



HAL
open science

Potentialisation des Thérapies cellulaires des accidents vasculaires cérébraux utilisant des cellules souches/progénitrices et des biomatériaux en recherche pré-clinique

Claire Rome

► **To cite this version:**

Claire Rome. Potentialisation des Thérapies cellulaires des accidents vasculaires cérébraux utilisant des cellules souches/progénitrices et des biomatériaux en recherche pré-clinique. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Grenoble - Alpes, 2021. tel-04767124

HAL Id: tel-04767124

<https://hal.science/tel-04767124v1>

Submitted on 5 Nov 2024

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.

TITRES ET TRAVAUX
EN VUE DE DE L'OBTENTION DU

DIPLOME D'HABILITATION A DIRIGER DES RECHERCHES

Claire Rome

**Potentialisation des Thérapies cellulaires
des accidents vasculaires cérébraux utilisant des cellules
souches/progénitrices et des biomatériaux
en recherche pré-clinique**

Soutenance à Grenoble Institut des Neurosciences, Grenoble

Le 21 juin 2021 à 14h devant les membres du jury :

Mme CATHERINE GHEZZI, Présidente du jury, Professeure des Universités,
UNIVERSITE GRENOBLE ALPES

Mme ISABELLE LOUBINOUX, Rapporteur du jury, Directrice de Recherche Inserm,
UNIVERSITE TOULOUSE 3 - PAUL SABATIER

M. WALID RACHIDI, Rapporteur du jury, Professeur des Universités,
UNIVERSITE GRENOBLE ALPES

Mme MARLENE WIART, Rapporteur du jury, Directrice de Recherche CNRS,
UNIVERSITE LYON 1 - CLAUDE BERNARD

M. OLIVIER DETANTE, Membre du jury, Professeur des Universités – Praticien Hospitalier.,
CHU GRENOBLE ALPE

Mme BRIGITTE ONTENIENTE, Membre du jury, Directrice de Recherche Inserm,
PHENOCELL

SOMMAIRE

PREAMBULE	1
PARCOURS PERSONNEL	2
CURRICULUM VITAE	4
DIPLOMES	5
ACTIVITES DE RECHERCHE	5
FINANCEMENTS.....	6
PUBLICATIONS ET PRODUCTION SCIENTIFIQUE.....	6
ACTIVITES D'ENCADREMENT.....	8
DIFFUSION SCIENTIFIQUE.....	10
RESPONSABILITES SCIENTIFIQUES	12
RESPONSABILITES PEDAGOGIQUES ET ENSEIGNEMENTS	12
FACTEUR D'IMPACT DES PUBLICATIONS	15
BILAN DES ACTIVITES DE RECHERCHE	17
CHAPITRE 1 : POLYMORPHISME DES ARNm ET PHYSIOLOGIE DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL	18
I. <i>Étude du polymorphisme des ARNm dans le système nerveux central du rat</i>	18
II. <i>Étude du polymorphisme des ARNm dans les tumeurs cérébrales humaines</i>	21
III. <i>Physiologie des cancers cérébraux</i>	22
CHAPITRE 2 : THERAPIE CELLULAIRE ET GENIQUE DES CANCERS	25
I. <i>L'utilisation des cellules souches mésenchymateuses couplées au contrôle de l'expression génique par hyperthermie locale, comme vecteurs de thérapie génique</i>	25
a) <i>Thérapie cellulaire sous contrôle de l'imagerie moléculaire</i>	25
II. <i>Thérapie génique ciblée des poumons par Sleeping Beauty</i>	30
CHAPITRE 3 : PROJETS ANNEXES ET COLLABORATIONS	34
I. <i>Caractérisation pharmacologique des neurones du ganglion spiral chez le rat</i>	34
II. <i>Collaboration développée en parallèle de mes recherches propres : Polymorphisme de l'ARNm de PCNA chez le blé</i>	34
III. <i>Collaborations développées en parallèle de mes recherches propres post-recrutement</i>	35
CHAPITRE 4 : THERAPIE CELLULAIRE ET ANGIOGENESE : EFFET DES CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES SUR LA CROISSANCE ET L'ANGIOGENESE TUMORALE.....	37
CHAPITRE 5 : MECANISMES D'ACTION DE LA THERAPIE CELLULAIRE PAR CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES APRES INFARCTUS CEREBRAL CHEZ LE RAT	41
I. <i>L'accident vasculaire cérébral</i>	41
II. <i>Physiopathologie de l'ischémie cérébrale</i>	43
III. <i>Mécanismes de la récupération spontanée post-AVC</i>	45
IV. <i>Contexte de la thérapie cellulaire par cellules souches dans le cadre du traitement de l'AVC</i>	48
V. <i>Effet des cellules souches mésenchymateuses injectées à la phase subaigüe de l'AVC sur la microvascularisation cérébrale dans le modèle d'occlusion transitoire de l'artère cérébrale moyenne (oACM) chez le rat</i>	51
a) <i>Caractérisation des changements micro-vasculaires post-occlusion/reperfusion</i>	52
b) <i>Evaluation de l'effet de l'injection de cellules souches mésenchymateuses sur les modifications micro-vasculaires post-occlusion/reperfusion</i>	54

PROJET SCIENTIFIQUE	58
POTENTIALISATION DES THERAPIES CELLULAIRES DES ACCIDENTS VASCULAIRES CEREBRAUX UTILISANT DES CELLULES SOUCHES/PROGENITRICES ET DES BIOMATERIAUX EN RECHERCHE PRE- CLINIQUE.....	59
I. <i>Contexte</i>	59
II. <i>Objectif</i>	60
c) Les hydrogels et la thérapie cellulaire.....	61
I. <i>Potentialisation de la survie cellulaire dans la cavité ischémique</i>	61
II. <i>Les gels d'acide hyaluronique auto-réparants</i>	63
III. <i>Toxicité de l'hydrogel d'acide hyaluronique in vitro</i>	65
IV. <i>Suivi du devenir des acteurs des thérapies cellulaires potentialisées par des biomatériaux in vivo</i>	67
a) Suivi du devenir des hydrogels d'acide hyaluronique par IRM	68
b) Suivi du devenir des hydrogels d'acide hyaluronique et des cellules thérapeutiques par tomographie spectrale à comptage de photons unique.....	68
V. <i>Potentialisation de la thérapie cellulaire régénérative post-accident vasculaire cérébral par les cellules souches/progénitrices neurales associées aux hydrogels</i>	69
BIBLIOGRAPHIE	72

TABLE DES FIGURES

FIGURE 1 : BILAN DES PUBLICATIONS DANS DES REVUES INTERNATIONALES A COMITE DE LECTURE PAR ANNEE	16
FIGURE 2 : STRUCTURE GENOMIQUE DU GENE DE F3/CONTACTINE DE RAT D'APRES (6).....	19
FIGURE 3 : RECHERCHE DE L'EXPRESSION DES ARNM DE GFAP ET DE F3/CONTACTINE DANS DES CELLULES ISOLEES DE NEUROHYPOPHYSE.....	20
FIGURE 4 : EXPRESSION DE LA CONTACTINE-1 DANS LES TUMEURS HUMAINES GLIALES.....	21
FIGURE 5 : EXPRESSION DE MMP-7 DANS LES GLIOBLASTOMES HUMAINS	23
FIGURE 6: NIVEAU D'EXPRESSION RELATIF DE L'ARNM DE MMP-7 DANS DEUX BIOPSIES SUCCESSIVES D'UN GLIOME CHEZ LE MEME PATIENT	23
FIGURE 7 : QUANTIFICATION RELATIVE DE L'ARNM DE MMP-7 DANS LES TUMEURS U87-MG.....	24
FIGURE 8 : SYSTEME IN VIVO DE CHAUFFAGE NON INVASIF PAR ULTRASON FOCALISES (FUS) CONTROLES PAR IRM.....	26
FIGURE 9 : ACTIVATION NON-INVASIVE PAR LES FUS GUIDES PAR IRM D'UN GENE RAPPORTEUR DANS LE REIN.	27
FIGURE 10 : CARACTERISATION IN VITRO DE LA LIGNEE CELLULAIRE KS483 GENETIQUEMENT MODIFIEES POUR EXPRIMER LA LUCIFERASE SOUS CONTROLE DU PROMOTEUR HUMAIN HSP70B.....	29
FIGURE 11: SCHEMA DU SYSTEME DE TRANSPOSON SLEEPING BEAUTY.	31
FIGURE 12 : MISE EN EVIDENCE PAR IMAGERIE DE BIOLUMINESCENCE DE L'EXPRESSION STABLE DU GENE DE LA LUCIFERASE TRANSFECTE IN VIVO AVEC DU PEI EN PRESENCE DU SYSTEME DE TRANSPOSASE SLEEPING BEAUTY	32
FIGURE 13 : MISE EN EVIDENCE DE LA PROLIFERATION DE CELLULES MARQUEES GRACE AU COMPLEXE PEI/SP AVEC ET SANS LESION INDUITE PAR LA BLEOMYCINE.	32
FIGURE 14 : LES HCSM FAVORISENT L'ANGIOGENESE IN VIVO (TEST DANS UN MODELE D'EPONGE SOUS-CUTANEE).	38
FIGURE 15 : EFFET DES CSMH (HMSC) SUR LA CROISSANCE TUMORALE.	39
FIGURE 16 : LES CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES MODIFIENT LA STRUCTURE DES VAISSEAUX TUMORAUX.	40
FIGURE 17 : L'ACCIDENT VASCULAIRE CEREBRAL EN QUELQUES CHIFFRES.....	42
FIGURE 18 : MECANISMES DELETERES, PROTECTION ENDOGENE ET PISTES THERAPEUTIQUES POUR L'ISCHEMIE CEREBRALE.....	44

FIGURE 19: MECANISMES CELLULAIRES ET MOLECULAIRES DE REGENERATION APRES UN ACCIDENT VASCULAIRE CEREBRAL.....	46
FIGURE 20 : LES ENJEUX DE LA RECHERCHE EN THERAPIE DE L'AVC : LA PLACE DE LA THERAPIE CELLULAIRE	48
FIGURE 21: DIFFERENTES SOURCES DE CELLULES UTILISEES EN THERAPIE CELLULAIRE DE L'ACCIDENT VASCULAIRE CEREBRAL.....	49
FIGURE 22: APERÇU DES MECANISMES PROPOSES POUR LES THERAPIES DE L'ACCIDENT VASCULAIRE CEREBRAL BASEES SUR LES CELLULES STROMALES MESENCHYMATEUSES (CSM).....	51
FIGURE 23 : CARACTERISATION DES MODIFICATIONS MICRO-VASCULAIRES POST-ISCHEMIE/REPERFUSION CHEZ LE RAT MCAO.....	53
FIGURE 24 : SUIVI DE L'EXPRESSION CEREBRALE DES ARNM DE FGF-2, VEGF, VEGFR-1, VEGFR-2, ANG1, ANG2, TIE1, TIE2, ENOS, TGF β 1, CXCR4 ET SDF-1 SUITE A UNE OCCLUSION DE L'ARTERE CEREBRALE MOYENNE CHEZ LE RAT	54
FIGURE 25 : L'INJECTION PAR VOIE INTRAVEINEUSE DE CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES HUMAINES (HMSC) INDUIT UNE AUGMENTATION DE L'ANGIOGENESE POST-ISCHEMIQUE	55
FIGURE 26 : EFFET DE L'INJECTION DES CELLULES MESENCHYMATEUSES EN IV SUR L'EXPRESSION DES ARNM DE FACTEURS PRO-ANGIOGENIQUES DURANT 25 JOURS POST-ISCHEMIE/REPERFUSION	56
FIGURE 27 : BIODISTRIBUTION DES CSMH MARQUEES AU ^{99m} Tc-HMPAO.	60
FIGURE 28 : DETECTION DES CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES HUMAINES IMPLANTEES AVEC OU SANS HYDROGEL DANS LA CAVITE ISCHEMIQUE DE RATS.....	62
FIGURE 29 : LES DIFFERENTES INTERACTIONS CHIMIQUES ET NON COVALENTES A L'ORIGINE DES HYDROGELS AUTO-REPARANTS ²²¹	63
FIGURE 30 : VISUALISATION DES CARACTERISTIQUES D'AUTOREPARATION DES HYDROGELS AUTO-REPARANTS : LE RESEAU DE L'HYDROGEL PEUT GERER LES DOMMAGES EXTERNES ET SE REPARER.....	64
FIGURE 31: FORMATION D'HYDROGELS D'ACIDE HYALURONIQUE INJECTABLES ET AUTO-REPARANTS GRACE A DES LIAISONS VIA LES ESTERS BORONATE.....	65
FIGURE 32: EVALUATION DE LA TOXICITE DE L'HYDROGEL D'ACIDE HYALURONIQUE SUR LES CSMHS PAR LE TEST DE CYTOTOXICITE LIVE/DEAD.....	67
FIGURE 33 : CSPN DE SOURIS EN CULTURE 3D DURANT 7 JOURS DANS UN HYDROGEL D'ACIDE HYALURONIQUE	70

PREAMBULE

Ce mémoire de demande d'Habilitation à Diriger des Recherches est présente en trois parties, la première correspond à un *Curriculum vitae* détaillé, qui fournit une synthèse de mon parcours professionnel jusqu'à aujourd'hui. Dans cette partie sont également listés les étudiants que j'ai pu encadrer pendant ces années. Si leur position actuelle n'est pas indiquée, la majeure partie d'entre eux sont toujours actifs dans la recherche, en contrat post-doctoral, thèse ou recrutés à différents niveaux dans des entreprises publiques ou privées. La liste des articles que j'ai publiés est également présente, le détail des travaux étant repris dans la seconde partie du mémoire.

Dans cette seconde partie, j'ai choisi de présenter l'ensemble des thématiques que j'ai eu l'occasion d'aborder lors de mon parcours de recherche. D'une part, cela me permet de mettre en exergue l'ensemble des compétences que j'ai pu acquérir et qui me rendent apte à encadrer pleinement des travaux de recherche. D'autre part, des interconnexions nombreuses peuvent être établies entre ces différentes parties. Par exemple, j'ai abordé lors de ma thèse la physiologie des cancers et mes travaux de recherche depuis mon recrutement à Grenoble m'ont permis de travailler à nouveau sur des thématiques liées au cancer, notamment la thérapie cellulaire des cancers.

De même, je me suis intéressée à la problématique des thérapies géniques et cellulaires. J'ai pu approfondir cette dernière thématique, thème principal de mes recherches actuelles, dans le cadre de la récupération post-ischémie cérébrale.

Afin de rendre la lecture de cette partie plus facile, ces travaux sont regroupés par thèmes dans cinq chapitres distincts plutôt que par ordre chronologique.

La dernière partie du mémoire présente mon projet de recherche actuel, dans l'équipe « NeuroImagerie Fonctionnelle et Perfusion Cérébrale » dirigée par le Dr E. Barbier au sein de l'unité Inserm U1216 à Grenoble. L'objectif de ce projet est de potentialiser la thérapie cellulaire post-ischémie cérébrale grâce à la protection des cellules greffées par des biomatériaux.

PARCOURS PERSONNEL

J'ai effectué mes travaux de doctorat au sein du Laboratoire de Neurobiologie Morphofonctionnelle, Unité Inserm 378, Université de Bordeaux 2, sous la direction du Dr. Franck Couillaud. Le sujet portait sur l'étude de l'expression de polymorphismes d'ARNm dans le système nerveux central des mammifères et leurs conséquences biologiques et implications physiologiques (notamment dans le cadre des tumeurs cérébrales).

Suite à l'obtention de mon doctorat, j'ai développé deux projets axés sur la mise au point d'outils à visée thérapeutique, qui associent les performances des différentes modalités d'imagerie à la puissance des outils de la biologie moléculaire, de la biologie cellulaire et du génie génétique. Le premier post-doctorat, que j'ai effectué au « Laboratoire d'Imagerie Moléculaire et Fonctionnelle : de la physiologie à la thérapie », m'a permis d'acquérir des compétences en imagerie (optique, IRM, FUS). Le second, au « Laboratory of endocrinology and molecular imaging », m'a permis d'acquérir des compétences dans le domaine de la différenciation cellulaire des cellules souches mésenchymateuses.

Depuis ma prise de fonction dans l'enseignement supérieur et la recherche en 2007, mon activité de recherche s'est essentiellement intéressée à des problématiques liées à l'utilisation des cellules souches mésenchymateuses humaines en thérapie anti-cancéreuse. J'ai souhaité faire évoluer mes activités de recherche et c'est pour cette raison qu'en septembre 2012, j'ai rejoint l'équipe d'Emmanuel Barbier (DR Inserm, « NeuroImagerie Fonctionnelle et Perfusion Cérébrale ») à l'institut des Neurosciences de Grenoble (GIN ; Inserm/UGA U1216). L'équipe travaille au développement de techniques innovantes d'acquisition et d'analyse en imagerie et spectroscopie par Résonance Magnétique Nucléaire (IRM et SRM) et sur leurs applications précliniques et cliniques en neurosciences. Sur le versant clinique, les méthodes IRM développées par l'équipe sont utilisées pour caractériser le microenvironnement cérébral (pH extracellulaire, volume sanguin, diamètre des microvaisseaux, perméabilité des vaisseaux, réactivité vasculaire) et pour décrire les effets d'innovations thérapeutiques (thérapie par microfaisceaux synchrotron, thérapie anti-angiogénique et thérapie cellulaire...) dans le cadre des tumeurs cérébrales, de l'accident vasculaire cérébral, du traumatisme crânien et du diagnostic de la maladie d'Alzheimer.

Mon arrivée au sein de cette équipe a permis de compléter les compétences de ce groupe par mes connaissances en biologie cellulaire et moléculaire tout en me permettant de mener mes propres projets de recherche dans un environnement enrichissant. En arrivant au sein de cette équipe, j'ai retrouvé l'environnement multi-disciplinaire semblable à celui que j'avais connu au cours de mes postdocs dans lequel se côtoient physiciens, informaticiens, médecins et physiologistes. C'est dans ce contexte enrichissant que je peux développer mes thématiques de recherche. Dans un premier temps, j'ai participé à des projets en lien avec les radio-thérapies anti-cancéreuses en m'intégrant dans une collaboration entre l'équipe et une équipe de l'ESRF. Dans ce cadre, mes compétences à l'interface de la physiologie, la biologie cellulaire et l'IRM m'ont permis de participer activement à ce projet. Puis, rapidement, j'ai pris en charge les thématiques de thérapies cellulaires par les CSMh dans l'accident vasculaire cérébral. Le développement de mes axes de recherche au sein du laboratoire se font en étroites collaboration avec le Prof Detante (chef de service neurovasculaire au CHU de Grenoble et membre de l'équipe). Ma principale priorité est de potentialiser cette thérapie grâce à la protection des cellules greffées par des hydrogels. Ceci est possible grâce à une étroite collaboration avec le Prof Auzély du CERMAV à Grenoble et avec qui nous avons obtenu plusieurs financements en Co-PI et avec qui je co-encadre des étudiants de Master 2, thèse et des post-docs.

CURRICULUM VITAE

CLAIRE ROME, PHD

Née le 20 mars 1974 à Saint-Denis (93)

Adresse personnelle : 14 rue Dominique Villars – 38 000 Grenoble

Adresse professionnelle : Grenoble Institut des Neurosciences - Inserm U1216
Bâtiment Edmond J Safra des Neurosciences, Chemin Fortuné Ferrini
BP 170 – 38042 – GRENOBLE – Cedex 9

E-mail : claire.rome@univ-grenoble-alpes.fr

Téléphone bureau : 04 56 52 05

89

Web of Science ResearcherID : L-1724-2014

ORCID ID : 0000-0002-3573-

0543

Loop profile: 349727

Scopus Author ID: 9240943400

Index h : 17

Index i10 : 22

DIPLOMES

- 2003 **Doctorat de 3^{ième} cycle** (Sciences Biologiques et Médicales), option Neurosciences
Université Victor Segalen Bordeaux 2
- 1999 **DEA** de Neurosciences et pharmacologie, Université de Bordeaux 2
- 1998 **Maîtrise** de physiologie et biologie cellulaire et moléculaire, Université de Nantes

ACTIVITES DE RECHERCHE

- Sept. 2012 **Maître de conférences** UGA au sein de l'équipe 5 de l'Institut des Neurosciences de Grenoble, U1216
« Thérapie cellulaire de l'AVC par les cellules souches mésenchymateuses »
- 2007-2012 **Maître de conférences** UJF au sein de l'équipe 5 de l'Institut Albert Bonniot, CRI U823
« Développement de nouveaux outils de thérapie cellulaire et génique pour le traitement du cancer basés sur le ciblage cellulaire et/ou génique des tumeurs »
- 2006-2007 **Post-Doctorat** au sein du Laboratoire d'endocrinologie et imagerie moléculaire, Université de Leiden, Pays Bas
« Contrôle de la différenciation des cellules souches par hyperthermie guidée par imageries »
- 2003-2006 **Post-Doctorat** au sein du Laboratoire d'Imagerie Moléculaire et Fonctionnelle : de la physiologie à la thérapie, ERT CNRS rattachée à l'UMR-5543, Université de Bordeaux 2
« Contrôle de l'expression génique par les ultrasons focalisés contrôlés par IRM de température »
- 2002-2003 **ATER** de l'EPHE au sein du Laboratoire de Neurobiologie Intégrative et Adaptative composante EPHE du Laboratoire de Neurobiologie Morphofonctionnelle, Unité Inserm 378, Université de Bordeaux 2
« Polymorphisme médullaire du récepteur à l'ocytocine et réflexe d'éjection de lait »
- 1999-2003 **Doctorat** au sein du Laboratoire de Neurobiologie Morphofonctionnelle, Unité Inserm 378, Université de Bordeaux 2
« Exemples de polymorphismes d'ARNm dans le système nerveux central des mammifères : conséquences biologiques et implications physiologiques »

FINANCEMENTS

- 2019 Partenaire ANR Breakthru (PI : Marlène Wiart ; Lyon)
« Bicolor imaging with X-Rays to Evaluate A repair Kit THRough dedicated labelling of stem cells and hydrogel »
- 2018 : Co-PI d'un financement FRM « Chimie pour la médecine 2018 » avec la Prof. Auzély (CERMAV)
« Hydrogels à base de polysaccharides injectables et auto-réparant à capacité d'imagerie pour la thérapie cellulaire »
Subvention : 126 000 euros/289 054 euros
- 2018 : Appel à projets IDEX Glyco@Alps,
Subvention : 5000 euros (Financement d'un étudiant de Master 2 et fonctionnement entre deux laboratoires : co-financement)
- 2017 Projet européen H2020 : consortium RESSTORE (Regenerative-stem-cell-therapy-stroke ; Coord : Prof. Detante) : en charge d'une des parties du WP Experimental
Subvention : 10 000 euros
- 2013 Appel à projets Grenoble Innovation Recherche (AGIR) (Université Joseph Fourier et Institut polytechnique de Grenoble)
« Contrôle spatio-temporel de protéine thérapeutique pour lutter contre la récurrence des gliomes après radiothérapie »
Subvention : 15 000 euros
- 2008 Association « Vaincre la mucoviscidose »
« Vectorisation du gène *cfr* pour une expression à long terme *in vivo* grâce à *Sleeping Beauty* »
Subvention : 20 000 euros
- 2008 Pôle Chimie-Science du vivant de l'Université Joseph Fourier
Subvention : 27 000 euros
- 2004- 2006 Financement postdoctoral de la Fondation Florindon

PUBLICATIONS ET PRODUCTION SCIENTIFIQUE

- 1) Potez, M., A. Bouchet, M. Flaender, **C. Rome**, N. Collomb, M. Grotzer, M. Krisch, V. Djonov, J. Balosso, E. Brun, J.A.Laissue & R.Serduc R (2020). Synchrotron X-ray boost delivered by Microbeam Radiation Therapy after conventional X-ray therapy fractionated in time improves F98 glioma control. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 50360-3016(20)30222-4
- 2) Figueiredo, T., J. Jing, I. Jeacomine, J. Olsson, T. Gerfaud, J.G Boiteau, **C. Rome**, C. Harris, R. Auzély-Velty (2020). Injectable self-healing hydrogels based on boronate ester formation between hyaluronic acid partners modified with benzoxaborin derivatives and saccharides. *Biomacromolecules*. 21(1):230-239
- 3) **Rome, C.**, J. Gravier, M. Morille, G. Divita, A.L. Bolcato-Bellemin, V. Josserand & J.L. Coll (2019) Near-infrared optical imaging of nucleic acid nanocarriers *in vivo*. *Methods Mol Biol*, 948, 49-65.
- 4) Piazza, I., A. Cupane, E.L. Barbier, **Rome C.**, N. Collomb, J. Ollivier, M.A. Gonzalez & F. Natali (2018). Dynamical properties of water in living cells. *Frontiers of Physics* 13, 138301.
- 5) Detante, O., **C. Rome** & J. Papassin (2017). How to use stem cells for repair in stroke patients. *Revue neurologique*. 173(9):572-576
- 6) Bouchet, A., M. Potez, **C. Rome**, N. Coquery, B. Lemasson, E. Brauer-Krisch, C. Remy, J.A. Laissue, E.L. Barbier, V. Djonov, and R. Serduc (2017). Permeability of brain tumor vessels

- induced by uniform or spatially micro-fractionated synchrotron radiation therapies. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*
- 7) Moisan, A. and Favre, I., **C. Rome**, F. de Fraipont, E. Grillon, N. Coquery, H. Mathieu, V. Mayan, B. Naegele, M. Hommel, M.J. Richard, E.L. Barbier, C. Rémy & O. Detante. (2016) Intravenous injection of clinical grade human mesenchymal stem cells after experimental stroke: functional benefit and microvascular effects. *Cell Transplantation*, no.25(12):2157-2171
 - 8) Boisserand, L.S.B., T. Kodama, J. Papassin, R. Auzély, A. Moisan, **C. Rome** & O. Detante. Biomaterial Applications in Cell-Based Therapy in Experimental Stroke. *Stem Cells International*. Epub 2016 May 4.
 - 9) Frachet, V., M. Keramidas, A. Nurisso, S. DeBonis., **C. Rome**, A. Boumendjel, D. Skoufias & X. Ronot. (2015) IPP51, a chalcone acting as a microtubule inhibitor with in vivo antitumor activity against bladder carcinoma. *Oncotarget Journal*, 6, no 16, 14669-86.
 - 10) Moisan, A. and Favre, I., **C. Rome**, E. Grillon, B. Naegele, M. Barbieux, F. de Fraipont, M.J. Richard, E.L. Barbier, C. Rémy & O. Detante (2014) Microvascular plasticity after experimental stroke: a molecular and MRI study. *Cerebrovasc Dis*, no.38(5):344-53
 - 11) **Rome, C.**, J. Gravier, M. Morille, G. Divita, A.L. Bolcato-Bellemin, V. Josserand & J.L. Coll (2013) Near-infrared optical imaging of nucleic acid nanocarriers in vivo. *Methods Mol Biol*, 948, 49-65.
 - 12) Keramidas, M., F. de Fraipont, A. Karageorgis, A. Moisan, V. Persoons, M. J. Richard, J. L. Coll & **C. Rome** (2013) The Dual Effect of Mscs on Tumour Growth and Tumour Angiogenesis. *Stem Cell Res Ther*, 4, no. 2: 41.
 - i. Cet article a été défini comme « 'Highly accessed' relative to age' ».
 - ii. Cet article a donné lieu à un « Commentary » : *Gomes Stem Cell Research & Therapy 2013, 4:42*
 - 13) Emadali, A., S. Rousseaux, J. Bruder-Costa, **C. Rome**, S. Duley, S. Hamaidia, P. Betton, A. Debernardi, D. Leroux, B. Bernay, S. Kieffer-Jaquinod, F. Combes, E. Ferri, C. E. McKenna, C. Petosa, C. Bruley, J. Garin, M. Ferro, R. Gressin, M. B. Callanan & S. Khochbin (2013) Identification of a Novel Bet Bromodomain Inhibitor-Sensitive, Gene Regulatory Circuit That Controls Rituximab Response and Tumour Growth in Aggressive Lymphoid Cancers. *EMBO Mol Med*, 5, no. 8: 1180-95.
 - 14) Faurobert, E., **C. Rome**, J. Lisowska, S. Manet-Dupe, G. Boulday, M. Malbouyres, M. Balland, A. P. Bouin, M. Keramidas, D. Bouvard, J. L. Coll, F. Ruggiero, E. Tournier-Lasserre & C. Albiges-Rizo (2013) Ccm1-Icap-1 Complex Controls Beta1 Integrin-Dependent Endothelial Contractility and Fibronectin Remodeling. *J Cell Biol*, 202, no. 3: 545-61.
 - 15) Bouchet, A., B. Lemasson, T. Christen, M. Potez, **C. Rome**, N. Coquery, C. Le Clec'h, A. Moisan, E. Brauer-Krisch, G. Leduc, C. Remy, J. A. Laissue, E. L. Barbier, E. Brun & R. Serduc (2013) Synchrotron Microbeam Radiation Therapy Induces Hypoxia in Intracerebral Gliosarcoma but Not in the Normal Brain. *Radiother Oncol*, 108, no. 1: 143-8.
 - 16) Coquery, N., N. Pannetier, R. Farion, A. Herbette, L. Azurmendi, D. Clarencon, S. Bauge, V. Josserand, **C. Rome**, J.L. Coll, J.S. Sun, E.L. Barbier, M. Dutreix & C. Remy (2012) Distribution and radiosensitizing effect of cholesterol-coupled Dbait molecule in rat model of glioblastoma. *PLoS One*, 7, e40567.
 - 17) Nascimento, F.D., L. Sancey, A. Pereira, **C. Rome**, V. Oliveira, E.B. Oliveira, H.B. Nader, T. Yamane, I. Kerkis, I.L. Tersariol, J.L. Coll & M.A. Hayashi (2012) The natural cell-penetrating peptide crotamine targets tumor tissue in vivo and triggers a lethal calcium-dependent pathway in cultured cells. *Mol Pharm*, 9, 211-21.
 - 18) Eker, O.F., B. Quesson, **C. Rome**, J. Arsaut, C. Deminiere, C.T. Moonen, N. Grenier & F. Couillaud (2011) Combination of cell delivery and thermoinducible transcription for in vivo spatiotemporal control of gene expression: a feasibility study. *Radiology*, 258, 496-504.
 - 19) Lin, E.H., M. Keramidas, **C. Rome**, W.T. Chiu, C.W. Wu, J.L. Coll & W.P. Deng (2011) Lifelong reporter gene imaging in the lungs of mice following polyethyleneimine-mediated sleeping-beauty transposon delivery. *Biomaterials*, 32, 1978-85.
 - 20) Sancey, L., S. Dufort, V. Josserand, M. Keramidas, C. Righini, **C. Rome**, A. C. Faure, S. Foillard, S. Roux, D. Boturnyn, O. Tillement, A. Koenig, J. Boutet, P. Rizo, P. Dumy & J.L. Coll (2009) Drug development in oncology assisted by noninvasive optical imaging. *Int J Pharm*, 379, 309-16.

- 21) **Rome, C.**, R. Deckers & C.T. Moonen (2008) The use of ultrasound in transfection and transgene expression. *Handb Exp Pharmacol*, 225-43.
- 22) Deckers, R., **C. Rome** & C.T. Moonen (2008) The role of ultrasound and magnetic resonance in local drug delivery. *J Magn Reson Imaging*, 27, 400-9.
- 23) **Rome, C.**, J. Arsaut, C. Taris, F. Couillaud & H. Loiseau (2007) MMP-7 (matrilysin) expression in human brain tumors. *Mol Carcinog*, 46, 446-52.
- 24) **Rome, C.**, F. Couillaud & C.T. Moonen (2007) Gene expression and gene therapy imaging. *Eur Radiol*, 17, 305-19.
- 25) Letavernier, B., R. Salomir, Y. Delmas, **C. Rome**, F. Couillaud, D.A., I. Dubus, F. Moreau-Gaudry, C. Grosset, O. Hauger, J. Rosenbaum, N. Grenier, C. Combe, J. Ripoché & C. Moonen. (2007). *Ultrasound-Induced Expression of a Heat Shock Promoter-Driven Transgene Delivered in the Kidney by Genetically Modified Mesenchymal Stem Cells: A Feasibility Study*. Ferenc A. Jolesz and Kullervo H. Hynynen
- 26) **Rome, C.**, H. Loiseau, J. Arsaut, V. Roullot & F. Couillaud (2006) Diversity of contactin mRNA in human brain tumors. *Mol Carcinog*, 45, 774-85.
- 27) **Rome, C.**, V. Roullot & F. Couillaud (2005) Polymorphism of the untranslated regions of the F3/contactin mRNA in the rat nervous system. *Brain Res Mol Brain Res*, 139, 184-91.
- 28) **Rome, C.**, F. Couillaud & C.T. Moonen (2005) Spatial and temporal control of expression of therapeutic genes using heat shock protein promoters. *Methods*, 35, 188-98.
- 29) Touelle, M., B. Saint-Jean, **C. Rome**, F. Couillaud, M. Castroviejo & J.P. Benedetto (2002) Two distinct proliferating cell nuclear antigen are present in the wheat cell. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40, 743-748.
- 30) Ito, K., **C. Rome**, Y. Bouleau & D. Dulong (2002) Substance P mobilizes intracellular calcium and activates a nonselective cation conductance in rat spiral ganglion neurons. *Eur J Neurosci*, 16, 2095-102.
- 31) **Rome, C.**, D. Luo & D. Dulong (1999) Muscarinic receptor-mediated calcium signaling in spiral ganglion neurons of the mammalian cochlea. *Brain Res*, 846, 196-203.

ACTIVITES D'ENCADREMENT

2001	Encadrement de Guillaume FRUGIER (Responsable : Dr. F. Couillaud), étudiant de maîtrise, Université de Bordeaux 2
2002	Encadrement de Marlène SANGUINE (Responsable : Dr. F. Couillaud), étudiante de licence professionnelle de biologie cellulaire et moléculaire, Université de Bordeaux 2
2003	Encadrement d'Aurélien CHRIST (Co-encadrement : Dr. F. Couillaud), étudiante de licence professionnelle de biologie cellulaire et moléculaire, Université de Bordeaux 2 Encadrement pratique dans le cadre ATER de Bastien TOUQUET (Responsable : Dr. M.-C. Lombard), étudiant préparant un diplôme de l'EPHE
2004	Encadrement d'Alix PRENAT (Co-encadrement : Dr. F. Couillaud), étudiante de licence professionnelle de biologie cellulaire et moléculaire, Université de Bordeaux 2
2003-2004	Encadrement pratique de Béatrice LETAVERNIER (Responsable : Dr. J. Ripoché), étudiante en DEA de biologie et pathologies des épithéliums, Université de Paris VII
2004-2005	Encadrement pratique de Julie MIGUEL (Responsable : Prof. M. Allard), étudiante en DEA de biocinétique des traceurs, Université de Tours
2007-2008	Encadrement de Lovisa ROSENQUIST, étudiante ERASMUS en Master 1 de biologie BCI, Université Joseph Fourier, en échange avec l'Université de York
2008-2009	Encadrement de Lucie CARRIE, étudiante en Licence Professionnelle de productions animales, Université Joseph Fourier
2009	Encadrement d'Anastassia KARAGEORGIS, étudiante 5 ^{ième} année de pharmacie, filière recherche, Université Joseph Fourier

- 2009-2010 Encadrement d'Anastassia KARAGEORGIS, étudiante Master 2R « Ingénieries pour la Santé et le Médicament » de l'Université Joseph Fourier
- 2010 Directrice de la thèse en pharmacie de l'Université Joseph Fourier d'Anastassia KARAGEORGIS
- 2012-2013 Encadrement de Dominique MIAS-LUCQUIN, étudiante Master 2R « Sciences du Vivant », option « Neurosciences & Neurobiology », Université Joseph Fourier
Encadrement de Nelly SICARD, étudiante Master 2R « BioSciences », Université Claude Bernard
Lyon 1
- 2013-2014 Encadrement de Mélanie KLEIN, étudiante Master 1 Ingénierie Santé, Université Joseph Fourier
- 2015-2016 Co-encadrante avec le Prof. Detante Olivier (CHU Grenoble) de la thèse de Sciences de Ligia Simoes Braga BOISSERAND (50%), École doctorale EDCSV, Université Grenoble-Alpes, Grenoble (Soutenance Novembre 2016)
- 2016-2017 Co-encadrement de François Bulteau avec Rachel Auzély (CERMAV), étudiant Master 2 Ingénierie Santé, Université Grenoble-Alpes
Encadrement de Mathieu Debuissou, étudiant Master 2 Neurosciences, Université Grenoble-Alpes
Encadrement de Margot Nagelé, étudiante de L3 Biotechnologies, Université Grenoble-Alpes
- 2017-2018 Co-encadrement avec Rachel Auzély (CERMAV) de Baptiste Quienne, étudiant Master 2 Chimie des polymères, Université Grenoble-Alpes
Co-encadrement avec le Prof. Detante de Emilie Francoz, Pierre Chapuis et Guillaume Boullen (étudiants de médecine, stage de Master 1), UFR Médecine, Université Grenoble-Alpes
- 2018-2019 Co-encadrement de Enrique Quesada avec Rachel Auzély (CERMAV), étudiant Master 2 Chimie des polymères, Université Grenoble-Alpes
Co-encadrement avec Anaick Moisan (EFS Grenoble) de Anthony Maino (Interne en pharmacie), étudiant Master 2 Ingénierie Santé, Université Grenoble-Alpes
Encadrement de Mégane Coradin, étudiante Master 2 Ingénierie Santé, Université Grenoble-Alpes
Co-encadrement avec le Prof. Detante de Sarah Paillé (étudiante 5^{ième} année médecine, stage de Master 1), UFR Médecine, Université Grenoble-Alpes
- 2019-2020 Co-encadrement avec Anne Briançon (laboratoire HP2 Grenoble) de Alaa Skeyni, étudiante Master 2 PHED, Université Grenoble-Alpes
Co-encadrement avec le Prof. Detante de Julie Belvarque (étudiante 5^{ième} année médecine, stage de Master 1), UFR Médecine, Université Grenoble-Alpes
- 2019-2022 Co-encadrement avec le Prof Detante et la Prof Auzély de la thèse de Sciences de Moustoifa SAID, École doctorale EDCSV, Université Grenoble-Alpes, Grenoble
- 2019-2021 Co-encadrement avec la Prof Auzély d'une post-doctorante Vanina Cosenza
- 2020-2021 Co-encadrement avec le Prof. Detante de Emma Velon (étudiante 4^{ième} année médecine, stage de Master 1), UFR Médecine, Université Grenoble-Alpes

Conférences invitées depuis 2007

Rome, C. et Detante, O. 2021. Thérapies cellulaires des strokes. Séminaire vendrediNeuro. CHU Grenoble, Grenoble

Rome, C. 2017 Cell therapy post-AVC by mesenchymal stem cells and biomaterials. Séminaire invité. Laboratoire Génie des Procédés Papetiers, Grenoble

Rome, C. 2017 Biomaterial-mesenchymal stem cell constructs. Conférence plénière invitée, In *4th Meeting d'ECCellFrance*, Grenoble

Rome, C. 2017 Hydrogels injectables à base de polysaccharides: application à l'accident vasculaire cérébral. Conférence plénière invitée, In *1st Kickoff Meeting de Glyco@Alps*, Grenoble

Rome, C. et Detante, O. 2016 Thérapie cellulaire post-AVC : de l'animal à l'homme. Conférence plénière. *Colloque médical du jeudi du CHU de Grenoble : les jeudis de l'interface*

Rome, C. 2013. Influence of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell on Microvasculature: Our Experiment in Rat Ischemic and Mouse Tumour Models. Conférence plénière, In *World Biotechnology Congress 2013*. Boston, MA (USA).

Rome, C. 2008. Imagerie et thérapie génique : exemple d'application ostéoarticulaire : Contrôle de l'expression génique par le promoteur HSP70B et la température dans les cellules mésenchymateuses progénitrices en vue d'une induction de leur différenciation en ostéoblastes, Conférence plénière, Société d'imagerie musculo-squelettique, Paris.

Rome, C. 2008. Introduction à l'imagerie optique, Conférence plénière, *Société d'imagerie musculo-squelettique*, Paris.

Rome, C. 2007. Contrôle spatio-temporel de l'expression transgénique *in vivo* chez le petit animal par les ultrasons focalisés guidés par IRM de température, Séminaire IFR 58, Université Pierre et Marie Curie, Paris, France.

Communications affichées depuis 2007

- 1) Papassin J., L.S.B., Boisserand, N. Collomb, E.L. Barbier, **C Rome**, and O. Detante. 2016. Greffe intracérébrale de cellules souches mésenchymateuses combinées à un hydrogel d'acide hyaluronique dans un modèle murin d'infarctus cérébral. In *21th journée de la société française neurovasculaire*, Paris.
- 2) **Rome C.**, A. Moisan, I. Favre, E. Grillon, B. Naegele, M. Barbieux, F. de Fraipont, M.J. Richard, E.L. Barbier, C. Rémy and O. Detante. 2014. Microvascular plasticity after experimental stroke: a molecular and MRI study. In *5th Congress of the French Society of Angiogenesis*, Chamonix.
- 3) Moisan, A, Favre, I., Rome, C., Naegele, B., Barbier, E.L., Remy, C., de Fraipont, F., Richard, M.-J., and Detante, O. 2012. Comment Les Cellules Souches Mésenchymateuses Améliorent-Elles La Microvascularisation Après Un Accident Vasculaire Cérébral?. In *1er congrès de la Société Française de Résonance Magnétique en Biologie et en Médecine*. Marseille (France).
- 4) Bouchet, A, B. Lemasson, T. Christen, C Rome, M Potez, Elke Brauer-Krisch, G. Le Duc, C. Remy, Jean A Laissue, E. L. Barbier, and R. Serduc. 2012. Synchrotron Microbeam Radiation Therapy Induces Hypoxia in Tumor but Not in Normal Brain Tissues. In *7th Medical Applications of Synchrotron Radiation Workshop*. Shanghai (China).

- 5) Coquery, N, R. Farion, D Clarençon, S Bauges, V Josserand, C Rome, J-L Coll, J-S Sun, E. L. Barbier, M Dutreix, and C. Remy. 2012. Radiosensitizing Effect of Cholesterol-Coupled Dbait on Animal Survival and Tumor Properties Determined with Multiparametric Mri. In *1er congrès de la Société Française de Résonance Magnétique en Biologie et en Médecine*. Marseille (France).
- 6) N. Coquery, R. Farion, D. Clarençon, S. Bauges, V. Josserand, C. Rome, J.-L. Coll, J.-S. Sun, E.L. Barbier, M. Dutreix, C. Remy, Radiosensitizing effect of cholesterol-coupled dbait on animal survival and tumor properties determined with multiparametric MRI, in: *1er congrès de la Société Française de Résonance Magnétique en Biologie et en Médecine*, Marseille (France), 2012.
- 7) Kéramidas, M., F. De Fraipont, C. Lucas, M.J. Richard, J.L. Coll & C. Rome. 2011. Human mesenchymal stem cells in tumor angiogenesis and growth. In *Société Française d'angiogenèse*. Bordeaux (France).
- 8) Coquery, N., A. Karageorgis, C. Lucas, M.J. Richard, E. Barbier, M. Sève, F. De Fraipont, C. Rémy, J.L. Coll & C. Rome. 2011. Human Mesenchymal Stem Cells for glioblastoma cell therapy. In *6èmes journées Scientifiques du Cancéropôle Lyon Auvergne Rhône-Alpes*. Lyon (France).
- 9) Kéramidas, M., F. De Fraipont, C. Lucas, M.J. Richard, J.L. Coll & C. Rome. 2011. Influence of human mesenchymal stem cells on adenocarcinomas cancer cell proliferation in subcutaneous and lung models. In *6th European Molecular Imaging Meeting*. Leiden (The Netherland).
- 10) Martel-Frchet, V., Kéramidas, M., Skoufias, D., Rome, C., Boudemendjel, A. & Ronot, X. 2011. Validation *in vitro* et *in vivo* d'un nouveau dérivé synthétique de flavonoïde ciblant les tumeurs de vessie. In *1ère Journée Scientifique du Médicament*. Grenoble (France).
- 11) Moisan, A, Favre, I., Rome, C., Naegele, B., Barbier, E.L., Remy, C., de Fraipont, F., Richard, M-J., and Detante, O. 2011. Comment les cellules souches mésenchymateuses améliorent-elles la microvascularisation après un accident vasculaire cérébral? In *Société Française de Bioingénierie Cellulaire et Tissulaire*. Reims (France).
- 12) Karageorgis, A., N. Coquery, C. Lucas, M.J. Richard, J.L. Coll, E. Barbier, M. Sève, F. De Fraipont, C. Rémy & C. Rome. 2010. The use of human mesenchymal stem cells as therapeutic tool in mice glioblastoma model. In *First European Mesenchymal Stem Cells Conference*. Toulouse, France.
- 13) Debeissat, C., C. Rome, F. Couillaud, E.L. Kaijzel, C.W.G.M. Lowik & C.T.W. Moonen. 2009. Osteoblastic differentiation of mesenchymal progenitor cells by heat-induced gene expression. In *4th European molecular Imaging Meeting*, ESMI. Barcelona, Spain: ESMI.
- 14) Eker, O., B. Quesson, C. Rome, J. Arsaut, C. Deminiere, C.T.W. Moonen, N. Grenier & F. Couillaud. 2009. In vivo spatio-temporal control of gene expression using a cellular vector in the rat kidney. In *4th European molecular Imaging Meeting*, ESMI. Barcelona, Spain: ESMI.
- 15) Kéramidas, M., V. Josserand, J.J. Feige, S. Bailly, D. Boturyn, P. Dumy, C. Rome & J.L. Coll. 2009. In vivo neo-angiogenesis visualization by 3D fluorescence imaging. In *4th European Molecular Imaging Meeting*. Barcelona, Spain.
- 16) Josserand, V., J.M. Dinten, I. Texier-Nogues, M. Kéramidas, L. Sancey, C. Rome, D. Boturyn, P. Rizo, P. Dumy & J.L. Coll. 2009. 3D optical imaging and fluorescent probes development for optical imaging : one step toward the bedside. In *4th European molecular Imaging Meeting*, ESMI. Barcelona, Spain: ESMI.

Activités vulgarisation scientifique depuis 2012

- | | |
|-------------|--|
| 2013-2015 | Membre du comité d'organisation local et participation active à la « Fête de la Science » |
| Depuis 2012 | Participation à la Formation « <i>L'habilitation à l'expérimentation animale de niveau 1</i> » organisée par le Dr Favier, Université Grenoble Alpes |
| 2018 | Expertise AVC-Thérapie pour le magazine « La Recherche » |
| 2019 | Conférence- Débat Grand Public sur L'AVC : RECHERCHE ET INNOVATION (France AVC 38) |

RESPONSABILITES SCIENTIFIQUES

Collaborations scientifiques depuis 2012

- **CERMAV**, CNRS, Grenoble, France, Prof. Rachel Auzély
Co-encadrement d'étudiants en M2 François Bulteau, Baptiste Quienne, Enrique Quesada
Co-encadrement de doctorant Moustoifa Said
Co-encadrement d'une chercheuse post-doctorale Vanina
- **EFS**, Grenoble, Unité de Thérapie et d'Ingénierie Cellulaire, Anaick Moisan, PharmD, PhD
- **ESRF**, Grenoble, France, Raphaël Serduc, François Estève, Audrey Bouchet

Participation à un réseau de recherche français et européen depuis 2012

Mon activité de recherche axée autour de problématiques liées à l'utilisation des cellules souches mésenchymateuses humaines adultes (hMSC) en thérapie post-AVC m'a permis de pouvoir intégrer le réseau français *E-CellFrance for regenerative medicine* (<https://www.ecellfrance.com/>) dont la mission est de permettre le développement des thérapies cellulaires à base de hMSC.

Dans ce cadre, je travaille en étroite collaboration avec le Prof. Detante, chef du service neurovasculaire de CHU de Grenoble et été impliquée dans un projet européen de thérapie cellulaire qu'il portait (*RESSTORE: REgenerative Stem cell therapy for Stroke*) (<http://www.resstore.eu/>).

Afin de potentialiser les thérapies que je développe, je collabore au sein de l'IDEX *Glyco@Alps* (<https://glycoalps.univ-grenoble-alpes.fr/>) avec la Prof. Auzély (CERMAV).

Expertises

- **Referee** pour la revue *Frontiers in Neuroscience*
- **Referee** pour la revue *Stem Cell Research*
- **Referee** pour la revue *European Radiology*
- **Expertise scientifique** pour le CEFIPRA (Indo-French Centre for the Promotion of Advanced Research) (<http://www.cefipra.org>)
- **Expert scientifique/reviewer** pour l'ANR

RESPONSABILITES PEDAGOGIQUES ET ENSEIGNEMENTS

Responsabilités – Pédagogiques

- Depuis Septembre 2007 :
Mise en place et responsable pédagogique de l'UE de Master 2 Recherche « Cancérologie expérimentale et thérapeutique » au sein de l'UFR de biologie ; Université Grenoble Alpes
- Depuis Septembre 2010 :
Mise en place et co-responsable pédagogique du module de L2 Enseignements coordonnés « Des biotechnologies pour des pathologies infectieuses » au sein de l'UFR de Pharmacie, *École des biotechnologies* ; Université Grenoble Alpes
- Depuis Septembre 2011 :
Mise en place et responsable pédagogique du module de L3 Enseignements coordonnés « Biotechnologies autour de la pathologie cancéreuse » au sein de l'UFR de Pharmacie, *École des biotechnologies* ; Université Grenoble Alpes

- Depuis Septembre 2018 :
Co-responsable pédagogique des travaux pratiques du module « Communication dans les cellules normales et cancéreuses » de **L3 Biologie ; Chimie-Biologie, UGA**

Activités administratives et collectives

- 2020 - Membre du Comité de Sélection du poste de Maître de Conférences 504, UGA
- 2009-2016 - Membre de la Commission Validation d'Acquis de l'Université Joseph Fourier, représentante de la composante Biologie
- 2010 - Membre du Comité de Sélection du poste de Maître de Conférences 1175, UJF
 - Membre du Comité de Sélection du poste de Maître de Conférences 761, UJF
 - Membre du comité d'organisation du XXXIIIème Congrès de la Société de Biologie Cellulaire de France : Imaging the cell ; Grenoble
- 2012-2016 - Membre du Groupe de Réflexion pour l'Animation, la Communication et l'Enseignement de l'Institut de neurosciences de Grenoble
- Depuis 2013 - Représentante des chercheurs au conseil de laboratoire Inserm U1216

Stages de formation

De manière à compléter mes compétences, j'ai assisté à des formations proposées par l'université Joseph Fourier.

- Formation « *Pratique Vocale* », 2007
- Formation « *L'habilitation à l'expérimentation animale de niveau 1* », 2008
- Formation du Service Universitaire de Pédagogie « *Découvrir l'apprentissage par problèmes* », 2010
- Atelier de formation Inserm : « *Vecteurs lentiviraux : outils pour la recherche fondamentale et thérapeutique* », 2010
- *Atelier de formation UGA « Anglais Présenter son cours en anglais »*, 2016

Informations significatives sur le déroulement de la carrière et les conditions d'exercice :

Mobilités géographiques et thématiques

Années	Diplôme et fonctions	Thèmes de recherche	Laboratoires
1999-2003	Thèse Université Bordeaux 2	« Exemples de polymorphismes d'ARNm dans le système nerveux central des mammifères : conséquences biologiques et implications physiologiques »	Laboratoire de Neurobiologie Morphofonctionnelle, Unité Inserm 378
2003-2006	Post-doctorat Université Bordeaux 2	« Contrôle de l'expression génique par les ultrasons focalisés contrôlés par IRM de température »	Laboratoire d'Imagerie Moléculaire et Fonctionnelle : de la physiologie à la thérapie, ERT CNRS rattachée à l'UMR-5543
2006-2007	Post-doctorat Université de Leiden, Pays Bas	« Contrôle de la différenciation des cellules souches par hyperthermie guidée par imageries »	Leids Universitair Medisch Centrum, Dept. Radiology, Laboratoire d'endocrinologie et imagerie moléculaire, Université de Leiden, Pays-Bas
2007-2012	Enseignant-Chercheur (MCU) Université Joseph Fourier	« Développement de nouveaux outils de thérapie cellulaire et génique pour le traitement du cancer basés sur le ciblage cellulaire et/ou génique des tumeurs »	Institut Albert Bonniot, CRI U823
Depuis 2012	Enseignant-Chercheur (MCU) Université Grenoble-Alpes	« Thérapie cellulaire des AVC utilisant les cellules souches mésenchymateuses et biomatériaux en recherche préclinique »	Institut des Neurosciences de Grenoble, Inserm U1216

Situations particulières

Septembre 2012 Changement de laboratoire et de thématique

2013-2014 Congé pour Recherches ou Conversions Thématiques (un semestre de CRCT CNU au titre de la campagne de mobilité 2013/2014 / un semestre de CRCT Université Joseph Fourier au titre de la campagne de mobilité 2013/2014)

Octobre 2014- Mars 2015 Congé maternité

Juillet 2016- Novembre 2016 : Congé maternité

FACTEUR D'IMPACT DES PUBLICATIONS

Depuis le début de ma thèse, j'ai publié en moyenne plus d'un article par an, quelle que soit la position dans la liste des auteurs, dans des revues internationales à comité de lecture (Figure 1). Fin 2020, la valeur de l'index « h » (h-index) calculé via le site « Web of knowledge » (<http://isiwebofknowledge.com/>) est de 17 et le Index i10 de 22.

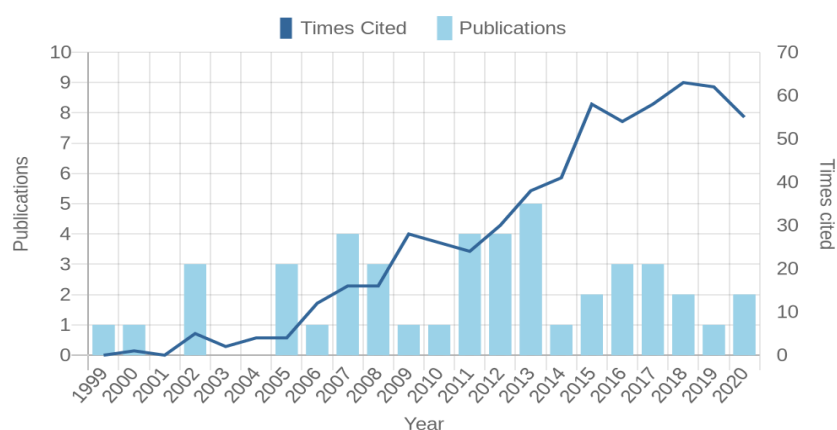


FIGURE 1 : Bilan des publications dans des revues internationales à comité de lecture par année

FACTEUR D'IMPACT DES PUBLICATIONS

DOI	Position Auteur	Nombre Auteurs	Revue	Année	Facteur d'impact*	Nombre de citation
10.1021/ACS.BIOMAC.9B01128	8	9	Biomacromolecules	2020	5.680 (2019)	3
Q110.1016/j.ijrobp.2020.02.023	4	12	Int J Radiat Oncol Biol Phys	2020	5.859 (2019)	0
10.1007/978-1-4939-9092-4_23	1	7	Methods in Molecular Biology	2019	10.71	0
10.1007/S11467-017-0731-5	4	8	Frontiers of Physics	2018	2.483	4
10.1016/J.NEUROL.2017.09.003	2	3	Revue Neurologique	2017	1.762	3
10.1016/J.IJROBP.2017.03.025	3	11	Int J Radiat Oncol Biol Phy	2017	5.554	13
10.3727/096368916X691132	3	14	Cell Transplantation	2016	3.006	13
10.1016/J.IJROBP.2016.06.830	5	12	Int J Radiat Oncol Biol Phy	2016	5.133	3
10.1155/2016/6810562	6	7	Stem Cells International	2016	3.540	23
10.18632/ONCOTARGET.4144	5	8	Oncotarget	2015	5.383	21
10.1159/000368597	3	11	Cerebrovascular Diseases	2014	3.754	20
10.1083/JCB.201303044	2	14	The Journal of Cell Biology	2013	9.688	49
10.1002/EMMM.201202034	4	22	EMBO Molecular Medicine	2013	8.245	45
10.1007/978-1-62703-140-0_5	1	7	Methods in Molecular Biology	2013	1.49	2
10.1016/J.RADONC.2013.05.013	5	15	Radiotherapy and Oncology	2013	4.857	49
10.1186/SCRT195	8	8	Stem Cell Research & Therapy	2013	4.634	32
10.1371/JOURNAL.PONE.0040567	9	14	Plos One	2012	3.730	16
10.1016/J.VPH.2011.08.080	2	12	Vascular Pharmacology	2012	3.212	1
10.1021/MP2000605	4	12	Molecular Pharmaceutics	2012	4.570	38
10.1016/J.BIOMATERIALS.2010.11.026	3	7	Biomaterials	2011	7.404	9
10.1148/RADIOL.10100767	3	8	Radiology	2011	6.066	15
10.1016/J.IJPHARM.2009.05.034	6	16	International Journal of Pharmaceutics	2009	3.607	18
10.1002/JMRI.21272	2	3	Journal of Magnetic Resonance Imaging	2008	3.472	49
10.1007/978-3-540-77496-9_9	1	3	Handbook of Experimental Pharmacology	2008		
10.1007/S00330-006-0378-Z	1	3	European Radiology	2007	4.260	26
10.1002/MC.20293	1	5	Molecular Carcinogenesis	2007	3.436	20
10.1002/MC.20244	1	5	Molecular Carcinogenesis	2006	2.836	3
10.1016/J.MOLBRAINRES.2005.05.012	1	3	Brain research. Molecular brain research	2005	2.954	3
10.1016/J.YMETH.2004.08.011	1	3	Methods	2005	4.073	57
10.1046/J.1460-9568.2002.02292.X	2	4	European Journal of Neuroscience	2002	4.101	28
10.1016/S0981-9428(02)01435-3	3	6	Plant Physiology and Biochemistry	2002	1.574	3
10.1016/S0006-8993(99)02034-X	1	3	Brain Research	1999	2.273	18

Gras : articles en 1^{er} auteur ; Rouge : article en dernier auteur ; * Facteur d'impact du journal pour l'année de publication

BILAN DES ACTIVITES DE RECHERCHE

I. ÉTUDE DU POLYMORPHISME DES ARNm DANS LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL DU RAT

Pour ma thèse, j'ai rejoint le *Laboratoire de Neurobiologie Morphofonctionnelle*, Unité Inserm 378, dirigé par le Dr. D. Poulain. Sous la direction du Dr. F. Couillaud, j'ai étudié le polymorphisme de l'ARNm de F3/Contactine, une molécule d'adhérence, et j'ai recherché un rôle fonctionnel à ce polymorphisme en relation avec les processus physiologiques de plasticité dans le système nerveux central du rat et, plus particulièrement, dans le système hypothalamo-neurohypophysaire (SHN). En effet, une plasticité morphofonctionnelle des neurones à ocytocine et des cellules gliales des noyaux hypothalamiques supraoptiques (NSO) et paraventriculaires est associée à une plasticité induite par des modifications morphologiques et fonctionnelles des cellules nerveuses qui correspondent à des modifications biochimiques dont une variation d'expression de la F3/Contactine.

La glycoprotéine F3/Contactine est une molécule d'adhérence cellulaire (CAM) GPI-link de la superfamille de Immunoglobulines (Ig) impliquée dans de très nombreuses interactions moléculaires. Elle est fortement exprimée lors du développement du système nerveux ¹ et le reste dans de nombreuses structures cérébrales à l'état adulte ². Cette molécule peut intervenir lors de la poussée neuritique, la fasciculation axonique et l'adhésion cellulaire à travers des interactions complexes avec des composants de la surface cellulaire et/ou des composants de la matrice extracellulaire.

F3/Contactine est fortement exprimée dans le SHN, elle est présente à la surface des axones et au niveau des terminaisons de neurones magnocellulaires. Dans ces neurones, elle est co-localisée dans les granules de neurosécrétion avec les neuropeptides ocytocine et vasopressine ³. Lors de stimulations physiologiques telles que la déshydratation ou la lactation connues pour induire la plasticité dans le SHN, l'expression de F3/Contactine fluctue. ARNm et protéine augmentent dans les noyaux supra-optiques lors de la stimulation alors que la quantité de protéine diminue dans les terminaisons des neurones magnocellulaires au niveau de la neurohypophyse (NH) ^{3,4}. L'ensemble de ces résultats suggèrerait que F3/Contactine pourrait être impliquée dans les mécanismes de plasticité du SHN.

Au cours de ma thèse, j'ai mis en évidence un polymorphisme important de régions non codantes de l'ARNm de F3/Contactine. Ce polymorphisme concerne aussi bien la région 3'UTR que la région 5'UTR.

Suite à un 3'RACE, j'ai décrit deux 3'UTR dans le SHN : une similaire à celle décrite chez la souris et une autre correspondant à une forme plus courte. Les deux 3'UTR possèdent chacune

un site canonique de poly-adénylation. Plusieurs 5'RACE m'ont permis de montrer que l'ARNm de F3/Contactine possède différentes 5'UTR et ces résultats étaient, sur ce point, comparables à ceux décrits chez la souris ⁵. Ces différentes 5'UTR résultent de l'utilisation de promoteurs alternatifs et de différents sites d'initiation de la transcription. La diversité est également générée par des mécanismes d'épissage qui diffèrent considérablement entre rat et souris. L'originalité du modèle rat réside dans le fait que les exons proximaux A ou C sont mutuellement exclusifs et que les épissages impliquent les exons Addin-1 et Addin-2 qui ne sont jamais des exons proximaux.

Au total, chez le rat, j'ai cloné seize 5'UTR et deux 3'UTR mais le nombre de combinaisons est théoriquement supérieur. Par ailleurs, je n'ai pas cloné chez le rat des exons décrits chez la souris (exons 0 et B) ni le site d'épissage interne à l'exon C (Fig. 2) ⁶.

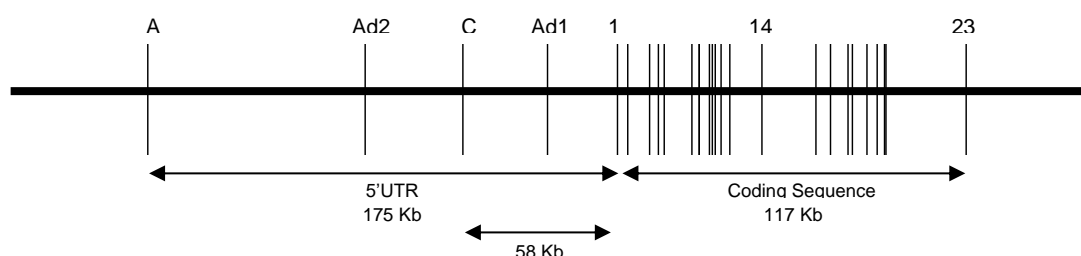


FIGURE 2 : Structure génomique du gène de F3/contactine de rat D'après (6).

On peut voir la représentation de l'organisation exon-intron du gène F3/contactine du rat. Chaque ligne verticale représente un exon. Seuls sont nommés les exons 5'UTR (exons A et C) et les exons additionnels (Ad1 et Ad2), le premier exon codant (exon 1), le milieu (exon 14) et le dernier exon codant (exon 23). Les tailles de la région génomique 5'UTR et de la région génomique codante sont indiquées.

J'ai étudié l'efficacité biologique des différents 5'UTR en mesurant la transcription et la traduction dans des lysats cellulaires et par transformation transitoire des lignées cellulaires. J'ai également recherché la présence d'élément fonctionnel de type IRES, par clonage dans un vecteur bi-cistronique. De plus, j'ai ainsi mis en évidence une expression différentielle des différents ARNm en relation avec différents états physiologiques des rongeurs. En effet, les exons A et C sont exprimés dans la NH des mâles adultes et des femelles gestantes et déshydratées, mais pas dans la NH de femelles vierges où seul l'exon A est exprimé.

Enfin, j'ai démontré l'expression de F3/Contactine dans des cellules gliales de la neurohypophyse par une technique originale de RT-PCR multiplex sur cellule unique fraîchement isolée. En effet, lors des expériences de RT-PCR et de RACE qui m'ont permis d'obtenir les résultats précédents, j'ai mis en évidence une expression de l'ARNm de F3/Contactine dans la neurohypophyse de rat adulte. Or, jusqu'alors, l'ARNm de cette molécule n'avait pas été détecté

dans cette structure par hybridation *in situ*. Par contre, la protéine avait été détectée sur les membranes pituicytaires³. Puisque F3/Contactine était décrite comme une molécule neuronale et que son ARNm n'était pas détecté dans la NH, la protéine détectée était considérée comme une forme soluble adressée à la NH par l'axone des neurones magnocellulaires, libérée et retenue sur la membrane pituicytaire par interaction avec l'un de ses ligands.

De façon à déterminer la localisation cellulaire de l'ARNm de F3/Contactine dans la NH, j'ai entrepris de l'amplifier à partir de cellules isolées de la NH. Après avoir dissocié et « récolté » les cellules, une série de RT-PCR est effectuée sur chacune d'elle afin de déterminer si elle exprime l'ARNm de F3/Contactine ainsi que son type cellulaire (cellule gliale ou non). Pour réduire au minimum le risque de modifications phénotypiques des cellules, le temps entre la dissociation et la « récolte » était réduit à 20 mn au minimum et 1 heure au maximum. Cette latence pourrait être critique dans le cas de l'expression de gènes précoces mais ces 20 mn apparaissent absolument nécessaires pour permettre aux cellules d'adhérer au fond de la boîte. Grâce à l'adhésion des cellules, le milieu de culture peut être remplacé, ce qui a permis d'éviter l'amplification des ARNm en solution issus des cellules lysées. J'ai ainsi pu déterminer qu'une partie, au moins, de l'ARNm de F3/Contactine exprimé dans la NH était d'origine pituicytaire (Fig. 3).

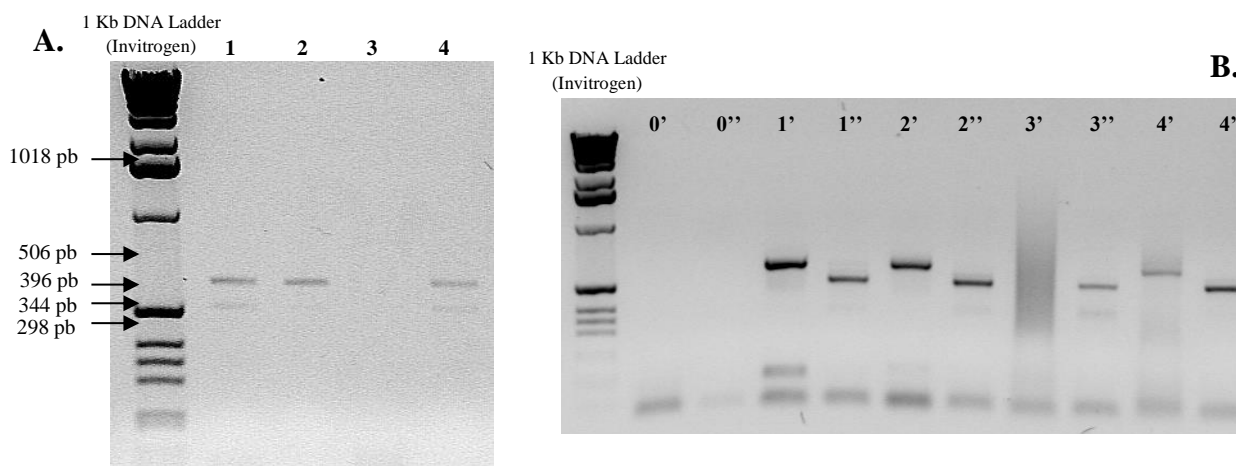


FIGURE 3 : Recherche de l'expression des ARNm de GFAP et de F3/Contactine dans des cellules isolées de neurohypophyse

A. Analyse sur gel d'agarose 2 % des échantillons issus de la première amplification (RT-PCR One-Step Multiplex ; F3/Contactine (628 pb) et GFAP (530 pb) ; Couloirs 1, 2, 3 et 4 : Expression des ARNm de GFAP et de F3/Contactine dans une cellule isolée à partir de NH de rate adulte témoin

B. Analyse sur gel d'agarose 2 % des échantillons précédents amplifiés par Nested-PCR ; Couloirs 0', 1', 2', 3' et 4' : Expression de F3/Contactine, 0' correspondant à la réamplification du milieu de prélèvement des cellules ; Couloirs 0'', 1'', 2'', 3'' et 4'' : Expression de GFAP, 0'' correspondant à la réamplification du milieu de prélèvement des cellules

Publications

Rome, C., V. Rouillot & F. Couillaud (2005) Polymorphism of the untranslated regions of the F3/contactin mRNA in the rat nervous system. *Brain Res Mol Brain Res*, 139, 184-91

II. ÉTUDE DU POLYMORPHISME DES ARNm DANS LES TUMEURS CÉRÉBRALES HUMAINES

Suite à ces résultats, j'ai pu étendre mon hypothèse fonctionnelle du rôle du polymorphisme des ARNm à un modèle physio-pathologique. J'ai alors choisi d'étudier l'ARNm de la F3/Contactine dans les tumeurs cérébrales humaines⁷. En effet, la présence de la Ténascine C et du Phosphacan (molécules partenaires de F3/Contactine) dans la matrice cellulaire péritumorale des gliomes renforçait l'hypothèse de la présence de F3/Contactine dans les gliomes. Dans un premier temps, grâce à une collaboration avec le Pr. Hugues Loiseau (CHU Hôpital Pellegrin, Bordeaux) et Josette Arsaut (Inserm U-394) qui ont mis à ma disposition une collection d'ARN totaux de tumeurs cérébrales humaines, j'ai démontré l'expression de la F3/Contactine dans les tumeurs cérébrales humaines par immunohistochimie, Western blot et RT-PCR puis décrit un polymorphisme des régions 5'UTR de l'ARNm par RACE et RT-PCR (Fig. 4). En outre, j'ai identifié un élément répétitif de type *Alu* qui s'insère par épissage au sein de la région 5'UTR.

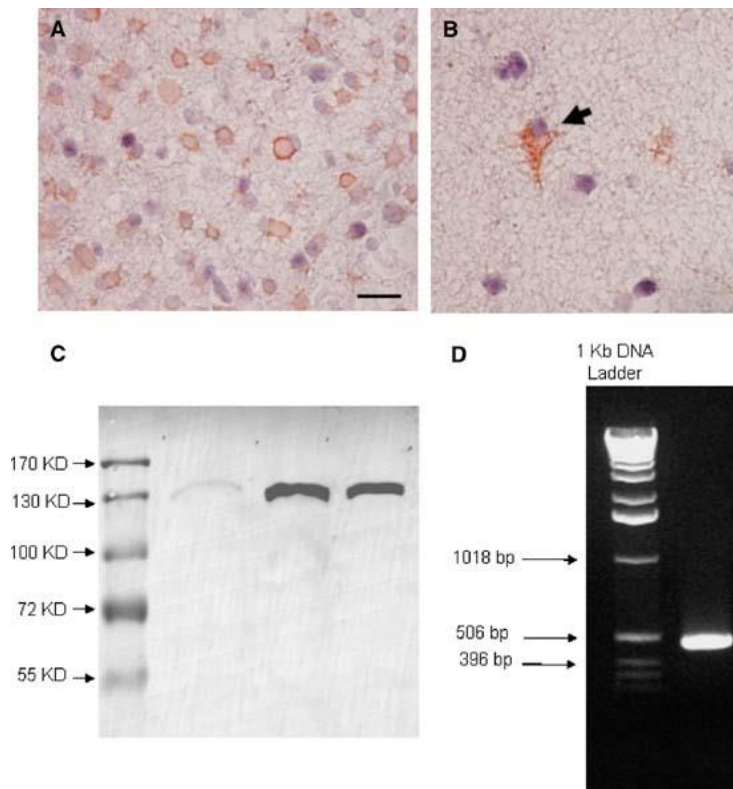


FIGURE 4 : Expression de la Contactine-1 dans les tumeurs humaines gliales

(A et B) Double marquage permettant la mise en évidence d'une co-localisation de la Contactine-1 (bleu) et de GFAP (rouge-brun) Echelle = 25 μ m. (C) Détection par Western blot de la Contactine-1 dans les gliomes (135 KD). (D) Mise en évidence par RT-PCR sur des ARNm de gliome de l'expression de la Contactine-1

Une étude, par qPCR, m'a permis de démontrer une expression différentielle des 5'UTR de cet ARNm entre les glioblastomes et les méningiomes. J'ai comparé l'efficacité transcriptionnelle/traductionnelle des différents 5'UTR et mis en évidence plusieurs modalités de traduction de l'ARNm de la Contactine humaine. Enfin, dans le modèle tumoral U87-MG, j'ai mis en évidence un nouvel exon proximal spécifiquement humain dont l'expression est exclusivement tumorale. Pour caractériser ce promoteur tumoral, j'ai été amené à concevoir une

technique originale de mise en évidence qui fait appel à des techniques d'imagerie de bioluminescence *in vivo*. Cette étude m'a permis d'entrer dans le monde de l'imagerie *in vivo* pour visualiser les modifications moléculaires liées à une pathologie.

De plus, ces études en thèse m'ont permis de mettre en place des collaborations avec le Prof. Hugues Loiseau du CHU de Bordeaux que j'ai pu maintenir lors de mon post-doctorat. Cette interaction m'a permise continuer à développer des projets fondamentaux liés à la physiologie des tumeurs cérébrales, plus particulièrement les gliomes, en parallèle de projets à visée thérapeutique anti-cancéreux.

Publications

Rome, C., H. Loiseau, J. Arsaut, V. Roullot & F. Couillaud (2006) Diversity of contactin mRNA in human brain tumors. *Mol Carcinog*, 45, 774-85.

III. PHYSIOLOGIE DES CANCERS CEREBRAUX

Les gliomes malins constituent l'un des cancers les plus agressifs chez les humains avec une médiane de survie entre 12 et 15 mois. La malignité de ces tumeurs est essentiellement soutenue par une diffusion locale dans le parenchyme cérébral environnant. Ainsi, la diffusion leptoméningée a lieu dans moins de 10 % des cas et des métastases systémiques sont tout à fait exceptionnelles. Compte tenu de ces caractéristiques cliniques, nous pouvions supposer que les systèmes biologiques soutenant ce comportement invasif particulier étaient très différents dans les gliomes par rapport à d'autres cancers.

Parmi les nombreux systèmes pouvant être impliqués, les métallo-protéases de la matrice (MMP) semblaient être largement impliquées dans les propriétés invasives des cancers. Parmi elles, la matrilysine (MMP-7), décrite comme étant d'origine épithéliale, était un candidat potentiel intéressant dans le gliome malin. Elle avait été trouvée dans une grande variété de tumeurs solides et son niveau d'expression avait été corrélé soit avec l'agressivité tumorale ou un mauvais pronostic dans le cancer de l'œsophage, l'adénocarcinome du pancréas et le cancer des cellules squameuses verruqueux et orale. La MMP-7 a été détectée dans les tumeurs cérébrales mais avec une faible expression ⁸.

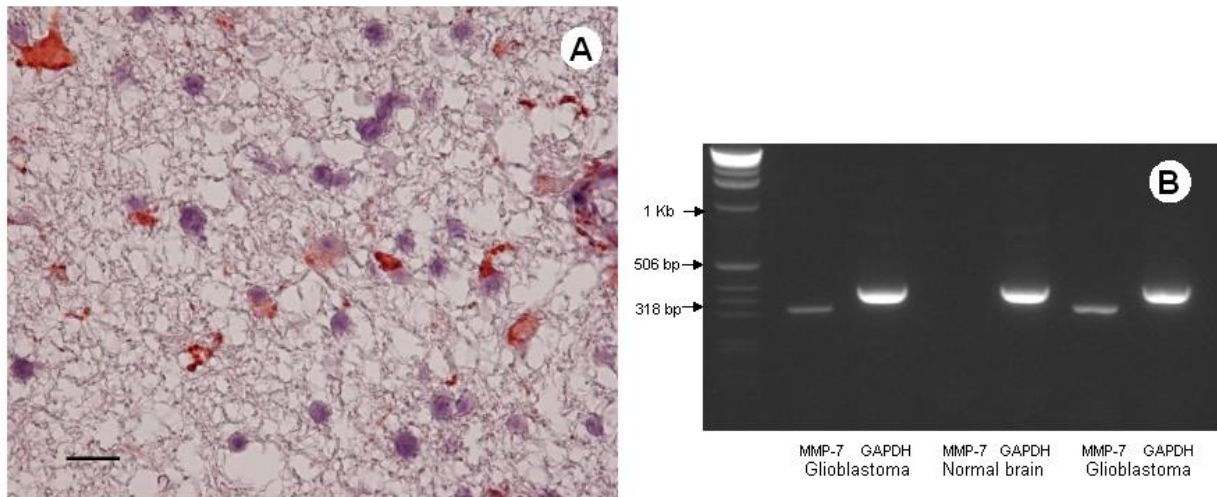


FIGURE 5 : Expression de MMP-7 dans les glioblastomes humains

Double marquage révélant l'expression des protéines MMP-7 (violet) et GFAP (rouge) dans des échantillons de glioblastome humain (Échelle = 25 μ m). (B) Analyse par RT-PCR de l'expression des ARNm de de MMP-7 et GFAP dans des échantillons de glioblastomes ou de tissu cérébral humain.

Lors de l'analyse de l'expression de l'ARNm de MMP-7 dans différentes tumeurs primaires cérébrales, nous avons trouvé des niveaux très variables d'expression qui n'étaient pas liés au caractère invasif des tumeurs. Grâce à des biopsies successives obtenues des mêmes patients atteints de glioblastome, nous avons pu montrer que l'expression de MMP-7 variait mais les variations intra-individuelles étaient plus faibles que les différences interindividuelles (Fig. 6). Dans un modèle de xéngreffe de tumeurs humaines U87 chez des souris immunodéficientes RAG2/gamma(c), nous avons pu montrer l'origine strictement tumorale de MMP-7.

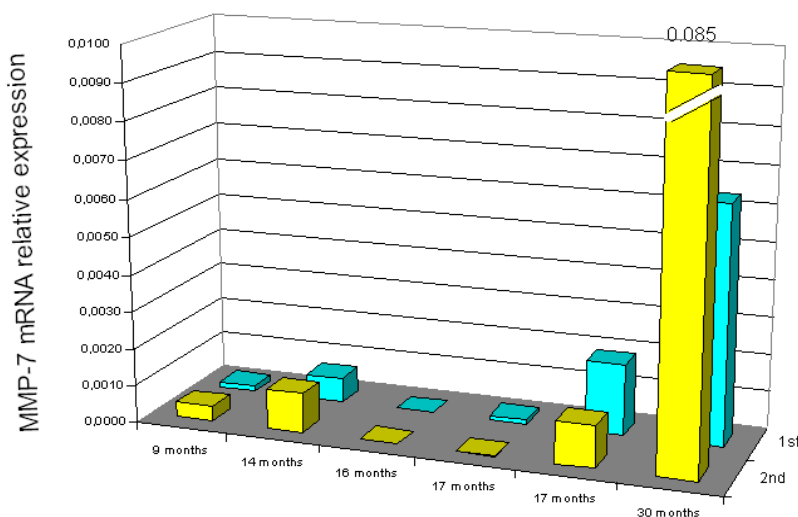


FIGURE 6: Niveau d'expression relatif de l'ARNm de MMP-7 dans deux biopsies successives d'un gliome chez le même patient

L'abscisse représente le délai en mois entre deux biopsies.

De plus, cette expression dépend de l'environnement tumoral puisque l'expression très faible de la MMP-7 dans des U87 en culture est fortement stimulée lorsqu'elles forment des

tumeurs et encore plus lorsqu'elles sont implantées en intracérébral. Ces données fournissent des informations cohérentes sur la diapason survenant entre la tumeur et le stroma environnant pour réguler l'expression de MMP-7 (Fig. 7).

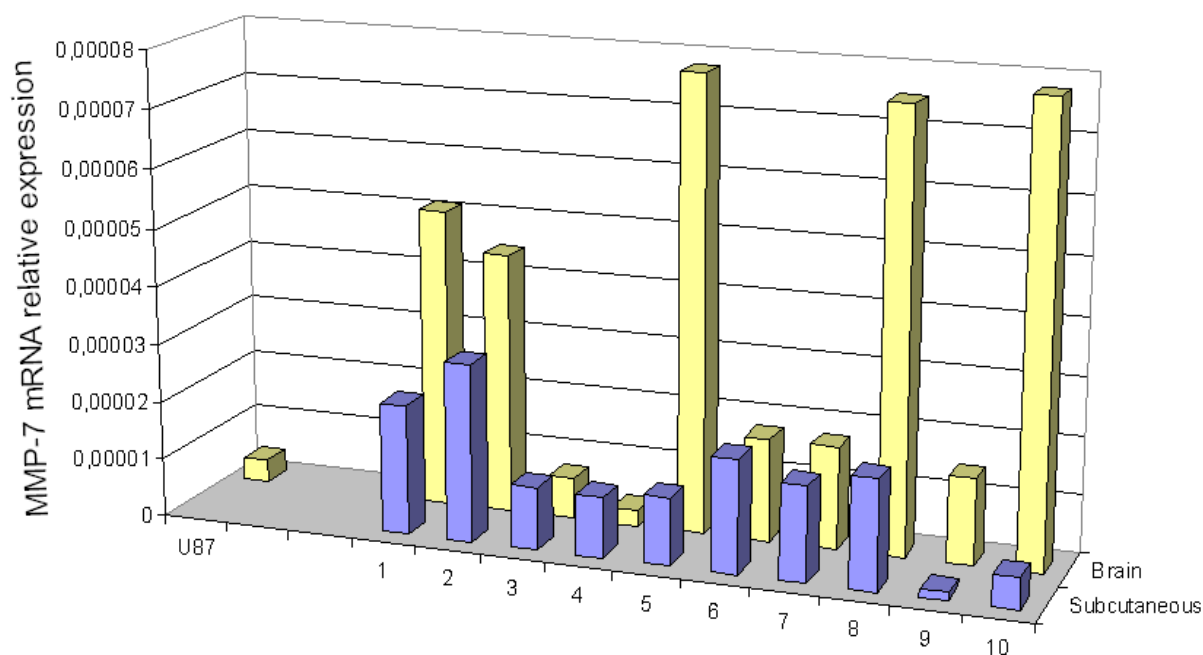


FIGURE 7 : Quantification relative de l'ARNm de MMP-7 dans les tumeurs U87-MG

Evaluation de la quantité relative de l'ARNm de MMP-7 dans des tumeurs induites U87-MG et retirées simultanément des sites intracérébraux et sous-cutanés chez la même souris RAG2/gammaC. Le niveau d'expression de l'ARNm MMP-7 a été déterminé par PCR en temps réel. Les niveaux d'expression de l'ARNm MMP-7 sont exprimés par rapport à la teneur en ARNm GAPDH dans le même échantillon. Chaque valeur représente la valeur moyenne des duplicatas.

Publications

Rome, C., J. Arsaut, C. Taris, F. Couillaud & H. Loiseau (2007) MMP-7 (matrilysin) expression in human brain tumors. *Mol Carcinog*, 46, 446-52.

I. L'UTILISATION DES CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES COUPLEES AU CONTROLE DE L'EXPRESSION GENIQUE PAR HYPERTHERMIE LOCALE, COMME VECTEURS DE THERAPIE GENIQUE

Au cours de mes deux post-doctorats, j'ai développé deux projets axés sur la mise au point d'outils à visée thérapeutique, qui associaient les performances des différentes modalités d'imagerie à la puissance des outils de la biologie moléculaire, de la biologie cellulaire et du génie génétique. Le premier post-doctorat, que j'ai effectué au « Laboratoire d'Imagerie Moléculaire et Fonctionnelle : de la physiologie à la thérapie », m'a permis d'acquérir des compétences en imagerie (optique, IRM, FUS). Le second, au « Laboratory of endocrinology and molecular imaging », m'a permis d'acquérir des compétences dans le domaine de la différenciation cellulaire des cellules souches mésenchymateuses.

L'objectif de ces projets était de montrer la possibilité d'utiliser les cellules souches mésenchymateuses comme vecteur d'adressage d'un gène thérapeutique dont on pourrait contrôler localement l'expression grâce à des ultrasons focalisés contrôlés par IRM.

a) THERAPIE CELLULAIRE SOUS CONTROLE DE L'IMAGERIE MOLECULAIRE

Parmi les défis qui doivent être relevés en thérapie cellulaire, un des plus important est le contrôle spatial et temporel de l'expression du transgène thérapeutique dans le tissu cible. La capacité des ultrasons focalisés à chauffer les tissus, même à l'intérieur du corps, peut être utilisée pour contrôler l'expression transgénique, quand le gène est placé sous contrôle d'un promoteur thermo-sensible. Ce type de promoteurs est répandu dans la nature.

Par exemple, tous les mammifères utilisent ces promoteurs aussi appelées des « Heat Shock Proteins » (HSP) quand ils ont de la fièvre afin de produire des protéines protectrices. L'utilisation des promoteurs de ces protéines afin de contrôler l'expression des gènes thérapeutiques nécessite un contrôle rigoureux de la température dans la région d'intérêt. Les promoteurs *hsp*, et plus particulièrement les promoteurs *hsp70*, ont été utilisés dans des stratégies de thérapie génique car, outre leur activation par la température, ils sont aussi très efficaces. La faisabilité de cette approche a été démontrée *in vitro* et *in vivo* afin de permettre l'expression de gène-suicide par des cellules de lignées de cancer implantées ou par l'expression de gènes rapporteurs dans une lignée de cellules C6⁹⁻²³. Dans ce projet, j'utilisais le promoteur *hsp70B* humain comme déclencheur de l'expression des gènes d'intérêt et donc comme clef de la différenciation cellulaire potentielle contrôlée par hyperthermie.

Cependant, cette approche requière un contrôle précis de la température *in vivo*. De ce point de vue, l'IRM est utilisable pour rapidement créer une carte de température permettant ainsi un

contrôle en « feedback » de la procédure du chauffage^{24,25} (Fig. 8). La surexpression locale d'un gène marqueur dans des cellules modifiées de lignée cellulaire de gliome avait démontré que cette technologie était utilisable^{12,16-19,22}.

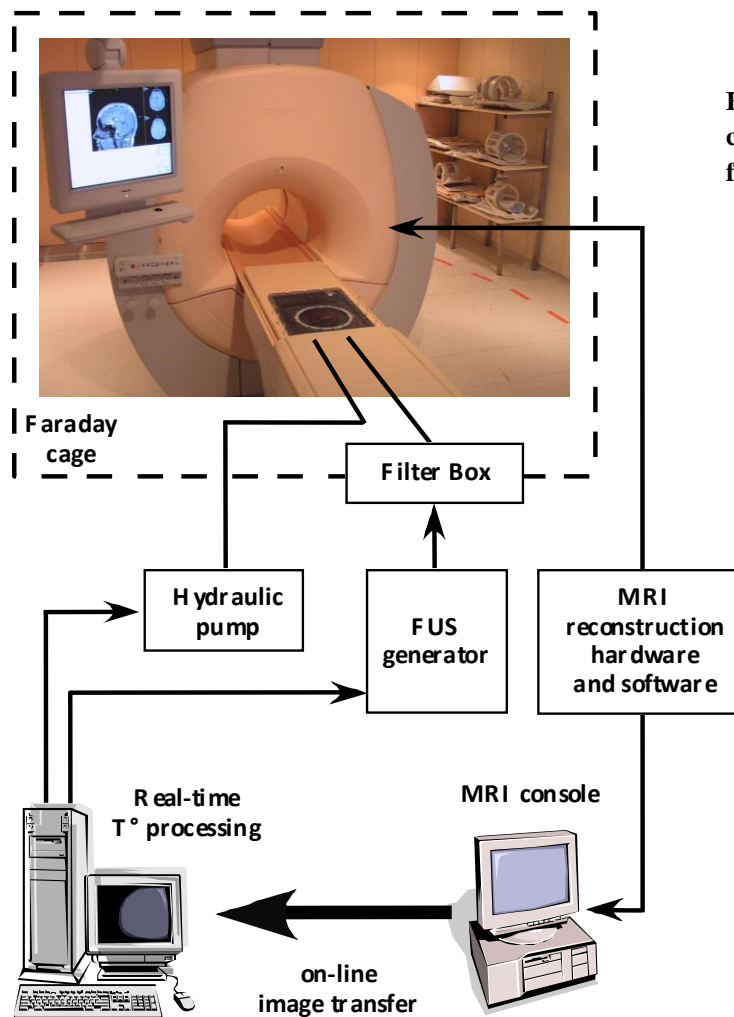


FIGURE 8 : Système *in vivo* de chauffage non invasif par ultrasons focalisés (FUS) contrôlés par IRM

Pour ce travail, j'ai développé de nouveaux vecteurs rétroviraux et obtenu des lignées cellulaires transformées stables qui exprimaient des rapporteurs fluorescents et bioluminescents sous contrôle du promoteur thermosensible humain *hsp70B* et étaient donc sensibles à l'hyperthermie. Ces lignées permettent d'induire des tumeurs solides chez le rat qui sont ensuite chauffées par FUS contrôlés par IRM. L'expression du rapporteur est suivie par imagerie optique *in vivo* et *in vitro*^{12,19,22,23}. Cette lignée a aussi permis de démontrer qu'un vecteur cellulaire pouvait permettre d'obtenir *in vivo* l'expression génique locale et contrôlée d'un transgène et cela guidé par IRM dans un organe tel que le rein²⁶.

Dans cette étude, nous avons pu démontrer qu'il était possible d'imager *in vivo* l'expression d'un gène rapporteur dont l'activation a été contrôlée dans le temps et l'espace grâce à une stratégie

thérapeutique combinant la vectorisation cellulaire d'un transgène et son activation contrôlée par un dépôt local de chaleur. Nos résultats, *in vivo* et *in vitro*, suggéraient que l'expression du transgène était dépendante des paramètres de chauffage, en accord avec la littérature²⁷⁻²⁹. De plus, les aires du rein où l'expression du transgène a pu être observée correspondaient exactement aux aires du rein chauffées (Fig. 9).

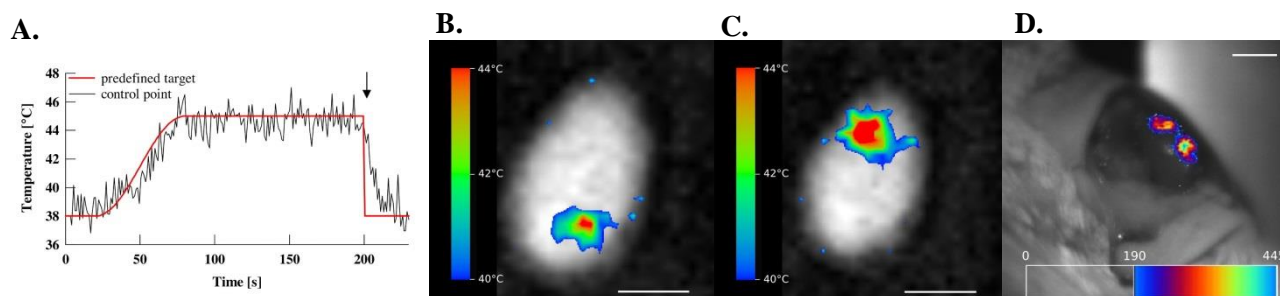


FIGURE 9 : Activation non-invasive par les FUS guidés par IRM d'un gène rapporteur dans le rein.

(A) Évolution de la température au niveau du point focal dans le rein durant un chauffage de 2 min à 45°C. La température mesurée (en noir) suit le profil de température prédéfini (en rouge). La déviation standard de la température était d'environ 1°C. (B) Image d'IRM de température obtenue à la fin du plateau de la procédure de chauffage au niveau d'une coupe du rein centrée sur le premier point focal des FUS (flèche noire sur (A)) (C) Image d'IRM de température obtenue à la fin du plateau de la procédure de chauffage au niveau d'une coupe du rein centrée sur le second point focal des FUS (43°C, 5 min). (D) Imagerie de bioluminescence (pseudo-couleurs) du même rein, 6 heures après les deux procédures d'activation du promoteur *hsp70B* par chauffage par les FUS. Seuil et échelle de couleur indiqués en bas de l'image (photons / s / mm²). Barre d'échelle de (B) et (C) = 10 mm.

Publications

Eker, O.F., B. Quesson, **C. Rome**, J. Arsaut, C. Deminiere, C.T. Moonen, N. Grenier & F. Couillaud (2011) Combination of cell delivery and thermoinducible transcription for in vivo spatiotemporal control of gene expression: a feasibility study. *Radiology*, 258, 496-504.

Rome, C., R. Deckers & C.T. Moonen (2008) The use of ultrasound in transfection and transgene expression. *Handb Exp Pharmacol*, 225-43.

Deckers, R., **C. Rome** & C.T. Moonen (2008) The role of ultrasound and magnetic resonance in local drug delivery. *J Magn Reson Imaging*, 27, 400-9.

Rome, C., F. Couillaud & C.T. Moonen (2007) Gene expression and gene therapy imaging. *Eur Radiol*, 17, 305-19.

Letavernier, B., R. Salomir, Y. Delmas, **C. Rome**, F. Couillaud, D.A., I. Dubus, F. Moreau-Gaudry, C. Grosset, O. Hauger, J. Rosenbaum, N. Grenier, C. Combe, J. Ripoche & C. Moonen. (2007). *Ultrasound-Induced Expression of a Heat Shock Promoter-Driven Transgene Delivered in the Kidney by Genetically Modified Mesenchymal Stem Cells: A Feasibility Study*. Ferenc A. Jolesz and Kullervo H. Hynynen

b) LA THÉRAPIE CELLULAIRE SOUS CONTRÔLE THERMIQUE ?

La connaissance de la biologie des cellules souches et leur vaste potentiel d'applications cliniques est en émergence rapide dans les domaines de la thérapie génique et cellulaire. Les cellules souches mésenchymateuses, de par leurs possibilités à se différencier en un grand nombre de lignées cellulaires, ouvrent des perspectives thérapeutiques importantes, notamment dans le domaine de la reconstitution tissulaire d'organes endommagés ou malades. Cependant, en thérapie génique

comme en thérapie cellulaire, un des défis à relever est celui du contrôle, spatial et temporel, de l'expression du transgène. Le contrôle de l'expression transgénique grâce à un promoteur thermosensible (*hsp70B*) activé par hyperthermie locale non invasive induite par ultrasons focalisés et contrôlée par IRM apporte une perspective des plus prometteuses. La combinaison de toutes ces approches permettrait d'espérer un contrôle suffisant des paramètres d'expression pour que la thérapie cellulaire guidée par imagerie puisse être une solution envisagée en clinique avec un maximum de sécurité pour les patients.

Les cellules souches mésenchymateuses (CSM), considérées comme des cibles potentielles pour la thérapie cellulaire et génétique contre un grand nombre de maladies, sont une population cible prometteuse car capable de se différencier en multiples lignées (chondroblastes, ostéoblastes, adipocytes, fibroblastes, cellules nerveuses, myoblastes)^{30,31} et ont, *in vitro*, une grande capacité à se multiplier. Il y a de nombreuses évidences tendant à montrer que ces cellules pourraient être utilisées comme véhicules en thérapie génique et cellulaire, notamment dans un but de reconstitution tissulaire.

Le but ultime de ce travail était d'utiliser les CSM dans de nombreuses formes de thérapies conduisant à la réparation ou la régénération de tissus ou organes endommagés ou malades. Cette approche, et plus particulièrement l'utilisation de CSM modifiées, est pleine de promesses, notamment dans le traitement des maladies osseuses. Effectivement, la connaissance de certaines chaînes de différenciation cellulaire des CSM permet d'envisager des traitements liés à ce type de maladie³².

Dans ce but, j'ai rejoint le laboratoire d'endocrinologie et d'imagerie moléculaire, dirigé par le Prof. Dr Clemens Lowik, qui porte un intérêt important à ces mécanismes. Mon intérêt s'est alors plus particulièrement porté vers les protéines BMP-7 (bone morphogenic protein 7) et RUNX-2 : deux protéines essentielles dans la différenciation des CSM en ostéoblastes car elles sont capables, *in vivo*, de déclencher la différenciation cellulaire des CSM en ostéoblastes³³.

BMP-7 est un membre de la super-famille des « Transforming Growth Factor- β » (TFG- β). Cette protéine extracellulaire permet de déclencher la différenciation cellulaire des CSM en ostéoblastes quand elle se fixe sur les récepteurs présents à la surface de ces cellules³⁴. RUNX-2 est un facteur de transcription essentiel pour la différenciation des ostéoblastes provenant des précurseurs mésenchymateux et la formation osseuse^{35,36}. J'ai choisi de plus particulièrement m'intéresser à l'isoforme II, spécifique du tissu osseux³⁷.

Dans un premier temps, les potentialités de différenciation par induction des CSM devaient être étudiées. Dans ce but, une lignée bien caractérisée de précurseurs multipotents mésenchymateux est utilisée: la lignée murine KS483, provenant de la croissance clonale d'une population de cellules

normales de moelle osseuse en culture de souris. Il s'agit d'une lignée ostéoprogénitrice qui a gardé des caractéristiques mésenchymateuses progénitrices. Maintenu dans les conditions appropriées de culture, elle peut se différencier en ostéoblastes, adipocytes et chondrocytes. Cette lignée a été génétiquement modifiée dans le laboratoire d'endocrinologie et d'imagerie moléculaire de Leiden afin d'obtenir une lignée stable et caractérisée contenant un site unique de recombinaison FRT qui permet de conserver les caractéristiques progénitrices de la lignée initiale. Ainsi, les lignées obtenues dans un second temps, suite à une recombinaison homologe utilisant le système Flp/FRT, n'auront comme différence que le gène intégré et pourront être comparés³³. J'ai obtenu les vecteurs FRT contenant les différentes cassettes d'expression *hsp70B*-luciférase, *hsp70B*-*bmp7* et *hsp70B*-*runx2* et j'ai modifié la lignée receveuse avec chacun de ces vecteurs afin de créer des lignées qui de manière à permettre d'induire la différenciation cellulaire par hyperthermie. À l'issue des phases de sélection, seule la lignée KS483- *hsp70B*-luciférase a été obtenue. Cette lignée m'a permis de caractériser le profil d'induction du promoteur *hsp70B* dans cette lignée cellulaire (Fig. 10).

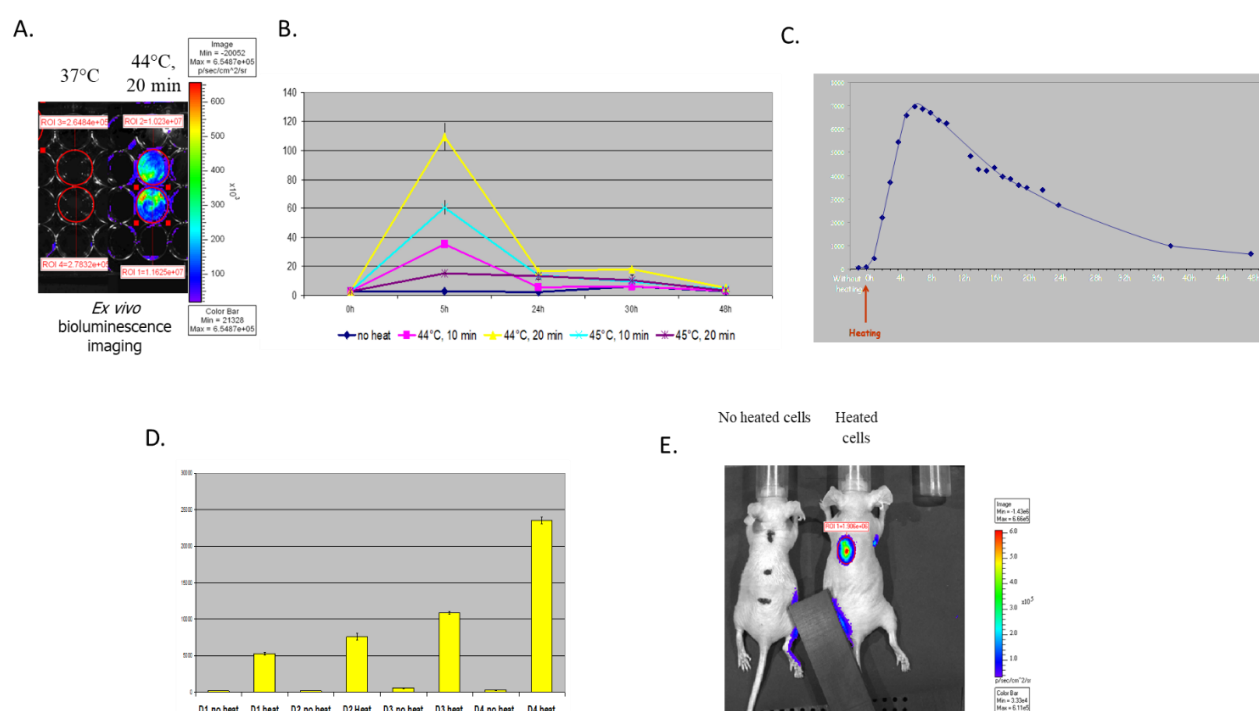


FIGURE 10 : Caractérisation *in vitro* de la lignée cellulaire KS483 génétiquement modifiée pour exprimer la Luciférase sous contrôle du promoteur humain *hsp70B*.

(A) Optimisation *in vitro* des meilleures conditions de chauffage de la lignée KS483-*hsp70B*-Luc. (B) Cinétique d'expression de la Luciférase aux conditions de chauffage optimum (44°C, 20 min) (C) Expression de la Luciférase après plusieurs chocs thermiques : la multi-activation (chocs espacés de 12h) permet d'augmenter l'expression du transgène. (D) Visualisation *in vivo* par imagerie de bioluminescence des cellules KS483-*hsp70B*-Luc avant et après chauffage

II. THERAPIE GENIQUE CIBLEE DES POUMONS PAR *SLEEPING BEAUTY*

Après ces deux post-doctorats, j'ai été recrutée en tant que maître de conférences au sein de l'université Joseph Fourier en septembre 2007. Les projets de recherche que j'ai menés au sein de l'équipe 5 de l'institut Albert Bonniot proposaient d'utiliser l'imagerie optique pour concevoir de nouvelles stratégies thérapeutiques anticancéreuses basées sur la thérapie génique et cellulaire.

Dans un premier temps, j'ai participé activement à une étude permettant de définir l'intérêt et la possible utilisation d'un système de transposon (*Sleeping Beauty* (SB)) associé à un transfectant utilisé *in vivo* (Polyethyleneimine (PEI), un polymère cationique qui interagit avec les charges anioniques de l'ADN, le condense et permet son passage à travers la membrane cellulaire riche en polyanions³⁸) pour modifier les cellules épithéliales pulmonaires dans une but de thérapie génique.

La thérapie génique de réparation a pour objectif d'introduire un gène fonctionnel dans suffisamment de cellules malades pour corriger au moins en partie un phénotype et améliorer la qualité de vie du patient³⁹⁻⁴¹. Le transfert de gènes au niveau des poumons est une approche prometteuse pour le traitement des maladies pulmonaires aussi bien héréditaires qu'acquises. Les systèmes de transfert de gènes, aussi bien viraux que non-viraux, ont besoin d'être améliorés en termes de sécurité et d'efficacité. Plusieurs vecteurs non viraux ont été développés pour le transfert de gènes. En général, les vecteurs synthétiques sont pensés pour contourner les inquiétudes posées par les problèmes d'immunogénicité et de sûreté des vecteurs viraux et pour permettre une administration répétée et donc une production à grande échelle⁴²⁻⁴⁵. Le système de transposon SB a été développé comme le vecteur non-viral, principalement pour la thérapie génique. En effet, ce vecteur combine les avantages des virus et l'ADN nu⁴⁶.

Si les approches non-virales semblent être une alternative plus sûre en thérapie génique, elles ont longtemps été limitées par la faible efficacité d'une intégration à long terme du gène d'intérêt dans le génome cible. Cependant, de récentes études montrent que l'utilisation de transposons⁴⁷, et plus particulièrement de *Sleeping Beauty* (SB), permet d'obtenir des expressions à long terme et à un niveau suffisant du transgène d'intérêt pour observer des effets thérapeutiques bénéfiques⁴⁸⁻⁵¹.

Le système transposon SB a été obtenu à partir des « Tc1-like transposable elements » de saumon. Le système SB est composé de deux éléments : un transposon contenant le gène d'intérêt flanqué de deux séquences répétées et une source de transposase^{49,52,53}. Ce système modifié est le système de transposition le plus efficace à l'heure actuelle dans les cellules de mammifères et il permet l'intégration d'une ou deux copies du transposon dans les cellules exprimant la transposase. Il a été montré que SB permettait l'intégration dans différents types de cellules en culture⁵⁴⁻⁵⁸ mais aussi *in vivo*^{38,49,59}. De plus, des études précliniques dans des modèles de souris ont révélé que le

système de transposition SB avait la capacité de traiter des maladies aussi bien monogéniques qu'acquises⁶⁰⁻⁶⁴.

À noter que le système SB est composé de deux plasmides que l'on co-transfecte. Le premier contient le gène d'intérêt et son promoteur, flanqués de deux séquences inversées répétées qui sont reconnues par la transposase. Seules les séquences d'ADN entourées des « pieds » du transposon seront intégrées grâce à la transposase. Le second plasmide, qui est co-transfecté en même temps, code pour la transposase mais ne possède pas d'éléments permettant son intégration. La transposase est donc exprimée transitoirement, le temps de permettre l'insertion de la cassette portée par l'autre plasmide dans le chromosome de la cellule co-transfectée (Fig. 11). Ceci permet de ne pas générer de réponse immunitaire contre la transposase qui n'est pas une protéine eucaryote.

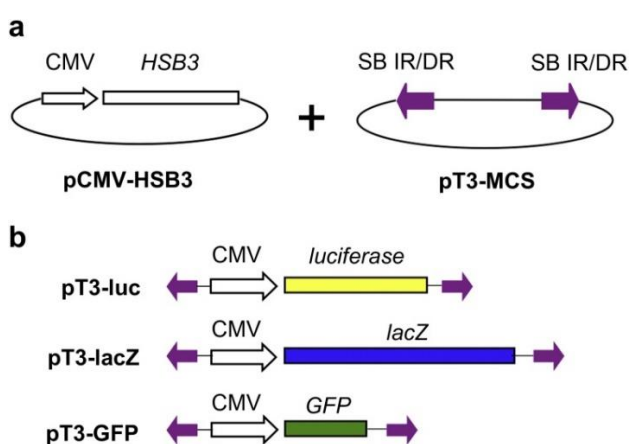


Figure 11: Schéma du système de transposon Sleeping Beauty.

a) Le système de Transposon Sleeping Beauty contient deux plasmides : un permettant l'expression de la transposase (HSB3) de *Sleeping Beauty* (pCMV-HSB3), un autre vecteur (pT3-MCS) contenant un multi-site de clonage entouré par les deux éléments répétés des transposons (inverse et direct : SB IRs/DRs). b) Le vecteur pT3-MCS peut être modifié de manière à porter différentes cassettes d'expression génique

Le problème majeur quant à l'utilisation du système SB, commun à toutes les approches thérapeutiques basées sur l'acheminement d'ADN au noyau de cellules cibles, est que l'ADN doit passer les barrières membranaires de la cellule et du noyau. Mais des méthodes et de nouveaux vecteurs ont été développées pour permettre l'acheminement de l'ADN en études précliniques⁶⁵⁻⁶⁷. Le progrès dans la thérapie génique du poumon exige donc clairement l'identification de systèmes de transfert de gènes sûrs et plus efficaces.

Parmi les vecteurs non viraux actuels, les homopolymères cationiques non-lipidiques ont été rapportés pour promouvoir transfection de gène dans le poumon⁶⁸⁻⁷². Parmi eux, la polyéthylimine (PEI) est notamment utilisée pour complexer de l'ADN⁷³⁻⁷⁵. La PEI est un des vecteurs non viraux les plus puissants pour cibler les poumons⁷⁶⁻⁷⁹. Ainsi, le polyplexe ADN SB/PEI est injecté dans la veine caudale des souris. Ce système permet de délivrer directement et efficacement le transposon au niveau des poumons laissant espérer un fort potentiel thérapeutique de ce système⁷⁹⁻⁸¹.

Il avait été montré qu'un ADN plasmidique intégrant le système SB-transposon induisait une expression d'un transgène à long terme dans les poumons de souris. Nous avons suivi l'expression

d'un gène rapporteur, la Luciférase, transfecté par du PEI/SB dans les poumons de souris et cela en utilisant l'imagerie non invasive de bioluminescence (Fig. 12)⁸².

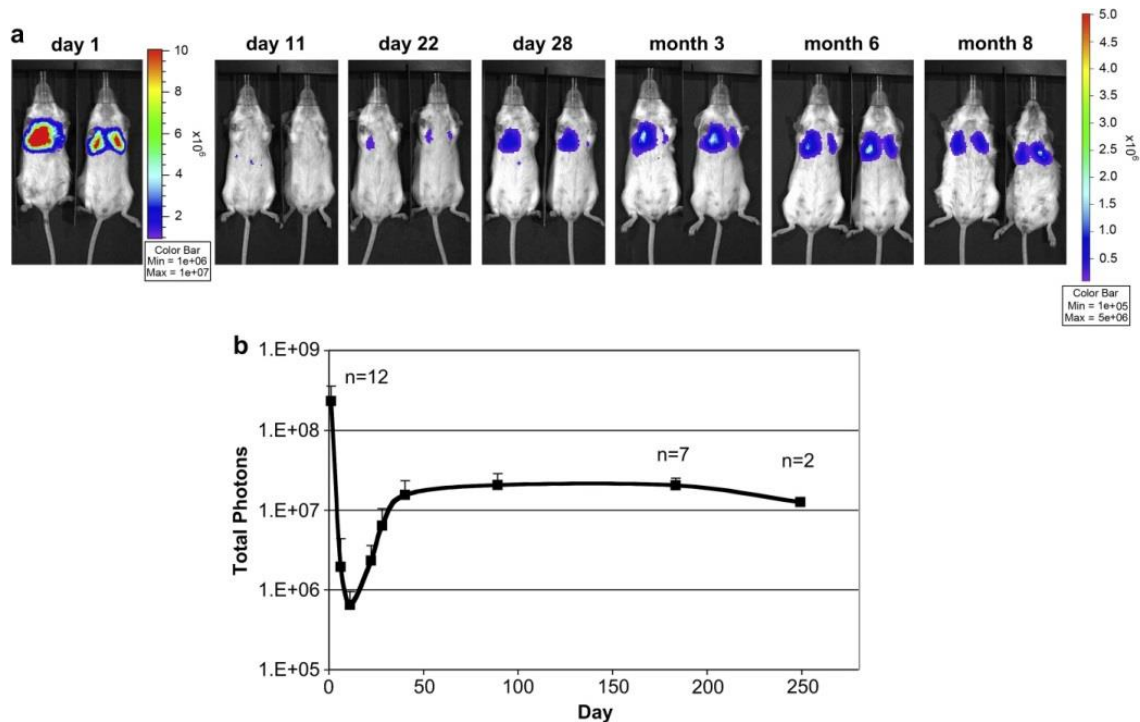


FIGURE 12 : Mise en évidence par imagerie de bioluminescence de l'expression stable du gène de la *luciferase* transfecté *in vivo* avec du PEI en présence du système de transposase *Sleeping Beauty*

Exemple du suivi de l'expression du transgène chez deux souris : (a), les intensités quantitatives moyennes de bioluminescence (qBi) mesurées à différents points temporels sont indiquées (b). Les barres d'erreur indiquent l'écart-type.

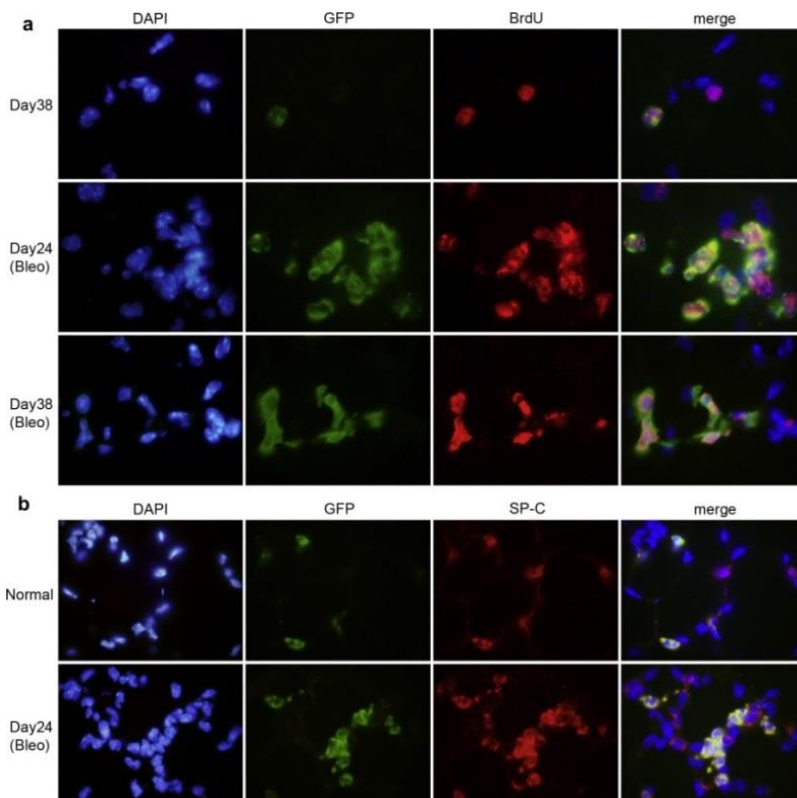


FIGURE 13 : Mise en évidence de la prolifération de cellules marquées grâce au complexe PEI/SP avec et sans lésion induite par la bléomycine.

Les poumons des souris transfectées avec le complexe PEI/SP-GFP ont été prélevés à différents temps post-transfection puis analysés en immunofluorescence. Les cellules ont été marquées avec du BrDU (A) ou SP-C (b).

Les souris sont soit non traitées (Day 38) soit traitées avec de la bléomycine par instillation 10 jours après la transfection *in vivo* et euthanasiées à Day 24 (Bleo) ou Day 38 (Bleo) après l'induction de la lésion. Magnification 1000×

Nous avons ainsi décrit une stabilisation de l'expression du transgène au niveau des poumons dans une petite population de cellules progénitrices alvéolaires. La technique fournit une plateforme prometteuse pour de futures recherches en biologie poumon distal et la thérapie régénératrice des tissus (Fig. 13).

Publications

Lin, E.H., M. Keramidas, **C. Rome**, W.T. Chiu, C.W. Wu, J.L. Coll & W.P. Deng (2011) Lifelong reporter gene imaging in the lungs of mice following polyethyleneimine-mediated sleeping-beauty transposon delivery. *Biomaterials*, 32, 1978-85

I. CARACTERISATION PHARMACOLOGIQUE DES NEURONES DU GANGLION SPIRAL CHEZ LE RAT

Au sein du Laboratoire de biologie cellulaire et moléculaire de l'audition, EMI 99-27, sous la direction du Dr D. Dulon, mon activité de recherche était axée autour des neurones bipolaires du ganglion spiral cochléaire chez le rat et la caractérisation pharmacologique de la régulation de ces neurones par un système efférent. Pour cela, des mesures de variations de calcium intracellulaire par spectrofluométrie à Indo-1 m'ont permis de montrer l'existence de récepteurs cholinergiques muscariniques fonctionnels dans les neurones fraîchement isolés du ganglion spiral cochléaire de rat et de les caractériser. De plus, grâce à une étude parallèle utilisant les mêmes outils, j'ai démontré, au niveau des neurones du ganglion spiral chez le rat, l'expression et la fonctionnalité des trois types de récepteurs à la substance P : NKR1, NKR2 et NKR3.

Publications

- Ito, K., C. Rome, Y. Bouleau & D. Dulon (2002) Substance P mobilizes intracellular calcium and activates a nonselective cation conductance in rat spiral ganglion neurons. *Eur J Neurosci*, 16, 2095-102.
- Rome, C., D. Luo & D. Dulon (1999) Muscarinic receptor-mediated calcium signaling in spiral ganglion neurons of the mammalian cochlea. *Brain Res*, 846, 196-203.

II. COLLABORATION DEVELOPEE EN PARALLELE DE MES RECHERCHES PROPRES : POLYMORPHISME DE L'ARNM DE PCNA CHEZ LE BLE

La réplication de l'ADN durant la division cellulaire est un phénomène complexe qui fait intervenir de nombreux facteurs protéiques. Bien décrite chez les procaryotes et les mammifères, la réplication du génome chez les plantes est assez peu étudiée. Lors de l'étude du complexe de réplication de l'ADN dans les cellules végétales, Magali Toueille et Michel Castroviejo se sont intéressés à PCNA, une protéine du complexe répliatif qui agit au niveau de la fourche de réplication. Lors de cette étude, ils ont détecté la présence de deux protéines PCNA de taille différente (31 KD et 37 KD). Cependant, étant donné la difficulté d'obtenir suffisamment de PCNA purs, les deux protéines n'ont pas pu être comparées par spectrométrie de masse. Dans le cadre d'une collaboration, nous avons décidé d'appréhender ce problème par l'étude des ARNm de PCNA.

A partir des alignements des séquences protéiques des PCNA du riz et du maïs, nous avons défini les domaines conservés de la protéine. A l'aide d'amorces dégénérées situées au niveau des domaines conservés, établies à partir des séquences nucléotidiques des PCNA de riz et de maïs, nous avons obtenu deux types de sondes homologues de PCNA de blé.

Nous avons ensuite entrepris une approche par 3'RACE afin de connaître les régions 3' des ARNm de PCNA. A l'issue de cette 3'RACE, nous avons obtenu l'extrémité 3' des ARNm de PCNA1 et PCNA2. Les mutations mises en évidence entraînent six modifications ponctuelles de

la séquence primaire de la protéine. PCNA2 présente également une délétion de 21 nucléotides au niveau de la séquence codante (pos 284-305) par rapport à PCNA1 qui est à l'origine d'une délétion de 7 acides aminés dans la séquence protéique. Enfin, les régions 3'UTR sont différentes. Le 3'UTR de PCNA2 contient, en plus de PCNA1, une séquence répétée de 185 nt environ 30 nt après le codon stop et une séquence additionnelle d'environ 50 nt en amont du poly-A. Ces deux ARN sont probablement issus de deux gènes différents. Nous avons cloné l'intégralité de la séquence codante et le 3'UTR de PCNA1 et obtenu l'expression d'une protéine étiquetée (6His-Tag) dans *E. coli*.

La délétion de sept acides aminés mise en évidence dans PCNA2 ne permet pas de différencier PCNA1 et PCNA2 en Western Blot. PCNA1 et PCNA2 co-migrent probablement au sein de la bande de 31 KD. L'ARNm correspondant à la bande de 37 KD reste donc à identifier.

Publications

Touelle, M., Saint-Jean, B., **Rome, C.**, Couillaud, F., Castroviejo, M. and Benedetto, J.-P. (2002). Two distinct proliferating cell nuclear antigens are present in the wheat cell. *Plant Physiol. Biochem.* **40** (9), 743-748.

III. COLLABORATIONS DEVELOPPEES EN PARALLELE DE MES RECHERCHES PROPRES POST-RECRUTEMENT

Enfin, grâce à mes compétences en imagerie, en biologie moléculaire et en développement de modèles animaux en cancérologie, j'ai pu mettre en place des collaborations aussi bien au sein de l'institut Albert Bonniot que dans des équipes d'autres instituts (notamment l'institut des Neurosciences de Grenoble). Ces collaborations m'ont permis de travailler sur des sujets tels que les lymphomes, les thérapies épigénétiques (Anouk Emadali, équipe dirigée par Dr Callanan), les tumeurs cérébrales (Nicolas Coquery, équipe dirigée par Dr. Barbier ;) ou les Cerebral Cavernous Malformation (Eva Faurobert, équipe dirigée par Dr Albiges-Rizo). De plus, en intégrant l'équipe d'Emmanuel Barbier, j'ai participé à des projets en lien avec les radio-thérapies anti-cancéreuses en m'intégrant dans une collaboration entre l'équipe et une équipe de l'ESRF (Raphael Serduc et Audrey Bouchet, équipe dirigée par le Prof. François Estève). Ces collaborations, à la fois intéressantes intellectuellement et personnellement, m'ont permis d'être associée aux publications découlant de ces travaux.

Publications

- Potez, M., A. Bouchet, M. Flaender, **C. Rome**, N. Collomb, M. Grotzer, M. Krisch, V. Djonov, J. Balosso, E. Brun, J.A.Laissue & R.Serduc R (2020). Synchrotron X-ray boost delivered by Microbeam Radiation Therapy after conventional X-ray therapy fractionated in time improves F98 glioma control. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* S0360-3016(20)30222-4

- Piazza, I., A. Cupane, E.L. Barbier, **Rome C.**, N. Collomb, J. Ollivier, M.A. Gonzalez & F. Natali (2018). Dynamical properties of water in living cells. *Frontiers of Physics* 13, 138301.

-
- Bouchet, A., M. Potez, **C. Rome**, N. Coquery, B. Lemasson, E. Brauer-Krisch, C. Remy, J.A. Laissue, E.L. Barbier, V. Djonov, and R. Serduc (2017). Permeability of brain tumor vessels induced by uniform or spatially micro-fractionated synchrotron radiation therapies. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*
- Frachet, V., M. Keramidas, A. Nurisso, S. DeBonis., **C. Rome**, A. Boumendjel, D. Skoufias & X. Ronot. (2015) IPP51, a chalcone acting as a microtubule inhibitor with in vivo antitumor activity against bladder carcinoma. *Oncotarget Journal*, 6, no 16, 14669-86.
- Emadali, A., S. Rousseaux, J. Bruder-Costa, **C. Rome**, S. Duley, S. Hamaidia, P. Betton, A. Debernardi, D. Leroux, B. Bernay, S. Kieffer-Jaquinod, F. Combes, E. Ferri, C. E. McKenna, C. Petosa, C. Bruley, J. Garin, M. Ferro, R. Gressin, M. B. Callanan & S. Khochbin (2013) Identification of a Novel Bet Bromodomain Inhibitor-Sensitive, Gene Regulatory Circuit That Controls Rituximab Response and Tumour Growth in Aggressive Lymphoid Cancers. *EMBO Mol Med*, 5, no. 8: 1180-95.
- Faurobert, E., **C. Rome**, J. Lisowska, S. Manet-Dupe, G. Boulday, M. Malbouyres, M. Balland, A. P. Bouin, M. Keramidas, D. Bouvard, J. L. Coll, F. Ruggiero, E. Tournier-Lasserre & C. Albiges-Rizo (2013) Ccm1-Icap-1 Complex Controls Beta1 Integrin-Dependent Endothelial Contractility and Fibronectin Remodeling. *J Cell Biol*, 202, no. 3: 545-61.
- Bouchet, A., B. Lemasson, T. Christen, M. Potez, **C. Rome**, N. Coquery, C. Le Clec'h, A. Moisan, E. Brauer-Krisch, G. Leduc, C. Remy, J. A. Laissue, E. L. Barbier, E. Brun & R. Serduc (2013) Synchrotron Microbeam Radiation Therapy Induces Hypoxia in Intracerebral Gliosarcoma but Not in the Normal Brain. *Radiother Oncol*, 108, no. 1: 143-8.
- Coquery, N., N. Pannetier, R. Farion, A. Herbette, L. Azurmendi, D. Clarencon, S. Bauge, V. Josserand, **C. Rome**, J.L. Coll, J.S. Sun, E.L. Barbier, M. Dutreix & C. Remy (2012) Distribution and radiosensitizing effect of cholesterol-coupled Dbait molecule in rat model of glioblastoma. *PLoS One*, 7, e40567.
- Nascimento, F.D., L. Sancey, A. Pereira, **C. Rome**, V. Oliveira, E.B. Oliveira, H.B. Nader, T. Yamane, I. Kerkis, I.L. Tersariol, J.L. Coll & M.A. Hayashi (2012) The natural cell-penetrating peptide crotamine targets tumor tissue in vivo and triggers a lethal calcium-dependent pathway in cultured cells. *Mol Pharm*, 9, 211-21.

CHAPITRE 4 : THERAPIE CELLULAIRE ET ANGIOGENESE : EFFET DES CELLULES

SOUCHES MESENCHYMATEUSES SUR LA CROISSANCE ET L'ANGIOGENESE TUMORALE

La connaissance de la biologie des cellules souches et leur vaste potentiel d'applications cliniques est en émergence rapide dans les domaines de la thérapie génique et cellulaire (85). De plus, parmi les différentes sources possibles de cellules, les CSM humaines dérivées de la moelle osseuse offrent l'avantage de ne pas provenir d'une source modifiée ou de tumeur. Les MSC adultes sont des cellules adhérentes, non hématopoïétiques qui résident dans le stroma de la moelle osseuse et régulent la différenciation de cellules souches hématopoïétiques. Ces CSM sont pluripotentes et peuvent se différencier en plusieurs types cellulaires mésodermiques comme les ostéoblastes, les adipocytes, les chondrocytes, les myoblastes et les cellules précurseurs endothéliales^{31,83}. Les CSM pouvant être cultivées *in vitro* tout en gardant leurs capacités de différenciation, elles ont été utilisées pour développer des thérapies pour la régénération de tissus dans des modèles animaux⁸⁴. Dans ce cadre, j'ai choisi de m'intéresser plus particulièrement au potentiel thérapeutique des cellules souches adultes.

Mon projet portait sur les propriétés des cellules souches mésenchymateuses et leur possible utilisation pour mener à bien une thérapie ciblée des cancers. Dans ce cadre, comprendre les multiples fonctions biologiques jouées par les cellules souches mésenchymateuses humaines (CSMh) ainsi que leur développement en tant qu'agents thérapeutiques pour la médecine régénérative ou dans le traitement du cancer était important puisque, en effet, il était établi que les CSMh jouent un rôle central dans la pathogenèse et la progression des tumeurs, mais leur impact sur la croissance tumorale reste controversé⁸⁵.

L'objectif de mon étude était d'évaluer l'activité thérapeutique intrinsèque de ces CSM et mettre en évidence leur capacité à modifier la vascularisation et la croissance tumorale. L'angiogénèse joue un rôle important dans le développement et le maintien des tumeurs. Les cellules souches mésenchymateuses humaines que j'ai utilisées ont été isolées, caractérisées et mises en culture dans l'Unité Mixte de Thérapie Cellulaire et Tissulaire au CHU de Grenoble (Dr MJ Richard). Dans un premier temps, pour évaluer le rôle potentiel des CSM sur l'angiogénèse, nous avons utilisé un modèle physiologique d'angiogénèse *in vivo* basé sur un système d'éponge de cellulose (Cellomeda; Turku, Finland) implantée en sous-cutanée chez la souris. Les CSM ont été injectées dans l'éponge et la néo-angiogénèse due à la présence des CSM a été évaluée grâce à l'imagerie 3D de fluorescence développée sur la plateforme d'imagerie du petit animal de l'IAB (Fig. 14). Nous avons ainsi démontré les activités pro-angiogéniques des CSMh. En effet, l'effet angiogénique *in vivo* des hMSCs est aussi fort que

l'effet du FGF-2 de base. Ce résultat est cohérent avec les données publiées d'un autre modèle angiogénique, mais moins physiologique, d'implantation *in vivo* de Matrigel⁸⁶⁻⁸⁸.

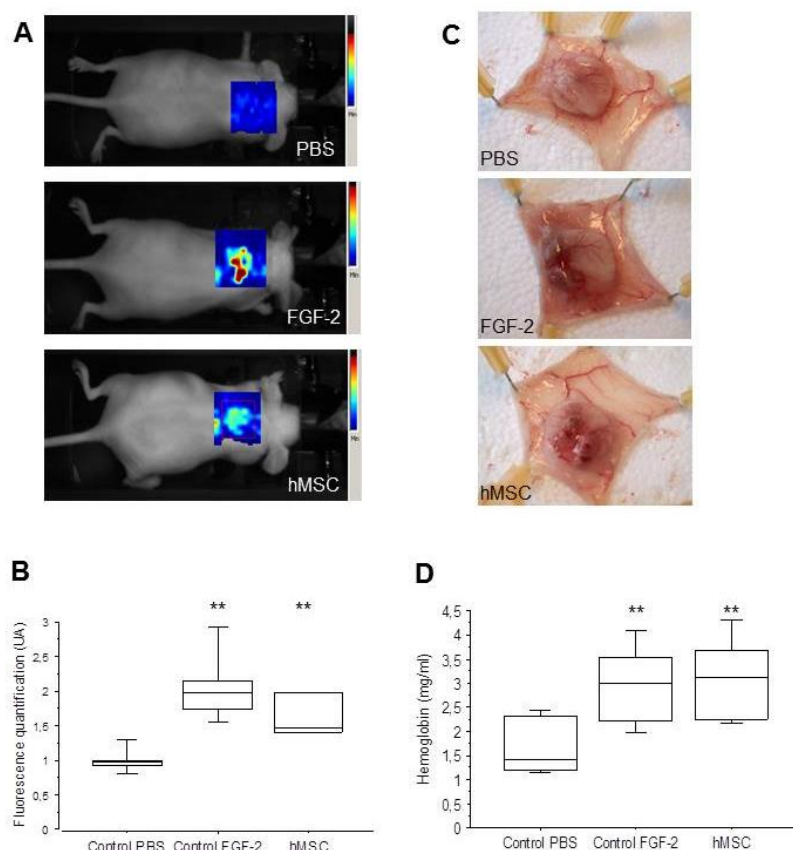


FIGURE 14 : Les hCSM favorisent l'angiogenèse *in vivo* (test dans un modèle d'éponge sous-cutanée).

Souris nude NMRI portant une éponge de cellulose sous-cutanée traitée par PBS (contrôle négatif) ou FGF-2 (200 ng; contrôle positif) ou CSMh (104 cellules) sous la peau dorsale. (A) Images de fluorescence tridimensionnelles représentatives de souris après injection IV de 50 μ M de RAFT-c(-RGDFK)-4 marqué à l'Alexa700. (B) Box plot de l'intensité de fluorescence, enregistrée en photons par pixel pour une région d'intérêt (ROI) spécifiée. Les données sont exprimées en tant que moyenne \pm SD (n = 3 à 6). (C) Les animaux ont été euthanasiés au jour 7 et les éponges ont été photographiées. (D) La quantité d'hémoglobine (Hb) était plus élevée dans les groupes traités par le FGF-2 et le CSMh que dans le groupe traité par le PBS. Les données sont exprimées en tant que moyenne \pm SD de deux expériences (12 souris dans chaque groupe ; **P <0,0007). hMSC, cellules souches mésenchymateuses humaines; IV, intraveineux; PBS, solution saline tamponnée au phosphate; SC, sous-cutané; SD, écart-type.

Cependant, il est intéressant de noter que le traitement des tumeurs avec des CSMh n'a pas été associé à une modification de l'imagerie de fluorescence 3D basée sur le RGD ou à une augmentation de la quantité d'hémoglobine. En effet, j'ai, grâce à l'imagerie optique, pu démontrer que l'administration de CSMh injectées en périphérie de tumeur sous-cutanées ou délivrées par injection intraveineuse systémique chez des souris porteuses de tumeurs sous-cutanées ou de tumeurs pulmonaires était toujours associée à une diminution de la croissance tumorale *via* une inhibition de la prolifération des cellules tumorales, probablement résultant de modifications profondes du réseau vasculaire tumoral (Fig. 15).

En effet, l'étude des vaisseaux sanguins des tumeurs ayant reçu des CSMh montre une diminution de leur nombre et une augmentation de leur taille suggérant une normalisation de la

vascularisation tumorale via une architecture vasculaire plus structurée. Le rôle clé des CSMh dans la régulation de la maturation et de la fonctionnalité des vaisseaux a déjà été décrit^{89,90}. Il est bien connu que les tumeurs présentent un réseau vasculaire anormal, caractérisé par des vaisseaux dilatés, tortueux, de forme irrégulière et hyperperméables, aboutissant finalement à une mauvaise oxygénation de la tumeur⁹¹.

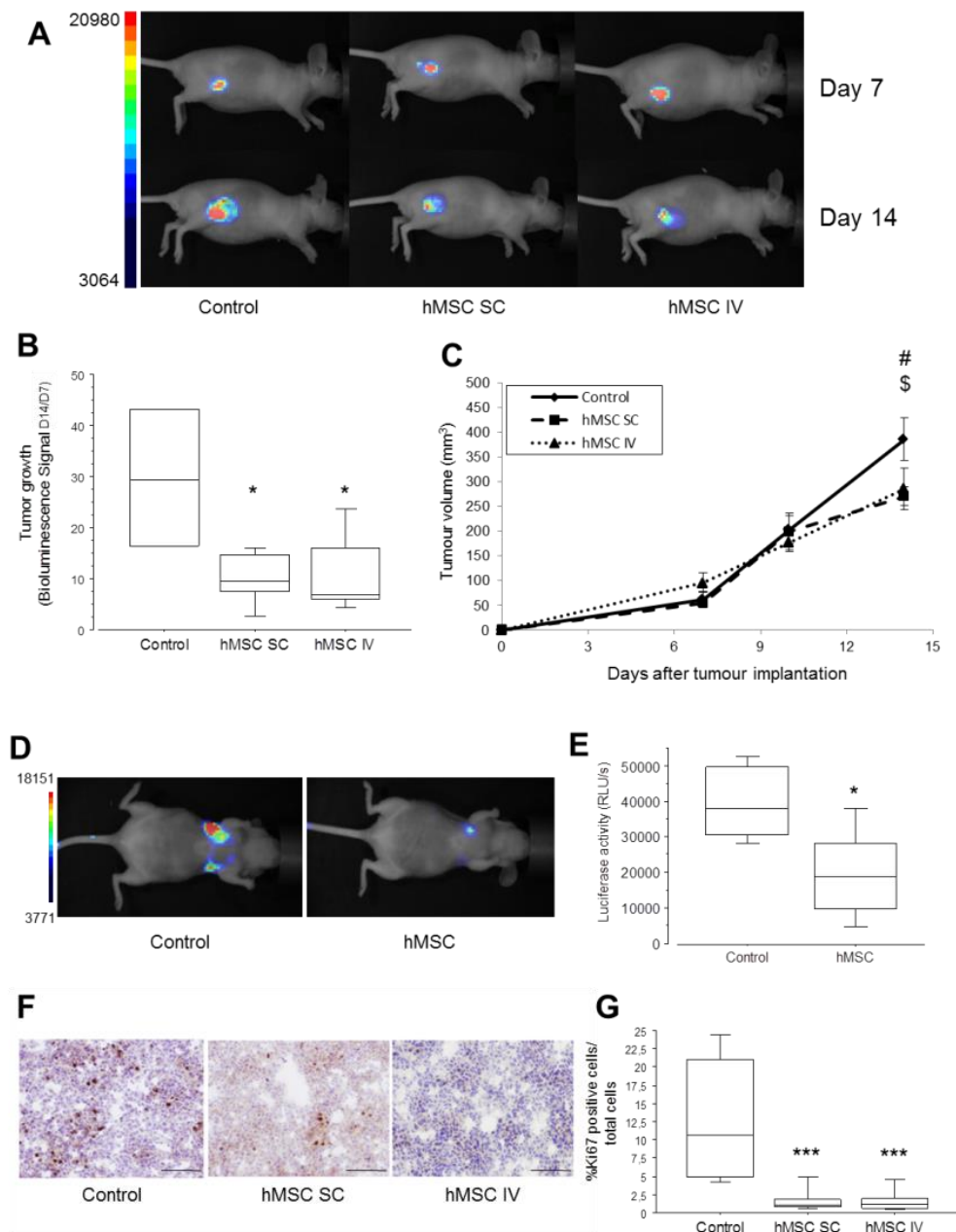


FIGURE 15 : Effet des CSMh (hMSC) sur la croissance tumorale.

A. Images représentatives de bioluminescence corps entier de souris Nude portant des tumeurs sous-cutanées TSA-pGL3 avant le traitement par CSMh (jour 7) et traitées par CSMh (injection SC ou IV ; jour 14) ou PBS (contrôle) (n = 4-5 souris/groupe). **B.** Box plot représentant la croissance tumorale dans chaque groupe. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD. *P < 0.05. **C.** Les volumes des tumeurs des xénogreffes des souris ont été déterminés aux points de temps indiqués. Les hMSC ont été injectées au jour 7. Les données sont exprimées en moyenne \pm SD. # indique P = 0,01 par le test t de Student (Contrôle vs hMSC SC) ; \$ indique P = 0,07 par le test t de Student (Contrôle vs hMSC IV). **D.** Images représentatives de bioluminescence corps entier de souris Nude portant des tumeurs pulmonaires TSA-pGL3 traitées par CSMh (injection IV) PBS (contrôle) (n = 4 souris/groupe). **E.** Box plot des résultats d'imagerie par

bioluminescence obtenus au 10e jour après l'inoculation des cellules tumorales. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD. * $P < 0.05$. F. Photographies de tumeurs SC représentatives, colorées à l'hématoxyline et avec un anticorps Ki67 au jour 14 et visualisées à un grossissement de 200 \times . G. Box plot représentant le nombre des cellules tumorales proliférantes Ki67+. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD (n = 6-9 photos/tumeur ; 5 souris/groupe ; *** $P < 0.0001$).

Nous avons également observé une augmentation des cellules positives à l' α SMA dans les tumeurs après l'injection de CSMh (Fig. 16). Or, il a été démontré que la maturation des péricytes dans les tumeurs contribue à la normalisation vasculaire ⁹². En parallèle de ces données, des preuves cliniques suggèrent que la normalisation vasculaire se produit chez les patients humains recevant des agents antiangiogéniques ⁹³ et qu'il existe une synergie entre la thérapie anti-VEGF et la chimiothérapie systémique ^{94,95}. Il sera intéressant de tester l'injection de hMSCs associée à une chimiothérapie conventionnelle dans notre modèle. Cette approche a été évaluée par Pessina et al ⁹⁶ en utilisant des CSMs comme véhicule pour l'administration de Paclitaxel. Ces auteurs ont observé une inhibition de la prolifération des cellules endothéliales *in vitro* et une diminution des cellules tumorales B16 mais n'ont pas analysé la structure des vaisseaux sanguins de la tumeur.

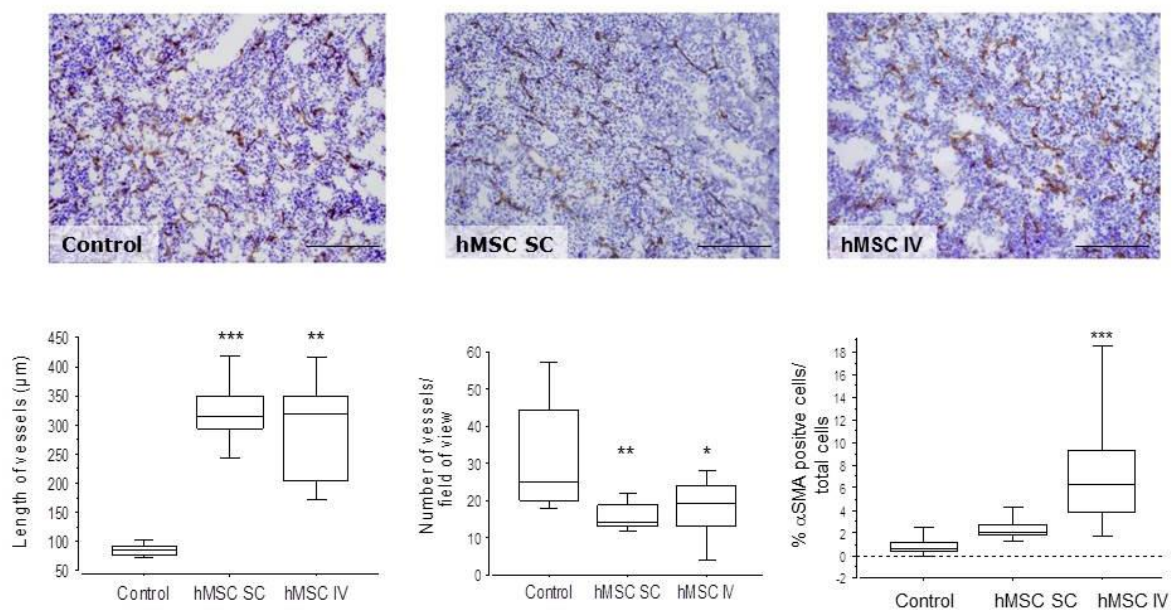


FIGURE 16 : Les cellules souches mésenchymateuses modifient la structure des vaisseaux tumoraux.

(A) Images de vaisseaux dans des tumeurs TSA-pGL3 dans des modèles de xénogreffes tumorales avec et sans injection (SC ou IV) de CSMh après coloration à l'hématoxyline et avec un anticorps CD31 (Obj. 100 \times). Barre d'échelle = 200 μ m. (B et C) Analyses quantitatives de la densité des vaisseaux (B) et de la longueur des vaisseaux (C). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD. (n = 5 souris ; six images/souris ; * $P < 0,05$, ** $P = 0,0016$, *** $P < 0,0001$). (D) Box drop représentant des cellules α SMA⁺ dans la tumeur. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD (n = 2 à 9 photos/tumeur ; deux à cinq souris/groupe ; *** $P < 0,0001$). hMSC, cellule souche mésenchymateuse humaine ; IV, intraveineux ; SC, sous-cutané ; SD, écart-type.

Publications

Keramidas, M., F. de Fraipont, A. Karageorgis, A. Moisan, V. Persoons, M. J. Richard, J. L. Coll & C. Rome (2013) The Dual Effect of Mscs on Tumour Growth and Tumour Angiogenesis. *Stem Cell Res Ther*, 4, no. 2: 41.

CHAPITRE 5 : MECANISMES D'ACTION DE LA THERAPIE CELLULAIRE PAR CELLULES

SOUCHES MESENCHYMATEUSES APRES INFARCTUS CEREBRAL CHEZ LE RAT

I. L'ACCIDENT VASCULAIRE CEREBRAL

Ces dernières décennies ont été marquées par une prise de conscience collective du défi sociétal majeur que représentent les Accidents Vasculaires Cérébraux (AVC) et les maladies neuro-dégénératives (MND). En effet, elles touchent plus de 33 millions de personnes dans le monde. Frappant principalement les personnes du milieu à leur fin de vie, leur incidence augmente avec le vieillissement de la population. Ces pathologies sont caractérisées soit par une perte neuronale au cours du temps (maladie d'Alzheimer) soit en réponse à une lésion aiguë (AVC).

L'accident vasculaire cérébral ⁹⁷ est défini cliniquement comme un déficit neurologique soudain fixe ou transitoire. On regroupe sous le terme AVC, 4 pathologies neurovasculaires distinctes :

- les *AVC ischémiques, les plus fréquents*, peuvent être transitoires (accidents ischémiques transitoires) ou constitués (infarctus cérébraux) et représentent environ 80% des cas. Ils sont la conséquence d'une occlusion d'une artère à destinée encéphalique. Dans le cas des accidents ischémiques transitoires, le flux sanguin est rétabli dans les 30 minutes et ne conduit à aucun déficit irréversible.

- les *AVC hémorragiques ou hématomes intraparenchymateux* représentent environ 15% des cas et correspondent le plus souvent à une rupture d'une petite artère perforante au sein du parenchyme encéphalique ^{98,99}.

- les *hémorragies sous-arachnoïdiennes* (<5% des cas) correspondent majoritairement à la rupture d'un anévrisme artériel intracrânien au sein des méninges ¹⁰⁰.

- les *thromboses veineuses cérébrales*, plus rares (<1%), sont liées à l'occlusion d'un sinus veineux ou d'une veine drainant l'encéphale. Elles peuvent rester isolées ou s'accompagner d'une lésion ischémique et/ou hémorragique.

La distinction entre ces différents types d'AVC repose sur l'imagerie cérébrale (imagerie par résonance magnétique ou IRM ; tomodensitométrie ou TDM).

L'AVC est donc défini comme un déficit neurologique soudain particulièrement dévastateur, deuxième cause de mortalité mondiale et première cause de handicap de l'adulte (Fig. 8). L'AVC est une maladie fréquente et grave qui atteint 120 000 à 140 000 personnes en France chaque année (16 millions dans le monde en 2005). Les AVC sont la principale cause de handicap acquis de l'adulte, la seconde cause de mortalité en France, et la troisième dans le

monde, après les pathologies cardiovasculaires et les cancers. Les AVC représentent également la seconde cause de démence ¹⁰¹. Les taux annuels de mortalité par AVC varient entre 28 à 60 décès pour 100 000 habitants. Au niveau mondial, 10% des décès lui seront attribuable en 2030, faisant de l'AVC la première ou la seconde cause de mortalité ¹⁰²⁻¹⁰⁵.

L'âge moyen de survenue d'un premier AVC est de 68,6 ans pour les hommes et 72,9 ans pour les femmes ¹⁰⁶. L'incidence des AVC augmente exponentiellement avec l'âge, et de ce fait, l'AVC est souvent considéré comme une maladie affectant principalement le sujet âgé. Or, 25% des patients ont moins de 65 ans et sont en âge de travailler (38 000 patients sur les 140 000 par an en France). Les AVC touchent notamment près de 7000 personnes de 24 à 44 ans par an en France, et sont à l'origine de 400 décès. Le handicap est lié aux déficits moteurs (paralysies) ou sensitifs, aux troubles du langage (aphasie) mais aussi aux troubles cognitifs, souvent sous-estimés. Environ 70% des patients survivants gardent des séquelles qui interfèrent de façon majeure avec leurs capacités fonctionnelles et cognitives ¹⁰⁷⁻¹¹². En outre, les AVC représentent une cause importante de dépression chez les malades et leur entourage.



FIGURE 17 : L'ACCIDENT VASCULAIRE CEREBRAL EN QUELQUES CHIFFRES

(Source : Site web Inserm : <https://www.inserm.fr/information-en-sante/dossiers-information/accident-vasculaire-cerebral-avc>)

Les conséquences des AVC sont très importantes en termes de mortalité et de handicap, mais également de coût sociétal, estimé à plus 8 milliards d'euros par an en France alors que la seule thérapeutique existante pour ce type d'AVC, la thrombolyse, ne peut être administrée qu'aux patients pris en charge dans les 4h30 suivant la survenue de l'AVC ¹¹³⁻¹¹⁵. Ainsi, seuls 2% des patients sont traités. De plus, ce traitement comporte un risque important d'hémorragie cérébrale symptomatique dont le risque est lié à la sévérité de l'AVC, à l'âge du patient, et aux facteurs de risque surajoutés (hypertension artérielle, hyperglycémie ou diabète). Il existe donc un réel besoin d'améliorer la compréhension des processus physiopathologiques de l'infarctus cérébral, ainsi que son diagnostic en urgence pour améliorer sa prise en charge précoce. De

plus, à la phase chronique, la seule prise en charge qui peut être proposée est la rééducation et la prévention de la récurrence de l'AVC. Un des objectifs de la recherche dans le cadre de l'AVC ischémique est de trouver des thérapeutiques pour permettre la récupération des patients qui gardent des séquelles, soit malgré un traitement à la phase aiguë, soit qui n'ont pas pu bénéficier de traitement^{116,117}. Le développement de nouveaux traitements, autre que la thrombolyse, permettrait de réduire le handicap post-AVC et d'entraîner ainsi un bénéfice en termes de qualité de vie du patient mais également de coût global de santé publique.

En dehors de la prise en charge dans une structure de soins spécialisée, le seul traitement efficace est la thrombolyse qui doit être administrée dans les premières heures suivant un AVC ischémique (ou infarctus cérébral). Favoriser la plasticité post-lésionnelle du cerveau représente une alternative thérapeutique majeure. C'est dans ce contexte que la thérapie cellulaire basée sur l'administration de cellules souches a émergé. Son action, fondée sur la « réparation » du tissu cérébral lésé, a montré un bénéfice sur la récupération dans des modèles d'ischémie cérébrale expérimentale. Cependant, de nombreuses questions restent en suspens concernant les mécanismes d'action de ce type de traitement.

II. PHYSIOPATHOLOGIE DE L'ISCHEMIE CEREBRALE

L'ischémie cérébrale fait suite à l'interruption du flux sanguin dans une artère cérébrale. Elle se définit comme une diminution du débit sanguin cérébral en dessous du seuil d'autorégulation physiologique conduisant à une anoxie cérébrale focalisée et donc à une rupture de l'équilibre énergétique. Durant cette phase précoce, dites « phase aigüe », durant laquelle l'interruption du débit sanguin entraîne une diminution des apports d'O₂ et de glucose au niveau du cerveau, le potentiel de membrane ne peut être maintenu. On observe donc une perte des gradients électrochimiques et une dépolarisation des neurones. Suivent alors une redistribution des ions, une libération excessive de neuromédiateurs et d'acides aminés excitateurs et la production de radicaux libres (cascade ischémique)¹¹⁸. La dépolarisation membranaire qui résulte de ces événements induit la formation d'un œdème, des effets cytotoxiques et excitotoxiques (ou le stress oxydant). Ainsi, en l'espace de quelques minutes, survient la mort neuronale au cœur de l'aire infarctée. Elle se définit par un effondrement du flux sanguin cérébral (CBF), du volume sanguin cérébral (CBV) et du coefficient d'extraction de l'oxygène (OEF)¹¹⁹.

À la périphérie de l'aire infarctée se trouve la zone de pénombre. Dans cette zone de « silence électrophysiologique », le tissu est insuffisamment perfusé pour préserver les gradients ioniques et donc garantir le fonctionnement des neurones, mais suffisamment pour assurer de manière temporaire leur viabilité. Ce second compartiment est défini par un métabolisme de l'oxygène relativement conservé par rapport au flux sanguin abaissé. Le taux d'extraction sanguin de l'oxygène y est élevé, traduisant un phénomène de « misery perfusion ». Le devenir de cette zone est fonction de la recanalisation : en

absence de reperfusion, la zone de pénombre évolue progressivement vers la nécrose irréversible suite à des lésions neuronales secondaires induites par une cascade biochimique délétère conduisant à des effets cytotoxiques et excitotoxiques (ou le stress oxydant) ¹²⁰. Cette progression est un phénomène rapidement évolutif : chacun de ces processus physiopathologiques apparaît à un moment défini dans le phénomène ischémique, certains arrivant après quelques minutes, d'autres après quelques heures voire jours ¹²¹. La gravité des lésions cérébrales déterminées par l'occlusion d'une artère cérébrale dépend de la durée de l'occlusion et des possibilités de suppléance à partir des artères cérébrales adjacentes. Cependant, la reperfusion joue aussi un rôle important dans la distribution des dommages. En effet, au moment de la reperfusion, une grande quantité d'oxygène arrive au niveau du cerveau, ce qui se traduit par la formation de radicaux libres (espèces activées de l'oxygène – ROS) et mène à un stress oxydant supplémentaire.

Lors de la phase plus tardive de l'ischémie cérébrale, appelée "*phase subaiguë*", ce sont des mécanismes de remodelage neurovasculaire et de récupération qui vont avoir lieu. (Fig 18)

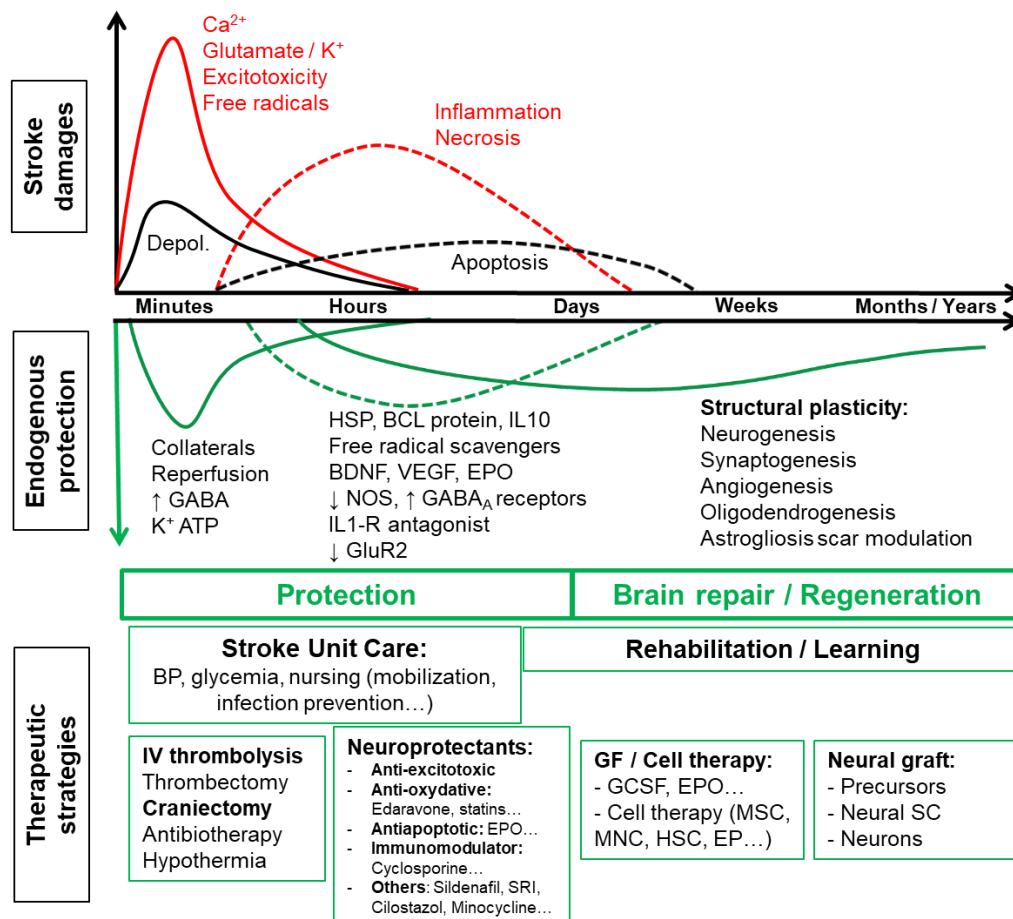


FIGURE 18 : Mécanismes délétères, protection endogène et pistes thérapeutiques pour l'ischémie cérébrale.

BCL : protéine B-cell lymphoma ; BDNF : facteur neurotrophique dérivé du cerveau ; CMN : cellules mononucléées ; CSH : cellules souches hématopoïétiques ; CSM : cellules souches/stromales mésenchymateuses ; Dép. : dépol. : dépol. : dépol. : dépol. : dépol. ; EPO : érythropoïétine ; GCSF : granulocyte-colony stimulating factor ; GluR2 : sous-unité 2 du récepteur au glutamate ; HSP : heat-shock protein ; IL : interleukine ; IP3 : inositol tri-phosphate ; IRS : inhibiteur de la recapture de la sérotonine ; IV : intraveineuse ; NOS : NO synthase (n : neuronale (type I), i : inductible (II), e : endothéliale (III)) ; PA : pression artérielle ; PE : progéniteurs endothéliaux ; VEGF : vascular endothelial growth factor. (Figure issue de ¹²²)

III. MECANISMES DE LA RECUPERATION SPONTANEE POST-AVC

Bien que la capacité de réparation de cerveau soit limitée, il est intéressant de noter qu'après une ischémie, tant chez l'homme que dans les modèles animaux d'AVC, il a été démontré qu'une récupération partielle des fonctions se produit en l'absence de traitement. Une meilleure compréhension de la récupération clinique s'est accompagnée d'une meilleure compréhension de sa base neurobiologique (Fig. 19)¹²². Des études sur des modèles animaux d'AVC ont fourni des informations cellulaires et moléculaires sur les événements qui sous-tendent cette récupération. Les progrès de la neuro-imagerie fonctionnelle et des méthodes neurophysiologiques ont fourni des données parallèles au niveau des systèmes chez les patients humains.¹²³⁻¹²⁵.

Des études ont identifié de multiples mécanismes endogènes soutenant ce phénomène endogène de récupération, tels que l'angiogenèse, la réorganisation corticale et la neurogenèse (Fig. 19)¹²⁶.

L'angiogenèse est la formation de nouveaux microvaisseaux qui se ramifient à partir de vaisseaux préexistants¹²⁷. Elle se produit dans la région péri-infarctus des patients victimes d'un AVC¹²⁸ et l'on suppose qu'elle contribue à la plasticité du système nerveux central ainsi qu'à la récupération fonctionnelle. Dans les modèles animaux d'AVC, une angiogenèse accrue est corrélée à une meilleure récupération, tandis que l'inhibition de l'angiogenèse post-AVC est corrélée à une récupération post-AVC réduite^{129,130}. Cette angiogenèse se produit dans les 4 à 7 jours suivant l'ischémie cérébrale en bordure du noyau ischémique. Parallèlement, la pousse axonale n'apparaît normalement pas avant 14 jours après l'ischémie, même en périphérie de l'ischémie¹³¹. Enfin, le potentiel angiogénique peut être limité par de multiples facteurs, dont le vieillissement¹³². Étant donné que l'accident vasculaire cérébral ischémique survient généralement à un âge avancé, il est indispensable de poursuivre les recherches sur les thérapies, notamment à base de cellules souches, pour améliorer le remodelage vasculaire après un accident vasculaire cérébral.

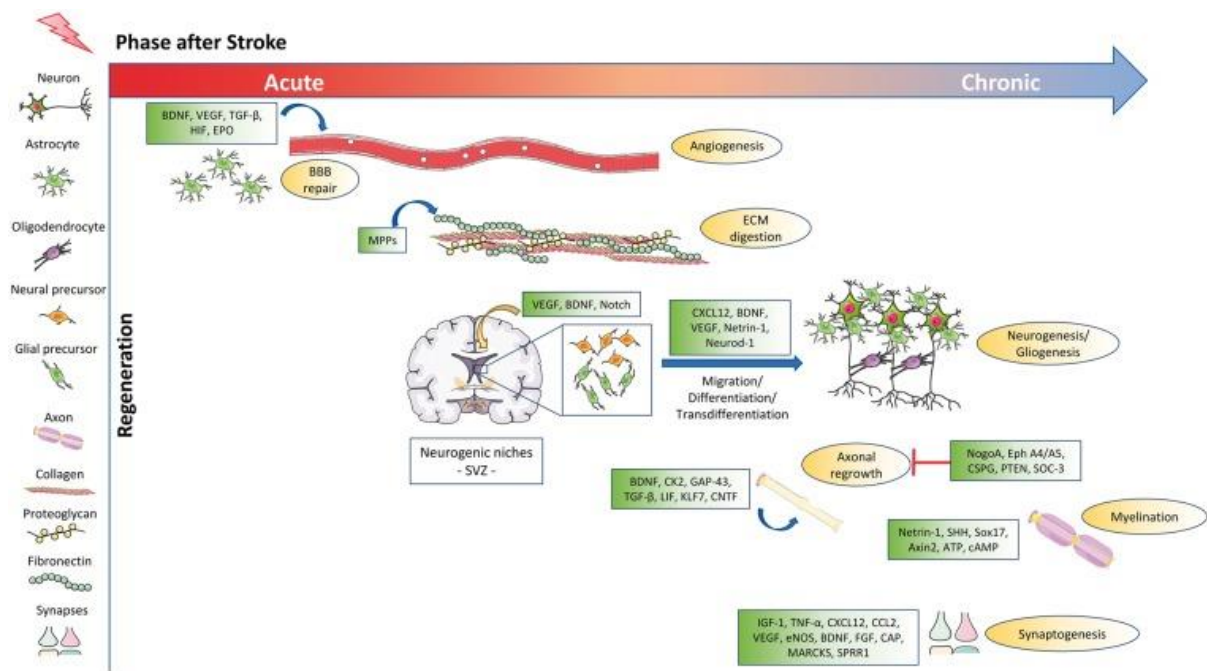


FIGURE 19: Mécanismes cellulaires et moléculaires de régénération après un accident vasculaire cérébral
 Durant les phases aiguës et chroniques après un AVC, l'angiogenèse, la neuro- et la gliogenèse doivent être rétablies dans le cerveau. Les médiateurs cruciaux de l'angiogenèse sont le BDNF, le VEGF, le TGF-β, le HIF et l'EPO. L'excès d'ECM doit être digéré par les MMP. Le VEGF et le BDNF participent également à la neurogenèse et à la gliogenèse à partir de précurseurs neuronaux et gliaux dans les niches neurogéniques. La migration, la différenciation et la (trans)différenciation des cellules sont déclenchées par CXCL12, Nestrin-1 et Neurod-1, en plus du VEGF et du BDNF. Pour compléter le processus de régénération, des facteurs comme CK2, GAP-43, LIF, KLF7, CNTF favorisent la repousse axonale. Netrin-1, SHH, Sox17, Axin2, ATP et cAMP sont impliqués dans la myélinisation. Enfin, la synaptogénèse est stimulée par IGF-1, TNF-α, CXCL12, CCL2, VEGF, eNOS, BDNF, FGF, CAP, MARCKS, SPRR1. Les mécanismes de contrôle visant à éviter une croissance axonale aberrante susceptible d'inhiber la repousse comprennent NogoA, Eph A4/A5, CSPG, PTEN, SOC-3. (Figure issue de la revue ¹²⁶)

Une réorganisation corticale a été observée chez des patients humains suite à un AVC. Il a, par exemple, été observé à l'aide de l'imagerie par résonance magnétique fonctionnelle (IRMf) une augmentation de l'activité neuronale bilatérale au cours des premiers stades suivant l'AVC, ainsi qu'une augmentation de l'activité dans l'hémisphère contra-lésionnel, associée à une récupération réduite après l'AVC ¹³³⁻¹³⁵. Parallèlement, les modèles animaux nous ont appris que la récupération fonctionnelle est fortement associée à la formation de nouvelles connexions synaptiques. Les neurones principalement survivants dans les tissus péri-infarctus présentent un élargissement de leurs arbres dendritiques ainsi qu'un bourgeonnement d'axones afin de former de nouvelles connexions avec les zones cérébrales locales et distantes. Il est important de noter que les axones des neurones des régions cérébrales controlatérales se développent vers les tissus dénervés dans l'hémisphère ipsi-lésionnel et controlatéral, ainsi que dans le tronc cérébral et la moelle épinière. De tels effets ont été particulièrement observés chez des animaux ayant subi des accidents vasculaires cérébraux importants ¹³⁶. Cependant, il

faut remarquer que certaines régions de l'hémisphère contra-lésionnel peuvent former une connectivité aberrante qui semble entraver la récupération fonctionnelle, par exemple, par des projections transcallosales supprimant la représentation corticale du membre parétique en raison d'une plasticité synaptique inadaptée¹³⁷. Par conséquent, un accident vasculaire cérébral peut aussi induire différents modèles de germination axonale, entraînant à la fois des effets réparateurs et préjudiciables.

Parallèlement à l'angiogenèse et à la réorganisation corticale, en 2006, la neurogenèse adulte a été décrite pour la première fois et on a émis l'hypothèse qu'elle était impliquée dans la récupération spontanée post-AVC¹³⁸. La neurogenèse adulte est un processus qui aboutit à la génération de nouveaux neurones à partir de cellules souches et progénitrices neurales (CSPN) dans le cerveau des mammifères adultes¹³⁹. Cette production de nouveaux neurones a lieu dans des zones appelées niches neurogéniques. La zone sous-ventriculaire du ventricule latéral et la zone subgranulaire du gyrus denté sont les deux principales niches neurogéniques qui contiennent des CSPN adultes qui prolifèrent, se divisent et se différencient en neurones matures. Cependant, des études ont mis en évidence qu'une neurogenèse adulte dans d'autres zones cérébrales, le long du système ventriculaire, principalement dans des conditions pathologiques¹⁴⁰. Ainsi, ce processus est augmenté dans le contexte de l'AVC avec un pic de prolifération des CSPN dans la zone subventriculaire entre une et deux semaines après la survenue d'un AVC^{130,141-143} car les CSPN peuvent remplacer les neuroblastes endommagés en réponse aux lésions dues à l'AVC¹⁴⁰.

L'angiogenèse et la neurogenèse sont couplées dans l'unité neuro-vasculaire en ce sens que les cellules endothéliales participant à l'angiogenèse fournissent des facteurs de croissance qui régulent l'auto-renouvellement des CSPN et la neurogenèse¹⁴⁴. La taille et la densité des microvaisseaux changent après un AVC¹⁴⁵ et les neuroblastes de la zone subventriculaire migrent à proximité des zones de remodelage vasculaire. En outre, les CSPN améliorent l'angiogenèse par le biais d'un soutien trophique tel que la stimulation paracrine du facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) et peuvent influencer le flux sanguin capillaire dans le système nerveux central¹⁴⁶. Cela met en évidence une relation réciproque entre la neurogenèse et le remodelage vasculaire après un accident vasculaire cérébral.

Enfin, la réparation endogène du cerveau ne se limite pas aux niches neurogéniques. Des études récentes ont montré que les cellules gliales entourant le cœur ischémique peuvent être réactivées. En effet, les péricytes, les précurseurs d'oligodendrocytes et les astrocytes sont tous capables de se différencier en neurones après une lésion cérébrale¹⁴⁷⁻¹⁵⁰.

IV. CONTEXTE DE LA THÉRAPIE CELLULAIRE PAR CELLULES SOUCHES DANS LE CADRE DU TRAITEMENT DE L'AVC

La transplantation de cellules souches représente une nouvelle voie thérapeutique de l'accident vasculaire cérébral, non seulement pour prévenir les dommages, au centre des stratégies thérapeutiques conventionnelles, mais aussi pour réparer le cerveau lésé, potentialiser la récupération spontanée cérébrale et offrir une réponse biologique plus dynamique que les pharmacothérapies (Fig. 20).

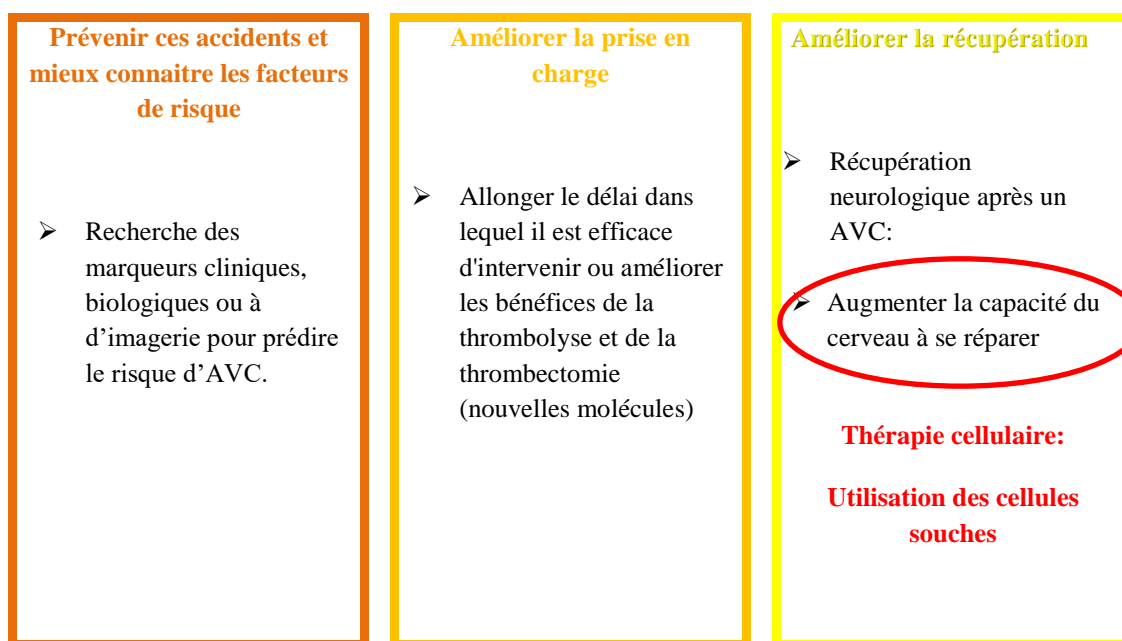


FIGURE 20 : Les enjeux de la recherche en thérapie de l'AVC : la place de la thérapie cellulaire

De nombreux types de cellules souches ont été évalués pour leur potentiel thérapeutique dans le traitement de l'AVC ischémique, y compris les cellules embryonnaires (ESC), neurales (NSC), pluripotentes induites (iPS) et les cellules souches mésenchymateuses (CSM)^{116,151,152} (Fig. 21). En effet, les cellules souches peuvent être obtenues à partir d'une variété de sources cellulaires, y compris embryonnaires ou fœtales, adultes ou culture cellulaire *in vitro* et ont chacune leurs intérêts et inconvénients en thérapie cellulaire de l'AVC.

Les cellules souches embryonnaires ont une capacité d'auto-renouvellement illimitée et sont des cellules pluripotentes. En 1998, ces cellules sont dérivées de la masse interne d'embryons humains au stade blastocyste¹⁵³ et ont le potentiel de se différencier dans n'importe quel type de cellule de l'organisme. Leur potentiel de différenciation en cellules neuronales a été démontré *in vitro*^{154,155}. Les effets bénéfiques des ESC ont été mis en évidence *in vivo* dans des modèles d'AVC chez le rat avec des améliorations efficaces en terme de taille de l'infarctus et de la récupération comportementale¹⁵⁶. Cependant, la controverse éthique limite sévèrement l'application clinique des ESC¹⁵⁷.

La découverte de cellules souches pluripotentes induites (iPS) a brisé un paradigme de différenciation cellulaire et a remporté un prix Nobel ¹⁵⁸. La capacité de transformer des fibroblastes *in vitro* en cellules souches pluripotentes à l'aide de la reprogrammation cellulaire a répondu à bon nombre des préoccupations de la thérapie ESC comme des questions éthiques ^{159,160}. Les cellules iPS de fibroblastes humains adultes peuvent migrer vers le site de la lésion et améliorer la lésion cérébrale et la fonction sensori-motrice ¹⁶¹. Une préoccupation avec l'iPS est l'immunogénicité cellulaire et la formation de tératomes est signalée après l'administration d'iPS ^{162,163}.

Des CSPN exogènes peuvent être obtenues à partir de ESC, de cellules iPS, de CSM dérivées de la moelle osseuse et de tissu adipeux, du système nerveux fœtal et adulte ¹⁶⁴. Ces cellules peuvent proliférer *in vitro* lorsqu'elles sont stimulées par divers facteurs de croissance et se différencier en neurones, astrocytes, oligodendrocytes ¹⁶⁵⁻¹⁶⁷. Malgré ces résultats encourageants, les thérapies de remplacement cellulaire utilisant des NSC ou des NPSC sont également affectées par la perte cellulaire ou une mauvaise différenciation et nécessitent des traitements immunosuppresseurs.

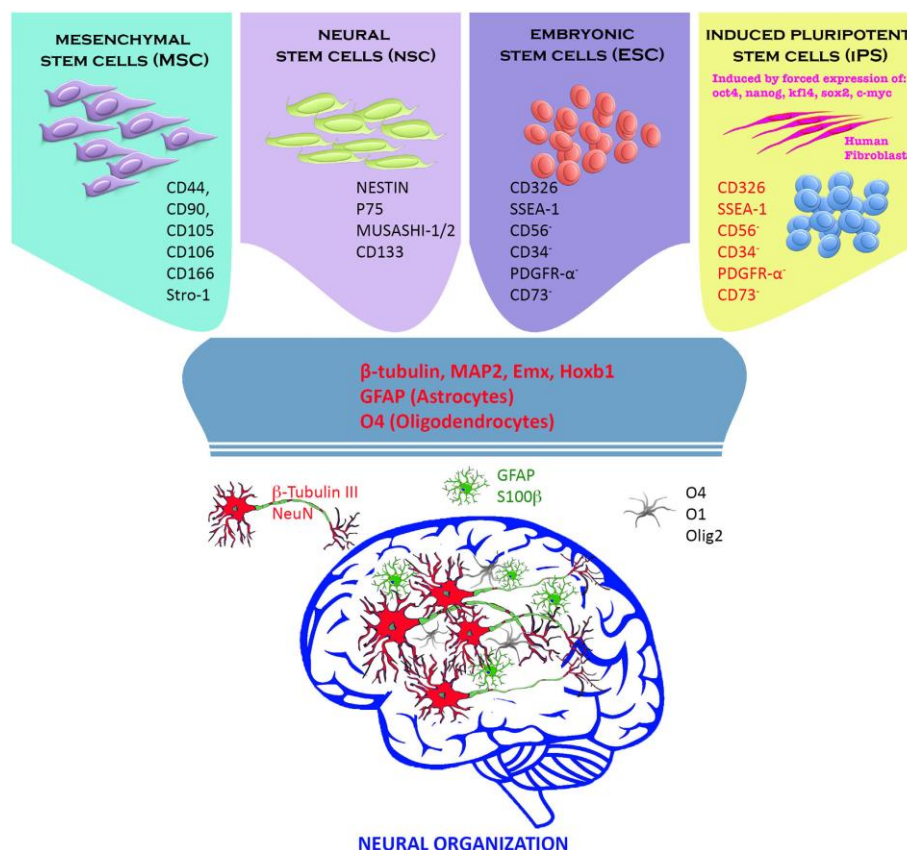


FIGURE 21: Différentes sources de cellules utilisées en thérapie cellulaire de l'accident vasculaire cérébral Les cellules souches et les cellules progénitrices neurales ont été utilisées pour remplacer la mort des tissus neuraux suite à une agression cérébrale. Les cellules souches adultes (cellules souches mésenchymateuses et neurales) et embryonnaires (ESC) ont montré une excellente capacité de différenciation vers les phénotypes neuraux (neurones, oligodendrocytes et astrocytes) *in vitro* et *in vivo* (Figure tirée de ¹⁶⁸).

Les cellules souches adultes ont été étudiées pour leur soutien paracrine et trophique dans la recherche post-AVC ^{169,170}. Les CSM ont été mises en évidence en 1970, à partir de moelle osseuse de cobaye ¹⁷¹. Les cellules souches mésenchymateuses humaines (CSMh) peuvent être obtenues à partir de divers tissus tels que la moelle osseuse ¹⁷², le tissu adipeux ¹⁷³ et d'autres tissus ^{174,175}. Leur intérêt en tant que traitement pro-angiogénique vient du fait qu'elles sont multipotentes et donc capables de s'auto-renouveler et de se différencier en une grande variété de type cellulaire, notamment en cellules endothéliales, cellules gliales ou neurones¹⁷⁶⁻¹⁸¹, lorsque le microenvironnement y est favorable ¹⁸². De plus, les CSMh ont la capacité de migrer vers les tissus lésés et notamment le cerveau, après ischémie ¹⁸³. Les cellules stromales / souches isolées du tissu adipeux, de la moelle osseuse et du cordon ombilical sont largement étudiées dans des études expérimentales et des essais de thérapie cellulaire ^{122,151,184}. En effet, les CSM sont intéressantes en vue d'applications cliniques car elles peuvent être prélevées chez un patient, autorisant une greffe autologue et permettant donc de s'affranchir des problèmes d'histocompatibilité classiquement observés dans un contexte de greffe allogénique. Mais, de plus, les CSM sont dites peu immunogènes car elles expriment des molécules HLA de classe I mais n'expriment des molécules HLA de classe II (MHC I⁺, MHC II⁻, CD40⁻, CD80⁻, CD86⁻) ¹⁸² permettant des allogreffes sans intervention d'immunosuppresseurs. Elles ont également l'avantage en plus d'être non immunogènes de ne pas être tumorigènes ^{185,186} et de ne pas soulever de questions éthiques liées à l'utilisation des cellules souches embryonnaires ¹⁸⁷.

La justification expérimentale pour l'utilisation des CSM dans la thérapie des accidents vasculaires cérébraux inclue un certain nombre de mécanismes d'action divergents tels que la différenciation en types de cellules utiles à la réparation tissulaire, la modulation du système immunitaire, la promotion de l'angiogenèse et de la neurogenèse ainsi que la sécrétion de facteurs neuroprotecteurs et neurotrophiques (Fig. 22). Les effets des CSM sont, de plus, basés sur leur capacité à cibler sélectivement les régions de la lésion.

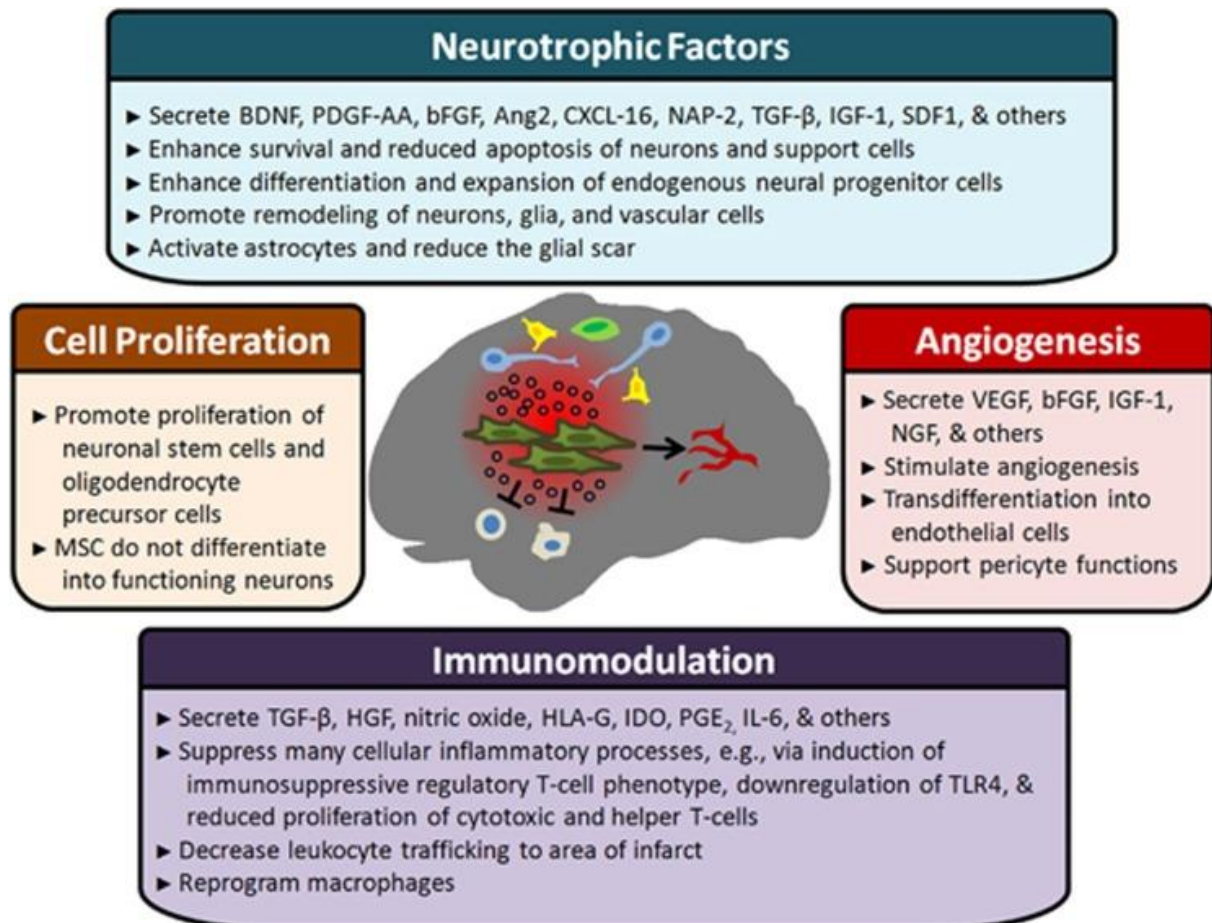


FIGURE 22: Aperçu des mécanismes proposés pour les thérapies de l'accident vasculaire cérébral basées sur les cellules stromales mésenchymateuses (CSM)

Parmi les mécanismes potentiels importants de médiation de l'action des CSM dans les accidents vasculaires cérébraux figurent la sécrétion de facteurs neurotrophiques, la promotion de l'angiogenèse et la modulation des réponses immunitaires (Figure issue de la revue ¹⁸⁸).

V. EFFET DES CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES INJECTÉES À LA PHASE SUBAIGÛE DE L'AVC SUR LA MICROVASCULARISATION CÉRÉBRALE DANS LE MODÈLE D'OCCLUSION TRANSITOIRE DE L'ARTÈRE CÉRÉBRALE MOYENNE (OACM) CHEZ LE RAT

Dans le cadre de l'essai clinique de phase II qui se déroulait au CHU de Grenoble au sein de l'unité neurovasculaire dirigée par le Prof. Detante Olivier, une injection systémique de cellules souches mésenchymateuses autologues (production UMTC, EFS Rhône Alpes/CHU de Grenoble) était réalisée chez des patients ayant présenté un infarctus récent dans le territoire carotidien (datant de moins de 6 semaines au moment de la greffe), avec un déficit neurologique persistant (ISIS/HERMES) ¹⁸⁹. L'objectif était d'évaluer la faisabilité et la tolérance de l'injection intraveineuse (IV) de CSMh autologues chez des patients. Dans ce contexte, les travaux de recherche auxquels j'ai participé ont permis de montrer que l'injection de CSMh en IV permettait une récupération plus importante chez l'animal suite à un AVC.

a) CARACTERISATION DES CHANGEMENTS MICRO-VASCULAIRES POST-
OCCLUSION/REPERFUSION

Pour cela, dans un premier temps, j'ai participé aux travaux de thèse d'Anaïck Moisan dirigés par le Prof. Detante Olivier et la Dr Rémy Chantal dont le but était de développer et d'optimiser de nouvelles thérapeutiques pour la prise en charge du handicap post-AVC. Leur objectif premier était la caractérisation, sur le long terme (3 semaines post-ischémie cérébrale), des changements de la micro-vascularisation au sein du modèle animal d'ischémie cérébrale focale transitoire (oACM) utilisé au laboratoire. Pour cela, les évolutions micro-vasculaires post-ischémie/reperfusion ont été suivies à l'aide d'un suivi multiparamétrique (IRM de la microvascularisation développée au sein de l'équipe d'Emmanuel Barbier, comportement, immunohistochimie et RT-qPCR). Mon expertise en biologie moléculaire a permis de décrire l'évolution de certains facteurs liés à l'angiogenèse et à la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique (BHE).

L'analyse des résultats a montré que la phase aigüe post-ischémie cérébrale (les deux jours suivants l'ischémie) implique les facteurs Ang-2, Tie-1, VEGFR-2 et eNOs responsables de la perméabilité de la BHE et de la dégradation des fonctions sensori-motrices. Durant la phase subaigüe (7^{ième} jour au 25^{ième} jour), l'expression des facteurs Ang-1, Ang-2, TGF β -1, SDF-1 et CXCR-4 est modifiée. Cette modification du pattern d'expression de ces facteurs combinée aux analyses des images obtenues en IRM multiparamétrique et en histologie suggère la formation et la stabilisation de néo-vaisseaux fonctionnels (Fig. 23).

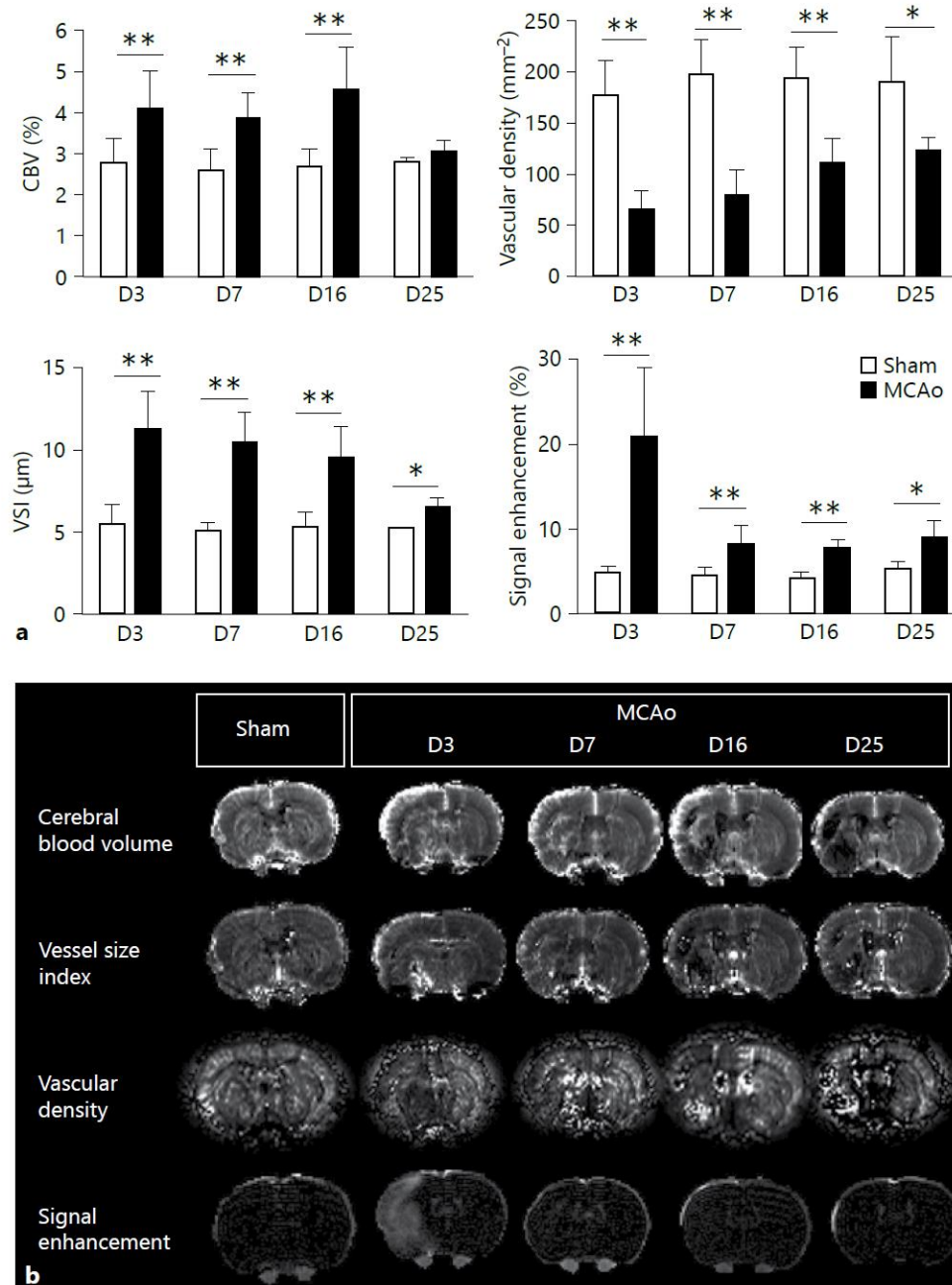


FIGURE 23 : Caractérisation des modifications micro-vasculaires post-ischémie/reperfusion chez le rat MCAo

a. Evolution du volume sanguin cérébral (CBV), de l'indice de taille des vaisseaux (VSI), de la densité vasculaire et de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique (rehaussement du signal) observés par IRM multiparamétrique 3, 7, 16 et 25 jours après occlusion de l'artère cérébrale moyenne au niveau de la lésion (MCAo, n=8) comparés aux rats Sham (n=9). Moyenne \pm SD. **b.** Images IRM de chaque paramètre et issues d'un rat représentatif. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ (Mann-Whitney).

Entre le 3^{ème} jour et le 7^{ème} jour, une phase de transition semble initier un switch d'activité des facteurs Ang-2 et TGF β -1 (Fig. 24) ¹⁹⁰. Etant donnée la dynamique physiopathologique de l'ischémie cérébrale observée dans cette étude, les phases de transition et subaiguë semblent être les meilleures cibles de thérapies pro-angiogéniques permettant d'améliorer la récupération post-AVC.

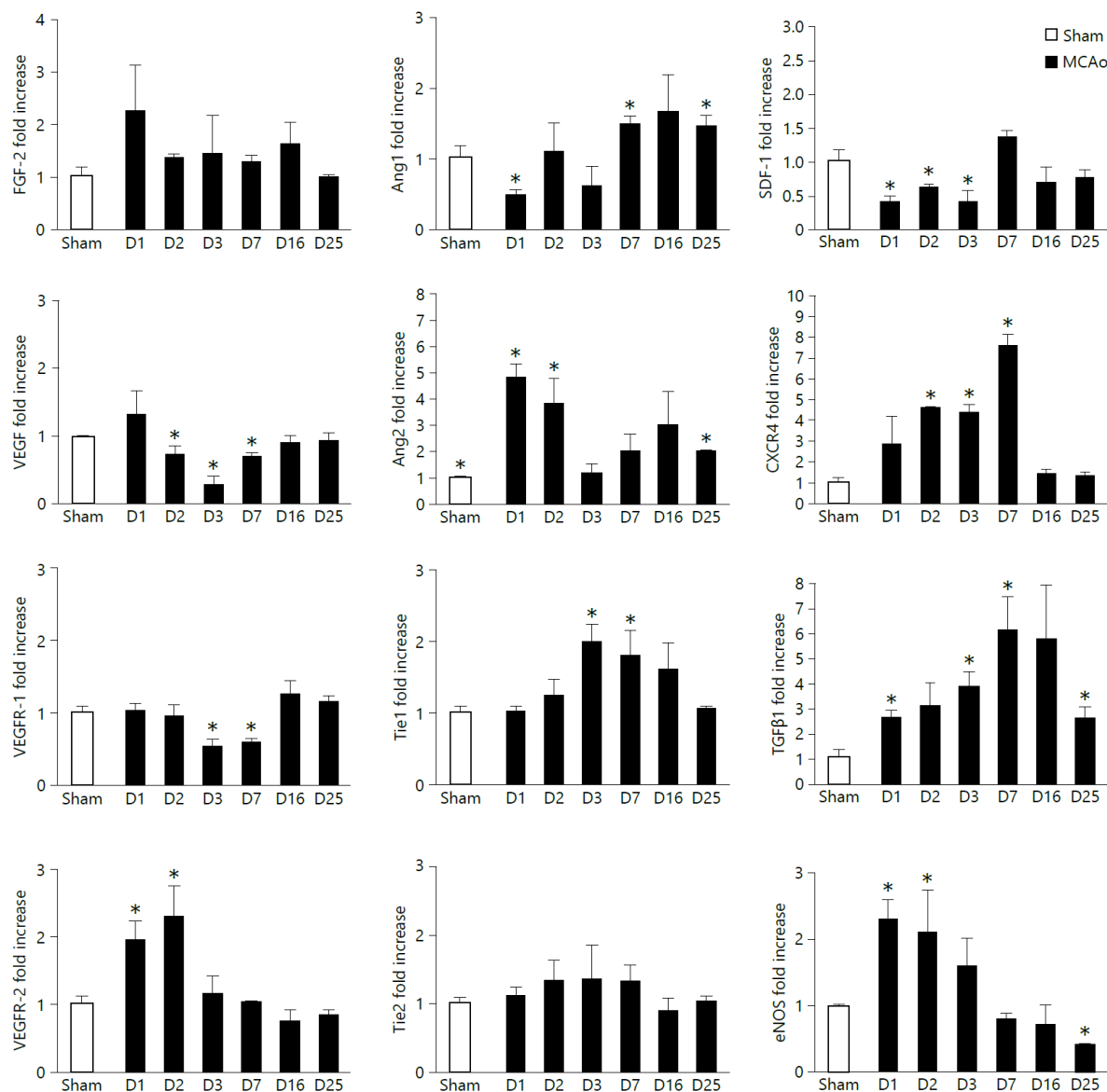


FIGURE 24 : Suivi de l'expression cérébrale des ARNm de FGF-2, VEGF, VEGFR-1, VEGFR-2, Ang1, Ang2, Tie1, Tie2, eNOS, TGFβ1, CXCR4 et SDF-1 suite à une occlusion de l'artère cérébrale moyenne chez le rat

Evolution quantitative de l'expression des ARNm par RT-qPCR de FGF-2, VEGF, VEGFR-1, VEGFR-2, Ang1, Ang2, Tie1, Tie2, eNOS, TGFβ1, CXCR4 et SDF-1 du jour 1 au jour 25 post-ischémie cérébrale chez des rats MCAo comparés à des rats Sham. Moyenne ± SEM. * p < 0.05 (Mann-Whitney).

b) EVALUATION DE L'EFFET DE L'INJECTION DE CELLULES SOUCHES

MESENCHYMATEUSES SUR LES MODIFICATIONS MICRO-VASCULAIRES POST-

OCCLUSION/REPERFUSION

Suite à cette étude, j'ai participé à la poursuite de ces travaux visant à évaluer le bénéfice fonctionnel et cognitif de l'administration de CSMh de moelle osseuse (source la plus utilisée dans les essais cliniques), par voie IV à la phase subaiguë de l'AVC (8 jours après ischémie-

reperfusion). L'objectif a alors été de caractériser des changements de la microvascularisation du cerveau lésé au sein du modèle oACM suite à l'injection de CSMh et, donc, leur éventuel effet bénéfique. Pour cela, les évolutions micro-vasculaires post-ischémie/reperfusion ont été suivies durant plusieurs semaines à l'aide d'un suivi multiparamétrique (IRM multiparamétrique de la vascularisation, suivi comportemental, immunohistochimie et RT-qPCR). Le suivi comportemental longitudinal a montré des bénéfices somatosensoriels et cognitifs retardés (de 4 à 7 semaines après l'injection de CSMh). L'étude longitudinale *in vivo* par IRM a montré une augmentation de la densité vasculaire dans la zone ischémique deux et trois semaines après l'injection de CSMh comparée aux animaux n'ayant pas reçu de CSMh (Fig. 25).

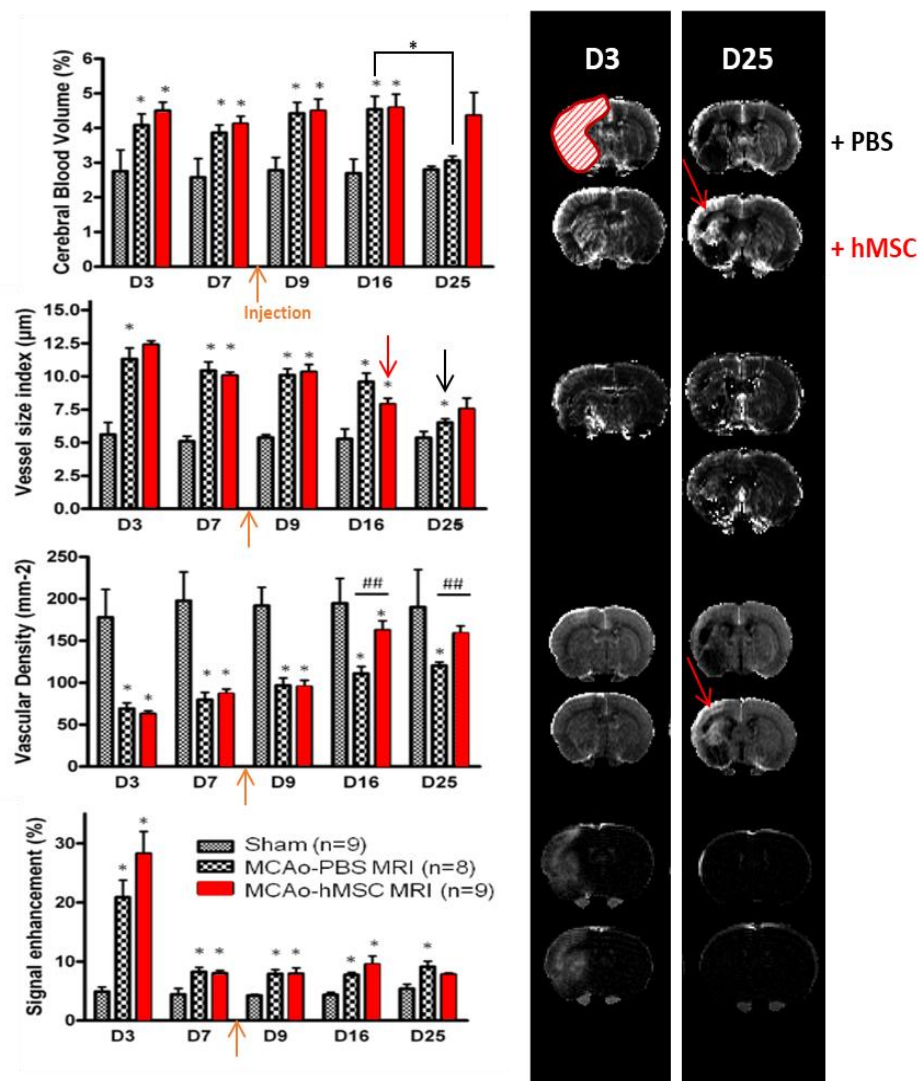


FIGURE 25 : L'injection par voie intraveineuse de cellules souches mésenchymateuses humaines (hMSC) induit une augmentation de l'angiogenèse post-ischémique

Evolution du volume sanguin cérébral (CBV), de l'indice de taille des vaisseaux (VSI), de la densité vasculaire et de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique (rehaussement du signal) dans les groupes MCAo-PBS MRI group (n=8), MCAo-hMSC MRI (n=9) comparés au groupe Sham MRI rats (n=9). Moyenne±SD ; MCAo

MRI groupes vs Sham MRI groupe : *t*-test or *Mann-Whitney*, * $P < 0.05$ (*t*-test) MCAo-PBS MRI vs MCAo-hMSC MRI: ## $p < 0.01$ (*t*-test)

L'histologie, l'immunohistologie et la RT-qPCR ont mis en évidence une surexpression de facteurs angiogéniques (Ang-2, Ang-1, SDF-1 et TGF β -1) chez des rats oACM traités par les CSMh par rapport aux rats oACM traités par PBS (Fig. 26). L'injection IV des CSMh, huit jours après ischémie (phase de transition), apporte des avantages fonctionnels et augmente l'angiogenèse cérébrale dans la lésion de AVC, *via* une libération de facteurs angiogéniques endogènes améliorant la stabilisation des néo-vaisseaux ce qui pourrait être un moyen d'améliorer la récupération fonctionnelle après un AVC ¹⁹¹.

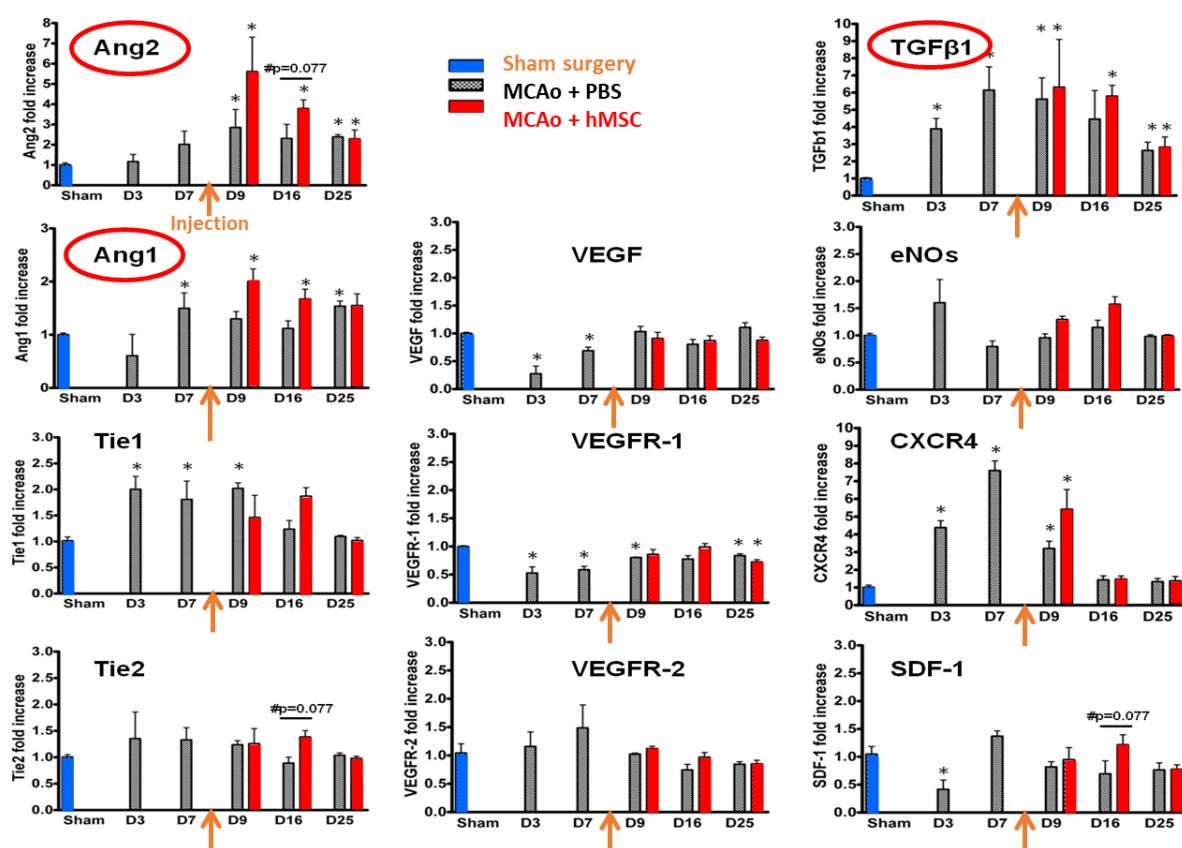


FIGURE 26 : Effet de l'injection des cellules mésenchymateuses en IV sur l'expression des ARNm de facteurs pro-angiogéniques durant 25 jours post-ischémie/reperfusion

Evolution de l'expression des ARNm par RT-qPCR de Ang2, Ang1, Tie1, Tie2, VEGF, VEGFR-1, VEGFR-2, TGF β 1, eNOs, SDF-1 et CXCR4 du jour 1 au jour 25 post-ischémie cérébrale chez des rats MCAo. Moyenne \pm SEM de trois expériences différentes en duplicat pour chaque point de chaque condition MCAo-PBS et MCAo-hMSC vs Sham: *Mann-Whitney* ; * $p < 0.05$. MCAo-PBS vs MCAo-hMSC: *Mann-Whitney* ; # $p = 0.077$.

Publications

- Detante, O., C. Rome & J. Papassin (2017). How to use stem cells for repair in stroke patients. *Revue neurologique*. 173(9):572-576
- Moisan, A. and Favre, I., C. Rome, F. de Fraipont, E. Grillon, N. Coquery, H. Mathieu, V. Mayan, B. Naegelé, M. Hommel, M.J. Richard, E.L. Barbier, C. Rémy & O. Detante. (2016) Intravenous injection of clinical grade

human mesenchymal stem cells after experimental stroke: functional benefit and microvascular effects. *Cell Transplantation*, no.25(12):2157-2171

- Moisan, A. and Favre, I., **C. Rome**, E. Grillon, B. Naegele, M. Barbieux, F. de Fraipont, MJ. Richard, E.L. Barbier, C. Rémy & O. Detante (2014) Microvascular plasticity after experimental stroke: a molecular and MRI study. *Cerebrovasc Dis*, no.38(5):344-53

PROJET SCIENTIFIQUE

POTENTIALISATION DES THERAPIES CELLULAIRES DES ACCIDENTS VASCULAIRES CEREBRAUX UTILISANT DES CELLULES SOUCHES/PROGENITRICES ET DES BIOMATERIAUX EN RECHERCHE PRE-CLINIQUE

I. CONTEXTE

La transplantation de cellules souches représente donc une voie thérapeutique de l'AVC, non seulement pour prévenir les dommages, au centre des stratégies thérapeutiques conventionnelles, mais aussi pour réparer le cerveau lésé et offrir une réponse biologique plus dynamique que les pharmacothérapies. C'est dans ce contexte que les travaux de recherche auxquels j'ai participé ont permis de montrer que l'injection de CSMh en IV permettait une récupération plus importante suite à un AVC. Cependant, le Prof. Detante avait montré que la majorité des CSMh injectées par voie IV sont transitoirement bloquées dans les poumons et que seulement une cellule sur 10 000 sont retrouvées au niveau de la lésion ischémique 24h après injection (Fig. 27) ¹⁹². Afin d'optimiser la thérapie cellulaire, il faudrait pouvoir augmenter le nombre des cellules actives au niveau de la lésion. Or, il existe plusieurs voies de délivrance des CSM possible ^{174,193} : l'injection intracérébrale, intra-artérielle, intraveineuse ou intranasale. La délivrance intracérébrale serait associée à une meilleure efficacité car une action directe des cellules peut avoir lieu. L'injection des CSMh au sein de la lésion cérébrale a, par ailleurs, déjà été évaluée dans le modèle d'ischémie cérébrale chez le rat (oACM) au sein du laboratoire. Cette étude a montré que les CSMh modifiaient la microvascularisation cérébrale lorsqu'elles étaient administrées localement au niveau de la lésion ischémique et que cet effet microvasculaire était quantifiable, dès un jour après administration, par IRM au cours d'un suivi *in vivo* chez le rat ¹⁹⁴. Par ailleurs, des études cliniques ont montré la faisabilité de cette approche dans le cadre de l'AVC ^{195,196}. En effet, la lésion cérébrale peut accepter une greffe à volume élevé sans lésion tissulaire et se trouve directement à côté de la zone du cerveau la plus en plastique après les accidents vasculaires cérébraux. Cependant, dans la lésion ischémique, la mort cellulaire étendue et la réponse inflammatoire dramatique en font un environnement plus hostile pour les transplantations cellulaires ayant pour résultat une perte grave de cellules greffées ¹⁹⁷.

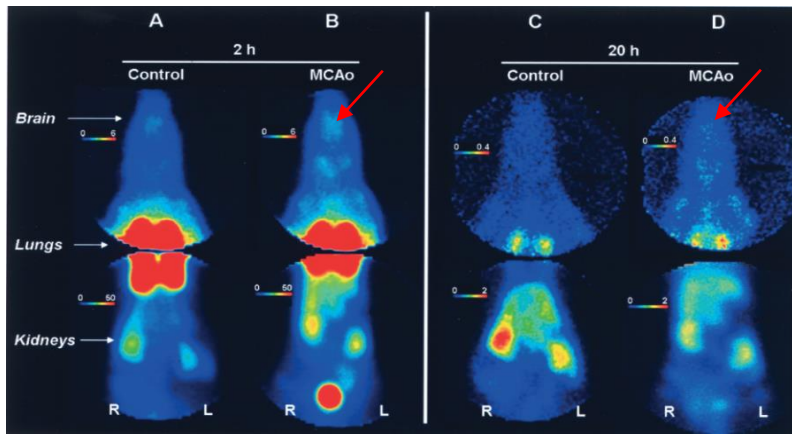


FIGURE 27 : Biodistribution des CSMh marquées au ^{99m}Tc -HMPAO.

Trois millions de CSMh ont été injectées 8 jours post-ischémie (tMCAo). On put voir que 2h après injection, de nombreuses cellules sont bloquées dans les poumons et que seulement 1 cellule sur 10 000 injectées se retrouvent au niveau de la lésion ⁶⁹.

II. OBJECTIF

La transplantation de cellules souches représente une voie thérapeutique de l'AVC, non seulement pour prévenir les dommages, au centre des stratégies thérapeutiques conventionnelles, mais aussi pour réparer le cerveau lésé et offrir une réponse biologique plus dynamique que les pharmacothérapies. Dans ce contexte, les travaux de recherche auxquels j'ai participé ont permis de montrer que l'injection de CSMh en IV permettait une récupération plus importante suite à un AVC. Cependant, de multiples facteurs influencent l'efficacité de la transplantation cellulaire et résultats du traitement dont l'inefficacité de l'administration aboutissant à un faible taux de greffe. Pour potentialiser cette thérapie, il faudrait injecter les CSMh au sein de la lésion cérébrale. En effet, elle peut accepter une greffe à volume élevé sans lésions tissulaires, et se trouve directement à côté de la zone du cerveau la plus en plastique après AVC. Cependant, comme le disait Dimmeler et al. ¹⁹⁸ : « Frequently, the mode of action of stem cell products remains obscured because the cells are inefficiently integrated into the tissue and so disappear rapidly, although clinical trials have shown some evidence for their therapeutic benefit ». En effet, dans la lésion ischémique, le problème majeur en matière de transplantation de cellules souches est la perte substantielle de cellules transplantées, qui peut représenter jusqu'à 80-99% du nombre total de cellules greffées ¹⁹⁹. Cela peut conduire à de faibles taux de survie des cellules et à des résultats médiocres en matière de croissance, de localisation, de différenciation et d'effets paracrines ¹⁷⁴. Pour surmonter ces obstacles, nous avons pensé à protéger les cellules avec des biomatériaux et, plus précisément, des hydrogels, afin améliorer la thérapie par cellules souches et promouvoir son application clinique ^{200,201}.. Même s'il reste nécessaire d'optimiser ces biomatériaux pour la viabilité, la différenciation et la prolifération des cellules souches, une méta-analyse récente a révélé que les interventions basées sur les biomatériaux ont permis de réduire le volume des lésions et d'améliorer les résultats neurologiques dans des modèles de rongeurs victimes d'un AVC ²⁰² et que des hydrogels

injectables composés d'acide hyaluronane et de méthylcellulose permettent d'améliorer la survie et l'intégration des cellules souches après transplantation dans des modèles murins d'accident vasculaire cérébral ²⁰³.

c) LES HYDROGELS ET LA THERAPIE CELLULAIRE

Les recherches actuelles se concentrent donc sur le développement d'hydrogels injectables protégeant les cellules pendant l'administration et stimulant la régénération endogène ²⁰⁴. Le bénéfice apporté par les hydrogels est lié à leurs similitudes mécaniques et compositionnelles avec les tissus vivants. En effet, ils agissent comme des échafaudages 3D qui améliorent la survie et la différenciation des cellules souches, tant *in vivo* qu'*in vitro* ²⁰⁵. Composés de réseaux polymères, ils sont ainsi capables d'absorber et de retenir une grande quantité d'eau, ils sont modulables, injectables et ont été utilisés au fil des ans pour l'ingénierie tissulaire et diverses applications d'administration de médicaments ²⁰⁶⁻²⁰⁸. De plus, les hydrogels peuvent imiter les propriétés chimiques, physiques et mécaniques de la MEC pour favoriser l'adhésion, la prolifération et la différenciation des cellules ²⁰⁹.

L'acide hyaluronique (HA), constituant essentiel de la matrice extracellulaire et abondant dans le cerveau (notamment dans l'environnement endogène des cellules progénitrices neurales ²¹⁰), est un biopolymère de choix pour la conception d'hydrogels destinés à améliorer l'efficacité de cette thérapie ²¹⁰⁻²¹². En effet, les hydrogels à base d'HA ont été utilisés *in vitro* et *in vivo* pour favoriser la survie, la prolifération et la différenciation des cellules ^{213,214}.

I. POTENTIALISATION DE LA SURVIE CELLULAIRE DANS LA CAVITE ISCHEMIQUE

Dans un premier temps, avec une étudiante en thèse (L. Boisserand) que j'encadrerais à 50% avec le Prof Detante, nous avons pu mettre en évidence que les cellules injectées dans la cavité ischémique survivaient plus lorsqu'elles étaient protégées par un hydrogel de HA. Dans cette étude, nous avons évalué l'intérêt de l'utilisation d'un hydrogel synthétique à base de HA (HyStemTM-HP, Sigma), combiné à des CSM humaines de grade clinique injectées 7 jours après l'induction d'un accident ischémique cérébral chez le rat. Nous avons évalué les effets de cette combinaison hydrogel+CSMh sur la survie des cellules, le remodelage du cerveau et la récupération fonctionnelle (article en cours de rédaction).

Des CSMh ont été détectées, au jour 0 pour être sûr de la procédure d'administration intracérébrale (n=2 rats par groupe traité) et deux semaines après l'administration pour évaluer leur survie (n=4 par groupe traité). Enfin, nous avons détecté le noyau humain des CSMh au jour 29 (trois semaines après l'administration) chez 66% des rats du groupe HA-hydrogel+CSM

contre 20% dans le groupe CSM (Fig. 28). L'augmentation de la survie cellulaire médiée par la co-administration avec des biomatériaux est largement rapportée²¹³⁻²¹⁶. Zhong et al. par exemple, a démontré une augmentation de la survie en SC neurale en utilisant l'hydrogel HyStem-HP in vitro, les cellules cultivées dans l'hydrogel ont présenté une augmentation du taux de survie dans des conditions de privation de facteurs trophiques et de soutien nutritionnel (pour imiter les conditions ischémiques) par rapport au groupe de contrôle. Nos résultats confirment la protection des cellules souches médiée par l'hydrogel HA dans des conditions ischémiques.

Les réponses bénéfiques promues par les CSM sont principalement médiées par des actions paracrines²¹⁷. Les CSM sécrètent des facteurs trophiques qui stimulent la protection du cerveau lorsqu'ils sont administrés en phase aiguë, par exemple en modulant la réponse inflammatoire à l'ischémie²¹⁸. Les facteurs trophiques améliorent également les mécanismes impliqués dans la réparation du cerveau, tels que la neurogenèse²¹⁹ et l'angiogenèse²²⁰. Dans la présente étude, l'hydrogel HA a effectivement augmenté la survie des CSMh.

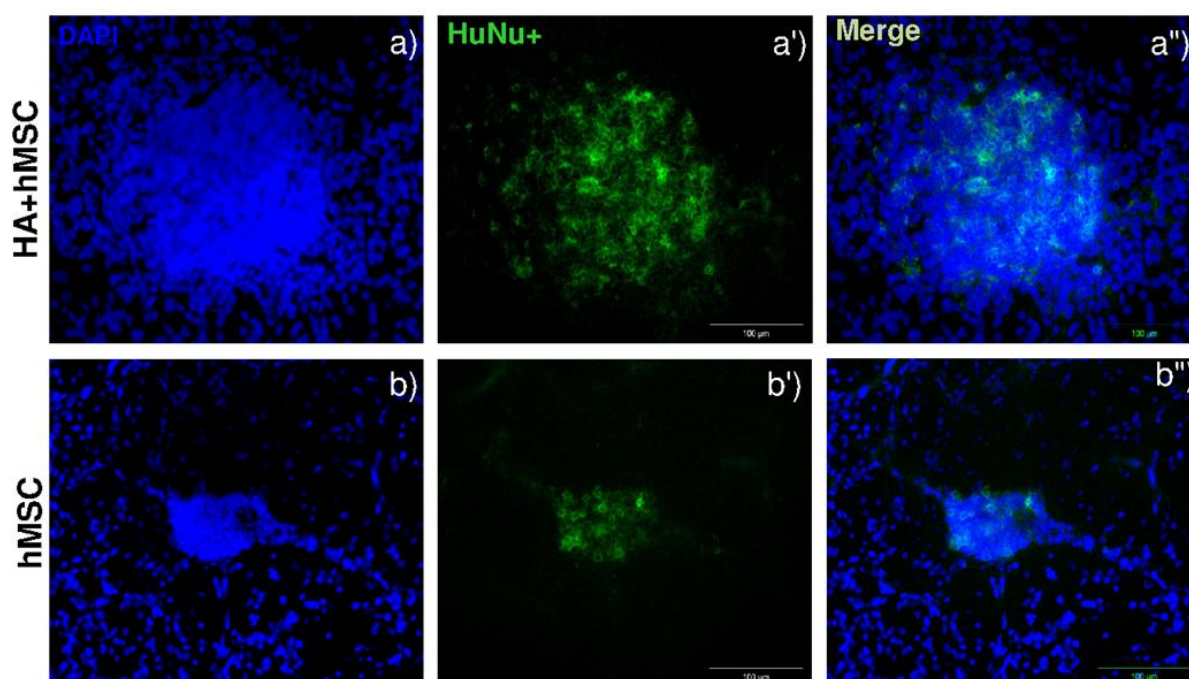


FIGURE 28 : Détection des cellules souches mésenchymateuses humaines implantées avec ou sans hydrogel dans la cavité ischémique de rats

Les cellules souches mésenchymateuses humaines ont été détectées dans les deux groupes de rats implantés avec des CSMh associées à un hydrogel (HA-hMSC) et avec des cellules seules (hMSC) en utilisant un marqueur de cellules à noyau humain (HuNu). Images représentatives de cellules humaines marquées par l'anticorps HuNu péri-nucléaire (en vert) bien co-localisées avec le marqueur d'ADN nucléaire 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI) en bleu dans le groupe HA-hMSC : DAPI **a**, HuNu **a'**, merge **a''** et hMSC : DAPI **b**, HuNu **b'** et merge **b''** 21 jours après l'administration (au jour 29).

II. LES GELS D'ACIDE HYALURONIQUE AUTO-REPARANTS

Face à ces résultats prometteurs, nous nous sommes intéressés aux différentes propriétés offertes par les différents types de polymères naturels développés. Les hydrogels existent dans un nombre étourdissant de variétés et sont fondamentalement une classe de matériaux flexibles faits de polymères réticulés et d'eau. Parmi eux, on retrouve l'acide hyaluronique (HA).

Les hydrogels auto-réparants reposent sur un principe commun impliquant une phase dite « mobile », qui permet la fermeture des fissures par une combinaison de transfert de masse et de reconnexion des liens brisés au sein de la matrice de l'hydrogel. La reconnexion au sein de cette matrice est généralement médiée par des liaisons non covalentes ou covalentes (Fig. 29). Les interactions non covalentes sont basées sur des liaisons sacrificielles faibles telles que les liaisons ioniques, l'hydrogène ou hydrophobes, tandis que les liaisons chimiques sont basées sur des liaisons covalentes dynamiques et des liaisons de coordination métalliques. La combinaison des liaisons covalentes et non covalentes mentionnées ci-dessus a également été utilisée récemment pour générer des hydrogels à double réseau mécaniquement résistants et élastiques avec des propriétés d'autoréparation rapide ²²¹.

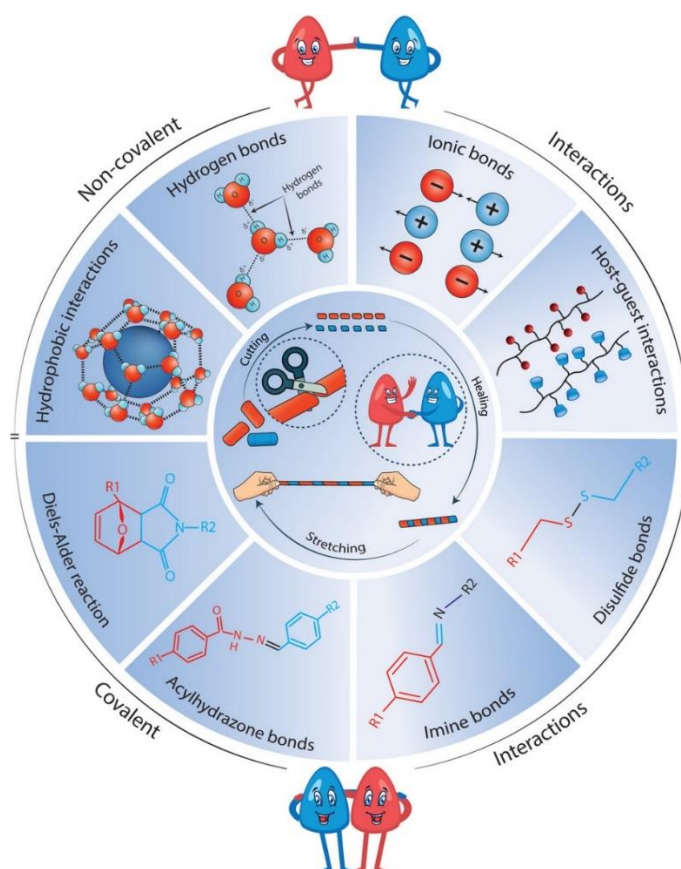


FIGURE 29 : Les différentes interactions chimiques et non covalentes à l'origine des hydrogels auto-réparants ²²¹

L'HA est un polysaccharide omniprésent dans le corps et déjà largement utilisé en médecine d'où l'intérêt grandissant qu'il suscite en recherche fondamentale pour élaborer des hydrogels. En tant que constituant principal de la matrice extracellulaire (MEC), ce polysaccharide joue des rôles structuraux et biologiques majeurs. Cependant, pour tirer vraiment profit de ses propriétés uniques, il est important de comprendre comment des hydrogels dérivés de ce polysaccharide peuvent imiter au mieux les tissus vivants – non seulement en matière de propriétés statiques, mais aussi, lorsqu'ils ont un comportement dynamique. En effet, seuls quelques hydrogels à base de HA ont été administrés par voie intracérébrale (IC) ^{204,210,214} lors d'essais précliniques et leur performance et biocompatibilité se trouvent affectées par les groupements fonctionnels introduits sur le HA pour le réticuler. Il existe donc un réel besoin de disposer d'hydrogels de HA injectables et auto-réparants biocompatibles.

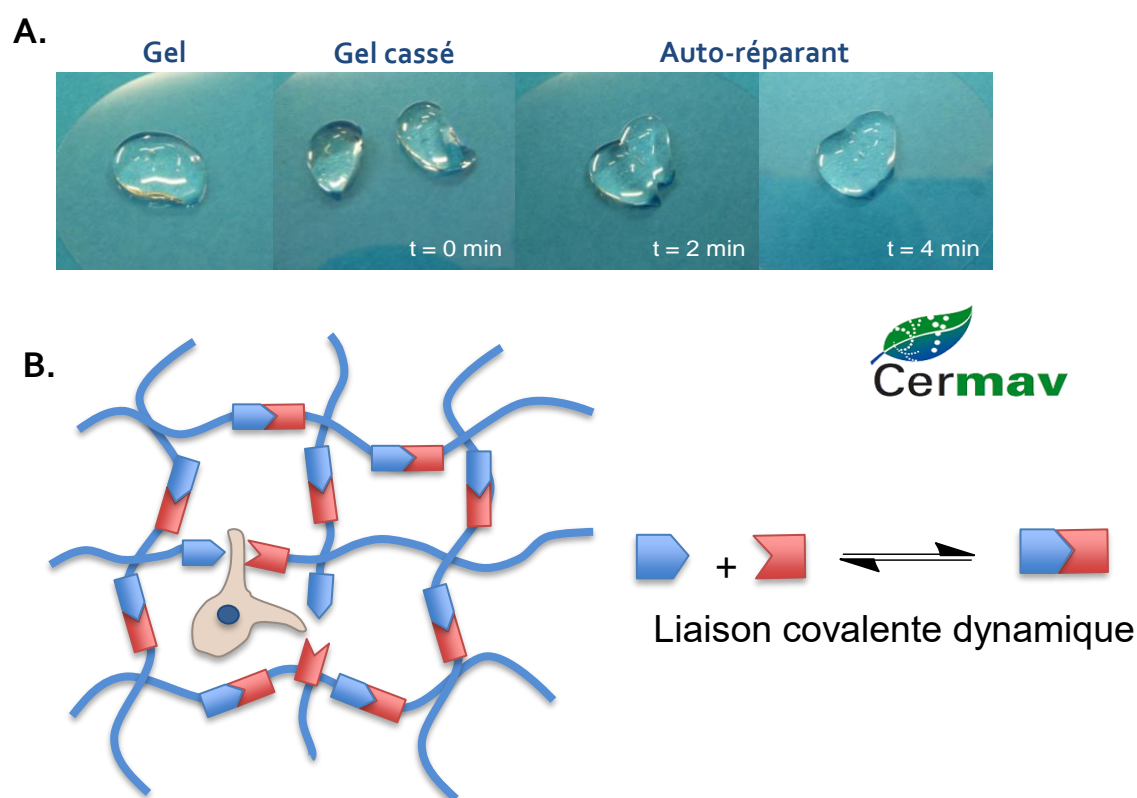


FIGURE 30 : Visualisation des caractéristiques d'auto-réparation des hydrogels auto-réparants : le réseau de l'hydrogel peut gérer les dommages externes et se réparer

A. Visualisation des capacités d'auto-réparation des hydrogels d'acide hyaluronique dynamiques covalents réticulés par des liaisons covalentes de type esters boronate développés par la Prof. Auzély au CERMAV. B. Schématisation de la dynamique des liaisons de type esters boronate

Des polymères qui peuvent s'auto-réticuler dans des conditions douces pour former des hydrogels, capables de se déstructurer jusqu'à un état liquide sous une contrainte de cisaillement (injectables) et de s'auto-réparer lorsque la contrainte appliquée est supprimée

(auto-réparants), suscitent donc beaucoup d'intérêt. C'est dans ce contexte que nous avons établi une collaboration avec des chimistes grenoblois (Prof Auzély) spécialistes des gels de HA qui peuvent, de plus, les fonctionnaliser (Brevet : WO2014072330 A1). En effet, elle a développé des hydrogels d'HA dynamiques covalents, réticulés par des liaisons covalentes réversibles de type esters boronate (Fig. 30) ²²². Cette famille d'hydrogels intéresse actuellement beaucoup les scientifiques du fait de leur propriétés d'auto-réparation. Du fait de leur capacité à être extrudés au travers d'une aiguille et à récupérer quasi-instantanément leurs propriétés mécaniques, ces gels peuvent être injectés de manière très peu invasive (Fig. 31). Cette caractéristique en fait des candidats très prometteurs pour augmenter la survie des cellules souches implantées en thérapie cellulaire. Par ailleurs, la nature dynamique de leurs pontages permet le remodelage local de la matrice par les cellules, ce qui est très favorable à la prolifération des cellules, une condition indispensable pour la formation de tissus.

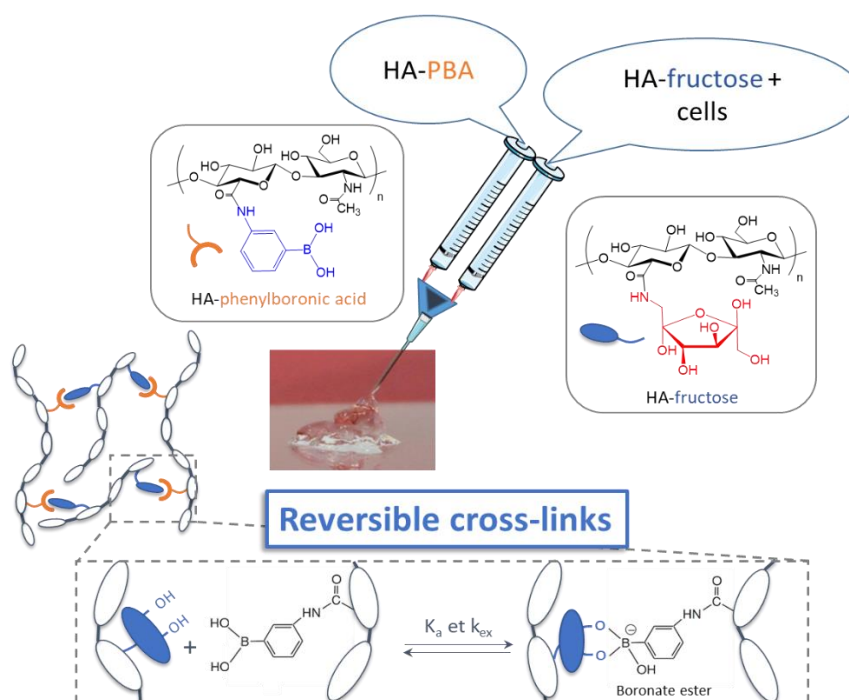


FIGURE 31: Formation d'hydrogels d'acide hyaluronique injectables et auto-réparants grâce à des liaisons via les esters boronate

III. TOXICITE DE L'HYDROGEL D'ACIDE HYALURONIQUE *IN VITRO*

L'hydrogel de HA-PBA/Fructose doit avoir pour rôle principal de protéger les cellules dans la zone ischémique. La cinétique de gélification du mélange HA-PBA/HA-Fructose doit être suffisamment rapide pour que les cellules soient incorporées de façon homogène dans la matrice. Le processus de gélification, qui impose aux cellules de subir une contrainte de

cisaillement, ne doit pas induire de cytotoxicité. Dans un premier temps, grâce au co-encadrement de trois étudiants de Master 2 et d'une post-doctorante avec Rachel Auzély (un biologiste et deux chimistes dont un avec financement IDEX Glyco@Ips), nous avons donc évalué la toxicité des différents hydrogels aux compositions et propriétés variables grâce au test Live/Dead. Nous avons pu comparer ces résultats à ceux que l'on avait obtenu avec l'hydrogel de HA commercial (HyStemTM-HP, Sigma). Ce test permet la visualisation des cellules vivantes (vertes) et mortes (rouge).

Dans le cadre du co-encadrement des étudiants en master 2, nous avons pu étudier la cytotoxicité des gels de HA-PBA/HA-Fructose sur les CSMh de grade clinique à plusieurs reprises dans le cadre de la caractérisation et la mise en évidence de la reproductibilité de fabrication des hydrogels. Les CSMh cultivées en 2D adhèrent au plastique et sont d'apparence fibroblastique contrairement aux CSMh cultivées 3D qui apparaissent avec une morphologie arrondie et dispersées dans l'hydrogel (Fig. 32A.). Par ailleurs, les tests de toxicité obtenus après 3 et 7 jours de mise en culture des CSMh dans l'hydrogel d'HA ont montré une légère augmentation de la mortalité cellulaire (non significative) par rapport aux conditions de culture 2D contrôle au bout de 7 jour de culture (Fig. 12B.). Cependant, cette augmentation de la mortalité reste à moduler car mises en culture en 3D dans un hydrogel d'HA commercial (HyStemTM-HP, Sigma), le taux de survie de CSMh n'était plus que de 55% dès 3 jours de culture (ligne orange en pointillés sur l'histogramme Fig. 32B.). Ces données peuvent nous laisser penser que les hydrogels auto-réparants auront donc une encore meilleure efficacité en termes de survie cellulaire au sein de la zone ischémique que le HyStemTM-HP que nous avons testé puisqu'ils permettent une meilleure survie cellulaire suite à l'injection des CSMh. Ce point est un des points que je souhaiterai développer dans mes projets de recherche au cours des prochaines années afin de pouvoir évaluer la combinaison hydrogel de HA et CSMh en termes de récupération cérébrale tout en continuant les interactions avec le Prof. Olivier Detante afin de pouvoir proposer des solutions viables et sécurisées aux patients post-AVC.

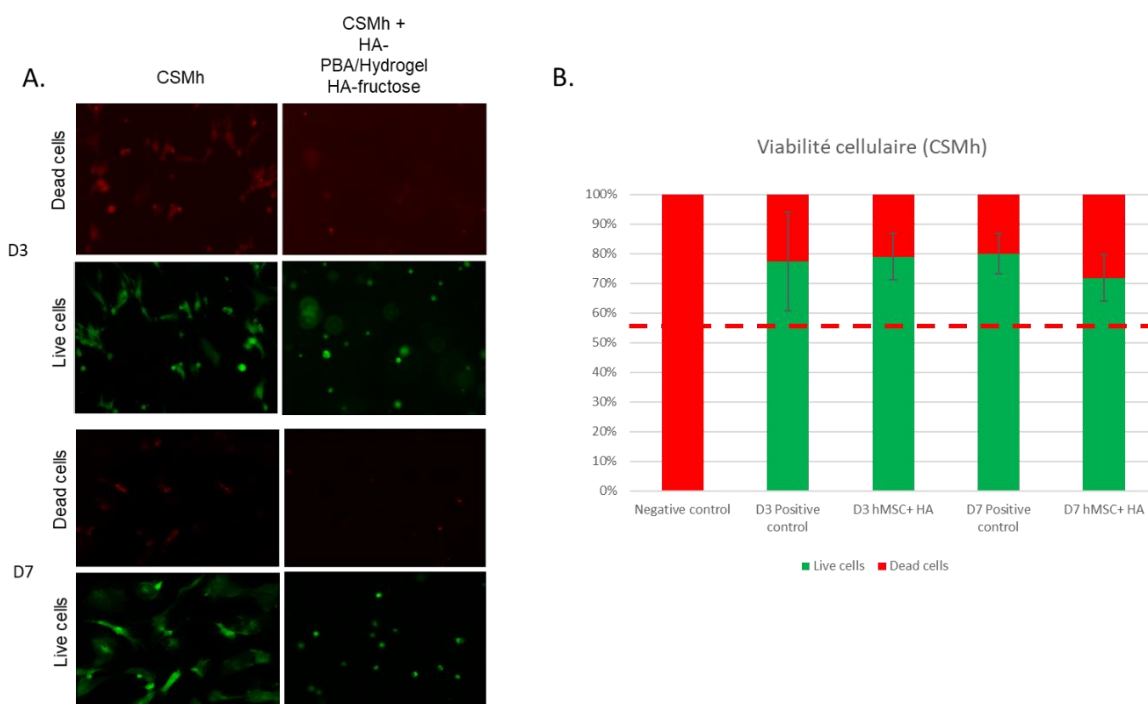


FIGURE 32: Evaluation de la toxicité de l'hydrogel d'acide hyaluronique sur les CSMhs par le test de cytotoxicité Live/Dead.

A. Cellules souches mésenchymateuses humaines de grade clinique (A. Moisan, EFS Grenoble) mise en culture en 2D ou en 3D dans de l'hydrogel d'acide hyaluronique PBA/Fructose durant 3 (D3) ou 7 jours (D7). En rouge : cellules mortes ; en vert : cellules vivantes. **B.** Evaluation de la viabilité cellulaire après 3 et 7 jours de culture des CSMh. En pointillés, la viabilité obtenues pour des CSMh mises en culture 3 et 7 jours dans du gel HyStem™-HP, Sigma.

Dans le cadre de cette collaboration avec la Prof. Auzély, j'ai pu encadrer une partie des travaux de post-doctorat de Tamiris Figueiredo qui ont donné lieu à une publication en 2020 dont je suis co-auteur ²²³. Elle a pu ainsi démontrer que de nouveaux hydrogels covalents dynamiques injectables à un pH physiologique en utilisant la complexation de benzoxaborine-saccharide comme méthode de réticulation réversible permettaient d'obtenir une viabilité de plus de 80% de fibroblastes après 7 jours de culture. Cet hydrogel a montré d'excellents comportements d'auto-réparation et d'injectabilité dans des conditions aqueuses et s'est révélé sensible au pH. Cette nouvelle classe d'hydrogel réticulé à base de boronate-ester pourrait donc s'avérer être aussi un bon candidat pour des applications de thérapie cellulaire.

IV. SUIVI DU DEVENIR DES ACTEURS DES THERAPIES CELLULAIRES POTENTIALISEES PAR DES BIOMATERIAUX *IN VIVO*

Les hydrogels de HA auto-réparant semblent donc de bons candidats pour potentialiser la thérapie cellulaire dans le cadre de la récupération post-AVC. Cependant, en ce qui concerne

l'application clinique, le suivi des hydrogels en temps réel après injection est un vrai défi en termes d'imagerie non invasive et reste un problème non résolu.

a) SUIVI DU DEVENIR DES HYDROGELS D'ACIDE HYALURONIQUE PAR IRM

Les fonctionnalisations possibles des hydrogels d'acide hyaluronique devraient nous permettre de suivre *in vivo* le devenir des gels. Dans cet objectif, nous avons obtenu avec la Prof. Auzély un financement en Co-PI de la Fondation pour la Recherche Médicale (Appel d'offre Chemistry for Medecine) en 2019. Le but de ce projet est de développer et d'évaluer *in vitro* et *in vivo* des « Hydrogels à base de polysaccharides injectables et auto-réparants à capacité d'imagerie pour la thérapie cellulaire ». Dans ce projet, nous co-encadrons une post-doctorante (Vanina Cosenza) qui doit fonctionnaliser sur mesure des hydrogels avec des agents de contraste IRM pour permettre un suivi en temps réel de leur distribution et de leur dégradation *in vivo* avec une grande sélectivité et sensibilité. Les observations non invasives et successives pourront fournir des informations efficaces et minimiser les différences inter-individuelles observées entre les animaux, ce qui pourrait faciliter le passage à la clinique de la transplantation de cellules médiée par hydrogel. Ce projet prévoit deux types de modifications : modifications avec du DOTA-Gd (agent de contraste utilisé en clinique) ou des peptides, qui nous permettront de développer l'imagerie CEST. Pour potentialiser les effets de notre thérapie, nous évaluerons en parallèle les effets de deux types cellulaires implantés chez des rats ischémiés : les cellules souches mésenchymateuses humaines de grade clinique, déjà étudiées sans hydrogel, et des CSPN issues d'IPS humaines (Phenocell)²²⁴. En effet, comme décrit ensuite dans le manuscrit, l'intérêt croissant de l'utilisation des CSNP en thérapie de pathologies cérébrales est notamment supporté par les résultats d'essais cliniques, notamment en thérapie de l'AVC. En effet, une étude de phase I dans laquelle des cellules souches neurales immortalisées (CTXo3) sont implantées dans le putamen ipsi-latéral par rapport à la lésion chez des patients post-AVC viennent d'être publiés²²⁵ et de montrer, après deux ans de suivi, que cette implantation n'avait aucun effet néfaste pour le patient permettant d'espérer un avenir prometteur pour cette source cellulaire et ce type d'injection.

b) SUIVI DU DEVENIR DES HYDROGELS D'ACIDE HYALURONIQUE ET DES CELLULES
THERAPEUTIQUES PAR TOMOGRAPHIE SPECTRALE A COMPTAGE DE PHOTONS
UNIQUE

Dans un second temps, j'ai pu être impliquée, du fait de mon expertise en thérapie cellulaire et mon interdisciplinarité entre imagerie/physiopathologie, dans un projet ANR

(BREAKTHRU) porté par Marlène Wiart (CarMeN, Université Claude Bernard Lyon 1, Inserm U1060 INSA Lyon, INRA U11397). Dans ce projet, je suis co-encadrante d'un étudiant en thèse (Moustoifa Said) co-dirigé par le Prof Detante et la Prof Auzély. Ce projet, à l'interface entre l'imagerie, la chimie et la biologie, a pour objectif de monitorer de manière précise et non invasive le devenir des composants d'un produit médical composé d'un bio-hydrogel et de CSMh dans le cadre d'un modèle AVC chez le rat (oACM) dans le but d'un transfert clinique. L'IRM et la tomographie assistée par ordinateur (CT) à rayons X sont les principales technologies radiologiques 3D utilisées dans le monde et sont privilégiées pour suivre le devenir de cellules injectées en clinique^{226,227}. Cependant, une des limites de ces deux approches est le fait que le signal produit par les cellules marquées avec un agent de contraste donné n'est pas spécifique : il est donc impossible de distinguer le signal des cellules marquées de signaux endogènes similaires (microhémorragies ou des calcifications par exemple), ou de signaux exogènes similaires (un autre agent de contraste distinct). La tomographie spectrale à comptage de photons unique (SPCCT) ou multicolore est en cours de développement et devrait constituer la prochaine génération de tomographie spectrale. Elle permet la visualisation sélective et la quantification de plusieurs agents de contraste en un seul balayage en exploitant la discontinuité du bord K dans l'absorption des rayons X. L'objectif principal de BREAKTHRU est donc de développer l'imagerie bicolore en utilisant la SPCCT spectrale dans le but de suivre pendant plusieurs semaines le devenir des cellules thérapeutiques, d'une part, et des hydrogels d'enrobage cellulaire, d'autre part, après leur transplantation dans des modèles de rongeurs atteints de maladies chroniques, dont l'AVC et de démontrer sa valeur ajoutée pour l'évaluation de l'efficacité thérapeutique de la médecine régénérative, en complément du critère de résultat de santé et du suivi multiparamétrique par IRM. Dans ce projet, l'hydrogel modifié pour être imagé par SPCCT sera, quant à lui, développé, sous la direction de la Prof. Auzély, par Moustoifa Said puis testé, sous ma direction, *in vitro* et *in vivo*. J'ai en charge la partie liée à l'évaluation du produit médical dans la cadre de l'AVC par IRM multiparamétrique. Ces données devraient compléter et renforcer celles obtenues par ailleurs en termes de toxicité et d'effet de la thérapie cellulaire combinée aux biomatériaux dans le but de récupération cérébrale.

V. POTENTIALISATION DE LA THERAPIE CELLULAIRE REGENERATIVE POST-ACCIDENT VASCULAIRE CEREBRAL PAR LES CELLULES SOUCHES/PROGENITRICES NEURALES ASSOCIEES AUX HYDROGELS

Enfin, puisqu'au niveau tissulaire, les tissus lésés suite à une ischémie cérébrale ont une certaine capacité de récupération notamment médiée par CSNP endogènes, ces cellules

semblent être des candidats intéressants pour la thérapie cellulaire post-AVC. Les CSNP peuvent être extraites de trois sources principales à des fins thérapeutiques : extraction directe du tissu cérébral (en particulier des régions paraventriculaires ou du bulbe olfactif), différenciation à partir de cellules souches pluripotentes et transdifférenciation à partir de cellules somatiques comme les fibroblastes de la peau, les cellules tubulaires rénales de l'urine et les cellules sanguines.

Les CSNP exogènes peuvent migrer dans les zones cérébrales ischémiques, où elles peuvent se différencier en neurones ou en astrocytes et favoriser la prolifération et la différenciation des CSNP endogènes²²⁸⁻²³⁰. Par ailleurs, l'administration de NSC humaines dans un modèle AVC de rat a mis en évidence des effets neuroprotecteurs par une augmentation des ramifications dendritiques, des projections du tractus corticospinal et en inhibant l'inflammation^{231,232}.

Cependant, la problématique de potentialisation des effets des CSNP en les combinant avec des biomatériaux reste d'actualité et plusieurs études ont démontré l'effet protecteur des hydrogels sur les CSNP^{214,233}. Ainsi, il a démontré que l'injection combinée de matrigel et CSNP dans la cavité de l'infarctus pouvaient améliorer le résultat fonctionnel, avec des effets notables plusieurs semaines après la lésion initiale due à l'AVC chez le rat²¹⁵.

Dans ce contexte, nous avons voulu évaluer le comportement de CSPN issues de zone sub-ventriculaire de souris dans les hydrogels auto-réparants développés par la Prof. Auzély. Les différents hydrogels testés ont été greffés avec différents pourcentage de RDG par Tamiris Figueiredo afin d'évaluer une éventuelle influence sur la migration ou/ou la survie des cellules dans ce biomatériaux (Fig. 33). Les cellules se développent en 3D au sein de l'hydrogel même après plusieurs jours de culture, s'organisent en neurosphères et migrent au sein de la structure.

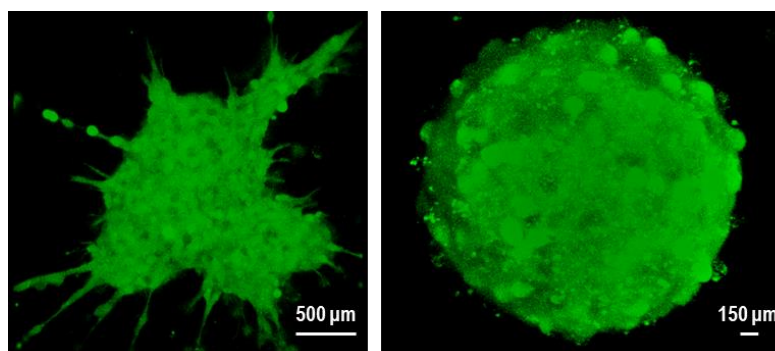


FIGURE 33 : CSPN de souris en culture 3D durant 7 jours dans un hydrogel d'acide hyaluronique
Visualisation en 3D de CSPN issues de zone sub-ventriculaire de souris en culture durant 7 jours dans un hydrogel d'acide hyaluronique par microscopie adaptative (Confobritgh ; Alexei Grichine, Antoine Delon, Plate-forme de microscopie de l'IAB) après marquage des cellules à la calcéine

Les premiers résultats encourageants obtenus nous laissent supposer un intérêt clinique fort de cette combinaison CSPN-hydrogel. Dans ce cadre et en étroite collaboration avec Anaick Moisan (EFS, unité de thérapie cellulaire et tissulaire, Grenoble) et Olivier Detante, l'intérêt de CSNP issues d'IPS humaines (Phenocell) pour la thérapie cellulaire post-AVC va être évalué. Le but de cette partie de mes projets de recherche est d'obtenir des données précliniques sur la sécurité, la biodistribution dans le corps entier et les mécanismes d'action de la thérapie cellulaire intracérébrale combinée à l'hydrogel d'acide hyaluronique afin de planifier des essais cliniques pionniers ultérieurs en médecine régénérative post-accidents vasculaires cérébraux.

Ce travail très transversal basé sur de fortes collaborations multidisciplinaires, les savoir-faire présents au sein de l'équipe (IRM multiparamétrique, analyse d'images, comportement, biologie cellulaire et biologie moléculaire) devrait permettre de contribuer à l'évaluation préclinique de biomatériaux à haut potentiel clinique associés à des cellules de grade clinique (ou en cours de validation pour) dans le cadre de la thérapie cellulaire et ainsi ouvrir la voie à une aide plus efficace pour les patients victimes d'un accident vasculaire cérébral.

BIBLIOGRAPHIE

1. Hosoya, H. *et al.* Developmental expression of the neural adhesion molecule F3 in the rat brain. *Neurosci Lett* **186**, 83–6 (1995).
2. Yoshihara, Y. *et al.* Overlapping and differential expression of BIG-2, BIG-1, TAG-1, and F3: four members of an axon-associated cell adhesion molecule subgroup of the immunoglobulin superfamily. *J Neurobiol* **28**, 51–69 (1995).
3. Pierre, K. *et al.* Regulated expression of the cell adhesion glycoprotein F3 in adult hypothalamic magnocellular neurons. *J Neurosci* **18**, 5333–5343 (1998).
4. Olive, S., Rougon, G., Pierre, K. & Theodosis, D. T. Expression of a glycosyl phosphatidylinositol-anchored adhesion molecule, the glycoprotein F3, in the adult rat hypothalamo-neurohypophysial system. *Brain Res.* **689**, 271–80 (1995).
5. De Benedictis, L. *et al.* Alternative promoters drive the expression of the gene encoding the mouse axonal glycoprotein F3/contactin. *Brain Res Mol Brain Res* **95**, 55–74 (2001).
6. Rome, C., Roullot, V. & Couillaud, F. Polymorphism of the untranslated regions of the F3/contactin mRNA in the rat nervous system. *Mol. Brain Res.* **139**, 184–191 (2005).
7. Rome, C., Loiseau, H., Arsaut, J., Roullot, V. & Couillaud, F. Diversity of contactin mRNA in human brain tumors. *Mol. Carcinog.* **45**, 774–785 (2006).
8. Rome, C., Arsaut, J., Taris, C., Couillaud, F. & Loiseau, H. MMP-7 (Matrilysin) expression in human brain tumors. *Mol. Carcinog.* **46**, 446–452 (2007).
9. Arai, Y. *et al.* Control of delivered gene expression in chondrocytes using heat shock protein 70B promoter. *J Rheumatol* **26**, 1769–74 (1999).
10. Blackburn, R. V., Galoforo, S. S., Corry, P. M. & Lee, Y. J. Adenoviral-mediated transfer of a heat-inducible double suicide gene into prostate carcinoma cells. *Cancer Res* **58**, 1358–62 (1998).
11. Braiden, V. *et al.* Eradication of breast cancer xenografts by hyperthermic suicide gene therapy under the control of the heat shock protein promoter. *Hum Gene Ther* **11**, 2453–63 (2000).
12. Eker, O. F. *et al.* Combination of Cell Delivery and Thermoinducible Transcription for in Vivo Spatiotemporal Control of Gene Expression: A Feasibility Study. *Radiology* **258**, 496–504 (2011).
13. Madio, D. P. *et al.* On the feasibility of MRI-guided focused ultrasound for local induction of gene expression. *J Magn Reson Imaging* **8**, 101–4 (1998).
14. Huang, Q. *et al.* Heat-induced gene expression as a novel targeted cancer gene therapy strategy. *Cancer Res* **60**, 3435–9 (2000).
15. Smith, R. C., Machluf, M., Bromley, P., Atala, A. & Walsh, K. Spatial and temporal control of transgene expression through ultrasound-mediated induction of the heat shock protein 70B promoter in vivo. *Hum Gene Ther* **13**, 697–706 (2002).
16. Vekris, A. *et al.* Control of transgene expression using local hyperthermia in combination with a heat-sensitive promoter. *J Gene Med* **2**, 89–96 (2000).
17. Guilhon, E. *et al.* Image-guided control of transgene expression based on local hyperthermia. *Mol Imaging* **2**, 11–7 (2003).
18. Guilhon, E. *et al.* Spatial and temporal control of transgene expression in vivo using a heat-sensitive promoter and MRI-guided focused ultrasound. *J Gene Med* **5**, 333–42 (2003).
19. Rome, C., Couillaud, F. & Moonen, C. T. W. Spatial and temporal control of expression of therapeutic genes using heat shock protein promoters. *Methods* **35**, 188–198 (2005).
20. Letavernier, B. *et al.* Ultrasound-Induced Expression of a Heat Shock Promoter-Driven Transgene Delivered in the Kidney by Genetically Modified Mesenchymal Stem Cells: A Feasibility Study. *MRI-Guid. Focus. Ultrasound Surg.* 171 (2007).
21. Rome, C. Contrôle spatio-temporel de l'expression transgénique in vivo chez le petit animal par les ultrasons focalisés guidés par IRM de température. (2007).
22. Rome, C., Couillaud, F. & Moonen, C. T. W. Gene expression and gene therapy imaging. *Eur. Radiol.* **17**, 305–319 (2007).
23. Rome, C., Deckers, R. & Moonen, C. T. The use of ultrasound in transfection and transgene expression. *Handb. Exp. Pharmacol.* **185**, 225 (2008).
24. Denis de Senneville, B., Quesson, B. & Moonen, C. T. Magnetic resonance temperature imaging. *Int J Hyperth.* **21**, 515–31 (2005).
25. Hokland, S. L. *et al.* MRI-guided focused ultrasound: methodology and applications. *IEEE Trans Med Imaging* **25**, 723–31 (2006).
26. Eker, O. *et al.* In vivo spatio-temporal control of gene expression using a cellular vector in the rat kidney. in (ed. ESMI) (ESMI, 2009).
27. Wang, S., Diller, K. R. & Aggarwal, S. J. Kinetics study of endogenous heat shock protein 70 expression. *J Biomech Eng* **125**, 794–7 (2003).

28. Deckers, R. *et al.* Image-guided, noninvasive, spatiotemporal control of gene expression. *Proc Natl Acad Sci U A* **106**, 1175–80 (2009).
29. Hundt, W., O'Connell-Rodwell, C. E., Bednarski, M. D., Steinbach, S. & Guccione, S. In vitro effect of focused ultrasound or thermal stress on HSP70 expression and cell viability in three tumor cell lines. *Acad Radiol* **14**, 859–70 (2007).
30. Kratchmarova, I., Blagoev, B., Haack-Sorensen, M., Kassem, M. & Mann, M. Mechanism of divergent growth factor effects in mesenchymal stem cell differentiation. *Science* **308**, 1472–7 (2005).
31. Pittenger, M. F. *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* **284**, 143–7 (1999).
32. Reiser, J. *et al.* Potential of mesenchymal stem cells in gene therapy approaches for inherited and acquired diseases. *Expert Opin Biol Ther* **5**, 1571–84 (2005).
33. van der Horst, G. *et al.* Differentiation of murine preosteoblastic KS483 cells depends on autocrine bone morphogenetic protein signaling during all phases of osteoblast formation. *Bone* **31**, 661–9 (2002).
34. Sampath, T. K. *et al.* Recombinant human osteogenic protein-1 (hOP-1) induces new bone formation in vivo with a specific activity comparable with natural bovine osteogenic protein and stimulates osteoblast proliferation and differentiation in vitro. *J Biol Chem* **267**, 20352–62 (1992).
35. Franceschi, R. T. The developmental control of osteoblast-specific gene expression: role of specific transcription factors and the extracellular matrix environment. *Crit Rev Oral Biol Med* **10**, 40–57 (1999).
36. Franceschi, R. T. & Xiao, G. Regulation of the osteoblast-specific transcription factor, Runx2: responsiveness to multiple signal transduction pathways. *J Cell Biochem* **88**, 446–54 (2003).
37. Banerjee, C. *et al.* Differential regulation of the two principal Runx2/Cbfa1 n-terminal isoforms in response to bone morphogenetic protein-2 during development of the osteoblast phenotype. *Endocrinology* **142**, 4026–39 (2001).
38. Coll, J. L. *et al.* In vivo delivery to tumors of DNA complexed with linear polyethylenimine. *Hum Gene Ther* **10**, 1659–66 (1999).
39. Anderson, W. F. Human gene therapy. *Nature* **392**, 25–30 (1998).
40. Cross, D. & Burmester, J. K. Gene therapy for cancer treatment: past, present and future. *Clin Med Res* **4**, 218–27 (2006).
41. Hoag, H. Gene therapy rising? *Nature* **435**, 530–1 (2005).
42. Essner, J. J., Mclvor, R. S. & Hackett, P. B. Awakening gene therapy with Sleeping Beauty transposons. *Curr Opin Pharmacol* **5**, 513–9 (2005).
43. Hackett, P. B., Largaespada, D. A. & Cooper, L. J. A transposon and transposase system for human application. *Mol Ther* **18**, 674–83 (2010).
44. Hodges, B. L. & Cheng, S. H. Cell and gene-based therapies for the lysosomal storage diseases. *Curr Gene Ther* **6**, 227–41 (2006).
45. Lavigne, M. D. & Gorecki, D. C. Emerging vectors and targeting methods for nonviral gene therapy. *Expert Opin Emerg Drugs* **11**, 541–57 (2006).
46. Izsvak, Z., Hackett, P. B., Cooper, L. J. & Ivics, Z. Translating Sleeping Beauty transposition into cellular therapies: victories and challenges. *Bioessays* **32**, 756–67 (2010).
47. Fernando, S. & Fletcher, B. S. Sleeping beauty transposon-mediated nonviral gene therapy. *BioDrugs* **20**, 219–29 (2006).
48. Hackett, P. B., Ekker, S. C., Largaespada, D. A. & Mclvor, R. S. Sleeping beauty transposon-mediated gene therapy for prolonged expression. *Adv Genet* **54**, 189–232 (2005).
49. Horie, K. *et al.* Efficient chromosomal transposition of a Tc1/mariner-like transposon Sleeping Beauty in mice. *Proc Natl Acad Sci U A* **98**, 9191–6 (2001).
50. Huang, X. *et al.* Sleeping Beauty Transposon-mediated Engineering of Human Primary T Cells for Therapy of CD19(+) Lymphoid Malignancies. *Mol Ther* **16**, 580–589 (2008).
51. Ivics, Z. & Izsvak, Z. Transposons for gene therapy! *Curr Gene Ther* **6**, 593–607 (2006).
52. Cui, Z., Geurts, A. M., Liu, G., Kaufman, C. D. & Hackett, P. B. Structure-function analysis of the inverted terminal repeats of the sleeping beauty transposon. *J Mol Biol* **318**, 1221–35 (2002).
53. Ivics, Z., Hackett, P. B., Plasterk, R. H. & Izsvak, Z. Molecular reconstruction of Sleeping Beauty, a Tc1-like transposon from fish, and its transposition in human cells. *Cell* **91**, 501–10 (1997).
54. Converse, A. D. *et al.* Counterselection and co-delivery of transposon and transposase functions for Sleeping Beauty-mediated transposition in cultured mammalian cells. *Biosci Rep* **24**, 577–94 (2004).
55. Fischer, S. E., Wienholds, E. & Plasterk, R. H. Regulated transposition of a fish transposon in the mouse germ line. *Proc Natl Acad Sci U A* **98**, 6759–64 (2001).
56. Geurts, A. M. *et al.* Gene transfer into genomes of human cells by the sleeping beauty transposon system. *Mol Ther* **8**, 108–17 (2003).
57. Luo, G., Ivics, Z., Izsvak, Z. & Bradley, A. Chromosomal transposition of a Tc1/mariner-like element in mouse embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U A* **95**, 10769–73 (1998).
58. Rusk, N. A prince for Sleeping Beauty. *Nat Methods* **4**, 10 (2007).

59. Score, P. R. *et al.* Sleeping Beauty-mediated transposition and long-term expression in vivo: use of the LoxP/Cre recombinase system to distinguish transposition-specific expression. *Mol Ther* **13**, 617–24 (2006).
60. Liu, H., Liu, L., Fletcher, B. S. & Visner, G. A. Sleeping Beauty-based gene therapy with indoleamine 2,3-dioxygenase inhibits lung allograft fibrosis. *Faseb J* **20**, 2384–6 (2006).
61. Liu, L., Mah, C. & Fletcher, B. S. Sustained FVIII expression and phenotypic correction of hemophilia A in neonatal mice using an endothelial-targeted sleeping beauty transposon. *Mol Ther* **13**, 1006–15 (2006).
62. Liu, L. *et al.* Endothelial targeting of the Sleeping Beauty transposon within lung. *Mol Ther* **10**, 97–105 (2004).
63. Montini, E. *et al.* In vivo correction of murine tyrosinemia type I by DNA-mediated transposition. *Mol Ther* **6**, 759–69 (2002).
64. Ohlfest, J. R. *et al.* Combinatorial antiangiogenic gene therapy by nonviral gene transfer using the sleeping beauty transposon causes tumor regression and improves survival in mice bearing intracranial human glioblastoma. *Mol Ther* **12**, 778–88 (2005).
65. Alton, E. W. *et al.* Cationic lipid-mediated CFTR gene transfer to the lungs and nose of patients with cystic fibrosis: a double-blind placebo-controlled trial. *Lancet* **353**, 947–54 (1999).
66. Bell, J. B. *et al.* Preferential delivery of the Sleeping Beauty transposon system to livers of mice by hydrodynamic injection. *Nat Protoc* **2**, 3153–65 (2007).
67. Zou, Y., Zong, G., Ling, Y. H. & Perez-Soler, R. Development of cationic liposome formulations for intratracheal gene therapy of early lung cancer. *Cancer Gene Ther* **7**, 683–96 (2000).
68. Davidson, D. J. *et al.* Lung disease in the cystic fibrosis mouse exposed to bacterial pathogens. *Nat Genet* **9**, 351–7 (1995).
69. Fortunati, E., Bout, A., Zanta, M. A., Valerio, D. & Scarpa, M. In vitro and in vivo gene transfer to pulmonary cells mediated by cationic liposomes. *Biochim Biophys Acta* **1306**, 55–62 (1996).
70. Guillaume-Gable, C. *et al.* Cationic phosphonolipids as nonviral gene transfer agents in the lungs of mice. *Hum Gene Ther* **9**, 2309–19 (1998).
71. McLachlan, G. *et al.* Evaluation in vitro and in vivo of cationic liposome-expression construct complexes for cystic fibrosis gene therapy. *Gene Ther* **2**, 614–22 (1995).
72. Oudrhiri, N. *et al.* Gene transfer by guanidinium-cholesterol cationic lipids into airway epithelial cells in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 1651–6 (1997).
73. Boussif, O. *et al.* A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 7297–301 (1995).
74. Erbacher, P. *et al.* Genuine DNA/polyethylenimine (PEI) complexes improve transfection properties and cell survival. *J Drug Target* **12**, 223–36 (2004).
75. Ziady, A. G. *et al.* Transfection of airway epithelium by stable PEGylated poly-L-lysine DNA nanoparticles in vivo. *Mol Ther* **8**, 936–47 (2003).
76. Densmore, C. L. *et al.* Aerosol delivery of robust polyethyleneimine-DNA complexes for gene therapy and genetic immunization. *Mol Ther* **1**, 180–8 (2000).
77. Gautam, A., Densmore, C. L., Xu, B. & Waldrep, J. C. Enhanced gene expression in mouse lung after PEI-DNA aerosol delivery. *Mol Ther* **2**, 63–70 (2000).
78. Goula, D. *et al.* Rapid crossing of the pulmonary endothelial barrier by polyethylenimine/DNA complexes. *Gene Ther* **7**, 499–504 (2000).
79. Goula, D. *et al.* Polyethylenimine-based intravenous delivery of transgenes to mouse lung. *Gene Ther* **5**, 1291–5 (1998).
80. Belur, L. R. *et al.* Gene insertion and long-term expression in lung mediated by the Sleeping Beauty transposon system. *Mol Ther* **8**, 501–7 (2003).
81. Belur, L. R., Podetz-Pedersen, K., Frandsen, J. & Mclvor, R. S. Lung-directed gene therapy in mice using the nonviral Sleeping Beauty transposon system. *Nat Protoc* **2**, 3146–52 (2007).
82. Lin, E.-H. *et al.* Lifelong reporter gene imaging in the lungs of mice following polyethyleneimine-mediated sleeping-beauty transposon delivery. *Biomaterials* **32**, 1978–1985 (2011).
83. Delorme, B., Chateaubieux, S. & Charbord, P. The concept of mesenchymal stem cells. *Regen Med* **1**, 497–509 (2006).
84. Dazzi, F. & Horwood, N. J. Potential of mesenchymal stem cell therapy. *Curr Opin Oncol* **19**, 650–5 (2007).
85. Keramidas, M. *et al.* The dual effect of mscs on tumour growth and tumour angiogenesis. *Stem Cell Res. Ther.* **4**, (2013).
86. Wu, Y., Chen, L., Scott, P. G. & Tredget, E. E. Mesenchymal Stem Cells Enhance Wound Healing Through Differentiation and Angiogenesis. *STEM CELLS* **25**, 2648–2659 (2007).
87. Al-Khaldi, A. *et al.* Postnatal bone marrow stromal cells elicit a potent VEGF-dependent neoangiogenic response in vivo. *Gene Ther.* **10**, 621–629 (2003).
88. Ghajar, C. M. *et al.* Mesenchymal cells stimulate capillary morphogenesis via distinct proteolytic mechanisms. *Exp. Cell Res.* **316**, 813–825 (2010).
89. Sanz, L. *et al.* Long-term in vivo imaging of human angiogenesis: Critical role of bone marrow-derived mesenchymal stem cells for the generation of durable blood vessels. *Microvasc. Res.* **75**, 308–314 (2008).

90. Au, P., Tam, J., Fukumura, D. & Jain, R. K. Bone marrow–derived mesenchymal stem cells facilitate engineering of long-lasting functional vasculature. *Blood* **111**, 4551–4558 (2008).
91. Goel, S. *et al.* Normalization of the Vasculature for Treatment of Cancer and Other Diseases. *Physiol. Rev.* **91**, 1071–1121 (2011).
92. Hamzah, J. *et al.* Vascular normalization in Rgs5 -deficient tumours promotes immune destruction. *Nature* **453**, 410–414 (2008).
93. Batchelor, T. T. *et al.* AZD2171, a Pan-VEGF Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor, Normalizes Tumor Vasculature and Alleviates Edema in Glioblastoma Patients. *Cancer Cell* **11**, 83–95 (2007).
94. Willett, C. G. *et al.* Efficacy, Safety, and Biomarkers of Neoadjuvant Bevacizumab, Radiation Therapy, and Fluorouracil in Rectal Cancer: A Multidisciplinary Phase II Study. *J. Clin. Oncol.* **27**, 3020–3026 (2009).
95. Saltz, L. B. *et al.* Bevacizumab in Combination With Oxaliplatin-Based Chemotherapy As First-Line Therapy in Metastatic Colorectal Cancer: A Randomized Phase III Study. *J. Clin. Oncol.* **26**, 2013–2019 (2008).
96. Pessina, A. *et al.* Mesenchymal Stromal Cells Primed with Paclitaxel Provide a New Approach for Cancer Therapy. *PLoS ONE* **6**, (2011).
97. Bousser, M.-G. & Mas, J.-L. Accidents vasculaires cérébraux. in.
98. Ferro, J. M. Update on intracerebral haemorrhage. *J. Neurol.* **253**, 985–999 (2006).
99. Hostettler, I. C., Seiffge, D. J. & Werring, D. J. Intracerebral hemorrhage: an update on diagnosis and treatment. *Expert Rev. Neurother.* **19**, 679–694 (2019).
100. Muehlschlegel, S. Subarachnoid Hemorrhage. *Contin. Lifelong Learn. Neurol.* **24**, 1623 (2018).
101. Feigin, V. L. *et al.* GLOBAL, REGIONAL, AND COUNTRY-SPECIFIC LIFETIME RISK OF STROKE, 1990–2016. *N. Engl. J. Med.* **379**, 2429–2437 (2018).
102. World health organization. *Global health estimates [Internet]. 2016.*
103. Benjamin, E. J. *et al.* Heart Disease and Stroke Statistics—2017 Update. *Circulation* **135**, e146–e603 (2017).
104. Mathers, C. D. & Loncar, D. Projections of Global Mortality and Burden of Disease from 2002 to 2030. *PLoS Med.* **3**, (2006).
105. Go, A. S. *et al.* Heart Disease and Stroke Statistics—2014 Update. *Circulation* **129**, e28–e292 (2014).
106. Phan, H. T. *et al.* Sex Differences in Severity of Stroke in the INSTRUCT Study: a Meta-Analysis of Individual Participant Data. *J. Am. Heart Assoc. Cardiovasc. Cerebrovasc. Dis.* **8**, (2018).
107. Sachdev, P., Brodaty, H., Valenzuela, M., Lorentz, L. & Lorentz, A. Progression of cognitive impairment in stroke patients. *Neurology* (2004) doi:10.1212/01.wnl.0000142964.83484.de.
108. Hommel, M., Miguel, S., Naegele, B., Gonnet, N. & Jaillard, A. Cognitive determinants of social functioning after a first ever mild to moderate stroke at vocational age. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* (2009) doi:10.1136/jnnp.2008.169672.
109. Hochstenbach, J., den Otter, R. & Mulder, T. Cognitive recovery after stroke: a 2-year follow-up. *Arch. Phys. Med. Rehabil.* (2003) doi:10.1016/s0003-9993(03)00370-8.
110. Hochstenbach, J. & T, M. Neuropsychology and the relearning of motor skills following stroke. *Int. J. Rehabil. Res. Int. Z. Rehabil. Rev. Int. Rech. Readaptation* (1999) doi:10.1097/00004356-199903000-00002.
111. Mulder, T. & Hochstenbach, J. Adaptability and Flexibility of the Human Motor System: Implications for Neurological Rehabilitation. *Neural Plast.* **8**, 131–140 (2001).
112. Kalaria, R. N., Akinyemi, R. & Ihara, M. Stroke injury, cognitive impairment and vascular dementia. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* **1862**, 915–925 (2016).
113. Wahlgren, N. *et al.* Thrombolysis with alteplase 3-4.5 h after acute ischaemic stroke (SITS-ISTR): an observational study. *Lancet Lond. Engl.* (2008) doi:10.1016/S0140-6736(08)61339-2.
114. Hacke, W. *et al.* Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. *N. Engl. J. Med.* (2008) doi:10.1056/NEJMo0804656.
115. Ahmed, M. B. *et al.* Implementation and outcome of thrombolysis with alteplase 3-4.5 h after an acute stroke: an updated analysis from SITS-ISTR. *Lancet Neurol.* (2010) doi:10.1016/S1474-4422(10)70165-4.
116. Wei, L., Wei, Z. Z., Jiang, M. Q., Mohamad, O. & Yu, S. P. Stem Cell Transplantation Therapy for Multifaceted Therapeutic Benefits after Stroke. *Prog. Neurobiol.* **157**, 49–78 (2017).
117. Langhorne, P., Bernhardt, J. & Kwakkel, G. Stroke rehabilitation. *The Lancet* **377**, 1693–1702 (2011).
118. Pinard, E. & Engrand, N. Physiopathologie de l'ischémie cérébrale. *Ann. Fr. Anesth. Réanimation* **18**, 574–582 (1999).
119. Collaboration, S. U. T. Organised inpatient (stroke unit) care for stroke. *Cochrane Database Syst. Rev.* (2013) doi:10.1002/14651858.CD000197.pub3.
120. Dirnagl, U., Iadecola, C. & Moskowitz, M. A. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci.* **22**, 391–397 (1999).
121. Doyle, K. P., Simon, R. P. & Stenzel-Poore, M. P. Mechanisms of ischemic brain damage. *Neuropharmacology* **55**, 310–318 (2008).
122. Detante, O. *et al.* Biotherapies in stroke. *Rev. Neurol. (Paris)* **170**, 779–798 (2014).
123. Cassidy, J. M. & Cramer, S. C. Spontaneous & Therapeutic-Induced Mechanisms of Functional Recovery After Stroke. *Transl. Stroke Res.* **8**, 33–46 (2017).

124. Cramer, S. C. Repairing the human brain after stroke: I. Mechanisms of spontaneous recovery. *Ann. Neurol.* **63**, 272–287 (2008).
125. Murphy, T. H. & Corbett, D. Plasticity during stroke recovery: from synapse to behaviour. *Nat. Rev. Neurosci.* **10**, 861–872 (2009).
126. Cirillo, C. *et al.* Post-stroke remodeling processes in animal models and humans. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **40**, 3–22 (2020).
127. Ruan, L., Wang, B., ZhuGe, Q. & Jin, K. Coupling of neurogenesis and angiogenesis after ischemic stroke. *Brain Res.* **1623**, 166–173 (2015).
128. Ergul, A., Alhusban, A. & Fagan, S. C. Angiogenesis: A Harmonized Target for Recovery after Stroke. *Stroke J. Cereb. Circ.* **43**, 2270–2274 (2012).
129. Krupinski J, Kaluza J, Kumar P, Kumar S & Wang J M. Role of angiogenesis in patients with cerebral ischemic stroke. *Stroke* **25**, 1794–1798 (1994).
130. Jin, K. *et al.* Evidence for stroke-induced neurogenesis in the human brain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 13198–13202 (2006).
131. Kanazawa, M. *et al.* Microglia preconditioned by oxygen-glucose deprivation promote functional recovery in ischemic rats. *Sci. Rep.* **7**, 1–16 (2017).
132. Petcu, E. B., Smith, R. A., Miroiu, R. I. & Opris, M. M. Angiogenesis in old-aged subjects after ischemic stroke: a cautionary note for investigators. *J. Angiogenesis Res.* **2**, 26 (2010).
133. Grefkes, C. & Fink, G. R. Connectivity-based approaches in stroke and recovery of function. *Lancet Neurol.* **13**, 206–216 (2014).
134. Rehme, A. K., Eickhoff, S. B., Rottschy, C., Fink, G. R. & Grefkes, C. Activation likelihood estimation meta-analysis of motor-related neural activity after stroke. *NeuroImage* **59**, 2771–2782 (2012).
135. Wang, L. E. *et al.* Degeneration of corpus callosum and recovery of motor function after stroke: A multimodal magnetic resonance imaging study. *Hum. Brain Mapp.* **33**, 2941–2956 (2012).
136. Carmichael, S. T., Kathirvelu, B., Schweppe, C. A. & Nie, E. H. Molecular, cellular and functional events in axonal sprouting after stroke. *Exp. Neurol.* **287**, 384–394 (2017).
137. Kim, S. Y. *et al.* Experience with the “Good” Limb Induces Aberrant Synaptic Plasticity in the Perilesion Cortex after Stroke. *J. Neurosci.* **35**, 8604–8610 (2015).
138. Thored, P. *et al.* Persistent Production of Neurons from Adult Brain Stem Cells During Recovery after Stroke. *STEM CELLS* **24**, 739–747 (2006).
139. Miller, F. D. & Gauthier-Fisher, A. Home at Last: Neural Stem Cell Niches Defined. *Cell Stem Cell* **4**, 507–510 (2009).
140. Lin, R. & Iacovitti, L. Classic and novel stem cell niches in brain homeostasis and repair. *Brain Res.* **1628**, 327–342 (2015).
141. Marques, B. L. *et al.* The role of neurogenesis in neurorepair after ischemic stroke. *Semin. Cell Dev. Biol.* **95**, 98–110 (2019).
142. Kokaia, Z. & Lindvall, O. Neurogenesis after ischaemic brain insults. *Curr. Opin. Neurobiol.* **13**, 127–132 (2003).
143. Marlier, Q., Verteneuil, S., Vandenbosch, R. & Malgrange, B. Mechanisms and Functional Significance of Stroke-Induced Neurogenesis. *Front. Neurosci.* **9**, (2015).
144. Shen, Q. *et al.* Endothelial Cells Stimulate Self-Renewal and Expand Neurogenesis of Neural Stem Cells. *Science* **304**, 1338–1340 (2004).
145. Lin, C.-Y. *et al.* Dynamic Changes in Vascular Permeability, Cerebral Blood Volume, Vascular Density, and Size after Transient Focal Cerebral Ischemia in Rats: Evaluation with Contrast-Enhanced Magnetic Resonance Imaging. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **28**, 1491–1501 (2008).
146. Teng, H. *et al.* Coupling of Angiogenesis and Neurogenesis in Cultured Endothelial Cells and Neural Progenitor Cells after Stroke. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **28**, 764–771 (2008).
147. Robel, S., Berninger, B. & Götz, M. The stem cell potential of glia: lessons from reactive gliosis. *Nat. Rev. Neurosci.* **12**, 88–104 (2011).
148. Heinrich, C. *et al.* Sox2-Mediated Conversion of NG2 Glia into Induced Neurons in the Injured Adult Cerebral Cortex. *Stem Cell Rep.* **3**, 1000–1014 (2014).
149. Nakagomi, T. *et al.* Brain Vascular Pericytes Following Ischemia Have Multipotential Stem Cell Activity to Differentiate Into Neural and Vascular Lineage Cells. *STEM CELLS* **33**, 1962–1974 (2015).
150. Torper, O. *et al.* In Vivo Reprogramming of Striatal NG2 Glia into Functional Neurons that Integrate into Local Host Circuitry. *Cell Rep.* **12**, 474–481 (2015).
151. Savitz, S. I., Cramer, S. C. & Wechsler, L. Stem Cells as an Emerging Paradigm in Stroke 3 Enhancing the Development of Clinical Trials. *Stroke* **45**, 634–639 (2014).
152. Krause, M., Phan, T. G., Ma, H., Sobey, C. G. & Lim, R. Cell-Based Therapies for Stroke: Are We There Yet? *Front. Neurol.* **10**, (2019).
153. Thomson, J. A. *et al.* Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science* **282**, 1145–1147 (1998).
154. Maroof, A. M. *et al.* Directed Differentiation and Functional Maturation of Cortical Interneurons from Human Embryonic Stem Cells. *Cell Stem Cell* **12**, 559–572 (2013).

155. Bain, G., Kitchens, D., Yao, M., Huettner, J. E. & Gottlieb, D. I. Embryonic Stem Cells Express Neuronal Properties in Vitro. *Dev. Biol.* **168**, 342–357 (1995).
156. Tae-Hoon, L. & Yoon-Seok, L. Transplantation of mouse embryonic stem cell after middle cerebral artery occlusion. *Acta Cir. Bras.* (2012) doi:10.1590/s0102-86502012000400009.
157. Tang, Y., Ma, Y., Zhang, Z., Wang, Y. & Yang, G. Opportunities and Challenges: Stem Cell-Based Therapy for the Treatment of Ischemic Stroke. *CNS Neurosci. Ther.* **21**, 337–347 (2015).
158. Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* **126**, 663–676 (2006).
159. George, P. M. & Steinberg, G. K. Novel Stroke Therapeutics: Unraveling Stroke Pathophysiology and Its Impact on Clinical Treatments. *Neuron* **87**, 297–309 (2015).
160. Yu, J. *et al.* Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells. *Science* **318**, 1917–1920 (2007).
161. Jiang, M. *et al.* Induction of pluripotent stem cells transplantation therapy for ischemic stroke. *Mol. Cell. Biochem.* **354**, 67–75 (2011).
162. Yamashita, T., Kawai, H., Tian, F., Ohta, Y. & Abe, K. Tumorigenic Development of Induced Pluripotent Stem Cells in Ischemic Mouse Brain. *Cell Transplant.* **20**, 883–892 (2011).
163. Zhao, T., Zhang, Z.-N., Rong, Z. & Xu, Y. Immunogenicity of induced pluripotent stem cells. *Nature* **474**, 212–215 (2011).
164. Garzón-Muvdi, T. & Quiñones-Hinojosa, A. Neural Stem Cell Niches and Homing: Recruitment and Integration into Functional Tissues. *ILAR J.* **51**, 3–23 (2010).
165. Chu, K. *et al.* Human neural stem cells improve sensorimotor deficits in the adult rat brain with experimental focal ischemia. *Brain Res.* **1016**, 145–153 (2004).
166. Hao, L. *et al.* Stem Cell-Based Therapies for Ischemic Stroke. *BioMed Research International* <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/468748/> (2014) doi:<https://doi.org/10.1155/2014/468748>.
167. Jablonska, B. *et al.* Chordin-induced lineage plasticity of adult SVZ neuroblasts after demyelination. *Nat. Neurosci.* **13**, 541–550 (2010).
168. Marei, H. E. *et al.* Potential of Stem Cell-Based Therapy for Ischemic Stroke. *Front. Neurol.* **9**, (2018).
169. Seo, J. H. & Cho, S.-R. Neurorestoration Induced by Mesenchymal Stem Cells: Potential Therapeutic Mechanisms for Clinical Trials. *Yonsei Med. J.* **53**, 1059–1067 (2012).
170. Borlongan, C. V. Concise Review: Stem Cell Therapy for Stroke Patients: Are We There Yet? *Stem Cells Transl. Med.* **8**, 983–988 (2019).
171. Friedenstein, A. J., Chailakhjan, R. K. & Lalykina, K. S. The Development of Fibroblast Colonies in Monolayer Cultures of Guinea-Pig Bone Marrow and Spleen Cells. *Cell Prolif.* **3**, 393–403 (1970).
172. Wexler, S. A. *et al.* Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal 'stem' cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not. *Br. J. Haematol.* **121**, 368–374 (2003).
173. Zuk, P. A. *et al.* Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells. *Mol. Biol. Cell* **13**, 4279–4295 (2002).
174. Liu, S. *et al.* Strategies to Optimize Adult Stem Cell Therapy for Tissue Regeneration. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, (2016).
175. Malgieri, A., Kantzari, E., Patrizi, M. P. & Gambardella, S. Bone marrow and umbilical cord blood human mesenchymal stem cells: state of the art. *Int. J. Clin. Exp. Med.* **3**, 248–269 (2010).
176. Du, H. & Taylor, H. S. Contribution of Bone Marrow-Derived Stem Cells to Endometrium and Endometriosis. *STEM CELLS* **25**, 2082–2086 (2007).
177. Uccelli, A., Moretta, L. & Pistoia, V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 726–736 (2008).
178. Kopen, G. C., Prockop, D. J. & Phinney, D. G. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**, 10711–10716 (1999).
179. Mezey, É., Chandross, K. J., Harta, G., Maki, R. A. & McKercher, S. R. Turning Blood into Brain: Cells Bearing Neuronal Antigens Generated in Vivo from Bone Marrow. *Science* **290**, 1779–1782 (2000).
180. Sanchez-Ramos, J. *et al.* Adult Bone Marrow Stromal Cells Differentiate into Neural Cells in Vitro. *Exp. Neurol.* **164**, 247–256 (2000).
181. Phinney, D. G. & Prockop, D. J. Concise Review: Mesenchymal Stem/Multipotent Stromal Cells: The State of Transdifferentiation and Modes of Tissue Repair—Current Views. *STEM CELLS* **25**, 2896–2902 (2007).
182. Chamberlain, G., Fox, J., Ashton, B. & Middleton, J. Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: Their Phenotype, Differentiation Capacity, Immunological Features, and Potential for Homing. *STEM CELLS* **25**, 2739–2749 (2007).
183. Detante, O. *et al.* Intravenous Administration of ^{99m}Tc-HMPAO-Labeled Human Mesenchymal Stem Cells After Stroke: In Vivo Imaging and Biodistribution. *Cell Transplant.* **18**, 1369–1379 (2009).
184. Detante, O., Moisan, A., Hommel, M. & Jaillard, A. Controlled clinical trials of cell therapy in stroke: Meta-analysis at six months after treatment. *Int. J. Stroke* **12**, 748–751 (2017).

185. Blanc, K. L. *et al.* Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *The Lancet* **363**, 1439–1441 (2004).
186. Aggarwal, S. & Pittenger, M. F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* **105**, 1815–1822 (2005).
187. Fernández-Susavila, H., Bugallo-Casal, A., Castillo, J. & Campos, F. Adult Stem Cells and Induced Pluripotent Stem Cells for Stroke Treatment. *Front. Neurol.* **10**, (2019).
188. Eckert, M. A. *et al.* Evidence for High Translational Potential of Mesenchymal Stromal Cell Therapy to Improve Recovery from Ischemic Stroke. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **33**, 1322–1334 (2013).
189. Jaillard, A. *et al.* Autologous Mesenchymal Stem Cells Improve Motor Recovery in Subacute Ischemic Stroke: a Randomized Clinical Trial. *Transl. Stroke Res.* **11**, 910–923 (2020).
190. Moisan, A. *et al.* Microvascular Plasticity After Experimental Stroke: A Molecular and MRI Study. *Cerebrovasc. Dis.* **38**, 344–353 (2014).
191. Moisan, A. *et al.* Intravenous Injection of Clinical Grade Human MSCs After Experimental Stroke: Functional Benefit and Microvascular Effect. *Cell Transplant.* **25**, 2157–2171 (2016).
192. Detante, O. *et al.* Intravenous Administration of 99mTc-HMPAO-Labeled Human Mesenchymal Stem Cells after Stroke: In Vivo Imaging and Biodistribution. *Cell Transplant.* **18**, 1369–1379 (2009).
193. Wei, N. *et al.* Delayed Intranasal Delivery of Hypoxic-Preconditioned Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Enhanced Cell Homing and Therapeutic Benefits after Ischemic Stroke in Mice. *Cell Transplant.* **22**, 977–991 (2013).
194. Moisan, A. *et al.* Intracerebral injection of human mesenchymal stem cells impacts cerebral microvasculature after experimental stroke: MRI study. *NMR Biomed.* **25**, 1340–1348 (2012).
195. Steinberg, G. K. *et al.* Clinical Outcomes of Transplanted Modified Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells in Stroke: A Phase 1/2a Study. *Stroke J. Cereb. Circ.* (2016) doi:10.1161/STROKEAHA.116.012995.
196. Kalladka, D. *et al.* Human neural stem cells in patients with chronic ischaemic stroke (PISCES): a phase 1, first-in-man study. *The Lancet* **388**, 787–796 (2016).
197. Hicks, A. U. *et al.* Transplantation of human embryonic stem cell-derived neural precursor cells and enriched environment after cortical stroke in rats: cell survival and functional recovery. *Eur. J. Neurosci.* **29**, 562–574 (2009).
198. Dimmeler, S., Ding, S., Rando, T. A. & Trounson, A. Translational strategies and challenges in regenerative medicine. *Nat. Med.* **20**, 814–821 (2014).
199. Marquardt, L. M. & Heilshorn, S. C. Design of Injectable Materials to Improve Stem Cell Transplantation. *Curr. Stem Cell Rep.* **2**, 207–220 (2016).
200. Drury, J. L. & Mooney, D. J. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. *Biomaterials* **24**, 4337–4351 (2003).
201. Luo, L. *et al.* Effects of Transplanted Heparin-Poloxamer Hydrogel Combining Dental Pulp Stem Cells and bFGF on Spinal Cord Injury Repair. *Stem Cells International* <https://www.hindawi.com/journals/sci/2018/2398521/> (2018) doi:<https://doi.org/10.1155/2018/2398521>.
202. Bolan, F., Louca, I., Heal, C. & Cunningham, C. J. The Potential of Biomaterial-Based Approaches as Therapies for Ischemic Stroke: A Systematic Review and Meta-Analysis of Pre-clinical Studies. *Front. Neurol.* **10**, (2019).
203. González-Nieto, D., Fernández-García, L., Pérez-Rigueiro, J., Guinea, G. V. & Panetsos, F. Hydrogels-Assisted Cell Engraftment for Repairing the Stroke-Damaged Brain: Chimera or Reality. *Polymers* **10**, 184 (2018).
204. Boisserand, L. S. B. *et al.* Biomaterial Applications in Cell-Based Therapy in Experimental Stroke. *Stem Cells Int.* **2016**, (2016).
205. Payne, S. L. *et al.* Initial cell maturity changes following transplantation in a hyaluronan-based hydrogel and impacts therapeutic success in the stroke-injured rodent brain. *Biomaterials* **192**, 309–322 (2019).
206. Hoffman, A. S. Hydrogels for biomedical applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **64**, 18–23 (2012).
207. Merino, S., Martín, C., Kostarelos, K., Prato, M. & Vázquez, E. Nanocomposite Hydrogels: 3D Polymer–Nanoparticle Synergies for On-Demand Drug Delivery. *ACS Nano* **9**, 4686–4697 (2015).
208. Costa, A. M. S. & Mano, J. F. Extremely strong and tough hydrogels as prospective candidates for tissue repair – A review. *Eur. Polym. J.* **72**, 344–364 (2015).
209. Tam, R. Y., Fuehrmann, T., Mitrousis, N. & Shoichet, M. S. Regenerative Therapies for Central Nervous System Diseases: a Biomaterials Approach. *Neuropsychopharmacology* **39**, 169–188 (2014).
210. Moshayedi, P. & Carmichael, S. T. Hyaluronan, neural stem cells and tissue reconstruction after acute ischemic stroke. *Biomatter* **3**, (2013).
211. Pakulska, M. M., Ballios, B. G. & Shoichet, M. S. Injectable hydrogels for central nervous system therapy. *Biomed. Mater. Bristol Engl.* **7**, 024101 (2012).
212. Robert, L. Hyaluronan, a truly “youthful” polysaccharide. Its medical applications. *Pathol. Biol.* **63**, 32–34 (2015).
213. Liang, Y., Walczak, P. & Bulte, J. W. M. The survival of engrafted neural stem cells within hyaluronic acid hydrogels. *Biomaterials* **34**, 5521–5529 (2013).
214. Zhong, J. *et al.* Hydrogel matrix to support stem cell survival after brain transplantation in stroke. *Neurorehabil. Neural Repair* **24**, 636–644 (2010).

215. Jin, K. *et al.* Transplantation of human neural precursor cells in Matrigel scaffolding improves outcome from focal cerebral ischemia after delayed postischemic treatment in rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* **30**, 534–544 (2010).
216. Sarnowska, A. *et al.* Encapsulation of mesenchymal stem cells by bioscaffolds protects cell survival and attenuates neuroinflammatory reaction in injured brain tissue after transplantation. *Cell Transplant.* **22 Suppl 1**, S67–82 (2013).
217. Castillo-Melendez, M., Yawno, T., Jenkin, G. & Miller, S. L. Stem cell therapy to protect and repair the developing brain: a review of mechanisms of action of cord blood and amnion epithelial derived cells. *Front. Neurosci.* **7**, (2013).
218. Acosta Sandra A., Tajiri Naoki, Hoover Jaclyn, Kaneko Yuji & Borlongan Cesar V. Intravenous Bone Marrow Stem Cell Grafts Preferentially Migrate to Spleen and Abrogate Chronic Inflammation in Stroke. *Stroke* **46**, 2616–2627 (2015).
219. Salgado, A. J. *et al.* Mesenchymal stem cells secretome as a modulator of the neurogenic niche: basic insights and therapeutic opportunities. *Front. Cell. Neurosci.* **9**, (2015).
220. Zhu, J. *et al.* Enhanced angiogenesis promoted by human umbilical mesenchymal stem cell transplantation in stroked mouse is Notch1 signaling associated. *Neuroscience* **290**, 288–299 (2015).
221. Talebian, S. *et al.* Self-Healing Hydrogels: The Next Paradigm Shift in Tissue Engineering? *Adv. Sci.* **6**, 1801664 (2019).
222. Tarus, D. *et al.* Design of Hyaluronic Acid Hydrogels to Promote Neurite Outgrowth in Three Dimensions. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **8**, 25051–25059 (2016).
223. Figueiredo, T. *et al.* Injectable Self-Healing Hydrogels Based on Boronate Ester Formation between Hyaluronic Acid Partners Modified with Benzoxaborin Derivatives and Saccharides. *Biomacromolecules* **21**, 230–239 (2020).
224. Kalladka, D. *et al.* Increased deep grey matter functional connectivity of poststroke hNSC implanted ipsilesional putamen. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **90**, 959–960 (2019).
225. Muir, K. W. *et al.* Intracerebral implantation of human neural stem cells and motor recovery after stroke: multicentre prospective single-arm study (PISCES-2). *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **91**, 396–401 (2020).
226. Bernsen, M. R., Guenoun, J., van Tiel, S. T. & Krestin, G. P. Nanoparticles and clinically applicable cell tracking. *Br. J. Radiol.* **88**, (2015).
227. Meir, R. & Popovtzer, R. Cell tracking using gold nanoparticles and computed tomography imaging. *WIREs Nanomedicine Nanobiotechnology* **10**, e1480 (2018).
228. Cheng, Y. *et al.* Intravenously delivered neural stem cells migrate into ischemic brain, differentiate and improve functional recovery after transient ischemic stroke in adult rats. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **8**, 2928–2936 (2015).
229. Ryu, S., Lee, S.-H., Kim, S. U. & Yoon, B.-W. Human neural stem cells promote proliferation of endogenous neural stem cells and enhance angiogenesis in ischemic rat brain. *Neural Regen. Res.* **11**, 298–304 (2016).
230. Huang, L. & Zhang, L. Neural stem cell therapies and hypoxic-ischemic brain injury. *Prog. Neurobiol.* **173**, 1–17 (2019).
231. Andres, R. H. *et al.* Human neural stem cells enhance structural plasticity and axonal transport in the ischaemic brain. *Brain* **134**, 1777–1789 (2011).
232. Bacigaluppi, M. *et al.* Delayed post-ischaemic neuroprotection following systemic neural stem cell transplantation involves multiple mechanisms. *Brain* **132**, 2239–2251 (2009).
233. Wollenberg, A. L. *et al.* Injectable polypeptide hydrogels via methionine modification for neural stem cell delivery. *Biomaterials* **178**, 527–545 (2018).