

U S I N E S S dans les labos

**CELLULES SOUCHES, THÉRAPIE
CELLULAIRE ET MÉDECINE
RÉGÉNÉRATRICE
JF STOLTZ**

Professeur à la Faculté de Médecine de Nancy
Chef de l'Unité de Thérapie Cellulaire et Tissulaire – CHU Brabois

Réparer, restaurer ou régénérer une fonction organique

POURQUOI LA THÉRAPIE CELLULAIRE?

- Non régénération spontanée des tissus mais le plus souvent cicatrisation
- Intérêt de préparer « *in vitro* » des biotissus (Médecine régénératrice) ou de développer la thérapie cellulaire.
- Cellules seules ne peuvent former un tissu **d'où nécessité de comprendre le rôle de l'environnement sur les fonctions cellulaires**
- Hors du tissu d'origine, les cellules peuvent perdre leurs spécificités

In vitro des cellules peuvent se reprogrammer : plasticité

APPLICATIONS POTENTIELLES

- Oncologie
- Hématologie
- Immunothérapie (NK, Cellules dendritiques...)
- Pathologies neurodégénératives (Parkinson, chorée de Huntington...)
- Cardiologie (insuffisance cardiaques...)
- Vasculaire (artères de petits diamètres)
- Ostéoarticulaire (os, cartilage, tendons, ligaments)
- Orthodontie
- Consolidation fractures (Projet National IMOCA)
- Pathologies hépatiques
- Diabète
- Urologie (urètre, prothèse penis...)
- Peau
- Cornée
- Régénération de nerfs
- ...

Quelques définitions

- **Autogreffe** → donneur = receveur
- **Allogreffe** → Donneur \neq receveur
- **Xénogreffe** → inter espèces
- **Différenciation** → transformation d'une cellule non différenciée en cellule spécialisée
- **Plasticité** → aptitude des cellules souches à générer des cellules n'appartenant pas à leur tissu d'origine
- **Homing** → aptitude des cellules greffées et redifférenciées à se diriger vers les tissus à traiter.

Les différents types de cellules souches utilisables en thérapie cellulaire et Médecine régénératrice

- **Totipotentes**: issues d'un ovule fécondé < 4 jours (blastomères)
Développement d'un être complet
- **Pluripotentes** ou cellules souches embryonnaires → masse interne, embryon au stade blastocyte (5ème à 7ème jour)
Formation des tissus de l'organisme (sans doute plus de 200 différents tissus)
- **Multipotentes**: tissus foetaux ou adultes
Auto renouvellement et formation de différents types de tissus (ex: moelle osseuse, liquide amniotique, sang de cordon,...)
- **Unipotentes**: un seul type de tissu mais gardent des capacités d'auto renouvellement
ex: hépatocytes, keratinocytes,...

CELLULES SOUCHES EMBRYONNAIRES

- Fécondation ovule → 2ème division (Blastomère) *totipotentes*
→ *Blastomère* peuvent donner naissance à tous les organes et tissus
- 4ème jour → cellules plus petites et séparation en cellules internes et externes.
- 5ème - 6ème jour → **Blastocytes** (128 à 256 cellules)
→ **cellules souches embryonnaires humaines (CSEh)**

Les CSEh ne sont pas des cellules susceptibles de permettre le développement d'un être humain.

Depuis + de 20 ans, on peut créer des lignées de CSEh [UK; USA; Israël; Suède; Chine]: en France (06/08/84): autorisation de lignées d'embryons surnuméraires sous réserve de consentements.

QUELLES CELLULES SONT ACTUELLEMENT UTILISABLES EN THÉRAPIE CELLULAIRE ?

- Cellules embryonnaires (CSE) (faisabilité ?, loi Bioéthique 2004)
- Progéniteurs adultes (CSM moelle, Progéniteurs circulants, adipocytes...)
- Progéniteurs fœtaux (cordon ombilical, cellules amniotiques).
- Autres cellules issues de tissus: unipotentes (foie ? Peau ?)

CELLULES SOUCHES (CS) CHEZ L'ADULTE

Les CS sont (probablement) présentes et dispersées dans tous le corps humains (niches) et participent à la régénération de l'organe et des tissus en fonction de signaux envoyés par l'environnement.

LES CELLULES SOUCHES ADULTES

- CS de la moelle osseuse (2 types)
 - CSH (hématopoïétiques) → (*même origine que les cellules endothéliales*)
 - Cellules souches mésenchymateuses qui forment cellules endothéliales, vaisseaux, muscles, squelette, cartilage.
 - Progéniteurs endothéliaux circulants
- CS peau → prolifération très importante: renouvellement épiderme, poils, ongles,...
- CS muscle (unipotente) et cellules satellites (multipotente)
- CS intestin → régénération entérocytes, glandes muqueuses,...
- CS poumon/foie/rein → non identifiées
- CS rétine.

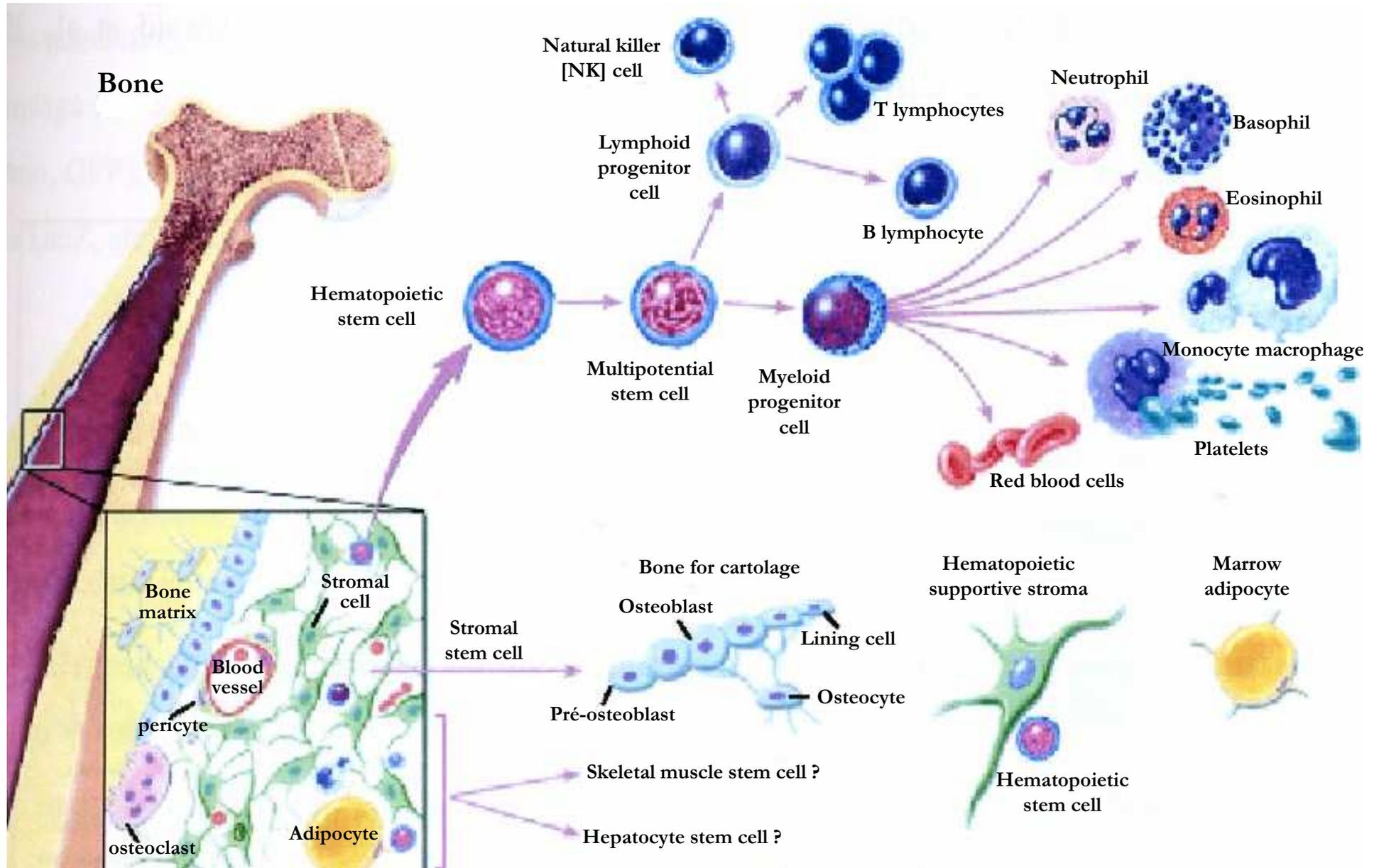
PRINCIPES GÉNÉRAUX DES THÉRAPIES CELLULAIRES ET DE L'INGENIERIE TISSULAIRE

- Prélèver de cellules souches à un patient ou à un donneur
- Optimiser la séparation, la différenciation et la prolifération de cellules – incorporation d'un gène
- Cultiver ou cocultiver des cellules (éventuellement inclusion dans une matrice biocompatible)
- Greffer

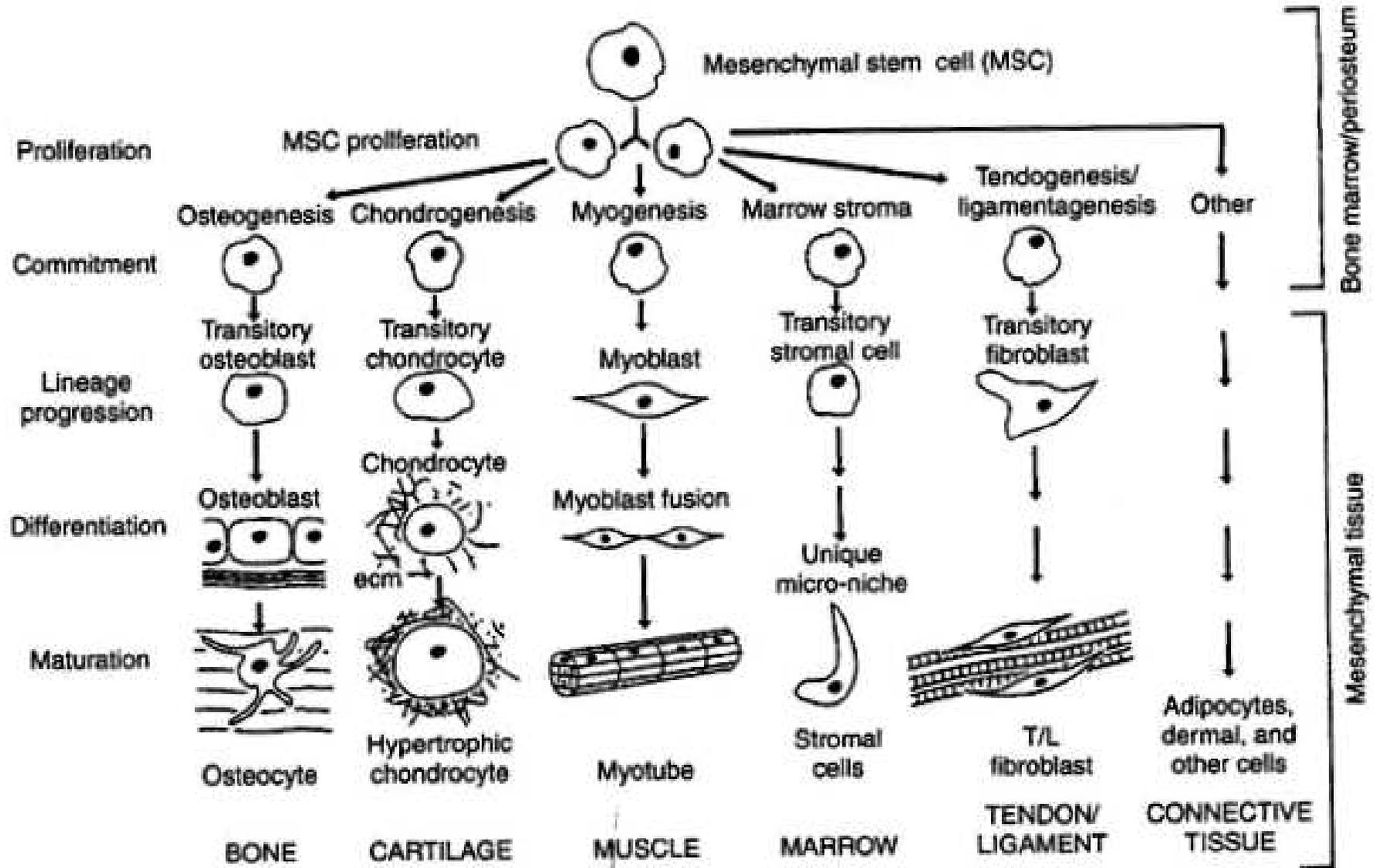
-La moelle osseuse a été le premier tissu dans lequel des cellules progénitrices ont été identifiées et utilisées pour le traitement de pathologies hématologiques.

- La moelle osseuse contient des cellules capables de se différencier en différents tissus.

HEMATOPOIETIC AND STROMAL STEM CELL DIFFERENTIATION



Différenciation potentielle des cellules souches mésenchymateuses



APPLICATIONS THERAPEUTIQUES DES CELLULES SOUCHES HEMATOPOÏETIQUES

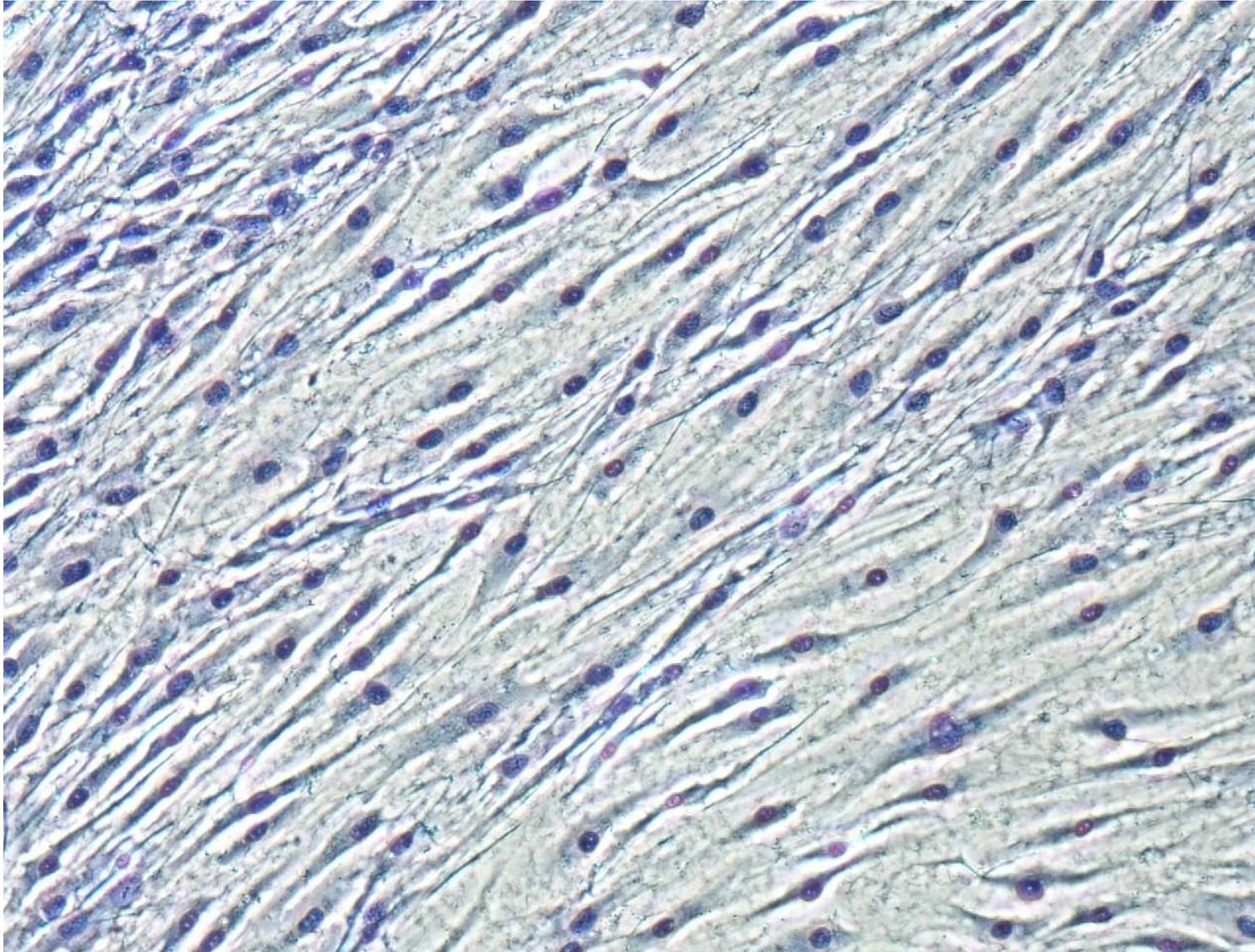
Thérapie cellulaire par cellules souches hématopoïétiques adultes de la moelle osseuse et du sang périphérique (+ de 50 ans)

- autogreffe (# 3 000 / an en France)
- allogreffe (# 1000 / an)
- sang de cordon placentaire (greffes allogéniques)

Principales applications:

- **Hémopathies malignes** (lymphomes, myélomes, leucémies ou certaines tumeurs solides (cancer du sein, neuroblastomes).
- **effets délétères sur la moelle** après chimiothérapies massives
- **Traitement du rejet après allogreffe** (GvL, GvH) → essais en cours niveau 3 avec CSM.

Caractérisation des cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse



CD34- / CD14- / CD73+ / CD90+ / CD105+ / CD146+ / HLA-DR-

THÉRAPIE CELLULAIRE ET IMMUNOLOGIE ADOPTIVE

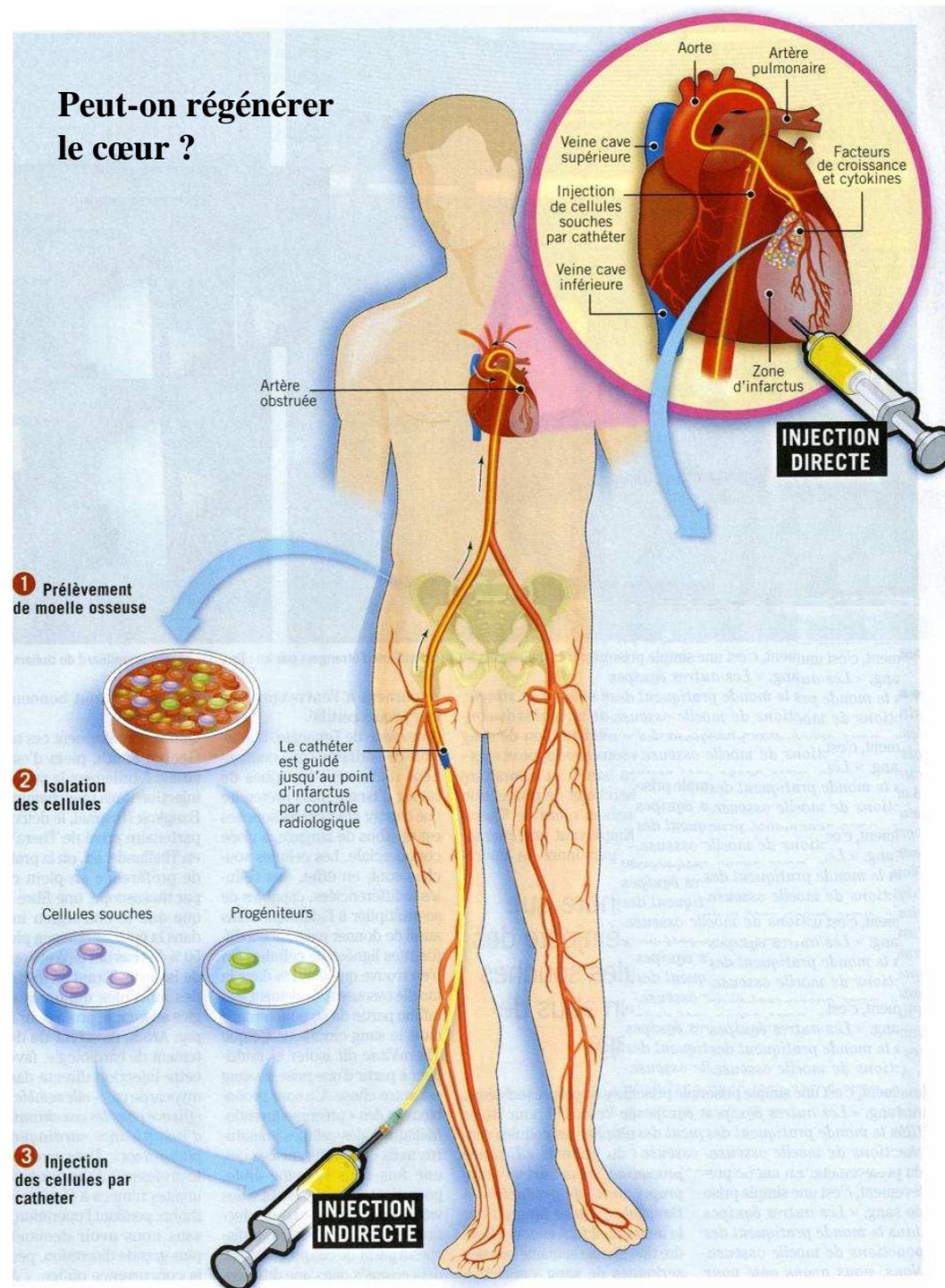
Utilisation lors de transplantation de CSH réalisées malgré la barrière d'histocompatibilité (absence de donneur HLA compatibles) pour → la reconstitution immunitaire.

Amplification de cellules NK (natural Killer) déplétées en cellules T

PRINCIPAUX ESSAIS CLINIQUES EN COURS AVEC DES CELLULES SOUCHES ENBRYONNAIRES ET DESCELLULES SOUCHES (EN COURS OU EN PROJET)

- Maladies des systèmes nerveux central (Parkinson, Chorée de Huntington) [avec CShe]
- Cellules dendritiques (mélanome)
- Maladies cardiaques (insuffisances cardiaques secondaires)
- Vaisseaux de petits diamètres
- Cartilage
- Foie
- Diabète (Ilot de Langheran)
- Urologie
- Cornée

Peut-on régénérer le cœur ?



INSUFFISANCE CARDIAQUE ET THERAPIE CELLULAIRE

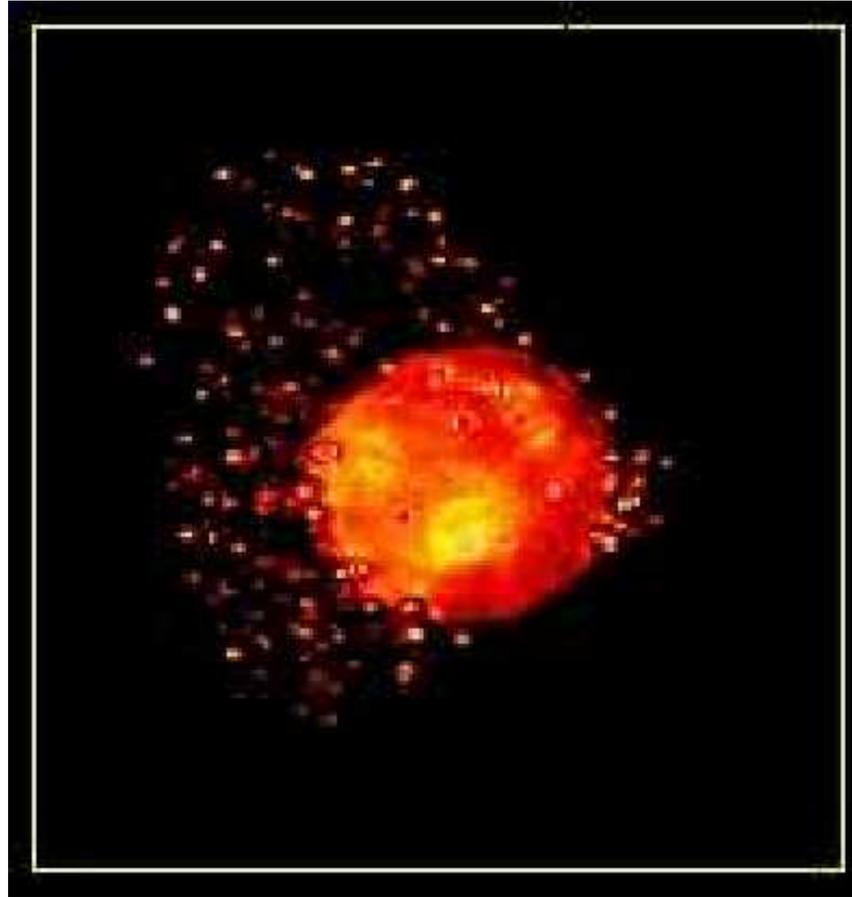
Plus de 30 essais cliniques avec différents protocoles cellulaires (myoblastes, CSH, CSM, ou plus spécifiques: CD133+, PEC, CS embryonnaires) et mode d'administration (intramyocardique, intracoronaire, transendocardique).

→ Résultats \pm marqués.

Nombre de patients faibles par essai

→ Difficulté actuelle de conclure

Ingénierie du cartilage



Chondrocyte articulaire en microscopie confoacle

Contraintes mécaniques et articulation



Position debout



0,7 MPa

Marche



5-10 MPa



**Mouvements
physiques intenses**



>18 MPa

**Cas extrêmes
(excès / immobilisation)**



**Déséquilibre de
l'homéostasie**



**Maladies dégénératives
(arthrose)**

LES CONTRAINTES DE L'ENVIRONNEMENT ET LE REMODELAGE TISSULAIRE

De nombreuses cellules de l'organisme sont exposées *in vivo* à différents types de forces: pression, compression, cisaillement, étirement...

i.e: ♦ *cisaillement et étirement sur les cellules artérielles (CE ou CML) ou dans les ligaments*

♦ *Pression sur chondrocytes des cartilages articulaires*

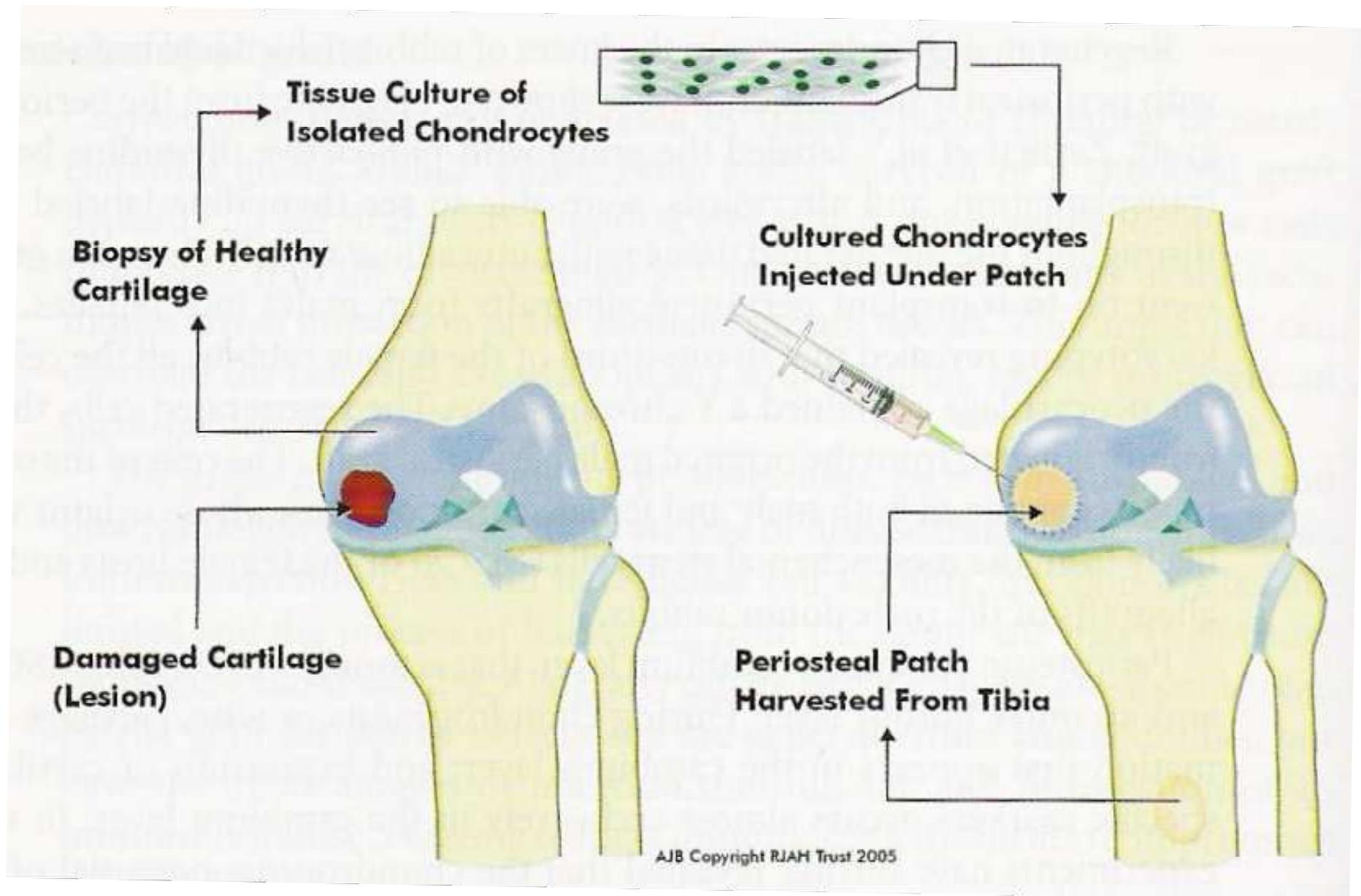
→ *Les forces mécaniques jouent un rôle déterminant sur l'homéostasie d'un tissu ou le phénotype cellulaire.*

REMODELAGE TISSULAIRE ET CONCEPT D'ADAPTATION

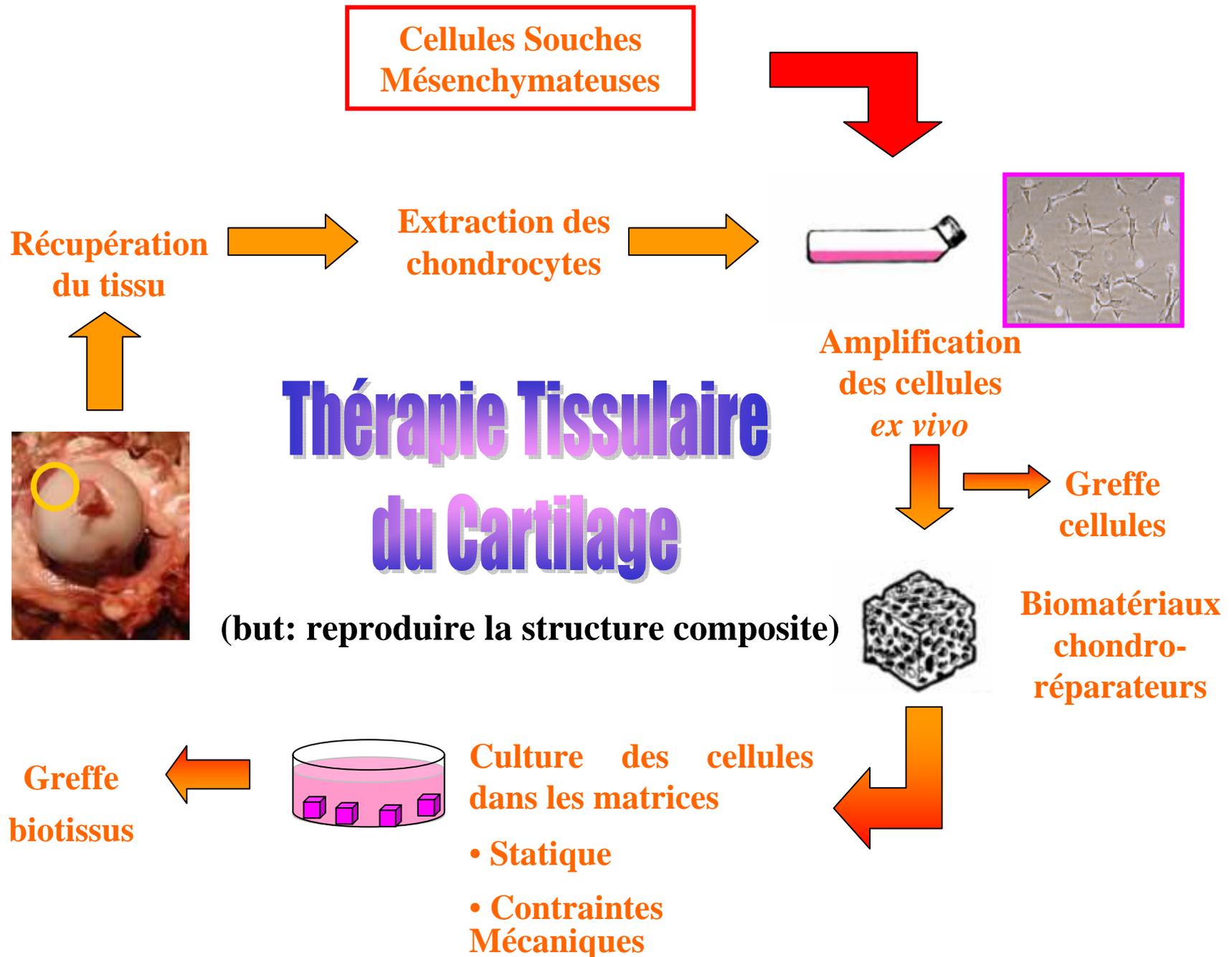
Forces mécaniques participent à la régulation et au remodelage tissulaire (loi dite de Wolf et concept d'adaptation de Roux)

Mechanical forces and Roux's Functional : Adaptation Concept

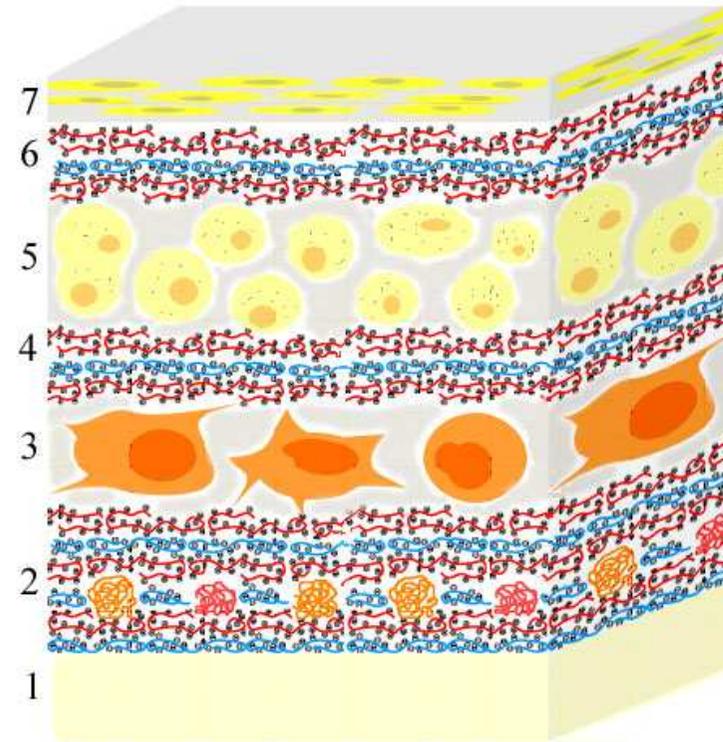
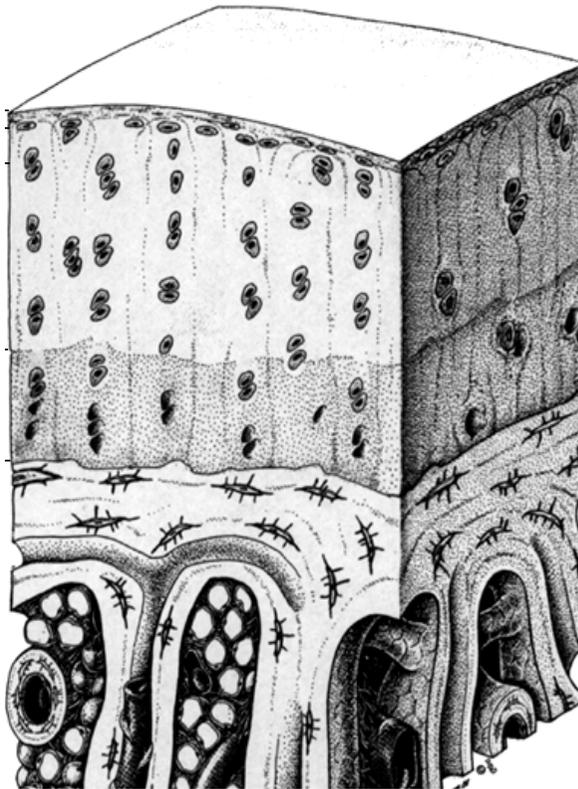
Many cells are influenced by functional stimuli, the nerve, muscle, gland cells by the related (electric) pulse, bone cells and connective tissue cells by pressure and tension... It is plausible that, if this influence is disadvantageous for some cells of a tissue or some parts of it, then these cells will disappear during the process of physiological regeneration. If, however, variations appear for which the functional stimulus is favorable, then in the course of time these cells will replace all the other cells, which are indifferent to the functional stimulus ». (Roux, 1881)



Thérapie cellulaire du cartilage avec des chondrocytes cultivés (Brittberg)



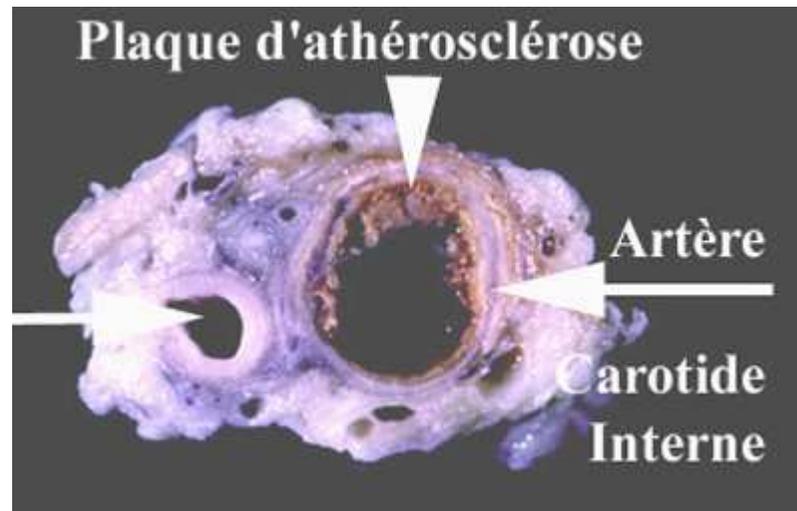
Projet de construction d'un biocartilage



- 1) Collagen-apatite as osteo-chondral matrix
- 2) Multilayered film (HA/PLL) as active compartment fonctionnalized by growth factors (BMP-2, TGF-beta ...)
- 3) Alginate/ Stem cells sprayed aimed to differentiate to Chondrocytic cell expressing the collagen type X
- 4) Multilayered film (HA/PLL) as active compartment
- 5) Alginate/chondrocytes expressing the collagen type IIB specific of the cartilage
- 6) Multilayered film (HA/PLL) as actives compartment
- 7) Alginate/ Stem cells sprayed the collagen type I and II.

Ingénierie Vasculaire

Préparation in vitro d'artères de petits diamètres
athérosclérose, thrombose, anévrisme, pontage...



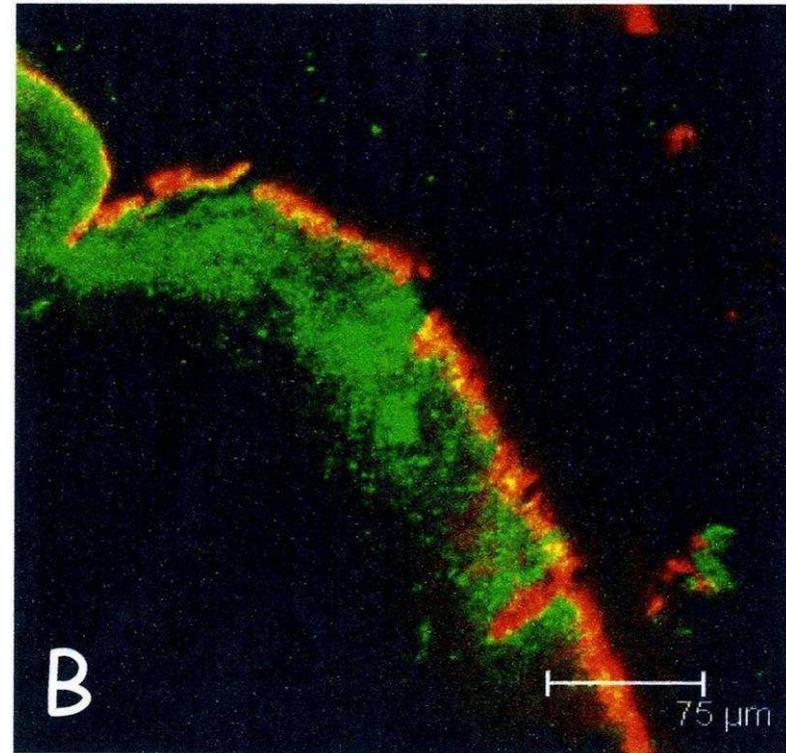
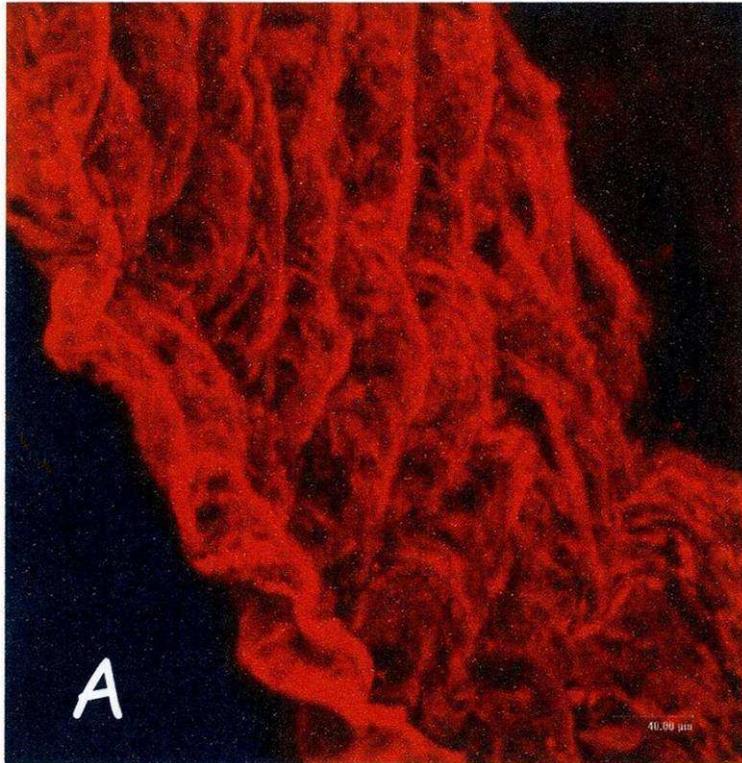
Obstruction de la lumière du vaisseau

- **Traitement : substituts vasculaires artificiels, allogreffes ou biovaisseaux ?**

Cellules souches potentielles

- Progéniteurs endothéliaux circulants [Griese (2003); Shirota (2003); Résultats personnels Brevet UHP-CHU 2007]
- Progéniteurs de cellules musculaires lisses (Simper et al 2002)
- CSM

Problèmes: → Reproduire la structure et la fonction d'une artère
→ Construire à partir de cellules natives (ECs et SMCs) ou de progéniteurs (EPCs) un intima et une media.



Observation en microscopie confocale d'une artère ombilicale recouverte d'un film PSS/PAH-rhodamine (A) etensemencée avec des cellules endothéliales marquées avec anticorps anti-PECAM-1 (vert) (B)

(résultats personnel)

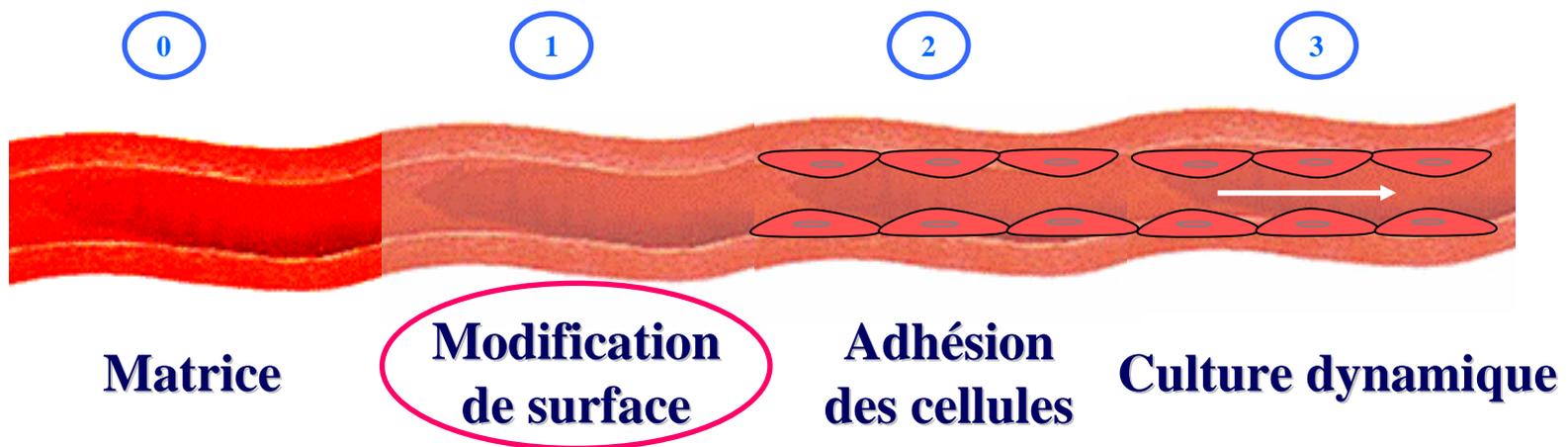
Projet d'un biovaisseau de faible diamètre à partir d'allogreffes

- Interface sang / substitut : proche des vaisseaux natifs
 - **Propriétés anti-thrombogéniques**



Ensemencement des CE

Pb : CE adhèrent peu sur les matrices natives

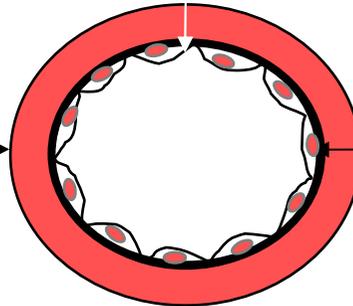


Biovaisseau hybride

Substitut vasculaire : $\varnothing < 7$ mm

Projéniteurs endothéliaux circulants (EPC)

Artère ombilicale
déendothélialisée



Film multicouche
de polyélectrolytes

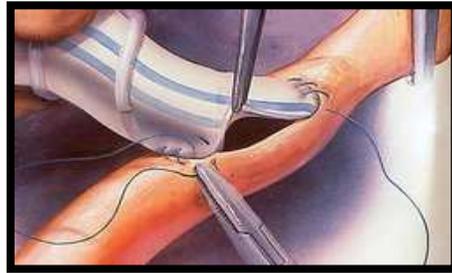
Différenciation

Différenciation et maturation :
EPC → CE

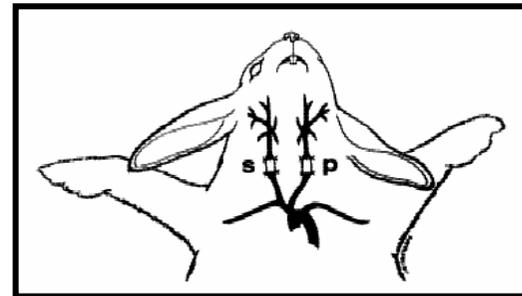
Évaluation

(Brevet CHU-UHP) 2007

Étude de l'implantation de vaisseaux traités par films de polyélectrolytes

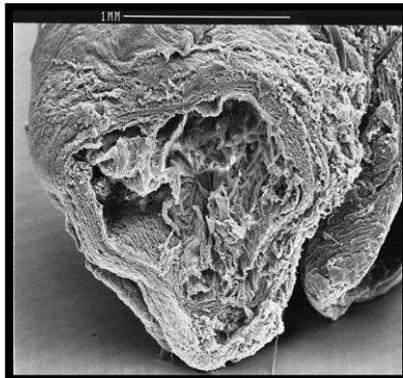


Anastomose latéro-latérale

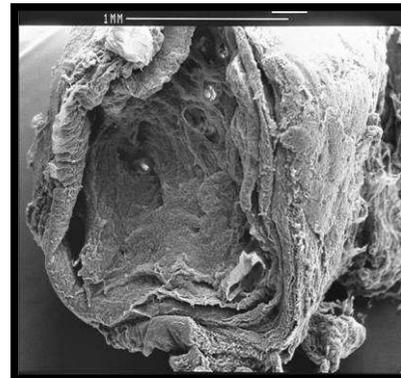


Pontage carotido-carotidien

Sans traitement

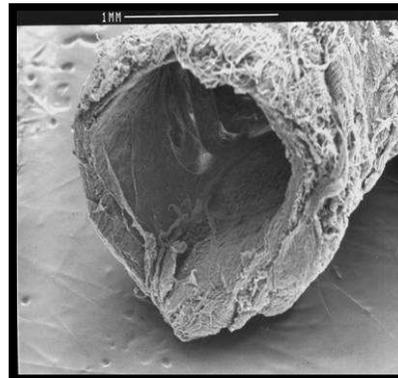


Carotide

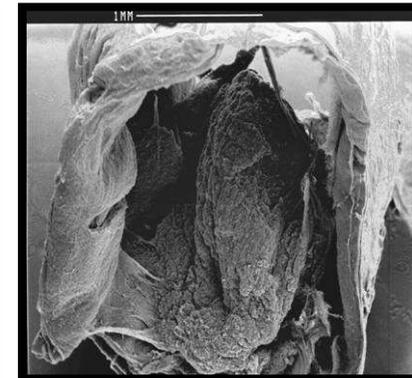


Aorte

Avec traitement par film de polyélectrolytes



Carotide



Aorte

(résultats personnel)

TC et stents



Le sang contient des précurseurs de cellules endothéliales (EPC) qui assurent la réparation de la paroi vasculaire.



La surface du stents est revêtue d'anticorps monoclonaux

Les anticorps Capturent les EPC

Les EPC se transforment en véritables cellules endothéliales

Ces cellules viennent recouvrir le stent et renforcer la paroi

Thérapie cellulaire et génique du foie

→ Grandes capacités d'autorégulation
(*hépatocytes ≠ cellules souches monopotentes*)

Un foie détruit au deux tiers peut se régénérer

→ Thérapie génique: prélèvement hépatocyte, introduction d'un gène, réimplanter les nouveaux hépatocytes.

Problème: il faut qu'une partie des cellules initiales disparaissent !

Même en cosmétologie !

Les cellules souches: les cellules les plus précieuses de la peau

Source de vie, elles sont à l'origine de toutes les cellules. Dans la peau, les cellules souches adultes ou cellules mères sont dotées d'un incroyable pouvoir de renouvellement et régénération.

Sous la ride:
Une raréfaction importante de cellules

Avec le temps, la peau s'appauvrit en cellules mères qui peuplent la base de l'épiderme. La peau perd peu à peu sa matière vive: les rides de creusent. Protéger ces cellules mères est d'autant plus indispensable qu'à chaque cellule protégée, ce sont des centaines de nouvelles cellules qui sont générées.



Professeur C. Pincelli, Université de Modène

Issu de la Recherche Dior sur les cellules souches: CAPTURE R60/80TM XP

Avancée technologique majeure, Capture R60/80TM XP a été conçu pour aider à relancer l'activité cellulaire et reconstituer les réserves de matière sous la ride. Jour après jour, la peau redevient une fabrique active de matière nouvelle. Les cellules repeuplent la peau.

Sous la ride, la vie renaît.



Sérum, crème et Crème Yeux Réparation Rides

Dior soutient la recherche sur les cellules souches adultes et participe au financement des travaux Du **standford Institute** for Stem Cell Biology and Regenerative Medicine.

Existe-t-il des souches cancéreuses ?

Question: L'existence d'une population rare de cellules souches favoriserait la croissance tumorale ?

Ex: LMA (Leucémie Myoblastique adulte): identification d'une population rare (CD 34+/CD 38-) capable de transmettre la leucémie.

- Origine: mutation ou de différenciation ?
- Caractéristiques Biologiques ?
- Perte d'une voie de signalisation ? (p53; WNT)
- Rôle du microenvironnement

A ce jour → Existence éventuelle de Cellules souches cancéreuses dans leucémie, tumeurs cerveau, cancer du sein, prostate, colon

Les Cellules souches cancéreuses semblent résistantes à la chimiothérapie.

PROMESSES MAIS DIFFICULTÉS D'UTILISATION DES CSH_e

Avantage

- Facile à localiser et identifier
- Source pratiquement illimitée
- Cellules pluripotentes et flexibles
- Grande capacité de profiler in vitro
- « Immortelles » en culture

Obstacles

- Allogreffes (expression HLA)
 - traitement immunosuppresseur ou création de banque CSH_e HLA
- Risque carcinogène plus élevé
- Pureté des lignées (contamination)
- Problèmes éthique et religieux
 - grande diversité des réglementations

PERSPECTIVES CONCERNANT LES CELLULES SOUCHES ADULTES

- Greffes allogéniques: risque rejet (Pb HLA)
- Risque cancer en situation autologue (rare)
En situation allogénique → sans doute faible et risque moins élevé qu'avec les CSe
- Pas de problème de recueil – quelques réticences pour cellules souches foétales

Défis

- Récolte et localisation
- Faible capacité de prolifération en in vitro
- Plasticité ou fusion
- Moindre efficacité ?
- Faibles capacités de « Homing »
- Nécessité d'une recherche fondamentale à visée cognitive (négligée par rapport au CShe).

CLONAGE HUMAIN À DES FIN THÉRAPEUTIQUES

*[Pb éthique, religieux, mais aussi de connaissances
scientifiques]*

- 2004
- Autorisation de clonage à des fins thérapeutique (Neuropathies dégénératives héréditaires sensibles et motrices - Maladie de Charcot)
 - Interdiction en France (loi Bioéthique 2004) autorisation dérogatoire de cultiver de embryons surnuméraires ou acquis à l'étranger

(Autorisation en l'absence de méthode alternative d'efficacité comparable)

CONCLUSIONS

- *Travaux en TC nécessitent des compétences transversales (Biologie cellulaire, hématologie, biologie moléculaire, mécanique, clinique...)*
- *Les recherches doivent être envisagées avec la vision GMP pour les applications cliniques ultérieures*
- *Tenir compte aspects réglementaires et éthiques (voir France les décrets du 16/08/07 pour la partie recherche et les décrets du 16/12/1998 pour les approches cliniques) + Directives Européennes*



*Unité de Thérapie Cellulaire et Tissulaire
" UTCT " (Nancy)*



*« Any science creates a new ignorance,
Any conscious and new unconscious,
Any new acquisition creates a new void »*

H. Michaud

*Départ of bioméchanics and cell and tissue Engineering and
Therapy (UMR CNRS7563 ET IFR 111) and UTCT (CHU)
JF STOLTZ – PU-PH*

N. DE ISLA – MCU
C. GIGANT HUSELSTEIN – MCU
P. MENU – MCU
S. MULLER – CR1 INSERM
D. BENSOUSSAN -PH

A. DALLOUL – PU PH
P. LABRUDE – PU
X. WANG - PU
V. DECOT – AHU

Tech

D. DUMAS - IR UHP
N. CHARIF - AI
M. GENTIL -AI UHP
G. GAUCHOIS – TR UHP
B. GUERBET - AJT
K. LORCIN – Secrétaire

Post Doc

H. KERDJOUDJ

V. MOBY

Y. LIU

H. CHEN
N. BERTHELEMY

PhD Students

A. KADI
C. GAUCHER
L. AISSI