

### 3. SESSION III. CELLULES SOUCHES ADULTES.

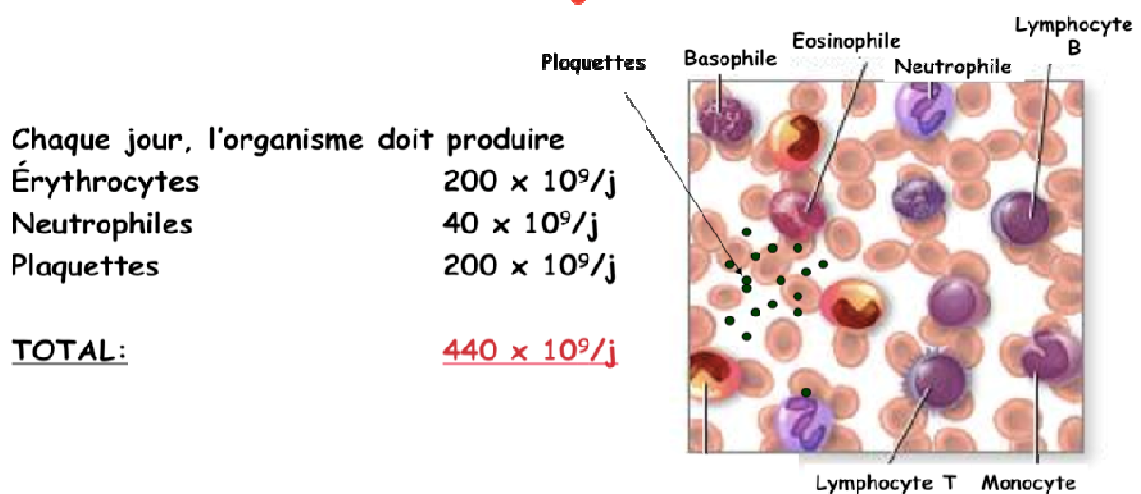
Dans la session I, nous avons indiqué qu'il y avait deux catégories majeures de cellules souches : cellules souches pluripotentes (qui sont détaillées dans la session II) et cellules souches adultes (ou somatiques)(voir schéma I-3). Dans cette session, nous détaillerons deux types de cellules souches adultes :

- ◆ les cellules souches générant les cellules du sang
- ◆ les cellules souches mésenchymateuses générant les tissus de soutien (cartilage, os, cellules graisseuses) avec des fonctions de régulation d'échange métabolique, d'attraction des cellules, de production de facteurs de croissance.

#### 3.1. Cellules souches générant les cellules du sang

Le domaine le plus développé en biothérapie cellulaire est la réparation des cellules du sang : globules blancs appelés également leucocytes, plaquettes, et globules rouges. Ces cellules du sang sont essentielles à la survie de l'individu.

## Hématopoïèse



⇒ **Les cellules du sang sont produites par des cellules souches présentes dans la moelle osseuse**

**Figure 3.1.** Les cellules du sang ont une durée de vie courte et tous les jours l'organisme doit renouveler de façon hautement régulée plusieurs centaines de milliards de cellules du sang.

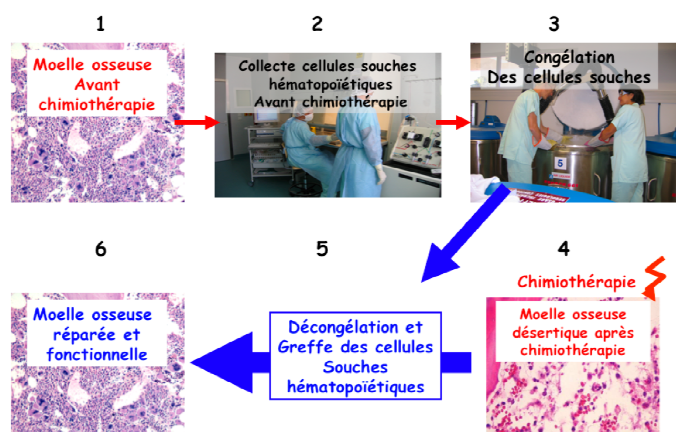
Les globules rouges assurent l'oxygénation des tissus, les plaquettes l'intégrité des vaisseaux sanguins, et les globules blancs sont essentiels pour les défenses contre les organismes étrangers. Ces cellules du sang ont une durée de vie définie :

- de un à plusieurs jours pour les globules blancs, principalement des polynucléaires neutrophiles,
- sept jours pour les plaquettes,
- cent-vingt jours pour les globules rouges.

Ainsi, tous les jours, l'organisme produit de façon hautement contrôlée environ 500 milliards de cellules du sang. Ce processus de production est appelé hématopoïèse. Les cellules du sang sont produites à partir d'une cellule souche, appelée cellule souche hématopoïétique. Cette cellule souche hématopoïétique est localisée dans la moelle osseuse pour des raisons que nous expliquerons ultérieurement.

Une partie de ces cellules souches prolifère de façon extensive pour produire l'ensemble des cellules du sang. Du fait de cette prolifération, ces cellules souches hématopoïétiques sont les cellules de l'organisme les plus sensibles aux chimiothérapies. Les chimiothérapies sont des produits chimiques qui tuent les cellules cancéreuses proliférantes, mais tuent également les cellules normales proliférantes. Cette sensibilité des cellules souches hématopoïétiques aux chimiothérapies est une des limites majeures à l'utilisation des chimiothérapies. Pour augmenter les doses de chimiothérapie, la biothérapie cellulaire est utilisée. Elle consiste à prélever les cellules souches hématopoïétiques d'un patient (ou bien d'un donneur compatible avec le patient sur un plan immunologique) pour réparer la production des cellules sanguines, une fois la chimiothérapie administrée (voir Figure 3.2).

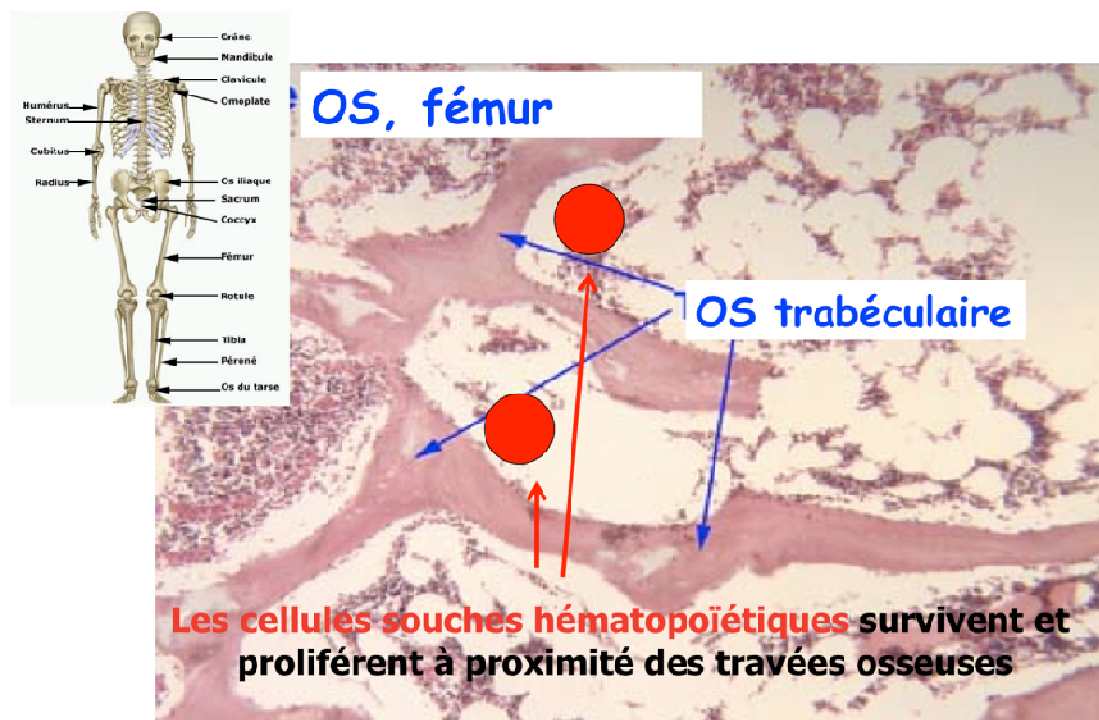
Pour comprendre les mécanismes sous-jacents à cette réparation, nous allons rappeler les données essentielles sur les cellules souches hématopoïétiques puis les principales utilisations thérapeutiques des cellules souches hématopoïétiques.



**Figure 3.2 :** Greffe de cellules souches hématopoïétiques pour restaurer la production de cellules du sang après chimiothérapie intensive.

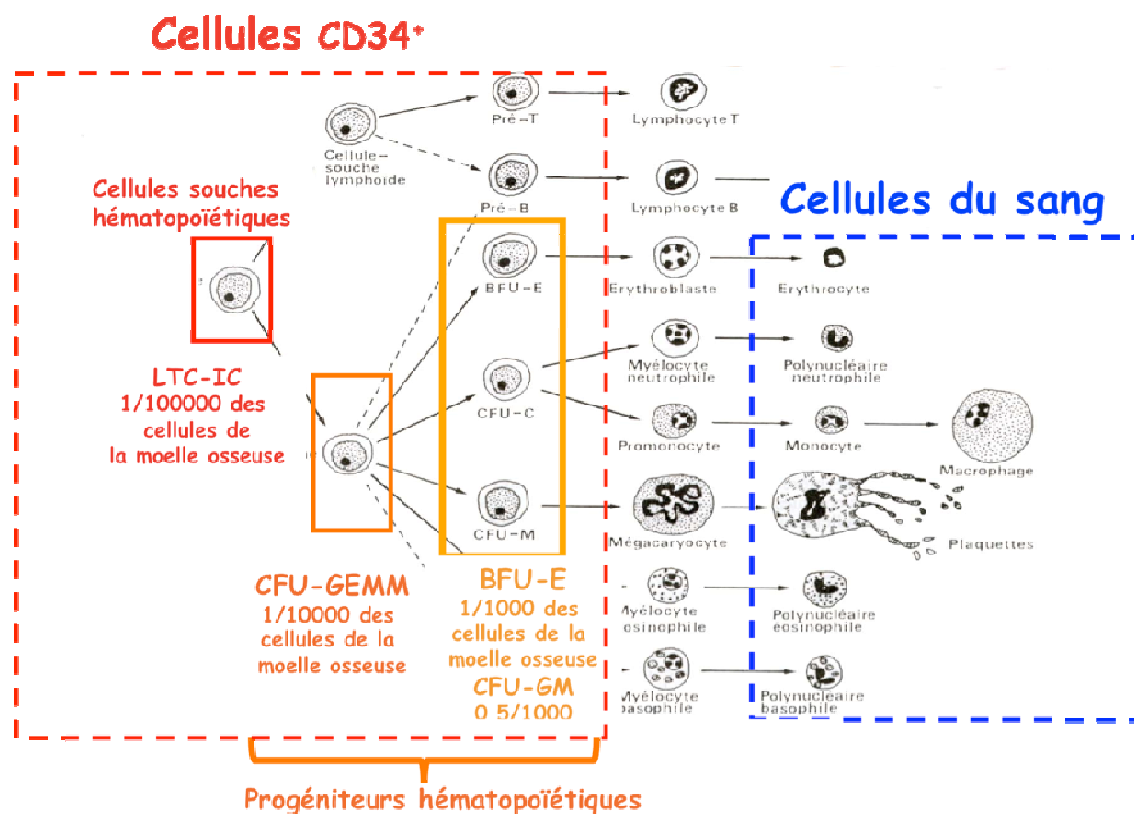
**3.1.1. Données essentielles sur les cellules souches hématopoïétiques.  
De vraies cellules souches et des progéniteurs plus différenciés.**

La production des cellules du sang à partir de cellules souches hématopoïétiques se fait dans la moelle osseuse, principalement dans les extrémités des os longs, les vertèbres, le bassin, le sternum. Les cellules souches hématopoïétiques sont dans la moelle osseuse parce qu'elles ont besoin du tissu osseux pour survivre, proliférer et se différencier. Les cellules souches hématopoïétiques sont en petite quantité dans la moelle osseuse, représentant environ 0,5% des cellules de la moelle osseuse.



**Figure 3.3. Les cellules souches hématopoïétiques sont localisées dans la moelle osseuse, à proximité de l'os, car elles ont besoin des cellules osseuses pour leur survie et leur prolifération.**

Ces cellules souches portent des marqueurs spécifiques à leur surface qui permettent de les identifier, en particulier *l'antigène CD34* largement utilisé en clinique pour quantifier l'hématopoïèse. Toutefois cet antigène CD34 est exprimé non seulement par les cellules souches hématopoïétiques mais également par leurs cellules filles (appelées *progéniteurs*) qui sont engagées dans un processus de différenciation. Il est exprimé également par un petit contingent de cellules endothéliales qui forment les vaisseaux sanguins. Lorsque l'on mesure dans une moelle osseuse les cellules CD34, représentant 0.5% des cellules de la moelle osseuse, on mesure, en conséquence, tout un spectre de différenciation de cellules qui dure environ cinq semaines dans l'organisme mais également en culture.

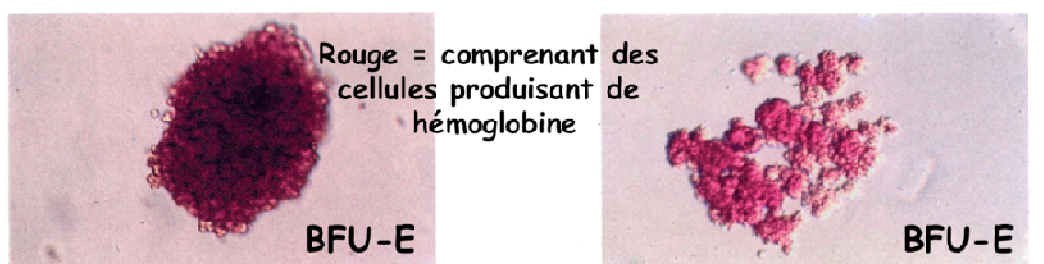


**Figure 3.4. Les cellules qui portent l'antigène CD34** forme un ensemble hétérogène constitué d'un petit contingent de vraies cellules souches et de progéniteurs de plus en plus engagée dans une voie de différenciation cellulaire. Pour la définition des CFU-GEMM, BFU-E et CFU-GM, voir Figure 3.5 ci-dessous.

Dans ce spectre, seul un petit contingent (1% environ des cellules CD34) est constitué de véritables cellules souches capables d'auto-renouvellement, leurs cellules filles appelées progéniteurs, ayant perdu cette propriété tout en étant capables d'une prolifération importante. Ces véritables cellules souches hématopoïétiques n'expriment pas le marqueur CD38. Elles sont également appelées LTC-IC de l'Anglais « Long Term Culture Initiating Cell ».

Les progéniteurs CD34 les plus engagés dans la différenciation sont capables de former des agglomérats de plusieurs milliers de cellules lorsqu'ils sont mis en culture en milieu semi-solide. Ces milieux de culture semi-solides contiennent les facteurs de croissance hématopoïétiques permettant la survie et la prolifération des progéniteurs. Ils sont semi-solides pour permettre la croissance cellulaire tout en empêchant la diffusion des cellules filles. Ainsi, au bout de quatorze jours de culture, on observe des colonies de plusieurs milliers de cellules qui sont chacune formées à partir d'un progéniteur hématopoïétique.

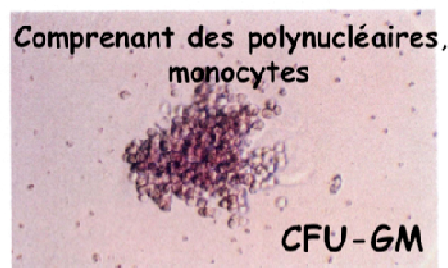
**De 50 à plusieurs milliers de cellules par colonie: de 6 à 12 divisions**



**Colonies générées par des progéniteurs de globules rouges**



**Colonies générées par des progéniteurs immatures**



**Colonies générées par des progéniteurs de globules blancs**

**Figure 3.5 : Détection des progéniteurs hématopoïétiques.** Lorsque la moelle osseuse d'un individu est mise en culture dans un gel semi-solide en présence de facteurs de croissance, on observe au bout de 14 jours des colonies de plusieurs dizaines à plusieurs dizaines de milliers de cellules. Ces colonies sont générées par des progéniteurs hématopoïétiques CD34 immatures « CFU-GEMM » (formant des colonies mixtes composées de globules blancs et de globules rouges jeunes), des progéniteurs CD34 « BFU-E » (formant des colonies comportant des cellules produisant de l'hémoglobine colorées en rouge), des progéniteurs CD34 « CFU-GM » (formant des colonies composées de globules blancs).



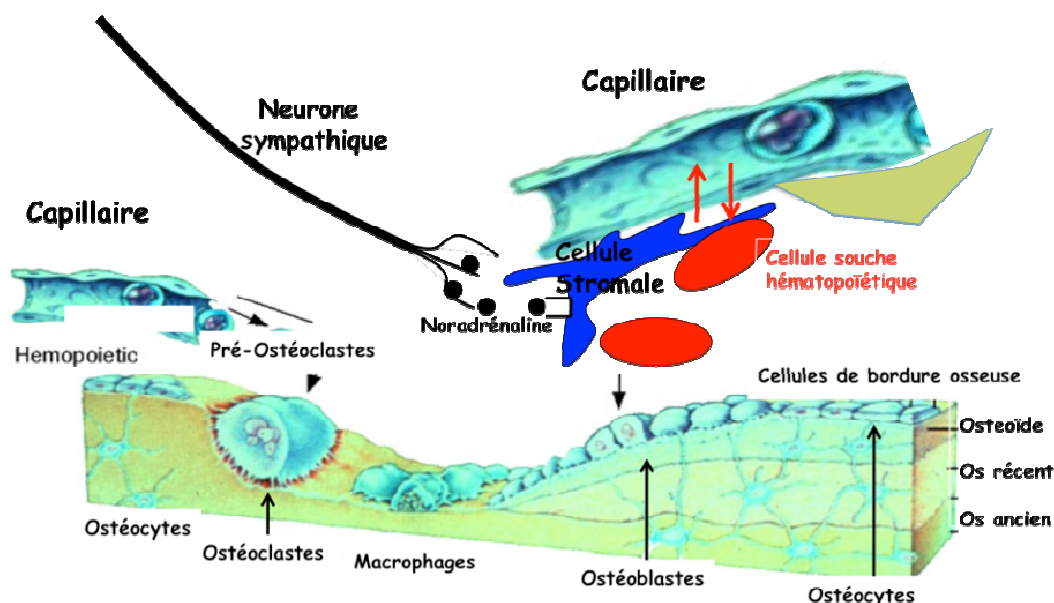
Les cellules CD34 représentent 0,5% des cellules de la moelle osseuse d'un individu normal, et ces cellules comprennent environ 10% de progéniteurs capables de former des colonies de globules blancs (monocytes, macrophages et polynucléaires neutrophiles, appelées CFU-GM, de l'anglais Colony Forming Unit Granulocyte Macrophage), 20% de progéniteurs capables de former des colonies érythroïdes (BFU-E, de l'anglais Burst Forming Unit Erythroid) et 1% de progéniteurs capables de former des colonies de taille plus importante composant les trois lignées hématopoïétiques : érythroïde, monocytaire-macrophagique, et mégakaryocytaire (CFU-GEMM).

### **3.1.2. Les niches des cellules souches hématopoïétiques dans la moelle osseuse.**

Les **cellules souches hématopoïétiques** vont dans la moelle osseuse parce qu'elles trouvent dans ce tissu les cellules nécessaires à leur survie et à leur environnement. Ces cellules constituent la niche des cellules souches hématopoïétiques. Lorsqu'on injecte une cellule souche hématopoïétique dans le sang, cette cellule circule à grande vitesse dans les vaisseaux. Quand cette cellule arrive dans les capillaires qui irriguent la moelle osseuse, elle est activée par des protéines produites par les cellules de l'environnement de la moelle osseuse, protéines que l'on appelle chimiokines. (La plus étudiée est la chimiokine SDF-1 (de l'anglais « stromal derived factor-1 ») produite par les cellules stromales de la moelle osseuse). Les cellules souches vont ainsi pouvoir migrer à travers l'endothélium, vers les cellules stromales, qui leur procurent les facteurs de survie et de prolifération. Des progrès très importants ont été faits ces trois dernières années pour mieux caractériser la niche des cellules souches hématopoïétiques : celles-ci sont au contact des cellules stromales et à proximité des cellules de l'os responsables de la construction de la matrice osseuse, les ostéoblastes. Ces cellules stromales expriment un récepteur activé par le neuromédiateur noradrénaline (bêta-3 adrénergique) produit(e) par les cellules neuronales sympathiques. Le système nerveux sympathique contrôle une grande partie des activités inconscientes (autonomes) du corps humain (battements du cœur et contraction des muscles lisses) et a également des effets sur les cellules et certains organes en sécrétant des substances, les neurotransmetteurs, en particulier la noradrénaline. La production de ce neuromédiateur est fluctuante avec un cycle de

24 heures fonction de l'exposition à la lumière. C'est ce qui explique que l'on observe chez l'animal et probablement chez l'homme une recirculation de la moelle osseuse vers le sang et du sang vers la moelle osseuse des cellules souches hématopoïétiques obéissant au rythme diurne et nocturne (rythme circadien).

**Les cellules souches hématopoïétiques survivent et prolifèrent dans une niche hématopoïétique associant les ostéoblastes et cellules endothéliales.**



**Figure 3.6:** Niche des cellules souches hématopoïétiques.

Les facteurs de croissance contrôlant la survie et la prolifération des cellules souches hématopoïétiques sont nombreux et de mieux en mieux connus. Plusieurs de ces facteurs sont en utilisation thérapeutique, notamment l'érythropoïétine qui permet d'augmenter la production de globules rouges (c'est ce facteur de croissance qui a fait l'objet de débats médiatiques lors du dopage de sportifs, visant à augmenter la masse des globules rouges). Le G-CSF, de l'anglais « Granulocyte Colony Stimulating Factor », stimulant la production de globules blancs est couramment utilisé chez les patients atteints de Cancer pour accélérer la récupération des globules blancs après destruction des cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques par la chimiothérapie.

### 3.1.3. Applications thérapeutiques des cellules souches hématopoïétiques. Autogreffe de cellules souches hématopoïétiques.

Comme indiqué dans le § 3.1 et la Figure 3-2, les cellules souches hématopoïétiques sont utilisées chez les patients atteints de cancer, traités par de fortes doses de chimiothérapie. Cette chimiothérapie intensive tue les cellules proliférantes, donc un maximum de cellules cancéreuses, mais également certaines cellules normales proliférantes. Les cellules normales les plus fragiles sont les progéniteurs hématopoïétiques qui prolifèrent activement. Pour augmenter la dose de chimiothérapie tout en préservant la capacité de produire des cellules du sang, les stratégies d'autogreffe de cellules souches hématopoïétiques ont été développées. Comme illustré dans la Figure 3.2, ces stratégies reposent sur une logique simple. L'utilisation de la chimiothérapie intensive a permis de doubler la survie dans deux types de cancers, le Myélome Multiple et les Lymphomes B en rechute.

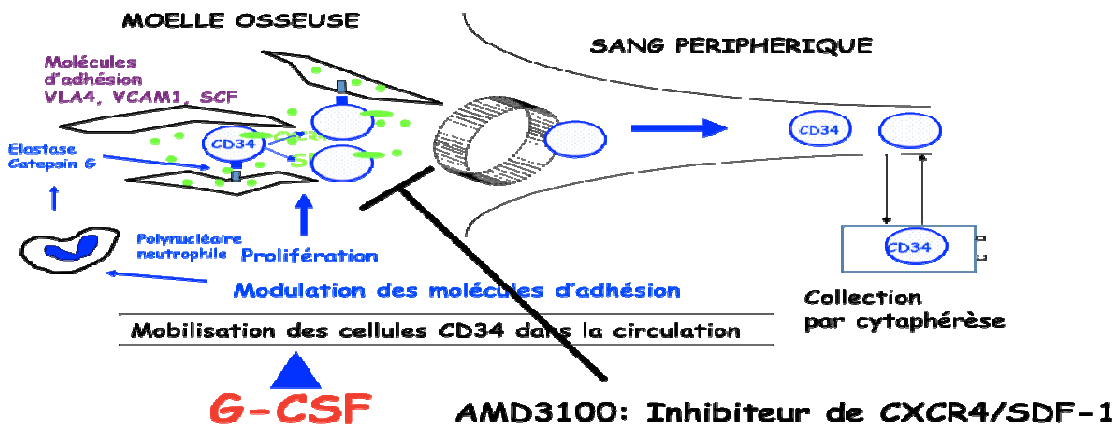
Une limite à l'utilisation de l'autogreffe est la possibilité de collecter un nombre suffisant de cellules souches/progéniteurs hématopoïétiques. Il faut greffer au moins deux millions de cellules CD34 viables/kg pour que le patient répare efficacement son hématopoïèse. Comme ces cellules souches/progéniteurs hématopoïétiques sont localisées dans la moelle osseuse, ils étaient prélevés directement dans la moelle osseuse après une anesthésie générale du patient.

Ces cellules souches/progéniteurs sont maintenant prélevées dans le sang périphérique. Ce processus est appelé mobilisation. On administre au patient le facteur de croissance G-CSF qui dégradent les molécules d'adhésion qui retiennent les cellules souches/progéniteurs hématopoïétiques au contact de leur niche et les libèrent ainsi dans le sang

**Figure 3.7. (page suivante)** Mobilisation des cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse dans le sang périphérique circulant.

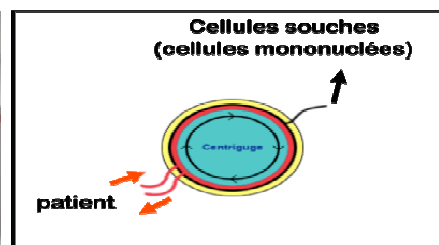
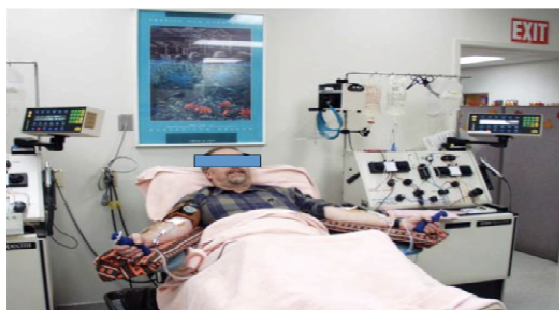


## Mobilisation des progéniteurs hématopoïétiques dans le sang périphérique et collection



Cette mobilisation des cellules souches/progéniteurs de la moelle osseuse dans le sang permet de les collecter en grand nombre. Par des techniques de *cytaphérèse*, les plaquettes, globules rouges et plasma sont séparés des globules blancs par centrifugation.

## Cytaphérèse



- 4 – 5 heures (2h pour don plaquettes)
- 1 à 3 séances

**Figure 3-8. Collection des cellules souches/progéniteurs hématopoïétiques par cytaphérèse.** La cytaphérèse permet de collecter en trois à cinq heures les cellules mononucléées du sang qui contiennent les cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques tout en réinjectant au patient ses polymorphonucléaires neutrophiles, ses plaquettes et globules rouges et son plasma. Cette méthode repose sur une centrifugation des cellules du sang, les cellules mononucléées étant moins lourdes que les polymorphonucléaires neutrophiles et globules rouges et plus lourdes que les plaquettes.

Les globules blancs contenant les cellules souches et progéniteurs sont collectés et réinjectés au patient. Une ou deux cytaphérèses suffisent pour réaliser une ou deux

autogreffes, soit au moins deux millions de cellules CD34 viables/kg pour que le patient répare efficacement son hématopoïèse.

#### **3.1.4. Allogreffe de cellules souches hématopoïétiques et lymphocytes. Compatibilité HLA.**

La deuxième stratégie d'utilisation médicale des cellules souches hématopoïétiques est l'allogreffe. L'allogreffe était initialement indiquée lorsque les cellules tumorales sont proches des cellules souches hématopoïétiques et en particulier dans le cas des leucémies aigues myéloïdes. L'allogreffe est de plus en plus utilisée pour les patients atteints de cancers résistants à plusieurs approches thérapeutiques et en particulier résistants à la chimiothérapie intensive et autogreffe de cellules souches hématopoïétiques. L'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques repose sur le remplacement complet et définitif des cellules hématopoïétiques et du système immunitaire du patient par les cellules hématopoïétiques et lymphocytes d'un donneur

Pour allogreffer un patient, on doit disposer d'un greffon d'un donneur compatible avec le patient sur un plan immunitaire. Cette compatibilité repose sur une similarité des molécules HLA (de l'anglais « Human Leucocyte Antigen ») présentes à la surface de nos cellules et permettant d'indiquer à nos cellules de défense de l'organisme si cette cellule est une cellule de notre organisme (on dit cellules du soi) ou une cellule étrangère. Si on ne trouve pas de donneur compatible dans la fratrie, on recherche dans les banques mondiales de donneurs un donneur non apparenté compatible. La compatibilité des groupes sanguins ABO n'est pas nécessaire.

Les cellules souches hématopoïétiques et lymphocytes sont collectés dans la moelle osseuse ou par cytophérèse comme indiqué dans le paragraphe ci-dessus.

Plusieurs types d'allogreffes sont pratiqués :

#### **- Allogreffe avec un conditionnement par chimiothérapie intensive (irradiation)**

Cette stratégie consiste à donner au patient une chimiothérapie intensive (et irradiation dans certains protocoles) de façon à détruire les cellules tumorales, à détruire le système immunitaire du patient, et à détruire les cellules souches hématopoïétiques du patient ce qui permet de libérer les niches hématopoïétiques

dans la moelle osseuse. A l'arrêt de la chimiothérapie intensive, les cellules souches hématopoïétiques et les lymphocytes du donneur sont greffés. Ces cellules souches hématopoïétiques colonisent les niches hématopoïétiques du patient, prolifèrent et se différencient de façon à reconstituer l'ensemble des cellules du sang et des lymphocytes.

Il y a remplacement complet de l'hématopoïèse mais également du système lymphocytaire du patient par celui du donneur. Les lymphocytes présents dans le greffon vont jouer un rôle immédiat en contribuant à tuer les cellules tumorales résistantes et également les cellules hématopoïétiques résiduelles après la chimiothérapie intensive.

Ces stratégies d'allogreffe associées à une chimiothérapie intensive sont limitées aux sujets jeunes d'âge inférieur à quarante ans du fait de la toxicité de ce traitement, notamment la réaction immune des lymphocytes du donneur. L'allogreffe est associée à une immunosuppression. Cette immunosuppression est progressivement levée en fonction de l'état du patient, de façon à ce que le système immunitaire du donneur tolère progressivement les cellules du patient, sans tolérer les cellules tumorales.

## Chambre stérile

- **Chambre une personne**
- **Flux laminaire : air stérile**
- **Nourriture stérile**
- **Décontamination digestive**
- **Personnel soignant: surblouse stérile, masque, bonnet, gants stériles**
- **Surveillance +++**
  
- **Attention : isolement + stress + long séjour (1 mois) → dépression**

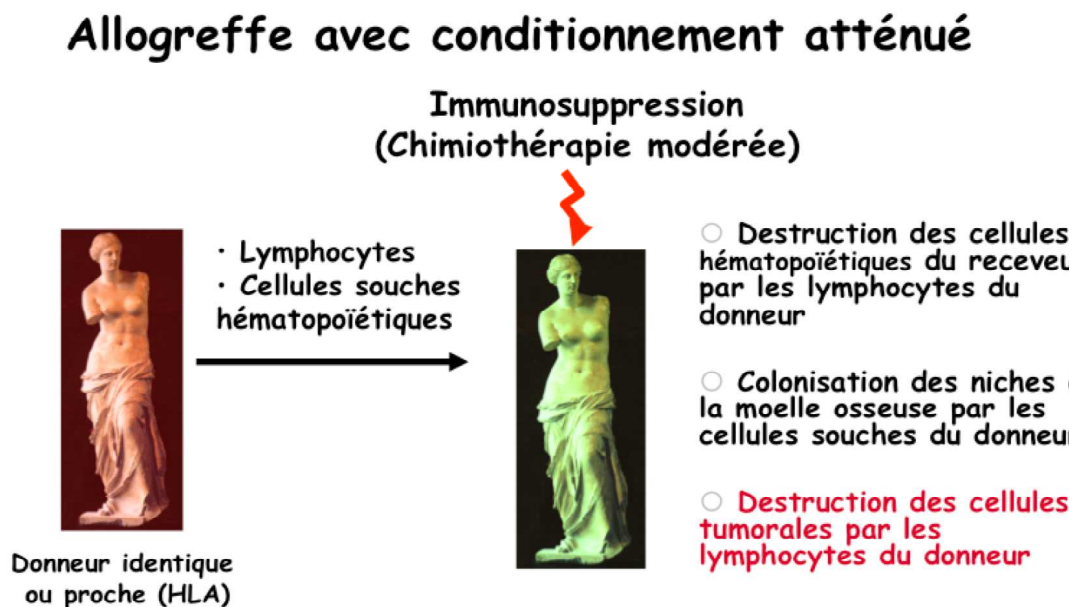


**Figure 3.9.** L'allogreffe nécessite de diminuer les défenses de l'organisme du patient. Le patient est hospitalisé dans une chambre stérile pour éviter toute contamination extérieure.

L'allogreffe nécessite de placer le patient dans des chambres en confinement stérile et alimentés avec une nourriture stérilisée, pendant une durée de un à plusieurs mois. Les indications de ce type d'allogreffe sont les leucémies myéloïdes.

### - Allogreffe avec conditionnement atténué

Afin de limiter la toxicité de l'allogreffe conventionnelle, sont développées depuis les années 2 000 des stratégies avec une chimiothérapie limitée ou sans chimiothérapie. Ces stratégies consistent à diminuer les défenses de l'organisme du patient par traitement par immunosuppresseurs, avant injection du greffon, ce qui permet d'éviter le rejet du greffon. Le greffon contient deux principes actifs : les lymphocytes et les cellules souches hématopoïétiques. Les lymphocytes du greffon éliminent les cellules souches hématopoïétiques du patient, libèrent les niches hématopoïétiques ce qui permet la colonisation de ces niches par les cellules souches hématopoïétiques du greffon.



**Figure 3.10.** L'allogreffe avec conditionnement atténué repose sur la suppression du système immunitaire du patient pour que les cellules immunitaires du greffon fassent l'essentiel du travail : libération des niches hématopoïétiques du patient en éliminant ses cellules hématopoïétiques, ce qui permet la colonisation de ces niches par les cellules souches hématopoïétiques du greffon qui peuvent se développer. Les lymphocytes du greffon éliminent les cellules tumorales.

Ces cellules souches hématopoïétiques du greffon survivent, prolifèrent et génèrent progressivement l'ensemble de l'hématopoïèse et de la lymphopoïèse.

Comme pour l'allogreffe conventionnelle, le dosage de l'immunosuppression après allogreffe est essentiel pour éviter une activation du système immunitaire du donneur, tout en maintenant un effet antitumoral des lymphocytes du donneur. Après

3 mois environ, cette immunosuppression est progressivement levée. Les cellules du donneur proviennent soit de la fratrie, soit de donneurs adultes compatibles sur un plan HLA. Une des limites de cette stratégie est la disponibilité de greffons.

- Allogreffe avec sang du cordon

En 2005, une équipe Américaine a eu l'idée d'injecter des cellules de sang de cordon chez les sujets adultes. Les cellules de sang de cordon sont prélevées à la naissance dans le cordon, sont très riches en cellules souches hématopoïétiques, notamment immatures, et également en lymphocytes immatures.



**Le sang de cordon contient des cellules jeunes au premier jour de la vie**

- **des lymphocytes (défense de l'organisme)**
- **des cellules souches du sang**
- **des cellules souches multipotentielle**

**Figure 3.11.** Cellules du sang de cordon.

Les greffes de cellules de sang de cordon ont été développées depuis 1989 avec les travaux pionniers du Professeur Eliane Gluckman pour des pathologies génétiques. La quantité de sang de cordon pouvant être collectée à la naissance (200 à 300 ml) étant limitée, un seul sang de cordon ne permet pas de greffer de façon efficace un sujet adulte. Une équipe Américaine a eu l'idée d'injecter deux sangs de cordon en même temps, chaque sang de cordon provenant d'un bébé différent. L'injection de deux sangs de cordon permet à l'un des sangs de cordon de se développer, pendant le premier mois de la greffe, en utilisant le deuxième sang de cordon comme support pour son développement. Les cellules du 2<sup>o</sup> sang de cordon sont éliminées par les lymphocytes du premier sang de cordon, ces deux sangs de cordons n'étant pas complètement identiques. Cette stratégie de greffe avec deux sangs de cordon permet actuellement de greffer des patients jusqu'à l'âge de 70 ans avec une toxicité limitée.

## Conclusion

En France sont réalisées environ 1500 allogreffes par an, principalement dans les pathologies leucémiques mais également chez les patients atteints de myélomes ou d'un lymphome qui résistent à plusieurs approches thérapeutiques. Chez certains malades résistants à plusieurs lignes de chimiothérapie, les résultats peuvent être spectaculaires avec une rémission complète. Ces patients après plusieurs mois de traitement ne reçoivent plus de traitement immunosuppresseur et sont en très bon état général.

Ces progrès thérapeutiques avec du sang de cordon ont augmenté de façon importante le besoin en sang de cordon. Un réseau mondial de banque de sang de cordon est en place. Lorsqu'un patient est éligible pour une greffe, on cherche dans ces fichiers internationaux les sangs de cordon compatibles sur un plan immunologique. Un effort important est fait en France pour rattraper notre retard dans la mise en banque de sang de cordon. Plusieurs banques de sang de cordon sont actives en France, en particulier à BESANÇON, BORDEAUX, PARIS MONTPELLIER, GRENOBLE, LYON, MARSEILLE, CRETEIL et POITIERS. L'objectif est d'obtenir 30 000 sangs de cordon dans les banques Françaises.