

# Thérapeutiques issues du vivant

► Les thérapeutiques issues du vivant incluent l'utilisation de protéines et de cellules. Les protéines purifiées du plasma humain font peu à peu place à des médicaments obtenus par recombinaison génétique pour s'affranchir des risques infectieux. Cependant, certaines comme les immunoglobulines ne sont pas près d'être remplacées par des produits recombinants. Les thérapeutiques fondées sur l'utilisation de cellules sont très diverses. Certaines sont bien validées, comme les transfusions de globules rouges, de plaquettes, de polynucléaires neutrophiles, les allogreffes et autogreffes de cellules souches hématopoïétiques, les greffes de cellules épidermiques. Beaucoup sont encore en expérimentation : manipulation des cellules de l'immunité pour stimuler les réponses anti-virales ou anti-tumorales, îlots de Langerhans pour traiter le diabète insulino-dépendant, hépatocytes pour remplacer la greffe de foie, cellules neuronales pour traiter des malades neurodégénératives, etc. Le progrès passe par des recherches sur les cellules souches de ces tissus, leur plasticité et les facteurs qui les contrôlent. L'évaluation de ces thérapeutiques pose des problèmes spécifiques, encore

incomplètement résolus, un des problèmes majeurs restant le risque infectieux. ◀

**L**e premier et – longtemps – le seul dérivé du vivant utilisé en thérapeutique a été le sang. Leur facilité d'obtention et de réinjection explique par ailleurs le développement des thérapies à base de cellules hématopoïétiques, qui seront plus largement évoquées ici que d'autres encore souvent au stade expérimental. Les thérapeutiques à base de protéines puis de cellules se sont ensuite développées. Les thérapeutiques protéiques sont maintenant évaluées, contrôlées et distribuées comme les médicaments. Il n'en est pas de même pour les cellules. Une des caractéristiques des thérapies issues du vivant est que leur méthodologie d'évaluation reste en construction avec une hantise croissante des risques de transmission d'agents infectieux. Ces thérapeutiques comportent aussi la thérapie génique et les greffes d'organes qui font l'objet d'autres articles dans ce numéro de *médecine/sciences*.

## **Les protéines issues du vivant et à activité thérapeutique**

### **Le plasma humain**

Le sang est constitué de cellules (globules rouges, globules blancs, pla-

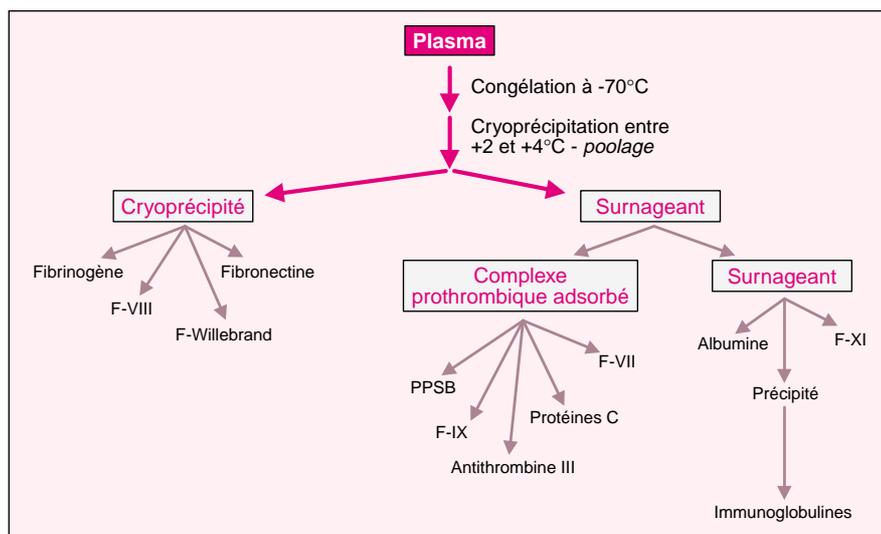
## **Bruno Varet**

B. Varet : Institut de recherche Necker-Enfants Malades (IRNEM) et Service d'hématologie adulte, Hôpital Necker, 149, rue de Sèvres, 75743 Paris Cedex 15, France.

quettes) et d'un liquide, le plasma (constitué de toutes les protéines circulantes diluées dans de l'eau). Longtemps, le plasma a été transfusé avec les globules rouges [1]. La première étape de l'« industrialisation » a été la séparation des globules rouges et du plasma. Le plasma sans les globules rouges a été utilisé comme méthode de remplissage vasculaire et aussi comme source d'albumine, de facteurs de coagulation, etc. Cette utilisation thérapeutique du plasma total s'est considérablement raréfiée, parce que la ou les protéines spécifiques sont associées à un volume d'eau important, et en raison des risques infectieux. La tendance va vers le remplacement du plasma par des succédanés (pour le remplissage vasculaire par exemple) [2] ou par des protéines purifiées (pour des activités thérapeutiques spécifiques).

Les protéines purifiées du plasma humain sont essentiellement l'albumine, les facteurs de la coagulation et les immunoglobulines. Ils sont obtenus par fractionnement (*figure 1*).

L'albumine est la protéine la plus abondante du plasma, environ 40 g/l. Elle est purifiée depuis longtemps et son gène bien identifié. De fortes quantités sont nécessaires pour le traitement des patients qui en manquent et les techniques actuelles de génie génétique *in vitro* ne permettent pas une production suffisante.



« anti-Rhésus » qui résulte de l'immunisation anti-D chez les femmes dd. La prévention de cette maladie est obtenue par injection systématique d'immunoglobulines humaines anti-D au décours de toute grossesse, interruption volontaire ou spontanée de grossesse ou éventuelle transfusion de produits D, chez les femmes dd. Les immunoglobulines anti-D sont obtenues à partir du plasma de donneurs volontaires dd immunisés anti-D. A ce jour, aucun anticorps monoclonal spécifique de l'antigène D ne s'est avéré utilisable en thérapeutique. Les immunoglobulines polyvalentes sont encore utilisées dans le traitement des déficits de production des anticorps constitutionnels ou acquis. Enfin, les immunoglobulines peuvent être utilisées comme immunomodulateur. Cette indication des immunoglobulines humaines a été expérimentée initialement dans le traitement du purpura thrombopénique idiopathique [3], puis dans de nombreuses maladies auto-immunes ou apparentées [4]. Dans ces indica-

Figure 1. **Schéma simplifié du fractionnement des protéines plasmatiques.** F: facteur; PPSB: prothrombine (FII); proconvertine (FVII); facteur Stuart (FX); facteur antihémophilique B (FIX).

Les facteurs de coagulation sont les protéines actives dans la coagulation plasmatique, elles ont été identifiées par l'analyse de plasma de malades présentant génétiquement des hémorragies anormalement faciles, ou plus rarement des thromboses. Rapidement, on a cherché, dans un but thérapeutique, à obtenir des dérivés de plasma enrichis en tel ou tel facteur comme le fibrinogène, le facteur VIII pour le traitement de l'hémophilie A, de l'ensemble des facteurs « dépendants de la vitamine K » (facteur II, VII, IX et X), etc.

Les immunoglobulines sont les anticorps, produits par les plasmocytes, cellules sécrétoires de la lignée lymphoïde B. Elles peuvent être utilisées pour induire une activité spécifique contre un antigène étranger, essentiellement un agent infectieux, pour apporter des anticorps polyvalents chez un sujet qui en manque ou encore comme immunomodulateur. On utilise en particulier des immunoglobulines à activité spécifique vis-à-vis d'antigènes bactériens ou viraux. Le sérum antitétanique de cheval administré après toute blessure en a été le prototype. Les sérums d'animaux immunisés font progressivement place à des anticorps humains, ce qui évite des immunisations contre des protéines animales. Des thérapeutiques sont également fondées sur l'utilisation d'immunoglobulines spécifiques vis-à-vis d'antigènes

humains. Les immunoglobulines anti-D sont ainsi utilisées dans la prévention de la maladie hémolytique néonatale due à l'immunisation

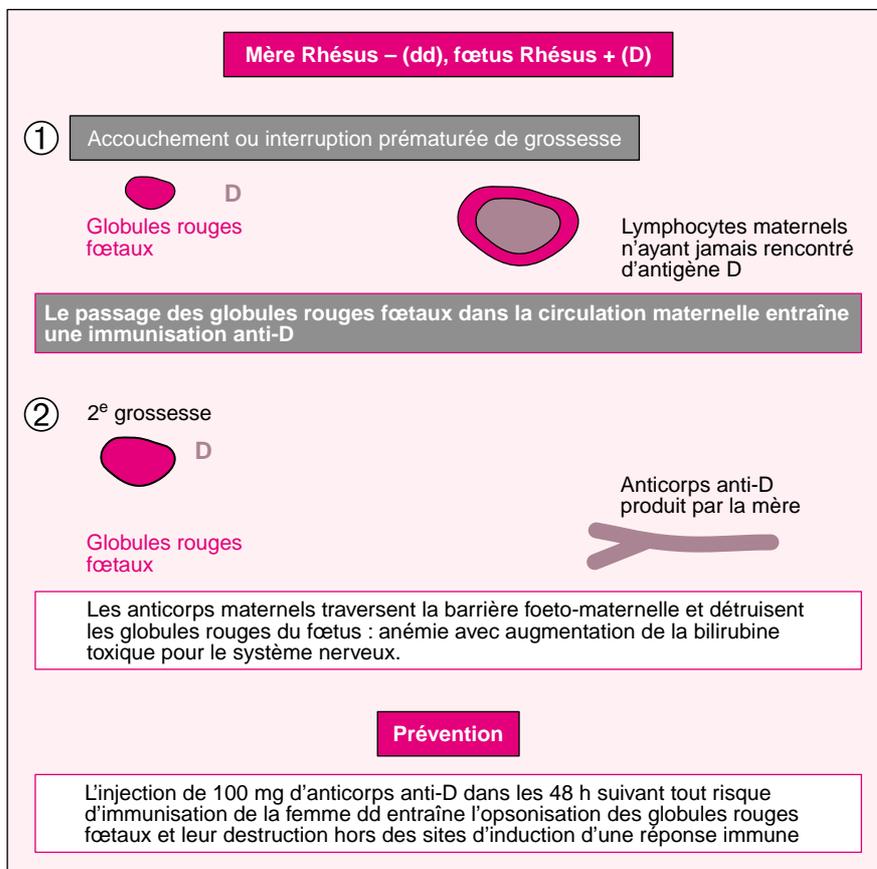


Figure 2. **Prévention de la maladie hémolytique Rhésus: exemple d'immunosuppression sélective par anticorps.**

tions, les immunoglobulines sont généralement utilisées à des doses plus importantes que pour un traitement substitutif. Leur mode d'action est complexe et probablement variable d'une maladie à l'autre. Dans certains cas, il est très mécanique, au travers de l'occupation par les immunoglobulines transfusées des récepteurs du fragment Fc des Ig, exprimés par les monocytes-macrophages. Dans d'autres cas, il s'agit d'une activité anti-idiotypique [5] ou d'une action sur les cellules T, directe ou par l'intermédiaire de l'induction de diverses cytokines [6].

On doit encore signaler, dans ce vaste chapitre, que diverses enzymes peuvent être purifiées du plasma pour le traitement de maladies liées à leur absence constitutionnelle. Ainsi la maladie de Gaucher a pu être traitée efficacement par l'enzyme déficiente purifiée du plasma. Elle est remplacée maintenant par la protéine recombinante.

### Les protéines purifiées d'origine animale

Les protéines extraites du plasma d'animaux restent utilisées notamment en sérothérapie spécifique, dans le traitement de syndromes hémorragiques, essentiellement chez des hémophiles immunisés contre le facteur VIII humain et de ce fait réfractaires aux préparations de facteur VIII humain, et comme source d'anticorps anti-lymphocytaires.

Le sérum anti-lymphocytaire de cheval, de chèvre ou de lapin est utilisé pour inhiber les lymphocytes T humains. Les indications sont essentiellement les greffes et certaines maladies auto-immunes ou apparentées. Le principal risque est la maladie sérique liée à la production d'anticorps du receveur contre les immunoglobulines animales.

Les anticorps monoclonaux, essentiellement murins, sont une source d'anticorps animaux obtenus *in vitro* dans des conditions qui peuvent être contrôlées afin de faire à peu près disparaître tout risque infectieux. Le principe de leur production est de fusionner une cellule B sécrétante unique (plasmocyte) avec une cellule lymphoïde tumorale qui lui transmet sa capacité de réplication indéfinie, et à l'isoler (« cloner »). Ces cellules clonales vont proliférer, permettant la

production « industrielle » d'un anticorps unique (« monoclonal »). Celui-ci peut-être utilisé dans un but thérapeutique, soit directement pour détruire ou inhiber les fonctions de cellules portant l'antigène contre lequel il est dirigé, soit indirectement comme transporteur spécifique vers les cellules cibles d'une toxine, d'un isotope radioactif, de molécules anticancéreuses, etc. Le facteur limitant tient à la production par le receveur d'anticorps neutralisants, liée à l'origine murine de l'immunoglobuline. Ce type de molécule ne peut donc être utilisé *in vivo* qu'en cure unique de quelques jours. Ce problème a été récemment contourné par la production d'anticorps monoclonaux humanisés (*voir plus loin*).

### Les protéines recombinantes

L'identification des gènes d'un nombre croissant de protéines du plasma ouvre la porte à la production *in vitro* de ces protéines, identiques aux protéines naturelles, sans les contraintes du don, de la purification à partir du plasma et sans les risques inhérents à l'utilisation de produits directement dérivés du vivant. Seul le gène identifié est issu du vivant, toute la suite étant de la production pharmaceutique. On est donc aux frontières des thérapeutiques issues du vivant et les exemples foisonnent. Les hormones et les facteurs de croissance peuvent être produits en quantité « industrielle » (hormone de croissance, érythropoïétine, facteurs de croissance granulocytaire et plaquettaire, interleukines...). Ces molécules sont essentiellement utilisées pour leur fonction à titre de traitement substitutif ou encore à des doses pharmacologiques, par exemple pour mobiliser les cellules de la moelle vers le sang ou pour simuler les lymphocytes *in vivo*. Les interférons sont utilisés surtout dans le traitement de certaines affections malignes (leucémie myéloïde chronique, leucémie à tricholeucocytes, lymphome T, cancer du rein métastasé) et dans la sclérose en plaques. Les protéines de la coagulation sont en plein développement, parmi lesquelles le facteur VIII recombinant occupe une place croissante dans le traitement de l'hémophilie A [7].

Enfin il faut insister sur les anticorps monoclonaux humanisés. Il s'agit d'une remarquable réussite de la recherche moderne, combinant l'isole-

ment d'un clone de plasmocytes murins produisant un anticorps monoclonal spécifique d'un antigène humain et les techniques de recombinaison génétique. Le gène murin est utilisé pour produire la partie spécifique de l'antigène et le reste du génome de l'immunoglobuline de souris est remplacé par un gène d'immunoglobuline humaine. Ainsi est construite une molécule mixte, spécifique, non immunogène chez l'homme. L'utilisation de ce type d'anticorps est en pleine expansion [8, 9].

### L'avenir

Le développement de protéines à usage thérapeutique est riche de retombées potentielles. La production *in vitro* des protéines du plasma à activité thérapeutique représente un champ considérable: protéines de la coagulation, cytokines, facteurs de croissance, enzymes... Les premiers succès ont été obtenus grâce à des molécules bien choisies pour la quasi certitude qu'elles trouveraient un marché suffisant. Depuis, la survenue d'effets secondaires de molécules recombinantes (anticorps neutralisants pathogènes par exemple) a toutefois montré que, pas plus que la recherche de molécules de synthèse chimique, la recherche thérapeutique à partir de gènes n'est exempte d'échecs. La production *in vivo*, par des animaux « transgénésés » avec un gène humain, de protéines du plasma dont la production *in vitro* serait insuffisante est une autre voie. Le prototype en serait l'albumine humaine. Il reste cependant à évaluer les risques infectieux des protéines produites chez l'animal. Les indications du plasma total persisteront, enfin, tant que les substances thérapeutiques qu'il peut apporter n'auront pas toutes été identifiées.

Il faut noter, parmi les problèmes à résoudre dans l'avenir, que l'évaluation de ces molécules [10] est soumise aux diverses étapes imposées aux médicaments classiques alors que ces procédures ne sont pas parfaitement adaptées. En effet, les études chez l'animal ne peuvent avoir qu'un intérêt limité, s'agissant de protéines humaines qui induisent rapidement la production d'anticorps. Toute étude de toxicité chronique est donc exclue. Par ailleurs, la recherche de la classique

« dose maximale tolérée », a toutes les chances de ne pas aboutir, s'agissant de molécules physiologiques, souvent susceptibles d'une activité thérapeutique à très faible concentration.

### Les thérapies cellulaires

Les thérapies cellulaires sont à la mode et cette mode n'est sûrement pas passagère. C'est un domaine en plein devenir et riche d'incertitudes. Les thérapies cellulaires autres qu'autologues présentent, comme les greffes d'organes, un risque infectieux que l'on ne pourra sans doute jamais complètement écarter. En effet, les techniques d'inactivation virale actuelles ne sont pas adaptées aux cellules vivantes. D'un autre côté, toutes les techniques de culture cellulaire, notamment dans le but d'élargir les greffons, présentent un risque infectieux dès qu'elles font appel à des milieux de culture comportant des sérums humains ou animaux.

### Les thérapies cellulaires validées

#### Les cellules hématopoïétiques allogéniques (Tableaux I et II)

La majorité des cellules du sang ont une durée de vie limitée (120 jours pour les globules rouges, 1 semaine pour les plaquettes, 1 jour pour les polynucléaires neutrophiles). Elles ne peuvent donc pas « greffer » chez les receveurs. On utilise des produits aussi purs que possible (globules rouges déleucocytés, plaquettes déleucocytées et, beaucoup plus rarement, des polynucléaires neutrophiles). La grande préoccupation reste le risque de transmission d'un agent infectieux. Ce risque est actuellement minimisé par la qualité de la sélection des donneurs, les tests sérologiques préalables à la transfusion, la recherche de virus en biologie moléculaire, ainsi que la déleucocytation. La collecte des plaquettes par cytophérèse est un autre moyen de réduire ce risque, un seul donneur permettant d'obtenir autant de plaquettes que 6 à 10 dons du sang classique. L'amélioration de la sécurité des produits existants repose essentiellement sur la mise au point de techniques d'inactivation virale qui n'altèrent pas la qualité des cellules [13]. La production *in vitro* de globules

Tableau I. Principales thérapies cellulaires allogéniques (I).

Nature des cellules	Objectif thérapeutique	Stade de développement	Problèmes rencontrés (hors risque de transmission d'agent pathogène)
Cellules mûres du sang	Traitement substitutif transitoire (anémie, thrombopénie)	Routine	Allo-immunisation
Cellules souches myéloïdes	Remplacer définitivement une moelle déficitaire (aplasie) ou malade (leucémie, maladies constitutionnelles du tissu myéloïde)	Routine	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Rejet (rare grâce à l'immunosuppression)</li> <li>• Réaction du greffon contre l'hôte (GVH)</li> </ul>
Cellules souches hématopoïétiques déplétées en cellules T	Réduire le risque de réaction du greffon contre l'hôte	Expérimental	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ne permet pas les greffes avec différence de compatibilité importante chez l'adulte (le permet chez l'enfant)</li> <li>• Dans les greffes compatibles, augmentation du risque de rejet et de rechute des maladies malignes causales</li> </ul>
Cellules souches hématopoïétiques du sang du cordon étendues <i>in vitro</i>	Permettre la greffe de receveurs adultes avec de « petits greffons »	Préclinique	Technique encore balbutiante

rouges et de plaquettes est une voie ouverte. On sait déjà faire se différencier *in vitro* des cellules immatures pour produire des globules rouges, des polynucléaires neutrophiles et des plaquettes. Cependant, ces techniques sont inapplicables à la production en grandes quantités. Elles se pratiquent à partir de précurseurs à durée de vie finie qu'il faudrait donc constamment renouveler par prélèvement de cellules de donneurs. Pour parvenir à produire des globules rouges ou des plaquettes *in vitro* dans des conditions de sécurité virale contrôlée et à une échelle « industrielle », il faudrait donc : (1) être capable de contrôler à long terme

l'autorenouvellement des cellules souches myéloïdes ; (2) avoir identifié tous les ingrédients qui permettent *in vivo* la production quotidienne des milliards de globules rouges et de plaquettes. Aucun obstacle théorique ne s'oppose aujourd'hui à ce que ces buts soient atteints un jour.

Le développement de succédanés de cellules est également très largement envisagé [13, 14]. Le globule rouge est apparemment une cellule très simple : un sac contenant de l'hémoglobine. En fait, ce sac est une membrane cellulaire avec toute sa complexité. De plus, l'hémoglobine est une molécule transporteuse d'oxygène. Il faut donc qu'un globule

**Tableau II.** Principales thérapies cellulaires allogéniques (II).

Nature des cellules	Objectif thérapeutique	Stade de développement	Problèmes rencontrés (hors risque de transmission d'agent pathogène)
Cellules hématopoïétiques mûres produites <i>in vitro</i> (globules rouges, plaquettes)	Production « industrielle » de globules rouges et de plaquettes	Technologie virtuelle	Connaissances fondamentales insuffisantes
Lymphocytes	Effet antitumoral chez un malade déjà allogreffé et dont la pathologie maligne récidive	Routine	Réaction du greffon contre l'hôte
Cellules neuronales fœtales	Guérir des maladies neuro-dégénératives	Expérimental	Logistique lourde
Hépatocytes	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Traitement transitoire d'une insuffisance hépato-cellulaire en attente de la greffe de foie</li> <li>• Alternative à la greffe de foie</li> </ul>	Préclinique	Démonstration de l'efficacité non apportée  Absence de modèle préclinique chez les grands animaux
Îlots de Langerhans	Guérison du diabète insulino-dépendant	Expérimental	Rejet à terme

rouge artificiel contient les équivalents de l'équipement enzymatique qui protègent le globule rouge physiologique de l'oxydation. Il sera peut-être plus simple de remplacer partiellement les plaquettes par des macromolécules capables de jouer une partie du rôle de ces cellules.

**L'allogreffe de cellules souches**

L'objectif de l'allogreffe de cellules souches est de remplacer définitivement une moelle malade par une moelle allogénique normale. Il n'y a pas d'obstacle « mécanique », car les cellules souches de la moelle s'injectent par voie sanguine et gagnent naturellement la moelle. Les obstacles sont immunologiques. Le rejet est assez aisément combattu par les traitements immunosuppresseurs pré-greffes. En revanche, la greffe contient aussi des cellules lym-

phoïdes du donneur qui vont réagir contre le receveur (réaction du greffon contre l'hôte ou GVH) [15, 16]. Actuellement, seules les greffes de donneurs identiques pour le système majeur d'histocompatibilité sont considérées comme d'un risque acceptable, qu'elles proviennent de donneurs intrafamiliaux (fratrie) ou de donneurs non apparentés des différents fichiers mondiaux (plus de 3 millions de donneurs potentiels actuellement) [17]. Les cellules peuvent être prélevées dans la moelle, le sang (technique plus récente, non encore parfaitement évaluée) ou le sang placentaire (« sang de cordon »). Les perspectives de ce type d'approches sont centrées sur la réduction des risques de GVH (*graft* versus *host*), car celle-ci représente la cause essentielle, directe ou indirecte, de mortalité. Cela peut être obtenu en déplaçant les cellules du greffon en

cellules T alloréactives. Cette technique est utile dans les greffes réalisées chez les enfants atteints de déficits immunitaires congénitaux. Les principales indications d'allogreffes sont cependant les maladies malignes et, dans ces maladies, la déplétion T augmente le risque de rechute.

**L'allogreffe de lymphocytes**

Cette technique est actuellement utilisée dans le traitement de rechutes d'affections malignes après allogreffe. En effet, le tissu lymphoïde du patient est généralement encore celui du donneur. L'injection de lymphocytes du donneur n'entraîne donc aucun rejet et la réaction anti-hôte de ces cellules peut suffire à induire la régression, voire la guérison de la pathologie maligne. C'est une remarquable démonstration de l'efficacité antitumorale de la réaction allogénique [18].

Parmi les perspectives ouvertes par ces techniques, on peut noter l'immunothérapie adoptive antivirale [19, 20]. Cette technique a déjà été expérimentée chez l'homme avec succès mais n'est pas encore entrée dans la routine. Elle consiste à faire expandre *in vitro* les lymphocytes du donneur en présence d'antigènes viraux (virus d'Epstein-Barr, cytomégalovirus) (*figure 3*) et à réinjecter ces cellules après greffe, soit préventivement, soit à titre curatif, pour prévenir ou faire régresser une infection virale dangereuse chez le receveur immunodéprimé. On peut également envisager d'administrer des lymphocytes porteurs d'un gène suicide. L'idée est d'introduire dans les lymphocytes du donneur avant leur injection, un gène inducible dont la mise en route en cas de GVH sévère permettrait de stopper cette dernière. On en est au stade des études préliminaires.

**Les cellules hématopoïétiques autologues** (*Tableaux III et IV*)

L'autotransfusion de globules rouges [1, 13] est utilisée afin de réduire les risques des transfusions allogéniques en collectant les globules rouges d'un patient programmé pour une intervention hémorragique, et en les conservant jusqu'à la date de l'intervention. L'intérêt coût-efficacité de cette méthode n'est pas démontré [21]. L'autogreffe de cellules souches consiste, quant à elle, à prélever des

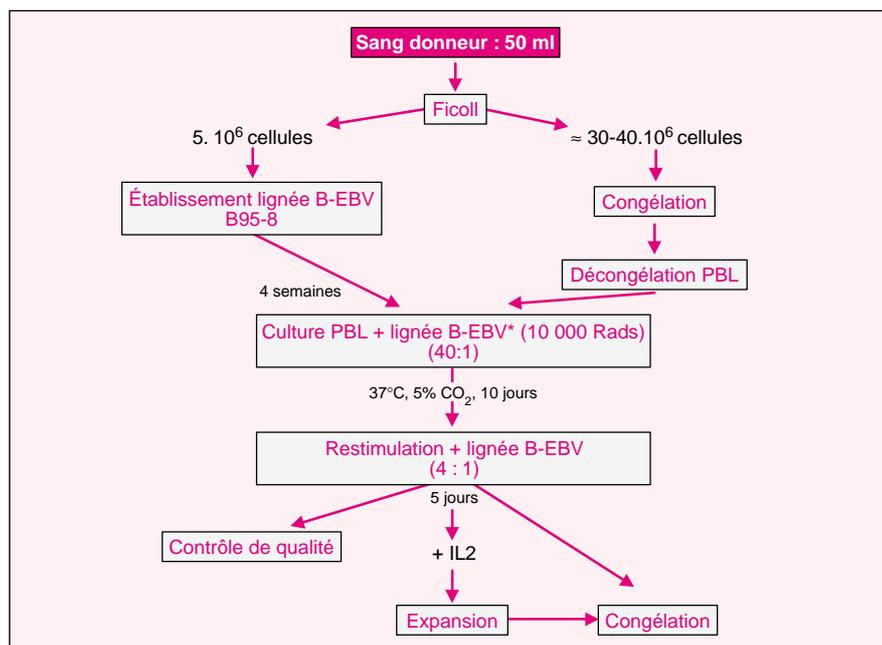


Figure 3. Un exemple de procédure de thérapie cellulaire. La production de lymphocytes T anti EBV ( $x : y$ ) = rapport lymphocytes de donneur/cellules stimulantes (d'après M. Cavazzana-Calvo).

cellules souches myéloïdes, le plus souvent actuellement dans le sang après mobilisation par facteur de croissance et/ou chimiothérapie, à les congeler et à les réinjecter au receveur, à un moment opportun dans la stratégie thérapeutique, après que celui-ci a reçu un traitement destiné à éradiquer la maladie, le plus souvent maligne. Ce traitement éradicateur (« conditionnement ») est responsable d'une telle toxicité sur la moelle que seule la réinjection des cellules conservées permet la reconstitution myéloïde. Le terme d'autotransfusion de cellules souches hématopoïétiques serait donc mieux adapté, car la greffe n'a pas de vertu thérapeutique propre. C'est le « conditionnement » qui est thérapeutique. L'autogreffe de cellules souches après un traitement radio et/ou chimiothérapique détruisant la moelle *in vivo* a démontré son efficacité en allongeant l'espérance de vie d'un certain nombre de patients atteints de maladies malignes, essentiellement hématologiques (lymphomes notamment en rechute, certaines leucémies aiguës, myélome...). Le risque de rechute est la principale complication (à la différence de l'allogreffe lors de laquelle la GVH est la principale complication).

Les perspectives de ces approches sont très importantes mais leur intérêt

reste souvent à évaluer. Ainsi, après des résultats largement médiatisés, il semble bien que la stratégie d'autogreffe n'apporte pas de bénéfice dans les cancers du sein [22]. Des techniques nouvelles à base de tri cellulaire ont été mises au point avec l'objectif d'éliminer les cellules tumorales du greffon. Pour l'instant, aucune étude n'a montré que cette sélection permettait d'améliorer les résultats [23]. Dans des maladies autoimmunes agressives, l'idée a émergé d'utiliser l'autogreffe de cellules déplétées en cellules T après un traitement immunosuppresseur lourd. Quelques résultats préliminaires ont été rapportés et les études en cours devraient permettre l'évaluation de ces traitements [24, 25].

L'expansion des cellules myéloïdes autologues est une voie poursuivie activement. Les facteurs qui limitent des autogreffes de cellules souches hématopoïétiques sont essentiellement les risques encourus par le patient pendant la période d'aplasie qui précède la réascension de cellules produites par la greffe, et la quantité de cellules collectées qui peut être insuffisante, notamment chez les sujets qui ont reçu au préalable des chimiothérapies. L'expansion des progéniteurs d'une part, des cellules souches d'autre part, est une tentative

de réponse à ces deux obstacles. Dans le cas de l'expansion des progéniteurs, l'objectif est de faire différencier *in vitro* un nombre suffisant de précurseurs proches des cellules du sang pour raccourcir la durée d'aplasie après la réinjection. Quelques travaux récents suggèrent que ce but peut être atteint grâce à l'utilisation *in vitro* de « cocktails » de facteurs de croissance hématopoïétiques [26]. L'expansion des cellules souches est un problème beaucoup plus difficile à résoudre car, pour le moment, les modalités de régulation des cellules souches restent très mal connues. Il est d'ailleurs possible que les cellules souches hématopoïétiques ne soient pas capables d'une expansion rapide sans perdre de leur capacité d'autorenouvellement. Il est donc indispensable que la recherche fondamentale progresse dans ce domaine.

### L'autogreffe de peau

Cette technique est utilisée avec succès pour le traitement des brûlures graves. Elle consiste à faire expandre *in vitro* des cellules épidermiques prélevées en zone saine chez le patient et à les greffer ensuite dans les zones brûlées. En une quinzaine de jours, il est possible d'obtenir des greffons capables de couvrir environ 15% de la surface corporelle totale et en 3 semaines un peu moins de 50%. Une particularité notable de cette technologie par rapport à l'exemple précédent est d'être complètement industrialisée. C'est une firme américaine (*Genzyme Tissue Repair*, Cambridge, USA) qui réalise cette technique pour les grands brûlés du monde entier. Néanmoins, l'autogreffe n'est pas celle d'une peau normale. Elle ne comporte ni glandes sudoripares, ni follicules pileux. L'identification d'une cellule souche multipotente, capable de se différencier en cellules épidermiques, en cellules de glandes sudoripares et en cellules de follicules pileux pourrait permettre de parvenir à des autogreffes d'encore meilleure qualité fonctionnelle.

### Les thérapies cellulaires en devenir

Les thérapies cellulaires actuellement au stade expérimental sont très nombreuses et, pour éviter un trop long

**Tableau III.** Principales thérapies cellulaires autologues (I).

Nature des cellules	Objectif thérapeutique	Stade de développement	Problèmes rencontrés
Globules rouges conservés (autotransfusion)	Transfusion de globules rouges sans risque infectieux	Routine	Utilisable seulement pour la chirurgie programmée moyennement hémorragique
Cellules souches hématopoïétiques	• Réduction de la durée de l'aplasie thérapeutique après chimiothérapie non myélosuppressive* pour pathologie maligne	Routine	• Risque de rechute à partir du greffon s'il contient des cellules tumorales
	• Reconstitution hématopoïétique après chimio/radiothérapie myélosuppressive pour pathologie maligne	Routine	• Idem
Cellules souches hématopoïétiques « purgées » de cellules malignes	Idem + réduction de risque de rechute	Expérimental	Absence de démonstration de l'utilité
Cellules souches hématopoïétiques déplétées en cellules T	Traitement des maladies auto-immunes après traitement immunosuppresseur très hématotoxique	Expérimental	Risque de déficit immunitaire secondaire
Cellules souches hématopoïétiques enrichies <i>in vitro</i> en progéniteurs	Réduction de la durée d'aplasie et reconstitution hématopoïétique après traitement myélosuppresseur pour pathologie maligne	Préclinique/ Expérimental	Absence d'intérêt financier pour les firmes productrices de facteurs de croissance hématopoïétiques
Cellules souches hématopoïétiques étendues <i>in vitro</i>	Reconstitution hématopoïétique après traitement myélosuppresseur malgré un greffon insuffisant au prélèvement	Préclinique	Connaissances fondamentales insuffisantes

\* Myélosuppresseur: détruisant définitivement les cellules hématopoïétiques.

catalogue, seul un petit nombre d'exemples pris parmi les thérapeutiques relativement les plus avancées seront passées en revue.

**Immunothérapie antitumorale autologue**

Stimuler la réponse immunitaire de l'hôte vis-à-vis de sa tumeur maligne est un rêve ancien des oncologues. Les progrès biologiques ouvrent de nouvelles perspectives [27]. On peut

utiliser pour ce faire plusieurs types de cellules: (1) les lymphocytes T cultivés *in vitro* et immunisés contre des antigènes tumoraux. L'objectif est alors d'injecter ensuite ces cellules tueuses pour obtenir la régression tumorale; (2) les cellules monocytaires « armées » avec des anticorps spécifiquement dirigés contre les cellules tumorales; (3) les cellules dendritiques « pulsées » *in vitro* avec des antigènes tumoraux, ou différenciées *in vitro* à partir de cellules leucé-

miques myéloïdes. L'objectif est là de stimuler *in vivo* les réponses lymphocytaires de l'hôte (« vaccination antitumorale ») [28].

La technique actuellement la plus en pointe est la vaccination par les cellules dendritiques. Toutefois, il reste à démontrer qu'il est effectivement possible chez l'homme de stimuler, que ce soit *in vitro* ou *in vivo*, une réponse immune antitumorale efficace chez des sujets chez lesquels la tumeur a été capable de se développer spontanément, situation qui est sensiblement différente des modèles animaux qui utilisent le plus souvent des tumeurs greffées. Toutes ces méthodes pourraient être optimisées par le transfert génique dans les cellules de molécules de membrane favorisant la réponse immune ou de cytokines immunostimulantes.

**Allogreffe d'îlots de Langerhans pour le traitement du diabète insulino-dépendant**

L'objectif final est de permettre à des patients insulino-dépendants de ne plus avoir recours à l'insuline [29]. Pour le moment, aucun résultat significatif à long terme n'a été observé malgré plusieurs centaines de tentatives dans le monde. Les difficultés sont multiples, tenant à la rareté des îlots de Langerhans disponibles, la nécessité d'une immuno-suppression, et à une connaissance insuffisante de leur physiologie. La description récente [30] d'une nouvelle technique d'immuno-suppression ouvre des perspectives qui demandent à être confirmées. L'expansion *in vitro* d'îlots a été décrite récemment et pourrait permettre également de nouvelles avancées [30].

**Allogreffe d'hépatocytes**

L'objectif de l'allogreffe d'hépatocytes [29] est de remplacer la greffe de foie, ou de permettre aux patients en attente de transplantation hépatique de survivre en attendant un foie disponible. Pour l'instant, aucun résultat véritablement significatif n'a été obtenu. Il semble nécessaire de revenir à des modèles animaux, notamment chez le gros animal. Une recherche plus fondamentale sur la physiologie de l'hépatopoïèse, des cellules souches et des facteurs de

Tableau IV. Principales thérapies cellulaires autologues (II).

Nature des cellules	Objectif thérapeutique	Stade de développement	Problèmes rencontrés
Lymphocytes T stimulés <i>in vitro</i> par virus*	Immunothérapie active spécifique de maladies virales (chez les immunodéprimés)	Premiers essais cliniques encourageants	Extrême lourdeur de la technologie
Lymphocytes T stimulés <i>in vitro</i> par antigènes tumoraux	Immunothérapie active spécifique de tumeurs malignes	Préclinique/ Premiers essais	• Extrême lourdeur de la technologie Preuve de l'efficacité non apportée chez l'homme
Macrophages armés vis-à-vis d'antigènes tumoraux	Immunothérapie active ± spécifique de tumeurs malignes	Préclinique/ Premiers essais	• Preuve de l'efficacité non apportée chez l'homme
Cellules dendritiques chargées d'antigènes tumoraux	« Vaccination » anti-tumorale	Préclinique	Preuve de l'efficacité non apportée chez l'homme
Épidermiques	Réparation cutanée après brûlures cutanées étendues	Routine (industrialisé)	Pas de reconstitution des cellules sudoripares ni des follicules pileux

\* En fait, il s'agit de cellules autologues pour les indications dans les greffes d'organes, mais allogéniques (du donneur, donc autologues vis-à-vis du tissu lymphoïde du patient) en cas de greffe de moelle.

régulation est probablement aussi indispensable.

### Greffe de neurones fœtaux

Quelques centaines de patients atteints de maladie de Parkinson ont été greffés dans des protocoles thérapeutiques rigoureux [32]. Ces essais ont montré que les neurones dopaminergiques fœtaux, implantés dans le cerveau adulte, survivent, se différencient et peuvent induire une récupération fonctionnelle significative, bien que variable d'un patient à l'autre ce qui implique que des études précliniques et cliniques supplémentaires soient réalisées pour les optimiser. La logistique importante, et impossible à déléguer à une structure de type industriel dans le cadre de greffes de tissus provenant d'IVG, compromet toutefois l'expansion de cette technique hors de centres de recherche spécialisés. L'obtention de cellules capables de remplacer les neurones dopaminergiques mais susceptibles d'être produites en quantité importante et conservées dans des « banques », dans lesquelles les neurochirurgiens pourraient venir puiser à la demande, est donc aujourd'hui

un objectif prioritaire. Les cellules souches, notamment mais pas seulement embryonnaires, ou les xéno-greffes sont des pistes activement suivies dans les laboratoires. Des résultats prometteurs viennent, par ailleurs, d'être obtenus dans une autre maladie neurodégénérative, la maladie de Huntington, dans laquelle la greffe neuronale représente ainsi le seul traitement envisageable à ce jour. Il est donc probable que, dans ce cas, les problèmes de logistique ne bloqueront pas l'expansion de la technique de la même façon que pour la maladie de Parkinson, pour laquelle d'autres traitements existent.

### L'évaluation des thérapies cellulaires

Jusqu'à une période récente (Loi n° 96-452 du 28 mai 1996 relative aux thérapies cellulaires et géniques), la thérapie cellulaire n'était soumise en France à aucune réglementation sérieuse [33]. Avec les contraintes éthiques et réglementaires actuelles, il est probable que la transfusion de globules rouges ou de plaquettes, ou encore l'autogreffe de cellules

souches hématopoïétiques du sang auraient mis beaucoup plus de temps à émerger qu'elles ne l'ont fait.

Malgré les tentations pour les cliniciens de réaliser le plus vite possible des essais chez l'homme, un certain nombre d'étapes incontournables doivent être respectés: (1) définition précise du but thérapeutique recherché; (2) mise au point d'un modèle animal adapté (il n'existe pas toujours et il faut éventuellement le créer); (3) expérimentation chez le rongeur, puis chez le gros animal; (4) définition des critères de qualité du produit cellulaire (nombre, fonction, etc.) et tentative de « standardisation » du produit; (5) essai de faisabilité chez l'homme. Il est probablement la plupart du temps illusoire de rechercher une dose maximale tolérée en matière de thérapie cellulaire. Compte tenu de la difficulté d'obtenir des cellules, le principal problème est plutôt de définir la dose minimale efficace dans une maladie donnée. En cas d'essai de faisabilité encourageant, une étude de phase II doit être réalisée, de préférence d'emblée randomisée et préalable à une éventuelle étude de phase III.

La thérapie cellulaire ne pourra sans doute jamais répondre aux critères de qualité exigés par les médicaments. En effet, ce sont des agents thérapeutiques beaucoup plus complexes de sorte qu'il sera sans doute impossible de réaliser des produits véritablement homogènes et aux effets parfaitement prévisibles. Le législateur a jugé bon de distinguer des « produits cellulaires » (cellules non volontairement modifiées), des « produits de thérapie cellulaire » (cellules volontairement modifiées), seules ces dernières étant considérées comme des médicaments, donc du ressort de l'industrie. Cette définition occulte le fait que toute cellule extraite du corps humain a de fortes probabilités d'être involontairement modifiée. Il faut donc trouver un équilibre entre les désirs des équipes médicales d'utiliser les cellules qu'elles peuvent elles-mêmes se procurer dans l'espoir de sauver les malades, mais dans des conditions qui risquent de ne pas permettre de répondre à la question posée, et les craintes que la prise en mains par l'industrie, certainement préférable en termes d'assurance qualité, ne « tue le génie »! ■

**RÉFÉRENCES**

1. Rouger P. *La transfusion sanguine*. Collection *Que sais-je ?* Paris: PUF, 1997: 127 p.
2. ANAES. Remplissage vasculaire au cours des hypovalémies relatives. *Reanim Urg* 1997; 6: 331-427.
3. Salama A, Mueller-Eckardt C, Kiefel V. Effect of intravenous immunoglobulin in immune thrombocytopenia. *Lancet* 1983; 2: 193-5.
4. Dwyer JM. Manipulating the immune system with immunoglobulin. *N Engl J Med* 1992; 326: 107-16.
5. Rossi F, Kazatchkine MD. Anti-idiotypes against autoantibodies in pooled normal human polyspecific Ig. *J Immunol* 1989; 143: 4104-9.
6. Abe Y, Horiuchi A, Miyake M, Kimura S. Anti-cytokine nature of natural human immunoglobulin: one possible mechanism of the clinical effect of intravenous immunoglobulin therapy. *Immunol Rev* 1994; 139: 5-17.
7. Fukutake K. Current status of hemophilia patients and recombinant coagulation factor concentrates in Japan. *Semin Thromb Haemost* 2000; 26: 29-32.
8. Link BK, Weiner GJ. Monoclonal antibodies in the treatment of human B-cell malignancies. *Leuk Lymphoma* 1998; 31: 237-49.
9. Illidge TM, Johnson PWM. The emerging role of radioimmunotherapy in haematological malignancies. *Br J Haematol* 2000; 108: 679-88.
10. Follea G, Cazenave JP. Des produits dérivés du plasma aux thérapeutiques expérimentales innovantes d'origine humaine: une démarche méthodologique pour l'évaluation des risques liés à la préparation des produits. In: Colin C, Setbon M, eds. *Journal d'Economie Médicale* 1997; 15: 347-56.
11. ANAES. *Indications et contre-indications des transfusions de produits sanguins labiles*. Paris: Editions EDK, 1997: 180 p.
12. Goodnough LT, Brecher ME, Kanter MH, Aubuchon JP. Transfusion medicine. First of two parts. Blood conservation. *N Engl J Med* 1999; 340: 438-47.
13. Goodnough LT, Brecher ME, Kanter MH, Aubuchon JP. Transfusion medicine. Second of two parts. Blood conservation. *N Engl J Med* 1999; 340: 525-33.
14. Winslow RM. Les substituts de globules rouges: nouvelles solutions pour de vieux problèmes. *Hématologie* 1998; 4: 267-76.
15. Porter DL, Antin JH. The graft-versus-leukemia effects of allogeneic cell therapy. *Ann Rev Med* 1999; 50: 369-86.
16. Robinet E, Tiberghien P. La réaction du greffon contre l'hôte: un modèle de dysrégulation cytokinique. *Hématologie* 2000; 6: 66-74.
17. Heslop HE. Haemopoietic stem cell transplantation from unrelated donors. *Br J Haematol* 1999; 105: 2-6.
18. Buzyn A, Varet B. Immunothérapie cellulaire adoptive: la transfusion de lymphocytes du donneur après allogreffe de moelle. *Médecine Thérapeutique* 1999; 5: 123-7.
19. Heslop H, Rooney C, Brenner M, et al. Clinical protocol. Administration of neomycin resistance gene-marker EBV-specific cytotoxic T-lymphocytes as therapy for patients receiving a bone marrow transplant for relapsed EBV-positive Hodgkin disease. *Hum Gene Ther* 2000; 11: 1465-75.
20. Lucas KG, Sun Q, Burton RL, et al. Clinical protocol. A phase I-II trial to examine the toxicity of CMV- and EBV-specific cytotoxic T lymphocytes when used for prophylaxis against EBV and CMV disease in recipients of CD 34-selected/T cell-depleted stem cell transplants. *Hum Gene Ther* 2000; 11: 1453-63.
21. Etchason J, Petz L, Keeler E, et al. The cost effectiveness of preoperative autologous blood donations. *N Engl J Med* 1995; 332: 719-24.
22. Stadtmauer EA, O'Neill A, Goldstein LJ, et al. Conventional-dose chemotherapy compared with high-dose chemotherapy plus autologous hematopoietic stem-cell transplantation for metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 2000; 342: 1069-76.
23. Chabannon C, Gorin N-C, Marolleau JP, Voso MT. Greffe autologue: où en est-on cinq ans après les premiers tris CD34+ ? *Hématologie* 1999; 5: 315-26.
24. Jantunen E, Myllykangasluosujarvi R. Stem cell transplantation for treatment of severe autoimmune diseases: current status and future perspectives. *Bone Marrow Transplant* 2000; 25: 351-6.
25. Marmont AM. New horizons in the treatment of autoimmune diseases: immunoblation and stem cell transplantation. *Ann Rev Med* 2000; 51: 115-34.
26. Reiffers J, Cailliot C, Dazey B, Attal M, Caraux J, Boiron JM. Abrogation of post-myeloablative chemotherapy neutropenia by ex vivo expanded autologous CD34-positive cells. *Lancet* 1999; 354: 1092-3.
27. Buzyn A, Ostankovitch M, Kemula M, Choppin J, Varet B, Guillet JG. Perspectives d'immunothérapie des hémopathies malignes. *Hématologie* 1997; 3: 518-27.
28. Masurier C, Fernandez NC, Maicent K, Valteau D, Angevin E, Zitvogel L. Rôle des cellules dendritiques dans l'immunité antitumorale: vers de potentielles applications thérapeutiques en hématologie. *Hématologie* 2000; 6: 226-33.
29. Franco D, Boudjema K, Varet B. *Îlots de Langerhans et hépatocytes. Vers une utilisation thérapeutique*. Paris: Editions INSERM, 1998: 214 p.
30. Shapiro AMJ, Lakey JRT, Ryan EA, et al. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med* 2000; 343: 230-8.
31. Ramiya VK, Maraist M, Arfors KE, Schatz DA, Peck AB, Cornelius JG. Reversal of insulin-dependent diabetes using islets generated *in vitro* from pancreatic stem cells. *Nat Med* 2000; 6: 278-82.
32. Peschanski M, Defer GL, Dethy S, et al. The need for phase III studies in experimental surgical treatments of Parkinson's disease. *Adv Neurol* 1999; 80: 651-63.
33. Bjornson CR, Rietze RL, Reynolds BA, Magli MC, Vescovi AL. Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells *in vivo*. *Science* 1999; 283: 534-7.
34. Eglitis MA, Mezey E. Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 4080-5.
35. Weissman IL. Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. *Science* 2000; 287: 1442-6.
36. Asahara T, Kalka C, Isner JM. Stem cell therapy and gene transfer for regeneration. *Gene Ther* 2000; 7: 451-7.
37. Bachoud-Levi A, Deglon N, Nguyen J, et al. Neuroprotective gene therapy for Huntington's disease using a polymer encapsulated BHK cell line engineered to secrete human CNTF. *Hum Gene Ther* 2000; 11: 1723-9.
38. Meynaud-Kraemer L, Setbon M, Colin C. Méthodes d'évaluation et de régulation des thérapeutiques expérimentales innovantes utilisant des produits humains et de substitution. In: Colin C, Setbon M, eds. *Journal d'Economie Médicale* 1997; 15: 403-10.

**ms2000**

**Summary**

**The living therapies**

Therapies derived from the living include proteins and cells. Proteins used as therapies are mainly obtained from human plasma, usually after several steps of purification. Some animal proteins are still used. These natural proteins are progressively replaced by proteins produced by recombinant technology. Cells used as therapy include blood cells (red, white and platelets), allogeneic and autologous hematopoietic stem cells, epidermal cells expanded in culture. Other cellular therapies are at different stages of experimentation: cells of the immune system, Langerhans islets, hepatocytes, embryonic neuronal cells... More research on stem cells, their regulation and plasticity is a prerequisite for new progresses. Procedures to evaluate these emerging therapies are in continuous construction.

**TIRÉS À PART**

B. Varet.