

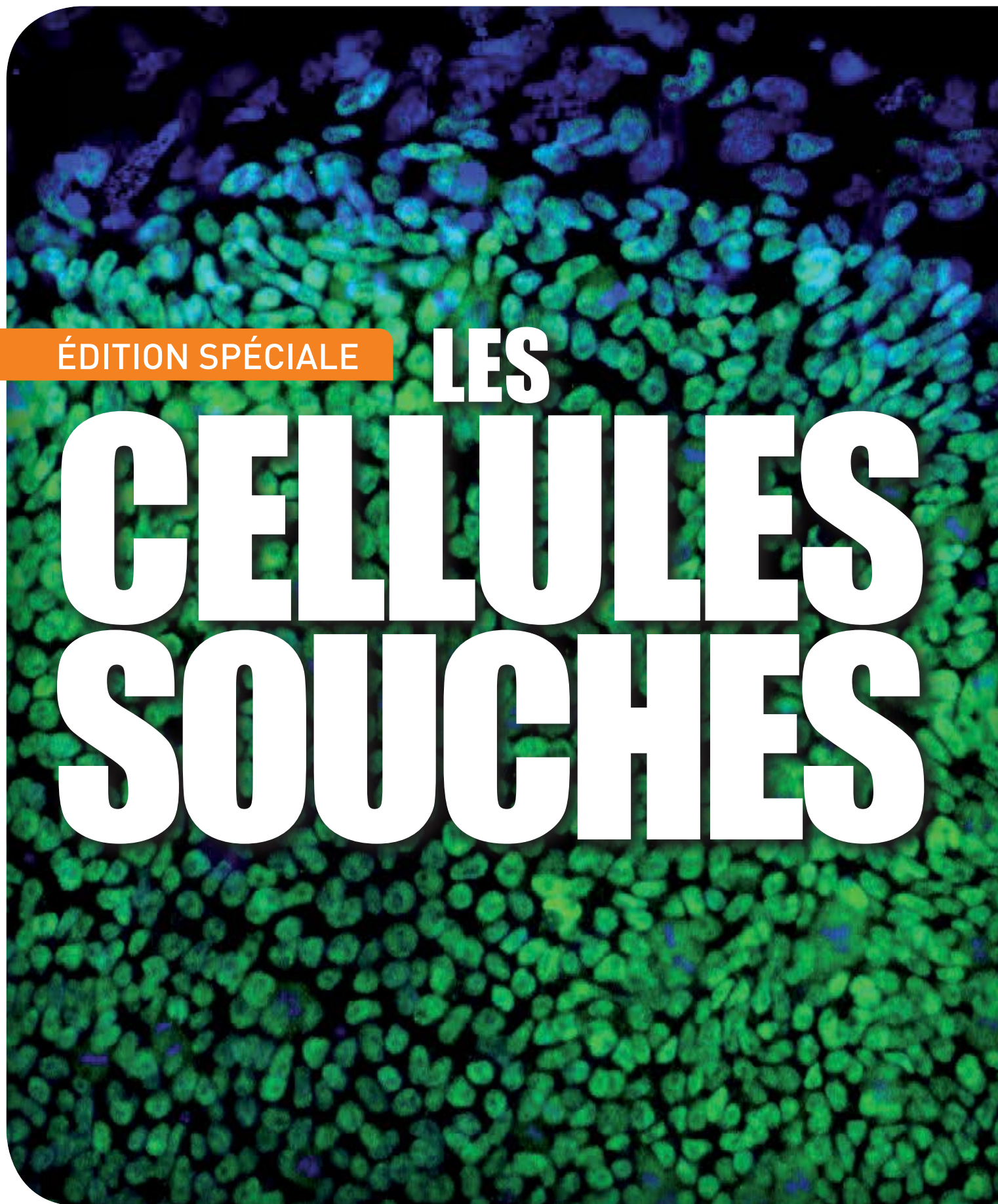
# NEPHROGENE

PUBLICATION DE L'ASSOCIATION POUR L'INFORMATION ET LA RECHERCHE SUR LES MALADIES RÉNALES GÉNÉTIQUES

ÉDITION SPÉCIALE

LES

# CELLULES SOUCHES



# SOMMAIRE



→ **LA MÉDECINE  
régénérative**

. JOHN DE VOS ..... 05

→ **LES CELLULES  
souches**

. JOHN DE VOS ..... 08



→ **LES PERSPECTIVES  
pour les maladies rénales génétiques**

. ALEXANDRE HERTIG ..... 13



→ **LE CHIMERISME :  
une voie vers l'émancipation  
des traitements immunosuppresseurs  
post-transplantation**

. GEORGES MOURAD ..... 17



→ **INTÉRÊTS ET RISQUES  
du traitement par cellules souches  
dans les maladies rénales génétiques :  
biothérapie dans le syndrome d'Alport**

. OLIVER GROSS ..... 19



→ **CELLULES SOUCHES  
et thérapie génique pour la cystinose**

. STÉPHANIE CHERQUI ..... 22

# ÉDITORIAL

DE DANIEL RENAULT, PRÉSIDENT DE L'AIRG-FRANCE



Bonjour à toutes et à tous,

Voici un numéro spécial de Néphrogène qui traite d'un futur qui nous tient à cœur : celui des thérapies restauratrices, cellulaire ou génique à partir des cellules souches. Ce numéro tourné vers l'avenir, fait écho largement à notre mythologie, grecque pour l'essentiel.

Et nous commencerons par **Europe** qui, avant de donner son nom à notre continent, est une princesse phénicienne. Selon l'étymologie couramment admise de ce nom, Europe serait la composition de « large » et « œil, vue » devenant ainsi « Large terre » pour l'aspect continental. Pour notre part nous garderons le concept initial de « large vue ». C'est avec ce concept en tête de « large vue » que l'AIRG-France est fière d'avoir concrétisé une idée ancienne qui lui est chère, celle de créer une fédération européenne des associations pour les maladies rénales génétiques. Cela s'est passé le 7 Juin 2013 à la Clinique Saint Luc de Bruxelles à l'invitation du Professeur Yves Pirson et de Bruno Woitrin président de l'AIRG-Belgique (voir le compte rendu sur notre site internet et dans le prochain numéro de Néphrogène).

**Prométhée**, est le deuxième mythe auquel nous nous référerons dans ce numéro. Dans la mythologie grecque, Prométhée est un Titan dont le nom signifie « le Prévoyant ». Il est surtout connu pour avoir créé les hommes à partir de restes de boue transformés en roches, ainsi que pour le vol du « savoir divin » (le feu sacré de l'Olympe) qu'il rendit aux humains. Pour avoir donné le feu aux hommes, le titan Prométhée est condamné par Zeus à être enchaîné sur le mont Caucase où un aigle lui ronge le foie toute la journée. La nuit son foie se régénère, c'est en cela que Prométhée est le symbole de la médecine régénérative, thème central de notre dossier spécial consacré aux cellules souches.

La **chimère**, toujours dans la mythologie grecque, est une créature fantastique généralement décrite comme un hybride avec une tête de lion, un corps (ou une autre tête) de chèvre, et une queue de serpent. La symbolique de la chimère est vaste et son nom a été repris pour désigner, dans un sens étendu, toutes les créatures composites possédant les attributs de plusieurs animaux ainsi que les rêves ou les fantasmes et les utopies impossibles. Par extension dans le langage commun, le terme chimérique qualifie une chose irréaliste. Mais pour nous le concept de « chimère » signifie espoir, espoir de réduire l'effet rejet dans la greffe en améliorant la fusion du greffon avec son corps d'accueil.

Enfin **Asklépios**, fils d'Apollon, qui, après une naissance tumultueuse, deviendra grâce à l'éducation d'un centaure spécial, Chiron, un grand maître de la médecine, et son animal favori le serpent, enroulé autour d'un bâton, deviendra l'emblème des professions médicales qui est passé à la postérité depuis le monde romain sous le nom d'Esculape. C'est bien l'exemple d'Asklépios qui pousse chercheurs et cliniciens sur les routes de la recherche médicale, c'est aussi ce même esprit qui nous pousse, nous patients à essayer de mieux comprendre les voies explorées pour en mesurer de façon raisonnée les espoirs légitimes qui sont au bout du chemin. C'est sous l'éclairage de ces quatre figures de la mythologie grecque que nous vous présentons ce numéro spécial sur les cellules souches. Depuis quelques décennies maintenant l'approche de la recherche basée sur les cellules souches (thérapie génique et cellulaire) font briller de grands feux d'espoir chez nous patients plongés dans l'obscurité des maladies génétiques, pour autant les chemins empruntés par la recherche se sont avérés jusqu'à présent longs et difficiles. Les feux brillent toujours et même quelquefois de nouveaux feux s'allument, mais ils restent encore lointains. Alors comment comprendre les axes de ces recherches ? Comment mesurer les obstacles qui bloquent la progression vers l'espoir ? Et surtout comment éviter d'être victime de l'emballement médiatique qui caractérise souvent l'annonce d'une nouvelle sur le sujet ? Pour apporter des réponses à ces questions, nous avons sollicité une série d'articles dont l'ambition est de faire un tour d'horizon du sujet pour la maladie rénale génétique. Je voudrais exprimer au nom de l'AIRG -France un grand merci aux auteurs de ces articles qui ont répondu présents même pour déborder quelquefois de leur domaine habituel en réponse à notre insistance. Un grand merci également aux Prs. Dominique Chauveau et Bertrand Knebelman qui ont accepté d'assurer la supervision scientifique de ce numéro spécial.

**Je vous souhaite une bonne lecture !**

# INTRODUCTION

. DE DOMINIQUE CHAUVEAU ET BERTRAND KNEBELMANN



D. Chauveau



B. Knebelmann

Première conviction, ce numéro spécial de Néphrogène est bienvenu. Il est consacré au présent et au futur de la Médecine régénérative des reins, et notamment à deux formes de biothérapies émergentes, la Thérapie cellulaire et la Thérapie génique. Destiné aux membres de l'AIRG-France et à leurs proches, il sera aussi une source d'information précieuse pour les patients souffrant de maladies rénales non-génétiques, et de nombreux médecins néphrologues, jeunes et moins jeunes, quel que soit leur mode d'exercice.

Deuxième conviction, ce numéro spécial de Néphrogène est didactique. Il inclut deux articles expliquant avec des mots simples et des illustrations lumineuses les principes généraux de la Thérapie cellulaire et de la Thérapie génique et leurs applications actuelles hors de la Néphrologie (V. les deux contributions de J. De Vos). Il compte également quatre articles centrés sur des applications en Néphrologie et en Transplantation rénale, dans le domaine de l'insuffisance rénale aiguë (V. l'article d'A Hertig), de la greffe rénale (V. l'article de G. Mourad), et de deux maladies rénales héréditaires, le syndrome d'Alport et la cystinose (articles d'O. Gross et S. Cherqui).

Troisième conviction, ce numéro spécial de Néphrogène a sa part de complexité. Celle-ci pourra sembler savante et à vrai dire un peu rébarbative au lecteur. C'est évidemment la contrepartie du dialogue entre patients et chercheurs ou médecins : comment trouver les mots qui permettent une authentique communication ? Ami lecteur, fais/faîtes néanmoins l'effort de lire l'introduction et la conclusion des contributions les plus compliquées. Ces paragraphes sont accessibles à tous, résument l'état des lieux, et disent la conviction et l'ardeur au travail qui animent les uns et les autres.

Quatrième conviction, ce numéro spécial de Néphrogène est nuancé et réaliste : chacun lira la part d'espoir des chercheurs et des médecins suscitée par la Thérapie cellulaire ou génique en Néphrologie et Transplantation. Chacun comprendra aussi l'immense chemin scientifique, expérimental et clinique, qu'il reste à parcourir pour que, demain peut-être, la régénérescence rénale devienne réalité.

Le projet de ce numéro spécial est-il ambitieux ? Certainement, mais c'est l'honneur du Conseil d'Administration de l'AIRG-France et de son Président de l'avoir suscité, et des auteurs d'avoir répondu présent. Que les uns soient vivement remerciés de leur contribution, et les autres félicités de leur opiniâtreté.

**A tous, excellente lecture !**

# ÉDITION SPÉCIALE LES CELLULES SOUCHES



John De Vos

## → LA MÉDECINE régénérative

JOHN DE VOS - Responsable de l'Unité de Thérapie Cellulaire - Département Biothérapies  
Pôle Biologie-Pathologie - Hôpital Saint-Eloi - CHU de Montpellier

**On peut voir le corps humain comme une construction sophistiquée dont les briques sont les cellules. Notre corps compte plus de 10 000 000 000 000 de cellules (dix mille milliards), qui sont réparties dans nos différents organes et qui fonctionnent en parfaite symbiose (sans que nous nous en rendions compte quand tout va bien !).**

**Mais si vient la maladie, ou tout simplement l'âge, et que les cellules qui assurent la fonction d'un organe viennent à disparaître, par exemple les cardiomyocytes (cellules cardiaques) dans le cœur après un infarctus du myocarde, le corps dans son entier est menacé. Ces pathologies où la disparition des cellules est responsable de la maladie peuvent être regroupées sous le nom générique de « maladies dégénératives ». Celles-ci sont nombreuses, souvent chroniques, et constituent donc un problème majeur de santé publique.**

Malgré les progrès considérables de la médecine, les maladies dégénératives restent le plus souvent dans une impasse thérapeutique. Tous les organes sont concernés, et on peut citer en exemple, après l'infarctus du myocarde dont nous avons parlé ci-dessus, la maladie de Parkinson, le diabète, l'arthrose, la cirrhose hépatique, etc. et bien entendu l'insuffisance rénale.

Les solutions thérapeutiques sont aujourd'hui essentiellement symptomatiques : lutter contre les troubles du rythme cardiaque après un infarctus, effectuer des injections d'insuline dans le diabète ou traiter par dialyse dans l'insuffisance rénale. Seule la transplantation d'organe permet à ce jour de guérir ces maladies dégénératives, mais l'on connaît les limites de cette approche, notamment à cause du manque d'organes disponibles pour la transplantation et des contraintes du traitement immunosuppresseur. Mais d'autres pistes thérapeutiques apparaissent, et en particulier la médecine régénérative.

*Représentation du mythe de Prométhée sur un vase ancien*



5

### → Prométhée et la médecine régénérative

Pour avoir donné le feu aux hommes, le titan Prométhée est condamné par Zeus à être enchaîné sur le mont Caucase où un aigle lui ronge le foie toute la journée. La nuit son foie se régénère, c'est en cela que Prométhée est le symbole de la médecine régénérative. Cela laisse supposer que les anciens grecs avaient découvert que le foie est un organe humain qui peut se régénérer en cas de besoin.

## MÉDECINE RÉGÉNÉRATIVE

La médecine régénérative vise à régénérer un tissu endommagé par la maladie ou la vieillesse en remplaçant les cellules qui ne fonctionnent plus, ou qui ont disparues. Deux stratégies peuvent être envisagées. La première est de stimuler les cellules résiduelles de l'organe endommagé pour qu'elles contribuent directement à la réparation. Cette stimulation pourrait être de nature médicamenteuse ou génétique. Dans certaines maladies de la moelle osseuse (l'organe qui fabrique les globules du sang), si celle-ci fonctionne de manière insuffisante, il existe aujourd'hui des médicaments que l'on peut administrer au patient par voie veineuse et qui entraînent une stimulation de la fabrication des globules blancs (G-CSF). C'est un début dans cette voie thérapeutique nouvelle, mais cette stratégie est clairement encore très limitée, ne serait-ce que parce que l'effet du médicament ne dure pas et nécessite des injections régulières : le tissu défaillant est stimulé, mais pas définitivement réparé. La deuxième stratégie de médecine régénérative est l'injection dans l'organe malade de nouvelles cellules, en bonne santé, pour réparer l'organe (le « régénérer »). Il s'agit de la médecine régénérative par thérapie cellulaire, stratégie dans laquelle les cellules sont utilisées comme un médicament sophistiqué pour réparer définitivement un organe. C'est une piste particulièrement prometteuse, qui fait volontiers appel aux cellules souches (voir l'article consacré aux cellules souches) et qui a déjà fait la démonstration de sa faisabilité pour un certain nombre d'organes, ainsi que nous allons le voir dans le chapitre suivant.

## OÙ EN SOMMES-NOUS ?

**Grefe dite de « moelle osseuse ».** Lorsque la moelle osseuse ne fonctionne plus, la vie du patient est menacée à brève échéance en raison d'infections graves, d'une anémie profonde et de saignements incontrôlés. Ceci peut s'observer dans de rares maladies où la moelle dégénère (« aplasies médullaires ») ou dans le cas plus fréquent de l'utilisation à très forte dose de produits de chimiothérapie et de radiothérapie dans le traitement de cancers du sang, notamment les leucémies aiguës. Depuis les années 70 il est possible de régénérer la moelle osseuse par l'injection intraveineuse de cellules souches sanguines (les cellules souches hématopoïétiques). Ces cellules souches, prélevées dans la moelle osseuse chez des donneurs volontaires compatibles ou dans le sang par une procédure particulière appelée apherèse, migrent après injection dans la moelle osseuse et la régénèrent

intégralement. Cette procédure est appelée allogreffe de cellules souches hématopoïétiques, ou « greffe de moelle osseuse » dans le langage courant. C'est le premier exemple de médecine régénérative utilisant des cellules souches. Cette technique est utilisée en routine clinique dans les services spécialisés d'hématologie (1500 greffes en 2009 en France).

**Grefe de peau.** Pour les grands brûlés, il est possible de produire en dehors de l'organisme (on dit « in vitro ») une peau qui, greffée 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 dizaines de cm<sup>2</sup> de peau. Mais la peau régénérée est d'une grande fragilité. Cette réparation reste donc encore insatisfaisante et nécessite des efforts de recherche pour être améliorée.

**Grefe de cartilage.** Il est possible de réparer des lésions localisées du cartilage chez les grands sportifs. Cette approche consiste à mettre en culture in vitro des cellules de cartilage sain, pendant une à deux semaines. Au terme de cette phase de culture, les cellules cartilagineuses se sont multipliées. Elles sont alors greffées pour reconstituer la matrice cartilagineuse du patient. Malheureusement, les protocoles actuels ne s'appliquent pas à la réparation de la lésion la plus commune du cartilage qu'est l'arthrose. L'arthrose pose en effet le problème d'une atteinte sur une vaste surface – il faut que la réparation puisse respecter parfaitement la forme des surfaces articulaires – et de l'altération de l'os sous-jacent, altération qui pourrait expliquer la souffrance du cartilage sus-jacent et qui n'est pas traitée par l'approche détaillée ici.

Ces trois exemples montrent que le concept de médecine régénérative est applicable à des maladies humaines. Mais les exemples de la peau et du cartilage montrent clairement que la route est encore longue pour aboutir à un organe régénéré à neuf et pour pouvoir s'appliquer aux pathologies dégénératives de tous les organes. De très nombreux essais cliniques sont en cours dans le monde entier, faisant intervenir des cellules souches ou d'autres types cellulaires, pour réparer des pathologies aussi variées que l'infarctus du myocarde, la maladie de Parkinson, les maladies dégénératives de la rétine, etc. Seule l'issue de ces essais cliniques pourra

conclure à l'éventuelle pertinence de certaines de ces nouvelles stratégies de thérapie cellulaire.

### APPLICATIONS POSSIBLES AUX MALADIES GÉNÉTIQUES

Le traitement des maladies génétiques pose une double difficulté : il faut réparer le patrimoine génétique du patient (« thérapie génique »), à tout le moins dans l'organe atteint par la maladie génétique, mais de surcroît il faut obtenir cette réparation dans une majorité de cellules de l'organe pour espérer que la réparation se traduise par une amélioration des signes cliniques. Une approche thérapeutique fait intervenir à la fois thérapie génique et thérapie cellulaire. Cette approche a été utilisée avec succès dans des déficits profonds du système immunitaire de l'enfant d'origine génétique, les « bébés-bulles » ainsi nommés car, du fait de la défaillance de leur système immunitaire, ces enfants sont condamnés à vivre dans une « bulle » stérile à l'abri du monde extérieur et de ses virus et bactéries. Le traitement consiste à prélever des cellules souches hématopoïétiques et à les modifier génétiquement en laboratoire pour corriger la mutation génétique responsable du déficit immunitaire. Les cellules souches hématopoïétiques ainsi réparées sont réinjectées à l'enfant, et les cellules réparées se mettent à fabriquer des globules blancs normaux capables de les protéger contre les infections. Ces enfants ont été définitivement guéris et sont sortis de leur bulle, ont pu rejoindre le domicile familial et débiter une scolarité normale ! Cette méthode, qui a été appliquée avec succès à la moelle osseuse, pourrait s'appliquer à d'autres organes.

### QUELLES PERSPECTIVES POUR LE REIN ?

Le rein est un organe à l'architecture très complexe, faisant intervenir un compartiment sanguin sous pression et un compartiment urinaire et des échanges complexes entre ces deux compartiments, sous forme de filtration de l'urine puis d'une réabsorption massive de l'eau et des sels minéraux. Au premier regard, ce n'est pas un organe pour lequel la thérapie cellulaire paraît appropriée : comment des cellules injectées dans cet organe pourraient-elles construire ce subtil agencement qui a été mis en place pendant les tous premiers mois du développement fœtal ? Un optimisme prudent est cependant permis. Il a en effet été rapporté dans la littérature médicale des exemples de régénération d'un rein partiellement lésé. Ces observations, qui ne s'appliquent pas à un rein en état d'insuffisance rénale terminale mais à des

lésions incomplètes, sont la preuve qu'il existe des mécanismes physiologiques de réparation du rein, notamment de la zone profonde (médullaire) du rein. Les glomérules ne peuvent malheureusement pas se régénérer. Cependant, dans des modèles d'animaux moins développés comme le poisson, des phénomènes de régénération plus poussés (« néonéphrogénèse ») sont bien connus et laissent ouvert l'espoir que l'on puisse retrouver ces propriétés primitives de régénération pour traiter les pathologies dégénératives rénales chez l'homme, notamment par des méthodes de thérapie cellulaire. Ce sujet de recherche est encore très peu développé. Le développement récent des cellules souches embryonnaires humaines et des cellules reprogrammées (« iPS ») (voir l'article sur les cellules souches) permet pour la première fois d'envisager de modéliser le développement normal du tissu rénal in vitro et de produire des cellules qui pourraient être capables de contribuer à la régénération du rein.

### CONCLUSION

Après la chirurgie et l'hygiène au XIX<sup>ème</sup> siècle, les médicaments au XX<sup>ème</sup> siècle, la médecine régénérative pourrait être la nouvelle révolution médicale du XXI<sup>ème</sup> siècle. Les exemples de médecine régénérative déjà existants et cités ci-dessus prouvent la faisabilité de cette approche. Il existe d'ailleurs de nombreux exemples de maladies développées par des animaux de laboratoire, qui sont semblables aux maladies humaines et que l'on a pu soigner grâce à des approches de médecine régénérative : maladie de Parkinson, diabète, infarctus du myocarde, myopathies, etc. Mais il est essentiel de garder à l'esprit que le temps qui sépare un nouveau concept de traitement médical (par exemple régénérer les cellules d'un rein endommagé par injection de nouvelles cellules « réparatrices ») et son application en routine à des patients peut être très long, jusqu'à requérir parfois plusieurs dizaines d'années. Les pistes que nous venons d'évoquer sont donc de réels espoirs mais qui demanderont un effort de recherche considérable. ■

Pour plus d'information sur la Médecine régénérative, les thérapies cellulaires et géniques, les cellules souches, nous vous invitons à lire le dossier « Biothérapies : les thérapies cellulaires et géniques » rédigé par les Pr. B. Klein et J. De Vos :  
→ <http://minilien.fr/a0m4r5>  
→ <http://minilien.fr/a0m4r6>

## → LES CELLULES souches

. JOHN DE VOS - Responsable de l'Unité de Thérapie Cellulaire - Département Biothérapies  
Pôle Biologie-Pathologie - Hôpital Saint-Eloi - CHU de Montpellier

Nous avons parlé à propos de la médecine régénérative des millions de milliards de cellules qui composent l'organisme. Ces cellules sont pour la plupart très spécialisées, afin d'assurer une fonction très précise dans l'organisme. Les cardiomyocytes sont ainsi les cellules musculaires responsables de la contraction rythmique du muscle cardiaque. Un autre exemple est le globule rouge, spécialisé dans le transport de l'oxygène dans le sang. Or la plupart de ces cellules spécialisées ont perdu la capacité de se multiplier. Quand elles finissent par mourir – les globules rouges par exemple ne vivent que 120 jours – elles doivent être remplacées par de nouvelles et jeunes cellules. Nous allons voir comment les cellules souches jouent un rôle essentiel dans la naissance de nouvelles cellules de l'organisme, et comment ces propriétés pourraient être utilisées pour la régénération de tissus endommagés par la maladie.

### LES CELLULES SOUCHES

Le corps humain n'est pas constitué que de cellules hautement spécialisées (« différenciées », cf. infra) comme le globule rouge, incapable de se multiplier : si c'était le cas, les tissus ne pourraient pas se régénérer ! Il existe également des cellules « indifférenciées », responsables de la fabrication de nouvelles cellules spécialisées : ce sont les cellules souches.

- **Cellule différenciée** : cellule ayant une fonction déterminée, associée à un tissu ou un organe : par exemple, globule rouge, cardiomyocyte, cellules de la peau (voir *différenciation*).
- **Cellule indifférenciée** : par opposition à une cellule différenciée, cellule sans fonction déterminée, autre que de survivre, proliférer et se différencier en cellule différenciée. Les cellules souches sont des cellules indifférenciées.
- **Différenciation** : processus par lequel une cellule immature (*cellule indifférenciée*) se transforme en cellule spécialisée (*cellule différenciée*) capable d'assurer certaines fonctions dans un organe.

Une **cellule souche** est une cellule indifférenciée particulière 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.
- les *cellules souches unipotentes* qui ne génèrent qu'un seul type cellulaire différencié : les cellules souches dites « satellites » du muscle squelettique ne sont capables de former que des cellules musculaires.
- les *cellules souches multipotentes* qui sont capables de générer plusieurs types cellulaires différenciés : par exemple, les cellules souches sanguines (« hématopoïétiques ») sont capables de former des globules rouges, des plaquettes, ainsi que tous les types de globules blancs du corps humain : lymphocytes, polynucléaires et monocytes.
- les *cellules souches pluripotentes* qui sont capables de générer tous les types cellulaires différenciés de l'organisme adulte : les seuls exemples unanimement reconnus par la communauté scientifique sont la *cellule souche embryonnaire (CSE)* et la *cellule souche pluripotente induite (iPS)*.

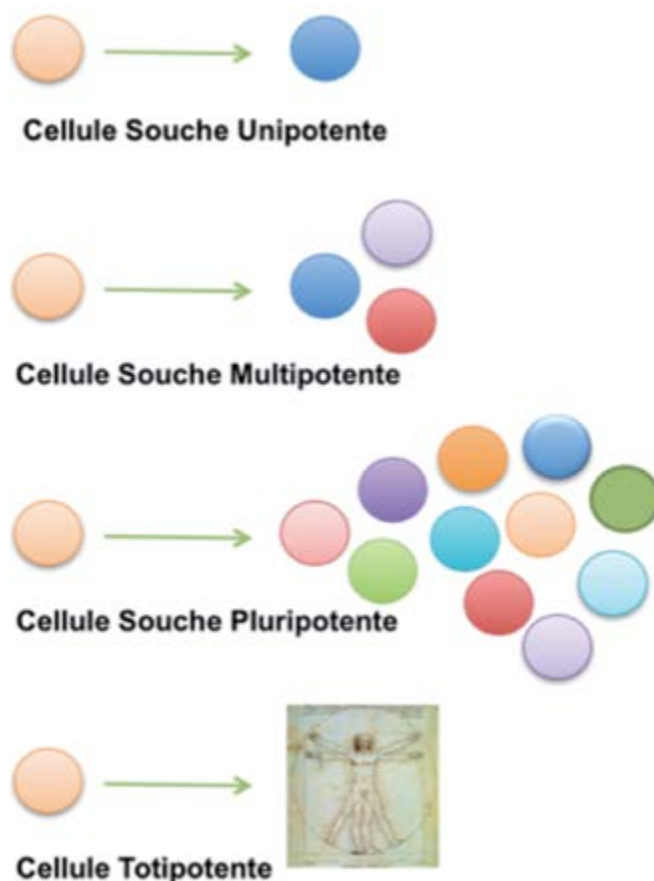




Potentiels de différenciation des PSCs et par extension leur potentiel thérapeutique

- les cellules **totipotentes** qui sont capables de générer un être humain entier à partir d'une seule cellule. Le seul exemple connu de cellule totipotente est l'ovocyte fécondé et les cellules (*blastomères*) qui en sont issues par division cellulaire, après une division (embryon au stade deux cellules) ou après deux divisions (embryon au stade de quatre cellules). La démonstration naturelle de la propriété de totipotence est apportée par la naissance des « vrais » jumeaux (les jumeaux « monozygotes ») et par les très rares quadruplés monozygotes rapportés dans la littérature médicale. Les cellules totipotentes ne sont pas des « cellules souches » car elles ne s'autorenouvellent pas. En effet, elles perdent très vite (une ou deux divisions cellulaires) leur propriété de totipotence.

**Figure 1 :** Les différents types de cellules souches (disques orange pâle) en fonction de leur capacité à générer un ou plusieurs types de cellules différenciées (chaque type de cellule différenciée est représenté par un disque de couleur différente). Les cellules totipotentes peuvent générer un organisme entier, mais ne sont pas des cellules souches.



## LES CELLULES SOUCHES ADULTES

Chez l'adulte, il n'existe pas de cellules souches pluripotentes. On n'observe que des cellules souches unipotentes ou multipotentes, dont les propriétés de différenciation sont en général restreintes à la fabrication des cellules spécialisées de l'organe dans lequel elles se trouvent. Par exemple, les cellules souches dites « *hématopoïétiques* », que l'on trouve dans la moelle osseuse, ne sont capables que de fabriquer des cellules sanguines (les globules). On peut regrouper ces cellules souches unipotentes et multipotentes de l'adulte sous le terme générique de *cellules souches adultes*. Ce type de cellules souches peut avoir des applications médicales, par exemple l'utilisation des cellules souches hématopoïétiques pour traiter des patients atteints de cancers sévères comme des leucémies aiguës par « greffe de moelle osseuse ». Dans le rein, l'existence de cellules souches reste malheureusement hypothétique, et le potentiel limité des cellules souches adultes ne permet pas d'utiliser des cellules souches d'un autre organe pour le régénérer : il n'est par exemple pas possible de prendre des cellules souches hématopoïétiques pour soigner une insuffisance rénale.

## LES CELLULES SOUCHES EMBRYONNAIRES

Pour envisager de réparer un tissu endommagé par l'ajout de nouvelles cellules (thérapie cellulaire), la cellule idéale serait une cellule qui aurait la capacité de se transformer en n'importe quelle cellule (cellule souche pluripotente) de façon à pouvoir réparer un dommage cellulaire dans n'importe quel organe. Les cellules souches embryonnaires humaines (CSEh) ont été les premières cellules souches pluripotentes obtenues chez l'homme de manière reproductible.

Les CSEh sont obtenues par mise en culture de la masse cellulaire interne de l'embryon du stade « blastocyste » (aux environs du 5<sup>ème</sup> jour du développement humain). Cette technique a tout d'abord été développée chez la souris en 1981 et cette découverte a valu le prix Nobel de médecine en 2007 à l'Anglais Martin Evans. En 1998, l'équipe de l'Américain James Thomson a montré que l'on pouvait également obtenir des cellules souches embryonnaires chez l'homme à partir d'embryon humain. En culture, les cellules de la masse cellulaire interne continuent de proliférer intensément. Si l'on prend soin de changer quotidiennement le milieu de culture et de repiquer une fois par semaine les CSEh en divisant les colonies en plus petits morceaux, cette prolifération est infinie. Ce sont là deux propriétés cardinales des

CSEh : prolifération intense, prolifération infinie. Les CSEh sont d'autre part capables de se différencier en n'importe quel type de cellule, à condition de les mettre dans des conditions de culture particulière.

Les CSEh sont capables de donner naissance à n'importe quel type cellulaire. Qu'est-ce que cela signifie ? En pratique, à tout moment de la culture des CSEh, au départ ou après plusieurs années, il suffit de changer les conditions de culture pour induire une différenciation des CSEh. Ces nouvelles conditions de culture sont décrites dans un « *protocole de différenciation* ». Le protocole est similaire à une recette de cuisine et indique tous les détails qu'il faut appliquer pour obtenir la cellule de votre choix : milieu de culture, facteurs de croissance, support de culture, etc. Le choix du protocole conditionne la direction de la différenciation : certains protocoles induisent la production de cellules sanguines, d'autres des cellules nerveuses, d'autres encore des cellules du rein, etc. Il est par exemple relativement aisé d'obtenir *in vitro*, dans une boîte de Pétri, des amas de CSEh qui se sont différenciées en cellules du cœur (« cardiomyocytes ») et qui battent de manière synchrone, à la manière du cœur !

Ainsi, le potentiel des cellules de la masse cellulaire interne de l'embryon, capables de fabriquer tous les organes de l'organisme, est conservé dans les CSEh, capables de générer tous les types cellulaires et tissus *in vitro*. Les CSEh sont bien un concentré de promesses pour la thérapie cellulaire et la médecine régénérative ! Comme les CSEh sont capables de croître abondamment et sans limites, elles sont une source illimitée de cellules neuves : des cellules médicaments que l'on pourra injecter dans un organe malade qui a perdu une partie ou la totalité de ses cellules d'origine. Une observation prometteuse a été réalisée par des chercheurs : les CSEh peuvent se différencier en cellules rénales. Bien que les cellules obtenues ne soient pas identiques aux cellules rénales adultes, ces cellules dérivées des CSEh sont relativement indifférenciées et ressemblent plus à des cellules fœtales.

Cependant, les CSEh posent deux problèmes : (1) Des problèmes éthiques, car la production de CSEh nécessite la destruction d'embryons humains. Cette problématique est minimisée par le fait qu'au cours des procédures de fécondation *in vitro*, des embryons sont régulièrement détruits. En effet, chaque année des milliers d'embryons sont détruits dans le cadre du traitement de l'infertilité : ce sont des embryons

produits en excès, ou de mauvaise qualité. Si les parents le souhaitent, dans le cadre de la loi française, ces embryons peuvent être donnés en vue d'une recherche pour la production de CSEh. (2) L'administration de cellules étrangères à un patient, comme la greffe d'un organe étranger, nécessite l'administration d'un traitement immunosuppresseur à cause de l'incompatibilité immunologique. L'utilisation des cellules du patient lui-même serait préférable à l'utilisation de CSEh issues d'un embryon reconnu comme étranger par le système immunitaire.

### LA REPROGRAMMATION CELLULAIRE

Il n'existe pas de cellule souche pluripotente chez l'adulte. Au cours du développement de l'embryon, les cellules souches pluripotentes se différencient, et chez l'adulte ne cohabitent plus que des cellules différenciées et des cellules souches adultes (cf. supra). En revanche, une équipe japonaise de l'université de Kyoto, dirigée par le Pr Shinya Yamanaka, a rapporté en 2006 la possibilité de créer dans un tube à essai des cellules souches pluripotentes à partir de cellules différenciées. Cette technique est appelée *reprogrammation cellulaire* car elle reprogramme totalement la nature d'une cellule. La reprogrammation cellulaire fait appel à l'expression forcée de quatre gènes et permet de générer des « cellules souches pluripotentes induites » (en anglais : induced pluripotent stem cells) dont l'acronyme consacré est « *iPS* ».

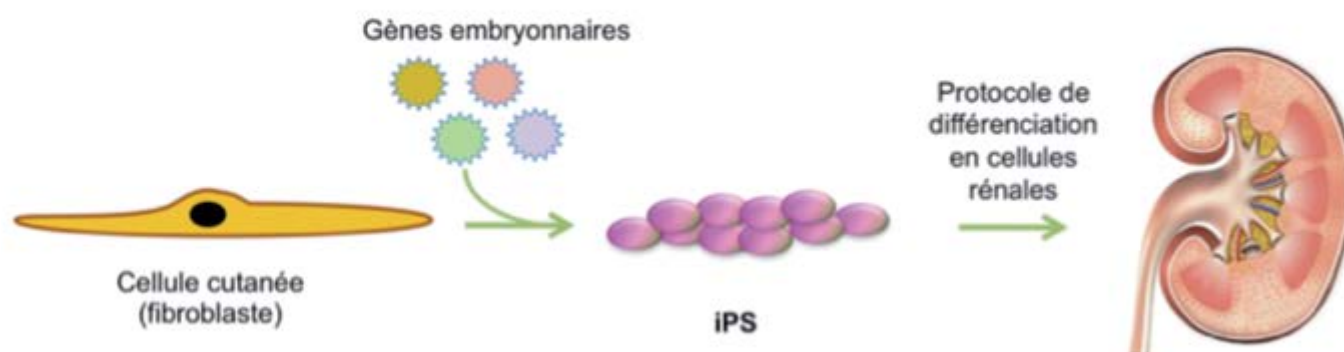
Ces résultats ont rapidement été reproduits par d'autres groupes internationaux et les résultats initiaux obtenus sur des cellules de souris ont été étendus à des cellules humaines. La relative simplicité de la procédure – la technique est parfaitement reproductible

- et les enjeux scientifiques et médicaux extraordinaires expliquent l'explosion de la recherche sur les iPS dans les laboratoires autour de la planète.

**Quels sont les enjeux ? Le principal enjeu est d'obtenir des cellules souches pluripotentes indépendamment des CSEh. Par rapport aux CSEh, voici les avantages de la technologie iPS :**

- permet d'obtenir des cellules souches pluripotentes à partir des cellules d'un patient, quel que soit son âge ou sa maladie : ceci ôte en particulier le problème de l'incompatibilité immunologique entre une lignée de CSEh et un patient, puisqu'on pourra imaginer traiter un patient avec ses propres iPS
- ne nécessite pas de détruire un embryon humain
- permet d'envisager d'obtenir des cellules souches pluripotentes à partir de n'importe quel individu, y compris des patients porteurs d'anomalies génétiques : dans ces cas-là, la lignée d'iPS sera aussi porteuse de l'anomalie et pourra servir d'étude pour comprendre et développer de nouveaux traitements.

La technologie iPS permet donc de rajeunir les cellules d'un patient, et une fois que ces cellules sont au stade iPS, c'est à dire un stade embryonnaire, de les faire différencier dans le type cellulaire désiré. Il est donc possible aujourd'hui de partir de cellules de la peau (par exemple des fibroblastes cutanés), de les reprogrammer en iPS, et ensuite de différencier ces iPS en cellules cardiaques. Autrement dit il est en 2012 assez facile de transformer des cellules de la peau en cœur !! (voir Figure 2).



**Figure 2 :** Comment la technologie des iPS permet de reprogrammer des cellules de la peau (fibroblastes) en iPS, qui à leur tour peuvent être différenciées en cellules cardiaques spontanément battantes in vitro: la technologie des iPS est la pierre philosophale de la biologie !

La médecine régénérative cherchait une source de cellules jeunes, capables de repeupler et de faire fonctionner à nouveau un organe endommagé par la maladie ou la vieillesse ? Les iPS sont une source théoriquement très séduisante de cellules médicament à cet usage.

**Cependant, ces cellules au profil idéal présentent un certain nombre de limites qui expliquent qu'il faudra plusieurs années avant que des iPS ne soient utilisées en thérapeutique :**

- Les iPS sont, comme les CSEh, des cellules souches pluripotentes et présentent donc les mêmes inconvénients, dont la propension, du fait de leur prolifération intense, à former des tumeurs non malignes (tératomes). Comme pour les CSEh, il sera impératif de sélectionner les cellules différenciées obtenues avant une injection aux patients.

- Il faudra également bien définir le stade de différenciation que les iPS devront atteindre pour former des cellules médicament efficaces (ne pas injecter des cellules du foie dans le rein, ou des cellules fœtales de rein dans le rein adulte !)
- Un problème spécifique aux iPS est lié à leur intégrité génétique. En effet, le protocole de reprogrammation actuel endommage le patrimoine génétique des cellules reprogrammées, ce qui pourrait en théorie se traduire par un risque accru de cancer. De nouvelles techniques sont en développement qui ne présenteraient pas ces inconvénients.

Ces réserves n'enlèvent rien aux promesses des iPS, elles rendent compte de la réalité et des obstacles que les médecins doivent affronter avant de pouvoir proposer à leurs patients de nouveaux traitements.

## OÙ EN SOMMES-NOUS ?

Les premiers essais cliniques utilisant des CSEh ont commencé aux Etats-Unis et en Corée du Sud. Ils concernent essentiellement la réparation de l'œil au cours des maladies dégénératives liées à l'âge ou des maladies génétiques de l'œil. Une équipe japonaise promet le démarrage d'un essai clinique de traitement de maladies de l'œil à base de cellules dérivées d'iPS dès 2013. Malheureusement, la recherche dans ce domaine pour les cellules rénales est moins avancée que pour l'œil, et aucun essai clinique n'est prévu pour le moment dans ce domaine.

## CONCLUSION

Les cellules souches, dans le cadre de la médecine régénérative, sont un **réel espoir** pour le traitement de maladies dégénératives aujourd'hui incurables. Pour de nombreux organes dont les cellules souches sont inaccessibles (cerveau), ou mal ou pas décrites (rein), les pistes les plus prometteuses sont celles utilisant des CSEh ou des iPS. Cependant, **il ne faut pas se tromper sur le calendrier**. Ces traitements demandent des années, voire des dizaines d'années pour se développer et mûrir avant d'atteindre de réelles applications cliniques. ■





Alexandre Hertig

## → LES PERSPECTIVES pour les maladies rénales génétiques

ALEXANDRE HERTIG - UPMC, Sorbonne Universités, Paris

**Chaque année en France, parmi les 2 à 3 millions de personnes souffrant d'une maladie rénale, tous stades confondus, ce sont environ 10 000 patients qui parviennent au stade terminal de l'insuffisance rénale (chiffres issus des rapports annuels publics du registre REIN : Réseau, Epidémiologie, Information, Néphrologie). Pour eux, aujourd'hui, il n'existe qu'une seule alternative : la dialyse ou la transplantation rénale. Et encore la greffe n'est-elle pas la panacée, puisque la médiane de la durée d'un greffon est actuellement de l'ordre de 12 ans seulement, après quoi il faut soit reprendre la dialyse, soit être à nouveau greffé.**

La majorité des malades en insuffisance rénale terminale aura perdu sa fonction rénale progressivement, à cause d'une pathologie vasculaire chronique (hypertension artérielle, et/ou diabète) ou d'une maladie inflammatoire. Même si ces patients-là sont l'exemple de l'échec d'une approche thérapeutique conventionnelle (par exemple, par le traitement de l'hypertension artérielle, la correction du diabète, ou la prescription d'un traitement immunosuppresseur), il est improbable qu'ils soient les meilleurs candidats à une approche non conventionnelle, visant à régénérer le rein (et donc à restaurer une fonction rénale) par l'administration de cellules souches. En tout cas ils ne seront pas les premiers candidats, car un rein détruit par une maladie chronique est un rein fibreux, cicatriciel, qui n'est pas a priori un terrain propice à une régénérescence.

Une minorité de patients (moins de 10%), mais une minorité nombreuse compte tenu de la prévalence générale des maladies rénales, développe lentement mais sûrement une insuffisance rénale en raison d'une mutation constitutionnelle de leur code génétique. La maladie la plus fréquente est la polykystose rénale, qui est causée par la mutation d'un gène codant pour une protéine exprimée sur le cil primaire. Ce dernier est une sorte de poil unique dressé à la surface de toutes nos cellules ou presque.

Dans le rein, schématiquement, l'urine est formée en filtrant le plasma dans des structures vasculaires microscopiques qu'on appelle des glomérules, et le produit de la filtration est traité et acheminé vers l'extérieur par de longs tuyaux microscopiques eux aussi, que l'on appelle des tubules. Lorsque le cil des tubules fonctionne mal à cause d'une mutation, des kystes – petites poches contenant du liquide – apparaissent avec l'âge, qui petit à petit déforment les reins et les détruisent littéralement. Une autre maladie est la maladie d'Alport, où une mutation sur le gène codant pour le collagène aboutit à une inflammation chronique des glomérules.

C'est, à notre avis, pour ces deux catégories de patients, dont le diagnostic est établi longtemps avant la détérioration de la fonction (parfois plusieurs décennies avant), que les cellules souches devront d'abord montrer leur efficacité pour avoir un avenir en médecine. Il faut y rajouter certains patients nés sans mutation mais dont l'ADN des cellules rénales a été endommagé de façon irréversible par des produits de chimiothérapie, et qui se retrouvent brutalement sans fonction rénale. Pour tous ceux là, l'intérêt de fournir des cellules « souches » (capables de régénérer un système de cellules rénales) et génétiquement indemnes est évident. Mais avant de discuter des différentes cellules souches qui offrent une perspective thérapeutique, il faut expliquer la façon qu'a le rein de se régénérer spontanément, « naturellement », après une agression.

### REGENERATION NATURELLE DES REINS APRES UNE AGRESSION

Pour certains organes ou ensemble de cellules (le sang, la peau, l'intestin), la mort est un évènement quotidien et massif, et le renouvellement est logiquement assuré par des cellules souches. Par exemple, un globule rouge ne vit que quatre mois, un globule blanc parfois seulement 24 heures, et notre moelle osseuse est remplie de progéniteurs qui assurent constamment leur renouvellement, dans ce cas précis pour assurer

le transport de l'oxygène et la défense contre les bactéries, respectivement. Dans le rein, la situation est très différente. L'épithélium, c'est-à-dire le tissu de cellules qui borde les glomérules et les tubules, a une espérance de vie très longue (on doit à la vérité de dire que ce temps « très long » n'est pas précisément connu), et le renouvellement est assuré à un rythme très lent par les cellules voisines, survivantes. En d'autres termes, le principe selon lequel il serait possible de régénérer le tissu rénal par des cellules souches est un principe par définition « artificiel ». Mais cela n'exclut pas, bien sûr, qu'il soit efficace. Nous allons maintenant discuter des observations qui ont justifié que l'on explore le potentiel thérapeutique de cellules « souches » pour les maladies rénales.

## OBSERVATIONS A L'ORIGINE D'UN ESPOIR SUR L'INTERET DE CELLULES SOUCHES POUR LA REGENERATION DU TISSU RENAL

A la fin des années 1990, il a été rapporté par une équipe de Pittsburgh aux Etats-Unis que des cellules dérivées de la moelle osseuse pouvaient être localisées dans le foie, et s'être différenciées en cellules du foie, dans un modèle animal d'agression hépatique. Dans la foulée, un groupe de New-York a montré qu'il était possible de trouver des cellules « mâles » (ayant un chromosome Y) dans le foie malade (hépatite C, cirrhose) de femmes autopsiées après qu'elles ont reçu une greffe de moelle d'un donneur de sexe masculin pour traiter une maladie sanguine. Ces cellules mâles exprimaient des marqueurs caractéristiques des hépatocytes, c'est-à-dire de cellules différenciées en cellules du foie. Cette observation était significative, au-delà de la preuve de concept, car la proportion d'hépatocytes dérivés de la moelle osseuse était grande, au maximum de 43%. Partant, il était raisonnable de postuler que le rein pourrait lui aussi bénéficier du potentiel « régénératif » de cellules souches dérivées de la moelle osseuse. Et de fait, l'examen de reins féminins transplantés à des hommes en insuffisance rénale terminale a permis de faire une observation très similaire : jusqu'à 20% de cellules épithéliales des tubules ont en leur sein un chromosome Y, c'est-à-dire que le rein féminin a été « colonisé » (réparé ?) par des cellules qui initialement n'étaient pas rénales mais extra-rénales. Ces travaux ont suscité un vif enthousiasme dans la communauté scientifique, et à l'évidence un fort espoir dans la population des malades. Cet enthousiasme a cependant été refroidi lorsque des techniques plus élaborées (étude au microscope confocal, ou encore au microscope 3D à déconvolution) ont été utilisées

pour confirmer chez l'homme ces observations, et aussi lorsque des modèles animaux employant des rongeurs génétiquement manipulés ont été utilisés pour permettre de « voir » l'incorporation de cellules extra-rénales dans le rein, et leur différenciation en cellules rénales. Ces données là, publiées au milieu des années 2000, ont finalement conclu qu'une toute petite fraction de cellules dérivait de cellules souches dérivées de la moelle osseuse dans un rein malade : moins de 1%. Cela confirme, comme expliqué plus haut dans les conditions physiologiques, que la capacité du rein à se régénérer en conditions pathologiques repose naturellement et, disons, à 99%, sur les cellules rénales survivantes ou génétiquement indemnes. Un contre-exemple est rarement cité, qui est qu'une maladie rénale génétique ne récidive jamais sur un greffon rénal. Or, si les cellules d'un receveur atteint de polykystose rénale par exemple, pouvaient coloniser le greffon d'un donneur évidemment indemne de mutation, il serait probablement observé des kystes dans ce même greffon : à notre connaissance, cela n'a jamais été rapporté et le dogme est que les maladies rénales génétiques ne récidivent jamais sur un greffon qui ne porte pas la mutation génétique.

Il faut ici discuter un point un peu technique, mais qui relativise encore l'observation, même marginale, que des cellules rénales soient pleinement dérivées de cellules de la moelle osseuse : il est possible que les images observées reflètent peut-être non pas une différenciation, mais une fusion de deux types cellulaires (cellule souche et cellule épithéliale).

Ceci étant dit, il n'est pas exclu, encore une fois, qu'il soit possible dans le futur de forcer la nature en injectant des cellules souches en contexte pathologique. Ici, pas d'exemple en médecine humaine, bien sûr, mais des données ont été publiées chez l'animal, que nous allons maintenant expliquer.

## INTERET DE CELLULES SOUCHES « MEDICAMENT » DANS LES MALADIES RENALES GENETIQUES : LA PREUVE PAR LES MODELES ANIMAUX

A notre connaissance, il existe un seul exemple chez l'animal qu'un modèle de polykystose rénale puisse être atténué, ou que le rein polykystique puisse être réparé, par l'injection de cellules dites « souche ». Ainsi, le groupe de Takashi Tada au Japon a réussi à réduire la fréquence des kystes rénaux chez des souris portant la mutation pathogène, en leur injectant

au tout premier stade embryonnaire des cellules souches pluripotentes de type iPS (voir plus loin) au sein desquelles la mutation avait été spontanément effacée grâce à des phénomènes naturels mais rares de recombinaison homologe. Il faut maintenant attendre que ces premiers résultats prometteurs soient reproduits par des équipes indépendantes.

Des travaux plus nombreux sont disponibles pour le modèle murin de la maladie d'Alport. Ils sont très contradictoires.

En 2006, deux groupes, l'un en Angleterre, l'autre aux Etats-Unis, ont rapporté que l'injection de cellules dérivées de la moelle osseuse aboutissait à l'incorporation de ces cellules dans les glomérules de souris ayant une prédisposition génétique à la maladie d'Alport, à leur différenciation en podocytes (cellules épithéliales du glomérule) et à leur fabrication du collagène manquant.

Ces deux études ont là aussi soulevé un énorme enthousiasme, mais il faut expliquer deux points qui les privent d'une portée immédiate chez l'homme. D'une part, les auteurs n'ont pas rapporté que les cellules souches retardaient la survenue de l'insuffisance rénale terminale (qui est un critère dur d'efficacité, et le seul susceptible d'intéresser les malades) et d'autre part, une étude effectuée par un groupe indépendant a démontré que l'effet bénéfique était probablement lié à l'irradiation corps entier que les souris avaient subies avant l'injection.

Cette irradiation a été en effet utilisée chaque fois, pour remplacer la moelle native par une moelle génétiquement intacte et ainsi faire en sorte que les cellules souches circulantes soient toutes capables de régénérer un tissu. Il n'est pas certain que cette irradiation était nécessaire, chez la souris en tous cas, puisque les souches de souris utilisées sont souvent « syngéniques », mais c'est le protocole qui a été suivi. Dans un article d'une violence exceptionnelle pour une revue scientifique, intitulé « the hype beyond the hope » (littéralement, chic et branché mais à l'origine de faux espoirs) un consortium d'experts de la maladie d'Alport a ensuite reproché aux deux premières équipes d'avoir inutilement suscité de l'espoir chez les patients porteurs de cette mutation.

Une des deux équipes a réagi en répétant l'expérience mais sans irradiation, et en étudiant la survie rénale (qui était prolongée). La controverse n'est pas encore éteinte, mais au jour d'aujourd'hui, il est juste de dire que l'effet bénéfique des cellules dérivées de la moelle osseuse pour réparer le rein au cours des maladies rénales génétiques n'a pas été unanimement observé par des équipes indépendantes.



Il faut maintenant discuter de deux autres sources potentielles de cellules souches : les cellules souches dérivées du liquide amniotique (appelées ASF pour Amniotic Fluid derived Stem cells, et les cellules pluripotentes générées à partir de cellules différenciées (appelées iPS pour induced Pluripotent Stem cells), isolées à partir des patients eux-mêmes. Il va de soi que cette stratégie ne concerne pas les patients souffrant de maladie rénale d'origine génétique, puisque les mutations à l'origine des maladies rénales sont présentes dans tous les types cellulaires, rénales comme souches. Ici, le concept est de tenter une réparation rénale ou sa régénération en réinjectant des cellules « souches » intactes, mais autologues (ne venant pas d'un donneur extérieur).

## LES CELLULES SOUCHES DU LIQUIDE AMNIOTIQUE

Environ 1% des cellules circulant dans le liquide amniotique ont en fait la propriété de se diviser de façon clonale et ont une forte capacité à se différencier en de nombreux types cellulaires (on parle de pluripotence). Une seule étude publiée en 2010 a montré que ces AFS pouvaient incorporer les tubules (et se différencier) dans un modèle de nécrose tubulaire chez la souris. Il est important de noter que l'injection à but thérapeutique d'AFS était réalisée deux heures après l'agression.

Leur effet a été très bénéfique, avec une forte atténuation de l'insuffisance rénale. Il est donc permis de penser qu'il serait utile, dès aujourd'hui, de collecter à la naissance les AFS de chaque individu, pour les stocker, pour le cas où, dans la vie future de cet individu, le problème se pose d'une défaillance d'organe, aiguë ou chronique, qu'il faudrait corriger. Les données sont encore très rares, et rien ne dit que cette stratégie sera payante, mais la question est bel et bien posée.

## LES CELLULES IPS

Il n'y a encore que très peu de preuve chez l'animal, et aucune chez l'homme évidemment, que les iPS peuvent aider à la régénérescence rénale, mais c'est une véritable source d'espoir. La technologie iPS consiste à restaurer un état de pluripotence à partir de cellules adultes et différenciées (extraites par exemple de la peau, ou d'autres types de cellules), par transgénèse, et souvent à l'aide de vecteurs viraux.

Ce n'est pas le lieu pour discuter des difficultés, et des dangers, liés à cette technologie, mais en théorie, il est envisageable que l'on parvienne dans le futur à créer des cellules ayant un potentiel de différenciation

en cellules rénales, à partir de cellules non rénales, pour le cas où ces dernières auraient été détruites, et dans l'objectif de recréer du tissu rénal sain.

## CONCLUSIONS

C'est avec un enthousiasme encore modéré que l'on appréhende aujourd'hui les perspectives de thérapie cellulaire pour la régénérescence rénale, a fortiori dans le contexte de maladies génétiques. Pour l'instant, il n'y a pas de preuve indiscutable que les cellules souches, quelque soit leur origine ou leur mode de fabrication, puissent intégrer une structure rénale pathologique, et s'y différencier en cellules rénales fonctionnelles au point de rétablir une fonction rénale efficace. Les cellules souches dérivées de la moelle font déjà l'objet d'essais cliniques, pour tester leur sécurité d'utilisation, et dans le but de prévenir l'insuffisance rénale aiguë au décours de la chirurgie cardiaque.

Ces essais seront examinés avec énormément d'attention. Ils postulent que ces cellules pourraient, par un effet paracrine (exercé depuis une distance relativement proche des structures endommagées, mais pas en leur sein), aider à la régénérescence. Il est encore permis d'espérer que des progrès seront réalisés qui augmenteront le potentiel de cellules souches à intégrer tout de même le rein, et à le réparer.

Dans cette perspective, la question est posée (pas seulement pour le rein, mais pour tous les organes, y compris pour la moelle elle-même) de l'intérêt de prélever et stocker à vie les cellules souches circulant dans le sang du cordon d'un individu à sa naissance, pour le cas où la technologie serait disponible à l'avenir pour réparer un rein, un foie, ou guérir une leucémie survenant chez ce même individu. Enfin, imaginer que l'on puisse prélever une cellule souche ou rendue souche, y corriger une mutation génétique, et la réimplanter pour régénérer un rein ou un autre organe, relève aujourd'hui de la science-fiction. Mais qui sait... ■

## Correspondance

Pr. Alexandre Hertig

Urgences Néphrologiques et Transplantation Rénale  
Hôpital Tenon, 4 rue de la Chine, 75020 Paris, France

Tel : 01 56 01 66 95 - Fax : 01 56 01 79 68

Email : alexandre.hertig@tnn.aphp.fr





Pr Georges MOURAD

## → LE CHIMERISME : une voie vers l'émancipation des traitements immunosuppresseurs post-transplantation

. PR GEORGES MOURAD - Service de Néphrologie, Dialyse et Transplantation,  
Hôpital Lapeyronie, 34295 Montpellier 05

### Les transplantateurs ont toujours rêvé du « Graal » (vase sacré) de la transplantation : établir une tolérance immune !

De quoi s'agit-il ? Il s'agit de trouver une procédure qui fasse que le greffon soit bien toléré, à long terme, sans médicament immunosuppresseur, cependant que le système immunitaire du receveur continue à réagir normalement aux autres agents exogènes, comme les agents infectieux (tolérance spécifique). Cette recherche est toujours d'actualité car on constate avec déception que les immunosuppresseurs au long cours, s'ils permettent de réduire l'incidence des rejets aigus, ont des effets secondaires très délétères à long terme : non seulement ils sont toxiques pour les reins, mais ils favorisent le développement de cancers, en particulier ceux induits par des virus. En 2012, les deux grandes causes de mortalité du transplanté sont d'une part les maladies cardio-vasculaires (40 % des cas) et d'autre part les maladies cancéreuses (35% des cas).

Alors que la tolérance est relativement facile à obtenir dans les modèles expérimentaux chez le rat ou la souris, elle s'est révélée extrêmement difficile à établir chez l'homme. Grâce au travail acharné des équipes de Boston (David Sachs et Meygan Sykes) et de Denver (Thomas Starzl) durant les années 1990 et 2000, on a pu établir que l'un des principaux phénomènes permettant d'établir une tolérance spécifique était « le chimérisme mixte », c'est-à-dire la coexistence chez le receveur de deux populations de cellules immunitaires, les unes étant celles du receveur et les autres provenant du donneur de l'organe greffé. En effet, l'équipe de Boston a pu induire une tolérance chez l'animal (porc) en associant une mini-greffe de moelle osseuse (à partir du donneur) avec une irradiation du thymus et un traitement par cyclosporine administrée par voie intraveineuse pendant 12 jours : les cellules de la moelle osseuse du donneur persistaient chez le

receveur, réalisant le « chimérisme mixte » recherché. Quelques années plus tard, l'équipe de Starzl, étudiant des patients transplantés du foie et ayant totalement arrêté le traitement immunosuppresseur et n'ayant présenté aucun rejet ou altération de la fonction du greffon, s'est aperçue que ces patients avaient des cellules hématopoïétiques originaires du donneur (microchimérisme mixte). Ils ont postulé que le greffon hépatique contenait probablement des cellules souches hématopoïétiques originaires du donneur, et que la persistance de ces cellules induisait la tolérance. La voie était donc ouverte pour l'utilisation de cellules souches, en particulier de la moelle osseuse, pour induire la tolérance chez l'homme. Les équipes de Stanford et de Boston avaient, ces dernières années, développé des programmes de transplantation rénale sans immunosuppression chez des patients recevant des greffons de donneurs vivants HLA identiques ou semi-identiques, combinés à une mini-greffe de moelle ou greffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH). De nouveaux résultats encourageants ont été rapportés au dernier congrès de la Société américaine de Transplantation à Boston.

En effet, les équipes de Chicago et Louisville ont rapporté à leur tour dans une étude de phase II, leur expérience de greffe rénale à partir de donneurs vivants, avec induction de tolérance, chez des patients HLA-incompatibles avec leur donneur. Dix-sept patients recevant un rein de donneur vivant ont été inclus. Ils ont reçu dans un premier temps un conditionnement et un jour après la transplantation rénale une greffe de cellules souches hématopoïétiques associée à une injection de cellules facilitantes pour la greffe des CSH afin d'éviter la réaction du greffon contre l'hôte (GvH). Le traitement d'entretien était composé de tacrolimus et de mycophénolate mofétil sans stéroïdes (voir note en fin d'article pour plus de précision sur le protocole suivi). Une seule perte de greffon rénal a été observée. Tous les patients sauf un ont développé un chimérisme

délectable dans le sang périphérique un mois après la transplantation. Le seul échec a été observé chez le patient le plus immunisé (PRA = 52 %). Parmi les huit patients ayant au moins 18 mois de suivi, la persistance d'un chimérisme a été observée chez cinq d'entre eux, pour lesquels le sevrage complet du traitement immunosuppresseur a été possible. Aucune maladie du greffon contre l'hôte n'a été observée.

Cette étude montre donc qu'un conditionnement de faible intensité immunosuppressive (fludarabine, cyclophosphamide, irradiation corporelle totale 200 cGy pendant 4 jours), associé à une greffe de cellules souches hématopoïétiques réalisée le lendemain de la transplantation, permet d'obtenir un chimérisme durable chez la plupart des receveurs HLA-incompatibles faiblement immunisés conduisant au sevrage de toute immunosuppression.

A côté des cellules souches hématopoïétiques, il y a depuis quelques années un regain d'intérêt pour les cellules souches mésenchymateuses (CSM) qui sont des cellules pluripotentes (qui peuvent se différencier en cellules parenchymateuses spécifiques d'organes), localisées dans quasiment tous les tissus de l'organisme. Ces cellules souches mésenchymateuses, en général extraites de la moelle osseuse ou du tissu adipeux, ont des propriétés anti-inflammatoires et immuno-modulatrices qui peuvent intéresser les néphrologues et les transplantateurs. En effet, ces CSM peuvent stimuler la régénération des cellules tubulaires et aider à la guérison des insuffisances rénales aiguës toxiques ou ischémiques. Elles peuvent également, dans les modèles expérimentaux de transplantation, diminuer la réponse immune et aider à l'installation d'un état de tolérance.

Ces données expérimentales viennent d'être appliquées à l'homme : une équipe chinoise (1) a comparé 52 receveurs de greffons de donneurs vivants traités par 2 injections de CSM autologues à 51 receveurs traités par basiliximab: les patients ayant reçu les cellules souches mésenchymateuses ont présenté moins de rejets aigus, moins d'infections opportunistes et avaient, un an après la greffe, une fonction rénale meilleure que les patients du groupe contrôle.

Ces données montrent que nous sommes à l'aube d'une nouvelle ère dans la prise en charge des maladies rénales et en transplantation rénale : les cellules souches hématopoïétiques (CSH) ou mésenchymateuses (CSM) seront probablement

demain l'un des piliers du traitement des insuffisances rénales aiguës (secondaires à une nécrose tubulaire aiguë), des maladies rénales chroniques pour freiner l'évolution vers l'insuffisance rénale chronique, et de la prise en charge du transplanté pour induire un état de tolérance immune avec l'espoir de se débarrasser du traitement immunosuppresseur. ■



LES FAMEUSES CHIMÈRES DE NOTRE DAME

**Définition :** En génétique, une chimère est un organisme, animal en général, formé de deux (ou plus) populations de cellules génétiquement distinctes. La chimère est issue, en reproduction sexuée, d'une double (ou multiple) fécondation créant plusieurs zygotes. Chaque population de cellules conserve son propre caractère génétique, si bien que l'organisme résultant est une combinaison de tissus ou organes de différents types, mais néanmoins compatibles.

Le terme de *chimère* est utilisé en référence aux créatures chimériques de la mythologie. (Wikipedia)

## Références :

1. Tan J, Wu W, Xu X et al. JAMA, 2012. Induction therapy with autologous mesenchymal stem cells in living-related kidney transplants: a randomized controlled trial.

**Note 1 :** *Protocole suivi pour les équipes de Chicago et Louisville : Dix-sept patients recevant un rein de donneur vivant sont inclus. Dans un premier temps, un conditionnement non myélo-ablatif de faible intensité (fludarabine, cyclophosphamide, et irradiation corporelle totale 200 cGy) est réalisé entre J-4 et J-1. A J0, la transplantation rénale est effectuée, suivie à J1 d'une greffe de cellules souches hématopoïétiques CD34+ dérivées du donneur, associée à une injection de cellules facilitantes (CD8+, TCR DD- et gd-, phénotypiquement proche des pDC). Ces cellules facilitantes avaient pour objectif de faciliter la greffe des CSH et d'éviter la réaction du greffon contre l'hôte (GvH). Le traitement d'entretien était composé de tacrolimus et de mycophénolate mofétil sans stéroïdes*



Oliver GROSS

## → INTÉRÊTS ET RISQUES du traitement par cellules souches dans les maladies rénales génétiques : biothérapie dans le syndrome d'Alport

. OLIVER GROSS - Université de Göttingen, Allemagne

### PREMIÈRE ÉTAPE :

#### Identifier la cible

Avant de s'attaquer à une maladie rénale génétique à l'aide d'un traitement par cellules souches, les chercheurs doivent bien caractériser la problématique médicale. Le syndrome d'Alport est une glomérulopathie héréditaire progressant vers l'insuffisance rénale terminale, qui survient souvent à l'adolescence. Il est provoqué par une structure défectueuse ou anormale dans le réseau  $\alpha3/4/5$  du collagène de type IV qui contribue à la membrane basale glomérulaire (MBG) normale. Qu'y a-t-il de si particulier au réseau  $\alpha3/4/5$  (IV) de la MBG ? Il est riche en ponts disulfides qui augmentent la résistance mécanique de la membrane basale chez tous les mammifères. Cette résistance mécanique accrue de la MBG est nécessaire pour résister tout au long de la vie à la pression sanguine, et filtrer plus de 150 litres d'urines par jour.

Le réseau  $\alpha3/4/5$  (IV) est exclusivement élaboré par les podocytes<sup>(1)</sup> : les podocytes sont bien la bonne cible à viser pour guérir le syndrome d'Alport (figure 1).

### DEUXIÈME ÉTAPE :

#### Comment parvenir à la cible ?

Pour guérir le syndrome d'Alport, deux stratégies peuvent être exploitées :

- 1 • remplacer le podocyte génétiquement défectueux par des nouveaux podocytes issus d'un donneur de cellules souches ;
- 2 • ou ne pas remplacer le podocyte génétiquement défectueux, mais tenter de le « réduire au silence » et ré-élaborer une membrane basale glomérulaire de meilleure qualité.

La première approche est séduisante, puisqu'elle guérirait le syndrome d'Alport, mais difficilement réalisable tout simplement parce que le podocyte est une cellule très particulière, installée sur le versant externe de l'épaisse membrane basale des capillaires glomérulaires.

Or, s'il est facile d'injecter des cellules souches dans le sang, il est complexe de donner aux cellules souches les consignes concernant leur site d'arrivée (le glomérule),

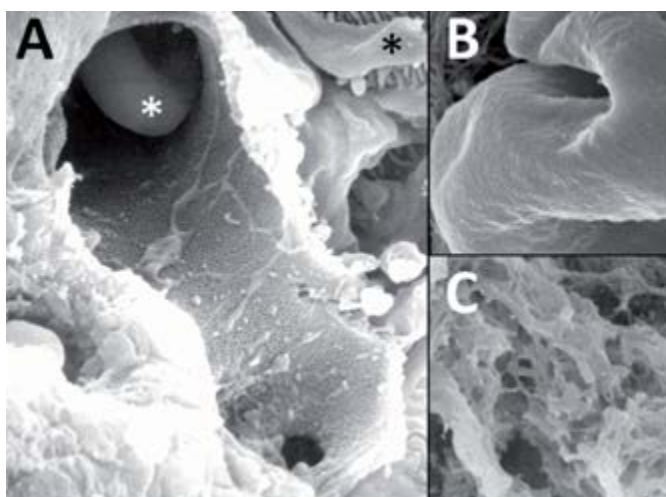


Figure 1 : MBG et podocytes sont les cibles du traitement par cellules souches dans le syndrome d'Alport :

- A : Coupe d'un capillaire dans le glomérule. Un globule rouge (astérisque blanche) s'engage dans le capillaire. Les podocytes (astérisque noire) sont localisés à l'extérieur du capillaire glomérulaire et doivent résister à la pression existant dans les vaisseaux (image fournie par T. HUBER, Freiburg, Allemagne).
- B : Membrane basale glomérulaire d'un sujet normal, régulière et dépourvue de trou (2).
- C : Membrane basale glomérulaire d'un patient souffrant de syndrome d'Alport, irrégulière et percée (2).

et l'instruction de traverser la MBG et de remplacer le podocyte, une cellule hautement spécialisée.

La deuxième approche est moins attrayante, puisqu'elle ne guérirait pas le syndrome d'Alport, mais plus accessible. Les cellules souches peuvent facilement être injectées dans le sang ou sous la capsule des reins. La mission qui leur est assignée ne consiste pas à remplacer les podocytes génétiquement défectueux, mais à produire des signaux dénommés chémokines qui indiquent aux podocytes génétiquement défectueux et aux cellules inflammatoires de « réduire leur activité » et de réparer ou de reconstruire la membrane basale.

### TROISIÈME ÉTAPE :

#### De quel arsenal scientifique disposons-nous pour guérir une maladie génétique des reins ?

La thérapie génique et la thérapie cellulaire ont pour objectif de réparer l'assemblage défectueux du collagène  $\alpha 3/4/5$ <sup>(IV)</sup> qui caractérise le syndrome d'Alport. Jusqu'à présent, le remplacement des gènes défectueux par thérapie génique dans les modèles animaux de syndrome d'Alport a échoué. Pour parvenir à une thérapie génique efficace, l'une des principales difficultés à surmonter concerne l'acheminement dans le glomérule d'un nombre suffisant de copies des gènes normaux du collagène<sup>(3)</sup>. Dans le rein, les chercheurs sont confrontés à des oppositions plus actives et plus efficaces que dans le foie ou le cœur. La nature a en effet imaginé des mécanismes de protection des reins pour les tenir à l'abri de virus et de bactéries dangereuses, sans anticiper que les chercheurs utiliseraient de « mauvais » virus comme vecteurs pour installer des copies de « bons » gènes dans les podocytes défectueux des patients atteints de syndrome d'Alport.

Parallèlement aux efforts nécessaires pour générer de nouveaux vecteurs de gènes efficaces et atoxiques, deux groupes de recherche ont observé que les cellules souches dérivées de la moelle osseuse peuvent améliorer le syndrome d'Alport de la souris en se transformant en podocytes capables de sécréter les chaînes manquantes de collagène  $\alpha 3/4/5$ <sup>(IV)</sup><sup>(4,5)</sup> : en bref, une approche de thérapie cellulaire à capacité curative.

Ces groupes postulent que les cellules souches sont mobilisées dans les glomérules détruits où ils traversent la MBG, se transforment en podocytes, sécrètent le collagène manquant, réparent les anomalies de la MBG et ralentissent (ou éventuellement font régresser) la maladie. Pour les patients affectés par un syndrome d'Alport, le fait le plus important est de différer l'âge de

survenue de l'insuffisance rénale terminale. Pour une raison inconnue, cet aspect n'a pas été évalué dans l'une et l'autre études des souris Alport, bien qu'une amélioration des lésions rénales ait été observée sous le microscope<sup>(4,5)</sup>. Ces publications ont été complétées par d'autres travaux montrant un effet bénéfique du traitement par cellules souches chez les souris avec syndrome d'Alport<sup>(6)</sup> : les auteurs ont prétendu que les cellules souches transmises par de simples transfusions de sang étaient capables de reconstruire une membrane basale glomérulaire intacte avec des chaînes de collagène  $\alpha 3/4/5$ <sup>(IV)</sup>. A mes yeux ces données sont troublantes et difficiles à interpréter : en effet, des transfusions sanguines ont été réalisées depuis plus d'un siècle chez les patients ayant une maladie rénale chronique pour corriger leur anémie.

Or, en dépit de transfusions sanguines réalisées chez des milliers de patients, une amélioration des maladies rénales chroniques n'a jamais été observée. Ultérieurement, Katayama et ses collaborateurs ont montré que la transplantation de moelle osseuse améliorait l'espérance de vie des souris Alport avec une efficacité similaire que la moelle provienne de souris normales ou de souris invalidées pour Col4a3-/- . Une irradiation sub-létale isolée a également un effet bénéfique<sup>(7)</sup>. De plus, une étude antérieure chez des souris Alport traitées par des cellules souches mésenchymateuses a montré une amélioration des lésions rénales observées au microscope, mais sans amélioration de la survie rénale<sup>(8)</sup>.

Le travail récent de Perin et coll. rapporte des résultats encourageants : l'injection de cellules souches d'origine amniotique retarde la progression de la fibrose rénale chez les souris avec syndrome d'Alport<sup>(9)</sup>. Les auteurs affirment que les souris traitées normalisent le nombre de leurs podocytes et ont une MBG de meilleure qualité que les souris non-traitées. Il n'est pas impossible que l'inhibition du système rénine-angiotensine par les cellules souches d'origine amniotique ait contribué à ces effets bénéfiques. Ces résultats pointent vers notre deuxième approche (voir étape 2 : comment parvenir à la cible ?). En résumé, cette approche thérapeutique ne permet pas de guérir la maladie, mais soulève l'espoir d'une amélioration du pronostic des patients ayant un syndrome d'Alport.

### QUATRIÈME ÉTAPE :

#### Quels sont les obstacles pour guérir une maladie génétique des reins ?

Les reins remplissent un grand nombre de fonctions primordiales en contrôlant les bilans de l'eau et du sel, le maintien du contenu en acide et en base, l'élimination de toxines, la régulation de la pression artérielle, etc... L'organisation biochimique, physiologique ou immunologique du rein est bien plus complexe que celle du cœur ou du poumon. Pour élaborer cet organe extraordinairement complexe, des millions d'années « d'essais et d'erreurs » ont été nécessaires à la nature. Le résultat est là : c'est un organe parfait avec 1 millions de glomérules (!) et des milliards de cellules interagissant ensemble. Alors que la nature a eu besoin de millions d'années, les chercheurs ont besoin d'un travail intense de plusieurs années pour réparer ne serait-ce qu'un seul gène de cet organe, tout simplement parce qu'il ne s'agit pas d'une cellule isolée, mais d'un merveilleux organe en interactions multiples.

#### CINQUIÈME ÉTAPE :

##### Quels sont les risques ?

Nos connaissances sur le syndrome d'Alport et son traitement potentiel par la transplantation de cellules de la moelle ou l'usage de cellules souches restent incomplètes. D'innombrables interrogations ont encore besoin d'être explorées chez l'animal avant d'envisager des études de transplantation chez l'homme.

En raison des risques associés à la procédure, la transplantation de moelle osseuse est strictement réservée aux maladies potentiellement mortelles. Par conséquent, le syndrome d'Alport ou la polykystose rénale autosomique dominante ne seront probablement pas retenus pour des projets de transplantation de moelle osseuse, faute d'améliorer la survie du patient, un résultat obtenu par la transplantation rénale.

Toute suggestion que les effets de la transplantation de moelle osseuse ou de la transfusion de cellules souches puissent être supérieurs à d'autres traitements (comme le blocage du système rénine-angiotensine) nécessiterait un complément d'investigations avant d'exposer des patients à des traitements plus périlleux.

#### SIXIÈME ÉTAPE :

##### La science sera-t-elle capable de guérir les maladies génétiques ?

Oui, je suis très optimiste, la science sera capable de guérir les maladies génétiques. Toutefois plusieurs années sont nécessaires pour réussir, et vérifier que le traitement sera réellement curatif.

Et un grand nombre d'années supplémentaires sera nécessaire pour vérifier que le traitement est sans

danger. Dans l'intervalle, les traitements conventionnels (et dépourvus de risque) comme les inhibiteurs du système rénine-angiotensine nous aideront à retarder la progression du syndrome d'Alport.

Les avantages de ces traitements conventionnels sont majeurs. Les biothérapies éventuellement dangereuses seront testées chez les adultes, mais pas chez des enfants ou des adolescents.

#### REMERCIEMENTS :

Le Registre européen Alport des « traitements conventionnels » dans le syndrome d'Alport (European Alport Registry) a reçu le soutien de l'ARG-France. ■

#### Références :

1. Abrahamson DR, Hudson BG, Stroganova L, Borza DB, St. John PL. Cellular Origins of Glomerular Basement Membrane Type IV Collagen Networks. *J Am Soc Nephrol* 20(7):1471-9, 2009.
2. Ryu M, Migliorini A, Miosge N, Gross O, Brinkkoetter PT, Romagnani P, Liapis H, Anders HJ: Plasma leakage through glomerular basement membrane ruptures triggers the proliferation of parietal epithelial cells and crescent formation in non-inflammatory glomerular injury. *J Pathol*, in press 2012
3. Heikkilä P, Tryggvason K, Thorner P: Animal models of Alport syndrome: advancing the prospects for effective human gene therapy. *Exp Nephrol* 8(1):1-7, 2000
4. Prodromidi EI, Poulosom R, Jeffery R et al. Bone marrow-derived cells contribute to podocyte regeneration and amelioration of renal disease in a mouse model of Alport syndrome. *Stem Cells* 24: 2448-2455, 2006
5. Sugimoto H, Mundel TM, Sund M, Xie L, Cosgrove D, Kalluri R. Bone-marrow-derived stem cells repair basement membrane collagen defects and reverse genetic kidney disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 7321-7326, 2006
6. LeBleu V, Sugimoto H, Mundel TM, Gerami-Naini B, Finan E, Miller CA, Gattone VH 2nd, Lu L, Shield CF 3rd, Folkman J, Kalluri R. Stem cell therapies benefit Alport syndrome. *J Am Soc Nephrol* 20(11):2359-70, 2009
7. Katayama K, Kawano M, Naito I et al. Irradiation prolongs survival of Alport mice. *J Am Soc Nephrol* 19: 1692-1700, 2008
8. Ninichuk V, Gross O, Segerer S, et al.: Multipotent mesenchymal stem cells reduce interstitial fibrosis but do not delay progression of chronic kidney disease in collagen4A3-deficient mice. *Kidney Int* 70(1):121-9, 2006
9. Sedrakyan S, Da Sacco S, Milanese A, Shiri L, Petrosyan A, Varimezova R, Warburton D, Lemley KV, De Filippo RE, Perin L. Injection of amniotic fluid stem cells delays progression of renal fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 23(4):661-73, 2012.



Stéphanie Cherqui

## → CELLULES SOUCHES et thérapie génique pour la cystinose

STÉPHANIE CHERQUI, PHD - University of California San Diego (UCSD), La Jolla, Californie, USA

**La cystinose est une maladie héréditaire (de transmission) autosomique récessive caractérisée par une accumulation de cystine dans les lysosomes de tous les organes.**

Cette accumulation est liée à un défaut de transport de la cystine à travers la paroi lysosomale ; la cystine est alors stockée dans les lysosomes et tend à former des cristaux<sup>(1, 2)</sup>. Il existe trois formes cliniques de la maladie : la forme infantile, la forme juvénile et la forme oculaire. La forme la plus grave et la plus fréquente est la forme infantile qui débute entre 6 et 8 mois par un syndrome de Toni-Debré-Fanconi, qui se caractérise par une tubulopathie proximale et un retard de croissance<sup>(2)</sup>. Les enfants atteints évoluent vers l'insuffisance rénale terminale. D'autres manifestations cliniques (atteinte oculaire, diabète, hypertension portale, hypothyroïdie, atteinte neurologique...) sont également dues à l'accumulation de cystine dans les différents organes<sup>(3)</sup>. La forme juvénile débute entre 12 et 15 ans par une atteinte rénale qui évolue également vers l'insuffisance rénale terminale<sup>(4)</sup>. Enfin la forme oculaire, comme son nom l'indique, se caractérise exclusivement par une atteinte de la cornée<sup>(5)</sup>.

Le traitement de la cystinose repose sur la cystéamine qui permet le clivage de la cystine dans les lysosomes<sup>(6)</sup>. Si ce traitement est instauré précocement et à fortes doses, il permet de retarder l'évolution de la maladie. Cependant, il doit être pris régulièrement toutes les 6 heures, y compris la nuit, et présente de nombreux effets secondaires qui rendent son administration difficile. De plus, chaque symptôme étant traité individuellement, les patients sont contraints de prendre des dizaines de médicaments plusieurs fois par jour. Enfin, les individus atteints d'insuffisance rénale doivent avoir aussi recours à la dialyse et la transplantation rénale.

Le groupe du Dr. Corinne Antignac (Inserm U 983, Paris) a identifié le gène impliqué dans la cystinose, le gène CTNS exprimé dans tous les organes testés<sup>(7)</sup>. CTNS code pour une nouvelle protéine, la cystinosine,

qui est un transporteur lysosomal de la cystine, ce qui est compatible avec la fonction attendue<sup>(8,9)</sup>. Nous avons également généré le modèle murin de la cystinose en invalidant le gène Ctns chez la souris<sup>(10)</sup>. Les souris Ctns<sup>-/-</sup> accumulent significativement la cystine dans tous les organes testés et des cristaux de cystine ont été observés dans la plupart des organes. Les souris Ctns<sup>-/-</sup> présentent des anomalies oculaires très similaires à celles retrouvées chez les enfants atteints de cystinose, une déminéralisation osseuse avec déformation des os longs ainsi que des anomalies musculaires et des troubles de comportement, traduisant des troubles neurologiques ou visuels. Les souris sur fond pure C57BL/6 développent, en plus des symptômes décrits précédemment, des signes de tubulopathie proximale et des anomalies rénales qui évoluent vers l'insuffisance rénale terminale<sup>(11)</sup>.

### IMPACT DES CELLULES SOUCHES DE LA MOELLE OSSEUSE SUR LA CYSTINOSE<sup>(12)</sup>

Deux types de cellules souches existent dans la moelle osseuse, les cellules souches hématopoïétiques (CSH) et les cellules souches mésenchymateuses (CSM) qui diffèrent par leur potentiel à générer différents types cellulaires. Nous avons testé ces deux types cellulaires dans les souris Ctns<sup>-/-</sup> en effectuant des transplantations syngéniques de CSH et CSM provenant de souris sauvages transgéniques pour la Green Fluorescent Protein (GFP) ; ces cellules souches expriment donc un gène fonctionnel Ctns mais aussi un gène rapporteur vert qui permet de suivre les cellules après transplantation. Les souris Ctns<sup>-/-</sup> ont été transplantées à l'âge de 2 mois après irradiation afin de détruire les cellules souches endogènes. Comme contrôles, les souris Ctns<sup>-/-</sup> ont été transplantées avec des cellules souches isolées de souris Ctns<sup>-/-</sup>. À 2 et 4 mois après transplantation, la fonction rénale des souris a été analysée et la cystine ainsi que l'expression du gène fonctionnel Ctns ont été mesurées dans le cerveau, les yeux, le cœur, les reins, le foie et les muscles des souris transplantées et des contrôles. Les mesures de cystine ont été effectuées

par spectrométrie de masse et l'expression du gène *Ctns* a été déterminée par PCR quantitative (qPCR). Les cellules dérivées de la moelle osseuse ont été observées dans les différents tissus par microscopie confocale.

Les CSM n'ont pas intégré efficacement les organes et n'ont eu qu'un effet bénéfique provisoire sur la teneur en cystine des tissus et sur la fonction rénale. Ceci est en accord avec ce qui est connu à présent sur les CSM ; ces cellules n'intègrent pas de façon stable les tissus mais ont un effet bénéfique transitoire en sécrétant des molécules et/ou protéines. En revanche, la teneur en cystine des différents organes a été réduite de 57% à 94% chez les souris traitées avec les CSH exprimant *Ctns* (Tableau 1).

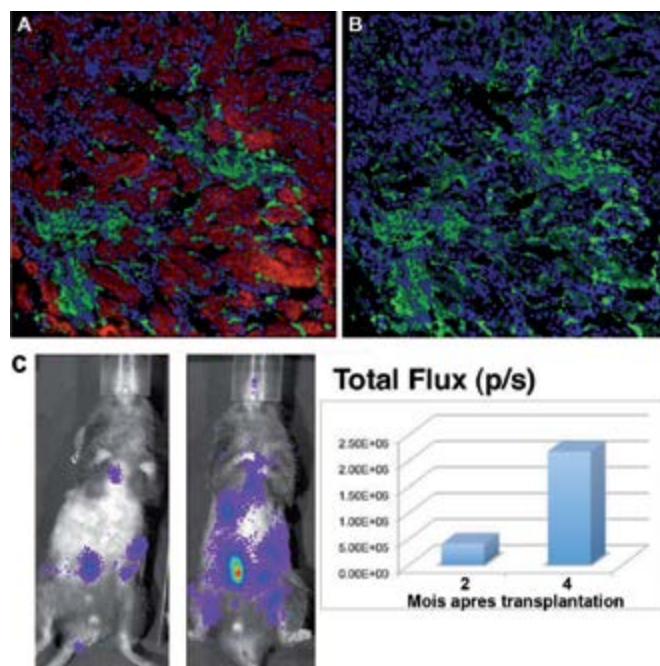
	Expression de <i>Ctns</i> , % des cellules totales	Diminution de la cystine (%)
Cerveau	5,9	57,3
Oeil	13,4	70,4
Cœur	11	81,9
Rein	12,9	70
Foie	9,6	94,4
Muscle	5,4	65,6
Rate	19,3	86,8

**Tableau 1 :** Expression de *Ctns* et diminution de la cystine dans les tissus des souris *Ctns*<sup>-/-</sup> traitées

La microscopie confocale et les qPCR ont révélé la présence d'une grande quantité de cellules dérivées de la moelle osseuse dans tous les organes testés, de 5% à 19% du nombre total de cellules (Tableau 1 et Figure 1A et 1B). La plupart de ces cellules font partie intégrante du tissu empêchant ainsi la progression naturelle des anomalies rénales et le dépôt de cristaux de cystine sur la cornée a été significativement amélioré chez les souris traitées.

Nous avons également transplanté les souris *Ctns*<sup>-/-</sup> avec des CSH exprimant un autre gène rapporteur, la luciférase, qui peut être visualisée chez les souris vivantes grâce au système d'imagerie IVIS. Ces études ont été utilisées pour suivre le destin des cellules transplantées exprimant le gène fonctionnel *Ctns* en fonction du temps. L'expression de la luciférase a été

détectée dans plusieurs tissus dès 4 semaines après transplantation et son intensité et sa localisation ont augmenté rapidement avec le temps (Figure 1C).



**Figure 1 :** Efficacité d'intégration des cellules dérivées de la moelle osseuse dans les tissus. (A,B) Photos de microscopie confocale de reins d'une souris *Ctns*<sup>-/-</sup> traitée avec des CSH sauvage exprimant la GFP. Les cellules dérivées de la moelle osseuse sont vues en vert, les noyaux cellulaires en bleus et les tubes proximaux sont vus en rouge. (C) Photo d'une souris *Ctns*<sup>-/-</sup> traitée avec des CSH sauvages exprimant la luciférase à 2 et 4 mois après transplantation, montrant la progression rapide d'intégration des cellules souches dans tous les tissus.

Cette abondante colonisation des tissus par les cellules dérivées de la moelle osseuse est très spécifique de la cystinose car les souris sauvages transplantées de la même façon présentent une expression tissulaire très faible de la luciférase. Ceci montre que l'efficacité d'intégration des cellules souches dans les tissus des souris *Ctns*<sup>-/-</sup> est liée à la progressive dégénération des tissus.

La transplantation des cellules souches hématopoïétiques exprimant le gène fonctionnel *Ctns* présente un succès significatif dans le traitement de la cystinose chez les souris *Ctns*<sup>-/-</sup>.

En effet, les cellules transplantées ont intégré abondamment tous les tissus, ce qui aboutit à des réductions significatives des niveaux de cystine dans les tissus et à la préservation de la fonction rénale normale 4 mois après transplantation.

## EFFET À LONG TERME DE LA TRANSPLANTATION DE CSH EXPRIMANT UN GÈNE CTNS<sup>(13)</sup>

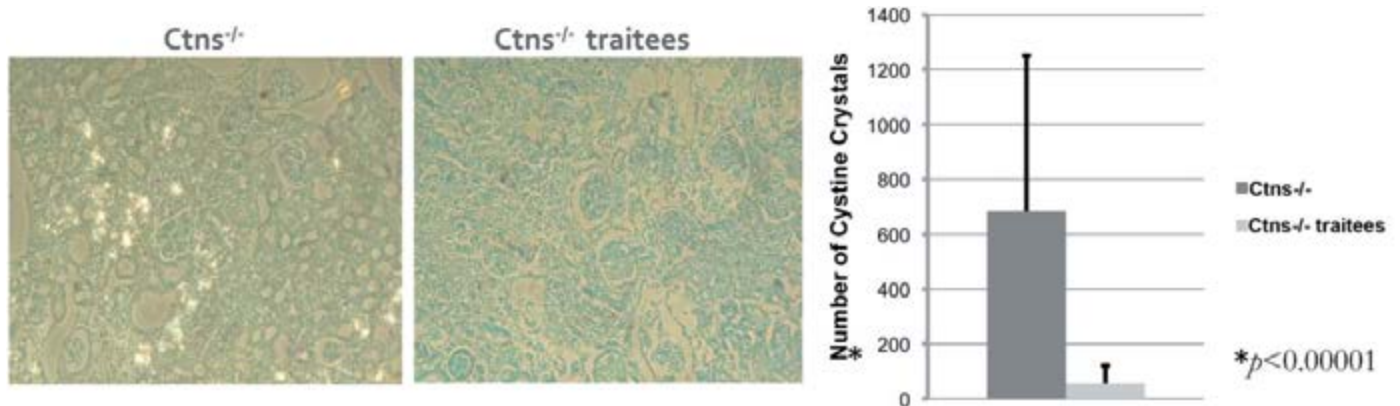
La question suivante était de déterminer si la transplantation de cellules souches hématopoïétiques exprimant le gène fonctionnel *Ctns* avait un effet thérapeutique à long terme chez les souris cystinotiques.

Nous avons donc étudié les souris 7 à 15 mois après la transplantation. Nous avons montré que la teneur en cystine a été diminuée de manière significative dans tous les tissus même après 17 mois suivant la transplantation (de 54% dans les reins à 96,5% dans le foie). De plus, les cristaux de cystine, abondant dans les reins des souris *Ctns*<sup>-/-</sup> non traitées, ont presque complètement disparu chez les souris transplantées (Figure 2). Ces résultats prouvent que le traitement est stable et efficace pendant la vie de la souris.

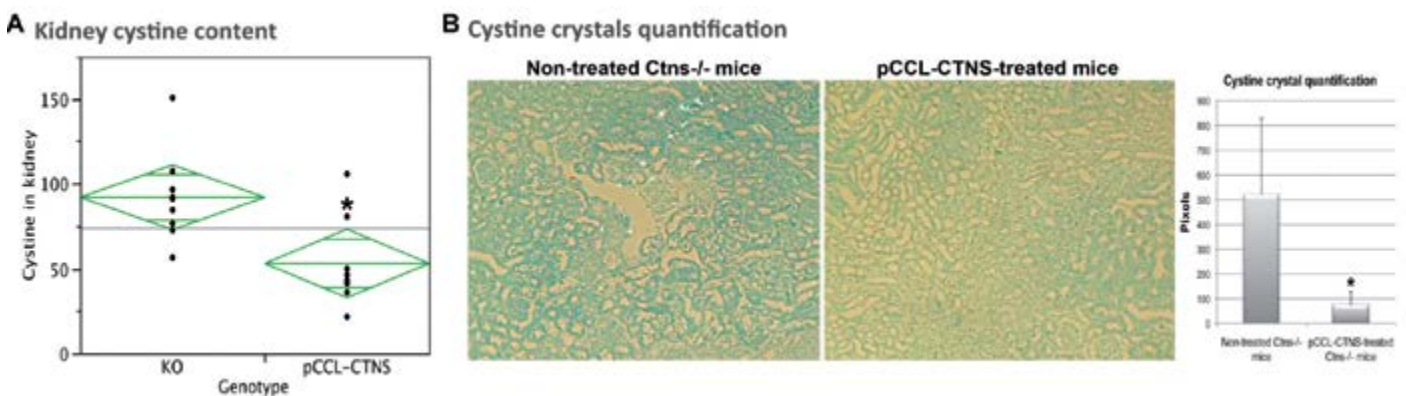
Nous avons également montré que la transplantation de CSH exprimant *Ctns* pouvait fournir une protection à

long terme des reins chez les souris *Ctns*<sup>-/-</sup>. Toutefois, nous avons démontré que l'efficacité du traitement dépendait de la quantité de cellules souches exprimant *Ctns* dans la moelle osseuse. En effet, plus le nombre de cellules exprimant *Ctns* est élevé dans la moelle osseuse, plus la quantité de cellules exprimant *Ctns* est élevée dans le rein et plus la fonction rénale est préservée. Ces résultats suggèrent qu'il sera important d'obtenir un niveau élevé de cellules exprimant le gène *Ctns* chez les patients pour un traitement optimal de la cystinose. En revanche, nous avons montré que même les souris transplantées après l'âge de 6 mois, âge pour lequel les anomalies rénales sont déjà mesurables dans le sang et l'urine, peuvent retrouver une fonction rénale normale. Ceci suggère que les reins peuvent être sauvés par la transplantation de cellules souches si les anomalies ne sont pas trop avancées.

Ces travaux vont donner lieu au premier essai clinique consistant à transplanter des cellules souches de la



**Figure 2 :** Photos d'histologie montrant les cristaux de cystine abondant dans le rein d'une souris *Ctns*<sup>-/-</sup> contrôle (*Ctns*<sup>-/-</sup>) et peu nombreux dans le rein d'une souris *Ctns*<sup>-/-</sup> traitée avec des CSH sauvages. L'histogramme représente la quantification de ces cristaux chez 30 souris traitées et 30 contrôles à l'âge de 15-17 mois.



**Figure 3 :** (A) Histogramme des taux de cystine dans le rein chez des souris *Ctns*<sup>-/-</sup> contrôles (KO) et des souris *Ctns*<sup>-/-</sup> traitées avec des CSH modifiées par LV-CTNS (pCCL-CTNS) 8 mois après transplantation. (B) Histologie du rein d'une souris *Ctns*<sup>-/-</sup> contrôle où de nombreux cristaux de cystine peuvent être visualisés au contraire des souris traitées. Une représentation de la quantification des cristaux chez plusieurs souris montre que la différence est statistiquement significative entre les deux groupes.



moelle osseuse d'un frère (ou sœur) sain à un patient atteint de cystinose (transplantation allogénique). Cet essai clinique nous permettra de déterminer si cette stratégie de traitement a également un effet thérapeutique chez l'homme. Cependant, les transplantations allogéniques présentent un taux élevé de mortalité à cause des risques liés au rejet des cellules souches étrangères par le corps de l'hôte. C'est pourquoi la stratégie à long terme pour la cystinose est de développer une transplantation dite autologue, c'est à dire la transplantation des cellules souches du patient qui ont été génétiquement modifiées ex vivo pour exprimer le gène CTNS fonctionnel. Cette procédure présente beaucoup moins de risque que la transplantation allogénique et pourra donc être utilisée de façon plus rependue.

### TRANSPLANTATION AUTOLOGUE DE CSH GÉNÉTIQUEMENT MODIFIÉES POUR EXPRIMER LE GÈNE CTNS<sup>(14)</sup>

Afin d'introduire un gène fonctionnel dans les cellules souches hématopoïétiques, nous utilisons un vecteur lentiviral qui permet l'infection efficace et stable des cellules souches et qui jusqu'à présent n'a jamais présenté de toxicité chez l'homme. De plus, le vecteur que nous utilisons est le même vecteur déjà utilisé en essai clinique<sup>(15)</sup>.

Tout d'abord, en utilisant des vecteurs lentiviraux exprimant les gènes rapporteurs GFP et luciférase, nous avons mis au point un protocole de transduction efficace qui permet d'obtenir une efficacité de transduction de 90% des cellules souches qui reste stable pour au moins un an après transplantation chez les souris.

Nous avons par la suite généré le vecteur lentiviral exprimant le gène humain CTNS (LV-CTNS) pour les études précliniques chez la souris pour établir son efficacité. Nous avons infecté des CSH isolées de souris *Ctns*<sup>-/-</sup> avec LV-CTNS et nous les avons transplantées chez les souris *Ctns*<sup>-/-</sup>. Les souris ont été analysées à 4 et 8 mois après transplantation. Comme contrôle, nous avons utilisé des souris *Ctns*<sup>-/-</sup> non traitées ou traitées avec des CSH sauvages. Une diminution significative de la cystine a été observée dans tous les tissus sauf l'œil chez les souris traitées avec LV-CTNS. Une amélioration de la fonction rénale a également été observée chez les souris traitées avec les cellules souches modifiées par le vecteur lentiviral exprimant CTNS ainsi qu'une diminution significative du niveau de cystine et des cristaux de cystine dans le rein (Figure 3). ■

### Références :

- Gahl, W.A., Bashan, N., Tietze, F., Bernardini, I., and Schulman, J.D. 1982. Cystine transport is defective in isolated leukocyte lysosomes from patients with cystinosis. *Science* 217:1263-1265.
- Gahl, W.A., Thoene, J., and Schneider, J.A. 2001. Cystinosis: A disorder of lysosomal membrane transport. In *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. C.R. Scriver, Beaudet, A.L., Sly, W.S., and Valle, D., editor. New York. 5085-5108.
- Lemire, J., and Kaplan, B.S. 1984. The various renal manifestations of the nephropathic form of cystinosis. *Am J Nephrol* 4:81-85.
- Langman, C.B., Moore, E.S., Thoene, J.G., and Schneider, J.A. 1985. Renal failure in a sibship with late-onset cystinosis. *J Pediatr* 107:755-756.
- Lietman, P.S., Frazier, P.D., Wong, V.G., Shotton, D., and Seegmiller, J.E. 1966. Adult cystinosis--a benign disorder. *Am J Med* 40:511-517.
- Gahl, W.A., Reed, G.F., Thoene, J.G., Schulman, J.D., Rizzo, W.B., Jonas, A.J., Denman, D.W., Schlesselman, J.J., Corden, B.J., and Schneider, J.A. 1987. Cysteamine therapy for children with nephropathic cystinosis. *N Engl J Med* 316:971-977.
- Town, M., Jean, G., Cherqui, S., Attard, M., Forestier, L., Whitmore, S.A., Callen, D.F., Gribouval, O., Broyer, M., Bates, G.P., et al. 1998. A novel gene encoding an integral membrane protein is mutated in nephropathic cystinosis. *Nat Genet* 18:319-324.
- Cherqui, S., Kalatzis, V., Trugnan, G., and Antignac, C. 2001. The targeting of cystinosin to the lysosomal membrane requires a tyrosine-based signal and a novel sorting motif. *J Biol Chem* 276:13314-13321.
- Kalatzis, V., Cherqui, S., Antignac, C., and Gasnier, B. 2001. Cystinosin, the protein defective in cystinosis, is a H(+)-driven lysosomal cystine transporter. *Embo J* 20:5940-5949.
- Cherqui, S., Sevin, C., Hamard, G., Kalatzis, V., Sich, M., Pequignot, M.O., Gogat, K., Abitbol, M., Broyer, M., Gubler, M.C., et al. 2002. Intralysosomal cystine accumulation in mice lacking cystinosin, the protein defective in cystinosis. *Mol Cell Biol* 22:7622-7632.
- Nevo, N., Chol, M., Bailleux, A., Kalatzis, V., Morisset, L., Devuyst, O., Gubler, M.C., and Antignac, C. 2010. Renal phenotype of the cystinosis mouse model is dependent upon genetic background. *Nephrol Dial Transplant* 25:1059-1066.
- Syres, K., Harrison, F., Tadlock, M., Jester, J.V., Simpson, J., Roy, S., Salomon, D.R., and Cherqui, S. 2009. Successful treatment of the murine model of cystinosis using bone marrow cell transplantation. *Blood* 114:2542-2552.
- Yeagy, B.A., Harrison, F., Gubler, M.C., Koziol, J.A., Salomon, D.R., and Cherqui, S. 2011. Kidney preservation by bone marrow cell transplantation in hereditary nephropathy. *Kidney Int* 79:1198-1206.
- Harrison, F., Yeagy, B.A., Rocca, C.J., Kohn, D.B., Salomon, D.R., and Cherqui, S. 2012. Hematopoietic Stem Cell Gene Therapy for the Multisystemic Lysosomal Storage Disorder Cystinosis. *Mol Ther*.
- Cartier, N., Hacein-Bey-Abina, S., Bartholomae, C.C., Veres, G., Schmidt, M., Kutschera, I., Vidaud, M., Abel, U., Dal-Cortivo, L., Caccavelli, L., et al. 2009. Hematopoietic stem cell gene therapy with a lentiviral vector in X-linked adrenoleukodystrophy. *Science* 326:818-823.

# AIRG-FRANCE

Depuis sa création en 1988 sous l'impulsion du Professeur J-P Grünfeld et du Dr Ginette Albouze, l'AIRG-France publie un magazine d'information destiné à ses Adhérents, en conformité avec les objectifs de l'Association qui veulent informer, aider les patients et soutenir la recherche. Cette publication rend compte de la vie et de l'activité de l'AIRG-France et informe ses lecteurs sur les sujets médicaux qui les préoccupent.

Elle ouvre aussi largement ses colonnes aux témoignages de ceux qui ont besoin de s'exprimer. Ainsi, Néphrogène se veut un trait d'union entre vous.

## CONSEIL D'ADMINISTRATION BUREAU :

**Président :** Daniel RENAULT  
**Trésorière :** Marianne WORBE  
**Secrétaire :** Jacques VIGNAUD  
**Secrétaire adjointe :** Françoise COUPPEY

## ADMINISTRATEURS :

**Catherine CABANTOUS :** *Webmestre*.....05 58 09 27 43  
**Monique CHEVALLIER :** *IDF*.....01 46 36 90 37  
**Marylise CLANET :** *IDF*.....01 45 43 66 43  
**François COUPPEY :**  
*Languedoc-Roussillon*.....04 66 75 59 88  
**Nicolas MULLIER :**  
*Nord-Pas de Calais*.....09 54 30 00 12  
**Nicole PATIN :** *Midi Pyrénées*.....06 20 96 49 00  
**Roger PIERRÉ :** *IDF*.....01 69 83 92 63  
**Valérie SLAMA :** *Bouches du Rhône*.....04 91 66 38 70  
**Vital TRONET :** *IDF*.....01 69 03 37 24  
**Aimé VERLAQUE :** *PACA*.....04 83 44 08 09  
**Ghislaine VIGNAUD :** *Paris*.....01 42 22 47 13  
**Raphaël VITE :** *Rhône Alpes*.....04 78 27 03 44

## CORRESPONDANTS :

**Géraldine PARELADA :** *Calvados*.....02 31 32 92 89  
**Jean-Louis DANNEPOND :** *Charente*.....05 45 39 76 76  
**Lucien MIKOLAJCZAK :** *Gard*.....04 66 75 45 72  
**Damien GABORIAU :** *Gironde*.....05 57 25 50 70  
**Marie RENAULT :** *Hérault*.....04 66 27 55 24  
**Niôle CABLAT :** *IDF*.....09 82 36 06 17  
**Maryvonne NORDEY :**  
*Loire Atlantique*.....02 28 03 50 16  
**Bernadette BAUDIN :** *Picardie*.....03 23 83 46 20  
**Rose-Marie PAYROT :**  
*Pyrénées Orientales*.....04 68 54 65 86  
**Bénédicte BOURQUARD :** *Rhône*.....04 37 24 7 370  
**Jacki ROUSTANG :** *Vaucluse*.....04 90 34 46 43

## PERMANENCE PARIS :

**Michelle AZAÏS :** .....06 72 79 87 77  
**Ingrid FEJEAN :** .....06 87 93 64 80  
**Bernadette DE FRANQUEVILLE :** .....01 45 50 28 75  
**Catherine JAGU :** .....06 61 11 34 06  
**Catherine MAZÉ :** .....06 08 97 13 36  
**Justine MOREAU :** .....06 13 50 50 32  
**Dominique ROUSIOT :** .....06 70 79 19 74  
**Béatrice SARTORIS :** .....06 84 23 18 14  
**Armelle ZAFRA :** .....06 83 06 83 60

## CONSEIL SCIENTIFIQUE :

**Président :** Pr Dominique CHAUVEAU  
Néphrologie, CHU Rangueil, Toulouse  
**Président d'Honneur :** Pr Jean-Pierre GRÜNFELD  
Néphrologie, Hôpital Necker-Enfants Malades, Paris

## MEMBRES :

**Pr Eric ALAMARTINE** CHU Nord St Etienne • **Pr Corinne ANTIGNAC** Inserm U 423 Paris • **Pr Christian COMBE** CHU Bordeaux • **Pr Pierre COCHAT** Hôpital Femme-Mère-Enfant Lyon Bron • **Pr Georges DESCHENES** Hôpital Debré Paris • **Pr Thierry HANNEDOUCHE** Hospices Civils Strasbourg • **Dr Laurence HEIDET** Hôpital Necker-Enfants Malades • **Pr Dominique JOLY** Hôpital Necker-Enfants Malades • **Pr Bertrand KNEBELMAN** Hôpital Necker-Enfants Malades • **Pr Chantal LOIRAT** Hôpital Debré Paris • **Dr Aurélie BERTHOLET-THOMAS** Hôpital Femme-Mère-Enfant Lyon Bron • **Pr Patrick NIAUDET** Hôpital Necker-Enfants Malades • **Pr Yves PIRSON** Cliniques St Luc Bruxelles • **Pr Philippe RIEU** CHU Reims • **Pr Rémy SALOMON** Hôpital Necker-Enfants Malades • **Pr Michel TSIMARATOS** Hôpital de la Timone Marseille • **Pr Philippe VANHILLE** CHR Valenciennes

**RÉDACTION / ÉDITION**

Jacques Vignaud  
AIRG-France  
BP 78  
75261 Paris cedex 06  
lapasset66@gmail.com

**CRÉATION GRAPHIQUE :**

José Da Cruz  
studio.traffik@free.fr

**COMITÉ DE RÉDACTION**

Françoise Cuppey  
Paul Fauconnier  
Catherine Mazé  
Roger Pierré  
Béatrice Sartoris  
Ghislaine Vignaud

**N°ISSN**

**1967-7855/NEPHROGENE**  
AIRG-France  
Association pour l'Information  
et la recherche sur les  
maladies Rénales Génétiques

[www.airg-france.org](http://www.airg-france.org)

Envoyez vos idées, articles,  
témoignages à :

Jacques Vignaud  
AIRG-France B-P 78  
75261 Paris Cedex 06  
Mail : Lapasset66@gmail.com



Avec **Richard Berry**,  
parrain d'AIRG France

**AIRG**  
France

**1988**  
**2013**  
25<sup>ème</sup>  
**ANNI  
VERS  
AIRE**

À L'ESPACE SAINT-MARTIN  
199<sup>bis</sup>, rue Saint-Martin - 75003 Paris  
**SAMEDI 7 DÉCEMBRE 2013**