

COMMUNICATION

Mise au point sur les lésions traumatiques de la moelle épinière et les approches thérapeutiques

MOTS-CLÉS : RÉGÉNÉRATION DE LA MOELLE ÉPINIÈRE. LÉSION AXONALE DIFFUSE. THÉRAPIE GÉNÉTIQUE

Spinal cord injury. From the proof of principle to the therapeutic tool

KEY-WORDS: SPINAL CORD REGENERATION. DIFFUSE AXONAL INJURY. GENETIC THERAPY

Alain PRIVAT *

L'auteur déclare ne pas avoir de liens d'intérêt en relation avec le contenu de cet article.

RÉSUMÉ

Les lésions médullaires traumatiques constituent une pathologie lourde en raison de leur fréquence et de la gravité des séquelles. Les recherches en matière de stratégies thérapeutiques se sont organisées autour de trois axes : neuroprotection pharmacologique, régénération axonale, thérapies substitutives.

La régénération axonale revêt un intérêt particulier dans la mesure où elle peut s'appliquer également à d'autres pathologies médullaires ou cérébrales. L'élément-clé de cette régénération est constitué par l'environnement tissulaire post-traumatique, et essentiellement par la cicatrice gliale. Nous avons identifié les protéines gliofibrillaires de l'astrocyte (GFAP et Vimentine) comme des éléments essentiels de cette cicatrice, et élaboré un modèle de souris transgénique chez laquelle les gènes codant pour ces protéines sont inactivés. Chez ces animaux, une hémisection médullaire latérale est suivie par une récupération fonctionnelle après 5 semaines, corrélée avec l'absence de cicatrice gliale et une repousse axonale des systèmes sérotonergiques descendants. Des résultats similaires ont été obtenus chez des souris témoins traitées après la lésion avec une injection locale d'un vecteur lentiviral porteur d'un siARN GFAP. Cet outil, susceptible d'être utilisé chez l'homme, sera testé sur un modèle de primate avec un suivi non-invasif par IRM à haute résolution.

* Membre correspondant de l'Académie nationale de médecine. Inserm U1051, Institut des Neurosciences de Montpellier, 80 Rue A. Fliche 34295 Montpellier

Tirés à part : Professeur Alain PRIVAT, même adresse

Article reçu le 28 juin 2015, accepté le 26 octobre 2015

SUMMARY

Spinal cord injury is a devastating pathology with heavy social and personal sequels. Therapeutic strategies are organized around three research directions: Neuroprotection, axonal regeneration and substitutive therapies. Of particular interest is axonal regeneration, since it may be applicable to other spinal or brain pathologies. The condition for regeneration in the central nervous system is the control of tissular surrounding after the lesion, and essentially the constitution of a glial scar. A key factor in the glial scar is the massive synthesis of glial fibrous proteins GFAP and Vimentin. We have devised a transgenic mouse model in which the genes coding for these proteins have been inactivated. After a lateral hemisection of the spinal cord, transgenic mice recover within five weeks the function of the paralyzed hind limb and the absence of glial scar formation is correlated with the regeneration of descending serotonergic axons. The same results have been obtained in naïve mice injected locally with a lentiviral vector carrying a siRNA for GFAP. This tool, which can potentially be used in injured patients, will be tested on a primate model with a non-invasive follow-up with high resolution MRI.

INTRODUCTION

Les lésions médullaires traumatiques constituent une pathologie lourde en termes de santé publique et de séquelles fonctionnelles (Figure 1). Près de 2,5 millions de personnes en sont affectées dans le monde avec une incidence annuelle de 40 à 60 par millions d'habitants dans les pays industrialisés [1]. Le cout moyen s'établit entre 1 et 4 millions d'euros par patient, suivant la gravité des lésions et les pays (National SCI statistical care).

Ces lésions ont été considérées très longtemps comme irréversibles, et les seuls traitements proposés étaient du domaine de la rééducation fonctionnelle et de la prévention des complications morbides, escarres, infections urinaires [2]. Toutefois le dogme de l'absence de régénération dans le système nerveux central établi par Cajal, [3] a été contesté il y a plus de trente ans par David et Aguayo [4] qui avaient réalisé chez le rat adulte des pontages au moyen de fragments de nerfs périphériques entre le tronc cérébral et la moelle sous jacente à une lésion. Ils ont pu observer la repousse au sein du greffon d'axones d'origine centrale sur plusieurs centimètres.

À la suite de très nombreux travaux expérimentaux, une stratégie thérapeutique s'articulant en trois interventions successives a été mise au point [5] :

L'intervention la plus précoce, qui se situe dans les premières heures après la lésion, fait appel à une **neuroprotection pharmacologique**. La neurotoxicité du glutamate a été largement documentée [6] et des antagonistes agissant sur le récepteur NMDA ont été synthétisés, dont l'efficacité neuroprotectrice a été démontrée successivement sur des neurones cultivés *in vitro* [7] sur des modèles animaux de lésions médullaires [8] et enfin sur un groupe de patients [9].

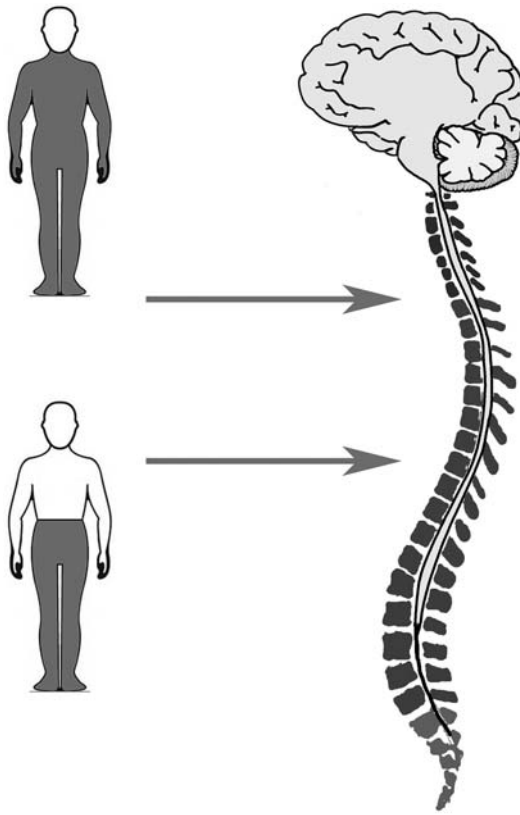


FIG. 1. — Anatomie des lésions médullaires : les flèches indiquent les niveaux des lésions et les atteintes fonctionnelles correspondantes

La deuxième approche, qui est l'objet essentiel de ce rapport, consiste à essayer de promouvoir, au sein de la moelle épinière, la **repousse des axones lésés** par le trauma initial. Le créneau temporel d'intervention se situe chez l'animal (rat, souris) dans les 48 heures qui suivent la lésion. Cette approche est fondée sur la constatation initiale de David et Aguayo [4] de la capacité intrinsèque aux axones centraux de régénérer dans un *environnement permissif*, en l'occurrence un nerf périphérique. L'environnement *non permissif* du système nerveux central est essentiellement constitué par la glie réactive [10, 11] qui constitue une barrière physique et chimique à la repousse axonale.

Enfin, l'existence au sein de la moelle épinière, au niveau lombaire, chez le rongeur comme chez l'homme, d'un générateur autonome de marche (CPG), activé par les voies sérotonergiques descendantes raphé-spinales [12, 13] ouvre la voie à des interventions tardives visant à rétablir, sous la lésion, une commande locomotrice autonome. La **transplantation de neurones sérotonergiques** immatures sous une

section médullaire complète a permis en effet de rétablir une locomotion réflexe chez le rat paraplégique [14]. Une stratégie alternative consisterait à activer des progéniteurs neuronaux présents dans la moelle épinière humaine au niveau lombaire, dont nous avons montré qu'ils peuvent se différencier *in vitro* en neurones sérotonergiques [15].

L'objectif du présent rapport est de retracer le cheminement d'une stratégie thérapeutique de régénération dans la moelle épinière post traumatique, à partir d'une preuve de principe très fondamentale chez l'animal, jusqu'à la mise au point d'un outil thérapeutique utilisable chez l'homme.

Régénération axonale dans le système nerveux central des mammifères adultes : la preuve de principe

L'absence de régénération axonale post-lésionnelle dans le système nerveux des mammifères adultes avait été fixée par le dogme de la *régénération abortive* [3]. Il a fallu attendre les travaux du groupe d'Alberto Aguayo [4] pour que ce dogme soit contesté. Après avoir réalisé une lésion à la base du tronc cérébral, chez un rat adulte, l'insertion d'un fragment de nerf périphérique au niveau de la lésion a permis de montrer, à l'intérieur du greffon nerveux, l'élongation d'axones centraux qui peut atteindre plusieurs centimètres.

Au même moment, nous montrions sur un modèle différent, le nerf optique du rat adulte, que l'énucléation du globe oculaire, suivie par la dégénérescence wallérienne des axones, déclenche la prolifération des cellules gliales au sein du nerf. La microglie péricitaire se mobilise et se transforme en microglie interstitielle amiboïde et phagocytaire, tandis que les astrocytes prolifèrent et constituent rapidement un tissu cicatriciel imperméable à toute repousse axonale [16]. Un peu plus tard, Eng et al. [17], documentent la formation d'une cicatrice gliale post-lésionnelle dans la moelle épinière et mettent en évidence la contribution de la protéine gliofibrillaire acide des astrocytes (GFAP) dans la constitution de cette cicatrice (Figure 2).

Le rapprochement de ces deux expérimentations conduit à élaborer l'hypothèse suivante : contrairement à ce que pensait Cajal, les axones des neurones centraux des mammifères adultes sont dotés d'une capacité intrinsèque de régénération, qui s'exprime dans le système nerveux périphérique, lequel est dépourvu d'astrocytes. En revanche, au sein du système nerveux central, la réactivité des astrocytes entraîne la formation d'une barrière physico-chimique infranchissable. Notre objectif est alors d'inhiber la réactivité astrocytaire post-lésionnelle, afin de déterminer si cette inhibition favorise une repousse axonale.

Nous disposons depuis peu d'un outil pharmacologique, le 7-beta-OH-Cholestéryl-3-oléate dont nous avons montré [18] qu'il réduisait la prolifération astrocytaire secondaire à une lésion électrolytique du cortex cérébral chez le rat. Nous avons eu recours pour cette démonstration à un modèle d'hémisection médullaire chez le rat. Nous avons administré à ces animaux immédiatement après la

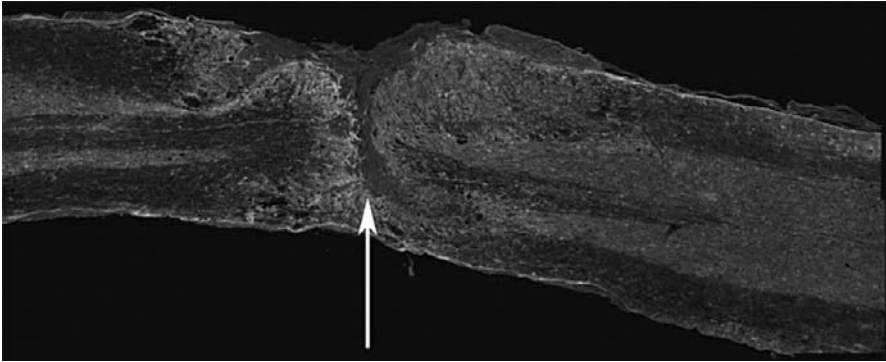


FIG. 2. — Zone lésionnelle et cicatrice gliale : Deux semaines après une lésion transversale étendue (90 %) au niveau D9-D10, chez une souris adulte, les astrocytes réactifs apparaissent en fluorescence verte, les microglies en rouge.

lésion des liposomes contenant ce dérivé du cholestérol. Nous avons constaté, du côté de la lésion, mais aussi à distance, une réduction de la réactivité astrocytaire, avec une diminution de la synthèse de la protéine GFAP, et des ARN correspondants. En parallèle, l'expression de la protéine d'adhésion axonale E-NCAM était diminuée dans la périphérie de la lésion. Nous avons documenté en conséquence une ré-innervation de l'hémi-moelle lésée par les axones sérotonergiques descendants originaires des noyaux du raphé [19]. Nous avons montré préalablement, par une technique de microdialyse chronique *in situ* que l'innervation sérotonergique de la moelle lombaire est un élément essentiel de la commande locomotrice [12].

Toutefois, cet outil pharmacologique pouvait difficilement être utilisé comme un outil thérapeutique, en raison de la fragilité du contenant, les liposomes, et de leur diffusion incontrôlable, qui échappe à toute évaluation statistique. Afin de disposer d'un outil plus fiable, nous nous sommes orientés vers une approche qui assurerait un *blocage permanent* de la réactivité astrocytaire, et plus précisément de son élément essentiel, les protéines gliofibrillaires. Nous avons pour ce faire engagé une collaboration avec le groupe de G. Babinet, qui venait de mettre au point une technique de transgénèse chez la souris. Nous avons étudié dans un premier temps une souris chez laquelle avait été inactivé le gène de synthèse de la protéine Vimentine, composant principal des gliofilaments avec la GFAP. Nous avons constaté chez ces animaux [20] que l'élongation des prolongements des astrocytes au cours du développement était perturbée, dans différentes régions du cerveau et de la moelle épinière. De plus la réactivité des astrocytes après une lésion était réduite, avec au niveau ultrastructural une désorganisation des gliofilaments.

Dans un deuxième temps, nous avons eu recours à un modèle de souris transgéniques chez lesquelles la synthèse de GFAP avait été inhibée (KO). Nous avons montré dans un premier temps dans un modèle de co-culture *in vitro* que les astrocytes de ces animaux étaient un substrat particulièrement favorable pour la survie de neurones et

l'extension de leurs axones [21]. Enfin, nous avons réalisé des hémisections médullaires chez des animaux présentant un double KO des gènes de synthèse de la vimentine et de la GFAP. Ces animaux présentaient une absence de réactivité astrocytaire dans la région péri-lésionnelle, caractérisée par l'absence de gliofilaments, avec une réduction sensible des protéines d'adhésion, et une repousse spectaculaire des axones sérotonergiques dans la moelle sous-lésionnelle. Cette repousse, anarchique dans un premier temps, s'organisait secondairement autour des sites normalement innervés, la corne dorsale, la colonne intermedio-latérale, et la corne ventrale au contact des motoneurons sur lesquels ces axones établissaient *de novo* des synapses. Sur le plan fonctionnel, les animaux recouvraient une locomotion quasi normale sur le test spécifique de la locomotion sur un grillage [22]. Par comparaison, les souris chez lesquelles la seule synthèse de vimentine avait été bloquée n'étaient pas statistiquement différents des témoins. En revanche, les animaux présentant le seul KO de la GFAP se comportaient comme les doubles KO. Il apparaît donc que l'inactivation de la synthèse de GFAP est un élément essentiel du contrôle de la cicatrice gliale et de la repousse axonale qui en résulte.

D'autres cibles ont été identifiées, qui favorisent la perméabilité de la cicatrice gliale, et en particulier un des composants de la matrice extracellulaire, les glycoprotéines à Chondroïtine-sulfate [23]. Une enzyme, la chondroïtinase ABC, digère en partie ces chaînes glycoprotéiques et, associée à une rééducation fonctionnelle appropriée, améliore le pronostic des lésions médullaires traumatiques en permettant une repousse axonale modérée [24]. Toutefois, la fragilité de cette enzyme exclut son utilisation en clinique humaine. Par ailleurs, la protéine Nogo-A, composante de la myéline, a été identifiée comme un inhibiteur de croissance axonale [25]. La neutralisation de cette protéine à l'aide d'un anticorps spécifique permet une amélioration de la locomotion chez des rats ayant subi une hémisection de la partie dorsale de la moelle épinière [26]. La transposition de ces résultats à un modèle lésionnel chez le primate [27] montra une discrète amélioration fonctionnelle, considérée comme secondaire à une repousse axonale au niveau de la lésion. Ces résultats ont été critiqués [28], et une réévaluation des résultats indiqua que l'effet principal du traitement s'exerçait en amont de la lésion, et conduisit finalement à une réinterprétation des données comportementales [29]. Enfin, une récente tentative clinique de transplantation chez un patient de cellules olfactives engainantes associées à un fragment de nerf périphérique, et une thérapie pharmacologique (methylprednisolone) a été rapportée par Tabakow [30]. Toutefois, s'agissant d'un cas unique, porteur d'une lésion incomplète, et bénéficiant d'une thérapie multiple, il est difficile d'attribuer la récupération à la levée d'un obstacle identifié.

À la lumière de l'ensemble de ces travaux, nous nous sommes efforcés d'élaborer un outil thérapeutique qui puisse être testé sur des modèles animaux et ensuite être appliqué en clinique dans une démarche de *recherche translationnelle*.

De la preuve de principe à l'outil thérapeutique

Les premiers jalons de la mise au point de cet outil avaient été posés dès la mise en évidence du rôle de la protéine GFAP dans la constitution des cicatrices gliales. En collaboration avec l'équipe de J. Mallet, nous avons réalisé le clonage de la GFAP Humaine, et montré grâce à une sonde cDNA de la GFAP l'implication de cette protéine dans la gliose du système nerveux central [31].

L'étape suivante a constitué en la mise au point d'un outil permettant de cibler dans l'espace et dans le temps la synthèse de GFAP et de l'inhiber. L'ARN interférence découverte entre temps par Fire et Mello [32] allait nous fournir cet outil. L'utilisation de vecteurs lentiviraux porteurs respectivement des siRNA de la GFAP et de la vimentine nous a permis de montrer sur des modèles de co-culture *in vitro* d'astrocytes de moelle épinière et de neurones corticaux que ces derniers survivaient en plus grand nombre et étendaient leurs neurites sur une plus grande distance quand les astrocytes avaient été pré-traités avec les siRNA de la GFAP et, avec une bien moindre efficacité, de la vimentine [33]. Ces résultats étaient en parfaite concordance avec ceux obtenus sur les souris transgéniques.

Dans un deuxième temps, cette même approche a été conduite sur le modèle d'hémisection médullaire mis au point chez la souris. Nous avons montré d'abord grâce à l'utilisation d'un vecteur porteur d'une sonde fluorescente que les astrocytes étaient la cible exclusive des lentivirus, et nous avons pu optimiser la diffusion de ces vecteurs. Dans un deuxième temps, nous avons pu répliquer sur ce modèle les résultats obtenus avec les souris transgéniques, à savoir l'inhibition de la formation de la cicatrice, la repousse des axones sérotonergiques et la récupération fonctionnelle sur le test de la locomotion sur une grille [34].

La dernière étape, en cours de réalisation, va consister en la confirmation des résultats sur un modèle de primate, conformément aux bonnes pratiques établies par un consortium international [35]. Dans ce but, nous avons mis au point un suivi longitudinal non invasif par IRM à haute résolution [36] compatible avec l'utilisation d'un petit nombre d'animaux et conforme aux règlements européens concernant l'utilisation des primates en recherche biomédicale. Par ailleurs, ce suivi IRM permet de comparer l'évolution des lésions chez un primate avec celles observées chez les patients avec les mêmes outils et les mêmes techniques.

L'espèce choisie est le lémurien malgache *Microcebus murinus*, dont le système nerveux central est maintenant bien connu [37], et dont un important élevage existe à Montpellier, auquel nous pouvons avoir accès.

CONCLUSION

Cette recherche, qui s'étend sur une trentaine d'années, illustre la simplicité de la démarche, qui est celle de la médecine expérimentale, contrastant avec la complexité de sa mise en œuvre. Cette dernière est largement tributaire de l'évolution des outils

d'analyse, et ultérieurement de thérapeutique. La théorie de régénération abortive formulée par Cajal il y a un siècle était fondée sur l'observation au microscope optique des tissus nerveux. Cajal disposait des techniques lui permettant d'individualiser les neurones et les différents types de cellules gliales, mais il a fallu disposer de la radio-autographie pour pouvoir marquer les cellules en division et les suivre, puis de l'immunocytochimie pour marquer spécifiquement une protéine, et de la microscopie électronique afin de déterminer respectivement avec précision quel était l'obstacle à la repousse, et quel était le substrat biochimique de cet obstacle. L'hypothèse posée, la technique de transgénèse chez l'animal a permis d'apporter une preuve de principe de cette hypothèse. L'interférence ARN permet de transformer cette preuve de principe en outil thérapeutique potentiel. L'IRM à haute résolution permettra de transposer dans un modèle de primate la démarche suivie chez les rongeurs. C'est au terme de cette dernière étape que pourront être éventuellement envisagés des essais cliniques.

RÉFÉRENCES

- [1] Van den Berg ME, Castelotte JM, Mahillo-Fernandez I, de Pedro-Cuesta J. Incidence of spinal cord injury worldwide: a systematic review. *J. Neurotrauma*. 2010;34(3):184-92.
- [2] Guttmann L. New hope for spinal cord sufferers. *Med Times* 1945;73:318-26.
- [3] Santiago Ramon y Cajal. *Estudios sobre la degeneracion y regeneracion del sistema nervioso* (Madrid, Imprenta de Hijos de Nicola Moya, 1913-1914).
- [4] David S, Aguayo AJ. Axonal elongation into peripheral nervous system « bridges » after central nervous system injury in adult rats. *Science*. 1981; 214(4523):931-3.
- [5] Privat A. Treatment of the future for spinal cord injuries. *Rev Prat*. 1995;45 (16):2051-6.
- [6] Choi DW, Koh JY, Peters S. pharmacology of glutamate neurotoxicity in cortical cell culture: attenuation by NMDA antagonists. *J Neurosci*. 1988; 8(1):185-96.
- [7] Rondouin G, Drian MJ, Chicheportiche R, Kamenka JM, Privat A. Non-competitive antagonists of N-methyl-D-Aspartate receptors protect cortical and hippocampal cell cultures against glutamate neurotoxicity. *Neurosci Lett*. 1988 91(2):199-203.
- [8] Gaviria M, Privat A, d'Arbigny P, Kamenka JM, Haton H, Ohanna F. Neuroprotective effects of a novel NMDA antagonist, Gacyclidine, after experimental spinal cord injury in adult rats. *Brain Res*. 2000;874(2):200-9.
- [9] Tadie M, Gaviria M, Mathé JF, et al. Early care and treatment with a neuroprotective drug, Gacyclidine, in patients with acute spinal cord injury. *Rachis*. 2003 15(6):363-76.
- [10] Privat A, Valat J, Fulcrand J. Proliferation of glial cell lines in the degenerating optic nerve of young rats. A radioautographic study. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1981; 40(1):46-60.
- [11] Fawcett JW, Asher RA. The glial scar and central nervous system repair. *Brain Res Bull*. 1999;49(6):377-91.
- [12] Gerin C, Becquet D, Privat A. Direct evidence for the link between monoaminergic descending pathways and motor activity. 1. A study with microdialysis probes implanted in the ventral funiculus of the spinal cord. *Brain Res*. 1995;704(2):191-201.

- [13] Perrin FE, Gerber YN, Teigell M, Lonjon N, et al. Anatomical study of serotonergic innervation and 5-HT (1A) receptor in the human spinal cord. *Cell death Dis.* 2011; Oct13;2:e218.doi: 10.1038/cddis2011.98.
- [14] Ribotta MG, Provencher J, Feraboli-Lohnherr D, Rossignol S, Privat A, Orsal D. Activation of locomotion in adult chronic spinal rats is achieved by transplantation of embryonic raphé cells reinnervating a precise lumbar level. *J Neurosci.* 2000 20(13):5144-52.
- [15] Dromard C, Guillon H, Rigau V, Ripoll C, et al. Adult human spinal cord harbors neural precursor cells that generate neurons and glial cells *in vitro*. *J Neurosci Res.* 2008;86(9):1916-26.
- [16] Fulcrand J, Privat A. neuroglial reactions secondary to Wallerian degeneration in the optic nerve of the postnatal rat: Ultrastructural and quantitative study. *J comp Neurol.* 1977; 176(2):189-222.
- [17] Eng LF, Ghirnikar RS. GFAP and astrogliosis. *Brain Pathol.* 1994;4(3):229-37.
- [18] Bochelen D, Eclancher F, Kupferberg A, Privat A, Mersel M. 7beta-hydroxycholesterol and 7beta-hydroxycholesterlyl-3-esters reduce the extent of reactive gliosis caused by an electrolytic lesion in rat brain. *Neuroscience.* 1992;51(4):827-34.
- [19] Gimenez y Ribotta M, Rajaofetra N, Morin Richaud C, Alonso G, et al. Oxysterol promotes serotonergic reinnervation in the lesioned spinal cord by reducing glial reaction. *J Neurosci Res.* 1995;41(1):79-95.
- [20] Galou M, Colucci-Guyon E, Ensergueix D, Ridet JL, et al. Disrupted glial fibrillary acidic protein network in astrocytes from vimentin knockout mice. *J Cell Biol.* 1996;133(4):853-63.
- [21] Menet V, Gimenez y Ribotta M, Sandillon F, Privat A. GFAP null astrocytes are a favorable substrate for neuronal survival and neurite growth. *Glia.* 2000;31(3):267-72.
- [22] Menet V, Prieto M, Privat A, Gimenez y Ribotta M. Axonal plasticity and functional recovery after spinal cord injury in mice deficient in both glial fibrillary acidic protein and vimentin genes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100(15):8999-2004.
- [23] Fawcett JW. The extracellular matrix in plasticity and regeneration after CNS injury and neurodegenerative disease. *Prog Brain Res.* 2015;218:213-26.
- [24] Bradbury EJ, Moon LD, Popar RJ, King VR, Bennett GS, et al. Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury. *Nature.* 2002 416(6881):636-40.
- [25] Chen MS, Huber AB, van den Haar ME, Frank M et al. Nogo-A is a myelin-associated neurite outgrowth inhibitor and an antigen for monoclonal antibody IN-1. *Nature.* 2000 403(5768):434-9.
- [26] Merkler D, Metz AG, Raineteau O, Dietz V, Schwab ME, Fouad K. Locomotor recovery in spinalcord-injured rats treated with an antibody neutralizing the myelin-associated neurite growth inhibitor Nogo-A. *J Neurosci.* 2001;21(10):3665-73.
- [27] Freund P, Schmidin E, Wannier T, Bloch J, et al. Nogo-A-specific antibody treatment enhances sprouting and functional recovery after cervical lesion in adult primates. *Nat Med.* 2006; 12(7):790-2.
- [28] Tuszynski M. Challenges to the report of Nogo antibody effects in primates. *Nat Med.* 2006 ; 12(11):1231-32.
- [29] Freund P, Schmidin E, Wannier T, Bloch JR et al. Anti-Nogo-A antibody treatment promotes recovery and manual dexterity after unilateral cervical lesion in adult primates. Re-examination and extension of behavioural data. *Eur J Neurosci.* 2009;29(5):983-96.
- [30] Tabakow P, Raisman G. et al. Functional regeneration of supraspinal connections in a patient with transected spinal cord following transplantation of bulbar olfactory ensheathing cells with peripheral nerve bridging. *Cell Transplant.* 2014;23:1631-55.

- [31] Rataboul P, Vernier P, Privat A. Analysis of glial scarring in the mammalian CNS with a GFAP cDNA probe. *Adv Exp Med Biol.* 1990;265:23-40.
- [32] Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis Elegans*. *Nature.* 1998;391(6669):806-11.
- [33] Desclaux M, Teiggel M, Amar L, Vogel R, et al. A novel and efficient gene transfer strategy reduces glial reactivity and improves neuronal survival and axonal growth *in vitro*. *PLoS One.* 2009;4(7):e 6227.
- [34] Desclaux M, Perrin FE, Do-Thi A, Prieto-Cappellini M. Lentiviral-mediated silencing of glial fibrillary acidic protein and vimentin promotes anatomical plasticity and functional recovery after spinal cord injury. *J. Neurosci Res.* 2015;93(1):43-55.
- [35] Kwon BK, Streijger F, Hill CE, Anderson AJ, Bacon M, et al. Large animal and primate models of spinal cord injury for the testing of novel therapies. *Exp Neurol.* 2015;269:154-68.
- [36] Noristani HN, Lonjon N, Cardoso M, Le Corre M, et al. Correlation of *in vivo* and *ex vivo* (1)H-MRI with histology in two severities of mouse spinal cord injury. *Front Neuroanat.* 2015; 9:24.
- [37] Verdier JM, Acquatella I, Lautier C, Devau G, Trouche S, Lasbleiz C, Mestre-Frances N. Lessons from the analysis of nonhuman primates for understanding human aging and neurodegenerative diseases. *Front Neurosc.* 2015 Mar 4;9:64.