

1. SESSION I : INTRODUCTION A LA BIOTHERAPIE CELLULAIRE ET GENIQUE

1.1. Préambule

La légende de Prométhée est un symbole pour la médecine régénérative. Elle laisse supposer que les Grecs anciens avaient découvert que le foie est l'un des rares organes humains à se régénérer spontanément en cas de lésion.



Figure 1.1. Tableau représentant le mythe de Prométhée par le peintre Rubens.

Le titan Prométhée donna aux hommes le pouvoir du feu. Il entra ainsi en conflit avec le dieu Zeus qui lui infligea un supplice. Il fut enchainé à un rocher dans les montagnes du Caucase où un aigle lui rongea le foie toute la journée. Son supplice était infini car toutes les nuits, **son foie se régénérait.**

Les chercheurs espèrent faire de cette légende une réalité en développant des thérapeutiques permettant de réparer des cellules, tissus ou organes endommagés ou âgés. C'est ce qu'on appelle la médecine régénérative.

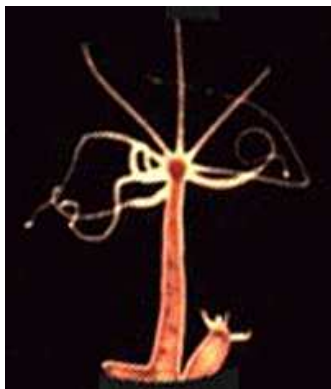
1.2. Les espèces primitives - apparues il y a plusieurs centaines de millions d'années - ont une capacité de réparation des tissus et organes qui a été perdue au cours de l'évolution

La biothérapie cellulaire a pour objectif de réparer des cellules âgées ou déficientes par des cellules en bonne santé de façon à réparer un tissu ou la fonction d'un organe. La capacité de régénération est usuelle pour certaines plantes qui repoussent après taille, qui génère une nouvelle plante après bouture.

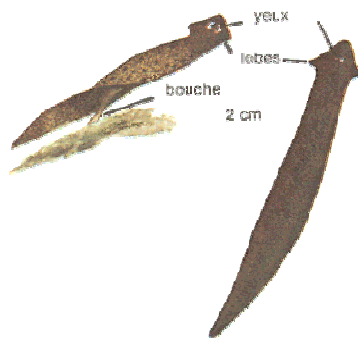
Pour les espèces animales, la capacité de réparer des tissus ou des organes a été progressivement perdue au cours de l'évolution au bénéfice de la cicatrisation.

Les espèces animales primitives apparues il y a plusieurs centaines de millions d'années ont la capacité d'une réparation d'un tissu ou organe.

Prenons 3 exemples parmi les plus connus. L'**hydre** est un animal d'eau douce (embranchement des Cnidaires) apparue il y a 680 millions d'années. L'hydre est un animal de structure simple avec un pied accroché sur un support et 8 à 10 tentacules (voir figure 1.2). Lorsque l'on coupe une hydre en deux, chaque partie régénère une hydre complète. Du fait de cette propriété, le Suisse Abraham Trembley (1710-1784) l'a baptisé « hydre » en référence au monstre mythologique. Il en est de même des vers, en particulier des **vers planaires** (embranchement des Plathelminthes), apparus il y a 550 millions d'années. Ces espèces sont plus évoluées que l'hydre avec un système nerveux, un organe digestif, et un organe génital. Peter Simon Pallas (1741-1811) a montré qu'en coupant un ver planaire, chaque morceau pouvait reconstituer un ver complet. Le ver planaire peut même être coupé jusqu'à 279 morceaux qui vont reconstituer 279 vers planaires !



Hydre



Ver Planaire



Salamandre

Figure 1.2 : Quelques espèces primitives capables de régénération

Ces deux espèces animales simples avec une capacité de régénération bidirectionnelle ont été les plus étudiées. Une capacité de régénération, plus ou moins limitée, existe pour d'autres espèces primitives. Ainsi, le lombric, notre ver de terre commun, peut se régénérer quand il est coupé en deux parties, mais pas en de multiples parties. Les insectes et crustacés peuvent régénérer une patte, une pince.

Prenons l'exemple de la **salamandre**, un petit amphibien (ordre des urodèles) apparu il y a 150 millions d'années, qui est l'espèce animale vertébrée qui a la plus forte capacité de régénération : patte, queue, mâchoire, cœur (partie), œil (partie), peuvent se régénérer. Par exemple, lorsque une patte est amputée, la salamandre est capable de reconstituer une patte identique en plusieurs semaines.

Le processus se décompose en :

- Cicatrisation du site d'amputation pendant les deux premiers jours de façon à éviter la fuite de liquide corporel et créer une barrière contre l'environnement externe.
- Formation d'un bourgeon de cellules indifférenciées (on appellera par la suite ces cellules indifférenciées des cellules souches) à partir du site de cicatrisation.
- Différenciation de ce bourgeon pour créer une structure tri-dimensionnelle de différents types cellulaires travaillant de façon coordonnée: cellules des vaisseaux, os, cartilage, cellules musculaires, cellules de la peau, neurones.

Les cellules souches à l'origine de cette réparation ont gardé la mémoire tissulaire de l'organe amputé. C'est un processus qui prend environ 40 jours.

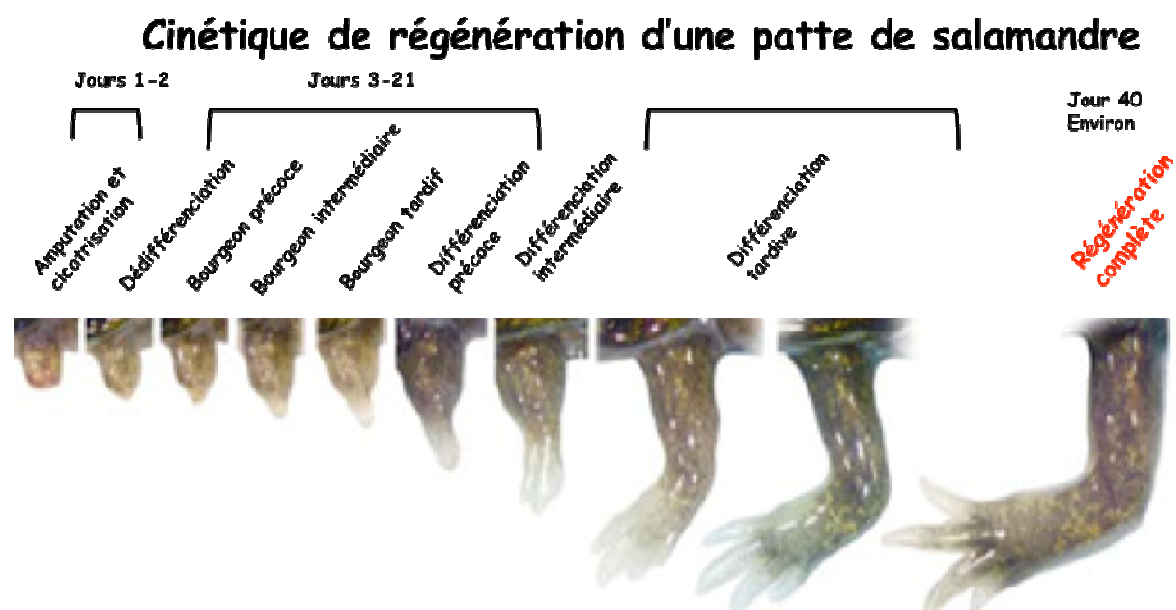


Figure 1.3 : Régénération d'une patte de Salamandre après amputation

1.3 Comment restaurer cette capacité de régénération des tissus et organes : biothérapies cellulaires et génique.

Notre corps est composé de 10 milliards de cellules regroupés en 200 tissus et organes. Tout d'abord quelques définitions pour mieux comprendre la médecine régénérative.

1.3.1. Quelques définitions.

Une cellule est la plus petite unité fonctionnelle d'un être vivant (Figure 1.4A). C'est un petit sac de quelques microns à quelques dizaines de microns suivant les types cellulaires, délimité par une membrane cellulaire lui permettant de s'isoler physiquement et du milieu extérieur tout en communiquant avec lui (Figure 1.4.B). La cellule contient un noyau délimité par une membrane « nucléaire » qui renferme l'ADN. L'ADN contient le programme de la cellule, codant pour l'information permettant à la cellule d'exercer ses fonctions. Cet ADN est traduit en protéines qui sont les molécules actives d'une cellule lui permettant de respirer de produire de l'énergie, de survivre, de proliférer, de communiquer avec les autres cellules, de produire les composantes de la matrice extracellulaire.

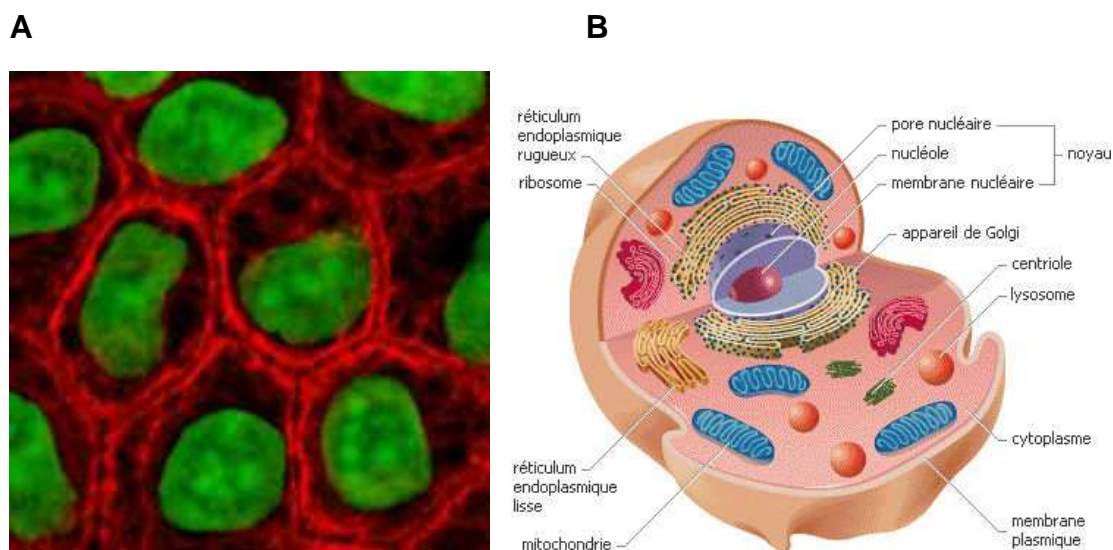


Figure 1-4. Cellule. Notre corps humain est composé de 10000 milliards de cellules. Une cellule est une entité fonctionnelle délimitée par une membrane cellulaire (ou plasmique) lui permettant les échanges avec l'extérieur. La cellule comprend un noyau, en vert sur la figure 1.4A, en violet sur la figure 1.4B, contenant l'ADN. L'ADN contient le programme de la cellule qui est traduit en protéines lui permettant d'exercer ses fonctions spécifiques.

Les tissus sont le niveau d'organisation intermédiaire entre les cellules et les organes. Un tissu est un ensemble de cellules pas forcément identiques mais de même origine, regroupée en ensemble fonctionnel, c'est-à-dire concourant à une même fonction. Nous avons environ 200 tissus dans notre corps humain.

Les tissus se groupent en organes. Un organe est un ensemble de tissus concourant à la réalisation d'une fonction physiologique. Certains organes assurent simultanément plusieurs fonctions, mais dans ce cas, une fonction est généralement associée à un sous-ensemble de cellules. Prenons comme exemple d'organe la peau (Figure 1.5).

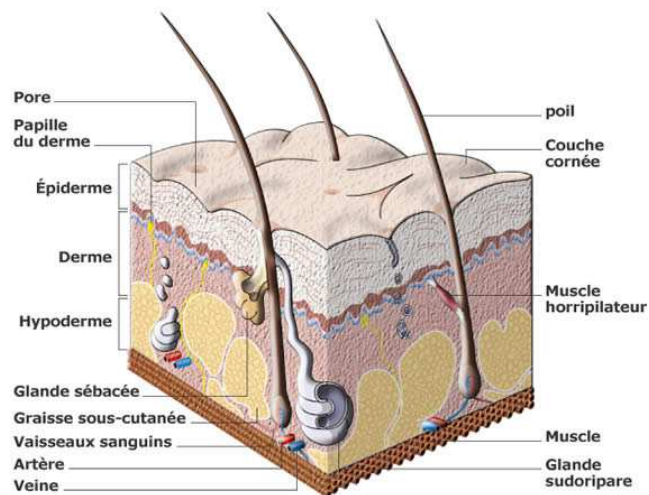


Figure 1-5. Coupe de peau. La peau est un organe vital assurant la protection du corps humain par rapport au milieu extérieur tout en assurant les échanges avec ce milieu extérieur. La peau est composée d'un ensemble de plusieurs tissus lui permettant d'assurer ces nombreuses fonctions (source « Invision.me.free.fr »).

La peau représente 8% de notre organisme en tant que poids et elle assure à la fois la protection de notre corps contre les agressions extérieures et les échanges entre notre corps et l'extérieur. C'est un organe sophistiqué contenant trois tissus principaux : l'épiderme, le derme et l'hypoderme.

1.3.2. Définition des Biothérapies cellulaires et géniques

Les Biothérapies sont l'ensemble des thérapeutiques basées sur l'emploi d'organismes vivants (levures, ferments, certains microbes, cellules, tissus) ou de substances prélevées sur des organismes vivants (hormones, extraits d'organes ou de tissus). Les biothérapies s'opposent aux chimiothérapies - au sens large - qui utilisent des substances de synthèse chimique. Les biothérapies recouvrent les thérapies cellulaires (manipulation de cellules souches ou différenciées), les thérapies tissulaires (différentes greffes de tissus vivants), les thérapies géniques (transfert de gènes, intervention sur les gènes). Les biothérapies englobent également des thérapies utilisant des médicaments copiant des molécules naturelles du corps humain et synthétisés par des bactéries ou des cellules, tels que des anticorps, des protéines bioactives (facteurs de croissance). Dans ce cours, nous ne traiterons que des biothérapies cellulaires et géniques.

1.3.3. Comment restaurer cette capacité de régénération des tissus et organes

Regardons attentivement le schéma de la coupe de patte de Salamandre (Figure 1.2). On comprend que pour réparer une patte de Salamandre, l'organisme doit produire plusieurs milliards de cellules, qui vont s'organiser en tissus qui eux mêmes vont structurer les différents organes d'une patte, ceci de façon synchronisée pour aboutir à une patte harmonieuse et fonctionnelle. Chez l'homme, nous sommes très loin de ces possibilités en 2010. Mais si la médecine moderne ne sait pas encore recréer des organes complets, elle commence à savoir manipuler la plus petite entité vivante : la cellule. Elle peut également produire des tissus simples comme l'épiderme avec un rôle bénéfique thérapeutique pour les grands brûlés, mais ne sait pas régénérer une peau complète. Elle sait également corriger un gène défectueux dans une cellule, et ceci de façon de plus en plus sécurisée.

Il faut repousser ces limites grâce au progrès de la recherche fondamentale, mais également, nous le verrons dans ce cours, en utilisant toute observation clinique et une approche pragmatique.

Nous exposerons les données scientifiques et médicales essentielles permettant d'anticiper le développement de ce domaine thérapeutique passionnant.

1.4 Nos cellules ont conservé certaines propriétés essentielles présentes chez les espèces primitives pour la réparation tissulaire.

Une réparation complète d'un organe déficient à partir d'un contingent de cellules souches serait d'un intérêt immense pour l'être humain. Cependant, comme précisé ci-dessus, ce potentiel de réparation a été perdu au cours de l'évolution des espèces au bénéfice de la cicatrisation. Nous verrons dans ces exposés que les éléments essentiels nécessaires à ce processus de réparation ont été conservés dans l'espèce humaine et peuvent être utilisés à des finalités thérapeutiques. C'est le domaine de la biothérapie cellulaire.

Un moteur commun à ces stratégies : les cellules souches.

Une cellule souche est une cellule indifférenciée qui a pour propriétés :

- **l'auto renouvellement** : la cellule souche se divise en deux cellules filles dont au moins une reste indifférenciée, avec les mêmes propriétés que la cellule mère, en particulier la propriété d'auto-renouvellement. Ainsi la cellule souche se renouvelle constamment.
- **la génération des cellules différenciées**, c'est à dire capables d'assurer la fonction d'un tissu ou d'un organe. Une cellule souche peut être capable de générer plusieurs types de cellules différenciées.

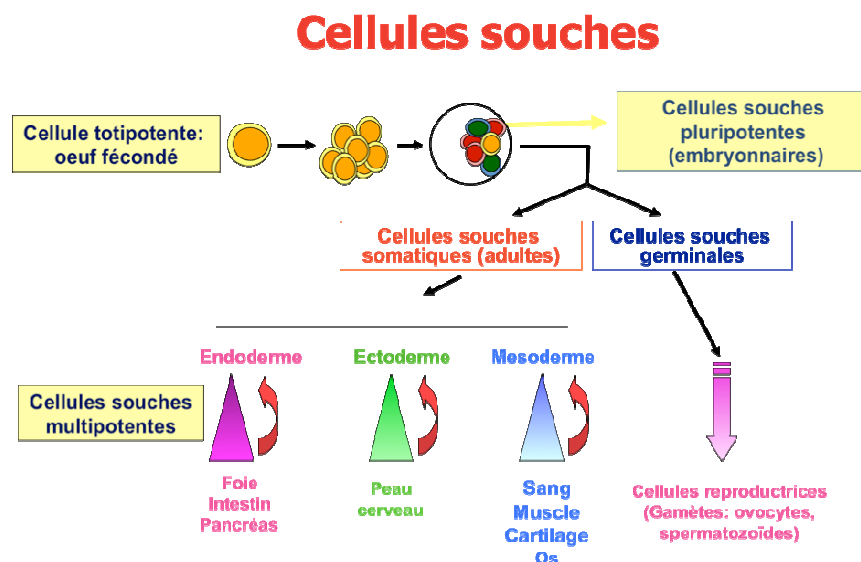


Figure 1.6 Différentes catégories de cellules souches. L'œuf fécondé génère un individu de **10 000** milliards de cellules regroupées **au sein de 200 tissus**. L'œuf fécondé génère en premier lieu des cellules souches embryonnaires capables de générer tous les tissus d'un individu. Ces cellules souches embryonnaires génèrent des cellules souches plus ou moins engagées vers un type cellulaire donné.

Cette notion de cellule souche est largement commentée dans les journaux grand public. Pour bien comprendre ce qu'est une cellule souche, considérons le schéma 1-6 ci-dessous.

La cellule, appelée cellule totipotente, qui a le potentiel de prolifération et de génération de diversité cellulaire le plus important est **l'œuf fécondé**. Notre organisme, qui comporte 10 000 milliards de cellules regroupés en 200 tissus, provient d'une seule cellule issue de la fécondation d'un ovocyte de notre mère par un spermatozoïde de notre père. L'œuf fécondé, lorsqu'il est implanté dans la paroi utérine, prolifère de façon massive et génère un embryon précoce, qui va générer un foetus puis un nouveau-né. L'œuf fécondé se différencie en cellules souches de plus en plus engagées dans une voie de différenciation.

1.4.1 Les cellules souches embryonnaires sont capables de générer tous les tissus de l'organisme, y compris les cellules reproductrices (gamètes)

Une deuxième catégorie de cellule souche qui est commentée régulièrement dans les **mass media** est celle des cellules souches embryonnaires. Elles seront exposées dans le **chapitre II**. Les cellules souches embryonnaires sont issues des cellules de la masse cellulaire interne d'un embryon précoce de 5-6 jours. Lorsque ces cellules de la masse interne sont mises en culture **in vitro** (in vitro signifie cultiver ces cellules en dehors de l'organisme) dans des conditions appropriées, elles sont capables d'une prolifération illimitée. Les cellules souches embryonnaires sont appelées cellules souches pluripotentes, capables de générer in vitro l'ensemble des tissus de l'organisme, y compris les cellules reproductrices - ovocytes ou spermatozoïdes - appelées gamètes. Les modèles animaux ont montré que toute intervention sur ces cellules embryonnaires sera présente dans toutes les cellules du futur embryon

1.4.2 Certains tissus/organes d'un individu sain sont en constant renouvellement grâce aux cellules souches adultes

Il existe d'autres types de cellules souches, les cellules souches adultes ou somatiques qui ont une capacité de prolifération importante mais ont perdu la capacité de générer l'ensemble des tissus de l'organisme. Il y a différentes catégories de cellules souches suivant leur capacité à générer tel ou tel type cellulaire comme illustré dans la figure 1.6. Ces cellules souches adultes seront exposées dans **le chapitre III**, notamment les **cellules souches hématopoïétiques** capables de générer l'ensemble des cellules du sang : globules rouges, plaquettes, globules blancs, lymphocytes. Les cellules du sang sont vitales, mais ont une durée

courte, d'une journée pour certains globules blancs à 120 jours pour un globule rouge. Tous les jours, l'organisme doit produire plusieurs centaines de milliards de cellules du sang de façon hautement contrôlée, et ceci à partir d'un petit contingent de cellules souches. Ces cellules souches hématopoïétiques et lymphoïdes sont largement utilisées en clinique avec des progrès majeurs depuis quelques années. Dans le chapitre III, seront également discutées les **cellules souches mésenchymateuses**. Les cellules souches mésenchymateuses sont capables de générer les tissus de soutien, l'os, le cartilage, les cellules de soutien (stromales) présentes dans de nombreux tissus, et les cellules graisseuses, appelés adipocytes.

Ci-joint sont indiqués plusieurs exemples de renouvellement continu d'un tissu ou organe.

- Cellules souches épithéliales et renouvellement des tissus épithéliaux.

Il existe plusieurs catégories de cellules souches adultes, à titre d'exemple les cellules souches épithéliales, qui sont essentielles pour le renouvellement des muqueuses (peau, muqueuses intestinales). Celles-ci sont en constant renouvellement, et ce processus implique des cellules souches épithéliales (définition et glossaire) comme c'est le cas dans la muqueuse intestinale.

- Réparation du foie et cellules souches hépatocytaires

Un autre exemple frappant du potentiel des cellules souches adultes est celui du **foie**. Lorsque on retire une partie de foie chez un animal (processus que l'on appelle hépatectomie), des cellules du foie appelées hépatocytes sont capables de se différencier, de proliférer et de reconstituer le tissu hépatique. Les mécanismes contrôlant la réparation du tissu hépatique ne sont pas bien compris. S'il devient possible de reproduire ces mécanismes en dehors de l'organisme, on pourrait générer une grande quantité de cellules du foie pour restaurer la fonction hépatique des patients présentant une destruction importante du foie (hépatite)..

- Prostate et cellules souches.

Il est possible de générer l'ensemble d'un tissu prostatique fonctionnel à partir d'une seule cellule souche présente dans la prostate de souris adulte. Cette cellule souche est purifiée sur la base de l'expression de marqueurs présents sur sa membrane cytoplasmique, à l'aide d'anticorps spécifiques de ces marqueurs et de techniques de tri cellulaire. Ces cellules souches sont appelées cellules souches prostatiques.

1.4.3 L'expression de seulement quatre de nos 25 000 gènes suffit à reprogrammer des cellules différenciées en cellules souches ayant la capacité de générer tous les tissus de l'organisme.

Ces exemples, aussi bien chez l'homme que chez l'animal, montrent que bien que les mammifères aient perdu le potentiel de réparation d'un membre amputé présent chez la Salamandre, l'information codant pour les mécanismes essentiels de ce processus de réparation est toujours présente dans le génome humain et peut être réactivée dans certains organes in vivo, ou par une manipulation de cellules in vitro.

Ce potentiel présent dans notre génome a été démontré par la découverte du Professeur YAMANAKA en 2006. Cette équipe a montré que des cellules différenciées d'un tissu peuvent être reprogrammées en cellules souches pluripotentes, capables de :

- prolifération illimitée dans des conditions de culture appropriées
- génération de l'ensemble des tissus de l'organisme, y compris les gamètes.

Ces cellules reprogrammées en cellules pluripotentes sont appelées *iPS* (de l'Anglais Induced Pluripotent Stem cells).

La découverte du professeur YAMANAKA est une avancée cruciale pour la médecine régénérative. Notre génome contient environ 25 000 gènes et l'activation de quatre de ces 25 000 gènes suffit à reprogrammer une cellule différenciée en cellule pluripotente (proche de cellules embryonnaires) et ceci de façon définitive. Comme cette découverte est simple, elle a été reproduite par de nombreuses équipes. Les mécanismes impliqués dans cette reprogrammation sont indiqués dans le chapitre II.

Il est facile de comprendre les possibilités fantastiques d'application de cette découverte. Une fois ces méthodologies sécurisées, on pourra créer pour tout individu une source illimitée de cellules souches de type embryonnaire capables de réparer l'essentiel des tissus et organes. L'intérêt de cette découverte majeure est qu'elle est simple et qu'elle a pu être reproduite par un très grand nombre d'équipes dans le monde.

1.5. Applications potentielles de la biothérapie cellulaire

1.5.1 Domaines d'application

Nous avons introduit les avancées récentes sur les cellules souches embryonnaires, sur la possibilité de reprogrammer des cellules adultes en cellules pluripotentes, sur

l'identification et la manipulation des cellules souches adultes. Ces avancées permettent de développer des stratégies de biothérapie cellulaire pour réparer des tissus et organes.

Dans la table ci-dessous, sont indiqués les nombreux domaines pour lesquels des applications médicales sont validées (rouge), en développement (bleu), ou vont être développées (vert).

De nombreux domaines médicaux

- **Cancer**
- **Peau**
- **Cartilage et os**
- **Diabète**
- **Infectiologie**
- **Cardiopathies**
- **Déficits hépatiques**
- **Pathologies musculaires**
- **Maladies neurodégénératives**

Figure 1.7. Domaines médicaux d'application reconnue en biothérapie cellulaire (rouge), en cours de développement thérapeutique (bleu), en cours d'essais cliniques ou précliniques (verts).

1.5.2 Biothérapie cellulaire d'application médicale courante.

Cancérologie. Lorsque les patients sont traités par chimiothérapie pour éradiquer les cellules tumorales, des cellules normales sont également détruites, en premier lieu les cellules souches capables de générer les cellules du sang : globules rouges, plaquettes et globules blancs. La génération des cellules du sang a lieu dans la moelle osseuse. Le processus de génération s'appelle hématopoïèse et les cellules souches cellules souches hématopoïétiques. Afin de pouvoir augmenter la dose de chimiothérapie injectée pour détruire un maximum de cellules tumorales, les cellules souches hématopoïétiques du patient sont collectées avant chimiothérapie intensive, congelées, et greffées au patient après chimiothérapie intensive. Ces cellules souches hématopoïétiques décongelées permettent de réparer l'ensemble des tissus hématopoïétiques et lymphocytaires. Ce processus peut également avoir lieu avec des cellules souches non plus du patient, mais provenant de donneurs.

Grefe de peau. Pour les grands brûlés, Il est possible de générer en dehors de l'organisme (on dit "*in vitro*") un épiderme fonctionnel qui, greffé au malade, permet

de restaurer une barrière épithéliale essentielle pour la survie du patient. Un petit fragment de peau saine de quelques centimètres carrés est cultivé pendant plusieurs semaines à grande échelle en présence de milieux de culture et de facteurs de croissance pour générer plusieurs m² de peau. Une limite est que seul l'épiderme est restauré, ce qui donne une peau avec une grande fragilité. Ces biothérapies cellulaires de génération d'un épiderme sont développées par quelques sociétés privées, et coûtent cher. Une solution d'avenir est de générer ces cellules de la peau à partir de cellules souches pluripotentes, embryonnaires ou induites, et de reconstituer à la fois l'épiderme et le derme (cf. communiqué de presse Istem en annexe 1 p.85).

Grefe de cartilage. Il est possible de réparer des lésions localisées du cartilage, notamment chez les grands sportifs. La méthodologie consiste à mettre en culture des cellules de cartilage sain, appelées chondrocytes, pendant une à deux semaines. Les cellules chondrocytaires amplifiées sont greffées et reconstituent la matrice cartilagineuse. Ces stratégies seraient très utiles pour réparer des disques vertébraux avec plusieurs essais thérapeutiques à grande échelle.

Grefe d'îlots de Langerhans. Une perspective qui concerne un grand nombre de patients atteints de diabète est la possibilité de réparer les cellules bêta du pancréas produisant de l'insuline. Il existe deux types de diabète :

- le diabète de type I, caractérisé par une destruction des cellules bêta produisant de l'insuline, par le système immunitaire du patient.
- le diabète de type II, caractérisé par une insensibilité progressive des cellules de l'organisme à l'insuline.

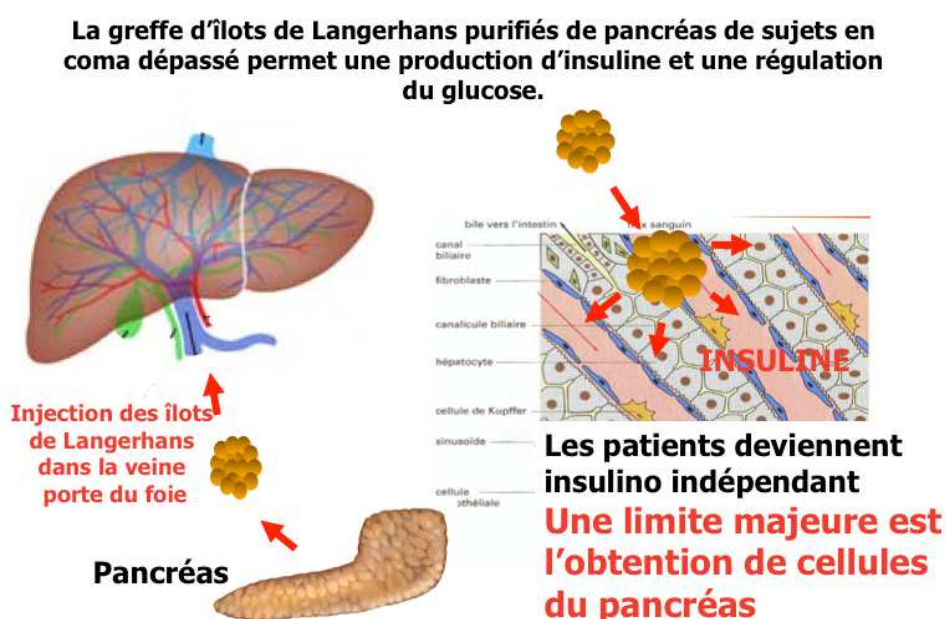


Figure 1-8. Greffe d'îlots pancréatiques (Langerhans) dans la veine porte du foie. Les îlots contenant de quelques à plusieurs milliers de cellules sont injectés dans la veine porte et bloqués dans les vaisseaux sanguins du foie. Ils se développent alors dans le tissu hépatique.

Dans les deux pathologies, le taux de glucose circulant augmente, entraînant de multiples problèmes de toxicité notamment sur les vaisseaux sanguins et lymphatiques. Le traitement du diabète de type I consiste à injecter de l'insuline pour restaurer le déficit de production par les cellules bêta. Cependant chez certains patients, l'injection d'insuline ne permet pas de contrôler de façon efficace les taux de glucose ce qui entraîne des chocs hyperglycémiques ou hypoglycémiques, et les complications associées. Depuis une dizaine d'années se sont développées les stratégies de greffe d'îlots pancréatiques pour les patients avec diabète de type 1 instable. L'insuline est produite de façon gluco-dépendante par les îlots greffés et les patients deviennent indépendants d'injection d'insuline. Ces patients insulino-résistants dont le devenir médical posait un gros problème peuvent ainsi bénéficier de conditions de vie sans injection d'insuline et en contrôlant les toxicités associées aux hyperglycémies et hypoglycémies.

Muscle cardiaque.

Les cardiopathies sont la première cause de mortalité et plusieurs stratégies sont potentiellement intéressantes pour réparer un muscle cardiaque.

Réparation du muscle cardiaque infarcté par injection de cellules de la moelle osseuse

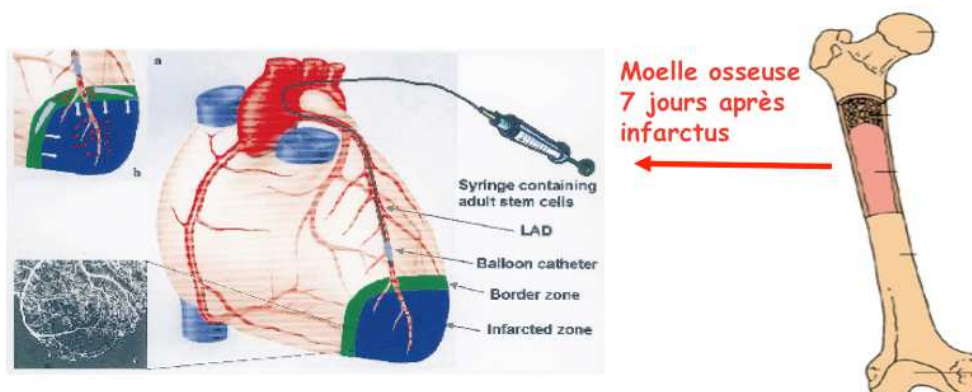


Figure 1.9. Injection de cellules de la moelle osseuses a fin de réparer un muscle cardiaque infarcté.

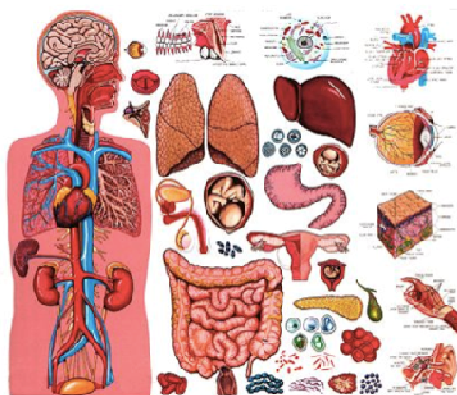
Plusieurs stratégies de réparation du muscle cardiaque sont en cours de mises au point. Les stratégies en développement clinique consistent à injecter la moelle osseuse du patient prélevée quelques jours après l'infarctus. Le principe actif est probablement les précurseurs des cellules formant les vaisseaux, présents dans la moelle osseuse, qui implantés dans la zone infarctée contribuent à la revascularisation du muscle cardiaque. Dans des modèles animaux, on a pu montrer que des cellules souches embryonnaires ou des cellules souches pluripotentes adultes sont capables lorsqu'elles sont implantées dans le muscle cardiaque, de se différencier en cardiomyocytes restaurant une fonction cardiaque efficace. L'application de ces techniques chez l'homme pourrait être envisagée dans les prochaines années, sous réserve des conditions de sécurité que nous exposons ci-dessous.

1.6 Sept principes essentiels pour le développement de la biothérapie cellulaire.

Les données scientifiques et médicales de ces dernières années, rappelées brièvement ci-dessus, montrent qu'un organisme humain a conservé le potentiel majeur de réparation des tissus et organes fonctionnels dans les espèces primitives. Les perspectives sont immenses, concernent beaucoup de pathologies et de nombreux patients, avec un marché financier estimé à plusieurs dizaines de milliards d'euros. Ces perspectives immenses expliquent que les recherches en biothérapie cellulaire sont très médiatisées, ce qui permet à certaines compagnies de vendre des stratégies thérapeutiques dont l'efficacité n'est pas prouvée. Tout l'enjeu des recherches scientifiques et médicales est d'activer ce potentiel de réparation tissulaire présent au sein de nos cellules, de façon sécurisée mais sans freiner les recherches.

Bien que les mécanismes mis en jeu soient complexes, multiples et concernent des tissus et organes différents, on peut dégager **7 principes faciles à comprendre et ceci quel que soit le tissu ou l'organe à réparer** (voir figure 1.10). Cette réflexion structurée permet de comprendre facilement quel principe est mis en jeu dans un essai de biothérapie cellulaire.

Comment réparer les tissus ou organes?



1. **Identifier le défaut** et quelles cellules ou molécules peuvent corriger ce défaut.
2. **Réparation à long terme.** Corriger le défaut à long terme: cellules souches ou cellules différenciées survivant longtemps.
3. **Sécurité.** Être sûr que les cellules ne vont pas produire un autre tissu ou être anormales (cancéreuses).
4. **Irrigation (vascularisation)** du tissu.
5. **Localisation.** Comment amener les cellules au sein du tissu à réparer.
6. **Survie, prolifération et différenciation.** Apporter les facteurs de croissance dans le tissu à réparer.
7. **Contrôle immunitaire,** en particulier dans le cas des cellules d'un donneur (cellules allogéniques) ou de cellules modifiées in vitro.

Figure 1.10. Sept principes essentiels pour développer les stratégies de biothérapie cellulaire

1.6.1 Le premier principe est d'identifier le défaut que l'on veut réparer et d'identifier quelles cellules ou molécules peuvent corriger ce défaut

Ce problème a priori évident n'est pas simple. Par exemple, en cas d'infarctus du myocarde sévère, quel type de cellule faut-il injecter ? Si l'infarctus est ancien, que le tissu cardiaque est cicatriciel sans cellules fonctionnelles, il faut restaurer l'ensemble du tissu cardiaque. Si l'infarctus est récent, le défaut est moins complexe à corriger. Faut-il injecter uniquement des cellules qui vont reconstituer les vaisseaux, et permettre aux cardiomyocytes endogènes de réparer les lésions une fois que les vaisseaux sont présents et que l'oxygène et les nutriments nécessaires pour la survie, la prolifération et la fonction des cellules sont apportés? Faut-il injecter également des cellules souches ? Ces questions ne sont pas élucidées pour le moment.

1.6.2 Le deuxième principe est de réparer à long terme le tissu

Un exemple simple est la transfusion plaquettaire. En cas de déficit de production de plaquettes, ce qui entraîne un risque vital, d'hémorragie la biothérapie cellulaire consiste à injecter des culots plaquettaires prélevés chez des donneurs sains. Les plaquettes ayant une durée de vie limitée de quelques jours, la transfusion plaquettaire a un intérêt thérapeutique pendant quelques jours seulement. Ce qui est possible pour les plaquettes n'est pas possible pour la réparation d'autres tissus

comme la réparation du cartilage, de l'os, du muscle cardiaque du foie, du pancréas. Il faut injecter des cellules capables de corriger le défaut pour la durée la plus longue possible. Pour ceci, il faut injecter soit des cellules souches, capables d'une prolifération in vivo et de générer de façon continue des cellules différenciées, soit des cellules différenciées mais survivant longtemps in vivo. L'injection de cellules souches capables de prolifération importante et de générer de façon continue des cellules différenciées est la stratégie qui est utilisée dans le cadre de la greffe de cellules souches hématopoïétiques. L'injection de cellules différenciées survivant longtemps est la stratégie utilisée dans le cadre de la greffe d'îlots de Langerhans.

1.6.3 Le troisième principe essentiel est la sécurité

Plus on souhaite corriger un défaut pour une durée longue, plus il est nécessaire d'injecter des cellules ayant une capacité de survie et de prolifération à long terme. Cette capacité peut poser un problème notamment avec la possibilité de cancérisation de ces cellules. La frontière entre une cellule souche normale et une cellule souche tumorale est ténue. Les mécanismes de survie et de prolifération sont proches voire identiques. Lorsque l'on cultive in vitro des cellules souches normales, des lésions chromosomiques peuvent être induites dans ces cellules. Les tests pour détecter ces anomalies génétiques sont peu sensibles, ne permettent pas de détecter des anomalies fines dans un petit contingent de cellules. Le développement de tels tests est un vrai défi pour le développement des biothérapies cellulaires.

Il est de même nécessaire que ces cellules injectées in vivo exercent la fonction attendue. Prenons par exemple la réparation du cartilage. On souhaite réparer du cartilage, mais pas générer un autre tissu en particulier de l'os. Or les cellules souches cartilagineuses et osseuses sont identiques et il est essentiel, lorsqu'on manipule ces cellules in vitro, d'avoir des systèmes de contrôle garantissant que l'on ne va pas générer de l'os, mais du cartilage.

Une autre difficulté est qu'il faut libérer des cellules sur un plan thérapeutique dans un temps court par rapport à la nécessité de faire des contrôles sophistiqués qui peuvent être longs. Tous ces problèmes de sécurité sont loin d'être résolus. Ils nécessitent une connaissance approfondie des principes 1 et 2 ci-dessus et une connaissance fondamentale de la biologie cellulaire.

1.6.4 Le principe 4 est la vascularisation du tissu

Des cellules survivent dans l'organisme parce qu'elles sont à proximité de vaisseaux qui permettent d'apporter l'oxygène, d'éliminer le gaz carbonique et d'apporter les nutriments nécessaires pour la survie, la prolifération et l'activité métabolique des

tissus. Une cellule in vivo ne doit pas être située à plus de 200 microns d'un capillaire. Si on souhaite réparer un tissu, il faut que ce tissu soit vascularisé. Pour cette raison, la compréhension des mécanismes de production des vaisseaux - appelé angiogénèse - est essentielle, avec en particulier l'utilisation de progéniteurs endothéliaux capables de générer de nouveaux vaisseaux.

1.6.5 Le cinquième principe est d'injecter les cellules réparatrices au bon endroit

Comment délivrer les cellules réparatrices au bon endroit ? Cette question à priori simple est très compliquée. Cette question fondamentale est résolue pour les **cellules souches hématopoïétiques par l'organisme lui même**. Elles sont localisées dans la moelle osseuse et il est difficile d'injecter ces cellules souches hématopoïétiques dans la moelle osseuse d'un patient, moelle qui est distribuée dans tous les os de l'organisme. Cette question est résolue par l'organisme lui-même. Les cellules souches hématopoïétiques sont présentes dans la moelle osseuse au contact de vaisseaux sanguins de la moelle osseuse et sont en constante recirculation dans le sang. C'est-à-dire qu'une petite fraction de ces cellules est capable chaque jour de quitter la moelle osseuse pour aller dans les vaisseaux sanguins et vice versa, les **cellules souches hématopoïétiques** présentes dans le sang sont capables de migrer dans la moelle osseuse. Cette recirculation constante des cellules souches hématopoïétiques explique que lorsque on injecte dans le sang périphérique d'un patient des cellules souches hématopoïétiques d'un donneur, elles vont naturellement se loger dans la moelle osseuse. Ce processus nécessite une reconnaissance spécifique par la cellule du tissu dans lequel elle va migrer. Cette reconnaissance se fait par des molécules membranaires présentes sur la cellule souche et par des molécules présentes sur les cellules vasculaires du tissu et/ou produites par les cellules du tissu. Dans l'exemple du pancréas, il n'est pas possible d'injecter des cellules d'îlots de Langerhans dans le pancréas directement. Cette difficulté est résolue en injectant des îlots dans la veine porte du foie. Ces îlots pancréatiques restent dans le foie parce qu'ils sont bloqués par les vaisseaux capillaires du fait de leur taille. Nous voyons qu'un simple processus de rétention par taille dans les capillaires permet de localiser un ensemble de cellules dans un tissu donné.

1.6.6 Un sixième principe est que les cellules introduites dans le tissu souhaité puissent trouver dans ce tissu les facteurs de survie de prolifération et de différenciation

Un tissu est un ensemble complexe de cellules dialoguant entre elles, avec notamment des cellules assurant des fonctions de soutien ou niche. Pour chaque pathologie, il faut s'interroger sur la fonctionnalité des cellules de soutien, voire les restaurer par biothérapie cellulaire. Dans le cadre de l'injection de cellules souches hématopoïétiques d'un donneur compatibles avec un patient, les cellules sont injectées dans le sang et vont se localiser dans la moelle osseuse du patient par les mécanismes naturels d'attraction de ces cellules dans la moelle osseuse. Puis ces cellules vont migrer au contact de cellules de l'environnement médullaire (appelées cellules de la niche hématopoïétique) qui va procurer aux cellules souches hématopoïétiques les facteurs de survie et de prolifération et de différenciation.

1.6.7 Un septième principe est le contrôle immunitaire

Il n'est pas toujours possible d'obtenir des cellules souches d'un patient parce qu'elles sont soit cancéreuses, soit anormales, soit détruites. Dans ces cas, on peut utiliser les cellules souches d'un donneur avec des protocoles d'immunosuppression qui permettent d'éviter leur rejet par les cellules de défense de l'organisme du patient. C'est cette mise au point de stratégies d'immunosuppression peu toxiques sur les îlots pancréatiques qui a permis le développement des greffes allogéniques d'îlots de Langerhans. C'est aussi le développement de stratégies innovantes d'immunosuppression qui a permis les avancées majeures dans les greffes de cellules souches hématopoïétiques de donneurs allogéniques chez des malades atteints de cancers. En quelques années, l'âge de l'allogreffe a reculé de 40 ans à 60 voire 70 ans chez les patients en bonne santé.

1.7 Conclusion

Ces 7 principes résument les difficultés et enjeux pour le développement de la biothérapie cellulaire. Notre société doit mettre en place un système d'autorisation de ces essais qui permettent d'assurer leur sécurité et leur efficacité sans freiner les recherches. Certaines avancées récentes qui ont changé les approches médicales, sont issues de réflexions pragmatiques, sans que l'on en connaisse les mécanismes avant l'essai thérapeutique. L'utilisation de cellules de sang de cordon contenant des cellules souches hématopoïétiques et lymphocytes a explosé suite à la publication

fin 2005 d'une étude américaine montrant que la greffe de deux prélèvements de sang de cordon (provenant de deux nouveau nés différents), permet de reconstituer l'hématopoïèse et la lymphopoïèse d'individus adultes. Dans le rapport sur le développement de la thérapie cellulaire, publié par le Sénat fin 2006, il était écrit que la greffe de sang de cordon ne pouvait être appliquée que chez les enfants de moins de 20 kg. Cette innovation faite de façon pragmatique par une équipe Américaine a permis de bouleverser les pratiques médicales dans le monde.

Il faut que sur un plan juridique, on puisse sécuriser au maximum l'utilisation des cellules souches, le développement de ces biothérapies cellulaires, sans empêcher l'émergence d'innovations dont les mécanismes ne sont pas immédiatement compris.