train de tester leur efficacité in vitro et chez le rat dans la régénération nerveuse périphérique*

KEYWORDS *Peripheral Nervous System; Regeneration; Olfactory Mucosa; Stem Cells; Extracellular Vesicles*

Summary *Peripheral nerve injuries can lead to severe functional deficits. Current treatments unfortunately remain insufficient. Stem cell grafting is nevertheless a promising therapy. Our team works on olfactory stem cells, located in the nasal cavity. The latter belong to the peripheral nervous system and are easily accessible in any awake patients, (without affecting the sense of smell). Having a high mitogenic activity and differentiating potential toward neural cells, they are related to bone marrow stem cells. We validated a new production process of human olfactory stem cells from a 2 mm² specimen for their clinical use in human peripheral nerve regeneration enhancement. We recently demonstrated, using a rat model, that olfactory stem cells grafting as an adjuvant treatment to surgical repair of facial or peroneal nerves improves functional recovery due to the immunomodulatory and trophic properties of these cells. Once grafted, the olfactory cells stop proliferating and we found no migration to other peripheral organs in our animal model. These characteristics indicate a low associated carcinogenic risk. Following these positive outcomes, we will soon begin a phase I/IIa clinical trial using olfactory stem cells for sensitive peripheral injuries or neuromas. Extracellular vesicles are nanoparticles produced by cells. Their use would enable to have the beneficial paracrine effects of stem cells without their drawbacks (immunocompatibility issues and long culture time). We validated their extraction for olfactory stem cells and are currently testing their efficiency for peripheral nerve regeneration on in vitro and in vivo models*

Les conséquences des lésions des nerfs périphériques

Les lésions des nerfs périphériques sont associées à des séquelles fonctionnelles majeures et à des répercussions psychologiques, sociales et économiques très importantes [1,2]. Malgré des progrès dans le délai de prise en charge et dans la qualité du geste chirurgical, les résultats en matière de récupération nerveuse ne se sont pas améliorés depuis plusieurs décennies. Une méta-analyse de 2005 a montré, après réparation microchirurgicale des nerfs ulnaire et médian, que seulement 51,6 % des patients avaient une récupération motrice satisfaisante (M4/M5) et seulement 42,6 % des patients une récupération sensitive satisfaisante (S3+/S4) [3]. Les étiologies les plus courantes sont les accidents de la voie publique. Statistiquement, les lésions des nerfs périphériques les plus fréquentes se situent au niveau des membres supérieurs (73,5 % des lésions traumatiques) et concernent majoritairement le nerf ulnaire [4]. Les principaux mécanismes lésionnels sont la traction, la section, l'écrasement et, dans une certaine mesure, l'ischémie. On observe moins souvent des lésions thermiques, des lésions électriques (électrocutions), des traumatismes balistiques et des avulsions. Si la chirurgie demeure un geste essentiel, les améliorations pourraient venir d'une meilleure maîtrise des paramètres biologiques impliqués dans la régénération nerveuse périphérique. En effet, la prévention de l'extension des lésions, grâce à des mesures médicales visant à limiter localement les perturbations cellulaires et moléculaires liées au traumatisme, pourrait permettre d'améliorer le pronostic des patients [5].

Thérapie cellulaire et régénération des nerfs périphériques

La régénération des nerfs périphériques passe par un processus complexe durant lequel les cellules de Schwann jouent un rôle crucial. Après un traumatisme axonal, les cellules de Schwann prolifèrent, phagocytent les débris et recrutent des macrophages afin d'offrir un milieu optimal pour la régénération. Elles sécrètent ensuite des facteurs de croissance, des composés de la matrice extra-cellulaire et des molécules d'adhérence qui aident la repousse axonale et lui assurent un support physique. Les cellules de Schwann ont été précédemment utilisées pour améliorer la régénération nerveuse. Cependant, compte tenu de la difficulté de leur prélèvement et de leur culture *in vitro*, il est difficile de les utiliser en clinique. Au vu de ces difficultés, de nombreuses équipes se tournent vers des cellules souches (CS) ou des cellules précurseurs pour la régénération des nerfs périphériques. Les cellules souches adultes à potentiel neuro-régénératif ont plusieurs origines :

- les cellules souches neurales sont localisées :
 - dans le système nerveux central. Chez l'adulte, des zones limitées et difficilement accessibles hébergent des cellules ayant gardé, dans des conditions particulières, la capacité de se différencier *in vitro* et *in vivo* en neurones et en cellules gliales. C'est le cas de la zone sous-ventriculaire (ventricules latéraux) et de l'hippocampe (gyrus dentelé),
 - dans le système nerveux périphérique [6]. Suite à une lésion nerveuse, les cellules de Schwann reviennent à un état proche des cellules souches mais, d'après Parrinello S. et al., elles sont isolément incapables de réparer les nerfs.

Elles ont besoin de l'aide des fibroblastes. Ces résultats encourageants font actuellement l'objet de nombreux travaux de recherche ;

- les cellules souches mésenchymateuses qui ont des capacités de différenciation en neurones [7]. Elles sont notamment retrouvées dans le tissu adipeux, la moelle osseuse et plusieurs organes de la face.

De nombreuses études précliniques animales prouvent l'efficacité des cellules souches dans la régénération des nerfs périphériques après un traumatisme. Les cellules souches favorisent :

- la régénération des neurones endommagés ou leur renouvellement grâce à leur effet paracrine, via notamment, la sécrétion de facteurs de croissance ;
- le recrutement des cellules gliales de soutien ;
- la constitution d'un microenvironnement favorable à la régénération, autour de la lésion nerveuse [8,9].

L'efficacité de nombreuses cellules souches (cellules souches de la moelle osseuse, adipeuses, du cordon ombilicale, amniotique. . .) a été étudiée [8—10] (Tableau 1) mais leur difficulté de prélèvement, les risques potentiels de formation de tératomes et les résultats peu convaincants pour les cellules non neurales, nous ont amenés à considérer de nouvelles cellules souches adultes, localisées dans un tissu nerveux (la muqueuse olfactive) et facilement accessibles car situées dans la cavité nasale.

La muqueuse nasale olfactive

La muqueuse olfactive appartient au système nerveux périphérique (SNP). C'est l'organe sensoriel qui a pour fonction principale de reconnaître les odeurs. Cette muqueuse est le siège d'une neurogenèse permanente. Chez l'homme, c'est le seul tissu nerveux capable d'auto-renouvellement. Quand un neurone meurt, il est remplacé par une nouvelle cellule nerveuse ; quand l'épithélium est lésé, il ne lui faut que quelques jours pour retrouver son intégrité. La naissance, la différenciation, la maturation, la survie, l'élongation axonale, la reconnaissance de la cible, la formation de synapses et la mort des neurones peuvent être observées dans le tissu adulte [11]. Elle constitue une aire accessible de collecte de cellules souches adultes. La plasticité de la muqueuse olfactive est en partie assurée par des cellules souches situées dans les deux strates—le neuro-épithélium et lamina propria— qui composent ce tissu. Ces deux strates sont séparées par une lame basale (Fig. 1) :

- l'épithélium abrite trois types cellulaires principaux : les cellules de soutien, piliers de cet épithélium pseudo-stratifié ; les cellules basales horizontales et glomérulaires ; les neurones sensoriels, immatures et matures ;
- la lamina propria est constituée de cellules engainantes, qui nourrissent et guident les axones, de faisceaux d'axones, de vaisseaux sanguins, de glandes de Bowman, sécrétrices de mucus, et de cellules souches olfactives ecto-mésenchymateuses.

La lame criblée de l'éthmoïde sépare le système olfactif périphérique (muqueuse olfactive) du système olfactif central (bulbe olfactif).

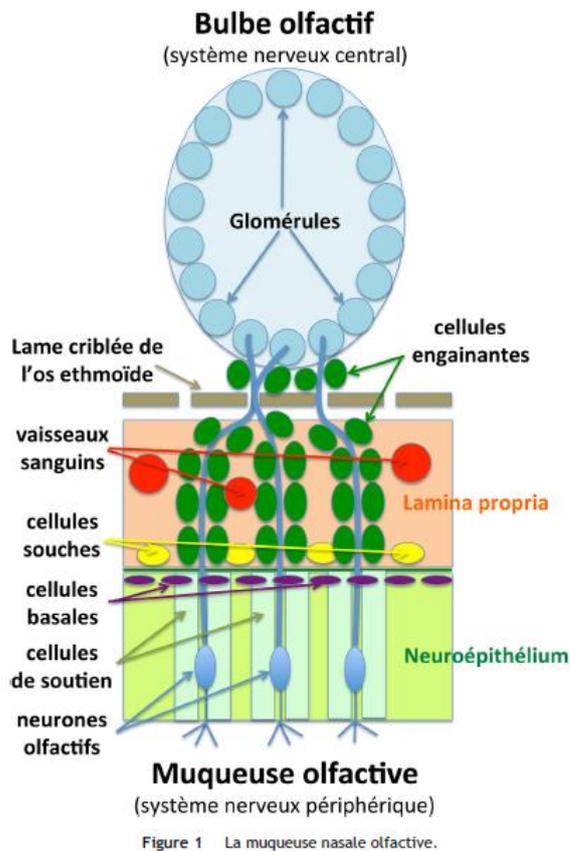
Les cellules souches olfactives nasales

Il est actuellement admis qu'il existe deux types de cellules souches au sein de la muqueuse olfactive. Les premières résident dans l'épithélium olfactif, dans sa partie basale. Il s'agit des cellules basales horizontales, situées au contact de la lame basale qui sépare le neuro-épithélium de la lamina propria olfactive. Quiescentes en situation physiologique, elles seraient capables de régénérer l'ensemble des cellules de l'épithélium olfactif après une lésion importante [12]. Cependant, même si ces cellules présentent au sein de leur niche des capacités d'auto-renouvellement et de multi potentialité, elles prolifèrent faiblement et ont un potentiel de différenciation relativement restreint. Le deuxième type de cellules souches adultes est localisé dans la lamina propria. Grâce à un travail de caractérisation poussé, il a été démontré que les cellules souches de la lamina propria peuvent être considérées comme un membre de la famille des cellules souches mésenchymateuses (CSM). Pour rappel, les CSM ont été initialement caractérisées par leur adhérence au plastique, leur forme fibroblastique en culture et leur capacité à former des colonies de type fibroblastique ou Fibroblasts Colony-Forming Unit (CFU-F). L'International Society for Cellular Therapy (ISCT) a choisi de dénommer ces cellules multipotent mesenchymal stromal cells avec l'acronyme MSC et d'établir des critères minimums de définition [13] :

- l'adhérence au plastique ;
- l'expression des marqueurs de surface CD73, CD90, CD105 et l'absence d'expression des marqueurs hématopoïétiques CD34, CD45, CD19, CD11a et Human Leukocyte Antigen-DR (HLA-DR) ;
- la différenciation en ostéoblastes, adipocytes et chondrocytes in vitro [14]. Ces cellules souches sont multipotentes, selon les conditions environnementales dans lesquelles elles se trouvent,

Tableau 1 Tableau récapitulatif des résultats des différentes « cellules souches » dans la régénération nerveuse des nerfs périphériques (48).

Type de cellule souche	Description cellulaire	Mécanismes	Résultats observés	Notes	Modèles animaux
CS issue de la moëlle osseuse (BMSC) (11–18)	Mésenchymateuse Multipotente	Adopte le phénotype de cellules de Schwann Sécrète des neurotrophines	Améliore les scores de marche, le poids musculaire et le nombre d'axones	Procédure de prélèvement invasif	Rongeurs Lapins Primates
CS dérivées du tissu adipeux (ADSC) (8,9,19–21)	Mésenchymateuse Multipotente	Adopte le phénotype de cellules de Schwann Produit des ARNm pour les facteurs de croissance	Améliore la myélinisation Promeut la croissance des neurites <i>in vitro</i> Améliore les scores de marche	Disponible par des procédés de prélèvement mini-invasif avec rendement cellulaire élevé Efficacité dépendant de l'âge	Rongeurs
Cellules amniotiques mésenchymateuses stromales (AMSC)(22–33)	Mésenchymateuse	Adopte le phénotype de cellules de Schwann	Amélioration fonctionnelle supérieure à celle obtenue avec ADSCs Potentiel angiogénique important	Peu d'immunogénicité Efficacité pour des greffes non autologues Obtention facile sans nécessité d'intervention invasive	Rats Souris
Cellules mésenchymateuses du cordon ombilical (34–36)	Mésenchymateuse Multipotente	Adopte le phénotype de cellules de Schwann Sécrète des neurotrophines	Augmentation de l'expression des ARNm des récepteurs des neurotrophines Amélioration des scores fonctionnels sciatiques, Amélioration de la myélinisation et de la sensibilité du membre postérieur	Probablement deux populations distinctes	Lapins Rats
Cellules souches de la pulpe dentaire (DPSCs) (37–39)	Mésenchymateuse	Adopte le phénotype neuronal et celui des cellules de Schwann	Améliore la myélinisation Améliore la récupération fonctionnelle	Les dents de sagesse sont une source potentielle	Rats Souris
Cellules souches dérivées des muscles squelettiques (Sk-SC) (40–42)	Mésenchymateuse	Capable de se différencier en cellules de multiples lignées	Améliore les critères histologiques de récupération	Dérivés de cellules satellites des muscles squelettiques	Rongeurs
Cellules souches issues de follicules pileux (HAP) (43,44)	Pluripotente	Capable de différenciation en cellules multilignées	Incorporation de cellules possible au site lésionnel Amélioration de la régénération nerveuse non prouvée	Cellules présentes dans le follicule pileux Probablement impliqué dans la formation du nerf sensitif du follicule pileux	Souris
Cellules des crêtes neurales (NCC) (45,46)	Pluripotente	Capable de se différencier en cellules multilignées	Diamètre nerveux plus robuste Amélioration de la myélinisation Promeut la croissance des neurites en <i>in vitro</i>	Originaire dans le développement embryonnaire de la zone entre l'ectoderme neural et l'ectoderme de surface	Rongeurs
Cellules précurseurs dérivées de la peau (SKP) (47,48)	Dérivées des crêtes neurales	Capable de différenciation en cellules multilignées Adopte un phénotype de cellules de Schwann Produit des facteurs de croissance Phagocytaire	Améliore la récupération comportementale Améliore la myélinisation Effets immunomodulateurs	Originaire du derme papillaire	Rongeurs



Ces cellules souches sont multipotentes, selon les conditions environnementales dans lesquelles elles se trouvent, elles peuvent donner naissance à des cellules neurales (neurones, astrocytes, oligodendrocytes) mais aussi à des cellules non nerveuses (cœur, foie, muscle) lorsqu'elles sont placées, in vitro et/ou in vivo, dans un environnement propice. Ces cellules ont été identifiées pour la première fois en 2005 [15]. Deux études (Murrell et al. [15] et Delorme et al. [16]) ont permis de caractériser ces cellules souches olfactives et démontrer leur similarité avec les cellules souches mésenchymateuses. Étant donné leur origine ectodermique, leurs propriétés neurogéniques marquées, et leur similarité avec les cellules souches dérivées de la moelle osseuse, ces cellules ont été nommées cellules souches olfactives ecto-mésenchymateuses [16]. Ces cellules possèdent une activité mitogène élevée et un fort potentiel de différenciation vers des lignées neurales. L'intérêt de ces cellules réside également dans le fait que la muqueuse olfactive est accessible chez l'individu vigile (Fig. 2), sans restriction d'âge ou de condition. L'isolement de la lamina propria et l'extraction des cellules souches olfactives (CSO) ont été réalisés avec succès par notre équipe chez 8 mammifères et chez l'homme [17]. Leur potentiel thérapeutique a été testé avec succès dans différents modèles animaux de paralysie, de la maladie de Parkinson, de surdité et d'amnésie [18]. Les mécanismes d'action suivants ont été observés :

- leur transformation en cellules gliales (cellules de Schwann) et/ou cellules neurales, lors de la transplantation dans le système nerveux [15,19—21] ;
- des actions immunomodulatrices [21] ;
- la sécrétion de nombreux facteurs impliqués dans la croissance et le guidage des axones [22].

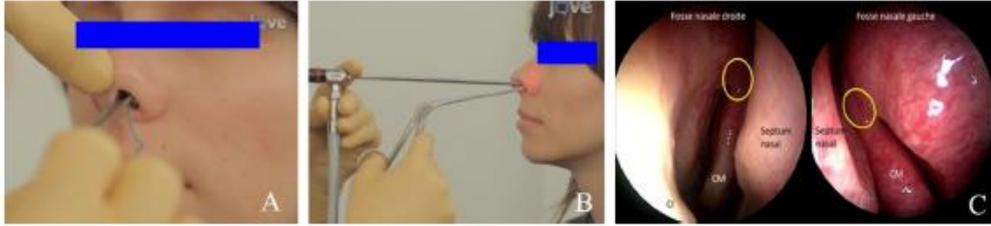


Figure 2 Biopsie de muqueuse nasale sous anesthésie locale. A. Tamponnement du site de prélèvement à l'aide d'un coton imbibé de xylocaïne naphazolinée pendant 15 à 20 minutes. B. Prélèvement de la muqueuse nasale sous contrôle endoscopique. C. Vue endoscopique : CM = Cornet Moyen, le cercle jaune = zone de prélèvement de la muqueuse au niveau de l'arche du CM.

Les cellules souches olfactives nasales sont efficaces pour promouvoir la régénération nerveuse du système nerveux périphérique

Les résultats encourageants, obtenus avec la greffe de CSO dans différents modèles de lésion du système nerveux central, ont amené la communauté scientifique à évaluer le potentiel thérapeutique de ces cellules souches dans d'autres types d'atteintes comme celles du système nerveux périphérique. Batioglu—Karaaltin et al. [23] ont montré, sur un modèle de section du nerf chez le rat, une amélioration de la récupération fonctionnelle lorsque la section était réparée à l'aide d'un conduit de repousse avec greffe de CSO. Dans cette étude, les auteurs ont conclu que cette récupération fonctionnelle est corrélée avec l'augmentation du nombre d'axones. De même, chez des souris dont le nerf facial a été comprimé, Esaki et al. [24] ont montré une récupération plus rapide lorsque celles-ci recevaient des CSO avec du MedGel. Salehi et al. [25] ont également montré des résultats similaires sur un modèle de compression du nerf sciatique chez le rat. Pour sa part, notre équipe a réalisé deux études animales. La première [26] a été menée sur un modèle de lésion traumatique du nerf facial chez le rat avec une perte de substance nerveuse de 2 mm. Dans deux groupes, la réparation était induite par la mise en place d'un conduit veineux (veine fémorale) dans lequel étaient greffées ou non des cellules souches olfactives. Ces deux groupes ont été comparés à un groupe de suture directe du nerf facial. Il s'agissait de rats syngéniques et de CSO purifiées à partir de muqueuse nasale de rats sacrifiés. L'évaluation de la mobilité faciale a été faite par électromyographie et analyse du mouvement assistée par vidéo, 3 mois après la réparation du nerf facial. Les syncinésies ont été évaluées par l'électromyographie et la mesure des mouvements buccaux involontaires pendant le réflexe de clignement et le double marquage rétrograde des motoneurones régénérés. La greffe de CSO permet une amélioration de la récupération fonctionnelle par rapport aux groupes manchon veineux sans greffe et suture directe. L'amplitude maximale des cycles de protraction et rétraction des vibrisses ainsi que la vélocité angulaire pendant la protraction des vibrisses ont été augmentées de manière significative. Elles ont également permis la diminution des syncinésies buccales. Cependant la greffe de CSO n'a pas montré d'amélioration de la croissance axonale à 3 mois. Nous avons mené une deuxième étude chez le rat [27], sur un modèle de section du nerf péronier avec perte de substance de 3 mm, la réparation étant faite de manière immédiate ou différée (deux semaines après) par un manchon veineux (utilisation de la veine fémorale contro-latérale), rempli ou non de CSO. Ces 4 groupes de rat sont été comparés à un groupe de rats sains. Il s'agissait de rats syngéniques femelles dans lesquels étaient utilisées des cellules souches de rats mâles. À 3 mois, la locomotion (peroneal functional index), les propriétés mécaniques musculaires (électromyogramme), la masse musculaire, le nombre d'axones ainsi que la myélinisation ont été évalués. Nous avons observé que la greffe de CSO avait significativement amélioré la récupération locomotrice, partiellement maintenu le phénotype contractile du muscle cible et augmenté la croissance axonale. Par ailleurs, aucune migration des cellules exogènes dans d'autres organes de l'animal receveur n'a été observée, ce qui, couplé à l'absence de prolifération des cellules greffées, indique un très faible risque de tumorigénicité et de métastase.

Cellules souches olfactives nasales et système nerveux périphérique : vers un essai clinique

Le procédé de fabrication de cellules souches isolées de la cavité nasale en vue d'un essai clinique chez l'homme a été validé et standardisé. Les données de validation constitueront le Dossier du médicament expérimental associé à cette étude clinique. Le recueil des biopsies nécessaires à ces validations a été faite dans le cadre de l'étude Nose « Validation d'un procédé d'un procédé de fabrication de cellules souches isolées de la cavité nasale en vue d'une

thérapie cellulaire innovante des nerfs périphériques traumatisés : recherche « NOSE » » N°Eudract 2018-A00796-49. Cette étude Nose, réalisée à l'AP-HM, est toujours en cours et a également permis de valider la faisabilité sans risques des premières biopsies et le procédé de fabrication ainsi que les contrôles de qualité de ce Médicament de Thérapie Innovante dans des conditions de Bonnes Pratiques de Fabrication pharmaceutiques (BPF) sans aucun incident. Nous avons pu ainsi adapter la fabrication des CSO pour que ces cellules soient en grade clinique et nous avons optimisé leur production pour diminuer le temps de culture. Ces changements ont notamment porté sur le milieu de culture, le type de digestion, le type d'enzyme utilisée pour la digestion et la technique de dissociation. Nos équipes Marseillaises sont prêtes à débiter cet essai clinique de phase I/IIa. Celui-ci sera le deuxième à considérer l'administration de cellules souches dans une indication de réparation nerveuse d'un nerf périphérique chez l'homme (un autre essai avec des cellules souches hématopoïétiques est en cours). L'objectif principal (phase I) est de vérifier la tolérance et la faisabilité de la greffe autologue de CSO. Par ailleurs, nous mesurerons (phase IIa) l'efficacité de la greffe autologue avec des enregistrements électromyographiques et les habituels scores cliniques (monofilament de Semmes-Weinstein, test de Weber et test de Dellon, signe de Hoffmann-Tinel, Cold Sensitivity Severity Scale (CSSS)). Nous analyserons 10 patients. Le temps de participation maximale de chaque patient sera de 12 mois et 21 jours, la durée d'inclusion maximale est de 12 mois. L'inclusion des patients se fera dans le service de chirurgie de la main et reconstructrice des membres de l'hôpital de la Timone de l'Assistance Publique-Hôpitaux de Marseille, par les médecins investigateurs des équipes de chirurgie de la main. Les patients traités présenteront une plaie nerveuse isolée négligée (délai après la plaie supérieur à 30 jours) ou un névrome (au moins six mois après la suture nerveuse n'ayant pas bénéficié de reprise chirurgicale), sur un nerf digital ou sur la branche sensitive du nerf radial. La biopsie de muqueuse nasale sera réalisée après anesthésie locale (patient vigile) sous endoscopie par un médecin ORL du CHU de Marseille. Au sein du laboratoire de Culture et de Thérapie Cellulaire (LCTC) du CHU de Marseille, les cellules souches ecto-mésenchymateuses nasales seront extraites et cultivées pendant 17 jours. Après contrôle de la qualité des cellules, la greffe de cellules souches ecto-mésenchymateuses nasales sera réalisée chez le patient au moment de la réparation chirurgicale du nerf (sous anesthésie loco-régionale ou générale). Celle-ci consistera en une résection de la zone névromateuse avec mise en place d'un conduit veineux. Quatre-vingt-dix microlitres de thrombine et de fibrine contenant des cellules souches (70 à 100 millions de cellules/mL) seront insérés au sein de ce conduit. Le suivi se fera à 2 semaines, 1 mois, 3 mois, 6 mois et 12 mois par évaluation clinique et par exploration neuro-physiologique. Un comité de surveillance aura pour fonction de suivre le bon déroulement de l'étude, la conformité et le suivi du protocole, les caractéristiques des patients inclus, l'incidence des événements indésirables (il passera en revue toutes les événements indésirables attendus et inattendus) ainsi que le respect de l'éthique. Les résultats de cette première étude chez l'homme permettront d'affirmer la faisabilité et l'absence de toxicité de ce traitement novateur et nous donnera une première idée de son efficacité. D'autres études seront nécessaires pour mieux étudier l'efficacité, les relations dose-effets, et les variabilités éventuelles selon les caractéristiques individuelles du patient. L'amélioration de la récupération fonctionnelle des lésions nerveuses constitue une contribution d'importance majeure dans le pronostic des traumatismes graves des membres. Vers l'utilisation des vésicules extracellulaires. Le mécanisme exact par lequel les cellules mésenchymateuses facilitent la régénération nerveuse n'est pas encore décrit avec exactitude. Bien que certaines études montrent que les cellules souches se différencient en cellules de Schwann [28,29], d'autres en revanche, ont mis en évidence une augmentation de la repousse axonale, de la formation de myéline et de la récupération fonctionnelle en l'absence de différenciation en cellules de Schwann [30]. Cette dernière étude indique que l'effet des cellules mésenchymateuses transplantées est probablement indirect, via la régénération des cellules de Schwann endogènes par le biais de mécanismes paracrines, plutôt que par différenciation des cellules souches. Parmi les acteurs de ces actions réparatrices se trouvent les vésicules extracellulaires. Les vésicules extracellulaires (VEC) sont des nanoparticules que l'on trouve dans quasiment tous les fluides biologiques comme le sang, l'urine, le lait maternel, le liquide d'ascite et la salive. Des études récentes ont mis en évidence le rôle paracrine de ces vésicules dans différentes circonstances physiologiques et pathologiques, comme les maladies neurodégénératives, les tumeurs et les fibroses tissulaires. Les VEC sont formées d'une bicouche lipidique et contiennent de nombreuses molécules (protéines, lipides, mARN, miARN, lncARN, ADN) qui jouent un rôle clé dans la communication intercellulaire en transférant ces médiateurs [31]. L'avancée de la recherche dans le domaine de la thérapie cellulaire a été particulièrement rapide au cours des

dernières années et de nombreuses équipes se tournent vers l'effet du sécrétome des cellules souches afin de contourner les limites inhérentes à l'utilisation des cellules. L'une des préoccupations majeures concernant les greffes de cellules souches chez l'homme est le risque néoplasique de ces cellules à activité mitogène élevée, même si ce risque semble très faible pour les CSO qui arrêtent de proliférer une fois greffées. L'utilisation de ces cellules est soumise aux règles de transplantation tissulaire, que ce soit en transplantation autologue ou hétérologue avec administration d'immunomodulateurs. Les vésicules extracellulaires contiennent moins de protéines membranaires que les cellules souches dont elles sont issues, et présentent très peu de problèmes d'immunocompatibilité. Leur utilisation en allogreffe est donc envisageable [31]. Ces vésicules, en raison de leur petite taille (nanoparticules), peuvent être utilisées en intravasculaire sans risquer d'entraîner des microthrombi. De plus, elles possèdent des protéines d'adhérence et de perforation qui leur permettent de traverser des barrières biologiques. La bicouche lipidique de leur membrane favorise la stabilité et la disponibilité de leur chargement. Les VEC sont plus faciles à stocker que les cellules et aucune toxicité n'est associée en cas de mauvaise conservation. À l'avenir, la mise en banque et l'utilisation de VEC peut être envisagée. Elles pourraient être disponibles sans délai du fait de l'absence de culture cellulaire autologue nécessaire, permettant une prise en charge optimale des lésions à la phase aigüe du traumatisme. Leur injection in situ écho-guidée permettrait de ne pas avoir recours à une nouvelle chirurgie ou et de les administrer sur toute la période de régénération nerveuse. Précédemment, les VEC issues d'autres cellules souches mésenchymateuses ont montré leur efficacité dans la régénération nerveuse périphérique [31] via différents mécanismes : la stimulation de la néo-angiogénèse, la régulation de la croissance axonale et la modulation de la neuro-inflammation [31,32,33,34]. Les VEC des CSO ont déjà été produites par trois équipes [35,36,37]. Xun et al. [36] ont récemment étudié le contenu de ces VEC par chromatographie en phase liquide-spectrométrie de masse, 304 protéines ont été identifiées dont le plasminogen activator inhibitor 1 (SERPINE1), l'insulin-like growth factor binding protein family members (IGFBP 4 and 5), l'epidermal growth factor receptor (EGFR), neurogenic locus notch homolog protein 2 (NOTCH2), l'apolipoprotein E (APOE), et la heat shock protein HSP90-beta (HSP90AB1). Ces molécules sont connues pour être importantes dans la production de facteurs neurotrophiques, l'angiogénèse, la prolifération et différenciation cellulaire, l'apoptose et l'inflammation et sont fortement corrélées au mécanisme de réparation tissulaire et à la régénération neurale. L'analyse du sécrétome des CSO que notre équipe avait réalisée en 2017 [22] avait généré des résultats concordants. Aucune étude n'a pour l'instant évalué les capacités de ces VEC à améliorer la régénération des nerfs périphériques. Nous avons mis au point un procédé de production, d'isolement et de purification des VEC produites par les CSO, en respectant rigoureusement les recommandations émises la Société internationale des vésicules extracellulaires qui édicte les Minimal Information for the Studies of Extracellular Vesicles (MISEV 2018 [38]). Il est important de noter que le milieu de culture influence de manière non négligeable les caractéristiques des vésicules et leur contenu (et donc leurs potentiels effets thérapeutiques), il est donc extrêmement important de le préciser leur protocole de production. Nous testons actuellement l'efficacité des VEC fraîches et congelées sur des modèles in vitro et in vivo.

Conclusion

Malgré les progrès apportés par l'avènement de la microchirurgie, les traumatismes des nerfs périphériques restent associés à une récupération fonctionnelle partielle dont les conséquences sur la qualité de vie peuvent être majeures. Les voies d'amélioration de la régénération nerveuse passent par une diminution de l'intensité et de la durée de la phase inflammatoire initiale et une stimulation de la phase de croissance axonale. Les cellules souches olfactives sont des cellules souches ecto-mésenchymateuses qui appartiennent au système nerveux périphérique. Elles possèdent des propriétés particulièrement intéressantes pour la régénération du système nerveux périphérique et sont facilement accessibles chez un individu vigile. Des résultats prometteurs sur l'amélioration de la récupération fonctionnelle, après traumatisme de nerfs périphériques, ont été obtenus lors de deux études chez le rat. Un essai thérapeutique chez l'homme va débiter prochainement. Cependant l'utilisation des cellules est associée à un temps de culture incompressible ainsi qu'à une utilisation obligatoirement autologue en l'absence d'immunosuppresseur. Or, l'efficacité de ces CSO serait principalement secondaire à l'effet paracrine de ces cellules. L'utilisation de vésicules extracellulaires issues de ces CSO permettrait de s'affranchir des problèmes évoqués plus haut. La

conservation de ces vésicules est plus simple et facilitera une utilisation allogénique et immédiate, adjuvante à la réparation chirurgicale du nerf. Déclaration de liens d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts.

Remerciements

Les auteurs remercient : La fondation de l'avenir qui a financé les deux études animales ainsi que l'étude « Nose ;le Pr Guy Magalon pour son importante contribution à l'initiation et à la poursuite de ces travaux.

Références

- [1] Neely JG, Neufeld PS. Defining functional limitation, disability, and societal limitations in patients with facial palsy: initial pilot questionnaire. *Am J Otol* 1996;17:340—2.
- [2] Noble J, Munro CA, Prasad VS, Midha R. Analysis of upper and lower extremity peripheral nerve injuries in a population of patients with multiple injuries. *J Trauma* 1998;45:116—22.
- [3] Ruijs ACJ, Jaquet J-B, Kalmijn S, Giele H, Hovius SER. Median and ulnar nerve injuries: a meta-analysis of predictors of motor and sensory recovery after modern microsurgical nerve repair. *Plast Reconstr Surg* 2005;116:484—94 [discussion 495-496].
- [4] Kouyoumdjian JA. Peripheral nerve injuries: a retrospective survey of 456 cases. *Muscle Nerve* 2006;34:785—8.
- [5] Grinsell D, Keating CP. Peripheral Nerve Reconstruction after Injury: A Review of Clinical and Experimental Therapies. *Bio-Med Res Int* 2014;2014:698256.
- [6] Parrinello S, Napoli I, Ribeiro S, Wingfield Digby P, Fedorova M, Parkinson DB, et al. EphB signaling directs peripheral nerve regeneration through Sox2-dependent Schwann cell sorting. *Cell* 2010;143:145—55.
- [7] Zheng Y, Huang C, Liu F, Lin H, Yang X, Zhang Z. Comparison of the neuronal differentiation abilities of bone marrow-derived and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Mol Med Rep* 2017;16:3877—86.
- [8] Sayad Fathi S, Zaminy A. Stem cell therapy for nerve injury. *World J Stem Cells* 2017;9:144—51.
- [9] Yousefi F, Lavi Arab F, Nikkhal K, Amiri H, Mahmoudi M. Novel approaches using mesenchymal stem cells for curing peripheral nerve injuries. *Life Sci* 2019;221:99—108.
- [10] Fairbairn NG, Meppelink AM, Ng-Glazier J, Randolph MA, Wino-grad JM. Augmenting peripheral nerve regeneration using stem cells: A review of current opinion. *World J Stem Cells* 2015;7:11—26.
- [11] Brann JH, Firestein SJ. A lifetime of neurogenesis in the olfactory system. *Front Neurosci* 2014;8:182.
- [12] Mackay-Sim A. Stem cells and their niche in the adult olfactory mucosa. *Arch Ital Biol* 2010;148:47—58.
- [13] Le Blanc K, Mougiakakos D. Multipotent mesenchymal stem cells and the innate immune system. *Nat Rev Immunol* 2012;12:383—96.
- [14] Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2005;7:393—5.
- [15] Murrell W, Féron F, Wetzig A, Cameron N, Splatt K, Bellette B, et al. Multipotent stem cells from adult olfactory mucosa. *Dev Dyn Off Publ Am Assoc Anat* 2005;233:496—515.
- [16] Delorme B, Nivet E, Gaillard J, Häupl T, Ringe J, Devèze A, et al. The human nose harbors a niche of olfactory ectomesenchymal stem cells displaying neurogenic and osteogenic properties. *Stem Cells Dev* 2010;19:853—66.
- [17] Veron AD, Bienboire-Frosini C, Féron F, Codeca E, Deveze A, Royer D, et al. Isolation and characterization of olfactory ectomesenchymal stem cells from eight mammalian genera. *BMC Vet Res* 2018;14:17.
- [18] Nivet E, Devèze A, Girard SD, Roman FS, Féron F. [Nose at the bedside of the brain]. *Med Sci MS* 2011;27:932—4.
- [19] Murrell W, Wetzig A, Donnellan M, Féron F, Burne T, Meedeniya A, et al. Olfactory mucosa is a potential source for autologous stem cell therapy for Parkinson's disease. *Stem Cells Dayt Ohio* 2008;26:2183—92.
- [20] Nivet E, Vignes M, Girard SD, Pierrisnard C, Baril N, Devèze A, et al. Engraftment of human nasal olfactory stem cells restores neuroplasticity in mice with hippocampal lesions. *J Clin Invest* 2011;121:2808—20.
- [21] Di Trapani M, Bassi G, Ricciardi M, Fontana E, Bifari F, Pacelli L, et al. Comparative study of immune regulatory properties of stem cells derived from different tissues. *Stem Cells Dev* 2013;22:2990—3002.
- [22] Girard SD, Virard I, Lacassagne E, Paumier J-M, Lahlou H, Jabes F, et al. From Blood to Lesioned Brain: An In Vitro Study on Migration Mechanisms of Human Nasal Olfactory Stem Cells. *Stem Cells Int* 2017;2017 [1478606].
- [23] Batioglu-Karaaltin A, Karaaltin MV, Oztel ON, Ovali E, Sener BM, Adatepe T, et al. Human olfactory stem cells for injured facial nerve reconstruction in a rat model. *Head Neck* 2016;38(Suppl1):E2011—20.
- [24] Esaki S, Katsumi S, Hamajima Y, Nakamura Y, Murakami S. Transplantation of Olfactory Stem Cells with Biodegradable Hydrogel Accelerates Facial Nerve Regeneration After Crush Injury. *Stem Cells Transl Med* 2019;8:169—78.
- [25] Salehi M, Bagher Z, Kamrava SK, Ehterami A, Alizadeh R, Farhadi M, et al. Alginate/chitosan hydrogel containing olfactory ectomesenchymal stem cells for sciatic nerve tissue engineering. *J Cell Physiol* 2019.
- [26] Bense F, Montava M, Duclos C, Bisson A, Delarue Q, Mar-dion NB, et al. Syngeneic Transplantation of Rat Olfactory Stem Cells in a Vein Conduit Improves Facial Movements and Reduces Synkinesis after Facial Nerve Injury. *Plast Reconstr Surg* 2020;146:1295—305.
- [27] Bonnet M, Guiraudie-Capraz G, Marqueste T, Garcia S, Jaloux C, Decherchi P, et al. Immediate or Delayed Transplantation of a Vein Conduit Filled with Nasal Olfactory Stem Cells Improves Locomotion and Axogenesis in Rats after a Peroneal Nerve Loss of Substance. *Int J Mol Sci* 2020;21.
- [28] Wang H, Zhang H, Liu M, Wang N. Distal segment extracts of the degenerated rat sciatic nerve induce bone marrow stromal cells to express Schwann cell markers in vitro. *Neurosci Lett* 2013;544:89—93.
- [29] Zhang Z, Liu Y, Zhu X, Wei L, Zhu J, Shi K, et al. Sciatic nerve extract of cattle causes neuronal differentiation of PC12 cells via ERK1/2 signaling pathway. *J Vet Sci* 2018;19:512—8.
- [30] Sowa Y, Kishida T, Imura T, Numajiri T, Nishino K, Tabata Y, et al. Adipose-Derived Stem Cells Promote Peripheral Nerve Regeneration In Vivo without Differentiation into Schwann-Like Lineage. *Plast Reconstr Surg* 2016;137:318e—30e.

- [31] Dong R, Liu Y, Yang Y, Wang H, Xu Y, Zhang Z. MSC-Derived Exosomes-Based Therapy for Peripheral Nerve Injury: A Novel Therapeutic Strategy. *BioMed Res Int* 2019;2019 [6458237].
- [32] Bucan V, Vaslăitis D, Peck C-T, Strauß S, Vogt PM, Radtke C. Effect of Exosomes from Rat Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells on Neurite Outgrowth and Sciatic Nerve Regeneration After Crush Injury. *Mol Neurobiol* 2019;56:1812–24.
- [33] Yu B, Zhou S, Qian T, Wang Y, Ding F, Gu X. Altered microRNA expression following sciatic nerve resection in dorsal root ganglia of rats. *Acta Biochim Biophys Sin* 2011;43:909–15.
- [34] Lai RC, Tan SS, Teh BJ, Sze SK, Arslan F, de Kleijn DP, et al. Pro-teolytic Potential of the MSC Exosome Proteome: Implications for an Exosome-Mediated Delivery of Therapeutic Proteasome. *Int J Proteomics* 2012;2012 [971907].
- [35] Rui K, Hong Y, Zhu Q, Shi X, Xiao F, Fu H, et al. Olfactory ecto-mesenchymal stem cell-derived exosomes ameliorate murine Sjögren's syndrome by modulating the function of myeloid-derived suppressor cells. *Cell Mol Immunol* 2021;18:440–51.
- [36] Xun C, Ge L, Tang F, Wang L, Zhuo Y, Long L, et al. Insight into the proteomic profiling of exosomes secreted by human OM-MSCs reveals a new potential therapy. *Biomed Pharmacother Biomedecine Pharmacother* 2020;131 [110584].
- [37] Tian J, Zhu Q, Zhang Y, Bian Q, Hong Y, Shen Z, et al. Olfactory Ecto-Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes Ameliorate Experimental Colitis via Modulating Th1/Th17 and Treg Cell Responses. *Front Immunol* 2020;11 [598322].
- [38] Théry C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles* 2018;7[1535750].