

Université de Poitiers
Faculté de médecine et de pharmacie

ANNÉE 2013

Thèse n°

THÈSE
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE
(Arrêté du 17 juillet 1987)

et

MÉMOIRE
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES
D'INNOVATION PHARMACEUTIQUE et RECHERCHE
(Décret 88-996 du 19 octobre 1988)

Présentée et soutenue publiquement
le 8 Octobre 2013 à POITIERS
par Monsieur BAULIER Edouard

Médecine régénérative : utilisation potentielle des cellules souches issues
du liquide amniotique en transplantation rénale

Composition du jury :

Président : Monsieur le Professeur Christian POÛS

Membres : - Madame le Docteur Anne BARRA

- Madame le Docteur Vanessa BORGOLTZ

- Monsieur le Docteur Silvano BRIENZA

- Monsieur le Docteur Frédéric FAVREAU

Directeur de thèse : Monsieur le Professeur Thierry HAUET

THÈSE
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE
(Arrêté du 17 juillet 1987)

et

MÉMOIRE
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES
D'INNOVATION PHARMACEUTIQUE et RECHERCHE
(Décret 88-996 du 19 octobre 1988)

présentée et soutenue publiquement
le 8 Octobre 2013 à POITIERS
par Monsieur BAULIER Edouard

Médecine régénérative : utilisation potentielle des cellules souches issues
du liquide amniotique en transplantation rénale

Composition du jury :

Président : Monsieur le Professeur Christian POÛS

Membres : - Madame le Docteur Anne BARRA
- Madame le Docteur Vanessa BORGOLTZ
- Monsieur le Docteur Silvano BRIENZA
- Monsieur le Docteur Frédéric FAVREAU

Directeur de thèse : Monsieur le Professeur Thierry HAUET



PHARMACIE

Professeurs

- COUET William, Pharmacie Clinique
- FAUCONNEAU Bernard, Toxicologie
- IMBERT Christine, Parasitologie
- GUILLARD Jérôme, Pharmaco chimie
- JOUANNETAUD Marie-Paule, Chimie Thérapeutique
- LEVESQUE Joël, Pharmacognosie
- MARCHAND Sandrine, Pharmacocinétique
- OLIVIER Jean Christophe, Galénique
- PAGE Guylène, Biologie Cellulaire
- RABOUAN Sylvie, Chimie Physique, Chimie Analytique
- SARROUILHE Denis, Physiologie
- SEGUIN François, Biophysique, Biomathématiques

Maîtres de Conférences

- BARRA Anne, Immunologie-Hématologie
- BARRIER Laurence, Biochimie
- BODET Charles, Bactériologie
- BON Delphine, Biophysique
- BRILLAULT Julien, Pharmacologie
- CHARVET Caroline, Physiologie
- DEJEAN Catherine, Pharmacologie
- DEBORDE Marie, Sciences Physico-Chimiques
- DELAGE Jacques, Biomathématiques, Biophysique
- DUPUIS Antoine, Pharmacie Clinique
- FAVOT Laure, Biologie Cellulaire et Moléculaire
- GIRARDOT Marion, pharmacognosie, botanique, biodiversité végétale
- GREGOIRE Nicolas, Pharmacologie
- HUSSAIN Didja, Pharmacie Galénique
- INGRAND Sabrina, Toxicologie
- MARIVINGT-MOUNIR Cécile Pharmaco chimie

- PAIN Stéphanie, Toxicologie
- RAGOT Stéphanie, Santé Publique
- RIOUX BILAN Agnès, Biochimie
- TEWES Frédéric, Chimie et Pharmaco chimie
- THEVENOT Sarah, Hygiène et Santé publique
- THOREAU Vincent, Biologie Cellulaire
- WAHL Anne, Chimie Analytique

PAST - Maître de Conférences Associé

- DELOFFRE Clément, Pharmacien
- HOUNKANLIN Lydwin, Pharmacien

Professeur 2nd degré

- DEBAIL Didier

Maître de Langue - Anglais

- LILWALL Amy

REMERCIEMENTS

Je tiens à adresser mes plus sincères remerciements à,

***Monsieur le Docteur Christian POÛS**, Professeur de biochimie à la Faculté de Pharmacie de Chatenay-Malabry et praticien hospitalier à l'Hôpital Bécclère, pour me faire l'honneur de s'être déplacé depuis Paris afin de présider le jury de cette thèse et de bien vouloir juger mon travail.*

***Madame le Docteur Anne BARRA**, Maître de conférence à la Faculté de Pharmacie de Poitiers et praticien hospitalier au CHU de Poitiers, ainsi qu'à **Madame le Docteur Vanessa BORGOLTZ** et **Monsieur le Docteur Silvano BRIENZA**, pour me faire l'honneur et le plaisir d'être membres de mon jury et de juger ce travail. Je remercie particulièrement Vanessa et Silvano d'avoir fait le déplacement depuis Paris pour assister à cette thèse.*

Je tiens à remercier tout particulièrement,

***Monsieur le Professeur Thierry HAUET**, Professeur à la Faculté de Médecine de Poitiers, Praticien hospitalier au CHU de Poitiers, pour m'avoir permis d'intégrer l'unité de recherche U1082, pour m'avoir permis de mener à bien mes projets et pour m'avoir dirigé pour cette thèse. Merci Thierry pour vos compétences et vos conseils.*

***Monsieur le Docteur Frédéric FAVREAU**, Maître de conférences à la Faculté de Médecine de Poitiers, Praticien hospitalier au CHU de Poitiers, pour le temps précieux et la confiance qu'il m'a accordé pendant ces 3 années et demie, pour ses conseils éclairés à chaque étape de la réalisation de cette thèse. Merci Frédéric pour tes compétences, ta gentillesse, ta disponibilité et tes innombrables relectures.*

***Monsieur le Docteur Antoine DUPUIS**, Maître de conférence à la Faculté de Médecine de Poitiers, Praticien hospitalier au CHU de Poitiers, pour son rôle de coordonnateur des internes IPR, et pour m'avoir donné la liberté nécessaire pour réaliser mes projets. Merci Antoine de m'avoir accueilli à Poitiers, et de tes conseils avisés tout au long de mon cursus d'interne.*

***Madame Sandrine JOFFRION**, Technicienne au service de biochimie du CHU de Poitiers, pour son aide précieuse à chaque étape de mon travail, ses multiples compétences, ses coups de gueule, sa patience, sa bonne humeur et son énergie. Merci Sabrina!*

***Monsieur le Professeur Gerard MAUCO**, Professeur à la Faculté de Médecine de Poitiers, chef du service de Biochimie du CHU de Poitiers, pour m'avoir accueilli dans son service.*

Je voudrais remercier pour leur aide,

Les membres de la plateforme IBISA du site de l'INRA de Surgères, William, Pierre, Catherine, Irène pour avoir pris soins de mes petits cochons...

Les membres de l'équipe U935 de Poitiers, Monsieur le Professeur Ali Turhan, Amélie, Marie-Laure, pour m'avoir initié au monde des cellules souches.

Les chirurgiens et aux internes en chirurgie du CHU de Poitiers, pour avoir opéré les animaux. Merci à monsieur le professeur Christophe Jayle, à monsieur le docteur Jérôme Cau. Merci à Pierre Olivier et à Thibaut qui se sont heureusement avérés aussi performants en chirurgie gynécologique qu'en transplantation rénale...

Les Techniciennes du service d'anatomo-pathologie du CHU de Poitiers, et surtout monsieur le professeur Jean-Michel Goujon, pour m'avoir initié aux techniques d'histologie et pour avoir lu toutes ces lames.

Catherine B. pour l'impression de ce manuscrit (et pour sa patience !).

Je voudrais également exprimer toute mon amitié,

A toute l'équipe de l'U1082, dans laquelle j'ai eu la chance d'effectuer ces 3ans et demi d'internat, merci à Seb, Nico, Raph, Jérôme, Delphine, Virginie, Solène, Sylvain, Patrick, Vivien, Nadège, Michel, François pour leurs conseils, leur aide et leur amitié.

A tous les membres du service de la pharmacie du CHU de Poitiers, pharmaciens, internes, préparateurs. Merci pour votre accueil lors de mon premier semestre à Poitiers, et pour m'avoir accordé votre confiance lors de mes gardes et mes astreintes à la Pharmacie.

A tous les internes de Poitiers, pharmaciens, biologistes, médecins, que j'ai pu croiser lors de ces 4 années passées au CHU et plus particulièrement Tackwa, Pauline, Astrid, Vincent, Lauranne, Christo, Manu, Vico, Souleymane pour tous ces bons moments passés ensemble.

Et mes pensées vont tout naturellement,

A ma famille et mes parents, pour leur soutien sans faille et auxquels je dois tout

A Bastien, Margaux, Thomas, Carole, amis si précieux

A Vanessa, merci d'être là, tout simplement...

TABLE DES MATIERES

PREAMBULE.....	11
PARTIE I: LES CELLULES SOUCHES HUMAINES EN THERAPEUTIQUE	13
I. DEFINITION	13
A. <i>Cellules souches</i>	13
B. <i>Division asymetrique</i>	13
C. <i>Auto-renouvellement</i>	14
D. <i>Différenciation</i>	17
II. PRINCIPAUX TYPES DE CELLULES SOUCHES	18
A. <i>Les Cellules Souches Embryonnaires</i>	19
B. <i>Les Cellules Souches Adultes</i>	21
1. Les Cellules Souches Mésenchymateuses.....	21
2. Cellules Souches Cancéreuses	28
III. CELLULES SOUCHES ET THERAPEUTIQUE HUMAINE	31
A. <i>Cadre légal</i>	31
1. Règlement européen n°1394/2007	31
2. Définitions.....	32
3. Autorisation de Mise sur le Marché des MTI et MTI-PP.....	33
4. Fabrication d'un MTI	35
5. Autorisation d'essai clinique	35
B. <i>Cadre éthique</i>	35
1. Loi de Bioéthique et recherche sur l'embryon	36
2. Brevetabilité des cellules souches embryonnaires	37
C. <i>Utilisation potentielle des cellules souches en thérapeutique humaine</i>	38
1. Les cellules souches en tant que médicament.....	39
2. Utilisation des cellules souches en modélisation.....	40
3. Les cellules souches pour le criblage des molécules thérapeutiques	42
D. <i>Etat des lieux de la thérapie cellulaire utilisant les cellules souches</i>	43
1. Essais cliniques en cours	43
2. Médicaments commercialisés utilisant des cellules souches	44
3. Perspectives et limites	45
a) Conditions de culture	45
b) Tumorigénicité.....	45
c) Modalités d'administration.....	46
IV. CONCLUSION.....	47
PARTIE II: LA TRANSPLANTATION RENALE	48
I. SITUATION ACTUELLE EN TRANSPLANTATION RENALE	48
A. <i>Rapport 2011 de l'Agence de Biomédecine</i>	49
B. <i>Les différents donneurs</i>	50
1. Le donneur vivant.....	50
2. Le donneur en état de mort encéphalique	50
3. Le donneur décédé après arrêt cardiaque (DDAC)	50
C. <i>Bénéfices de la transplantation rénale</i>	52
1. Qualité de vie des patients	52
2. Impact économique.....	53
D. <i>Enjeux actuels</i>	53
1. Donneurs à critères étendus	54
2. Donneurs décédés après arrêt cardiaque.....	55

II. ISCHEMIE REPERFUSION EN TRANSPLANTATION RENALE.....	56
A. Définitions.....	57
1. L'ischémie.....	57
a) Donneurs vivants, donneurs en état de mort encéphalique	57
b) Donneurs décédés après arrêt cardiaque (DDAC).....	58
2. La reperfusion	58
B. Les lésions d'ischémie reperfusion	59
1. Lésions d'ischémie.....	59
2. Lésions de reperfusion	62
C. Stratégies visant à limiter l'impact des lésions d'IR sur les greffons	63
1. Solutions et techniques de conservation du greffon	63
2. Supplémentation des solutions de conservation en molécules thérapeutiques	66
III. CONCLUSION.....	68

PARTIE III : ETUDE DE L'UTILISATION DES CELLULES SOUCHES ISSUES DU LIQUIDE AMNIOTIQUE DANS UN MODELE PRECLINIQUE PORCIN D'AUTO TRANSPLANTATION RENALE.....70

I. INTRODUCTION	70
II. MATERIEL ET METHODES.....	72
A. Cellules souches issues du liquide amniotique.....	72
1. Obtention des cellules.....	72
2. Marquages des AFSC à la GFP.....	72
3. Caractérisation des cellules.....	73
a) Différenciation adipogénique	73
b) Différenciation ostéogénique	73
c) Différenciation en cellules endothéliales.....	73
d) Analyse phénotypique.....	74
4. Détermination de la sensibilité à l'hypoxie réoxygénation	74
a) Conditions de culture	74
b) Evaluation de la viabilité cellulaire par réalisation du test XTT	74
c) Evaluation de la viabilité cellulaire par dosage de l'ATP intracellulaire.....	74
d) Evaluation de la nécrose cellulaire par dosage de l'activité de la Lactate Déshydrogénase....	75
5. Congélation des cellules.....	75
6. Injection des cellules souches issues du liquide amniotique ex vivo	75
B. Animaux.....	76
1. Groupes	76
2. Auto transplantation rénale	76
3. Injection autologue des cellules souches issues du liquide amniotique	76
4. Suivi post transplantation.....	77
C. Analyses sur les échantillons collectés in vivo.....	77
1. Analyses histologiques	77
a) Coloration à l'acide périodique de Schiff (PAS)	77
b) Coloration Rouge Sirius	78
c) Marquage α Smooth Muscle Actin (α SMA)	78
d) Marquage fluorescent de la Green Fluorescent Protein	78
e) Marquage fluorescent du SWC3A	78
2. Dosage de l'expression protéique par Western Blot.....	78
3. Dosages ELISA	79
4. Dosages biochimiques sur sang et urines.....	79
D. Analyse statistique	79
III. RESULTATS.....	79
A. Les AFSC se différencient en adipocytes, ostéoblastes et cellules endothéliales	79
B. Les AFSC expriment CD29, CD90, CD73 mais pas c-Kit.....	80
C. Les AFSC sont sensibles à l'Hypoxie Reoxygenation in vitro.....	81

D. Les AFSC sont détectables après injection ex vivo dans le rein conservé.....	81
E. Les AFSC sont détectables 24h après injection in vivo dans le rein transplanté	82
F. Les AFSC sont présentes en très faible nombre 3 mois après injection dans le rein transplanté.....	83
G. Les AFSC ne semblent pas induire de tératome après 3 mois de suivi.....	83
H. L'injection d'AFSC autologues 6 jours après transplantation accélère significativement la récupération de fonction et la régénération tissulaire du greffon rénal..	83
I. L'injection d'AFSC autologues 6 jours après transplantation réduit significativement le développement de la fibrose tissulaire ainsi que l'infiltration de cellules immunitaires observée 3 mois après la greffe	85
J. L'injection d'AFSC autologues 6 jours après la transplantation est associée à un profil d'expression protéique pro-angiogénique dans le greffon 3 mois après la greffe.....	86
K. Il existe des variations dans la cinétique des concentrations en VEGF et TGFβ au niveau systémique, entre les animaux traités par injection d'AFSC et les animaux non traités	87
IV. DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	87
A. Mode d'obtention des AFSC.....	87
B. Caractérisation des AFSC.....	88
1. Différenciation.....	88
2. Expression de marqueurs membranaires.....	88
3. Evaluation de la réponse à l'HR	89
C. Modèle animal	90
1. Conduite de l'étude.....	90
a) Choix de l'espèce animale.....	90
b) Choix de la technique de transplantation rénale	90
c) Choix du mode d'administration des AFSC.....	91
d) Détection des AFSC après injection	91
e) Groupes contrôles.....	91
f) Techniques d'analyses biologiques.....	92
2. Mécanismes potentiellement impliqués dans l'induction des réparations des lésions d'IR par les AFSC	92
a) Rôle de VEGF-A, Flt-1 et Angiopoïétine I	92
b) Prévention de la fibrose et de l'infiltration cellulaire	93
c) Rôle de TGF-β.....	94
D. Perspectives.....	94
1. Liées aux AFSC.....	94
2. Liées au modèle animal	95
V. CONCLUSION	95
FIGURES ET TABLEAUX.....	97
ABREVIATIONS	99
BIBLIOGRAPHIE	103
SERMENT DE GALIEN.....	112
RESUME	114

PREAMBULE

L'objectif de cette thèse est de définir deux composants de la médecine régénérative, les cellules souches d'une part et la transplantation rénale d'autre part puis de tester cette association dans un modèle animal qui soit le plus proche possible de l'Homme.

Les cellules souches évaluées ici sont les cellules souches issues du liquide amniotique dont nous verrons qu'elles font partie de la famille des cellules souches mésenchymateuses. Ces cellules possèdent des propriétés thérapeutiques potentielles qui seraient particulièrement intéressantes dans le domaine de la transplantation d'organes solides. Leur mode d'obtention et leurs caractéristiques font de ces cellules d'excellentes candidates pour devenir à moyen terme des produits de thérapie cellulaire chez l'Homme.

La transplantation d'organe, et la transplantation rénale en particulier, sont particulièrement touchées par la pénurie d'organe, et le besoin de recruter de nouveaux donneurs est plus que jamais d'actualité. Cet élargissement des critères de sélection des donneurs conduit les équipes de transplantation à s'écarter des donneurs optimaux, et donc à greffer des organes de qualité moindre. L'une des grandes problématiques actuelles en transplantation rénale est donc de développer des thérapeutiques permettant d'utiliser les greffons *a priori* de moins bonne qualité, et d'augmenter ainsi les chances de succès de ces greffes.

Dans ce contexte, l'injection de cellules souches en vue d'accélérer la régénération de l'organe greffé semblerait être une bonne piste thérapeutique nécessitant néanmoins préalablement une évaluation préclinique pertinente. Lors de ce projet, il a donc été développé un modèle préclinique de transplantation rénale permettant de recréer assez fidèlement le contexte de la greffe de reins issus d'une certaine catégorie de donneurs à critères élargis : les donneurs décédés après arrêt cardiaque. Le modèle a été développé pour cibler spécifiquement les lésions subies par l'organe dans ce genre de situation, en s'affranchissant des problématiques de rejet immunitaire. La taille et la physiologie du porc, proches de celle de l'Homme, ainsi que la longue durée du suivi après transplantation s'inscrivent parfaitement dans les préconisations de l'EMA (European Medicines Agency) et de l'Agence de Biomédecine concernant l'évaluation préclinique des produits de thérapie cellulaire.

La première partie de cette thèse aura pour objectif de définir précisément ce qu'est une cellule souche et de décrire les différentes familles de cellules souches susceptibles d'avoir un intérêt thérapeutique. Dans cette première partie, nous avons volontairement choisi d'aborder ces cellules sous un angle pharmaceutique. Nous avons donc mis l'accent sur le contexte législatif encadrant leur développement, puis j'ai dressé un état des lieux des essais cliniques et des produits réellement sur le marché utilisant des cellules souches, ainsi que les progrès à réaliser en matière de développement de ces thérapies.

La deuxième partie du travail concernera plus spécifiquement la transplantation rénale. Les problématiques actuelles de la transplantation rénale y seront abordées, comme la disponibilité des greffons, puis seront décrits précisément les processus lésionnels impliqués dans la transplantation, en mettant de côté l'aspect purement immunologique du rejet d'organe. Enfin les stratégies thérapeutiques en cours de développement visant à augmenter l'efficacité de la transplantation rénale seront exposées, notamment dans le cadre de l'élargissement des critères de sélection des donneurs.

Enfin, la troisième partie du travail sera consacrée aux travaux *in vitro* et *in vivo* d'évaluation préclinique de l'utilisation des cellules souches issues du liquide amniotique dans le cadre de la transplantation d'organe. Nous verrons que les résultats de l'étude sont plutôt encourageant, même si l'utilisation à court terme de ces cellules chez l'Homme n'est pas encore envisageable.

PARTIE I: LES CELLULES SOUCHES HUMAINES EN THERAPEUTIQUE

I. DEFINITION

A. CELLULES SOUCHES

Le terme de cellule souche humaine a été avancé pour la première fois en 1998 par Thomson, lorsque lui et son équipe sont parvenus à isoler et mettre en culture des cellules issues de blastocystes humains dans un état indifférencié[1]. Ces cellules, qui semblent pouvoir se répliquer de manière indéfinies sans dérive tumorale apparente, sont capables de fournir tous les tissus existant dans le corps humain. Les cellules décrites par cette étude sont les premières cellules souches embryonnaires (cellules ES) isolées chez l'homme. Depuis, les connaissances sur les cellules souches ont considérablement évolué, avec la découverte de nouveaux types de cellules souches, autres que celles issues de l'embryon[2, 3].

Une cellule souche est définie comme une cellule qui se divise de manière asymétrique, qui est capable d'auto-renouvellement et qui peut se différencier vers différentes lignées cellulaires.

B. DIVISION ASYMETRIQUE

Classiquement, une cellule de l'organisme va, au cours de sa prolifération, se diviser pour donner deux cellules "filles" identiques à la cellule initiale. Il s'agit là d'une division dite symétrique, principal mode de prolifération des cellules de l'organisme. Les cellules souches quant à elles caractérisées par un mode de division dit asymétrique, dans lequel la cellule initiale va se diviser en deux cellules différentes: l'une qui lui est identique en tous points, et l'autre dont le destin sera différent et qui sera amenée à avoir des propriétés différentes de celles de la cellule souche initiale[4]. Cette division asymétrique regroupe donc deux phénomènes distincts: l'auto-renouvellement (lorsque la cellule fille est identique à la cellule souche initiale) et la différenciation (lorsque la cellule fille est différente de la cellule souche initiale) (Figure 1).

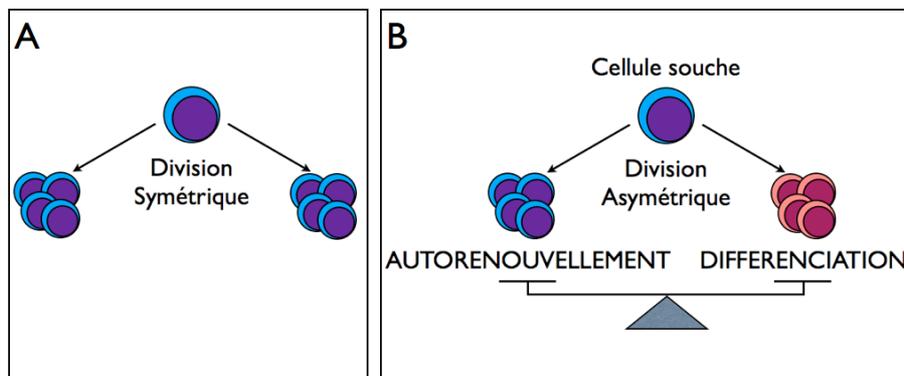


Figure 1: Division asymétrique des cellules souches

(A) Représentation de la division symétrique, caractéristique de la majorité des cellules de l'organisme Humain, et dans laquelle une cellule va se diviser en deux cellules identiques entre elles et à la cellule d'origine. (B) Représentation de la division asymétrique, spécifique aux cellules souches, au cours de laquelle la cellule souche va se diviser en une cellule différente, plus spécialisée, (différenciation) et/ou une cellule identique la cellule d'origine, permettant de renouveler le capital initial de cellules souches (auto-renouvellement).

C. AUTO-RENOUVELLEMENT

L'auto-renouvellement est la capacité qu'a une cellule souche de donner par division une cellule fille identique à la cellule mère, tout en gardant la possibilité de se différencier ultérieurement. Ce mécanisme permet le maintien de la cellule souche à l'état indifférencié[4, 5].

C'est une caractéristique fonctionnelle, si ce n'est la caractéristique fonctionnelle fondamentale des cellules souches. L'équilibre entre auto-renouvellement et différenciation est en effet d'une importance cruciale dans le maintien de la population initiale de cellules souches, particulièrement chez l'adulte. En effet, ces cellules sont présentes en très faibles quantités au sein de l'organisme et se divisent très peu et très lentement. Contrairement aux cellules ES qui peuvent se multiplier indéfiniment, certaines cellules souches adultes (CSA) n'ont qu'une capacité de multiplication limitée avant d'entrer en sénescence. Ce contrôle précis de l'auto-renouvellement permet donc à ces CSA d'être présentes tout au long de la vie de l'individu.

La notion d'auto-renouvellement des cellules souches, et principalement des CSA, est indissociable du concept de l'existence de "niches". Ces niches sont des régions anatomiques au sein desquelles une population hétérogène de cellules permet la création d'un microenvironnement particulier permettant le contrôle de l'état de différenciation des cellules souches[5-8]. (Figure 2)

Les cellules stromales de la niche vont pouvoir influencer sur l'équilibre entre auto-renouvellement et différenciation, grâce à un mécanisme complexe associant la libération de cytokines spécifiques, ainsi que des contacts directs cellule/cellule permettant la modulation de voies de signalisation intracellulaires particulières[9].

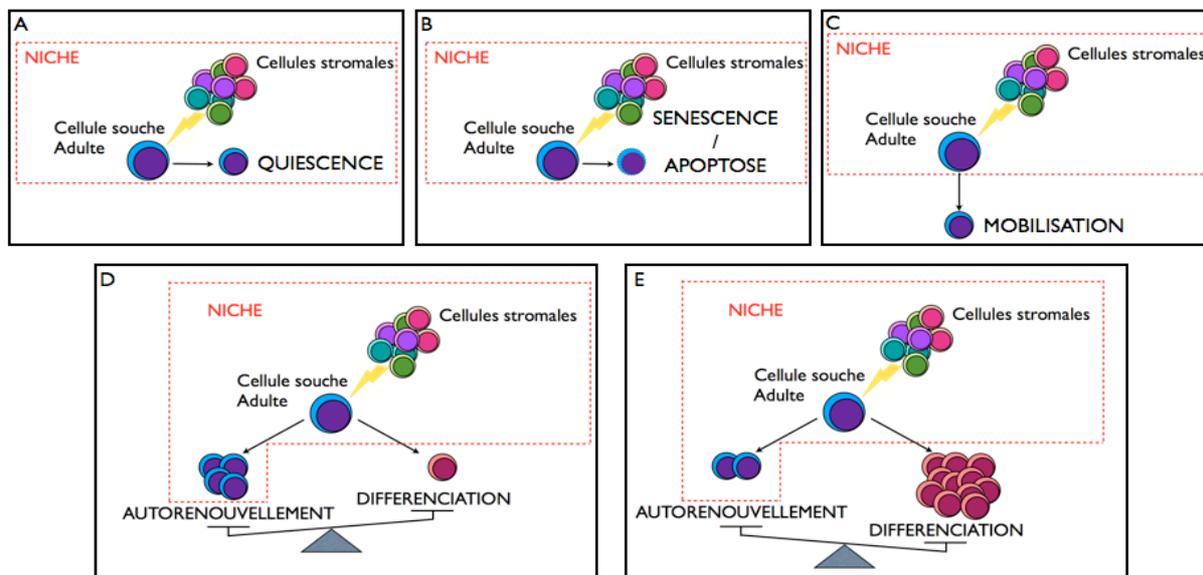


Figure 2: Destinées des cellules souches.

Au sein de la niche, le microenvironnement cellulaire et notamment les cellules stromales vont réguler l'équilibre entre l'entrée en quiescence (A), l'entrée en apoptose (B), la mobilisation hors de la niche (C), ou le déclenchement d'une voie de division privilégiant l'auto-renouvellement (D) ou la différenciation (E) des cellules souches adultes (CSA).

Parmi les facteurs solubles responsables du maintien des cellules souches dans un état indifférencié, le basic Fibroblast Growth Factor (bFGF), l'Insulin-like Growth Factor (IGF), le Transforming Growth Factor beta (TGF β), le Bone Morphogenic Protein (BMP) et le Leukemia Inhibitory Factor (LIF) semblent les plus importants[4, 10-12]. Ils entrent d'ailleurs fréquemment dans la composition des milieux de cultures *in vitro* des cellules souches pluripotentes. La transduction du signal en aval de la liaison des ligands avec leurs récepteurs spécifiques passe par l'activation de kinases spécifiques (PI3K, JAK, MAPK) pour IGF, bFGF et LIF, ou par la dimérisation de protéines Smad pour TGF β et BMP. Ces kinases vont ensuite entraîner l'activation de facteurs de transcriptions régulant l'expression de gènes de pluripotence dont les plus importants sont Oct-4, Sox-2 et NANOG[13]. L'activation de la voie de BMP a pour conséquence une inhibition de l'expression de ces gènes de pluripotence et favorise donc la différenciation des cellules souches[14].

Récemment, l'importance des voies de Wnt/ β caténine, de Notch ainsi que celle de Hedgehog/Sonic Hedgehog a été mise en avant dans le contrôle de la différenciation des cellules souches pluripotentes et multipotentes, et particulièrement chez les cellules souches hématopoïétiques (CSH)[15].

L'expression de molécules d'adhésion par les cellules souches (LFA-1, VLA-4) et les cellules stromales (ICAM-1/2 et VCAM-1) sont indispensables à la régulation de la mobilité des cellules souches au sein de l'organisme[9] (Figure 3). Inversement, des cellules souches présentes dans la circulation sont susceptibles de rejoindre spécifiquement leur niche par un phénomène de "homing". Ce homing permet la colonisation de la moelle osseuse du receveur par les CSH du donneur après leur injection systémique, lors de la greffe de moelle osseuse.

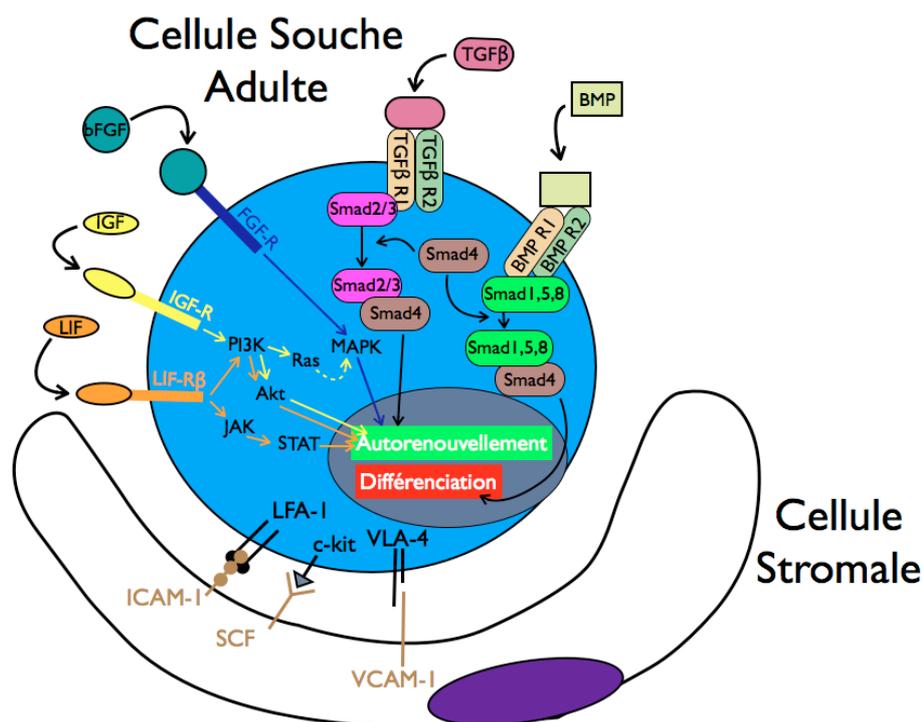


Figure 3 : Régulation des cellules souches par les cellules stromales de la niche.

Les principales voies intracellulaires de transduction du signal sont également représentées. LIF: Leukemia Inhibitory Factor. LIF-R β : LIF Receptor beta. JAK: Janus Kinase. STAT: Signal Transducers and Activators of Transcription. IGF: Insulin-like Growth Factor. IGF-R: IGF Receptor. PI3K: Phosphatidyl Inositol 3 Kinase. MAPK: Mitogen Associated Protein Kinase. bFGF: basic Fibroblast Growth Factor. FGF-R: Fibroblast Growth Factor Receptor. TGF β : Transforming Growth Factor. TGF β -R: TGF β Receptor. BMP: Bone Morphogenic Protein. BMP R: BMP Receptor, VLA-4 : Very Late Antigen-4, VCAM-1 : Vascular Cell Adhesion Molecule-1, SCF : Stem cell Factor, LFA-1 : Lymphocyte Function-associated Antigen-1, ICAM-1 : InterCellular Adhesion Molecule-1. Adapté de Niwa et al., Nature 2009; Wang et al, Blood 2007; Xu et al., Cell Stem Cell 2008.

Cette notion de niche s'applique également à des cellules souches cancéreuses qui semblent être présentes au sein de la tumeur, dont le microenvironnement est caractérisé principalement par une hypoxie plus ou moins sévère. La mobilisation de ces cellules cancéreuses hors leur niche semblerait être l'élément déclencheur de la dissémination métastatique[16].

L'auto-renouvellement, quoique indispensable à la définition de la cellule souche, n'est pas le seul mécanisme justifiant l'engouement des chercheurs pour ces cellules ces dernières années. En effet, la possibilité qu'ont ces cellules de pouvoir se différencier en cellules d'une multitude de tissus suscite curiosité, espoirs mais aussi inquiétude, non seulement chez les scientifiques, également chez le grand public.

D. DIFFERENCIATION

La différenciation est la capacité de donner, à partir d'une cellule, une ou plusieurs lignées cellulaires aux caractéristiques différentes de la cellule initiale. Cette propriété de différenciation est partagée par l'ensemble des cellules souches, quoique à un degré divers, et joue ainsi un rôle important dans la définition des différents types de cellules souches existant chez l'embryon ou chez l'homme adulte. Le pouvoir de différenciation de ces cellules est d'ailleurs à la base de leurs hiérarchisations possibles.

Ainsi les cellules sont dites "totipotentes" lorsqu'une seule d'entre elles a la capacité de donner un embryon ainsi que ses annexes, et donc, *in fine* un organisme entier[17]. Il s'agit des cellules de la morula, ensemble de cellules résultant de la fécondation d'un ovocyte par un spermatozoïde. Ces cellules, peu nombreuses, n'existent que précocement et transitoirement lors du développement de l'embryon.

Très vite au cours de la gestation (5^{ème} jour), ces cellules vont se différencier en cellules dites "pluripotentes". Celles ci peuvent donner naissance à un embryon, mais sans ses annexes embryonnaires. Elles ont donc perdu leur capacité à donner naissance à un organisme entier. Ces cellules sont localisées dans la masse cellulaire interne du blastocyste, et sont plus communément appelées cellules souches embryonnaires ou cellules ES[18]. Il existe également des cellules souches pluripotentes artificiellement générées à partir de cellules adultes : ce sont les cellules souches pluripotentes induites (cellules iPS)[19].

Aux stades plus tardifs du développement embryonnaire puis fœtal, ainsi que chez l'adulte peuvent être isolées des cellules souches dites "multipotentes" qui ne peuvent plus se différencier que vers un nombre limité de tissus[20].

Les cellules "oligopotentes" ne peuvent plus se différencier qu'en un nombre limité de cellules appartenant à un tissu donné [21](cas des cellules souches de la peau).

Enfin, il existe des cellules souches dites "unipotentes" capables de ne donner qu'un seul type de cellule, en plus de leur capacité d'auto-renouvellement, comme par exemple les cellules souches épidermiques ne pouvant donner que des kératinocytes[22]. (Figure 4)

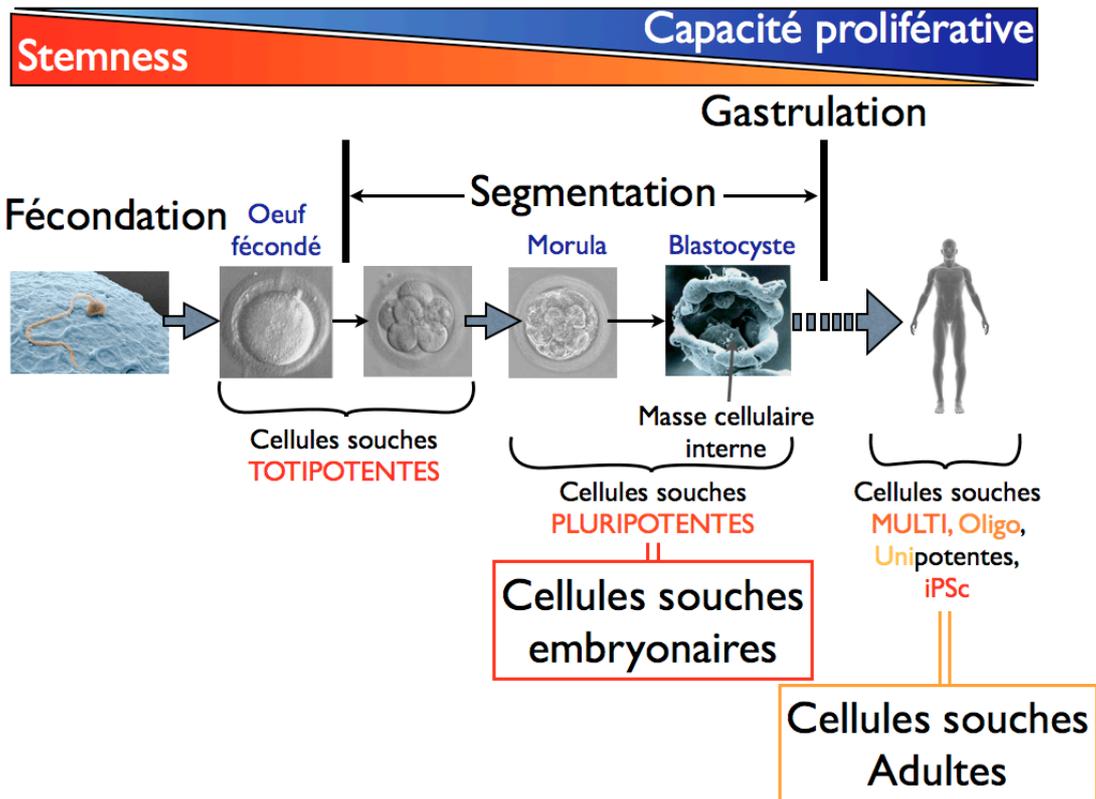


Figure 4: Types de cellules souches en fonction du stade de développement.
 Représentation générale des différents types de cellules souches chez l'Homme, en fonction de leur potentiel de différenciation et du stade de développement auquel elles sont présentes. iPSc: cellules souches pluripotentes induites.

La classification des cellules souches peut donc être vue comme une pyramide, avec au sommet les cellules souches totipotentes, peu nombreuses, au potentiel de différenciation le plus élevé, mais dotées d'une faible capacité de prolifération. A la base de cette pyramide se trouvent des cellules, certes plus nombreuses et pouvant proliférer plus rapidement, mais au pouvoir de différenciation (et donc au potentiel thérapeutique) de plus en plus limité. Intuitivement, cette classification suggère une évolution des cellules souches en cascade, de haut en bas et en sens unique: une cellule totipotente va se différencier en cellules pluripotentes, qui elles mêmes vont se différencier en cellules multipotentes, et ainsi de suite jusqu'à obtenir une cellule totalement différenciée à la fonction physiologique clairement établie.

II. PRINCIPAUX TYPES DE CELLULES SOUCHES

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, le terme cellule souche désigne des cellules partageant 3 propriétés communes que sont la division asymétrique, l'auto-renouvellement et la capacité de se différencier. Nous verrons que les cellules souches diffèrent en fonction de leur localisation anatomique, du stade de développement auquel elles sont présentes, et du contexte physiopathologique dans lequel elles sont prélevées.

Ces différences ayant un retentissement sur leur intérêt thérapeutique potentiel, il convient donc de décrire les principales catégories de cellules souches existantes.

Nous aborderons également, quoique de manière moins approfondie, la problématique des cellules souches cancéreuses, qui seront très probablement à l'origine d'un changement radical dans la manière de concevoir les thérapies anticancéreuses.

A. LES CELLULES SOUCHES EMBRYONNAIRES

Si les premières cellules ES ont été isolées d'embryons murins en 1981 par Evans et Kaufmann[23], il a fallu attendre 17 ans pour que Thomson et son équipe parviennent à cultiver les premières cellules ES humaines[1].

Les cellules ES sont présentes de manière transitoire lors du développement embryonnaire (5-7^{ème} jour de développement) et sont présentes dans l'embryon au stade morula (64 cellules) puis au niveau de la masse cellulaire interne de l'embryon au stade blastocyste. Ces cellules sont qualifiées de cellules souches pluripotentes car chacune d'elle a la propriété de donner naissance un embryon, à l'exception des annexes embryonnaires (placenta).

Actuellement, les cellules ES étudiées *in vitro* sont essentiellement prélevées à partir de la masse cellulaire interne du blastocyste. Cette masse cellulaire interne est isolée après effraction de la zone pellucide et du trophoctoderme, qui constituent la couche externe du blastocyste[24].

Les cellules ES issues de la masse cellulaire interne sont ensuite mises en culture dans des milieux de cultures spécifiques destinés à les maintenir dans un état indifférencié tout permettant leur multiplication. Outre ces milieux de culture spécifiques, la culture des cellules ES nécessitent la présence de cellules nourricières afin de les obliger à conserver l'état indifférencié qui les caractérise[25]. Les cellules nourricières classiquement utilisées pour la culture de cellules ES sont des fibroblastes embryonnaires humains ou murins dont les capacités de prolifération ont été inhibées de manière irréversible par traitement à la mitomycine ou par irradiation. Cette méthode de culture consiste en fait à recréer *in vitro* une niche artificielle comme celle-ci a été décrite plus haut. Les récentes innovations dans le domaine de la culture de ces cellules ont néanmoins permis l'apparition de techniques de culture permettant de s'affranchir de ces cellules nourricières[25].

Les cellules ES sont caractérisées par l'expression de marqueurs membranaires spécifiques (Tra 1-60, SSEA-3, SSEA-4), de la phosphatase alcaline et de facteurs de transcriptions responsables du maintien de la pluripotence (NANOG, Oct-4 ou Pou5f1, Sox-2, TDGF-1)[26]. Les cellules ES présentent une capacité de prolifération apparemment illimitée. La question de savoir si cette prolifération *in vitro* s'accompagne ou non de l'acquisition d'anomalies génétiques reste actuellement en suspend[27]. La pluripotence des cellules ES peut être évaluée par leur capacité à former des tératomes après injection à la

souris immunodéprimée NOD-SCID (Non Obese Diabetic-Severe Common Immunodeficiency Disease)[28, 29].

Les tératomes sont des tissus ectopiques, d'apparence éventuellement primitive qui peuvent se développer de manière spontanée et pathologique chez l'individu adulte[28, 30]. Ce sont des tumeurs rarement malignes, dont la résection chirurgicale constitue un traitement habituellement efficace[30]. Un tératome mature peut renfermer des cheveux, des dents ou autre, ce qui justifie parfaitement l'étymologie grecque du terme qui signifie "tumeur monstrueuse".

Nous verrons plus tard que l'étude de la formation de tératomes est particulièrement importante pour le contrôle qualité de cellules différenciées obtenues à partir de cellules pluripotentes. En effet, la formation possible d'un tératome après injection, par contamination de la suspension de cellules différenciées par des cellules indifférenciées résiduelles est une des grandes problématiques de ce type de traitement[28].

Cette pluripotence peut également être évaluée *in vitro*. En effet, lorsque les cellules pluripotentes sont cultivées en l'absence de cellules nourricières, en l'absence de facteurs de croissance maintenant de la pluripotence comme le bFGF, et en conditions non adhérentes, celles-ci ont la particularité de former des corps embryonnaires (EB). Lors de la culture prolongée de ces EB, les cellules vont se différencier spontanément. Cette différenciation spontanée peut alors être mise en évidence par une dissection des EB et un marquage spécifique révélant des cellules appartenant aux trois types de feuillet embryonnaires[31].

Les cellules ES humaines sont exclusivement issues d'embryons obtenus par fécondation *in vitro* dans le cadre de programmes d'aide médicale à la procréation (Agence de Biomédecine). Ce sont alors des embryons pour lesquels les parents ont abandonné tout projet parental. En raison de la capacité de prolifération indéfinie, les études expérimentales sur les cellules ES sont conduites sur des lignées dont le mode d'obtention strictement encadré. Il existe actuellement 211 lignées de cellules ES humaines dans le monde dont l'utilisation est approuvée par le National Institute of Health américain. Seule 28 lignées françaises de cellules ES ont été constituées en France, mais les 37 équipes françaises autorisées à travailler sur les cellules ES et sur l'embryon, peuvent déposer une demande d'importation de lignées en France auprès de l'Agence de Biomédecine.

De par leur pluripotence, et donc leur capacité de se différencier en toute cellule de l'organisme adulte, les cellules ES sont les cellules souches au potentiel thérapeutique le plus élevé, malgré la formation de tératomes chez le receveur après leur injection. Néanmoins, comme nous le montrerons par la suite, en raison de la destruction de l'embryon accompagnant le prélèvement des cellules ES, l'utilisation de ces cellules en thérapeutique ou en recherche purement cognitive se heurte à d'importants problèmes éthiques[32]. Les cellules souches d'origine adulte permettent de s'affranchir de ces considérations éthiques et font d'ailleurs déjà l'objet de certains protocoles d'essais cliniques à un stade avancé.

B. LES CELLULES SOUCHES ADULTES

Les cellules souches adultes (CSA) sont des cellules présentant au maximum des propriétés de multipotence (capacité de différenciation vers les cellules d'un feuillet embryonnaire précis, sans capacité de formation d'un organisme entier). Les cellules de carcinome embryonnaires étant des cellules pathologiques pluripotentes, ne rentrent pas dans le groupe des CSA, malgré leur présence chez l'adulte[28].

Les CSA ont perdu la capacité d'auto-renouvellement apparemment illimitée des cellules ES, en raison notamment d'une diminution de l'activité des télomérases provoquant un raccourcissement des télomères et donc une senescence progressive[33].

Néanmoins les CSA présentent une capacité de prolifération en général suffisante pour couvrir les besoins de l'organisme, principalement parce que ces cellules sont majoritairement maintenues à un état quiescent (phase G0 du cycle cellulaire). Le contrôle de cette quiescence est un phénomène extrêmement important dans le maintien de la population des ces CSA tout au long de la vie adulte.

Les CSA sont isolées de différents tissus, et notamment de ceux présentant un renouvellement rapide, comme la moelle osseuse, le tissu adipeux et la muqueuse intestinale[20, 34]. Ce renouvellement est précisément du à la présence d'un faible contingent de cellules souches au sein de ces tissus. Il faut d'ailleurs noter que des cellules souches neurales ont été identifiées dans le cerveau, et leur présence suggère une capacité de renouvellement de cet organe[7, 35]. Cette découverte va à l'encontre de la notion communément acquise présentant le cerveau comme l'un des rares organes à ne pas présenter la capacité de se régénérer.

Parmi les CSA nous ne parlerons que des Cellules Souches Mésenchymateuses, famille à laquelle appartiennent les cellules souches issues du liquide amniotique que nous utiliserons dans la partie expérimentale, et des cellules souches cancéreuses, en raison de leur potentiel thérapeutique.

1. Les Cellules Souches Mésenchymateuses

Les cellules souches mésenchymateuses (CSM) sont des cellules souches adultes, facilement isolables, hétérogènes et multipotentes.

En 2006, M. Dominici a proposé une combinaison minimale de critères fonctionnels et de marqueurs de surface spécifiques, pour la définition des CSM, critères validés par la société internationale de thérapie cellulaire (ISCT)[36].

Ainsi une CSA, pour être qualifiée de CSM, doit pouvoir adhérer au plastique dans des conditions standards de culture, c'est à dire sans cellules nourricières (à la différence avec les

cellules ES) ou sans recouvrir le plastique de molécules de la matrice extra cellulaire facilitant l'adhésion cellulaire (gélatine, fibronectine).

Les CSM doivent exprimer à plus de 95% le CD105 (endoglin), le CD73 (ecto 5' nucléotidase) et le CD90 (Thy-1), mais doivent être négatives (< 2%) pour le CD45 (marqueur pan-leucocytaire), le CD34 (marqueur des cellules souches hématopoïétiques et des progéniteurs endothéliaux), le CD14 ou le CD11b (marqueurs des monocytes/macrophages), le CD79 α ou le CD19 (marqueurs des lymphocytes B), ainsi que les molécules du HLA-DR. Les marqueurs qui ne doivent pas être détectés correspondent aux types cellulaires adhérents sur plastique susceptibles de contaminer les cultures cellulaires.

Enfin les CSM doivent démontrer leurs propriétés de différenciation *in vitro* en ostéoblastes (tissu osseux), chondrocytes (tissu cartilagineux) et en adipocytes (tissu grasseux). Cette différenciation est induite par la mise en culture dans des milieux facilitant cette différenciation et contenant notamment de la dexaméthasone, du β glycérophosphate et de l'acide ascorbique pour la différenciation en ostéoblastes, du TGF β 3 pour la différenciation en chondrocytes et de la dexaméthasone, de l'insuline et de l'indométhacine pour la différenciation en adipocytes.

Les CSM peuvent donc se différencier en cellules issues du mésenchyme embryonnaire et donc également en cellules musculaires comme les cardiomyocytes, ce qui a justifié l'engouement de la recherche sur ces cellules pour traiter les ischémies myocardiques[37].

Néanmoins il a été montré que ces CSM pouvaient se différencier en cellules qui n'ont pas pour origine le mésenchyme embryonnaire, comme les neurones, les hépatocytes et les cellules épithéliales[38]. Ces données posent la question de savoir si les CSM sont seulement des cellules multipotentes ou bien des cellules pluripotentes, car en principe seules les cellules souches pluripotentes peuvent, en théorie, se différencier en cellules issues de 3 feuillettes embryonnaires. Il existe donc une plasticité spécifique aux CSM leur permettant de plus grandes capacités de différenciation que les autres CSA. Diverses explications sont avancées, comme une dédifférenciation des CSM leur permettant d'augmenter leur répertoire de différenciation[39, 40] ou encore une plasticité « naturelle » commune aux cellules issues du mésenchyme embryonnaire, celui-ci subissant des fluctuations importantes de phénotypes, à des stades précoces du développement embryonnaire[41]. Le mécanisme exact à l'origine de cette plasticité n'a, pour l'instant, pas encore été entièrement expliqué.

Cette plasticité dans la différenciation des CSM présente l'avantage de diversifier énormément les indications possibles de leur utilisation dans le cadre de la régénération tissulaire. Nous avons vu que leur différenciation possible en cardiomyocytes a entraîné l'évaluation des CSM dans la réparation post ischémie du myocarde[37]. Les CSM ont également été testées dans le traitement de l'ischémie des membres inférieurs pour leur capacité à se différencier en cellules endothéliales[42, 43]. De plus, l'usage des CSM combinées ou non à des biomatériaux poreux a été investiguée dans les grandes pertes osseuses et les pseudarthroses en raison de leur potentiel de différenciation en ostéoblastes[44, 45]. Enfin il faut noter que les CSM sont également à l'étude dans la réparation de l'épithélium cornéen[46]. Cette liste d'applications potentielles n'est pas exhaustive et les CSM sont des cellules au potentiel thérapeutique très important.

Cette pseudo pluripotence peut également avoir un inconvénient majeur. Nous avons vu précédemment que les cellules souches pluripotentes induisent la formation de tératomes au niveau de leur point d'injection. Cette formation de tératome constitue un effet indésirable majeur lié à l'utilisation des cellules souches pluripotentes et des cellules différenciées qui en sont dérivées. Or les CSM ne semblent pas induire de tératome chez la souris NOD-SCID, mais cela suffit-il à déduire que cette utilisation est totalement sûre? En effet beaucoup des applications thérapeutiques des CSM impliquent une amplification de ces cellules jusqu'à obtenir un nombre de cellules suffisant avant injection. Certaines équipes ont décrit une instabilité génétique des CSM pouvant aboutir à leur transformation et l'apparition de tumeurs après injection chez la souris[47]. L'origine des CSM semble avoir un impact sur leur transformation potentielle, puisque jusqu'à maintenant seules les CSM issues du tissu adipeux ont été décrites comme pouvant se transformer en cellules souches cancéreuses[48].

Il est important de noter que cette transformation est déclenchée après de très longues périodes de culture (> 5 mois). Actuellement, les CSM sont testées dans des pathologies touchant des patients jeunes, et sont destinées à demeurer de manière prolongée chez ces patients. Ainsi, contrairement à des médicaments traditionnels, il n'y a aucun moyen de déterminer des paramètres de pharmacocinétique (temps de demie vie, vitesse d'élimination, diffusion...) pour ces CSM. Or si ces cellules sont potentiellement instables en culture, comment peut-on être certain de leur absence de tumorigénicité à long terme après injection? Ces problématiques de sécurité d'utilisation, qui seront par ailleurs plus précisément décrites dans la suite du texte, restent encore à explorer sur des modèles animaux permettant une période de suivi suffisamment longue afin de pouvoir affirmer que de telles thérapies impliquant les CSM sont totalement sûres.

En plus de leur capacité de différenciation, les CSM peuvent également sécréter des facteurs de croissance induisant la réparation des tissus et cellules situées à proximité. Cette action dite paracrine, plus que la différenciation en cellules fonctionnelles, semble être le mode d'action principal des CSM dans les pathologies de type ischémiques, et notamment dans le cas de l'ischémie myocardique[37, 40]. Parmi les facteurs de croissance sécrétés, nous pouvons citer le Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), l'Angiopoïétine-1 (Ang-1), l'Epidermal Growth Factor (EGF) et l'Hepatocyte Growth Factor (HGF) qui induisent la prolifération et la réparation des cellules endothéliales. Ce point précis présente un intérêt tout particulier dans le cadre du traitement des pathologies ischémiques[34, 49, 50].

D'autre part les CSM vont pouvoir recruter des cellules souches résidentes au niveau du site de lésion par la sécrétion de cytokines chimioattractantes, et remodeler la matrice extra cellulaire via la libération de matrice-métalloprotéases dont MMP-9.

Le profil de sécrétion des CSM, ou sécrétome, varie en fonction du tissu duquel les cellules ont été extraites. Ainsi le potentiel proangiogénique des CSM semble supérieur lorsque celles-ci sont issues du tissu adipeux (on parle de cellules souches dérivées du tissu adipeux ou ADSC)[34] que lorsqu'elles sont issues de la moelle osseuse. Il est donc pertinent d'étudier avec précision le sécrétome de CSM provenant de diverses sources tissulaires pour identifier celles qui seront les plus efficaces en fonction de la pathologie à traiter.

Il s'avère également que le microenvironnement cellulaire influe sur le sécrétome des CSM[51]. Cette observation est la base des nombreuses études de conditionnement de ces

cellules, au cours desquelles ces dernières sont soumises à différentes conditions de culture et dont les sécrétomes correspondant sont identifiés[52-54]. Dans ce cas précis, les CSM pourraient passer du statut de médicament directement injectable au patient, à celui de système de production de milieu d'intérêt thérapeutique[55]. Cette approche permettrait de s'affranchir de la problématique liée à l'injection de cellules potentiellement tumorigènes dans l'organisme du patient.

Les CSM ont également une autre propriété, qui a encore contribué à l'élargissement de leur utilisation thérapeutique potentielle. Cette propriété, indépendante de leur multipotence, est la capacité de moduler de manière remarquablement efficace la réponse immunitaire[56-59]. Cette propriété d'immunomodulation est dirigée contre la quasi totalité des cellules du système immunitaire. Les CSM peuvent endiguer une réponse immunitaire dérégulée et anarchique, telle qu'elle est présente dans les pathologies auto-immunes. Elles peuvent également contrôler une réponse immunitaire justifiée mais délétère comme celle caractéristique de la transplantation de cellules ou d'organes allogéniques. Grâce à l'expression du CD55, CD46 et CD59 et à la sécrétion du Facteur H les CSM empêchent l'activation du complément[60]. L'absence de déclenchement de réponse immunitaire à l'injection des CSM serait associée à l'absence de sensibilisation du receveur après injection.

Cette dernière donnée est importante car elle sous-entend que ces CSM pourraient être injectées de manière répétée, si elles n'étaient pas efficaces dès la première administration.

Néanmoins certaines études tendent à montrer une possible immunogénicité de certaines souches de CSM conduisant, dans certains cas, à la sensibilisation du receveur[58, 61].

Il semble que le potentiel immunomodulateur des CSM soit fortement augmenté dans un contexte inflammatoire. Ainsi les médiateurs pro-inflammatoires comme TNF- α (Tumor Necrosis Factor alpha), IL-1 α et β , ou anti-inflammatoires comme l'IFN- γ (Interferon gamma) activent les CSM qui libèrent des facteurs inhibant la réponse inflammatoire. Il est également observé que les CSM injectées sont préférentiellement recrutées au niveau des sites de lésion. Le mécanisme impliqué n'est pas encore totalement élucidé mais semble impliquer des molécules chimioattractantes comme les fractions C5a et C3a du complément[56, 58, 62].

Parmi les facteurs inhibiteurs sécrétés par les CSM, certains vont pouvoir agir sur la réponse immunitaire innée. Cette immunité stérile va pouvoir être déclenchée même si l'organisme n'a jamais été confronté à l'antigène. La réponse immunitaire innée implique des leucocytes mais également des barrières anatomiques. Les cibles de l'action immunomodulatrice des CSM sur la réponse immunitaire innée sont les cellules Natural Killer (NK), les Polynucléaire Neutrophiles (PNN) les Monocytes (MO) et les Macrophages (MA). Les PNN et les MA sont des cellules phagocytaires, qui éliminent leurs cibles par phagocytose. Les MO, en s'infiltrant dans les tissus, deviennent des MA qui sont également capables de sécréter des molécules proinflammatoires et chimioattractantes responsables de l'entretien et de l'expansion de la réponse immunitaire. Les cellules NK sont susceptibles de se lier aux cellules modifiées comme les cellules cancéreuses ou infectées, et les détruire. Les

cellules NK peuvent également sécréter de l'IFN- γ , médiateur impliqué dans la réponse antivirale.

Les CSM, principalement par la sécrétion d'IL-10, de monoxyde d'azote (NO) et de Prostaglandine E-2 (PGE-2), vont pouvoir inhiber le recrutement, la mobilité et l'activité de phagocytose des MA, ainsi la différenciation des MO circulants en MA pouvant alors migrer dans les tissus[63]. La sécrétion de cette même PGE-2 et de TGF- β par les CSM va pouvoir inhiber la libération de l'IFN- γ par les cellules NK. Elle inhibe également leur prolifération, l'expression de certains récepteurs impliqués dans leur action cytotoxique, et répriment ainsi la lyse cellulaire dont sont responsables les cellules NK[58].

Ce mécanisme repose également sur l'action de l'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) de CSM qui provoque la dégradation du tryptophane extracellulaire en métabolites anti-inflammatoires de la famille des kynurénines.

Enfin les CSM vont inhiber l'apoptose et l'explosion oxydative causée par les PNN, par un mécanisme qui reste encore incertain mais qui semblerait impliquer la libération de l'IL-6[63].

Les CSM vont également pouvoir réguler la réponse immunitaire dite spécifique ou adaptative, car spécialement tournée contre à un antigène donné. Cette réponse fait intervenir 3 grands types de cellules : les cellules dendritiques (CD), les Lymphocytes B (LyB) et les Lymphocytes T (LyT). Les CD et les LyB sont également appelés cellules présentatrices de l'antigène (CPA). Ces CPA vont reconnaître l'antigène ou la cellule étrangère (non soi), l'internaliser et le présenter à leur surface aux lymphocytes T (LyT). En plus de cette capacité à présenter l'antigène, les LyB peuvent se différencier en plasmocytes sécrétant les anticorps spécifiques de l'antigène. Les CPA vont également permettre la sélection des lymphocytes les plus spécifiques de l'antigène.

Certains LyT vont avoir une action cytotoxique directe, d'autres vont sécréter des cytokines permettant de mobiliser, activer et coordonner les cellules effectrices de la réponse immunitaire. Certains sous-types de LyT vont être générés pour garder en mémoire l'antigène. Lors d'une deuxième exposition au même antigène, ces cellules vont permettre d'initier une réponse immunitaire plus rapide.

Une sous-population de LyT, appelée LyT régulateurs (Treg), a été récemment identifiée. Ces Treg ont la particularité de réguler la réponse immunitaire adaptative et de permettre l'induction d'un état de tolérance plus ou moins spécifique vis à vis d'un antigène. Dans ce cas précis, une cellule allogénique (non soi) sera acceptée par le système immunitaire comme faisant partie intégrante du "soi". L'induction de l'état de tolérance est particulièrement recherchée dans le cadre de la transplantation d'organes ou de cellules allogéniques, car il pourrait permettre d'éviter tout rejet immunitaire, tout en sevrant le patient de son traitement immunosuppresseur aux effets indésirables parfois graves[64].

Les CSM vont pouvoir moduler la réponse immunitaire adaptative en agissant sur les trois types cellulaires impliqués. Elles vont inhiber la prolifération des LyB et leur activation en plasmocytes, majoritairement par sécrétion de PGE-2 et leur activité IDO. Elles vont diminuer la génération de CD immatures (CDi) à partir des MO par libération de PGE-2, IL-

6, TGF β . Les CSM vont aussi inhiber la maturation des CDi par sécrétion d'IL-6 et par contact cellulaire direct via la voie de Notch/Jagged. Elles vont également modifier le profil de sécrétion des CD vers un profil plutôt anti-inflammatoire avec une inhibition de la libération de l'IFN- γ , du TNF- α et de l'IL-12 ainsi qu'une activation de la sécrétion de l'IL-10 par les CD matures (CDm)[58, 62, 65]. L'IL-10 peut induire la génération de Treg périphériques tolérogènes.

Enfin, les CSM vont inhiber, principalement par l'intermédiaire d'IL-6, TGF- β , HGF,IDO, NO et PGE-2, la prolifération et la sécrétion d'IFN- γ des LyT, mais également inhiber la génération de LyT cytotoxique. Par la sécrétion de TGF- β , les CSM vont également privilégier la génération de Treg[66, 67] (Figure 11). Ce potentiel immunomodulateur semble indépendant du statut allogénique ou autologue des CSM utilisées en thérapeutique[61, 68].

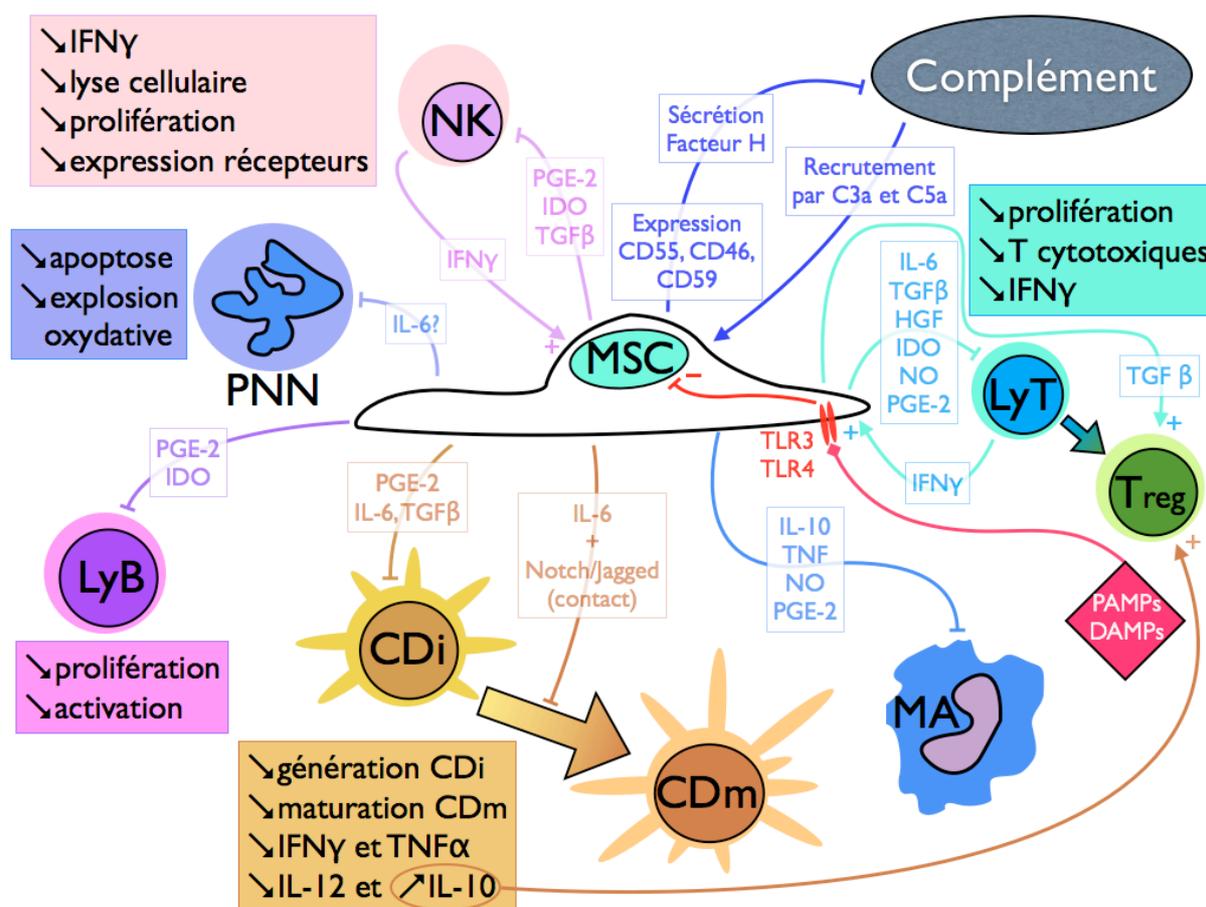


Figure 5 : Immunomodulation par les cellules souches mésenchymateuses.

Représentation générale des mécanismes à la base des propriétés immuno modulatrices de CSM sur les différentes populations de cellules impliquées dans la réponse immunitaire. CSM : cellule souche mésenchymateuse NK : Natural Killer, PNN : Poly Nucléaires Neutrophiles, LyB : Lymphocytes B, Cdi : Cellules Dendritiques immatures, Cdm : Cellules Dendritiques matures, MA : Macrophages, PAMPs : Pathogen Associated Molecular Paterns, DAMPs : Damage Associated Molecular Paterns, LyT : Lymphocyte T, Treg : Lymphocyte T régulateur, PGE-2 : Prostaglandine E-2, IDO : indoleamine 2,3-dioxygénase, TGF- β : Transforming Growth Factor betta, IFN- γ : Interféron gamma, TNF α : Tumor Necrosis factor alpha, NO : Nitric Oxyde, TLR : Toll Like Receptor, HGF : Hepatocyte Growth Factor.

Par l'expression de nombreux médiateurs, les CSM peuvent donc réprimer la réponse inflammatoire et immunitaire, qu'elle soit innée ou adaptatrice, et privilégier la génération de cellules tolérogènes telles que les Treg. Cette propriété remarquable peut être bénéfique dans

le traitement de pathologies auto-immunes ou inflammatoires chroniques (Polyarthrite Rhumatoïde, Encéphalomyélite auto-immune, Lupus Erythémateux Disséminé[69-71]), ainsi que dans la prévention du rejet de greffe[72, 73].

Les CSM ont la capacité de migrer préférentiellement vers les tumeurs, et d'y promouvoir la prolifération tumorale, l'invasion des tissus environnants et la dissémination métastatique[74]. Lorsqu'elles sont cultivées en normoxie, les CSM poussent en formant une monocouche avec inhibition de contact, comme les autres cellules de l'organisme. Mais ces mêmes cellules cultivées en hypoxie vont voir leur inhibition de contact progressivement abolie, et vont proliférer de manière plus rapide et plus anarchique[75]. Cette donnée pourrait suggérer la possibilité de transformation des CSM dans un environnement hypoxique (comme celui retrouvé dans les tumeurs cancéreuses), ce qui suggérerait une possible implication des CSM dans le déclenchement des cancers.

L'étude des CSM dans le domaine de l'oncologie pourrait ainsi s'orienter vers deux voies : comprendre les mécanismes à l'origine de ces propriétés pro-tumorales[74, 76] et de "homing" des CSM vers les cellules tumorales, mais également mettre à profit ce phénomène en utilisant les CSM dans un but diagnostique, comme traceur de tumeurs, ou en tant que vecteurs potentiels de molécules thérapeutiques anticancéreuses[77-79]. Dans le cas de l'utilisation thérapeutique de CSM, ces dernières peuvent être modifiées génétiquement de manière à exprimer des molécules induisant la mort des cellules tumorales[78].

Les cellules souches issues du liquide amniotique (Amniotic Fluid Stem Cells, AFSC) sont des cellules en suspension dans le liquide amniotique dans lequel baigne le fœtus[80]. Ces cellules sont actuellement utilisées à but uniquement diagnostique dans la détection prénatale des anomalies chromosomiques fœtales. Le liquide amniotique est alors ponctionné par amniocentèse, et les cellules amniotiques, qui proviennent uniquement du fœtus et non de la mère, sont mises en culture pour effectuer le caryotype. La technique d'amniocentèse est maintenant bien maîtrisée, avec un risque relativement réduit pour le fœtus. Devant le potentiel thérapeutique de ces cellules, certaines cliniques américaines ont déjà débuté la constitution de banques de cellules issues du liquide amniotique

La mise en culture sur support plastique des cellules issues du liquide amniotique, permet de sélectionner les AFSC qui sont, comme les CSM, adhérentes au plastique. Comme les CSM, les AFSC, ont la capacité à se différencier *in vitro* en plusieurs lignées cellulaires (ostéocytes, adipocytes, cellules nerveuses, cellules rénales). Ces AFSC sont également caractérisées par la présence des marqueurs CD73, CD105, CD90, ainsi que l'absence de CD34, CD45, CD11b, CD19 et HLA-DR[81, 82]. Injectés chez la souris, les AFSC ont la caractéristique de ne pas former de tératome. Ce sont des cellules extrêmement hétérogènes, regroupant des cellules avec un potentiel multipotent certain, et des cellules «non souche». Pour s'affranchir de cette hétérogénéité, les auteurs de certaines études ont trié les AFSC sur la base du c-kit[49, 83, 84], bien qu'il n'ait pas été prouvé que ce marqueur soit spécifique des AFSC «souches», et que son expression s'atténue au cours de la culture suivant le tri cellulaire[85].

Actuellement, 2 voies d'utilisation des AFSC sont en cours d'investigation : l'utilisation de la cellule en tant que telle, en exploitant ses capacités paracrines, de différenciation ou

d'immunomodulation, et son emploi comme base cellulaire pour la génération de cellules iPS, en raison de sa multipotence et de sa plasticité[80, 81, 86, 87]. Des études récentes ont essayé d'évaluer le potentiel thérapeutique des AFSC dans des pathologies ischémiques (membre, rein, cœur)[49, 82, 84, 88, 89]. Hauser et coll. ont démontré dans un modèle d'insuffisance rénale aiguë induite par le glycérol que l'injection d'AFSC humains chez la souris améliore la reprise de fonction rénale, induit la prolifération des cellules tubulaires et réduit l'apoptose. Ils ont également montré que les AFSC s'accumulent au niveau des capillaires péri-tubulaires jusqu'à 21 jours après l'injection et que leur action sera principalement liée à un effet paracrine et notamment la sécrétion de VEGF[84]. Cependant, aucune étude ne semble faire état de l'utilisation des AFSC dans le traitement ou la prévention des lésions d'Ischémie Reperfusion liées à la transplantation rénale, et encore moins dans un modèle de gros animal comme le porc.

2. Cellules Souches Cancéreuses

L'hypothèse initiale de l'existence de cellules souches cancéreuses (CSC) pouvant être à l'origine du développement de tumeurs provient de deux constatations. Dans les années 1970 tout d'abord, Mendelsohn puis Clarkson décrivent *in vitro* une hétérogénéité dans les capacités prolifératives des cellules au sein d'une même tumeur, que ce soit chez la souris ou chez l'Homme[90, 91]. D'autre part, il a été montré *in vivo* chez la souris que la grande majorité des cellules d'une tumeur ne permettent pas de déclencher de processus tumoral après injection chez un animal sain. En revanche, certaines rares cellules cancéreuses peuvent entraîner la formation d'un cancer après injection en très faible quantité chez un animal sain[92, 93]. Par analogie avec les CSA qui sont majoritairement quiescentes, mais qui peuvent se différencier en cellules aux capacités de prolifération de plus en plus élevées, certains auteurs ont émis l'hypothèse qu'il devait exister des cellules souches responsables du déclenchement et de la prolifération de tumeurs. Ces cellules ont donc été appelées cellules souches cancéreuses ou CSC[92].

Au départ, les recherches sur les CSC ont été réalisées dans le domaine de l'hématologie, avec l'hypothèse de l'existence de cellules souches leucémiques (CSL). Ces cellules partageraient avec les cellules souches hématopoïétiques (CSH), les mêmes propriétés d'auto-renouvellement et de différenciation, avec une capacité à reconstituer une tumeur au phénotype identique à celui de la tumeur d'origine[94].

Les CSL partageraient certaines caractéristiques phénotypiques avec les CSH, comme la présence du CD34 et l'absence de CD38, CD71 et HLA-DR, mais n'exprimeraient pas CD90 et c-Kit et exprimeraient en plus le CD123. La confirmation de l'existence de CSL a été apportée en 1997 par Bonnet et Dick[95]. Ceux-ci ont utilisé un test de repopulation multiple avec transplantation secondaire de cellules de Leucémie Aiguë Myéloïde (LAM) d'origine humaine chez la souris NOD-SCID. Dans cette expérience, les auteurs ont extrait, purifié et injecté chez la souris NOD-SCID des CSL de patients présentant des LAM. Ils ont ainsi réussi à recréer chez la souris des LAM hautement représentatives de leur équivalent humain, et ce même après multiples transplantations. Ces cellules ont été appelées SL-IC pour SCID

Leukemia-Initiating Cells, ou cellules inductrices de leucémies chez la souris SCID. Ils ont montré que ces cellules sont rares (0,2 à 100 cellules pour 10^6 cellules mononuclées), et qu'elles sont toutes de phénotype CD34+ CD38-, tout comme les CSH. Après ces travaux, les CSC ont été identifiées dans une grande variété de tumeurs solides, cancer du sein tout d'abord, puis des poumons, de la prostate[92, 93, 96, 97]...

Des investigations menées sur les CSL et les CSC en général ont démontré que les mécanismes à l'origine de l'auto-renouvellement et de la différenciation de ces cellules sont communs avec ceux existants chez les cellules souches non pathologiques (voies de Notch, Wnt et Sonic Hedgehog notamment)[76]. Ces phénomènes sont néanmoins dérégulés chez les CSC. Il semblerait également que, comme les CSA, les CSC soient localisées dans des niches permettant le maintien de leur auto-renouvellement et le contrôle de leur différenciation[98].

Le mécanisme à la base de la transformation de CSA en CSC reste encore très flou, même si il semblerait qu'une succession bien précise de mutations génétiques et de modifications épigénétiques soit nécessaire à leur formation. L'étude de ces mécanismes est de la plus grande importance dans la mesure où leur compréhension permettrait l'identification précise de cibles thérapeutiques potentielles vis à vis des CSC[99-101].

La mise en évidence des CSC constitue en effet une grande avancée dans l'approche thérapeutique de nombreux cancers. Actuellement, la majorité des molécules anticancéreuses utilisées ciblent les cellules en prolifération. En effet la quasi-totalité des cellules cancéreuses prolifères de manière dérégulée avec une inhibition de la sénescence et de l'apoptose, aboutissant à une croissance rapide de la tumeur.

Ce type d'approche ciblant les cellules en division est caractérisé aujourd'hui encore par un nombre important de rechutes, car il semblerait que les traitements ne parviennent pas à cibler les cellules à l'origine du déclenchement du cancer. En effet, comme les CSA, les CSC sont majoritairement quiescentes, en phase G0 du cycle cellulaire, et sont donc naturellement résistantes aux traitements antiprolifératifs classiques. On peut donc détruire la plus grande partie des cellules cancéreuses, seule la destruction des CSC permettrait de causer la destruction de la tumeur.

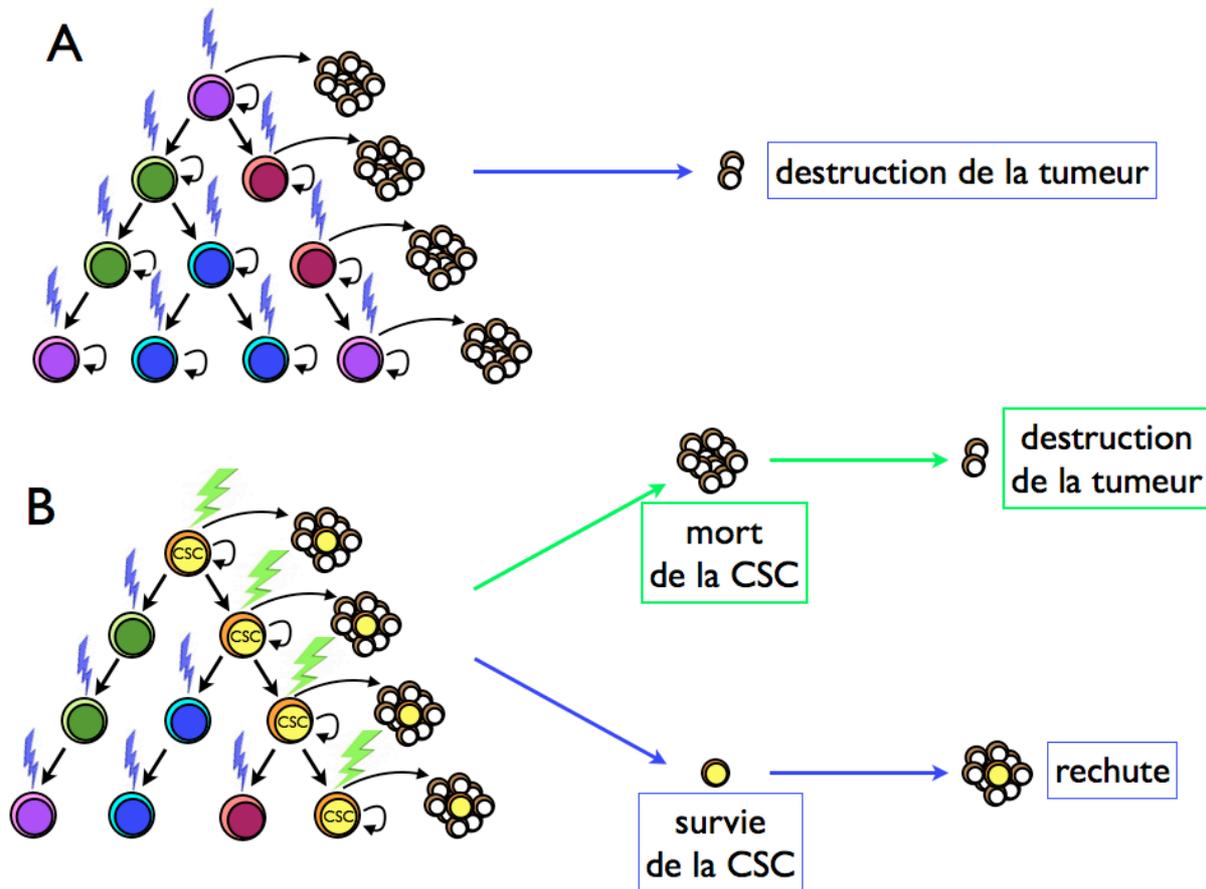


Figure 6 : Modèles d'hétérogénéité des cellules cancéreuses.

Dans le modèle (A) les cellules cancéreuses sont hétérogènes mais peuvent toutes proliférer indéfiniment et former de nouvelles tumeurs. Les molécules cytotoxiques ciblant les cellules en division (éclairs bleus) pourraient détruire la tumeur. Dans le modèle (B) les cellules cancéreuses sont hétérogènes, mais seul un très faible nombre de CSC est capable d'auto-renouvellement et de différenciation. Ces CSC sont quiescentes et les molécules cytotoxiques ciblant les cellules en division (éclairs bleus) épargneraient ces CSC qui seraient ensuite responsables des rechutes. De nouvelles molécules ciblant les CSC (éclairs verts) permettraient d'induire leur mort et donc de détruire entièrement la tumeur. CSC : Cellules Souches Cancéreuses. Adapté de Reya et al. Nature 2001

La connaissance, quoiqu'encore partielle, des mécanismes à l'origine de la différenciation et de l'auto-renouvellement des cellules souches a d'ailleurs permis la mise au point ou la « redécouverte » de nouveaux médicaments anticancéreux. Ainsi la salinomycine, antibiotique développé à l'origine pour traiter certaines infections bactériennes chez les gallinacés, s'est révélée, une molécule efficace pour traiter un nombre important de cancers, notamment par son inhibition de la voie de Wnt[102].

De la même manière le ciblage des régulateurs épigénétiques, connus pour jouer un rôle dans le contrôle des capacités de prolifération des CSA et des cellules ES, a montré de bons résultats dans le traitement de cancers principalement hématologiques.

La découverte des CSC a donc permis une remise en question des principes jusque là acquis concernant le traitement des cancers, et une modification de fond dans l'approche thérapeutique anticancéreuse.

III. CELLULES SOUCHES ET THERAPEUTIQUE HUMAINE

Nous verrons que, si les règles régissant les autorisations de mises sur le marché de ces cellules souches « thérapeutiques » sont plutôt homogènes au niveau européen, il existe en revanche des différences importantes entre les pays du point de vue de l'attribution d'autorisation de recherche et de brevetabilité de ces cellules.

En effet, plus que pour aucun autre médicament, l'utilisation des cellules souches divise. Le fond culturel et philosophique sur lequel reposent les débats, plus éthiques que scientifiques, a débouché sur une régulation drastique des conditions d'étude des cellules souches et notamment des cellules ES.

Nous verrons pourtant que l'étude cognitive des cellules souches en général, et des cellules ES en particulier peut déboucher sur un nombre conséquent d'applications dont certaines font déjà l'objet d'essais cliniques. Nous essaierons enfin de replacer l'utilisation potentielle de ces cellules chez l'Homme au cœur des problématiques spécifiques de l'industrie pharmaceutique.

A. CADRE LEGAL

Dans ce premier item, nous aborderons les textes de loi caractérisant les différents types de produits thérapeutiques dérivées des cellules souches, et régissant, au niveau Français et Européen, les modalités d'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) de ces produits.

1. Règlement européen n°1394/2007

Les nouvelles directives européennes ont entraîné des modifications du cadre réglementaire au niveau national. Les « médicaments de thérapie cellulaire » deviennent par exemple des « médicaments de thérapie cellulaire somatique », les « préparations de thérapie génique » et « médicaments de thérapie génique » passent sous la dénomination commune « médicaments de thérapie génique », au sein des « Médicaments de Thérapie Innovante ».

C'est en effet le règlement européen n°1394/2007 modifiant la directive 2001/83/CE ainsi que le règlement (CE) n°726/2004, entré en vigueur le 30 décembre 2008 qui a considérablement modifié la réglementation appliquée aux produits de thérapie contenant ou utilisant des gènes, des cellules ou des tissus, chez l'Homme.

Ce règlement européen introduit le statut de Médicament de Thérapie Innovante (MTI) regroupant les produits de thérapie génique, de thérapie cellulaire, d'ingénierie tissulaire et les médicaments combinés de thérapie innovante. Ce texte a notamment pour objectif d'instaurer une procédure d'AMM centralisée pour le MTI, et d'établir un référentiel applicable sur l'ensemble des pays de l'UE. Ce règlement fixe également les obligations de suivi d'efficacité et de sécurité après mise sur le marché, et d'évaluation de ces produits innovants via la création du comité pour les thérapies innovantes (Committee for Advanced Therapies, CAT) au sein de l'Agence Européenne du Médicament (European Medicines Agency, EMA).

2. Définitions

Le terme MTI englobe les médicaments de thérapie génique, les médicaments de thérapie cellulaire somatique, les produits issus de l'ingénierie tissulaire et les médicaments combinés de thérapie innovante. La définition du médicament de thérapie génique et celle du médicament de thérapie cellulaire somatique sont apportées par la directive européenne 2001/83/CE, partie IV, Annexe I.

Le médicament de thérapie génique est un produit thérapeutique biologique i) contenant une substance active qui contient ou qui consiste en un acide nucléique recombinant utilisé ou administré chez l'être humain en vue de réguler, réparer, remplacer, ajouter ou supprimer une séquence génétique, ii) dont l'effet thérapeutique, diagnostique ou prophylactique est directement lié à la séquence d'acide nucléique recombinant qu'il contient ou le produit de l'expression génique de cette séquence. Cette définition n'inclut pas les produits vaccinaux dirigés contre les maladies infectieuses.

Le médicament de thérapie cellulaire somatique est un produit thérapeutique biologique i) contenant ou consistant en des cellules ou tissus ayant subi des manipulations substantielles en vue de MODIFIER les caractéristiques biologiques, les fonctions physiologiques ou les propriétés structurelles à la base de leur utilisation clinique, ou les cellules ou tissus ne devant pas être utilisés pour les mêmes fonctions essentielles chez le receveur et le donneur, ET ii) présenté comme possédant comme propriété de, ou utilisé ou administré à l'être humain dans le but de traiter, prévenir ou diagnostiquer une pathologie grâce aux propriétés pharmacologiques, immunologiques ou métaboliques de ces cellules ou tissus.

Le règlement n°1394/2007 complète ces définitions avec celles des médicaments issus de l'ingénierie cellulaire ou tissulaire et des médicaments combinés de thérapie innovante.

Les premiers sont i) des cellules ou tissus ayant subi une manipulation substantielle de façon à OBTENIR (différence avec produits de thérapie cellulaire somatique) des caractéristiques biologiques, des fonction physiologiques ou des propriétés structurelles utiles à la régénération, à la réparation ou au remplacement recherchés ii) des cellules ou tissus ne devant pas être utilisés pour les mêmes fonctions essentielles chez le receveur et le donneur. Il faut noter qu'une grande partie de la définition est commune avec celle des produits de thérapie cellulaire somatique.

Les médicaments combinés de thérapie innovante sont des MTI qui intègrent dans leur composition un ou plusieurs dispositifs médicaux ou bien un ou plusieurs dispositifs médicaux implantables actifs.

Outre la définition précise des MTI, le principal intérêt de ce règlement n°1394/2007 est d'établir les modalités d'autorisation de mises sur le marché de ces MTI en les répartissant en 2 sous types : les MTI, les MTI préparés ponctuellement (MTI-PP). Il permet de plus le distinguo entre ces MTI et les Préparations qui ne sont plus des médicaments mais des produits de santé, à la réglementation différente.

3. Autorisation de Mise sur le Marché des MTI et MTI-PP

Il est important de distinguer les MTI et les préparations, les deux ayant des statuts différents.

Si le produit subit des modifications substantielles en vue « d'obtenir des caractéristiques biologiques, des fonctions physiologiques ou des propriétés structurelles utiles à la régénération, à la réparation ou au remplacement recherchés » et/ou si le produit n'est pas destiné à être utilisé pour la ou les mêmes fonctions chez le receveur que chez le donneur, ce produit est un MTI (ou un MTI-PP). Les modifications substantielles ne sont pas listées dans le texte, sont simplement précisées les modifications « non substantielles » : découpage, broyage, façonnage, centrifugation, trempage dans des solutions antibiotiques ou antimicrobiennes, stérilisation, irradiation, séparation, concentration ou purification de cellules, filtration, lyophilisation, congélation, cryoconservation, vitrification.

Une préparation est donc un produit associant l'absence de modification substantielle ET une destination identique chez le receveur et le donneur. Si le produit déroge à l'une de ces deux conditions, il sera considéré comme MTI. Une association de modifications non substantielles appliquées à un produit peut constituer dans leur ensemble, une modification substantielle, faisant passer le produit du statut de Préparation à celui de MTI. De même un changement d'indication peut entraîner le changement de statut de Préparation à MTI.

La différence entre MTI et MTI-PP réside dans la destination du produit : un MTI-PP sera destiné à un seul malade, ne sera pas exporté en dehors du pays où il est développé et sera régulé au niveau national. Attention, cette définition ne fait pas le distinguo entre produit allogénique et produit autologue.

La Figure 14 représente de manière simplifiée les principes de distinction entre les MTI.

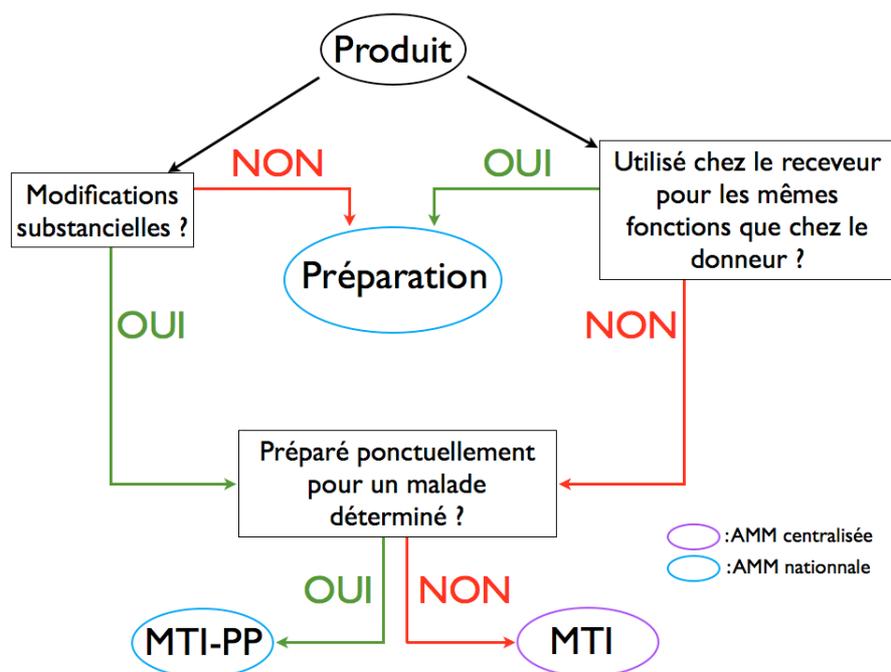


Figure 7 : Distinction entre divers Médicaments de Thérapie Innovante (MTI) Médicament de Thérapie Innovante Préparé Ponctuellement (MTI-PP) et Préparations. Cette distinction particulièrement importante conditionne le régime d'Autorisation de Mise sur le Marché auquel sera soumis de produit.

L'AMM d'un MTI se fait dans le cadre d'une procédure centralisée d'autorisation, après évaluation par l'EMA. L'évaluation est réalisée par le comité des médicaments à usage humain (CHMP) en collaboration avec le CAT. (Figure 15).

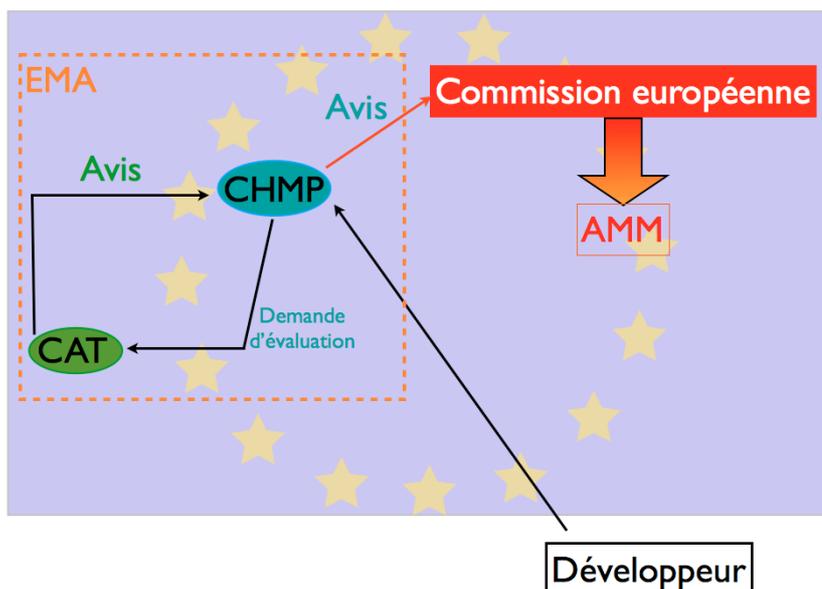


Figure 8 : AMM centralisée.

Schéma simplifié de la procédure centralisée d'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) à laquelle sont soumis les Médicaments de Thérapie Innovante. CHMP : Comité des médicaments à usage humain, CAT : Comité pour les thérapies innovantes, EMA : agence européenne du médicament.

Le CHMP peut mettre jusqu'à 210 jours pour rendre son avis concernant la demande d'AMM.

Le CAT est composé de membres désignés pour une période de 3 ans renouvelable. Le président et le vice-président sont élus par les membres pour une durée de 3 ans, renouvelable 1 seule fois. Il est composé de 35 membres dont 5 appartenant au CHMP (désignés par le CHMP), 1 membre désigné par chaque pays membre qui n'est pas représenté par l'un des membres du CHMP (23 autres + Norvège, Islande, Liechtenstein = 26), 2 membres désignés par la commission européenne pour représenter les médecins, 2 membres désignés par la commission européenne pour représenter les associations de malades.

Il a pour but de vérifier la qualité, la sécurité et l'efficacité de chaque MTI avant approbation finale par le CHMP de la délivrance de l'AMM européenne et de suivre les avancées technologiques du secteur

Les MTI-PP suivent un parcours d'AMM nationale spécifique définie par la loi n°2011-302 du 22 mars 2011. Le développeur devra justifier du respect de la définition de MTI-PP de son produit, et devra consulter les guidelines spécifiques des MTI édités par l'EMA portant sur les points clés de développement du produit. Un suivi particulier de l'efficacité et des effets indésirables des MTI-PP afin de pouvoir évaluer en continu la balance bénéfice/risque de l'utilisation du produit. Dans certains cas, les MTI-PP étant destinés à de petites

populations spécifiques, ceux-ci pourraient être autorisés sans avoir fournis de résultats cliniques préalables pour établir leur efficacité ou leur profil de sécurité.

Ce cas de figure ne sera possible qu'après avoir démontré l'impossibilité de réaliser des recherches biomédicales pertinentes, et engendrera un suivi renforcé du produit.

4. Fabrication d'un MTI

Un MTI est un médicament, il doit donc être fabriqué conformément à la directive 2003/94/EC sur les bonnes pratiques de fabrication applicables aux médicaments à usage humain. Si l'établissement est localisé en France, il devra être un établissement pharmaceutique autorisé par l'ANSM en application des articles L. 5124-1 ou L. 5124-9-1 du Code de la Santé Publique.

Les directives européennes et françaises précisent que tout lot de médicament expérimental doit être certifié par une personne compétente qui attestera que ledit médicament expérimental a été fabriqué dans le respect des bonnes pratiques de fabrication dans un établissement autorisé. De même l'EMA dicte les textes encadrant le développement des MTI (2001/83/CE, 2004/23/CE, 2006/17/CE et 2006/86/CE).

5. Autorisation d'essai clinique

Le promoteur désirant débiter un essai clinique va demander une autorisation d'essai clinique auprès de l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament (ANSM) qui va avoir entre 90 et 180 jours pour émettre un avis.

L'agence peut faire appel, pour rendre sa décision, au groupe d'experts sur les recherches biomédicales portant sur les thérapies cellulaires. Dans le cas de préparations de tissus ou de cellules, l'ANSM fait appel à l'agence de biomédecine. La décision d'autorisation de démarrage de l'essai clinique est donnée par le directeur général de l'ANSM.

En parallèle, le promoteur doit déposer un dossier auprès d'un Comité de Protection des Personnes qui rend son avis sous 35j

B. CADRE ETHIQUE

En France, la recherche cognitive sur les cellules ES a souffert du statut juridique incertain de l'embryon. Les textes de loi actuels tendent à limiter l'étude de ces cellules aux protocoles de recherche ayant un bénéfice thérapeutique majeur et direct, bannissant de fait les programmes de recherche à but strictement cognitif. Dans le cadre de la biologie, la recherche cognitive correspond en général aux recherches menées dans un but de compréhension du vivant, sans application pratique directe attendue à court terme. Mais ce n'est pas parce que ces recherches n'ont *a priori* pas d'autre but que d'explorer puis de comprendre un mécanisme particulier, qu'elles seront dénuées d'applications importantes *a posteriori*.

L'exemple peut être le plus parlant dans le domaine des cellules souches est celui des cellules iPS qui représentent une source particulièrement importante d'applications thérapeutiques. C'est en effet grâce aux précédentes études visant à comprendre les mécanismes contrôlant la régulation de la pluripotence des cellules ES que Yamanaka a pu sélectionner les gènes qu'il a utilisé pour reprogrammer une cellule somatique différenciée en cellules iPS[13].

De la même manière ces problèmes éthiques majeurs impactent la valorisation des résultats des équipes de recherche dans le domaine des cellules souches, avec une régulation stricte, mais très variable d'un pays à l'autre, des application susceptibles d'être protégées par un brevet.

Ces différences reposent principalement sur une différence de statut de l'embryon entre les différents pays engendrant, plus qu'un débat scientifique, un questionnement moral et philosophique sur la pertinence de la conduite des recherches cognitives sur les cellules issues de l'embryon[32].

1. Loi de Bioéthique et recherche sur l'embryon

La première loi de bioéthique de 2004 instaurait, dans l'article L.2151-5, un régime dérogatoire à la recherche sur l'embryon humain. Cette recherche est donc interdite, et constitue donc un délit, mais des autorisations dérogatoires peuvent être attribuées pour une durée de 5 ans et ce pendant 5 ans à partir de la date de mise en application de la loi (2006). Ces dérogations pouvaient être attribuées pour des recherches sur l'embryon et les cellules embryonnaires, à la condition expresse que ces recherches soient susceptibles de permettre des progrès thérapeutiques majeurs, et en l'absence de l'existence d'une méthode d'efficacité comparable.

A la manière dont est rédigé le texte, on comprend que les équipes de recherches travaillant sur l'embryon et les cellules souches embryonnaires sont hors-la-loi, mais qu'elles bénéficient d'une autorisation à la transgresser. Ce raisonnement confère une connotation péjorative à la recherche sur l'embryon, en plus d'écarter du champ des autorisations possibles les programmes de recherche à but purement cognitif. Ce régime dérogatoire a été fustigé par les équipes de recherches travaillant sur l'embryon, car cette loi stigmatisait les chercheurs sans apporter de contrôle supplémentaire sur les recherches effectuées dans le domaine par rapport à un régime d'autorisation strictement encadrée.

Cette loi décrit également les conditions dans lesquelles les embryons peuvent être sélectionnées pour faire l'objet de recherches et le système permettant la délivrance des dérogations aux équipes de recherche. Seuls peuvent être autorisés les embryons issus d'une assistance médicale à la procréation (AMP) et ne faisant plus l'objet d'un projet parental. Le couple dont est issu l'embryon doit donner son consentement écrit, à l'issue d'un délai de réflexion de 3 mois. L'autorisation de recherche est délivrée après examen du projet par l'Agence de Biomédecine, en fonction de sa pertinence, de son respect des principes éthiques et de son intérêt pour la santé publique.

L'article L.2151-5 précise que les embryons ayant fait l'objet de recherche ne peuvent plus être transférés à des fins de gestation. Il spécifie également que l'importation de cellules ES peut être autorisée par l'Agence de Biomédecine, aux laboratoires qu'elle aura préalablement autorisés à manipuler et à stocker les cellules embryonnaires.

Cette loi de la bioéthique a été révisée en 2011, et beaucoup de chercheurs dans le domaine des cellules embryonnaires, appuyés par un rapport parlementaire paru en 2010 et préconisant le passage du régime dérogatoire au régime d'autorisation strictement encadrée, espéraient une abrogation du statut dérogatoire.

L'article L.2151-5 tel qu'il a été modifié par la loi n°2011-814 du 7 juillet 2011, conserve le régime dérogatoire, supprime le délai de 5 ans pour l'attribution des autorisations de recherche par l'agence de biomédecine, et autorise l'implantation pour projet parental d'embryons ayant fait l'objet d'une recherche au bénéfice de l'embryon ou dans le but d'améliorer les techniques d'AMP, sous réserve que cet embryon n'ait pas été atteint.

Cette loi remplace également le mot « thérapeutique » par le mot « médical » dans la phrase concernant les progrès susceptibles d'être entraînés par la recherche sur les embryons. Cette nuance permet d'élargir quelque peu le champ des recherches sur l'embryon en y intégrant celles qui visent par exemple à comprendre de certaines maladies.

L'autorisation de procéder à la recherche sur les cellules embryonnaires est toujours donnée par l'Agence de Biomédecine, qui apporte sa réponse dans les 4 mois suivant la date à laquelle le dossier a été déposé. C'est également toujours cette agence qui délivre les autorisations d'importation et d'exportation (article L. 2151-6), mais aussi la conservation (article L. 2151-7) de cellules embryonnaires humaines à des fins de recherche.

Il existe à ce jour 28 lignées de cellules ES autorisées en France, et 37 équipes sont habilitées à travailler sur les cellules souches embryonnaires humaines (Agence de Biomédecine, rapport 2011).

Nous avons vu que les problèmes éthiques suscités par le statut particulier de l'embryon ont des répercussions sur la mise en place des protocoles de recherche, mais également sur la méthode de valorisation des travaux scientifiques que constitue le dépôt d'un brevet.

2. Brevetabilité des cellules souches embryonnaires

Le dépôt d'un brevet est souvent un moyen de valoriser le travail de développement d'une équipe de recherche. La majorité des brevets existant dans le domaine des cellules souches concernent les cellules souches embryonnaires et mésenchymateuses, puis les cellules souches pluripotentes induites. S'il existe des brevets américains, canadiens et japonais portant sur les cellules souches embryonnaires, aucun brevet n'a cependant été déposé à l'Office Européen des Brevets dans ce domaine.

Une des raisons à cela est la difficulté d'initier en France des recherches sur ces cellules, principalement à cause des lois de bioéthique de 2004 puis de 2011, mais également à cause d'une décision de la Cour de Justice de l'Union Européenne (CJUE) rendue le 10

mars 2011, réduisant considérablement les possibilités de brevets se rapportant aux cellules embryonnaires au niveau européen.

La technique actuelle permettant l'isolement des cellules ES entraîne obligatoirement la destruction de l'embryon. La problématique de la question préjudicielle déposée à l'époque auprès de la CJUE était de savoir si cette technique constitue une atteinte à la dignité humaine et en étant coupable d'une utilisation d'embryons humains à des fins industrielles et commerciales telle que l'a établi la directive 98/44/CE du 6 juillet 1998. Cette utilisation est en effet qualifiée de contraire à l'ordre public aux bonnes mœurs et donc, de fait non brevetable.

La décision rendue est claire : La notion d'embryon « s'applique dès le stade de la fécondation aux cellules totipotentes initiales et à l'ensemble du processus de développement et de constitution du corps humain qui en découle. »

Le mode d'obtention de la cellule ES passant par la destruction d'un blastocyste, et donc d'un embryon, aucun brevet ne peut être déposé concernant l'utilisation potentielle que l'on peut faire de ces cellules.

Il existe néanmoins une exception à cette interdiction. Il s'agit des inventions ayant un objectif thérapeutique ou de diagnostic qui s'appliquent à l'embryon humain et lui sont utiles.

Le cadre éthique et législatif encadrant la brevetabilité des cellules souches embryonnaires est donc beaucoup plus restrictif au sens du droit Européen depuis 2011, au risque d'entraîner une diminution majeure de la compétitivité internationale de l'Europe et de la France en particulier.

Cela est d'autant plus dommageable que les cellules ES, mais aussi les cellules souches en général, présentent de nombreuses applications potentielles dans le domaine de la santé humaine.

C. UTILISATION POTENTIELLE DES CELLULES SOUCHES EN THERAPEUTIQUE HUMAINE

Les cellules vivantes utilisées pour la recherche et à des fins thérapeutiques peuvent être utilisées de deux manières : comme médicaments, c'est à dire injectées ou implantées chez le patient, ou bien uniquement *in vitro*, sans injection chez le patient. Dans ce cas précis, les cellules peuvent soit servir de modèles *in vitro* pour la modélisation de maladies, de sélection des molécules d'intérêt, d'évaluation de leur toxicité ; soit servir de système *in vitro* de production de protéines d'intérêts.

Le large éventail des utilisations potentielles des cellules souches en médecine humaine a progressivement suscité l'intérêt du monde de l'industrie pharmaceutique, même si des recherches doivent être entreprises pour répondre aux problèmes de transfert d'échelle et de sécurité d'utilisations inhérents au passage au statut de médicament utilisé chez l'Homme.

1. Les cellules souches en tant que médicament

La première manière d'utiliser les cellules souches comme des médicaments est d'exploiter leurs propriétés de différenciation pour générer de nouvelles cellules fonctionnelles pour remplacer celles d'un tissu lésé et/ou non fonctionnel[28].

Les cellules ES et iPS formant des tératomes après injection, une différenciation *in vitro* de ces cellules en un type cellulaire avant injection sera privilégié. L'injection de cellules neurales, musculaires, cardiaques, épithéliales dérivées à partir de cellules ES et iPS a fait l'objet de nombreuses expérimentations dans des modèles murins. Malheureusement, très peu de ces expériences sont allées jusqu'à la réalisation d'essais cliniques chez l'Homme.

Les CSA peuvent théoriquement être injectées telles qu'elles dans le but d'obtenir une différenciation *in situ* en cellules d'intérêt. Cette démarche a notamment été testée chez l'animal, puis l'Homme, avec plus ou moins du succès principalement dans le traitement de l'ischémie myocardique et de l'ischémie aiguë des membres inférieurs, et dans la cicatrisation des plaies cutanées[37]. Il a été prouvé que les CSM et les cellules différenciées à partir des iPS et cellules ES semblaient avoir tendance à disparaître du tissu dans lequel elles ont été injecté[58]. Les conclusions de cette constatation sont i) qu'il faudrait associer ces cellules à un biomatériau et/ou à des facteurs de croissance favorisant leur implantation dans le tissu et ii) que les effets bénéfiques pourtant observés après injection de ces cellules pourrait passer la promotion de la réparation tissulaire par action paracrine des cellules souches injectées. Cette dernière hypothèse pourrait aboutir à l'utilisation des CSM, qui sont d'ailleurs caractérisées par une capacité de prolifération quasi illimitée et une technique de culture aisés, comme cellules productrices de milieux conditionnés[55]. Ces milieux auraient un potentiel thérapeutique, dans la mesure où ils contiennent les facteurs de croissance nécessaires à l'induction efficace de la réparation tissulaire, sans contenir de cellules.

Les cellules souches pluripotentes (regroupant les cellules ES et les cellules souches pluripotentes induites ou iPS) peuvent être utilisées pour produire des cellules différenciées destinées à remplacer les cellules lésées. Les cellules iPS sont dérivées artificiellement de cellules différenciées du malade. Les cellules différenciées à partir des iPS peuvent lui être réinjectées de manière autologue, sans risque de rejet immunitaire. Ces cellules différenciées peuvent avoir été modifiées afin de restaurer une fonction déficiente à la base du développement d'une pathologie. Cette configuration correspond parfaitement au concept de médecine individualisée car les cellules utilisées sont utilisées pour un patient donné, pour une situation pathologie donnée. Néanmoins nous verrons que des efforts de développement doivent encore être entrepris pour améliorer les techniques de culture des iPS et la fiabilité du processus de différenciation[103].

Il existe enfin une dernière voie de recherche visant à développer des molécules susceptibles d'induire les mécanismes de réparation physiologiques utilisant les cellules souches endogènes « résidentes » au sein des organes, via une action sur la « niche ». Cette action pourrait être consécutive à l'utilisation de molécules chimiques ou de composés protéiques permettant une stimulation de la mobilisation et de la différenciation des cellules souches endogènes[104, 105].

L'écueil principal de ces thérapies utilisant les cellules souches est le problème de transfert d'échelle entre thérapie cellulaire telle qu'elle est envisagée dans les laboratoires académiques, et les modèles économiques propres aux grands laboratoires pharmaceutiques ou « Big Pharma ». Ces modèles économiques exigent une certaine rentabilité et donc la perspective d'une distribution large et simplifiée, de produits « tout fait » à la production moins onéreuse et pouvant être utilisés pour un grand nombre de patient. Il faudrait donc pouvoir se rapprocher du modèle de la distribution des poches de sang.

Une des hypothèses susceptible d'intéresser ces industries pharmaceutiques seraient la constitution de banques de cellules iPS ou de CSM haplotypées, alors qu'au contraire le modèle actuel de thérapie individuelle ne paraît pas viable.

Devant les efforts de recherche et développement à consentir avant de pouvoir constituer et utiliser de telles banques, les Big Pharma ont principalement privilégié partenariats avec les laboratoires académiques et/ou les sociétés de biotechnologie spécialisés dans le domaine de la thérapie cellulaire.

Ainsi GSK, Roche et AstraZeneca ont investi en 2007 dans l'organisme SC4SM, institut de recherche public/privé du Royaume-Uni spécialisé dans la réalisation de tests toxicologiques à partir de cellules souches.

GSK a également investi en 2008 plus de 25 millions de dollars sur 5ans dans le Harvard Stem Cell Institute pour développer des thérapies issues des cellules souches dans les domaines de la neurologie, les maladies cardiovasculaires, le diabète, l'obésité, les troubles musculo-squelettiques et le cancer.

Roche et Novartis ont investi 2 x 27 millions d'euros en 2007 et 2009 dans la société de thérapie cellulaire Cellerix qui a développé en 2012 une étude de Phase III dans l'utilisation de cellules souche mésenchymateuses issues du tissu adipeux dans le traitement des fistules rectales associées à la maladie de Crohn. Selon le site ClinicalTrials.gov, cette étude serait toujours active et en cours de recrutement.

Seul Pfizer semble avoir créé un département interne dédié à la médecine régénérative, avec un budget néanmoins très faible en regard de celui globalement alloué à la recherche et développement.

Le meilleur exemple de société ayant choisi de s'impliquer massivement dans le domaine de la thérapie cellulaire est Genzyme. Même si elle n'a pas le statut de Big Pharma, mais celui de « Big Biotech » (grande entreprise de biotechnologie), Genzyme possède de parts dans des sociétés comme Myosix (France) et Osiris Therapeutics (USA) ainsi que des produits de thérapie cellulaire qui leurs sont propres (Rapport du Leem 2010, « des cellules pour la santé » ; sites internet des sociétés)

2. Utilisation des cellules souches en modélisation

La possibilité d'utiliser des cellules souches pour constituer des modèles cellulaires plus ou moins complexes concerne surtout les cellules souches pluripotentes comme les cellules ES, mais surtout les iPS. La première application décrite de l'utilisation des iPS en modélisation de pathologies date de 2008 avec la production de motoneurons synthétisés à partir d'iPS issues de patients atteints de Sclérose Latérale Amyotrophique[106].

L'utilisation des iPS est particulièrement intéressante pour la réalisation de modèles pertinents de pathologies impossibles à modéliser correctement chez le rongeur, afin de décrire les mécanismes physiopathologiques sous-jacents. Les pathologies concernées peuvent être les maladies monogéniques et/ou celles qui ne sont développées qu'à l'âge adulte[106-108]. Les cellules somatiques porteuses de l'anomalie prélevées chez le patient, sont reprogrammées en iPS, puis celles ci sont différenciées pour donner en grande quantité des cellules spécifiques de certains tissus porteuses de l'anomalie. La même démarche peut être effectuée de cellules ES si celles ci sont issues d'embryon pour lesquels une anomalie a été détectée lors d'un diagnostic pré implantatoire. Les problèmes liés à l'article L.2151-5 de la loi de bioéthique de 2011 compliquent néanmoins l'utilisation des cellules ES pour la modélisation.

Les cellules IPS produites à partir de cellules de patient atteints de maladies rares permettent donc la mise en place de modèles cellulaires beaucoup plus pertinents que ceux réalisés chez la souris pour l'étude des mécanismes physiopathologiques à l'origine de ces maladies.

Ces cellules pluripotentes pourraient également servir de modèles de toxicité généraux divers organes[109]. L'avantage qu'ont ces cellules par rapport aux cultures cellulaires primaires sont une obtention possible dans de grandes proportions et la possibilité de varier les stades de maturation des tissus recréés afin de détecter une éventuelle toxicité fœtales et/ou embryonnaires due à certaines molécules.

Les cellules iPS pourraient également avoir un intérêt majeur dans le développement préclinique de médicaments. La représentation de la diversité génétique de la population humaine est en effet très importante lors des phases tardives du développement des médicaments. Les iPS, prélevées puis différenciées à partir d'un grand nombre d'individus pourraient servir de modèles d'évaluation préclinique représentant la diversité de la population pour identifier des phénomènes des paramètres de toxicité et d'efficacité, ainsi que l'identification de sous populations de répondeurs ou de non-répondeur chez une catégorie de malades donnée[110]. Cette technique permettrait en pratique de modéliser et prévoir le taux d'attrition de la molécule à l'étude, avant son évaluation chez les patients.

En complément, pour une échelle de population moindre, les iPS pourraient trouver une application au stade des essais cliniques en servant de base à la génération de modèles individualisés de toxicité prédictive et/ou de réponse prédictive. Cette démarche permettra d'éliminer les patients susceptibles de subir une toxicité accrue de la molécule, de mieux sélectionner les patients et donc de réaliser un essai clinique plus pertinent[111].

Les iPS pourraient également servir pour l'identification de biomarqueurs pertinents corrélés à la réponse au traitement pour un patient donné. Dans ce cas précis, les cellules destinées à être différenciées seraient prélevées dès l'inclusion des patients, puis les modèles cellulaires des patients non répondeurs sont comparés à ceux des patients répondeurs[112].

Ce domaine d'application des cellules iPS est d'ailleurs en cours dévaluation par certains grands laboratoires pharmaceutiques pour le dessin de plusieurs essais cliniques et pré-cliniques.

De la possibilité d'obtenir des modèles physiopathologiques pertinents et en grande quantité à partir des cellules souches pluripotentes découle une autre application potentiellement très intéressante : le criblage biologique des molécules chimiques à la recherche des médicaments de demain.

3. Les cellules souches pour le criblage des molécules thérapeutiques

Au cours de la recherche et de la mise au point de leurs médicaments, les industries pharmaceutiques ont accumulé des milliers de molécules qui n'ont pas été emmenées jusqu'au bout de leur développement pour des raisons diverses. Ces molécules ont été stockées au sein d'immenses chimiothèques. Néanmoins, certains de ces médicaments « abandonnés » pourraient avoir une utilité potentielle dans un domaine d'application qui n'a pas été envisagé à l'époque de leur développement. Le criblage des molécules thérapeutiques au sein des chimiothèques est un des enjeux majeur du pour l'industrie pharmaceutique, car il pourrait aboutir à la découverte de nouveaux médicament pour un coût inférieur. La taille des chimiothèques impose cependant que la technique de criblage ait un « débit » suffisant pour tester les molécules dans un délai acceptable, tout en gardant une pertinence élevée évitant ainsi le développement coûteux d'une molécule finalement inactive.

Traditionnellement le criblage effectué sur les molécules de ces chimiothèques regroupe deux grandes techniques : i) le screening virtuel permettant de révéler *in silico* le matching entre une molécule candidate et une cible connue, sur la base de leur formule chimique respective et ii) le screening lors duquel les molécules d'intérêt sont synthétisées puis testées sur des cibles chimiques potentielles. Ces deux méthodes, bien qu'extrêmement efficaces en terme de rapidité d'exécution, révèlent un certain manque de pertinence. L'utilisation de cibles biologiques serait particulièrement intéressante, mais il était jusqu'à lors impossible de fournir du matériel biologique en quantité, présentant un phénotype varié (malade, sain, variation génétique) et avec un rendement suffisant pour répondre aux besoins de l'industrie pharmaceutique.

L'utilisation de bioréacteurs permettant la génération de plusieurs milliards de cellules en une quinzaine de jour, associée à l'évolution de la robotisation et au potentiel de différenciation des iPS a permis d'envisager l'utilisation de ces cellules dans le criblage biologique à haut débit des molécules issues des chimiothèques, que ce soit en terme d'efficacité, mais aussi de toxicité[113].

Cette application est déjà en cours d'exploitation par certains laboratoires pharmaceutiques importants comme Roche, qui a choisi de cribler une partie de sa chimiothèque sur des cellules issues d'iPS au sein de la plateforme de l'I-stem à Evry, dont les installations permettent le criblage de 70 000 molécules en parallèle.

D. ETAT DES LIEUX DE LA THERAPIE CELLULAIRE UTILISANT LES CELLULES SOUCHES

1. Essais cliniques en cours

De nombreux essais cliniques cherchant à évaluer l'utilisation de cellules souches comme produit de thérapie cellulaire sont actuellement en cours à travers le monde. La majorité de ces études sont néanmoins des études de sécurité et de toxicité sur de très petits échantillons de malades (<10 malades) (Phase I). En France, on compte 8 essais cliniques ouverts (contre 135 au total dans le monde) en cours utilisant l'injection cellules souches ou de cellules dérivées des cellules souches, dont 2 sont de Phase I et 6 de Phase II. Actuellement on dénombre dans le monde 57 essais de Phase I, 78 de Phase II, 12 de Phase III. On s'aperçoit que l'addition des essais dans chacune des phases donne un nombre supérieur à 135, car un essai thérapeutique peut être enregistré dans deux phases différentes au même moment. (Source : ClinicalTrial.gov, intitulé : "Recruiting" [OVERALL-STATUS] AND NOTEXT [OVERALL-STATUS-OUTDATED] AND stem cells injection [TREATMENT]).

La majorité de ces essais cliniques portent sur l'utilisation de cellules souches mésenchymateuses et hématopoïétiques. A noter 1 essai de sécurité/toxicité de cellules débuté cette année à Kobe dans le traitement de la Dégénérescence maculaire liée à l'âge exsudative utilisant des cellules d'endothélium pigmentaire rétinien (RPE) dérivées d'iPS autologues par un des membres de l'équipe ayant généré les premières iPSc murines puis humaines en 2006 et 2007 (Pr Takahashi, Ibri, Kobe, Japon).

Le pendant de cette étude existe également aux états unis, dans la même indication, mais les investigateurs ont choisi de dériver leurs cellules RPE à partir de cellules ES.

L'état des essais cliniques les plus avancés concernant les différents types de cellules souches, ainsi que les indications correspondantes, sont listés dans le tableau 1.

CELLULES	INDICATIONS	PATHOLOGIES	ETAT
Cellules souches mésenchymateuses (tissus adipeux, moelle osseuse, sang placentaire)	Remplacement os, cartilage	Grandes pertes osseuses, remplacement cartilage	Phase 3
	Immunomodulation, diminution de la réponse inflammatoire	- Maladies auto-immunes (Crohn, diabète type 1) - Induction tolérance (greffe organes, CSH, GVH)	Phase 3
	Action trophique, cicatrisation	Stimulation de la réparation tissulaire spontanée (ischémie rénale, autisme, lésions moelle épinière, insuffisance cardiaque, brûlures cutanées)	Phase 3
	Vectorisation de drogues cytotoxiques ou d'un adénovirus oncolytique)	Cancers (gliomes)	Phase 2
Cellules souches hématopoïétiques	Multiples indications hématologiques ou non, immunologiques, thérapie génique...	Myélomes multiples, lymphomes, cancers solides, VIH, adrénoleucodystrophie	Validation thérapeutique
Cellules souches épithéliales	Peau : réparation transitoire ou permanente, thérapie génique	Brûlures, irradiation, maladies génétiques	Validation thérapeutique
	Remplacement de l'épithélium cornéen	Syndrome d'insuffisance en cellules souches lymphiques	Phase 2/3
Cellules souches neurales (neurosphères)	Remplacement de neurones ou effet trophique	Ischémie cérébrale (IC), SLA	IC : Phase 1 SLA : Phase 2
Cellules souches embryonnaires	Repopulation de paroi rétinienne par cellules épithéliales pigmentaires de la rétine issues de cellules souches embryonnaires (UK)	Dégénérescence maculaire avancée liée à l'âge, dégénérescence maculaire de stargardt	Phase 1/2
Cellules souches pluripotentes induites	Repopulation de paroi rétinienne par des cellules épithéliales pigmentaires de la rétine issues de cellules souches pluripotentes induites autologues (Japon)	Dégénérescence maculaire avancée liée à l'âge	Phase 1

Tableau 1 : Essais cliniques impliquant les cellules souches

Indications et pathologies ciblées des essais thérapeutiques les plus avancés concernant les cellules souches. Les essais sont classés en fonction du type de cellule souche faisant l'objet d'investigations SLA : Sclérose Latérale Amyotrophique.

2. Médicaments commercialisés utilisant des cellules souches

En 2010, un rapport du Leem faisant l'état des lieux de la thérapie cellulaire en France et dans le Monde rapportait 42 produits de thérapie cellulaire commercialisés à l'époque. Les principales aires thérapeutiques étaient la dermatologie et le traitement des plaies en particulier, ainsi que la réparation osseuse et cartilagineuse. Ces produits utilisent principalement des cellules différenciées et seuls 3 produits contiennent véritablement des cellules souches : il s'agit d'un produit comprenant des cellules souches mésenchymateuses allogéniques contenues dans un squelette permettant la reconstruction osseuse dans certaines pathologies orthopédiques de la colonne vertébrale (*Osteocel®*, *Osteocel plus®*), et de deux produits utilisant des cellules progénitrices autologues issues de follicules capillaires utilisés dans la réparation des plaies (*EpiDex®* et *EuroGraft®-M*).

Il y a donc encore très peu de produits utilisant des cellules souches disponibles sur le marché, car un certain nombre d'obstacles sont encore à surmonter pour pouvoir transférer les concepts de traitement des laboratoires de recherche académique vers les industries pharmaceutiques.

3. *Perspectives et limites*

Il existe encore beaucoup de questions en suspens dans le domaine de la thérapie cellulaire utilisant les cellules souches en thérapeutique humaine, et beaucoup d'entre elles bloquent encore la mise en pratique de concepts qui ont fait leurs preuves dans certains modèles animaux et cellulaires.

a) *Conditions de culture*

Il existe encore un certain nombre de problématiques à résoudre concernant les modalités de culture des cellules souches destinées à être administrées chez l'Homme[103].

Il faut en effet développer des milieux de bonne qualité permettant aux cellules souches de conserver un état indifférencié à long terme, tout en permettant une vitesse de prolifération correcte. Les milieux utilisés dans les laboratoires de recherche comprennent de nombreux composés animaux dans leur composition, et notamment du Sérum de Veau Fœtal (SVF). Ce SVF, et les composés d'origine animale ne peuvent être contenus dans les milieux de culture des cellules souches à usage humain, en raison de problèmes d'approvisionnement, de variabilité inter lots, de contaminations des milieux par des agents pathogènes bovins, et de présence résiduelle d'allo-antigènes. Ainsi les milieux récemment développés qui ne contiennent pas de protéines et dont la composition est exactement connue semblent les plus adaptés aux Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF) des MTI à usage humain. Ces milieux peuvent ensuite être complétés avec des hormones, facteurs de croissance, protéines recombinantes[114].

Pour résumer, le milieu idéal permettrait une prolifération rapide des cellules, en évitant l'apparition de mutations génétiques à l'origine d'une transformation des cellules tout en permettant de conserver le capital souche des cellules.

b) *Tumorigénicité*

Aujourd'hui plus que jamais, la prévention des effets indésirables associés à l'utilisation des médicaments est d'une importance primordiale. Aussi l'injection de MTI risquant d'induire la formation de tumeurs chez le patient est inacceptable et il convient de réduire au minimum ce risque de tumorigénicité[28, 103, 115].

Le risque d'induction de tumeurs après injection de cellules souches dépend du type de cellule considéré. Les cellules souches adultes, et les CSM en particulier sont susceptibles d'acquérir des mutations chromosomiques et génétiques susceptibles de les transformer en cellules cancéreuses. Le test de référence actuel pour la détection des mutations chromosomiques est le karyotypage, mais sa sensibilité reste néanmoins relativement faible. Étant donné le temps de séjour potentiellement important des cellules souches au sein de l'organisme du patient après injection, des tests de forte sensibilité doivent être mis au point pour valider précisément la qualité des cellules obtenues, et de détecter avec une forte sensibilité la présence d'anomalies chromosomiques et génétiques susceptibles d'induire une transformation cancéreuse. Des tests de forte sensibilité ont été récemment mis au point comme le CGH assay (essai de comparaison d'hybridation génomique) permettant une résolution de l'ordre de 50kb, mais des progrès doivent encore être faits pour baisser encore le

seuil de détection de ces techniques. De même l'EMA préconise la réalisation d'essais précliniques sur gros animaux, avec un longue période de suivi après injection des CSM afin de pouvoir détecter la formation de tumeurs.

Dans le cas de l'utilisation de cellules différenciées à partir de cellules pluripotentes, le principe est de vérifier l'absence de cellules souches non différenciées résiduelles dans la préparation cellulaire finale, qui risquerait de déclencher des tératomes après injection. La présence d'une seule de ces cellules dans la suspension étant suffisante pour induire le tératome, des techniques de détection très sensibles doivent être mises au point. Les méthodes les plus récentes permettent de détecter des miRNA spécifiques des cellules souches pluripotentes avec une limite de détection de l'ordre de la femtomole, voir de l'attomole, encore faut-il, avant de les mettre en application déterminer précisément les séquences de ces miRNA spécifiques, ce qui n'est pas encore le cas en pratique[28].

Outre la détection des cellules incomplètement différenciées dans la suspension cellulaire finale, l'autre moyen évident de réduire les risques de formation de tératomes à l'injection est d'optimiser les méthodes de différenciation des cellules ES et iPS en cellules totalement matures. Pour le moment, le processus de différenciation est quelque chose « d'artisanal » dans sa réalisation en raison de l'instabilité de certaines lignées de cellules ES. De plus, certains processus à l'origine de la différenciation des cellules ES et iPS ne sont pas encore pleinement compris et identifiés[116].

c) Modalités d'administration

Il reste des progrès important à réaliser dans le domaine de la détermination de la modalité d'administration des cellules souches[117]. En effet, nous avons montré que la localisation finale de ces cellules au sein de l'organisme est dictée par des phénomènes complexes de homing. Ces phénomènes peuvent conduire à une implantation des cellules souches dans divers organes non ciblés en cas d'injection systémique. Différentes modalités d'administration des cellules souches doivent donc être testées, en tenant compte de la grande diversité des indications possibles (traitement de l'ostéogénèse imparfaite, de l'infarctus du myocarde, de la transplantation d'organes solides, ou de leur utilisation comme support d'hématogénèse en cas de co-administration avec les cellules souches hématopoïétiques[37, 44, 67, 118], dans des modèles animaux précliniques avant de pouvoir procéder à leur administration chez l'humain. Pour conférer une bonne valeur translationnelle à ces études précliniques, les modèles animaux doivent bien entendu être les plus proches possibles de l'Homme en terme de physiologie et de corpulence[103].

Dans la majorité des cas, la détermination de la quantité de cellules à administrer reste encore à déterminer, là encore en raison de la multiplicité des applications possibles. Encore une fois, pour des raisons évidentes de transfert d'échelle cette détermination ne pourra être effectuée sur les modèles classiques de rongeurs, mais par la réalisation de tests précliniques sur de gros animaux, dont la corpulence se rapproche de celle de l'Homme[103].

IV. CONCLUSION

Cette première partie bibliographique nous a permis de définir précisément les caractéristiques fondamentales des cellules souches en général, et des cellules souches mésenchymateuses, dont font partie les cellules souches issues du liquide amniotique qui seront concernées par le travail expérimental de cette thèse.

Nous avons exposé les mécanismes d'actions sous tendant les applications possibles de ces cellules dans le cadre de la réparation et de la régénération tissulaire.

Nous avons également présenté les cadres légaux régissant chaque étape de la mise au point d'un médicament de thérapie cellulaire. Nous avons montré que le développement préclinique de cette catégorie de médicament était associé à des problématiques spécifiques de sécurité d'utilisation et de démonstration d'efficacité. L'agence européenne du médicament et les experts de la thérapie cellulaire s'accordent à dire que ces produits de thérapie cellulaire devraient être validés sur des modèles précliniques de gros animaux, avec une période de suivi suffisamment longue.

PARTIE II: LA TRANSPLANTATION RENALE

La transplantation de greffons sains afin de suppléer à la défaillance terminale d'un organe est un versant souvent oublié de la médecine régénérative. C'est peut être la conséquence d'une médiatisation inférieure, due à l'engouement du public pour les cellules souches, sorte de panacée des temps modernes, sensées être capables de régénérer n'importe quel organe en quelques jours. La réalité des faits est tout autre car si les cellules souches constituent peut être le futur de la médecine régénérative, la transplantation d'organe sauve de nombreuses vies à travers le monde, et ce depuis 1954, date du succès de la première greffe de rein.

Depuis cette première transplantation, des progrès thérapeutiques majeurs ont été réalisés pour empêcher le rejet immunologique du greffon, mais également pour prévenir les lésions dues à l'ischémie reperfusion, phénomène particulièrement délétère pour l'organe mais inévitable lors de la transplantation.

Nous avons délibérément choisi de ne pas traiter des mécanismes immunitaires de rejet de greffe majoritairement liés à l'allotransplantation, en dépit du fait que certaines cellules souches ont montré des capacités particulièrement intéressantes de modulation de la réponse immunitaire. En effet, même si cette problématique est d'un intérêt indéniable, nous verrons dans la troisième partie que le modèle porcin de transplantation rénale que nous avons développé cible les lésions engendrées par la séquence d'ischémie reperfusion, en l'absence de tout phénomène d'allo-reconnaissance. Les mécanismes immunitaires du rejet des greffons allogénique ne seront donc pas traités, et feront l'objet d'une des perspectives de notre travail expérimental.

Après avoir présenté le contexte actuel de la transplantation rénale en France et notamment souligné le problème de la pénurie d'organe rencontrée par les équipes de transplantateurs, entraînant la nécessité d'élargir le pool de donneurs potentiels, je décrirai plus précisément les lésions initiées par la séquence d'ischémie reperfusion et les stratégies thérapeutiques actuellement développées pour les prévenir.

I. SITUATION ACTUELLE EN TRANSPLANTATION RENALE

Le contexte actuel de la transplantation d'organe, et de la transplantation rénale en particulier, est marqué par une pénurie de greffons (Agence de Biomédecine, rapport 2011). Cette pénurie ne concerne pas seulement la France, mais touche l'ensemble des équipes de transplantateurs à travers le monde. Cette pénurie est d'autant plus grave que la transplantation rénale est le meilleur traitement à l'insuffisance rénale terminale.

A. RAPPORT 2011 DE L'AGENCE DE BIOMEDECINE

La transplantation constitue, d'après l'Agence de la Biomédecine, un programme prioritaire. En effet ce traitement souffre d'une carence de greffons. Aujourd'hui en France seulement 1/4 à 1/3 des patients sur liste d'attente sont greffés chaque année. L'agence de Biomédecine a recensé pour l'année 2011, 2976 greffés rénaux pour 11920 patients en attente de greffe.

Pour le rein, en 2011 en France, 3884 nouveaux malades ont été inscrits sur la liste nationale d'attente pour une greffe rénale, soit une diminution de 6% par rapport à l'année 2010. Pour la première fois un arrêt de progression et, plus encore, une diminution des nouvelles inscriptions sont observés (Figure 9)

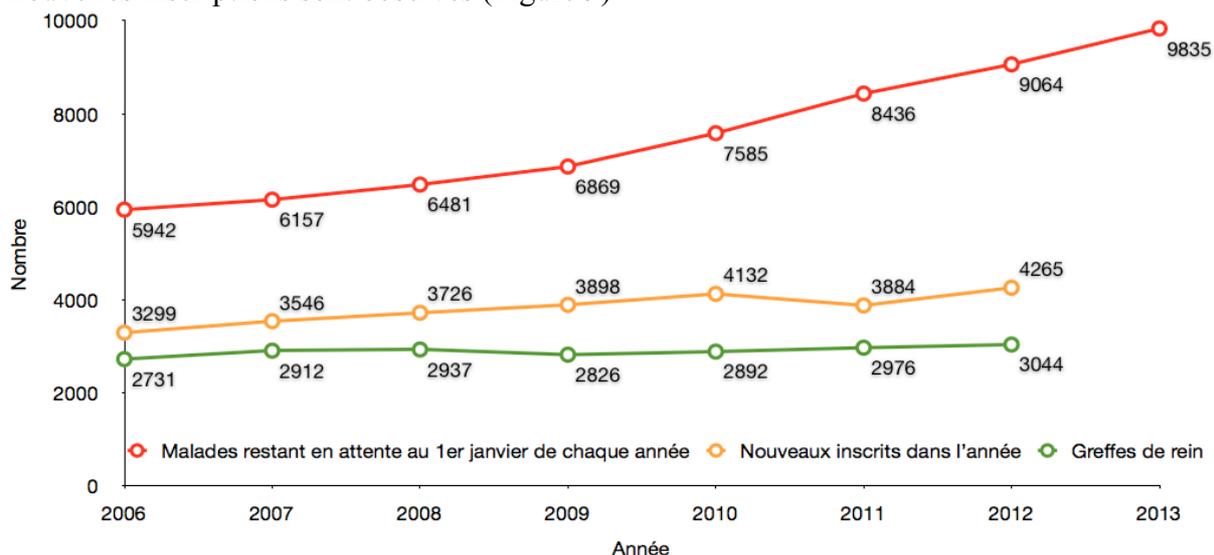


Figure 9: Patients en attente de greffes

Evolution de la liste d'attente et devenir des candidats en greffe rénale (source Agence de Biomédecine, rapport 2011)

L'écart entre le nombre d'organes disponibles et le nombre de patient dont la situation relève de la transplantation rénale est d'autant plus problématique que la qualité de vie des patients en attente de greffe est grandement impactée. En effet un patient sous dialyse, en attente d'une greffe rénale, a une espérance de vie réduite, inférieure à celle d'un patient greffé. De plus, les personnes en attente de recevoir un greffon sont soumises à d'importantes contraintes de temps et de santé, imposant un emploi du temps très rigoureux.

Il est donc nécessaire d'étendre les possibilités de greffe pour des patients toujours plus nombreux, en augmentant le recensement des donneurs potentiels, et en élargissant les critères de sélection de ces donneurs afin de disposer d'un nombre plus important d'organes à prélever. Les pistes d'actions possibles portent sur : i) l'optimisation du recensement et du prélèvement des donneurs en état de mort encéphalique, ii) l'élargissement des critères de choix des donneurs vers des donneurs à critères étendus (aussi appelés donneurs marginaux), iii) le développement des prélèvements sur les personnes décédées après un arrêt cardiaque, que la loi autorise en France depuis 2006 (décret du 2 août 2005), iv) le développement des prélèvements sur les donneurs vivants.

B. LES DIFFERENTS DONNEURS

Classiquement, en transplantation d'organe, il existe 3 types de donneurs :

1. Le donneur vivant

C'est le donneur idéal, offrant les meilleures conditions de prélèvement et de greffe dans une limite de temps optimale. Ce sont les greffes présentant le meilleur taux de réussite. Le temps de conservation extracorporelle des greffons est court (2 à 3 heures). En France ce type de donneurs ne représente que 10% des greffes rénales. Cette modalité est plus largement développée dans d'autres pays, en effet ces donneurs représentent 24% des dons en Grande-Bretagne, 38% en Suisse, 40% dans les pays scandinaves et 42% aux Etats-Unis.

2. Le donneur en état de mort encéphalique

Cette forme de décès fait suite à des événements violents (traumatisme crânien grave, accident vasculaire cérébral, etc...). Ce type de décès correspond à l'arrêt total de la perfusion sanguine au niveau du cerveau aboutissant à sa destruction irréversible alors que tous les autres tissus sont vivants, grâce essentiellement au maintien de la fonction cardiaque et de la respiration artificielle. Cet état de mort encéphalique est mis en évidence par des examens cliniques répétés puis confirmés par un examen paraclinique défini dans le Décret du 2 décembre 1996. En France, ce sont les donneurs les plus fréquents, ils représentent 87.9% des greffes de rein (Agence de Biomédecine, rapport 2011).

3. Le donneur décédé après arrêt cardiaque (DDAC)

Le manque de donneurs a poussé l'Agence de Biomédecine et des transplantateurs, à élargir les sources de dons. C'est pourquoi, en France, la loi autorise depuis 2006 le prélèvement chez les donneurs DDAC. Cette nouvelle source serait susceptible d'augmenter le pool de greffons de 20 à 40%[119, 120]. En France, le prélèvement sur donneurs DDAC ne représente que 2,2% des greffes de rein réalisées en 2011. En effet, la fréquence d'organes non greffés pour cause de mauvaise qualité est plus élevée dans le cas des prélèvements de donneurs DDAC que dans le cas des donneurs en état de mort encéphalique[121]. (Figure 10)

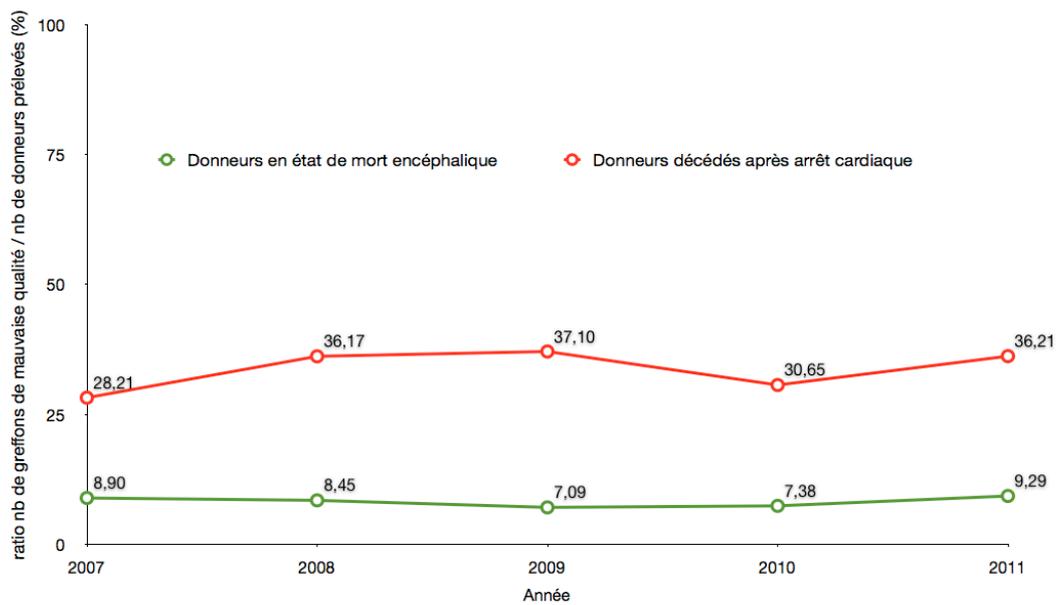


Figure 10 : Greffons rénaux refusés

Evolution par année du pourcentage de greffons rénaux refusés pour cause de mauvaise qualité par rapport au nombre total de donneurs prélevés en fonction du type de donneur. (Agence de Biomédecine, rapport 2011).

La classification de Maastricht présentée en 1995 classe les DDAC potentiels en fonction des circonstances de survenue du décès par arrêt cardiaque (Tableau 2). Les prélèvements de reins étaient jusqu'à récemment limités aux patients issus des catégories I, II et IV de Maastricht c'est-à-dire les arrêts cardiaques extra-hospitaliers et les arrêts cardiaques survenant chez un patient en état de mort encéphalique. Récemment, tout indique que les prélèvements de reins sur donneurs décédés après décision d'un arrêt de soin en service de réanimation (Classe III) seront également autorisés.

CLASSIFICATION DE MAASTRICHT		
I	Arrêts cardiaques EXTRA- Hospitaliers	Personnes qui arrivent à l'hôpital en arrêt cardiaque et pour lesquelles le prélèvement d'organes est envisagé si la durée de l'arrêt cardiaque est inférieure à 30 minutes. Il s'agit d'un arrêt cardiaque constaté en dehors de tout secours médical ou paramédical et s'avérant immédiatement ou secondairement irréversible.
II		Personnes qui ont un arrêt cardiaque en présence des secours, et dont la réanimation (massage cardiaque et respiration artificielle) échoue. C'est l'arrêt cardiaque dit "réfractaire".
III	Arrêts cardiaques INTRA- Hospitaliers	Personnes pour lesquelles une décision d'un arrêt de soins en réanimation est prise en raison de leur pronostic.
IV		Personnes décédées en mort encéphaliques qui font un arrêt cardiaque irréversible au cours de la prise en charge en réanimation.
V		Equivalent de la Classe II, en intra-hospitalier.

Tableau 2 : Classification de Maastricht (1995)

Le tableau classe les DDAC en différentes présent les catégories de DDAC en fonction des circonstances de l'arrêt cardiaque en vert les catégories de DDAC autorisées, en orange la catégorie potentiellement autorisée à court terme.

C. BENEFCES DE LA TRANSPLANTATION RENALE

Contrairement à la majorité des autres organes susceptibles d'être transplantés, il existe des stratégies thérapeutiques permettant d'assurer les fonctions essentielles du rein, dans le cas de sa dysfonction terminale. Ces stratégies permettent la survie du malade en insuffisance rénale chronique terminale, dans l'attente de la mise à disposition d'un greffon.

1. Qualité de vie des patients

La majorité des fonctions endocrines du rein (production d'EPO, activation de la vitamine D par hydroxylation) peuvent être assurées par l'administration de molécules thérapeutiques de substitution, avec un impact relativement faible sur la qualité de vie des patients.

Les fonctions de filtration du rein, vitales pour la survie, sont quant à elles assurées par la mise sous dialyse. Cette méthode permet l'élimination des produits de dégradation du métabolisme et de restaurer l'équilibre hydro-électrolytique du sang. En 2011, 9354 nouveaux patients ont été mis en dialyse, alors que l'on compte, pour la même année 2976 patients greffés. Parmi tous les patients actuellement traités pour une insuffisance rénale chronique terminale, la majorité d'entre eux l'est par dialyse (55%) (Agence de Biomédecine, Rapport 2011). Même si les patients greffés sont dans l'ensemble plus jeunes et possèdent moins de comorbidité que les patients sous dialyse, les patients greffés ont un taux de mortalité très inférieur à celui des patients en dialyse. Ainsi, entre 60 et 69 ans, pour 1000 patients dialysés

en 2011, 127 sont décédés dans l'année. Pour 1000 patients du même âge, porteurs d'un greffon rénal fonctionnel, seuls 24 sont décédés dans l'année.

De la même manière, les patients greffés ont, pour un âge identique, une espérance de vie globalement supérieure à celle des patients traités par dialyse. A titre d'exemple, l'espérance de vie d'un patient de 65 ans traité par dialyse est de 6,5 ans, alors que pour un patient greffé celle-ci monte jusqu'à 14,6 ans. Ces valeurs sont à comparer avec l'espérance de vie d'une personne de 65 ans issue de la population générale, qui atteint 20,5 ans d'après l'INSEE. Un malade en insuffisance rénale chronique terminale de 65 ans traité par greffe rénale vivra donc en moyenne jusqu'à presque 80 ans, alors qu'un malade du même âge ne vivra que jusqu'à 72 ans si il est traité par dialyse. (Agence de Biomédecine, rapport 2011).

La greffe rénale est donc la thérapie de choix pour les patients en insuffisance rénale chronique terminale, car elle permet, comparée au traitement par dialyse, d'augmenter l'espérance de vie et de diminuer le taux de mortalité des malades.

2. Impact économique

La greffe rénale est également une source d'économies pour la société car un malade en insuffisance rénale chronique terminale coûte beaucoup moins cher à l'assurance maladie qu'un malade en dialyse. En 2007 par exemple, 82% des 4 milliards d'euros que coûtent la prise en charge de l'insuffisance rénale terminale en France sont consacrés à la dialyse, contre seulement 18% à la greffe rénale, alors qu'à cette période 25699 patients étaient porteurs d'un greffon fonctionnel, contre 31056 patients dialysés (Assurance Maladie, Agence de Biomédecine, rapport 2007).

En effet, si le coût de première année post-transplantation rénale est évalué à presque 50000 euros par l'assurance maladie, le coût des années suivantes diminue considérablement jusqu'à moins de 8000 euros par ans. Le coût d'une année de traitement par dialyse quant à lui ne diminue pas au cours du temps et s'élève à 70000 euros par patient.

Devant les avantages conséquents de la greffe rénale par rapport à la dialyse, que ce soit en termes de qualité de vie des patients ou en termes d'économies générés, il est primordial de développer des techniques permettant d'augmenter le nombre de greffes rénales réalisées chez les patients en insuffisance rénale chronique terminale.

D. ENJEUX ACTUELS

Dans la continuité de ce qui a été énoncé plus haut, le principal enjeu actuel de la transplantation rénale est de palier à la pénurie d'organe qui touche les équipes de transplantations, par l'extension du pool des donneurs potentiels et l'augmentation des chances de succès de la greffe rénale. Pour exemple, seuls 24,2% des patients en attente de greffe pourront être greffés au cours de l'année ((Agence de Biomédecine, rapport 2011)

1. Donneurs à critères étendus

L'évolution actuelle du don d'organes nécessite d'augmenter le pool des donneurs et implique donc une extension des critères de choix. Actuellement, les donneurs les plus nombreux sont les donneurs en état de mort encéphalique et les donneurs vivants, en raison principalement de la bonne qualité de leurs greffons. Il existe une autre catégorie de donneurs appelée donneurs à critères étendus, dont les organes sont considérés comme étant à risque pour le receveur. Les greffons issus de ces donneurs sont effectivement associés à une incidence supérieure de non fonctions primaires (NFP), d'une durée de survie du greffon diminuée et d'une surmortalité opératoire[121-123].

Si nous mettons de côté les donneurs vivants, un donneur « idéal » est un donneur en état de mort encéphalique, âgé de moins de 40 ans, dont la cause de la mort est traumatique, dont l'hémodynamique est stable au moment du prélèvement, dont le rein ne présente pas de lésion chronique sous-jacente et qui n'est pas porteur de maladie transmissible. Par définition, un donneur à critères étendus présente une ou plusieurs des caractéristiques différentes de celles d'un donneur décédé "idéal". Outre-Atlantique, il existe une définition plus précise du donneur à « critères étendus » ou donneur « marginal ». Ce donneur est âgé de plus de 60 ans, ou bien âgé de 50 à 59 avec deux des critères suivants : i) hypertension artérielle, ii) décès lié à un accident vasculaire et iii) fonction rénale altérée (créatininémie supérieure à 150 $\mu\text{mol/L}$ [124].

D'après cette définition, plus de 38% des patients greffés en France recevraient des greffons issus de donneurs marginaux, puisque ce chiffre représente le pourcentage de donneurs de plus de 60 ans (Agence de Biomédecine, rapport 2011). Parallèlement à ce vieillissement de la population des donneurs, les causes de décès tendent également à se modifier, avec une augmentation des décès vasculaires (cause de décès plus fréquente chez les personnes âgées) par rapport aux décès par traumatisme (cause de décès plus fréquente chez les personnes jeunes). Tous ces facteurs de risques participent à l'augmentation du nombre de greffons "marginaux" présentant des facteurs de comorbidités non négligeables. (Tableau 3)

Années	60 ans ou moins		Plus de 60 ans		Total	Moins de 2 facteurs de risque*		2 facteurs de risques ou plus*		Total
	N	%	N	%	N	N	%	N	%	N
1997	814	92,4	67	7,6	881	860	97,6	21	2,4	881
1998	919	92,5	75	7,5	994	967	97,3	27	2,7	994
1999	895	92,3	75	7,7	970	945	97,4	25	2,6	970
2000	892	87,8	124	12,2	1016	975	96	41	4	1016
2001	904	84,9	161	15,1	1065	1036	97,3	29	2,7	1065
2002	1018	85	180	15	1198	1141	95,2	57	4,8	1198
2003	895	80	224	20	1119	1069	95,5	50	4,5	1119
2004	975	75,5	316	24,5	1291	1217	94,3	74	5,7	1291
2005	972	70,9	399	29,1	1371	1298	94,7	73	5,3	1371
2006	1004	69,6	438	30,4	1442	1375	95,4	67	4,6	1442
2007	1062	68	499	32	1561	1441	92,3	120	7,7	1561
2008	1001	64	562	36	1563	1441	92,2	122	7,8	1563
2009	926	62,5	555	37,5	1481	1345	90,8	136	9,2	1481
2010	882	59,8	594	40,2	1476	1335	90,4	141	9,6	1476
2011	926	58,9	646	41,1	1572	1420	90,3	152	9,7	1572
Total	14085	74,1	4915	25,9	19000	18262	96,1	738	3,9	19000

* : Au moins deux facteurs de risque parmi l'hypertension artérielle, le diabète, un décès de cause vasculaire ou une créatinémie supérieure à 150 µmol/l

Tableau 3 : Comorbidités et donneurs

Evolution du nombre de donneurs présentant des facteurs de risques d'échec de la greffe (Agence de Biomédecine, rapport 2011)

Même si les greffes réalisées à partir de donneurs âgés à critères étendus sont associées à un risque plus important de rejet de greffe et de décès du patient, les patients recevant ces greffons, une fois passée la phase de surmortalité post-opératoire, ont un gain d'espérance de vie de 5 ans comparé aux patients dialysés[122, 124]. La diminution des risques d'échec de greffe à partir de reins de donneurs marginaux passe par une détection précoce des reins les plus à risque, par le développement d'outils pronostiques basés sur des paramètres biologiques, ainsi que par la réalisation d'une biopsie au moment du prélèvement.

Il faut également optimiser les conditions de conservation des greffons marginaux, notamment par la perfusion systématique des greffons sur machine de perfusion permettant la surveillance *ex vivo* de l'organe ainsi que la diminution du taux de reprise retardée de fonction (RRF)[125, 126]. La RRF est définie comme la nécessité d'au moins une séance de dialyse dans la première semaine post-greffe. La sélection du receveur et la diminution de la période de conservation de l'organe jouent également un rôle important dans l'amélioration des chances de survie du greffon issu de donneurs marginaux[127].

2. Donneurs décédés après arrêt cardiaque

Nous avons vu que les donneurs DDAC constituent une source potentielle de greffons, mais que cette catégorie de donneurs est encore assez peu utilisée. En effet, les greffes réalisées à partir de DDAC étaient à leur début plus coûteuses et complexes à organiser et accumulaient un plus grand nombre de NFP, un taux plus élevé de RRF, ainsi qu'une survie moindre des greffons.

Néanmoins depuis la première greffe rénale utilisant un greffon issu d'un donneur DDAC effectuée en France en 2006, les résultats des greffes réalisées à partir de ces donneurs se sont améliorés, jusqu'à obtenir des taux de NFP ou d'absence durable et définitive de fonction du greffon proches de ceux des greffes à partir de donneurs en état de mort encéphalique[128]. Même si le taux de RRF est toujours plus élevé dans le cas des donneurs

DDAC, le taux de survie des greffons à moyen et long terme est comparable à ceux obtenus avec des donneurs en état de mort encéphalique.

Cela s'explique notamment par une sélection stricte de donneurs et des receveurs, ainsi que le respect de conditions spécifiques de prélèvement et de conservation de l'organe.

La transplantation rénale est donc la solution la plus efficace et la plus intéressante pour traiter les patients atteints d'insuffisance rénale chronique terminale, que ce soit en terme de gain de qualité de vie pour les patients, qu'en terme de réduction des coûts liés à la prise en charge de la pathologie par l'Assurance Maladie. Malgré tout, la pénurie d'organe qui touche la France et le reste du Monde, a conduit les équipes de transplantateurs à étendre les critères de sélection des greffons vers ceux provenant de donneurs DDAC et de donneurs marginaux.

Si la première catégorie de donneurs constitue un réservoir important d'organes susceptibles d'être greffés, la seconde semble plutôt résulter d'une évolution naturelle inévitable du profil des donneurs vers des personnes toujours plus âgées, avec toujours plus de comorbidités. La qualité moindre des greffons provenant de ces donneurs engendre un risque accru de refus de procéder à la greffe, de complications post greffe voir d'échec de greffe. De ce fait, toute stratégie permettant l'optimisation de l'utilisation des greffons des donneurs marginaux et des donneurs DDAC, ainsi que l'amélioration des chances de succès de leur transplantation, est d'une importance capitale.

Les récents efforts des équipes de recherche dans le domaine ont montré qu'il était possible de ramener les taux de NRP, de RRF et de survie de ces greffons au niveau de ceux des greffons issus de donneurs en état de mort encéphalique, en ciblant prioritairement la séquence d'ischémie reperfusion et ses conséquences physiopathologiques.

Dans le chapitre à venir, nous décrirons plus précisément les phénomènes d'ischémie reperfusion caractéristiques de la transplantation rénale et ses conséquences pour l'organe, puis je vous présenterai les stratégies thérapeutiques susceptibles de lutter contre les lésions qu'ils engendrent.

II. ISCHEMIE REPERFUSION EN TRANSPLANTATION RENALE

Dans cette partie consacrée, je commencerai par définir plus précisément la, ou plutôt les séquences d'ischémie reperfusion (IR) spécifiques de la transplantation. J'exposerai ensuite les conséquences de cette IR sur le greffon, et notamment les lésions qu'elle induit sur les différentes structures anatomiques de l'organe et leur impact sur le succès de la greffe. Enfin je présenterai les différentes pistes thérapeutiques actuellement explorées pour limiter ces lésions afin de contribuer à l'élargissement des critères de sélection des donneurs.

A. DEFINITIONS

1. *L'ischémie*

D'une manière générale, l'ischémie est caractérisée par la diminution ou l'interruption de l'apport sanguin à l'organe considéré, et donc de l'apport en oxygène, en nutriments et du drainage des déchets cellulaires. Dans le cadre de la transplantation rénale, et en fonction du type de donneur considéré, la nature l'ischémie peut varier, que ce soit au niveau de la durée, de température, ou du milieu dans lequel elle aura lieu. On peut néanmoins considérer qu'il existe deux grands types de situation, celle regroupant les donneurs vivants et les donneurs en état de mort encéphalique, où l'organe subit une phase d'ischémie à faible température (ischémie froide), et celle des donneurs DDAC dans laquelle une phase supplémentaire d'ischémie à température corporelle précède l'ischémie froide infligée au greffon.

a) *Donneurs vivants, donneurs en état de mort encéphalique*

Dans le cas de ces deux catégories de donneurs, la phase d'ischémie débute lors du clampage de l'artère rénale, avant prélèvement du greffon. Cette phase correspond à la conservation extracorporelle de l'organe à greffer. Dès l'explantation, celui-ci est privé de son environnement physiologique et devient alors très exposé. En pratique, le greffon est d'abord rincé avec une solution de conservation d'organe à une température de 4°C, puis plongé pour conservation dans cette même solution.

L'intégralité de cette période qui se déroule jusqu'à l'implantation du greffon dans l'organisme du receveur correspond à la période d'ischémie froide. Il faut noter que le temps nécessaire à la réalisation des différentes anastomoses (veine, artère, uretère) par le chirurgien correspond également à une phase de réchauffement du greffon, quelque fois appelée ischémie tiède. Pour préserver le métabolisme du greffon, la température de la conservation a été fixée empiriquement à 4°C. La loi de Van't Hoff, dont on peut dire en simplifiant qu'elle définit l'efficacité d'une réaction chimique en fonction de la température, montre que l'activité métabolique d'un organe diminue de 50% à chaque palier de 10°C. A 4°C, le métabolisme actif résiduel est donc d'environ 10%.

L'hypothermie à 4°C permettrait donc de réduire les besoins métaboliques du greffon. Malgré cette faible température, les besoins de la cellule ne sont pas nuls et le métabolisme résiduel n'est pas suffisant pour la survie de l'organe[129]. De plus l'hypothermie semble surajouter des dommages cellulaires, à ceux déjà engendrés par l'ischémie en elle même.

Le métabolisme résiduel du greffon lors de sa conservation implique des apports en électrolytes, en nutriments et en énergie au cellules afin d'améliorer leur survie. Cet apport est réalisé par la solution de conservation d'organe. Cette solution est une solution acellulaire qui est formulée pour placer l'organe dans le meilleur environnement possible pour éviter au maximum le développement des lésions dues à la phase d'ischémie. L'impact de la solution de conservation sur le bon déroulement de la conservation de l'organe et sur la limitation du développement des lésions d'IR a fait que l'optimisation de la composition de ces solutions a un intérêt certain pour augmenter la qualité des greffons au moment de leur greffe[130].

La durée de la phase d'ischémie froide varie énormément en fonction du type de donneur considéré. En France, en règle générale, cette période d'ischémie froide varie (i) entre 2h et 4h pour le foie et le rein provenant du donneur vivant, (ii) entre 2h et 24h pour le rein provenant de donneur en mort encéphalique, et (iii) entre 2h et 18h pour le rein provenant du donneur décédé après arrêt cardiaque.

b) Donneurs décédés après arrêt cardiaque (DDAC)

Comme nous l'avons décrit plus haut, les greffons issus de donneurs DDAC, du fait du contexte dans lequel ils sont prélevés, subissent une phase d'ischémie à température corporelle (ischémie chaude) précédant la conservation de l'organe (ischémie froide). Pour ces greffons, l'ischémie débute à l'arrêt de la circulation sanguine suite à l'arrêt cardiaque.

Cette ischémie chaude peut être divisée en deux périodes distinctes : la première suit immédiatement l'arrêt cardiaque et correspond au délai entre celui-ci et le démarrage de la réanimation par massage cardiaque externe. Cette période est caractérisée par un arrêt de la circulation sanguine au niveau de l'organe et est également appelée période de « no flow ». La phase de réanimation par massage cardiaque externe est quant à elle caractérisée par un rétablissement très partiel de la perfusion sanguine de l'organe et est donc appelée période de « low flow ».

Dans le cadre du prélèvement de donneurs DDAC, cette durée d'ischémie chaude (« no flow + low flow ») ne doit pas dépasser 150 minutes, sous peine d'entraîner l'augmentation du taux de NFP et RRF après transplantation[125, 128].

L'ischémie chaude est effectivement particulièrement dommageable pour l'organe, car elle est mal contrôlée: le milieu dans lequel l'organe (sang) n'est alors pas optimisé pour la conservation, et l'organe est encore sous la dépendance des phénomènes de libération de cytokines et autres messagers délétères accompagnant l'arrêt cardiaque.

Ce contexte ischémique particulièrement défavorable a conduit à la systématisation d'une méthode particulière de la conservation de l'organe. Lors de la conservation d'organes issus de donneurs vivants ou en état de mort encéphalique, le greffon baigne dans la solution de conservation. Dans le cas des donneurs DDAC, le greffon subit une conservation dynamique, par perfusion de la solution de préservation dans l'organe grâce à l'action d'une machine de perfusion[126, 130].

Cette technique a permis de diminuer significativement les NFP et RRF des greffons issus de donneurs DDAC, et reste une voie de développement importante pour l'amélioration de la qualité des greffons issus de donneurs DDAC.

2. La reperfusion

Au moment de la reperfusion, dans le cas des greffes vascularisées, le greffon est relié au réseau vasculaire du receveur permettant ainsi le retour de la circulation sanguine au sein de l'organe. L'organe va donc à la fois se réchauffer, et retrouver un apport « normal » en oxygène (normoxie) ainsi qu'en nutriments. En théorie, ce changement de conditions se fait de manière immédiate après déclampage puisque physiologiquement le rein est perfusé à un débit de 1 litre par minute. Malgré tout, certaines zones du greffon ne sont pas reperfusées,

c'est le phénomène de "no-reflow", avec pour conséquence une persistance l'ischémie chaude au sein de ces territoires. La qualité de la reperfusion du greffon est donc liée à la qualité de sa conservation.

Contrairement à ce que l'on pourrait penser, la reperfusion de l'organe n'a pas que des conséquences bénéfiques pour le greffon. Le retour en normoxie et l'apport soudain d'énergie et de nutriments provoque, comme je vais maintenant vous le montrer, l'exacerbation des mécanismes lésionnels initiés lors de la phase d'ischémie.

B. LES LÉSIONS D'ISCHEMIE REPERFUSION

Il faut souligner que même si les lésions d'ischémie reperfusion ou lésions d'IR sont moins connues du grand public que les lésions du greffon engendrées par le rejet immunitaire, ces lésions d'IR n'en sont pas moins une cause potentielle de rejet du greffon. Il a même été montré que les lésions d'IR, considérées comme allo-indépendantes, et les lésions immunologiques de rejet, allo-dépendantes, sont très liées. En effet, les facteurs allo-indépendants provoquent des lésions favorisant les dysfonctions primaires et tardives du greffon, et les facteurs allo-dépendants participent aux rejets aigus et chroniques du greffon[131].

Durant la séquence d'IR, les interactions existant entre ces facteurs allo-dépendants et allo-indépendants renforcent les lésions conduisant aux rejets métaboliques et/ou immunologiques des transplants à plus ou moins long terme. Limiter les lésions d'IR permet donc également de diminuer les risques de rejet immunitaire du greffon, quelque soit la compatibilité entre le donneur et le receveur[132-134].

Les lésions d'ischémie et de reperfusion sont très intimement liées, et il est très difficile de séparer d'un côté les lésions spécifiquement engendrées par la phase d'ischémie, et celles dues uniquement à la phase de reperfusion. Pourtant, pour des raisons de facilité de lecture et de compréhension, j'ai choisi de séparer les lésions initiées durant l'ischémie, et celles qui sont décrites lors de la transplantation. Il faut donc lire ce manuscrit en gardant à l'esprit que ces deux « étapes » de développement des lésions d'IR se déroulent de manière continue.

1. Lésions d'ischémie

L'ischémie au sens strict a pour conséquence directe des troubles majeurs de l'homéostasie de l'organe touché[134], tels que : i) un arrêt du flux vasculaire induisant une stase sanguine et une activation de la cascade de coagulation, ii) un arrêt de l'apport en oxygène aux tissus (hypoxie), iii) un arrêt des apports en nutriments sanguins comme le glucose, iv) une diminution de la température de l'organe non vascularisé.

Lors de cette phase d'ischémie, on assiste donc à une accumulation des déchets issus du métabolisme anaérobie et à une déplétion énergétique importante. La chute de la pression partielle en oxygène dans l'organe provoque une cessation du métabolisme oxydatif cellulaire

qui se réoriente vers le métabolisme anaérobie. La mitochondrie ne peut plus assurer la phosphorylation oxydative nécessaire à la production d'ATP, substrat énergétique principal de la cellule. Le métabolisme anaérobie assure la continuité de la glycolyse par la réduction du pyruvate en lactate. Cette voie ne permet pas de générer suffisamment d'ATP pour répondre aux besoins énergétiques de la cellule et va induire une acidose cellulaire particulièrement délétère, par accumulation de lactate associée à la libération d'ions proton (H^+) provenant de hydrolyse de l'ATP. Les protons comme le lactate étant ensuite transférés vers le milieu extracellulaire, l'acidose devient généralisée au sein de l'organe, et ce dans les 10 minutes suivant le début de l'ischémie[135, 136].

Le transfert des protons hors de la cellule est réalisé par la pompe Na^+/H^+ qui fait rentrer un Na^+ contre chaque H^+ expulsé hors de la cellule. Il en résulte donc une accumulation de Na^+ intracellulaire. Cette accumulation est alors contrée par l'activation de l'échangeur Na^+/Ca^{2+} qui va à son tour provoquer une accumulation de Ca^{2+} intracellulaire[137, 138]. Ce surplus de calcium intracellulaire va activer les enzymes protéolytiques calcium-dépendantes dont l'action va entraîner une mort cellulaire massive[139].

Dans le cadre de la transplantation, l'ischémie se déroule au moins en partie dans un contexte d'hypothermie nécessaire à la conservation de l'organe. Cette hypothermie va provoquer des lésions spécifiques se surajoutant à celles due à l'ischémie. En effet, à $4^{\circ}C$, la diminution du métabolisme rend difficile la mise en place des systèmes de défense cellulaire contre l'ischémie. L'action combinée du froid et de l'ischémie conduit à une inhibition complète de la production d'ATP[140].

En raison d'un métabolisme résiduel, les réserves en ATP de la cellule sont vite épuisées, et on considère qu'au bout de 4 heures d'ischémie à $4^{\circ}C$, environ 95% de l'ATP a disparu, conduisant à la dégradation de l'intégrité cellulaire, à la formation de l'œdème cellulaire et à l'acidose caractéristiques de la transplantation d'organe[140].

La diminution des réserves en ATP va également avoir une autre conséquence dramatique pour la cellule. En effet les cellules ont une concentration intracellulaire en K^+ très supérieure à celle du milieu extra cellulaire, et inversement, la concentration en Na^+ de la cellule est très faible comparé à celle du milieu extra cellulaire. Ce gradient de concentration de chaque côté de la membrane cellulaire est assuré par un transfert actif des ions K^+ de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule, contre des ions Na^+ qui suivent le trajet inverse[138]. Ce phénomène est dit actif car il est consommateur en énergie, et donc en ATP. L'épuisement des réserves en ATP va donc entraîner un arrêt de ces pompes et les concentrations en chacun des ions vont avoir tendance à s'équilibrer de chaque côté de la membrane cellulaire, avec une fuite de K^+ vers le milieu extra cellulaire et une entrées massive de Na^+ et d'eau vers le milieu intracellulaire. Cette entrée massive d'eau va engendrer un gonflement de la cellule : c'est l'œdème cellulaire qui va toucher également la mitochondrie et perturber son métabolisme[141].

La mitochondrie est l'organite qui est responsable de la synthèse de l'ATP, et comme nous venons de le voir, c'est également un organite qui est touché de plein fouet par l'ischémie[142-144]. L'instabilité de la membrane de la mitochondrie qui permet la synthèse de l'ATP grâce à l'oxygène par un transfert d'électrons le long des complexes constituant la chaîne respiratoire. La destruction de la mitochondrie va entraîner une libération de ces électrons qui vont réagir avec l'oxygène résiduel présent lors des temps précoces de l'ischémie. Cette réaction va donner naissance à une espèce radicalaire très active : l'anion superoxyde (O_2^-). Cette espèce radicalaire de l'oxygène (ROS) va induire des dommages irréparables sur l'ADN, les protéines et les composants lipidiques des membranes cellulaires, conduisant à une surmortalité cellulaire[145, 146].

Les principaux mécanismes physiopathologiques des lésions d'ischémie ont été réunis dans la Figure 11.

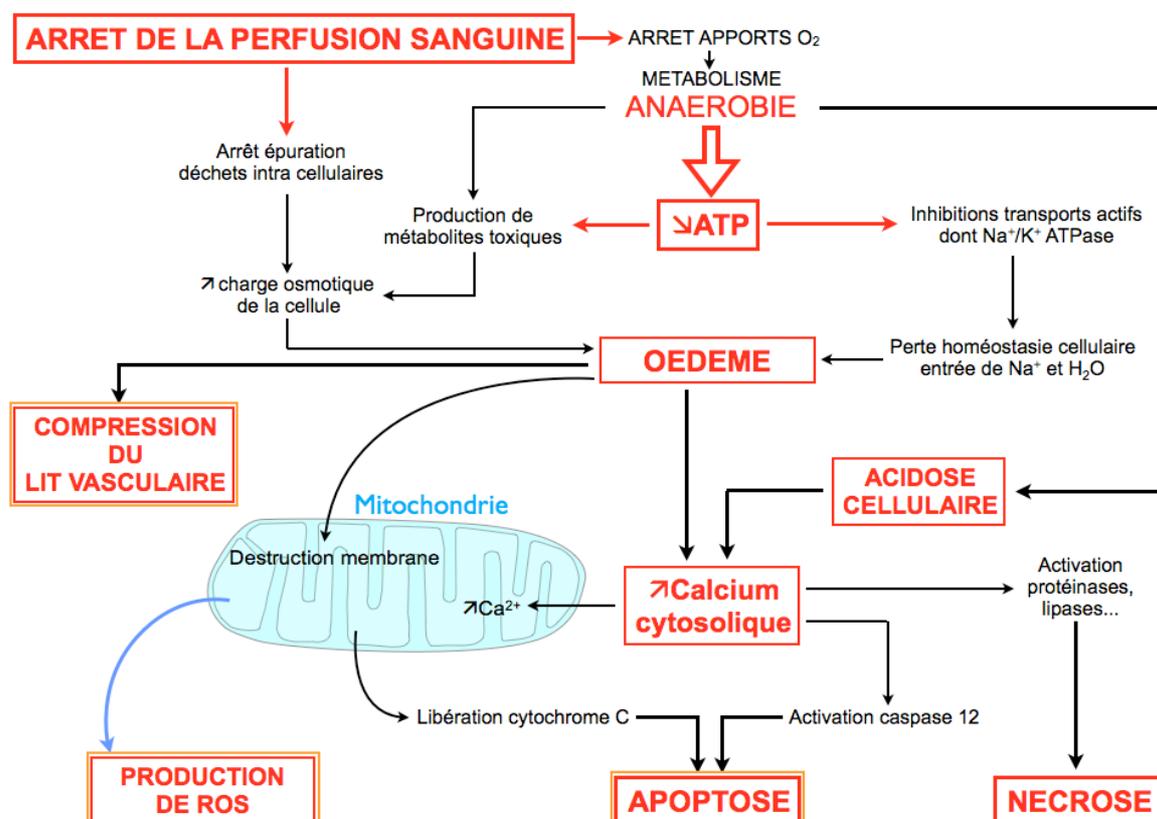


Figure 11 : Principaux mécanismes initiateurs des lésions d'ischémie

Les grands événements physiopathologiques sont encadrés en rouge. Les événements susceptibles d'être exacerbés par la reperfusion sont encadrés en rouge et orange. ROS : espèces radicalaires de l'oxygène.

Au cours de la constitution des lésions d'IR, les cellules endothéliales sont les premières cellules touchées, avec une nécrose et leur détachement de la paroi des vaisseaux. Ce mécanisme est susceptible d'activer la coagulation intravasculaire, favorisant ainsi la formation de phénomènes thrombo-emboliques lors de la reperfusion[147].

Les effets délétères des lésions d'ischémie apparaissent peu pendant la phase d'ischémie, ils sont plutôt "visibles" au moment de la transplantation chez le receveur. En effet, les modifications métaboliques et structurelles qui ont lieu pendant la période d'ischémie font le lit des lésions de transplantation.

2. Lésions de reperfusion

Les premiers processus physiopathologiques liés à la transplantation sont : l'initiation de la réponse aux lésions provoquées par l'ischémie et l'extension de ces dernières par un mécanisme immuno-inflammatoire.

Tout d'abord, l'œdème cellulaire et tissulaire décrit précédemment va, par un phénomène purement mécanique, aboutir à la compression du lit vasculaire par gonflement des structures tissulaires[136]. Ce phénomène est révélé lors de la reperfusion de l'organe, en isolant du flux sanguin certaines parties du greffon qui subiront alors une ischémie prolongée.

De la même manière que l'œdème initié lors de l'ischémie va révéler ses conséquences pathologiques lors de la reperfusion, l'endothélium altéré par l'ischémie va activer la coagulation et entraîner la formation de thrombus lors du rétablissement de la circulation sanguine. Ces thrombus, associés à la compression du lit vasculaire par l'œdème tissulaire, vont à leur tour favoriser la constitution de zones non vascularisées ou zone de « no-reflow » au sein du greffon[148, 149].

En plus des conséquences sur le "no-reflow", l'activation de la voie de la coagulation a pour conséquence une activation de la NO synthase endothéliale augmentant la production de NO (monoxyde d'azote). A de fortes concentrations cet élément vasodilatateur réagit avec les radicaux superoxydes pour produire des peroxynitrites (ONOOH^{\cdot}), formant des espèces radicalaires à l'origine de lésions sévères du stress oxydant.

La reperfusion de l'organe est accompagnée d'un afflux massif de glucose et d'oxygène au sein d'un tissu lésé dont les cellules et plus particulièrement les mitochondries sont très endommagées. Les mitochondries n'étant plus capables de produire efficacement de l'ATP, l'oxygène va être à l'origine de la production massive de ROS, et notamment la formation de radicaux hydroxyles (HO^{\cdot}) hautement cytotoxiques, qui vont initier la peroxydation des lipides membranaires de la cellule, de l'ADN et des protéines cellulaires conduisant à la destruction de la cellule[145, 146].

Dans le cadre de la transplantation, les lésions d'IR, qui rappelons-le sont allo-indépendantes, vont induire une augmentation de l'immunogénicité de l'organe, conduisant à l'activation des cellules du système immunitaire inné. Les cellules altérées du greffon libèrent de nombreux médiateurs pro-inflammatoires. Ces médiateurs, parmi lesquels de molécules chimioattractantes comme MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1), la fraction C5a du complément et l'IL-8, mais aussi des cytokines pro inflammatoires comme IL-1 β et TNF- α . Ces médiateurs vont entraîner le recrutement des leucocytes sanguins dans le tissu du greffon, et leur orientation vers un phénotype effecteur. L'envahissement du greffon par les cellules immunitaires va se faire dans les premières heures suivant la reperfusion et en plusieurs vagues successives. Celui-ci débute par l'infiltration des polynucléaires neutrophiles (PNN), puis le recrutement des monocytes (MO) et leur transformation locale en macrophages (MA), le recrutement des cellules Natural Killer (NK) et enfin l'infiltration des Lymphocytes T (LyT)[134, 150, 151].

L'infiltration puis l'activation des PNN et des MO/MA va aboutir à la dégradation tissulaire du greffon, par action cellulaire directe, ou par la production de molécules pro inflammatoires et cytotoxiques.

Ce processus inflammatoire extensif au sein du greffon, les lésions tissulaires qu'il engendre et les cellules inflammatoires qui y sont recrutées vont aider à déclencher, amplifier et maintenir la réponse immunitaire allo-dépendante, et provoquer ainsi un rejet global de l'allogreffe.

Dans le contexte actuel de pénurie généralisée d'organes, le développement de stratégies thérapeutiques pouvant limiter des lésions d'IR dues à la transplantation ou favoriser les phénomènes de réparation tissulaire post transplantation, sont des perspectives de tout premier plan.

C. STRATEGIES VISANT A LIMITER L'IMPACT DES LESIONS D'IR SUR LES GREFFONS

L'étude des mécanismes à l'origine de l'initiation et du développement des lésions d'IR a permis de dégager des cibles thérapeutiques potentielles pour améliorer la qualité des organes greffés. Ces thématiques majeures sur lesquelles les principales recherches sont effectuées sont la composition des solutions de conservation et les techniques de conservation du greffon et la supplémentation de ces solutions en molécules thérapeutiques.

1. Solutions et techniques de conservation du greffon

Comme nous l'avons vu précédemment, les greffons rénaux les plus susceptibles d'être endommagés par les lésions d'IR sont aussi ceux qui sont conservés le plus longtemps hors de leur milieu physiologique dans des solutions de conservation d'organe. De plus, c'est pendant cette période de conservation que s'initie la majorité des phénomènes aboutissant au développement des lésions d'IR. L'optimisation de la composition des solutions de conservation est donc essentielle pour contrôler les lésions d'IR[152].

Les mécanismes physiopathologiques à l'origine des lésions d'IR ont mis en lumière les objectifs que devaient remplir les solutions de conservation : i) limiter la déplétion en ATP, ii) contrôler l'acidose et iii) prévenir l'œdème.

Les premières solutions de conservations utilisées étaient des solutions cristalloïdes pures, de type Ringer Lactate, et ne permettaient pas une bonne conservation de l'organe. Partant du postulat empirique qu'il fallait que les solutions de conservation reproduisent le milieu-intracellulaire, les premières solutions de conservation étaient de composition hyperpotassique. Le but de cette forte concentration de potassium était alors de contrer les phénomènes de fuite de potassium et d'entrée massive de sodium et donc d'eau dans la cellule, et ainsi limiter l'œdème caractéristique de l'IR.

La forte concentration de potassium des solutions de conservation entraîne en fait une dépolarisation cellulaire à l'origine de la contraction des muscles lisses vasculaires et donc

une vasoconstriction massive. Cette vasoconstriction contribue un peu plus à la compression du lit vasculaire dû au développement de l'œdème, dont les effets constatés à la reperfusion ont été exposés précédemment. Le nivellement du gradient de concentration en potassium de part et d'autre de la membrane cellulaire entraîne par ailleurs une suractivation des pompes Na^+/K^+ ATPases responsables d'une accélération de la déplétion en ATP. Comme nous l'avons vu, ce phénomène de consommation de l'ATP présente la principale source de protons responsables de l'acidose.

Les premiers résultats de ces solutions étaient encourageants, montrant une diminution des lésions de conservation chez le greffon. Néanmoins, il est apparu que ces effets bénéfiques n'étaient dus en réalité que par la présence de colloïdes ou d'imperméants permettant l'augmentation de la pression oncotique en faveur de la rétention de l'eau au sein du milieu extra cellulaire. Les imperméants sont des sucres ne passant pas la membrane cellulaire ou des anions qui ont également un effet protecteur de membrane. L'ajout de ces molécules ne doit pas augmenter de trop la viscosité de la solution de conservation, afin de permettre une perfusion correcte de l'ensemble de l'organe. L'utilité de la supplémentation en colloïdes ou imperméants n'est plus à démontrer et la majorité des solutions de conservation actuelles en sont dotées.[152-154]

L'évolution de la composition des solutions de conservation va vers une tendance à la diminution de la concentration en potassium, sans pour autant revenir à une concentration normo-potassique. On distingue alors 3 grandes catégories de solutions de conservation en fonction de leur concentration en potassium : i) les solutions de type intracellulaire avec une concentration en potassium supérieure à 30mM, ii) les solutions de type intermédiaire avec une concentration en potassium inférieure à 30mM mais supérieure à 10mM et iii) les solutions de type extracellulaire avec une concentration en potassium proche de 5mM.

Le meilleur moyen pour lutter contre l'acidose caractéristique de l'ischémie est l'utilisation de systèmes tamponnant les variations de pH dans les solutions de conservation. Ces tampons sont principalement les tampons bicarbonate, phosphate, histidine, HEPES et tryptophane.

La limitation de la déplétion en ATP due à l'existence d'un métabolisme résiduel à 4°C pendant la conservation, est réalisée généralement par l'ajout de glucose dans la solution.

Historiquement, les greffons rénaux sont conservés baignant dans la solution de conservation avec laquelle ils avaient été rincés. Cette méthode de conservation statique reste encore valable aujourd'hui pour la majorité des greffons, mais l'extension des critères de sélection des donneurs a conduit au prélèvement et à la conservation d'organes de moins bonne qualité, ayant éventuellement subi préalablement une période d'ischémie chaude. Ce constat a poussé les équipes de recherche à trouver d'autres solutions pour optimiser les conditions de préservation de ces organes. (Tableau 4)

Solutions	Plasma	Solution de type Intra-cellulaire	Solutions de type Intermediaire					Solutions de type Extracellulaire		
	Plasma	UW (Belzer) (Viaspan)	IGL-1	Polysol	Celsior	Lifor	HTK (Custodiol)	CMRL-1066 + 1% BSA	HBSS +0.5% BSA	SCOT 15
<i>Ions (mM)</i>										
Na ⁺	140	30	125	120	100	98	15	144	119	118
K ⁺	5	125	30	15	15	15.8	10	5.3	2.1	5
Mg ²⁺	0.8	5	5		13		4	0.8	1.08	1.20
Ca ²⁺	2.5				0.25	0.17	0.015	1.8	0.9	1.75
Cl ⁻	104						50	126	3	
<i>Tampons (mM)</i>										
SO ₄ ²⁻	1.4	5	5		1,2				1.08	
KH ₂ PO ₄	3.2	25	25			+		1	2.16	
HCO ₃ ⁻	25							26	25	25
HEPES				24		+				
Histidine				6.3	30		198	0.12		
Na ₃ PO ₄				21.7						
<i>Molécules (mM)</i>										
Adenosine		5	5	5		0.01				
Allopurinol		1	1							
Alpha-tocopherol				5 x 10 ⁻³						
Ascorbic acid				0.11				0.28		
Cholestérol								0.0005		
Coenzyme A								0.003		
Glucose	7							6	10.8	11
Glutamate					20			0.51		
Glutathion		4	3	5.6	3			0.032		
α-Ketoglutarate							1			
Lactobionate		100	100		80					
Mannitol					60		30			
Potassium gluconate				20						
Pyruvate de Na										
Raffinose		30	30	3.2						
Ribose										
Sodium Gluconate				75						
Tryptophan							2	0.048		
<i>Colloïdes (g/L)</i>										
HES		50								
PEG 20 kDa										15
PEG 35 kDa			1	20						
Albumine	42							10	5	
<i>Physico-chimie</i>										
pH	7.4	7.3	7.3	7.4	7.3	7.07	7.2	7.2	7.4	7.3
Viscosité (cSt) à 4°C		5.34	1.92		2.03		1.71	1.64	1.69	3.12
Viscosité (cSt) à 20°C	1.84	3.22	1.19		1.21		1.12	1.06	1.06	1.41
Viscosité (cSt) à 37°C		1.98	0.84		0.82		0.8	0.73	0.72	1.2
Osmolarité (mOsm)	308	327	298		320		310	301	32	337

Tableau 4 : Solutions de conservation en transplantation

Composition des solutions de conservation couramment utilisés en transplantation et comparées à la composition du sang. Na⁺ : Sodium, K⁺ : potassium, Mg²⁺ : Magnésium, Ca²⁺ : Calcium, Cl⁻ : Chlore, SO₄²⁻ : Sulfate, KH₂PO₄ : Phosphate de potassium, HCO₃⁻ : Bicarbonate, Na₃PO₄ : Phosphate de Sodium, HES : Hydroxy Ethyl Starch, PEG : Poly Ethylène Glycol.

Par mimétisme avec la physiologie des organes vascularisés, caractérisés par la perfusion de sang dans leur réseau vasculaire, certaines équipes ont mis au point des machines de perfusion permettant une conservation dynamique de l'organe. Ces machines existent maintenant depuis plusieurs années, et permettent la perfusion de manière continue ou pulsatile d'une solution réfrigérée dans l'organe[126]. Ces machines se perfectionnent constamment, permettant maintenant une perfusion de l'organe à des températures

normothermique (37°C), une oxygénation de la solution de perfusion ou un meilleur accès à l'organe ou à la solution de perfusion pour des diagnostics *ex vivo*[155].

Les concepts de perfusion normothermique et/ou oxygénée du greffon sont relativement nouveaux, et donc encore en cours d'investigation, que ce soit pour la perfusion de reins ou d'autres organes.

La modification des conditions de conservation a été accompagnée par le développement de solutions de perfusion dédiées à ce nouveau mode de conservation.

La conservation par perfusion du greffon est un facteur indépendant de diminution de retard de fonction du greffon par une diminution de la vasoconstriction rénale, l'amélioration de la perfusion de l'organe, l'expulsion de microthrombi du cortex rénal, le maintien du pH intracellulaire, la diminution de l'œdème tissulaire, l'apport de substrats métaboliques et l'élimination des produits du catabolisme[126, 130].

Pendant quelques heures, la solution de conservation sera le seul environnement auquel sera exposé le greffon. La conservation, qu'elle soit statique ou dynamique, hypothermique ou normothermique, est un moment particulièrement important dans le devenir du greffon car elle correspond à la période d'initiation des lésions d'ischémie. Cette solution constitue donc un vecteur de choix pour la délivrance de molécules thérapeutiques d'intérêt, pouvant cibler la coagulation ou le stress oxydant[153]. L'ajout de cellules souches mésenchymateuses et de cellules souches issues du liquide amniotique lors de cette étape de perfusion *ex vivo* pourrait également être intéressant pour promouvoir la réparation tissulaire post greffe[156].

2. Supplémentation des solutions de conservation en molécules thérapeutiques

Il est particulièrement intéressant de traiter le greffon lors de la phase de conservation de l'organe. En effet à ce moment précis, l'organe est totalement individualisé, et n'est plus en contact avec le reste de l'organisme. Une molécule thérapeutique administrée directement dans la solution de conservation n'a dans ce cas aucun risque de diffuser vers des organes non ciblés et d'y entraîner des effets indésirables. Cette situation permettrait également de contrôler avec précision la quantité de principe actif qui sera délivrée au greffon, et la cinétique de sa consommation éventuelle par l'organe. En effet, des prélèvements de la solution de perfusion pourraient être réalisés pour y doser la molécule administrée.

D'autre part ces molécules ont, auprès l'ANSM, le statut un peu particulier de Produit Thérapeutique Annexe (PTA). Les PTA sont « définis comme tout produit, à l'exclusion des dispositifs médicaux, entrant en contact avec des organes, tissus, cellules ou produits issus du corps humain ou d'origine animale au cours de leur conservation, de leur préparation, de leur transformation, de leur conditionnement ou de leur transport, avant leur utilisation thérapeutique chez l'Homme [...]. » L'autorisation de mise sur le marché de ces PTA est simplifiée par rapport aux molécules ayant le statut de médicament, puisque ces produits doivent seulement faire l'objet, préalablement à leur mise sur le marché, « d'une autorisation délivrée par le directeur général de l'ANSM, après évaluation de leur qualité, de leur sécurité

et de leur efficacité *in vitro* ». Le délai entre le développement initial du PTA et sa mise sur le marché est donc considérablement raccourci, comparé à un médicament classique.

Néanmoins, la quasi totalité des molécules susceptibles d'être ajoutées aux solutions de conservation pour protéger le greffon contre les lésions d'ischémie sont encore au stade d'expérimentation dans des modèles animaux. Ces modèles animaux ayant plus ou moins de valeur translationnelle, nous ne parleront ici que des molécules les plus susceptibles d'être utilisées chez l'Homme à moyen terme.

Les molécules utilisées en tant qu'additifs aux solutions de conservation vont pouvoir potentiellement cibler tous les phénomènes délétères initiés lors de l'ischémie. Certaines molécules anticoagulantes de bons résultats chez le porc dans l'amélioration de la reprise de fonctions des greffons et l'inhibition de l'inflammation post greffe. Le mécanisme d'action principal est l'inhibition de la formation de microthrombi suite à l'activation et la lésion de l'endothélium[157, 158].

Il peut être également intéressant d'inhiber le recrutement des cellules immunitaires proinflammatoires au sein du greffon pour éviter les phénomènes de rejet de greffe ultérieurs. Des inhibiteurs de la liaison des cellules immunitaires à la membrane de cellules endothéliales tel que l'antagoniste de P-sélectines YSPSL ont montré de bons résultats. De la même manière, des inhibiteurs du complément semblent efficaces dans l'amélioration de la survie post-greffe dans des modèles de gros animaux[130].

Le stress oxydant dû à la formation des ROS a des effets particulièrement délétères pour le greffon. La supplémentation de la solution de conservation des greffons rénaux en trimétazidine a permis de réduire ce stress oxydant, mais aussi de préserver le métabolisme énergétique et de réduire l'acidose, avec une amélioration de la reprise de fonction rénale après transplantation chez le porc[159].

Une approche thérapeutique visant à augmenter la disponibilité de l'oxygène dissout dans la solution de conservation, par un transporteur d'oxygène issu de l'hémoglobine de ver marin a montré de bons résultats dans la prévention du développement des lésions chroniques du greffon[160]. L'association de ce genre de molécule à une oxygénation active de la solution de conservation grâce à une machine de perfusion pourrait être particulièrement intéressante.

Compte tenu des mécanismes en jeu lors du développement des lésions d'IR, l'association de molécules ciblant chacune une voie spécifique est importante pour prévenir efficacement les lésions d'IR initiées lors de l'ischémie.

III. CONCLUSION

La transplantation rénale est la thérapie de référence pour le traitement de l'insuffisance rénale chronique terminale. Par rapport à la dialyse, la transplantation rénale permet d'améliorer la qualité de vie et la durée de vie des patients, tout en permettant à la société de réaliser des économies considérables.

Le besoin d'augmenter le nombre de greffes réalisées chaque année se heurte à une pénurie d'organe. Une des manières de contrer cette pénurie est de prélever les greffons chez des donneurs de moins bonne qualité que les donneurs habituellement sélectionnés. Mais cette démarche pousse les équipes de transplantateurs à greffer des organes dont l'origine et les conditions de prélèvement entraînent des risques plus élevés de complications chez le receveur après transplantation. Il est donc urgent de mettre en place des thérapeutiques permettant de diminuer ce risque de complications, principalement en prévenant les dommages liés à la transplantation ou en accélérant la régénération du greffon après transplantation.

Dans ces conditions, l'utilité des CSM pourrait s'avérer primordiale, mais des investigations complémentaires doivent être entreprises dans des modèles animaux précliniques avant d'envisager de tester leur utilisation chez l'Homme

PARTIE III : ETUDE DE L'UTILISATION DES CELLULES SOUCHES ISSUES DU LIQUIDE AMNIOTIQUE DANS UN MODELE PRECLINIQUE PORCIN D'AUTO TRANSPLANTATION RENALE

I. INTRODUCTION

Nous avons vu dans la première partie de cette thèse qu'il existe, outre les cellules embryonnaires, des cellules souches pouvant être isolées chez l'Homme adulte. Parmi ces cellules souches adultes, les cellules souches mésenchymateuses (CSM) comprennent une population hétérogène de cellules souches provenant de différents tissus mais partageant néanmoins des propriétés communes.

Les cellules souches issues du liquide amniotique (AFSC) qui font partie de la famille des CSM, sont isolées du liquide amniotique récupéré à terme ou par amniocentèse, plus précocement au cours de la gestation. Ces cellules peuvent se différencier en plusieurs types cellulaires, dont les cellules rénales, et leur sécrétome est en faveur d'une induction de l'angiogenèse, d'une inhibition de l'apoptose et d'une modulation de la réponse inflammatoire. Elles ont par ailleurs démontré leur capacité à améliorer la reprise de fonction rénale dans un modèle murin d'insuffisance rénale aigüe induite par le glycérol.

Dans la deuxième partie du manuscrit, nous avons exposé un certain nombre de voies de recherche visant à protéger le greffon contre les lésions d'IR, afin de pouvoir élargir le pool d'organes disponibles à ceux issus de donneurs encore peu exploités comme les donneurs décédés après arrêt cardiaque (DDAC). Ce développement s'est fait au détriment de la mise au point de stratégies visant à induire les processus de régénération tissulaire après transplantation, alors même que ces deux actions sont complémentaires. Les phénomènes physiopathologiques à l'origine du déclenchement des lésions d'IR étant de plus très diversifiés, il est fort probable que cette même diversité soit observée dans les voies de régénération cellulaires et tissulaires déclenchées lors de la cicatrisation.

C'est précisément parce que leur impact bénéfique potentiel dans le domaine de la régénération tissulaire est dû à de multiples facteurs que les AFSC sont des candidates particulièrement intéressantes pour promouvoir la réparation post greffe de l'organe transplanté.

Afin d'évaluer le bénéfice potentiel de l'utilisation des AFSC dans le cadre de la transplantation rénale, nous avons choisi de travailler chez le porc, dont les similitudes avec l'Homme en termes d'anatomie et de physiologie rénale lui confèrent la valeur hautement translationnelle qui manque cruellement au modèle murin, pourtant plus fréquemment étudiée.

Pour nous focaliser spécifiquement sur les lésions d'IR et éviter tout phénomène d'allo-reconnaissance, nous avons associé une autogreffe rénale avec néphrectomie controlatérale dans des conditions mimant les donneurs DDAC, à l'injection d'AFSC autologues.

OBJECTIFS

Nous avons tout d'abord effectué une série d'expérimentation *in vitro* dans le but de vérifier que les AFSC que nous avons prélevé en fin de gestation présentaient bien les caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles de CSM, mais aussi pour déterminer le moment auquel injecter ces cellules.

Nous avons par la suite débuté l'étude *in vivo* afin de caractériser l'impact de l'injection des AFSC lors de la transplantation rénale sur la vitesse de reprise de fonction du greffon, l'évolution de ses lésions tissulaires et l'expression locale de facteurs de croissance impliqués dans l'angiogenèse.

L'objectif du travail est en réalité double : i) prouver que les AFSC sont potentiellement efficaces pour lutter contre les lésions d'IR caractéristiques de la transplantation de greffons issus de donneurs DDAC et ii) mettre au point un modèle à forte valeur translationnelle pouvant servir à l'évaluation de l'utilisation d'autres cellules souches dans le cadre de la transplantation rénale.

II. MATERIEL ET METHODES

A. CELLULES SOUCHES ISSUES DU LIQUIDE AMNIOTIQUE

Pour chaque porcelet sélectionné pour subir une greffe rénale suivie d'injection de cellules souches issues du liquide amniotique (AFSC), les AFSC ont été prélevées à la fin de la gestation. Les cellules ont ensuite été caractérisées, puis leur résistance à l'hypoxie a été évaluée pour décider du moment de leur injection. Les AFSC ont ensuite été marquées à la Green Fluorescent Protein (GFP) grâce à un promoteur lentiviral puis congelées jusqu'au jour de leur injection chez l'animal. Afin de valider le protocole d'injection, une lignée d'AFSC a été injectée dans un rein *ex vivo*.

1. Obtention des cellules

Les AFSC sont isolées lors de la naissance des porcelets par césarienne, après 112 jours de gestation. Les truies dont proviennent les 6 porcelets qui recevront l'injection d'AFSC autologues sont intubées puis anesthésiées par administration de Sévoflurane au masque et de bolus itératifs de kétamine. L'utérus est abordé par laparotomie médiane, puis il est incisé pour exposer les porcelets encore dans leur enveloppe placentaire. Dix millilitres du liquide amniotique de chaque porcelet sont aspirés à la seringue directement à travers l'enveloppe placentaire grâce à une aiguille. Les porcelets sont ensuite prélevés. Les cellules contenues dans les échantillons sont lavées une fois dans le milieu de culture Amniochrome II (Lonza), centrifugées à 1500 rpm pendant 5 minutes puis resuspendues dans l'Amniochrome II et enfin déposées dans une plaque de culture 6 puits (VWR). Les plaques sont mises à l'étuve à 37°C et 5% de CO₂. Après 24h, les cellules non adhérentes sont enlevées puis le milieu changé par la suite tous les 2 jours. Seuls les AFSC provenant de porcelets mâles viables sont cultivés (2 porcelets par portée, 3 portées).

2. Marquages des AFSC à la GFP

Les cellules sont modifiées pour exprimer de manière constitutive la protéine fluorescente GFP. Pour cela la protéine est transduite dans les cellules grâce à un vecteur lentiviral. Le jour précédent la transfection, 1×10^5 AFSC à passage 4 sont déposées dans chaque puits de plaque 6 puits avec 2 ml de milieu Amniochrome II et sont placées en étuve à 37°C et 5% CO₂. Le jour suivant les cellules sont transduites durant toute une nuit avec un lentivirus VSVG pTrip pseudotypé codant pour la protéine GFP, sous le contrôle du promoteur EF1 α . Les transductions sont réalisées à une moyenne d'infection de 5 dans 1 ml d'Amniochrome II supplémenté avec du sulfate de protamine à une concentration de 5 μ g/ml. L'efficacité de la transduction a été évaluée par cytométrie en flux.

3. Caractérisation des cellules

Les AFSC isolées sont caractérisées sur la base de leurs capacités de différenciations, l'expression de marqueurs membranaires présents à leur surface.

a) *Différenciation adipogénique*

Préalablement à la culture des AFSC en milieu de différenciation adipogénique, les AFSC sont mises en cultures sur dans des puits de plaque 6 puits à très faible adhérence, à une densité de 1×10^6 cellules par ml d'Amniochrome II. Dans cette configuration de culture, les AFSC forment des sphères en 3 jours. Ces sphères, ressemblant aux corps embryonnaires formés dans les mêmes conditions de culture par les cellules ES sont ensuite mises en culture dans des puits de plaques 6 puits traités pour la culture cellulaire. Après une période de 24h nécessaire pour leur adhésion au plastique, les cellules sont cultivées pendant 3 semaines en utilisant le kit hMSC Adipogenic BulletKit (Lonza) pour induire leur différenciation en adipocytes. Brièvement, le kit contient deux types de milieu de différenciation qui sont alternés tous les 2 jours jusqu'à la fin du protocole de différenciation.

Au bout des 21 jours de culture, les gouttelettes lipidiques caractéristiques des adipocytes sont détectées par le marquage rouge à l'Oil red O (Sigma-Aldrich) au microscope. Le contrôle négatif de différenciation est obtenu en cultivant les cellules pendant la même période en milieu Amniochrome II.

b) *Différenciation ostéogénique*

Pour réaliser la différenciation ostéogénique, les AFSC subissent les mêmes conditions préparatoires que pour la différenciation adipogénique. Les cellules sont ensuite cultivées pendant 3 semaines en utilisant le kit hMSC Osteogenic BulletKit (Lonza). Au bout de 3 semaines de culture, la présence de dépôts minéraux spécifiques des ostéoblastes est mise en évidence au microscope par une coloration rouge à l'Alizarin Red S (Sigma-Aldrich). Le contrôle négatif de différenciation a été obtenu en cultivant les cellules pendant la même période en milieu Amniochrome II.

c) *Différenciation en cellules endothéliales*

Pour réaliser la différenciation endothéliale, les AFSC sont déposées dans les puits de plaque 6 puits à une concentration de 1×10^6 cellules par ml de milieu Amniochrome II. Au bout de 24h, le milieu est remplacé par le milieu EGM2-MV (Lonza) supplémenté en Vascular Endothelium Growth Factor (VEGF-A, PromoKine) humain à la concentration de 50ng/ml. Au bout de 4 semaines de culture en milieu de différenciation, les cellules sont marquées en utilisant les anticorps anti CD31 (1/100, AbDserotec) et anti endothelial Nitric Oxyde Synthase (eNOS, 1/100, BD transduction) couplés à un fluorochrome. Le contrôle négatif de différenciation est obtenu en cultivant les cellules pendant la même période en milieu Amniochrome II.

d) Analyse phénotypique

Les 6 lignées d'AFSC, à passage 5 destinées à être injectées chez l'animal sont testées en cytométrie en flux sur FACSCantoII (BD) pour détecter l'expression de CD29 (1/10, BD transduction), de CD73 (1/50, eBioscience), de CD90 (1/100, BD transduction) et de c-Kit (1/100 Abcam).

4. Détermination de la sensibilité à l'hypoxie réoxygénation

Afin de définir le moment de l'injection des AFSC par rapport à la séquence d'ischémie reperfusion (IR) due à la transplantation rénale, nous avons évalué la résistance de ces cellules à une séquence d'hypoxie réoxygénation (HR) *in vitro*. Nous avons soumis des cellules primaires endothéliales d'artère de porc (PAEC) à la même séquence d'HR car nous savons ces cellules très sensibles à la séquence d'IR *in vivo*.

a) Conditions de culture

Les cellules sont cultivées jusqu'à 75% de confluence sur le support adéquat puis le milieu de culture est remplacé par un milieu de conservation d'organe Viaspan (BMS) et les cellules sont placées en chambre d'hypoxie humide au réfrigérateur à 4°C. Cette chambre est alimentée pendant 24h par un mélange gazeux composé à 95% de N₂ et 5% de CO₂ (Bactal2, Air Liquide). Après ces 24h d'hypoxie, le Viaspan est remplacé par le milieu de culture adéquat (PromoCell MV pour PAEC ou Amniochrome II pour AFSC) et les cellules sont remises en culture à 37°C, en normoxie c'est-à-dire en présence de 5% de CO₂, 20% de O₂, et 75% de N₂ pour 24h supplémentaires de réoxygénation. Les conditions de culture contrôles sont caractérisées par une culture en normoxie en parallèle à la séquence d'HR (48h), avec changement de milieu à H0 et H24. Lors des tests de viabilité (ATP et XTT), les conditions contrôle sont réalisées en utilisant pour chacun des types cellulaires (AFSC et cellules endothéliales) les deux milieux de culture cités ci avant.

b) Evaluation de la viabilité cellulaire par réalisation du test XTT

Les cellules sont cultivées en plaques 96 puits, jusqu'à atteindre 75% de confluence. Le test XTT (Cell Prolifération Kit II, Roche) est réalisé conformément aux instructions du fabricant. Les cellules sont incubées en présence d'un sel de tetrazolium qui sera clivé dans la cellule viable, par les déshydrogénases cellulaire en formazan chromogène, ce qui reflétera partiellement l'activité mitochondriale. La lecture s'effectue au spectrophotomètre Victor (Perkin-Elmer) à 450 nm et les résultats sont exprimés en pourcentage d'activité XTT des cellules HR par rapport au contrôle.

c) Evaluation de la viabilité cellulaire par dosage de l'ATP intracellulaire

Le dosage de l'ATP intracellulaire est un marqueur de viabilité cellulaire, car sa diminution rapide est en rapport avec la mort cellulaire. Ce dosage est réalisé grâce au kit ATPlite one step (Perkin-Elmer). Cette méthode luminométrique est basée sur l'émission de lumière par la D luciférine en présence de luciférase et d'ATP. L'émission de lumière est proportionnelle à la concentration intracellulaire en ATP. Les cellules sont cultivées en plaques 96 puits opaques, jusqu'à atteindre 75% de confluence et sont soumises aux

différentes conditions expérimentales. Puis, le substrat et l'enzyme sont ajoutés à chaque puits de culture. Après agitation 2 min à 700 tpm sur agitateur orbital de plaque, la luminescence est lue grâce au spectrophotomètre Victor 3 (Perkin-Elmer) et les résultats sont exprimés en pourcentage de la concentration intracellulaire résiduelle en ATP des cellules HR par rapport au contrôle.

d) Evaluation de la nécrose cellulaire par dosage de l'activité de la Lactate Déshydrogénase

La lactate déshydrogénase (LDH) est une enzyme cytosolique qui catalyse la conversion du pyruvate en lactate. En cas de dommages cellulaires, elle est libérée à l'extérieur de la cellule. La quantification de l'activité de la LDH extracellulaire rapportée à l'activité totale (extracellulaire et intracellulaire) est un indicateur de la mort cellulaire par nécrose. Les cellules sont cultivées en flasques de 25 cm², jusqu'à atteindre 75% de confluence. Les cellules subissent soit une séquence d'HR comme décrit précédemment, soit 48h de culture en condition de normoxie à 37°C. Le surnageant est ensuite prélevé, et le tapis cellulaire lysé avec 300µl de Phosphate Buffer Saline (PBS, Invitrogen,) + Triton 0,1% (Sigma-Aldrich). Ce lysat est récupéré et purifié par sonication. L'activité de la LDH dans chacun des milieux est mesurée sur l'automate Modular automatic analyser (Roche Diagnostics) par colorimétrie. Les résultats sont exprimés en ratio du pourcentage de libération de LDH des cellules HR par rapport au pourcentage de libération de LDH des cellules contrôle.

5. Congélation des cellules

Après marquage à la GFP, les AFSC sont récoltées par trypsination (trypsine 0,25%, Gibco) puis congelées dans 1 ml d'un mélange de Sérum de Veau Fœtal (SVF, Gibco) + Dimethyl Sulfoxyde (DMSO, Sigma-Aldrich) + Amniochrome II (40/10/50, v/v/v) par ampoule de 1x10⁶ cellules. Les cellules sont ensuite placées dans un surgélateur à -80°C.

6. Injection des cellules souches issues du liquide amniotique ex vivo

Une lignée d'AFSC a été amplifiée directement après marquage à la GFP, et une suspension de 40x10⁶ cellules dans 15ml de NaCl 0,9% a été injectée dans l'artère d'un rein ayant subi préalablement 24h de conservation statique *ex vivo* à 4°C dans la solution de conservation d'organe Viaspan. L'injection des cellules est réalisée en 5 minutes et est suivie par 10 min de rinçage avec du NaCl 0,9%. A l'issue du rinçage, des morceaux de cortex rénal et d'artères rénales ont été prélevés, inclus dans la cryocolle et congelés à -80°C.

B. ANIMAUX

1. Groupes

Dans les expériences *in vivo*, trois groupes de 6 animaux sont étudiés. Le groupe AFSC désigne les animaux qui ont reçu leurs propres AFSC préalablement marqués à la GFP par injection après autotransplantation rénale. Le groupe SHAM désigne les animaux qui ont reçu une injection de solution acellulaire de NaCl 0,9% après autotransplantation. Le groupe contrôle est constitué d'animaux ayant subi l'ablation d'un rein, sans transplantation rénale et sans injection de cellules ou de NaCl 0,9% dans le rein. Tous les animaux sont suivis pour une durée de 3 mois après la transplantation ou la néphrectomie. Un porc supplémentaire a subi une autotransplantation suivie d'une injection d'AFSC marqués à la GFP, puis a été sacrifié 24h après l'injection.

2. Auto transplantation rénale

Les transplantations rénales chez le porc sont effectuées sur la plateforme IBiSA d'expérimentation préclinique de Surgères. Nous utilisons des porcs mâles de race Large White âgés de trois mois et pesant entre 35 et 40 kg, et qui ont la particularité de présenter des reins de taille et de poids similaires à l'homme. Lors des interventions chirurgicales, les animaux subissent une anesthésie gazeuse par l'isoflurane à 2% (Forène, Abbott) et par bolus itératifs de kétamine. Le rein gauche est exposé par laparotomie médiane, puis il est isolé du tissu qui l'entoure et le pédicule est disséqué avec individualisation de l'artère et de la veine rénale. Une période d'ischémie chaude de 60 minutes est induite sur le rein gauche avant son prélèvement par clampage de son pédicule. Le rein subit alors une période d'ischémie chaude *in situ* à température corporelle. Cette période est comparable à celle observée dans le cas des prélèvements de reins issus de donneurs décédés par arrêt cardiaque. Après cette période, le rein gauche est prélevé et plongé dans du liquide physiologique à 4°C, pour permettre un refroidissement rapide de l'organe. Le rein est ensuite lavé par 300 à 500 ml de solution de conservation Viaspan et plongé dans cette même solution à l'intérieur d'un conteneur stérile à 4°C pendant 24h. Le modèle d'auto-transplantation consiste à transplanter au même animal, le rein prélevé la veille afin de s'affranchir des problèmes d'immunotolérance. La transplantation est suivie d'une néphrectomie controlatérale du rein droit, afin de se rapprocher de la masse néphronique présente en clinique humaine.

3. Injection autologue des cellules souches issues du liquide amniotique

L'injection des AFSC est autologue: ce sont les AFSC récoltés et isolés lors de la naissance du porcelet qui lui sont réinjectés 3 mois plus tard. Six jours après la greffe rénale, le porc est anesthésié et une laparotomie médiane est effectuée. Après dissection du pédicule rénal, 1ml/Kg d'héparine sodique 5000 UI (Choay) est injecté par voie IV. L'artère rénale est alors clampée, et les AFSC marqués à la GFP en suspension dans 15 ml de NaCl 0,9% sont injectés directement dans l'artère rénale, en aval du clamp, à la dose de 1 million de cellules/Kg de masse corporelle. Immédiatement après l'injection, le clamp est libéré et la circulation rénale rétablie (durée maximale de clampage: 5min)

4. Suivi post transplantation

Des prélèvements de sang sont régulièrement effectués à J0, J1, J3, J7, J11, J14, 1 et 3 mois post-transplantation pour suivre notamment l'évolution du taux de créatinine plasmatique. Grâce aux cages métaboliques, les urines sont également récupérées aux mêmes temps post-transplantation que les prélèvements sanguins. Des biopsies rénale à l'aiguille fine sont également réalisées à J14 et M1 post-transplantation et conservées dans le formol pour être incluses en paraffine. Le jour du sacrifice de l'animal, à M3 post-transplantation, des morceaux de cortex rénal, de foie, de poumons, de cœur, et de rate sont prélevés et congelés ou conservés dans le formol.

La figure 12 expose la conduite générale de l'étude *in vivo*

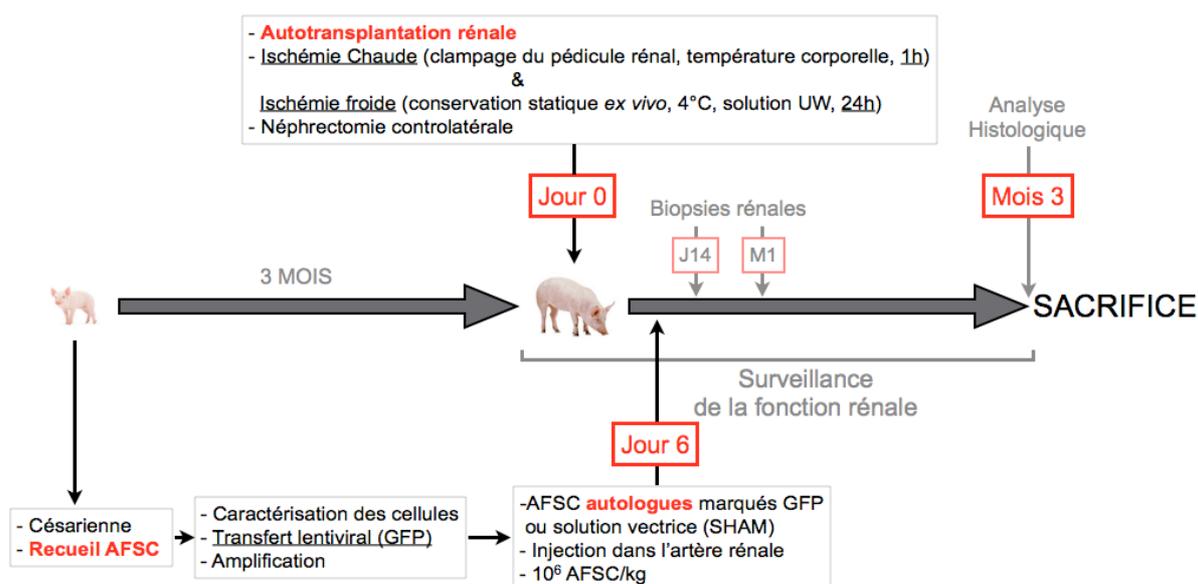


Figure 12 : Programme expérimental

Schéma explicatif du protocole mis en place pour l'évaluation *in vivo* des AFSC en transplantation rénale. UW : University of Wisconsin (Viaspan).

C. ANALYSES SUR LES ECHANTILLONS COLLECTES *IN VIVO*

Les échantillons biologiques prélevés *in vivo* sont les morceaux d'organes provenant du sacrifice, les biopsies rénales, le sang, et l'urine des animaux

1. Analyses histologiques

Les analyses histologiques sont réalisées sur les biopsies rénales, ainsi que sur les morceaux d'organes, congelés ou conservés dans le formol, obtenus au sacrifice.

a) Coloration à l'acide périodique de Schiff (PAS)

Le PAS colore en rose les membranes basales et les bordures en brosse des tubules. Il permet de visualiser les structures du tissu rénal. La coloration PAS est réalisée sur la machine Leica ST502 (Leica Biosystems) à partir des biopsies et des morceaux de rein conservés dans le formol puis incluses en paraffine. Les lames sont lues à l'aveugle par un

anatomopathologiste spécialisé dans les pathologies rénales. Les lésions histologiques sont exprimées en pourcentage de la surface de l'échantillon touchée selon une échelle semi quantitative avec : 1. lésions affectant moins de 10% de l'échantillon ; 2. lésions affectant 10-25% de l'échantillon ; 3. lésions affectant 25-50% de l'échantillon ; 4. lésions affectant 50-75% de l'échantillon ; 5. lésions affectant plus de 75% de l'échantillon.

b) Coloration Rouge Sirius

Le rouge Sirius colore en rouge le collagène et caractérise la fibrose rénale. Cette coloration est réalisée sur les morceaux de rein prélevés 3 mois après la transplantation. La surface colorée en rouge est calculée à partir de 10 champs photographiés pour chaque lame, en utilisant le logiciel Visilog (Noesis). Les résultats de fibrose sont exprimés en pourcentage de la surface examinée.

c) Marquage α Smooth Muscle Actin (α SMA)

Le marquage α SMA est caractéristique de la présence inhabituelle de myofibroblastes au sein du tissu rénal. Le marquage est réalisé grâce à un anticorps anti α SMA (1/50, Dako) révélé par la diaminobenzidine. La surface colorée par la diaminobenzidine est calculée à partir de 10 champs photographiés pour chaque lame, en utilisant le logiciel Visilog (Noesis). Les résultats sont exprimés en pourcentage de la surface examinée.

d) Marquage fluorescent de la Green Fluorescent Protein

Les morceaux de d'organes prélevés au sacrifice et congelés coupés sur cryotome puis marqués grâce à un anticorps fluorescent anti GFP (1/100^e, Invitrogen), à la recherche d'AFSC.

e) Marquage fluorescent du SWC3A

Le SWC3A est un antigène porcin présent majoritairement à la surface des monocytes et de macrophages. Les échantillons de reins prélevés au sacrifice et congelés, puis sont coupés au cryotome et marqués grâce à un anticorps anti SWC3A (1/100, Southern Biotech).

2. Dosage de l'expression protéique par Western Blot

Les protéines totales sont extraites après broyage et centrifugation des échantillons de rein congelés à la date du sacrifice. Chaque échantillon d'environ 100mg est déposée dans un tube contenant 900 μ l de tampon de lyse conservé dans la glace (20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM Na₂EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton, 2,5 mM sodium pyrophosphate, 1 mM beta-glycerophosphate, 1 μ g/ml leupeptin, 1 mM Na₃VO₄) et additionné d'un cocktail d'antiprotéases. Chaque échantillon de tissu rénal est broyé à l'aide d'un polytron (Medialab, Fisher scientific) pendant 30 secs puis conservé pendant 1h dans la glace à 4°C. Les homogénats de rein sont centrifugés pendant 15 minutes à 200g, le surnageant isolé et aliquoté. Le dosage des protéines totales du surnageant est réalisé selon la technique BCA (Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit, Sigma-Aldrich). Après dénaturation thermique, les surnageant sont dilués pour avoir une concentration en protéines identique et sont chargés sur un gel pré-coulé constitué d'un gradient d'acrylamide. La migration des protéines dans le gel est forcée par l'application d'un courant électrique. A la fin de la migration, les protéines sont

transférées sur une membrane de Polyfluorure de vinylidène (PVDF). Après saturation, les membranes sont incubées avec des anticorps anti TGF- β (1/600, Santa Cruz Biotechnology), VEGF-A (1/100, Santa Cruz Biotechnology), VEGF-récepteur 1 (Flt-1, 1/100, Santa Cruz Biotechnology) ou Angiopoïétine-1 (Ang-1, 1/100, Santa Cruz Biotechnology). La membrane est ensuite incubée avec les anticorps secondaires approprié couplés à la peroxydase (GE Healthcare). La révélation est réalisée par chimioluminescence (ECL kit, Amersham Bioscience). La quantité de protéines chargées initialement est normalisées à partir de l'expression de la β actine (1/40000, Sigma). L'intensité de la coloration des bandes obtenues pour chaque protéine est quantifiée grâce au logiciel AlphaEase FC software.

3. Dosages ELISA

Les dosages plasmatiques de VEGF-A et de TGF- β chez les animaux a été réalisé par technique ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) grâce aux kits Quantikine de chez R&D systems). La lecture des plaques a été réalisée à 450 nm sur le lecteur de plaque Victor 3 (Perkin-Elmer).

4. Dosages biochimiques sur sang et urines

Les concentrations de la créatinine urinaire et plasmatique, des protéines urinaires et du sodium urinaire et plasmatique ont été mesurées l'automate Modular automatic analyser (Roche Diagnostics). L'osmolarité sanguine et urinaire ont été déterminées par la méthode d'abaissement du point de congélation.

D. ANALYSE STATISTIQUE

Tous les résultats sont exprimés en moyenne +/- écart moyen. Comme les groupes expérimentaux contiennent au maximum 6 sujets, nous avons utilisé le test non paramétrique de Mann et Withney pour la comparaison de deux groupes. Pour la comparaison de 3 groupes, nous avons utilisé le test de Kruskal-Wallis associé au test multicomparatif de Dunn. Pour les comparaisons intra groupe, nous avons appliqué le test de Wilcoxon. Toutes les analyses ont été réalisées sur le logiciel GraphPadInStat (GraphPad). Tous les résultats pour lesquels la p value est inférieure à 0,05 sont considérés comme significatifs et représentés par *.

III. RESULTATS

A. LES AFSC SE DIFFERENCIENT EN ADIPOCYTES, OSTEOBLASTES ET CELLULES ENDOTHELIALES

La caractérisation des AFSC porcins isolés par césarienne à la fin de la gestation est indispensable par manque de données bibliographiques sur le sujet. Cette caractérisation passe notamment par la vérification des capacités de différenciation des cellules.

Le marquage à l'Oil Red O a permis de mettre en évidence l'apparition de gouttelettes lipidiques dans les AFSC à l'issu du protocole de différenciation adipocytaire (Figure 13a). Le marquage à l'Alizarin Red S montre la présence de dépôts minéraux caractéristiques de la présence d'ostéoblastes chez les AFSC cultivés pendant 3 semaines en milieu de différenciation ostéogénique (Figure 13b). Les gouttelettes lipidiques et les dépôts minéraux ne sont pas détectés dans les conditions de culture contrôle. La détection de CD31 et de eNOS par immunofluorescence (flèches grises) à l'issu de la culture des AFSC en présence de VEGF-A prouve la différenciation effective des AFSC en cellules endothéliales. Ni CD31, ni eNOS se sont détectables après 4 semaines de culture en conditions contrôle. (Figure 13c)

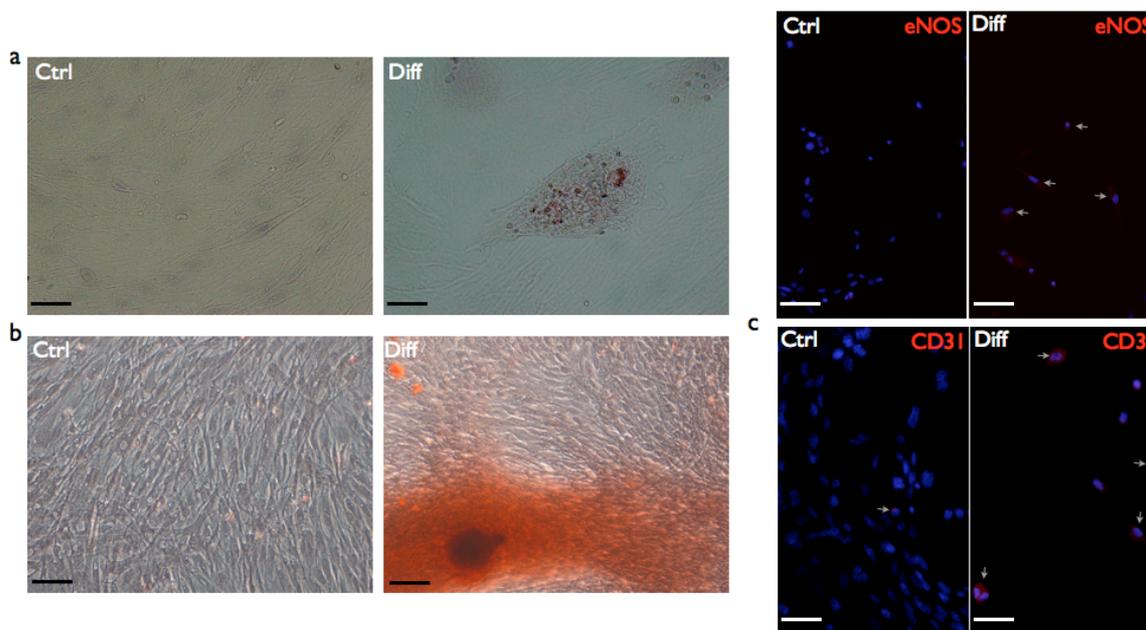


Figure 13 : Potentiel de différenciation des AFSC prélevés par césarienne

a) Différenciation adipocytaire mise en évidence par le marquage Oil Red O. b) Différenciation ostéogénique illustrée par le marquage Alizarin Red S. c) Différenciation endothéliale montrée par marquage de CD31 et eNOS en immunofluorescence. Ctrl : marquage effectué sur les cellules cultivées en Amniochrome II, Diff : marquage sur cellules cultivées en milieu de différenciation. Barres d'échelle : 50µm.

B. LES AFSC EXPRIMENT CD29, CD90, CD73 MAIS PAS C-KIT

Outre leur potentiel de différenciation, l'expression de marqueurs membranaires spécifiques à la surface des AFSC est essentielle pour leur caractérisation. Les analyses en cytométrie en flux des AFSC montrent que ces cellules expriment à plus de 90% les marqueurs CD29, CD90 et CD73 qui sont également exprimés à la surface des CSM. Les cellules par contre très peu (<2%) le c-Kit, récepteur au Stem Cell Factor (Figure 14).

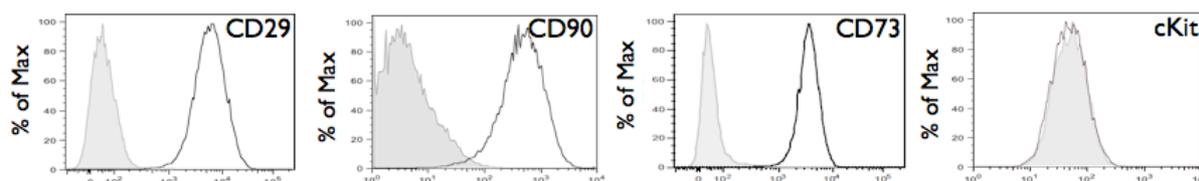


Figure 14 : Phénotypage des AFSC prélevés par césarienne

Niveaux d'expression de CD29, CD90, CD73 et c-Kit déterminés par cytométrie en flux à la surface de AFSC. Pour chaque marquage, la courbe grisée représente le contrôle isotypique.

C. LES AFSC SONT SENSIBLES A L'HYPOXIE REOXYGENATION IN VITRO

La libération de LDH par les AFSC à l'issue de la séquence d'HR est très significativement supérieure à celle des PAEC, signant la nécrose massive des AFSC. En effet, on remarque l'augmentation de libération de LDH d'un facteur 25 après HR comparé aux conditions contrôles pour les AFSC alors que cette augmentation n'est que d'un facteur 2 à 3 pour les PAEC.

La concentration en ATP intracellulaire, caractérisant le degré de viabilité cellulaire est significativement plus faible chez les AFSC que chez les PAEC à l'issue de la séquence d'HR. La quantité résiduelle d'ATP après HR reste élevée, de l'ordre de 75%, chez les PAEC, alors qu'elle n'est que d'environ 12% pour les AFSC. L'activité de clivage du XTT des deux types cellulaires est diminuée de 75% après HR, sans différence significative entre AFSC et PAEC. Au final les résultats mettent en évidence une sensibilité des AFSC à l'HR au moins équivalente à celles des PAEC. (Figure 15)

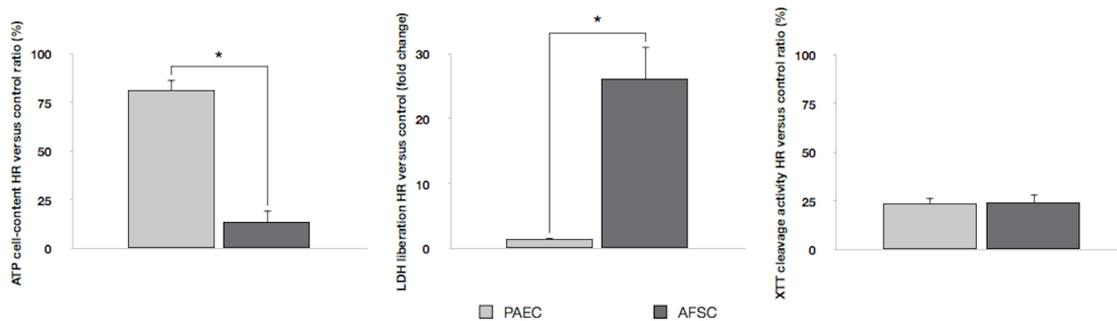


Figure 15 : Résistance à l'Hypoxie Réoxygénation des AFSC et PAEC

De gauche à droite : pourcentage d'ATP intracellulaire résiduel à la fin de l'HR comparé aux conditions contrôles, ratio de la libération de LDH après HR comparé aux conditions contrôles, et pourcentage résiduel d'activité de clivage du XTT après HR comparé aux conditions contrôles.

D. LES AFSC SONT DETECTABLES APRES INJECTION EX VIVO DANS LE REIN CONSERVE

Après injection *ex vivo* d'AFSC marquées à la GFP dans un rein ayant subi 24h de conservation à 4°C en solution Viaspan, dans le but d'évaluer la rétention des cellules dans l'organe lors d'une injection directe par l'artère rénale, nous pouvons détecter des cellules positives à la GFP, que ce soit à la surface de la lumière vasculaire, que plus profondément dans le tissu rénal (Figure 16). En parallèle nous n'avons détecté aucune cellule GFP positive par cytométrie en flux parmi les cellules récupérées dans la solution de rinçage du rein après injection. Les AFSC semblent donc efficacement délivrées à l'organe lorsque la voie d'injection directe dans l'artère rénale est réalisée.

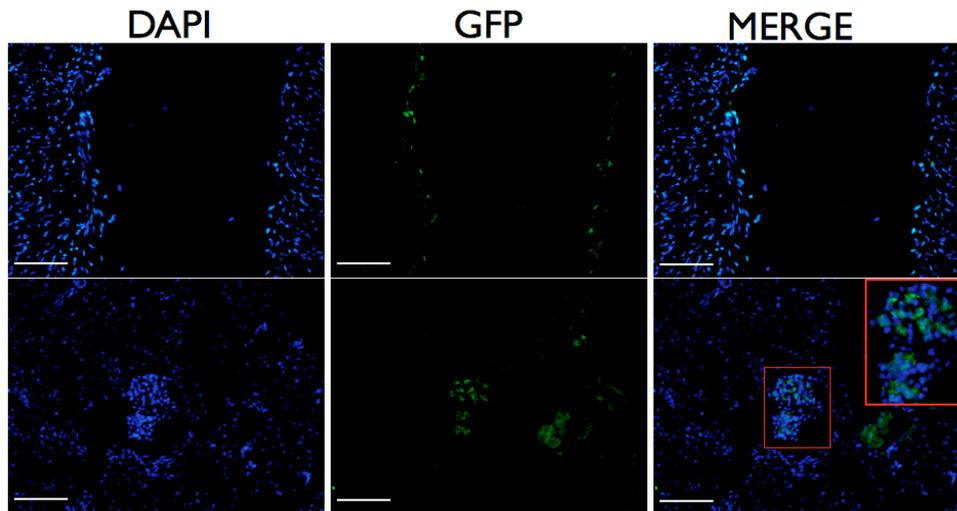


Figure 16 : Marquage GFP après injection des AFSC ex vivo

Marquage en immunofluorescence sur tissu rénal des cellules GFP après injection d'AFSC exprimant la GFP dans un rein ex vivo. Les photos du haut sont celles d'une coupe d'artère rénale, en bas celles d'une coupe corticale. Barre d'échelle : 100 μ m

E. LES AFSC SONT DETECTABLES 24H APRES INJECTION IN VIVO DANS LE REIN TRANSPLANTE

Le protocole d'administration des AFSC retenu pour les expérimentations *in vivo* chez le porc est l'injection des cellules directement dans l'artère rénale. Un porc a été traité en respectant ce protocole puis a été sacrifié le lendemain de l'injection, pour localiser les organes autres que le rein (foie, rate, poumons, cœur) susceptibles de piéger les AFSC après injection. Les cellules exprimant la GFP ont été retrouvées exclusivement dans le rein, aucune n'a pu être mise en évidence dans les autres organes. Les cellules présentes dans le rein semblent avoir traversé la paroi des vaisseaux et sont localisées dans le tissu rénal sans que l'on puisse mettre en évidence une localisation anatomique (tubule, glomérule, interstitium) préférentielle (Figure 17).

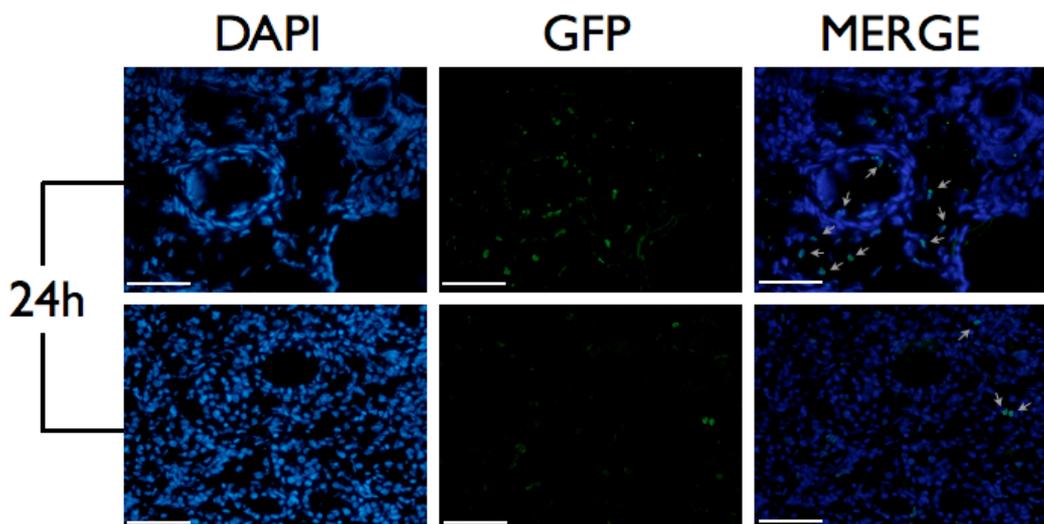


Figure 17 : Marquage GFP 24h après injection d'AFSC in vivo

Marquage en immunofluorescence sur tissu rénal des cellules GFP réalisé 24 heures après injection d'AFSC exprimant la GFP dans un rein in vivo. Barre d'échelle : 100 μ m.

F. LES AFSC SONT PRESENTES EN TRES FAIBLE NOMBRE 3 MOIS APRES INJECTION DANS LE REIN TRANSPLANTE

Les cellules GFP positives ont été recherchées sur les échantillons d'organes prélevés au sacrifice sur les porcs ayant reçu une injection d'AFSC pour vérifier si les cellules étaient capables de s'intégrer de manière durable au tissu. Les organes non ciblés, tout comme la majorité des reins des porcs traités n'ont pas révélé la présence de cellules GFP positives 3 mois après l'injection (Figure 18a). Dans les reins de 2 porcs cependant, des cellules GFP positives ont été retrouvées, mais en très faible nombre (Figure 18b).

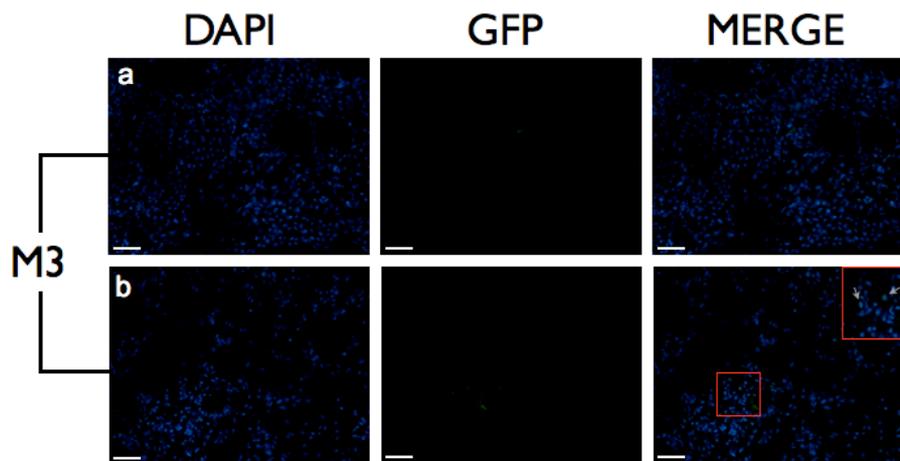


Figure 18 : Marquage GFP 3 mois après greffe rénale

Marquage en immunofluorescence sur tissu rénal des cellules GFP réalisé 3 mois après injection d'AFSC exprimant la GFP dans un rein *in vivo*. (a) Série de photos représentative des animaux chez lesquels la GFP n'est pas détectable 3 mois après transplantation (n=4). (b) Série de photos représentatives des animaux chez lesquels la GFP est faiblement détectable 3 mois après transplantation (n=2). Barre d'échelle : 100 μ m.

G. LES AFSC NE SEMBLENT PAS INDUIRE DE TERATOME APRES 3 MOIS DE SUIVI

Lors du sacrifice, les reins et les autres organes prélevés ont été examinés visuellement avec attention, et aucun n'a révélé la présence de masses ou de structures suggérant la présence de tératomes dus à l'injection d'AFSC.

H. L'INJECTION D'AFSC AUTOLOGUES 6 JOURS APRES TRANSPLANTATION ACCELERE SIGNIFICATIVEMENT LA RECUPERATION DE FONCTION ET LA REGENERATION TISSULAIRE DU GREFFON RENAL

Les porcs ont été suivis dans des conditions très proches de la clinique humaine tout au long des trois mois qui ont succédé à la transplantation. L'évolution de la créatininémie des animaux transplantés (AFSC et SHAM) est similaire quelque soit le groupe jusqu'au jour de

l'injection des cellules soit 6 jours après transplantation, avec une augmentation maximale entre J3 et J4. La créatininémie reste comparable jusqu'à J11. A partir de J14 par contre, soit 7 jours après injection des cellules, la valeur de la créatininémie devient significativement inférieure dans le groupe AFSC par rapport au groupe SHAM (105 +/- 4 mM pour AFSC contre 350 +/- 13 pour SHAM) et atteint même les valeurs mesurées chez les porcs CONTROL qui ont seulement subi une simple néphrectomie (106 +/- 10 mM). Au troisième mois suivant la transplantation, la valeur de la créatininémie des porcs du groupe AFSC est revenue à une valeur de 89, 8 +/- 3 mM comparable à celle d'animaux du même âge n'ayant pas subi de chirurgie (88 +/- 3 mM) alors que les animaux transplantés et non traités par les cellules souches restent à une valeur de créatininémie élevée (143 +/- 7 mM) (Figure 18).

La récupération de la fonction de filtration du greffon signe de la réparation des dommages infligés aux glomérules est donc accélérée par l'injection de cellules souches. Un autre indicateur d'intégrité de la fonction glomérulaire et la mesure de la protéinurie, dont la valeur est significativement diminuée 3 mois après transplantation chez les porcs traités par injection d'AFSC, comparé aux porcs n'ayant pas reçu de cellules souches (Figure 19).

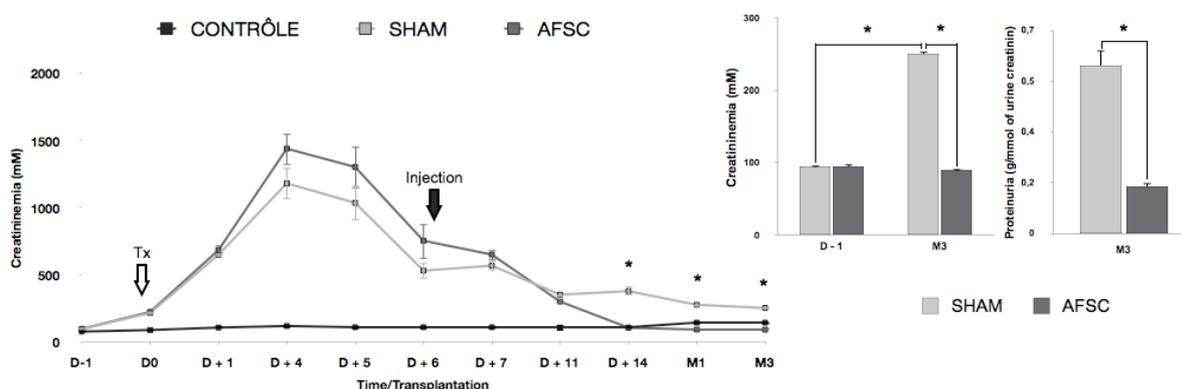


Figure 19 : Créatininémie et de la protéinurie après greffe rénale

De gauche à droite : représentations de l'évolution de la créatininémie des animaux des groupes Contrôle, SHAM et AFSC, à partir du jour précédent la transplantation au jour du sacrifice ; comparaison de l'évolution créatininémie des animaux des groupes SHAM et AFSC entre le jour précédent la transplantation et le jour du sacrifice ; comparaison de la protéinurie entre les animaux des groupes SHAM et AFSC 3 mois après transplantation. Tx : Transplantation, Injection : injection des cellules ou de la solution vectrice.

Les résultats semblent indiquer que les AFSC ont la capacité d'augmenter la vitesse des processus de régénération post transplantation et plus précisément ceux permettant de restaurer la fonction glomérulaire du greffon.

L'évaluation de la fraction d'excrétion du sodium dans les urines, ainsi que le rapport d'osmolarité entre l'urine et le sang sont des témoins de l'intégrité des tubules rénaux. Le calcul de ces constantes réalisé à partir de la date de l'injection des AFSC montre une fraction d'excrétion du sodium significativement plus faible chez les animaux du groupe AFSC que chez ceux du groupe SHAM. Cette différence est associée à un rapport d'osmolarité entre l'urine et le sang significativement supérieur chez les animaux ayant reçu une injection de cellules souches, comparé à ceux qui n'ont pas été traités (Figure 20a).

Les cinétiques d'évolution de ces constantes sont également intéressantes puisque toutes deux ont tendance à évoluer plus rapidement vers des valeurs physiologiques dans le groupe AFSC que dans le groupe SHAM (en moyenne 0,26-0,46 % pour la fraction d'excrétion du

sodium et 1,35-1,40 pour le rapport entre l'osmolarité urinaire et plasmatique chez des animaux sans chirurgie).

Ces constatations ont renforcées par les analyses histologiques effectuées sur les biopsies rénales réalisées 14 jours et 1 mois après la greffe. Celles ci indiquent que l'intégrité tissulaire des reins des animaux du groupe AFSC a été préservée par l'injection des cellules souches. En effet, à 14 jours et 1 mois de la transplantation, soit respectivement à 7 et 21 jours de l'injection, la coloration PAS sur biopsies montre des scores inférieurs de perte de la bordure en brosse des tubules, de détachement des cellules épithéliales tubulaires et de l'inflammation tissulaire dans le groupe d'animaux traités par injection d'AFSC (Figure 20b).

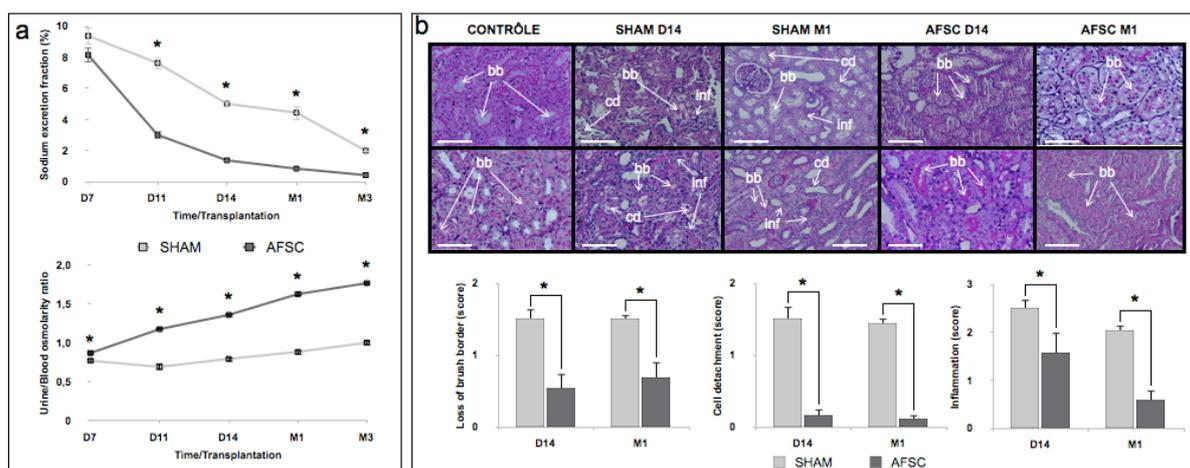


Figure 20 : fonction tubulaire et lésions tissulaires des greffons

(a) représentation de l'évolution de la fraction d'excrétion du sodium et du rapport d'osmolarité entre l'urine et le sang chez les animaux SHAM et AFSC, à partir de l'injection de cellules ou de solution vectrice seule jusqu'au jour du sacrifice. (b) photographies représentatives des colorations PAS effectuées sur les biopsies rénales des animaux, et représentation des scores de perte de bordure en brosse (brush border), de détachement des cellules épithéliales tubulaires (cell detachment) et d'inflammation calculés à partir de ces coupes. bb : bordure en brosse, cd : détachement cellulaire, inf : inflammation. Barres d'échelle : 100 µm

I. L'INJECTION D'AFSC AUTOLOGUES 6 JOURS APRES TRANSPLANTATION REDUIT SIGNIFICATIVEMENT LE DEVELOPPEMENT DE LA FIBROSE TISSULAIRE AINSI QUE L'INFILTRATION DE CELLULES IMMUNITAIRES OBSERVEE 3 MOIS APRES LA GREFFE

A la fin du suivi des animaux, soit 3 mois après la transplantation, la coloration rouge sirius et le marquage anti- α SMA du tissu rénal sont significativement moins importants chez les animaux ayant reçu une injection d'AFSC que chez les animaux non traités. Ces données suggèrent que le développement de la fibrose a été réduit par l'injection des cellules souches. Au moment du sacrifice, il y a également significativement moins de cellules immunitaires exprimant SWC3A infiltrées dans le tissu rénal des animaux du groupe AFSC que chez ceux du groupe SHAM. Ces observations sont corrélées à une fréquence supérieure de détection de zones d'atrophie tubulaire et d'infiltrats cellulaires sur les coupes histologiques de reins colorés au PAS issues des animaux non traités par rapport aux animaux traités avec les AFSC (Figure 21).

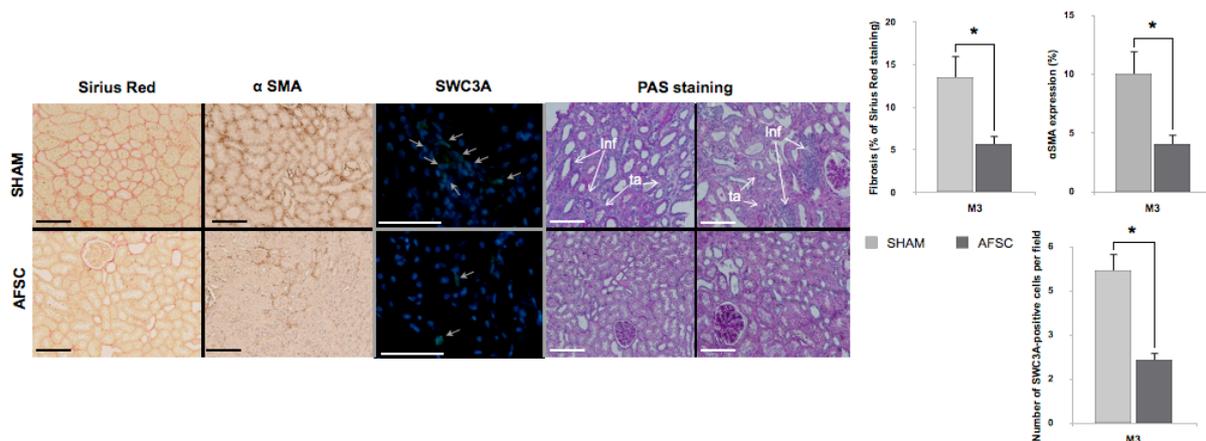


Figure 21 : Fibrose et infiltration cellulaire des greffons

Photographies représentatives des colorations rouge sirius, α SMA, du marquage en immunofluorescence des cellules SWC3A positives dans le tissu rénal des animaux SHAM et AFSC 3 mois après la transplantation, ainsi que la représentation de leur quantification respective. Photographies représentatives de la coloration PAS sur les reins des animaux 3 mois après la transplantation. Inf : Infiltrat cellulaire, ta : atrophie tubulaire. Barres d'échelle: 100 μ m

J. L'INJECTION D'AFSC AUTOLOGUES 6 JOURS APRES LA TRANSPLANTATION EST ASSOCIEE A UN PROFIL D'EXPRESSION PROTEIQUE PRO-ANGIOGENIQUE DANS LE GREFFON 3 MOIS APRES LA GREFFE

Les Western Blots réalisés sur les échantillons de reins prélevés lors du sacrifice des animaux, montrent des niveaux d'expression des facteurs de croissance pro-angiogéniques VEGF-A et Angiopoïétine 1 significativement supérieurs chez les animaux ayant bénéficié de l'injection de cellules souches après transplantation, par rapport à ceux qui n'ont pas été traités. Nous pouvons également observer une expression significativement inférieure du récepteur à au VEGF-A, Flt-1, dans le tissu rénal des porcs du groupe AFSC, comparé au groupe SHAM. Il n'y a en revanche pas de différence dans les niveaux d'expression de ces 3 protéines entre les animaux du groupe SHAM et du groupe Contrôle ni entre ceux du groupe Contrôle et du groupe AFSC (Figure 22).

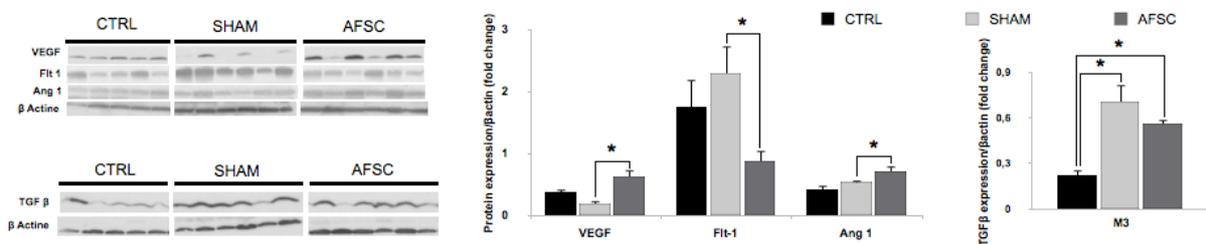


Figure 22 : Expression protéique de VEGF-A, Flt-1, Ang-1 et TGF- β dans le rein

Photographies de l'analyse par western blot de l'expression des protéines VEGF, Flt-1, Ang-1 et TGF- β sur les tissus rénaux des animaux des groupes Contrôle, SHAM et AFSC 3 mois après transplantation, et représentation de leur quantification respective rapportée à celle de la β actine. CTRL : Contrôle, VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor-A, Flt-1 : VEGF récepteur 1, Ang-1 : Angiopoïétine 1, TGF- β : Transforming Growth Factor β .

On peut observer une expression de TGF- β significativement plus importante dans les groupes AFSC et SHAM comparativement au groupe Contrôle, sans que l'on puisse toutefois mettre en évidence une différence significative entre les porcs traités et les porcs non traités (Figure 22).

K. IL EXISTE DES VARIATIONS DANS LA CINÉTIQUE DES CONCENTRATIONS EN VEGF ET TGF β AU NIVEAU SYSTEMIQUE, ENTRE LES ANIMAUX TRAITES PAR INJECTION D'AFSC ET LES ANIMAUX NON TRAITES

Les dosages plasmatiques de VEGF-A par méthode ELISA montrent que la concentration plasmatique de ce facteur de croissance a tendance à diminuer significativement entre le onzième et le quatorzième jour suivant la transplantation chez les animaux du groupe SHAM. Cette cinétique n'est pas retrouvée chez les animaux traités par injection d'AFSC et donc les taux plasmatiques semblent se stabiliser 4 jours après injection des cellules. A J14, la concentration plasmatique en VEGF-A chez les porcs du groupe AFSC est d'ailleurs significativement plus importante que ceux du groupe SHAM. Il n'y a plus de différence entre ces deux groupes 3 mois après la transplantation (Figure 23).

Les taux plasmatiques en TGF β sont globalement significativement augmentés chez les porcs ayant bénéficié de l'injection d'AFSC par rapports aux animaux du groupe SHAM, avec des différences significatives à 7 jours et 1 mois post transplantation. A la fin du suivi néanmoins, il n'y a plus de différences entre nos deux groupes (Figure 23).

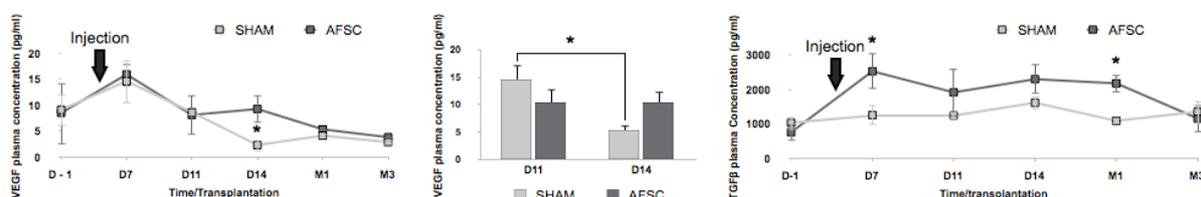


Figure 23 : Taux plasmatiques de VEGF et TGF- β après greffe

Représentations de l'évolution de la concentration plasmatique de VEGF et TGF- β mesurée par méthode ELISA à partir du jour précédent la transplantation, jusqu'au sacrifice de l'animal. Injection : Moment de l'injection des AFSC ou de la solution vectrice seule.

IV. DISCUSSION ET PERSPECTIVES

A. MODE D'OBTENTION DES AFSC

Dans cette étude, nous avons choisi d'utiliser les AFSC de manière autologue. Il faut donc pouvoir associer un échantillon de liquide amniotique renfermant les AFSC avec l'animal duquel provient l'échantillon prélevé. Dans certaines espèces animales, la démarche est facilitée par le fait que la femelle ne porte, dans l'immense majorité des cas, qu'un seul petit. La ponction de liquide amniotique peut alors se faire directement par voie transcutanée,

à distance de la naissance. Au contraire, une truie peut porter jusqu'à 18 porcelets, et il est alors impossible de prélever du liquide amniotique de manière précise sans sacrifier les porcelets.

Afin de réaliser des injections autologues d'AFSC et de garder les porcelets en vie, nous avons du procéder à la mise bas puis au prélèvement des échantillons de liquide amniotique par césarienne. A notre connaissance, l'utilisation de ce genre de démarche en vue de prélever des AFSC n'a été décrite que dans une seule étude chez l'Homme, mais jamais chez le porc[161]. Ce genre de démarche permettrait néanmoins le prélèvement de liquide amniotique humain sans avoir recours à l'amniocentèse, potentiellement source de complications pour le bébé[162].

Ce mode de prélèvement n'ayant jamais été réalisé chez le porc, la caractérisation de ces cellules avant leur injection prend alors toute son importance.

B. CARACTERISATION DES AFSC

1. Différenciation

Les AFSC sont définies comme faisant partie de la famille des cellules souches mésenchymateuses (CSM)[81].

Les critères minimaux donnés par l'ISCT pour permettre l'identification de CSM comprennent notamment la capacité de différenciation en adipocytes, en ostéoblastes et en chondrocytes. Les cellules souches mésenchymateuses présentent également une certaine plasticité leur permettant de se transdifférencier vers d'autres types cellulaires comme les hépatocytes, les cardiomyocytes et les cellules endothéliales. Cette plasticité confère à ces CSM des propriétés de différenciation à la limite de la pluripotence[36, 41].

Nos AFSC ont la capacité de se différencier en adipocytes, ostéoblastes et en cellules endothéliales. La différenciation en cellules endothéliales est de la plus grande importance dans le cadre de la réparation des greffons après transplantation, puisque ces cellules sont les plus touchées par les lésions d'IR[147]. Les AFSC pourraient alors contribuer à la régénération du rein transplanté en remplaçant directement les cellules lésées.

La caractérisation des différenciations adipogénique et ostéogéniques a été réalisée par marquage coloré, conformément aux recommandations de l'ISCT. Il n'y a pas de recommandations particulières quant à la caractérisation de la différenciation endothéliales, mais il existe des marqueurs de pertinence différente en fonction du stade de maturation des cellules endothéliales désirées. Ainsi l'expression du facteur von Willebrand est caractéristique de la cellule endothéliale mûre, et l'expression de eNOS et CD31 apparaît plus précocement dans le processus de différenciation[163]. Notre but n'étant pas d'obtenir des cellules endothéliales mûres par différenciation, nous avons sélectionné eNOS et CD31 comme marqueurs de la différenciation effective de nos AFSC en cellules endothéliales.

2. Expression de marqueurs membranaires

L'ISCT a également défini des marqueurs membranaires spécifiques des CSM pour leur caractérisation[36]. Nous avons montré que nos AFSC expriment le CD73 et le CD90. En plus de ces marqueurs dont la présence est nécessaire pour valider la qualité des CSM (marqueurs positifs), il existe une liste de marqueurs qui ne doivent pas être présent à la

surface des CSM (marqueurs négatifs). Ces marqueurs sont HLA DR, CD34, CD45, CD19 et CD14. Nous n'avons pas présenté les résultats de la caractérisation de ces marqueurs sur nos cellules car les anticorps correspondant sont actuellement en cours de validation au laboratoire.

Nous avons montré que les AFSC expriment le CD29 mais pas le c-Kit. Le premier marqueur est traditionnellement considéré comme étant exprimé par les CSM, en complément de ceux imposés par l'ISCT. Le second a été testé car il est fréquemment à la base d'une sélection des AFSC afin d'utiliser une population homogène de cellules lors des expériences utilisant ces cellules. Le fait que nos AFSC prélevés à la fin de la gestation n'expriment pas c-Kit n'est pas alarmant, puisqu'il a été décrit que ce marqueur était faiblement exprimé par les AFSC et que ce niveau d'expression diminue parallèlement à l'augmentation du stade de gestation auquel sont prélevées les AFSC. Par ailleurs il a été montré que les AFSC n'exprimant pas le c-Kit possèdent les mêmes capacités de différenciation et de sécrétion de facteurs de croissance que les cellules exprimant le c-Kit et que ces cellules ont tendance à perdre rapidement l'expression de ce marqueur au cours de leur culture *in vitro*[85].

3. Evaluation de la réponse à l'HR

Dans le cadre de la transplantation rénale, les cellules souches pourraient être injectées à différents moments clés par rapport au déclenchement des lésions d'IR et au processus de réparation cellulaire qui s'en suivent. Ainsi, les AFSC pourraient être utilisées pendant la conservation, pour prévenir les lésions d'IR chez le greffon, mais elles subiraient alors les phénomènes délétères de la conservation hypothermique, avec comme conséquence leur probable inactivation.

Ces cellules souches pourraient également être injectées précocement après la transplantation de l'organe, voire même juste avant la réalisation des anastomoses entre le greffon et le réseau vasculaire du receveur. Néanmoins, nous avons montré qu'il règne alors dans le rein transplanté un environnement particulièrement toxique pour les cellules avec notamment la persistance possible de zones ischémiques, et la libération d'espèces réactives de l'oxygène[145, 146].

Enfin, les AFSC pourraient être injectées à distance de la transplantation rénale, en respectant un délai de quelques jours, afin de permettre la dissipation de l'environnement délétère régnant dans le greffon. Cela permettrait de limiter au maximum le risque de lésions faites aux AFSC. Injecter ces cellules 3 à 7 jours après la transplantation rénale pourrait d'ailleurs revêtir un intérêt particulier puisque un travail récent publié par l'équipe a mis en avant la mise en place dans le rein, à partir de 3 jours post transplantation, de mécanismes de réparation cruciaux pour l'avenir du greffon[164].

En l'absence de données concluantes dans la littérature, le choix du moment de l'injection des AFSC est donc délicat, et semble conditionné à la sensibilité des cellules aux lésions d'IR.

C'est la raison pour laquelle nous avons voulu tester la sensibilité de nos AFSC à une séquence d'HR *in vitro*. Afin de pouvoir relier les résultats de ces tests à des données connues de la littérature en matière de susceptibilité à l'IR, nous les avons appliqués à notre séquence

d'HR simultanément à nos AFSC et à des PAEC, dont la sensibilité *in vivo* à l'IR est clairement démontrée[147].

C. MODELE ANIMAL

1. Conduite de l'étude

a) *Choix de l'espèce animale*

Les travaux ont été conduits sur des porcs de race Large White. Dans le cadre de procédures chirurgicales le gabarit de l'animal (40 Kg environs le jour de la greffe) permet l'utilisation de matériel chirurgical et de procédures d'anesthésie identiques à ceux utilisés en clinique humaine[165]. L'intérêt supplémentaire de cet animal en transplantation rénale est que le rein porcine est très proche de celui de l'Homme, que ce soit au niveau fonctionnel, qu'au niveau de sa taille et de son anatomie. Le réseau vasculaire est quasiment identique et le rein porcine présente la particularité d'être, comme le rein humain et à l'inverse du rein de rongeurs, d'être multipapillaire et multilobé[166]. Le gabarit de l'animal est également un plus dans le cadre d'évaluation de produits de thérapie cellulaire et notamment de l'étude de leur dissémination au sein de l'organisme[103]. Néanmoins cet avantage constitue paradoxalement un point faible modèle, puisque plus les organes sont grands, plus il est difficile d'y déceler un type particulier de cellule.

Les installations dont nous disposons permettent également un suivi de l'animal jusqu'à 3 mois post greffe, ce qui est un avantage dans le cadre de la caractérisation des lésions chroniques du greffon, mais aussi pour déceler des éventuels effets indésirables liés à l'évaluation de cellules souches, comme la formation de tératomes.

b) *Choix de la technique de transplantation rénale*

Dans le cadre de la transplantation rénale, les CSM, et donc par extension les AFSC peuvent exercer leurs actions bénéfiques potentielles par deux grands mécanismes[37, 40, 57]. Le premier repose sur les propriétés immunomodulatrices des cellules pouvant, à terme, induire une tolérance du greffon tout en arrêtant tout traitement immunomodulateur. L'autre mécanisme ferait intervenir les propriétés de différenciation et de sécrétion de facteurs de croissance de ces cellules pour promouvoir la réparation et la régénération tissulaire post transplantation.

L'étude de ces deux voies thérapeutiques dans un modèle animal impliquerait le ciblage de deux processus physiopathologiques : les mécanismes immunitaires d'allo reconnaissance dans le cadre de l'induction de tolérance, et les lésions d'IR dans le cadre de l'induction de la régénération tissulaire. Dans le cas de l'étude de l'induction de tolérance chez le porc, le protocole d'expérimentation animale serait alors trop complexe à mettre en place dans un premier temps car il nécessiterait entre autres la réalisation d'une banque d'AFSC porcine haplotypée, une sélection drastique des donneurs et des receveurs en terme de compatibilité, ainsi que la mise en place d'un traitement immunosuppresseur et de son suivi chez les animaux.

Nous avons donc choisi de nous focaliser dans un premier temps sur la réparation des lésions d'IR spécifiques de la transplantation de reins issus de donneurs DDAC dont l'ischémie comprend une période d'ischémie à température corporelle suivie d'une ischémie hypothermique[167]. Afin d'éviter tout phénomène d'allorecognition, nous avons opté, en plus de l'injection d'AFSC autologues, pour la transplantation du propre rein de l'animal, après une période de conservation combinant 1h d'ischémie à température corporelle par clampage de l'artère rénale et 24h d'ischémie à 4°C dans une solution de conservation d'organe.

c) Choix du mode d'administration des AFSC

Les AFSC se sont révélées au moins aussi sensibles que les HAEC à l'HR *in vitro*, ce qui ne rendait pas pertinent leur injection pendant la conservation du greffon ou même dans délai trop court suivant la transplantation. Nous avons donc choisi d'injecter les AFSC 6 jours après la greffe, pour les raisons mentionnées précédemment. De plus nous avons choisi d'injecter les cellules directement dans l'artère rénale, et ce au prix de la réalisation d'une opération chirurgicale délicate, afin de réduire au maximum le risque de dissémination des cellules aux autres organes de l'animal.

d) Détection des AFSC après injection

Etant donné les problématiques de dissémination des AFSC, et pour voir si ces cellules étaient susceptibles de s'intégrer de manière durable au tissu rénal, il paraissait indispensable de pouvoir suivre les AFSC. Etant donné le caractère autologue des cellules et l'absence de marqueur membranaire totalement spécifique des AFSC, la seule manière de suivre ces cellules est de les marquer artificiellement[81]. Etant donné la durée du suivi, les marqueurs fluorescents classiques comme le CFSE ou le BrdU sont inutilisables[168, 169]. C'est la raison pour laquelle nous avons décidé de faire exprimer la protéine GFP par les AFSC en utilisant une transfection durable grâce à un vecteur lentiviral[170].

La méthode de détection par immunofluorescence sur coupe histologique, bien que controversée en raison du risque de faux positifs, présente l'intérêt de pouvoir balayer une surface de tissus importante à la recherche de cellules fluorescentes. La détection et la quantification de l'expression de la GFP par western blot aurait également pu être intéressante, mais n'as pas été appliquée en raison de l'absence d'anticorps adéquat. Cette démarche s'est avérée concluante, puisque nous avons pu détecter dans le greffon les AFSC marquées à la GFP 10 minutes, 24h et 3 mois après leur injection.

e) Groupes contrôles

Nous avons comparé des porcs ayant bénéficiés de l'injection d'une suspension d'AFSC 6 jours après la greffe, à des porcs ayant subi l'injection de la même solution vectrice acellulaire, tout en respectant le même délai entre la transplantation et l'injection. Le but a été de s'affranchir des biais éventuels liés à l'injection de la solution dans l'organes, comme la purge de thrombus résiduels dans le rein, l'endommagement du réseau vasculaire rénal liée à

l'injection, ou les conséquences du temps de clampage nécessaire à l'injection des cellules à J6. Nous avons utilisé deux types d'animaux contrôle « sains » : des animaux uninephrectomisés afin de mimer la réduction néphronique liée à la présence résiduelle d'un seul des deux reins. En effet des travaux non publiés menés par l'équipe ont montrés que cette réduction néphronique n'était pas totalement anodine pour le rein restant, et cela avait tendance à se répercuter sur certaines valeurs biologiques. Néanmoins, en toute logique ce groupe est le réel pendant « sain » des animaux transplantés, qui ne sont plus pourvu que d'un seul de leurs 2 reins initiaux. Un groupe « historique » d'animaux n'ayant pas subi de chirurgie nous a également permis de donner un aperçu physiologique de certaines valeurs biologiques.

f) Techniques d'analyses biologiques

Nous avons montré par des dosages biologiques, que l'injection des cellules souches permettait une accélération de la reprise des fonctions glomérulaires et tubulaires du greffon. Pour cela nous avons dosé la créatinine plasmatique et la protéinurie chez nos animaux. Nous n'avons pas calculé la clairance de la créatinine. En effet, en dépit d'un monitoring étroit des animaux grâce aux cages métaboliques, il existe un doute sur la quantité d'urine recueillie sur 24h par rapport à la quantité d'urine réellement émise par l'animal. Les tubules rénaux permettant de concentrer les urines par réabsorption d'eau et de sodium, le calcul de la fraction d'excrétion du sodium et la comparaison de l'osmolarité urinaire par rapport à l'osmolarité du sang sont des bons indicateurs de la fonction tubulaire du greffon.

2. Mécanismes potentiellement impliqués dans l'induction des réparations des lésions d'IR par les AFSC

a) Rôle de VEGF-A, Flt-1 et Angiopoïétine I

Nous avons vu que l'injection des AFSC était associée, 3 mois après la transplantation, à une augmentation de l'expression de VEGF-A et d'Angiopoïétine 1 (Ang-1) au niveau du greffon. Bien que les AFSC sont connues pour sécréter *in vitro* et *in vivo* ces deux facteurs de croissance, nous avons vu que ces cellules n'étaient quasiment plus détectables dans le rein au moment du sacrifice. Il semblerait donc la présence de VEGF-A et Ang-1 en quantité importante dans le greffon ne soit pas due directement à leur sécrétion par les AFSC, mais pourrait être la conséquence de la l'induction de processus de réparation lors de l'injection des cellules, mécanismes potentiellement toujours en cours 3 mois après la greffe. Le VEGF peut exercer son action proangiogénique par liaison à différents types de récepteurs. Parmi ces récepteurs, Flt-1 est suspecté d'être un peu, voire pas fonctionnel et pourrait limiter l'action du VEGF [171, 172]. La réduction de l'expression de Flt-1 dans le tissu rénal suggère que des quantités plus importantes de VEGF sont disponibles et pourraient se lier à ses autres récepteurs, ce qui potentialiserait l'action de ce facteur de croissance.

L'évolution de la vascularisation du greffon n'ayant pas encore été analysée, il est difficile de mettre en avant de manière certaine la relation entre l'augmentation de l'expression de VEGF et d'Ang-1 et une néovascularisation voir une néoangiogénèse localisée au niveau du rein, et à l'origine de l'accélération de la reprise de fonction du greffon

ainsi qu'à la prévention de la fibrose tubulo-interstitielle. Néanmoins, après le sacrifice, les reins de l'étude ont été perfusés avec un produit de contraste spécifique permettant par la suite l'analyse de la microvascularisation et du remodelage vasculaire grâce à un microscanner. Ce microscanner permet de reconstruire et d'analyser des vaisseaux d'un diamètre minimal de 20µm. Ce travail est actuellement en cours.

Nous avons montré une différence dans la cinétique d'évolution du VEGF-A plasmatique entre nos deux groupes expérimentaux, avec à J14, une concentration plasmatique en VEGF-A supérieure chez les porcs du groupe AFSC.

La concentration en VEGF plasmatique est assez délicate à interpréter, et sa mesure avait été réalisée pour palier à l'impossibilité d'analyser l'expression de la protéine dans le tissu rénal tout au long de l'étude. Les sources potentielles du VEGF retrouvées au niveau systémique sont potentiellement nombreuses et il convient de considérer ce résultat avec précautions.

b) Prévention de la fibrose et de l'infiltration cellulaire

Grâce aux marquages PAS, rouge sirius, α SMA, et SWC3A sur les greffons rénaux, nous avons montré que l'injection des AFSC 6 jours après la transplantation permet de réduire la fibrose, l'inflammation tissulaire et l'infiltration de cellules inflammatoire dans le rein.

Le modèle que nous avons utilisé ne permet pas la réalisation d'une quantification précise et en continu de l'évolution de la fibrose rénale tout au long des 3 mois de suivi. En effet les biopsies réalisées n'ont pas une taille suffisante pour permettre une quantification suffisamment représentative du volume du rein atteint par la fibrose avec des techniques de coloration classiques. Pour permettre cela, il faudrait procéder à des sacrifices sériés d'animaux, à différents temps, ce qui prendrait un temps considérable étant donné le faible rendement combiné de la sélection de porcelets et de l'isolement des AFSC autologues lors de la naissance par césarienne (2 animaux par portée de 18 porcelets dans notre étude). A titre d'exemple, la différence de surface d'une coupe histologique effectuée sur une biopsie et celle effectuée sur un échantillon est illustrée par la Figure 24.

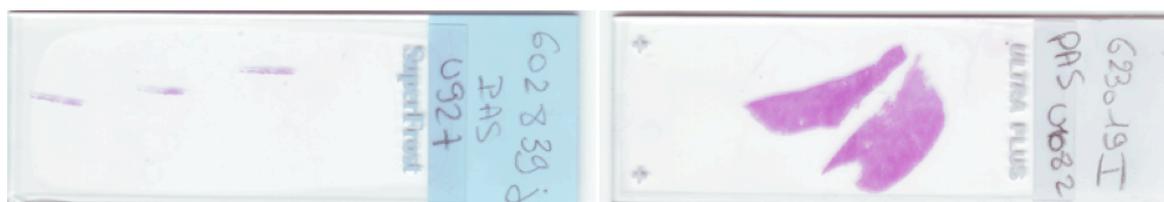


Figure 24 : Comparaison biopsies intermédiaires/échantillons prélevés à 3 mois

Photographie de lames réalisées à partir de coupes de biopsies rénales prélevées à J11 (à gauche) et d'échantillons de rein prélevés au moment du sacrifice de l'animal. Sur la lame de gauche, ce sont 3 coupes de la même biopsie qui ont été déposées successivement. Sur la lame de droite il s'agit d'une seule coupe de 2 morceaux différents inclus côte à côte dans la paraffine.

La coloration idéale effectuée pour analyser une coupe histologique de rein est le Trichrome Masson, permettant d'évaluer, en une seule coloration et donc sur une seule lame, les structures membranaires, les phénomènes fibreux et les cellules résidentes ou inflammatoires. Néanmoins les colorations PAS et Rouge Sirius sont aussi tout aussi efficaces

que le Trichrome Masson pour évaluer, respectivement, les cellules qu'elles soient résidentes ou inflammatoires, et l'extension de la fibrose.

Le marquage α SMA est spécifiques des fibromyoblastes et des cellules musculaires lisses et permet de mettre en évidence une éventuelle transition épithélio-mésenchymateuse à l'origine du développement de la fibrose. Les cellules musculaires lisses faisant partie intégrante de la structure de vaisseaux, il ne faut prendre en compte que le marquage de l'interstitium rénal.

c) *Rôle de TGF- β*

Nous avons mis en évidence une augmentation de l'expression de TGF- β dans les greffons par rapport aux reins non greffés, sans différence entre nos deux groupes AFSC et SHAM.

TGF- β est une cytokine dont le rôle physiologique est lié au microenvironnement dans lequel elle est libérée ainsi qu'à sa cinétique de libération. Ainsi une exposition prolongée à TGF- β dans un microenvironnement proinflammatoire pourrait favoriser la génération de fibrose et entretenir la réaction inflammatoire. A l'inverse une libération transitoire de TGF- β dans un environnement proangiogénique pourrait induire la prolifération des cellules endothéliales et faciliter la néovascularisation. De plus, TGF- β est connu pour induire la transformation des LyT en cellules T régulatrices, permettant de moduler la réponse inflammatoire et immunitaire, ce qui aurait un effet bénéfique indéniable dans le cadre de la transplantation rénale[173, 174].

Le profil de l'évolution des taux plasmatiques de TGF- β montre que l'injection des AFSC provoque une libération accrue de TGF- β au niveau systémique mais que les taux redeviennent sensiblement identiques entre nos deux groupes à la fin de la période de suivi. Cet aspect transitoire de l'élévation de la concentration de TGF- β pourrait suggérer le côté plus bénéfique des effets potentiels de TGF- β , sans toutefois en apporter la preuve formelle.

D. PERSPECTIVES

1. *Liées aux AFSC*

Nous avons vu que le protocole d'injection des AFSC a été adapté pour prendre en compte la sensibilité probable des cellules à l'IR caractéristique de la transplantation rénale. Avec l'apparition de la perfusion normothermique et oxygénée du greffon pendant sa phase de conservation, ce type d'approche pourrait être remise en question. Il pourrait donc être judicieux de tester l'injection des AFSC dans ce type de configuration, dont l'intérêt pour la conservation de l'organe n'est toutefois pas encore clairement établi.

Nous avons de plus montré un effet bénéfique clair de l'utilisation de ces cellules injectées de manière autologue dans le cadre de la transplantation rénale. Il est néanmoins peu probable que, si ce genre de cellules venaient à être couramment utilisées en clinique humaine, celles-ci proviendrait certainement de banques de cellules allogéniques haplotypées et non de banques de cellules autologues. Il pourrait donc être intéressant de réitérer ces expériences chez le porc, en utilisant cette fois des AFSC d'origine allogénique.

Le phénotype des AFSC étant évolutif en fonction de la durée de gestation, il pourrait également être intéressant de tester l'injection de cellules allogéniques isolées à différents

stades de gestation afin de définir le moment optimal pour l'obtention des AFSC, les plus efficaces dans la prévention et la réparation des lésions d'IR chez le greffon.

2. *Liées au modèle animal*

Le modèle expérimental utilisé ici implique la réalisation d'une autogreffe rénale pour cibler spécifiquement les lésions d'IR liées à la transplantation. En clinique humaine, cette situation d'autotransplantation ne se présente jamais. Pour fournir une preuve définitive du bénéfice thérapeutique de l'utilisation des AFSC il serait souhaitable de réaliser des transplantations allogéniques dans ce même modèle porcin.

La méthode d'injection des cellules souches doit être également améliorée. Si l'injection des cellules directement dans l'artère du greffon n'est pas remise en cause, la nécessité de réopérer le patient après transplantation est inconcevable en clinique humaine. Il serait possible de cathétériser l'artère rénale par voie transcutanée via l'artère iliaque, mais cette méthode nécessite un matériel particulier pour être évaluée chez le porc. Pour cela, le laboratoire est en train de se doter un amplificateur de brillance permettant de vérifier la qualité de la cathétérisation.

Avant l'injection des AFSC et lors du sacrifice, les organes ont été inspectés visuellement à la recherche de la formation éventuelle de tératomes. Le but initial du travail n'étant pas de tester la tumorigénicité des AFSC, nous n'avons pas procédé à des analyses histologiques plus poussées des tissus. Néanmoins, le modèle porcin pourrait être un très bon modèle d'investigation de la tumorigénicité de certaines variétés de cellules souches pour des raisons que nous avons évoquées précédemment. Afin d'augmenter la pertinence du modèle dans le cadre de l'étude de la tumorigénicité, il faudrait pouvoir augmenter la durée de suivi des animaux. Mais il existe un obstacle majeur à cette démarche. En effet, à la fin de notre étude le porcelet est alors âgé de 6 mois et pèse plus de 100kg. Dans ces conditions, il est impossible de prolonger le suivi sans s'exposer à des problèmes techniques lors de la chirurgie terminale du sacrifice.

V. CONCLUSION

Dans cette étude, nous avons cherché à mettre en place un protocole préclinique de transplantation rénale chez le porc afin de tester l'utilisation de cellules souches dans le cadre de la transplantation rénale. Nous avons utilisé ce modèle spécifique afin d'évaluer pour la première fois l'utilisation des cellules souches issues du liquide amniotique dans un modèle d'autotransplantation rénale ciblant les lésions d'Ischémie Reperfusion spécifiquement infligées aux greffons issus de donneurs décédés après arrêt cardiaque.

Nous avons tout d'abord prélevé les cellules souches issues du liquide amniotique par césarienne afin de permettre leur injection autologue lors de la transplantation. Nous avons ensuite montré que ce mode de prélèvement permettait d'isoler du liquide amniotique des cellules souches de bonne qualité du point de vue de leur potentiel de différenciation et de

leur expression de marqueurs membranaires communs aux cellules souches mésenchymateuses. Nous avons ensuite mis en évidence une sensibilité des cellules souches issues du liquide amniotique à une séquence d'hypoxie réoxygénation *in vitro*, ce qui nous a poussé à injecter nos cellules dans le greffon rénal 6 jours après la transplantation. Après avoir validé *ex vivo* puis *in vivo* que les cellules injectées directement dans l'artère du greffon étaient majoritairement retenues dans l'organe, nous avons comparé l'impact de l'injection des cellules souches issues du liquide amniotique sur la reprise de fonction du greffon après transplantation, comparé à l'injection d'une solution de NaCl 0,9% seule.

Nous avons réussi à mettre en évidence que l'injection de cellules souches permet d'accélérer considérablement la reprise des fonctions glomérulaires et tubulaires du greffon comparé à l'injection de la solution saline. Ces cellules souches ont également permis de préserver l'intégrité tissulaire des greffons en prévenant le développement de la fibrose, de l'inflammation et de l'infiltration de cellules immunitaires. Nous avons également pu montrer que les cellules souches semblent induire l'instauration d'un environnement pro angiogénique au sein de l'organe, sans toutefois parvenir à dégager le mécanisme d'action privilégié de ces cellules souches. Il faut également noté que nous n'avons pas détecté de formation de tératomes suivant l'injection des cellules souches chez les animaux.

Au final, cette étude nous a permis de démontrer l'intérêt et la faisabilité de l'injection de cellules souches issues du liquide amniotique pour accélérer la régénération de greffons rénaux issus de donneurs décédés après arrêt cardiaque. Nous avons également pu mettre au point une technique d'administration prenant en compte la sensibilité potentielle des cellules souches à la séquence d'ischémie reperfusion caractéristique de la transplantation rénale. Le modèle animal développé ici est un modèle préclinique à haute valeur translationnelle permettant l'évaluation potentielle de l'injection d'autres types de cellules souches dans le cadre de la transplantation d'organes solides.

FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1: Division asymétrique des cellules souches.....	14
Figure 2: Destinées des cellules souches.....	15
Figure 3 : Régulation des cellules souches par les cellules stromales de la niche.	16
Figure 4: Types de cellules souches en fonction du stade de développement.	18
Figure 5 : Immunomodulation par les cellules souches mésenchymateuses.	26
Figure 6 : Modèles d'hétérogénéité des cellules cancéreuses.....	30
Figure 7 : Distinction entre divers Médicaments de Thérapie Innovante (MTI)	33
Figure 8 : AMM centralisée.....	34
Figure 9: Patients en attente de greffes	49
Figure 10 : Greffons rénaux refusés.....	51
Figure 11 : Principaux mécanismes initiateurs des lésions d'ischémie	61
Figure 12 : Programme expérimental.....	77
Figure 13 : Potentiel de différenciation des AFSC prélevés par césarienne	80
Figure 14 : Phénotypage des AFSC prélevés par césarienne.....	80
Figure 15 : Résistance à l'Hypoxie Réoxygénation des AFSC et PAEC.....	81
Figure 16 : Marquage GFP après injection des AFSC ex vivo	82
Figure 17 : Marquage GFP 24h après injection d'AFSC in vivo.....	82
Figure 18 : Marquage GFP 3 mois après greffe rénale	83
Figure 19 : Créatininémie et de la protéinurie après greffe rénale.....	84
Figure 20 : fonction tubulaire et lésions tissulaires des greffons	85
Figure 21 : Fibrose et infiltration cellulaire des greffons.....	86
Figure 22 : Expression protéique de VEGF-A, Flt-1, Ang-1 et TGF- β dans le rein.....	86
Figure 23 : Taux plasmatiques de VEGF et TGF- β après greffe	87
Figure 24 : Comparaison biopsies intermédiaires/échantillons prélevés à 3 mois.....	93
Tableau 1 : Essais cliniques impliquant les cellules souches.....	44
Tableau 2 : Classification de Maastricht (1995)	52
Tableau 3 : Comorbidités et donneurs.....	55
Tableau 4 : Solutions de conservation en transplantation	65

ABREVIATIONS

A

ADSC : Cellules souches dérivées du tissu adipeux (Adipose Derived Stem Cell)
AFSC : Cellules souches issues du liquide amniotique (Amniotic Fluid Stem Cell)
AMM : Autorisation de Mise sur le Marché
AMP : Assistance Médicale a la Procréation
Ang-1 : Angiopoïétine-1
ANSM : Agence Nationale de Sécurité du Médicament
 α SMA : Actine _ du muscle lisse (_ Smooth Muscle Actin)
ATP : Adénosine Tri Phosphate

B

BCA : Bicinchoninic Acid Protein Assay
bFGF : basic Fibroblast Growth Factor
BMP : Bone Morphogenic Protein
BMP-R : Bone Morphogenic Protein Receptor Receptor
BPF : Bonnes Pratiques de Fabrication

C

Ca²⁺ : ion Calcium
CDi : Cellules dendritiques immatures
CDm : Cellules dendritiques matures
CGH : Comparaison de l'hybridation génomique (Comparison of Genomic Hybridation)
CHMP : Comité des médicaments à usage humain (Committee for Human Medicinal Product)
CJUE : Cours de Justice de l'Union Européenne
Cl⁻ : ion Chlorure
CPA : Cellules présentatrices de l'antigène
CSA : Cellules Souches Adultes
CSC : Cellules Souches Cancéreuses
CSH : Cellules souches Hématopoïétiques
CSM : Cellules souches mésenchymateuses
CTA : Comité pour les thérapies innovantes (Committee for Advanced Therapies)

D

DAB : Diamino Benzidine
DAMPs : Damage Associated Molecular Patterns
DDAC : Donneur Décédé après Arrêt Cardiaque
DMSO : Dimethyl Sulfoxyde

E

EB : Corps embryonnaires (Embryonic Bodies)
EDTA : acide éthylène diamine tétraacétique (Ethylen Diamine Tetraacetic Acid)
EGF : Epidermal Growth Factor
EGTA : acide éthylène glycol tétraacétique (Ethylen Glycol Tetraacetic Acid)
ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EMA : Agence européenne du médicament (European Medicines Agency)
eNOS : endothelial Nitric Oxide Synthase
EPO : Erythropoïétine
ES (cellules) : cellules souches embryonnaires (Embryonic stem cells)

F

FGF-R : Fibroblast Growth Factor Receptor

G

GFP : Green Fluorescent Protein

H

H⁺ : Protons
HCO³⁻ : ion bicarbonate
HEPES : acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
HES : Hydroxy Ethyl Starch
HGF : Hepatocyte Growth Factor
HO· : Radical hydroxyle
HR : Hypoxie Réoxygénation

I

IBiSA : Infrastructures en Biologie Sante et Agronomie
IC : Ischémie Cérébrale
ICAM-1 : InterCellular Adhesion Molecule-1
IDO : Indoleamine 2,3 déoxygénase
IFN-γ : Interferon gamma
IGF : Insulin-like Growth Factor
IGF-R : IGF Receptor
iPS (cellules) : Cellules souches pluripotentes induites (induced Pluripotent Stem cells)
IR : Ischémie Reperfusion
ISCT : Société internationale de thérapie cellulaire (International Society of Cellular Therapy)
IV : Intra-Veineuse

J

JAK : Janus Kinase

K

K^+ : ion Potassium

KH_2PO_4 : Phosphate de potassium

L

LDH : Lactate Deshydrogenase

Leem : Les entreprises du médicament

LFA-1 : Lymphocyte Function-associated Antigen-1

LIF : Leukemia Inhibitory Factor

LIF-R β : LIF Receptor beta

LyB : Lymphocytes B

LyT : Lymphocytes T

M

MA : Macrophages

MAPK : Mitogen Associated Protein Kinase

MCP-1 : Monocyte Chemotactic Protein-1

Mg^{2+} : ion Magnésium

miRNA : micro RiboNucleotidic Acid

MMP-9 : Métallo-protéase de la matrice (Matrix Metallo Protease)

MO : Monocytes

MTI : Médicament de Thérapie Innovante

MTI-PP : Médicament de Thérapie Innovante-Préparés Ponctuellement

N

Na^+ : ion Sodium

Na_3PO_4 : Phosphate de Sodium

NFP : Non Fonction Primaire

NK (cellules) : cellules Natural Killer

NO : Monoxyde d'azote

NOD-SCID : Non Obese Diabetic-Severe Common Immunodeficiency Disease

O

$ONOO^-$: Peroxynitrites

P

PAEC : cellules endothéliales primaires d'artère de porc (Porcine primary Arterial Endothelial Cells)

PAMPs : Pathogen Associated Molecular Patterns

PAS : Acide periodique de Schiff (Periodic Acid Schiff)

PBS : Phosphate Buffer Saline

PEG : Poly Ethylène Glycol

PGE-2 : Prostaglandine E 2

PI3K : Phosphatidyl Inositol 3 Kinase

PNN : Polynucléaires neutrophiles

PTA : Produit Thérapeutique Annexe

PVDF : Polyfluorure de vinylidène

R

ROS : Espèce radicalaire de l'oxygène (Radical Oxygen Species)

RPE : Epithélium pigmentaire de la rétine (Retinal Pigmentary Epithelium)

RRF : Reprise Retardée de Fonction

S

SCF : Stem cell Factor

SLA : Sclérose Latérale Amiotrophique

SO₄²⁻ : ion Sulfate

SSEA-3/4 : Stage-Specific Embryonic Antigens

STAT : Signal Transducers and Activators of Transcription

SVF : Sérum de Veau Fœtal

T

TDGF-1 : Teratocarcinoma Derived Growth Factor

TGF-β : Transforming Growth Factor beta

TGFβ-R : Transforming Growth Factor beta Receptor

TLR 2-3 : Toll Like Receptor 2-3

TNF-α : Tumor Necrosis Factor alpha

tpm : tours par minute

Treg : Lymphocytes Trégulateurs

U

UW : Viaspan (University of Wisconsin)

V

VCAM-1 : Vascular Cell Adhesion Molecule-1

VEGF-A : Vascular Endothelial Growth Factor-A

VLA-4 : Very Late Antigen-4

VSVG : Vesicular Stomatitis Virus G protein

X

XTT : sodium 2,3,-bis(2-methoxy- 4-nitro-5-sulfohenyl)-5-[(phenylamino)-carbonyl]-2H-tetrazolium

BIBLIOGRAPHIE

1. Thomson, JA, *et al.* (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* **282**: 1145-1147.
2. Vats, A, Bielby, RC, Tolley, NS, Nerem, R, and Polak, JM (2005). Stem cells. *Lancet* **366**: 592-602.
3. Denham, M, Conley, B, Olsson, F, Cole, TJ, and Mollard, R (2005). Stem cells: an overview. *Curr Protoc Cell Biol* **Chapter 23**: Unit 23 21.
4. He, S, Nakada, D, and Morrison, SJ (2009). Mechanisms of stem cell self-renewal. *Annu Rev Cell Dev Biol* **25**: 377-406.
5. Frenette, PS, Pinho, S, Lucas, D, and Scheiermann, C (2013). Mesenchymal stem cell: keystone of the hematopoietic stem cell niche and a stepping-stone for regenerative medicine. *Annu Rev Immunol* **31**: 285-316.
6. Yin, H, Price, F, and Rudnicki, MA (2013). Satellite cells and the muscle stem cell niche. *Physiol Rev* **93**: 23-67.
7. Gonzalez-Perez, O, Gutierrez-Fernandez, F, Lopez-Virgen, V, Collas-Aguilar, J, Quinones-Hinojosa, A, and Garcia-Verdugo, JM (2012). Immunological regulation of neurogenic niches in the adult brain. *Neuroscience* **226**: 270-281.
8. Watt, FM, and Hogan, BL (2000). Out of Eden: stem cells and their niches. *Science* **287**: 1427-1430.
9. Chen, S, Lewallen, M, and Xie, T (2013). Adhesion in the stem cell niche: biological roles and regulation. *Development* **140**: 255-265.
10. Reynolds, A, *et al.* (2013). Canonical Wnt signals combined with suppressed TGFbeta/BMP pathways promote renewal of the native human colonic epithelium. *Gut*.
11. Hirai, H, Karian, P, and Kikyo, N (2011). Regulation of embryonic stem cell self-renewal and pluripotency by leukaemia inhibitory factor. *Biochem J* **438**: 11-23.
12. Gotoh, N (2009). Control of stemness by fibroblast growth factor signaling in stem cells and cancer stem cells. *Curr Stem Cell Res Ther* **4**: 9-15.
13. Takahashi, K, *et al.* (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **131**: 861-872.
14. He, XC, *et al.* (2004). BMP signaling inhibits intestinal stem cell self-renewal through suppression of Wnt-beta-catenin signaling. *Nat Genet* **36**: 1117-1121.
15. Katoh, M (2007). WNT signaling pathway and stem cell signaling network. *Clin Cancer Res* **13**: 4042-4045.
16. Borovski, T, De Sousa, EMF, Vermeulen, L, and Medema, JP (2011). Cancer stem cell niche: the place to be. *Cancer Res* **71**: 634-639.
17. Rossant, J (2001). Stem cells from the Mammalian blastocyst. *Stem Cells* **19**: 477-482.
18. De Miguel, MP, Fuentes-Julian, S, and Alcaina, Y (2010). Pluripotent stem cells: origin, maintenance and induction. *Stem Cell Rev* **6**: 633-649.
19. Takahashi, K, and Yamanaka, S (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**: 663-676.

20. Ratajczak, MZ, Zuba-Surma, E, Kucia, M, Poniewierska, A, Suszynska, M, and Ratajczak, J (2012). Pluripotent and multipotent stem cells in adult tissues. *Adv Med Sci* **57**: 1-17.
21. Majo, F, Rochat, A, Nicolas, M, Jaoude, GA, and Barrandon, Y (2008). Oligopotent stem cells are distributed throughout the mammalian ocular surface. *Nature* **456**: 250-254.
22. Ko, K, *et al.* (2009). Induction of pluripotency in adult unipotent germline stem cells. *Cell Stem Cell* **5**: 87-96.
23. Evans, MJ, and Kaufman, MH (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* **292**: 154-156.
24. Tanaka, N, Takeuchi, T, Neri, QV, Sills, ES, and Palermo, GD (2006). Laser-assisted blastocyst dissection and subsequent cultivation of embryonic stem cells in a serum/cell free culture system: applications and preliminary results in a murine model. *J Transl Med* **4**: 20.
25. Villa-Diaz, LG, Ross, AM, Lahann, J, and Krebsbach, PH (2013). Concise review: The evolution of human pluripotent stem cell culture: from feeder cells to synthetic coatings. *Stem Cells* **31**: 1-7.
26. Zhao, W, Ji, X, Zhang, F, Li, L, and Ma, L (2012). Embryonic stem cell markers. *Molecules* **17**: 6196-6236.
27. Lefort, N, Perrier, AL, Laabi, Y, Varela, C, and Peschanski, M (2009). Human embryonic stem cells and genomic instability. *Regen Med* **4**: 899-909.
28. Cunningham, JJ, Ulbright, TM, Pera, MF, and Looijenga, LH (2012). Lessons from human teratomas to guide development of safe stem cell therapies. *Nat Biotechnol* **30**: 849-857.
29. Cooke, MJ, Stojkovic, M, and Przyborski, SA (2006). Growth of teratomas derived from human pluripotent stem cells is influenced by the graft site. *Stem Cells Dev* **15**: 254-259.
30. Kountakis, SE, Minotti, AM, Maillard, A, and Stiernberg, CM (1994). Teratomas of the head and neck. *Am J Otolaryngol* **15**: 292-296.
31. Itskovitz-Eldor, J, *et al.* (2000). Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers. *Mol Med* **6**: 88-95.
32. Dresser, R (2001). Ethical issues in embryonic stem cell research. *JAMA* **285**: 1439-1440.
33. Allsopp, RC, Morin, GB, DePinho, R, Harley, CB, and Weissman, IL (2003). Telomerase is required to slow telomere shortening and extend replicative lifespan of HSCs during serial transplantation. *Blood* **102**: 517-520.
34. Blaber, SP, *et al.* (2012). Analysis of in vitro secretion profiles from adipose-derived cell populations. *J Transl Med* **10**: 172.
35. Martinez-Serrano, A, Rubio, FJ, Navarro, B, Bueno, C, and Villa, A (2001). Human neural stem and progenitor cells: in vitro and in vivo properties, and potential for gene therapy and cell replacement in the CNS. *Curr Gene Ther* **1**: 279-299.
36. Dominici, M, *et al.* (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **8**: 315-317.
37. Williams, AR, and Hare, JM (2011). Mesenchymal stem cells: biology, pathophysiology, translational findings, and therapeutic implications for cardiac disease. *Circ Res* **109**: 923-940.
38. Jiang, Y, *et al.* (2002). Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* **418**: 41-49.
39. Delorme, B, Chateauvieux, S, and Charbord, P (2006). The concept of mesenchymal stem cells. *Regen Med* **1**: 497-509.

40. Jackson, L, Jones, DR, Scotting, P, and Sottile, V (2007). Adult mesenchymal stem cells: differentiation potential and therapeutic applications. *J Postgrad Med* **53**: 121-127.
41. Zipori, D (2006). The stem state: mesenchymal plasticity as a paradigm. *Curr Stem Cell Res Ther* **1**: 95-102.
42. Das, AK, Bin Abdullah, BJ, Dhillon, SS, Vijanari, A, Anoop, CH, and Gupta, PK (2013). Intra-arterial allogeneic mesenchymal stem cells for critical limb ischemia are safe and efficacious: report of a phase I study. *World J Surg* **37**: 915-922.
43. Lee, EJ, Park, HW, Jeon, HJ, Kim, HS, and Chang, MS (2013). Potentiated therapeutic angiogenesis by primed human mesenchymal stem cells in a mouse model of hindlimb ischemia. *Regen Med* **8**: 283-293.
44. Krampera, M, Pizzolo, G, Aprili, G, and Franchini, M (2006). Mesenchymal stem cells for bone, cartilage, tendon and skeletal muscle repair. *Bone* **39**: 678-683.
45. Bruder, SP, Fink, DJ, and Caplan, AI (1994). Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy. *J Cell Biochem* **56**: 283-294.
46. Kolli, S, Ahmad, S, Lako, M, and Figueiredo, F (2010). Successful clinical implementation of corneal epithelial stem cell therapy for treatment of unilateral limbal stem cell deficiency. *Stem Cells* **28**: 597-610.
47. Serakinci, N, *et al.* (2004). Adult human mesenchymal stem cell as a target for neoplastic transformation. *Oncogene* **23**: 5095-5098.
48. Ning, H, *et al.* (2009). Identification of an aberrant cell line among human adipose tissue-derived stem cell isolates. *Differentiation* **77**: 172-180.
49. Sartore, S, *et al.* (2005). Amniotic mesenchymal cells autotransplanted in a porcine model of cardiac ischemia do not differentiate to cardiogenic phenotypes. *Eur J Cardiothorac Surg* **28**: 677-684.
50. Mirabella, T, Cilli, M, Carlone, S, Cancedda, R, and Gentili, C (2011). Amniotic liquid derived stem cells as reservoir of secreted angiogenic factors capable of stimulating neo-arteriogenesis in an ischemic model. *Biomaterials* **32**: 3689-3699.
51. Seib, FP, Prewitz, M, Werner, C, and Bornhauser, M (2009). Matrix elasticity regulates the secretory profile of human bone marrow-derived multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs). *Biochem Biophys Res Commun* **389**: 663-667.
52. Rosova, I, Dao, M, Capoccia, B, Link, D, and Nolte, JA (2008). Hypoxic preconditioning results in increased motility and improved therapeutic potential of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* **26**: 2173-2182.
53. Hoke, NN, Salloum, FN, Kass, DA, Das, A, and Kukreja, RC (2012). Preconditioning by phosphodiesterase-5 inhibition improves therapeutic efficacy of adipose-derived stem cells following myocardial infarction in mice. *Stem Cells* **30**: 326-335.
54. Haider, KH, and Ashraf, M (2012). Preconditioning approach in stem cell therapy for the treatment of infarcted heart. *Prog Mol Biol Transl Sci* **111**: 323-356.
55. Cantinieaux, D, *et al.* (2013). Conditioned medium from bone marrow-derived mesenchymal stem cells improves recovery after spinal cord injury in rats: an original strategy to avoid cell transplantation. *PLoS One* **8**: e69515.
56. Ren, G, *et al.* (2009). Species variation in the mechanisms of mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression. *Stem Cells* **27**: 1954-1962.
57. Law, S, and Chaudhuri, S (2013). Mesenchymal stem cell and regenerative medicine: regeneration versus immunomodulatory challenges. *Am J Stem Cells* **2**: 22-38.
58. Hoogduijn, MJ, Roemeling-van Rhijn, M, Korevaar, SS, Engela, AU, Weimar, W, and Baan, CC (2011). Immunological aspects of allogeneic and autologous mesenchymal stem cell therapies. *Hum Gene Ther* **22**: 1587-1591.

59. Di Trapani, M, *et al.* (2013). Comparative Study of Immune Regulatory Properties of Stem Cells Derived from Different Tissues. *Stem Cells Dev.*
60. Moll, G, *et al.* (2011). Mesenchymal stromal cells engage complement and complement receptor bearing innate effector cells to modulate immune responses. *PLoS One* **6**: e21703.
61. Griffin, MD, Ryan, AE, Alagesan, S, Lohan, P, Treacy, O, and Ritter, T (2013). Antidonor immune responses elicited by allogeneic mesenchymal stem cells: what have we learned so far? *Immunol Cell Biol* **91**: 40-51.
62. Shi, Y, Su, J, Roberts, AI, Shou, P, Rabson, AB, and Ren, G (2012). How mesenchymal stem cells interact with tissue immune responses. *Trends Immunol* **33**: 136-143.
63. Zhang, R, *et al.* (2013). Anti-inflammatory and immunomodulatory mechanisms of mesenchymal stem cell transplantation in experimental traumatic brain injury. *J Neuroinflammation* **10**: 106.
64. Shalev, I, Selzner, N, Shyu, W, Grant, D, and Levy, G (2012). Role of regulatory T cells in the promotion of transplant tolerance. *Liver Transpl* **18**: 761-770.
65. Liu, WH, *et al.* (2013). Novel mechanism of inhibition of dendritic cells maturation by mesenchymal stem cells via interleukin-10 and the JAK1/STAT3 signaling pathway. *PLoS One* **8**: e55487.
66. Luz-Crawford, P, *et al.* (2013). Mesenchymal stem cells generate a CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cell population during the differentiation process of Th1 and Th17 cells. *Stem Cell Res Ther* **4**: 65.
67. Perico, N, *et al.* (2011). Autologous mesenchymal stromal cells and kidney transplantation: a pilot study of safety and clinical feasibility. *Clin J Am Soc Nephrol* **6**: 412-422.
68. Griffin, MD, Ritter, T, and Mahon, BP (2010). Immunological aspects of allogeneic mesenchymal stem cell therapies. *Hum Gene Ther* **21**: 1641-1655.
69. Sun, L, *et al.* (2009). Mesenchymal stem cell transplantation reverses multiorgan dysfunction in systemic lupus erythematosus mice and humans. *Stem Cells* **27**: 1421-1432.
70. Parekkadan, B, Tilles, AW, and Yarmush, ML (2008). Bone marrow-derived mesenchymal stem cells ameliorate autoimmune enteropathy independently of regulatory T cells. *Stem Cells* **26**: 1913-1919.
71. Gonzalez, MA, Gonzalez-Rey, E, Rico, L, Buscher, D, and Delgado, M (2009). Treatment of experimental arthritis by inducing immune tolerance with human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Arthritis Rheum* **60**: 1006-1019.
72. Tan, J, *et al.* (2012). Induction therapy with autologous mesenchymal stem cells in living-related kidney transplants: a randomized controlled trial. *JAMA* **307**: 1169-1177.
73. Reinders, ME, Rabelink, TJ, and de Fijter, JW (2013). The role of mesenchymal stromal cells in chronic transplant rejection after solid organ transplantation. *Curr Opin Organ Transplant* **18**: 44-50.
74. Lazennec, G, and Jorgensen, C (2008). Concise review: adult multipotent stromal cells and cancer: risk or benefit? *Stem Cells* **26**: 1387-1394.
75. Grayson, WL, Zhao, F, Bunnell, B, and Ma, T (2007). Hypoxia enhances proliferation and tissue formation of human mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* **358**: 948-953.
76. Espinoza, I, Pochampally, R, Xing, F, Watabe, K, and Miele, L (2013). Notch signaling: targeting cancer stem cells and epithelial-to-mesenchymal transition. *Oncol Targets Ther* **6**: 1249-1259.

77. Reagan, MR, and Kaplan, DL (2011). Concise review: Mesenchymal stem cell tumor-homing: detection methods in disease model systems. *Stem Cells* **29**: 920-927.
78. Collet, G, Grillon, C, Nadim, M, and Kieda, C (2013). Trojan horse at cellular level for tumor gene therapies. *Gene* **525**: 208-216.
79. Bonomi, A, *et al.* (2013). Adipose tissue-derived stromal cells primed in vitro with paclitaxel acquire anti-tumor activity. *Int J Immunopathol Pharmacol* **26**: 33-41.
80. Trounson, A (2007). A fluid means of stem cell generation. *Nat Biotechnol* **25**: 62-63.
81. De Coppi, P, *et al.* (2007). Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nat Biotechnol* **25**: 100-106.
82. Da Sacco, S, *et al.* (2010). Human amniotic fluid as a potential new source of organ specific precursor cells for future regenerative medicine applications. *J Urol* **183**: 1193-1200.
83. Moorefield, EC, *et al.* (2011). Cloned, CD117 selected human amniotic fluid stem cells are capable of modulating the immune response. *PLoS One* **6**: e26535.
84. Hauser, PV, *et al.* (2010). Stem cells derived from human amniotic fluid contribute to acute kidney injury recovery. *Am J Pathol* **177**: 2011-2021.
85. Bai, J, Wang, Y, Liu, L, Chen, J, Yang, W, and Gao, L (2012). Human amniotic fluid-derived c-kit(+) and c-kit (-) stem cells: growth characteristics and some differentiation potential capacities comparison. *Cytotechnology* **64**: 577-589.
86. Anchan, RM, *et al.* (2011). Amniocytes can serve a dual function as a source of iPS cells and feeder layers. *Hum Mol Genet* **20**: 962-974.
87. Trohatou, O, Anagnou, NP, and Roubelakis, MG (2012). Human amniotic fluid stem cells as an attractive tool for clinical applications. *Curr Stem Cell Res Ther.*
88. Teodelinda, M, Michele, C, Sebastiano, C, Ranieri, C, and Chiara, G (2011). Amniotic liquid derived stem cells as reservoir of secreted angiogenic factors capable of stimulating neo-arteriogenesis in an ischemic model. *Biomaterials* **32**: 3689-3699.
89. Perin, L, *et al.* (2010). Protective effect of human amniotic fluid stem cells in an immunodeficient mouse model of acute tubular necrosis. *PLoS One* **5**: e9357.
90. Mendelsohn, ML (1962). Chronic infusion of tritiated thymidine into mice with tumors. *Science* **135**: 213-215.
91. Clarkson, B, Fried, J, Strife, A, Sakai, Y, Ota, K, and Okita, T (1970). Studies of cellular proliferation in human leukemia. 3. Behavior of leukemic cells in three adults with acute leukemia given continuous infusions of 3H-thymidine for 8 or 10 days. *Cancer* **25**: 1237-1260.
92. Reya, T, Morrison, SJ, Clarke, MF, and Weissman, IL (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* **414**: 105-111.
93. O'Flaherty, JD, *et al.* (2012). The cancer stem-cell hypothesis: its emerging role in lung cancer biology and its relevance for future therapy. *J Thorac Oncol* **7**: 1880-1890.
94. Hope, KJ, Jin, L, and Dick, JE (2004). Acute myeloid leukemia originates from a hierarchy of leukemic stem cell classes that differ in self-renewal capacity. *Nat Immunol* **5**: 738-743.
95. Bonnet, D, and Dick, JE (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* **3**: 730-737.
96. Tu, SM, and Lin, SH (2012). Prostate cancer stem cells. *Clin Genitourin Cancer* **10**: 69-76.
97. Economopoulou, P, Kaklamani, VG, and Siziopikou, K (2012). The role of cancer stem cells in breast cancer initiation and progression: potential cancer stem cell-directed therapies. *Oncologist* **17**: 1394-1401.
98. Yi, SY, Hao, YB, Nan, KJ, and Fan, TL (2013). Cancer stem cells niche: a target for novel cancer therapeutics. *Cancer Treat Rev* **39**: 290-296.

99. Pandolfi, A, Barreyro, L, and Steidl, U (2013). Concise review: preleukemic stem cells: molecular biology and clinical implications of the precursors to leukemia stem cells. *Stem Cells Transl Med* **2**: 143-150.
100. Munoz, P, Iliou, MS, and Esteller, M (2012). Epigenetic alterations involved in cancer stem cell reprogramming. *Mol Oncol* **6**: 620-636.
101. Gentry, SN, and Jackson, TL (2013). A mathematical model of cancer stem cell driven tumor initiation: implications of niche size and loss of homeostatic regulatory mechanisms. *PLoS One* **8**: e71128.
102. Naujokat, C, and Steinhart, R (2012). Salinomycin as a drug for targeting human cancer stem cells. *J Biomed Biotechnol* **2012**: 950658.
103. de Sa Silva, F, *et al.* (2012). Toward personalized cell therapies by using stem cells: seven relevant topics for safety and success in stem cell therapy. *J Biomed Biotechnol* **2012**: 758102.
104. Chen, S, Shimoda, M, Chen, J, and Grayburn, PA (2013). Stimulation of adult resident cardiac progenitor cells by durable myocardial expression of thymosin beta 4 with ultrasound-targeted microbubble delivery. *Gene Ther* **20**: 225-233.
105. Goichberg, P, *et al.* (2011). The ephrin A1-EphA2 system promotes cardiac stem cell migration after infarction. *Circ Res* **108**: 1071-1083.
106. Dimos, JT, *et al.* (2008). Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science* **321**: 1218-1221.
107. Kinnear, C, *et al.* (2013). Modeling and rescue of the vascular phenotype of Williams-Beuren syndrome in patient induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Transl Med* **2**: 2-15.
108. Tanaka, A, *et al.* (2013). Efficient and reproducible myogenic differentiation from human iPS cells: prospects for modeling Miyoshi Myopathy in vitro. *PLoS One* **8**: e61540.
109. Medine, CN, *et al.* (2013). Developing high-fidelity hepatotoxicity models from pluripotent stem cells. *Stem Cells Transl Med* **2**: 505-509.
110. Kondo, T, *et al.* (2013). Modeling Alzheimer's disease with iPSCs reveals stress phenotypes associated with intracellular Abeta and differential drug responsiveness. *Cell Stem Cell* **12**: 487-496.
111. Sgodda, M, and Cantz, T (2013). Small but significant: inter- and inpatient variations in iPS cell-based disease modeling. *Mol Ther* **21**: 5-7.
112. Yang, SR, Rahman, I, Trosko, JE, and Kang, KS (2012). Oxidative stress-induced biomarkers for stem cell-based chemical screening. *Prev Med* **54 Suppl**: S42-49.
113. Trosko, JE, and Chang, CC (2010). Factors to consider in the use of stem cells for pharmaceutical drug development and for chemical safety assessment. *Toxicology* **270**: 18-34.
114. Sams, A, and Powers, MJ (2013). Feeder-free substrates for pluripotent stem cell culture. *Methods Mol Biol* **997**: 73-89.
115. Barkholt, L, *et al.* (2013). Risk of tumorigenicity in mesenchymal stromal cell-based therapies--bridging scientific observations and regulatory viewpoints. *Cytotherapy* **15**: 753-759.
116. Blanpain, C, Daley, GQ, Hochedlinger, K, Passegue, E, Rossant, J, and Yamanaka, S (2012). Stem cells assessed. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**: 471-476.
117. Fukushima, S, Sawa, Y, and Suzuki, K (2013). Choice of cell-delivery route for successful cell transplantation therapy for the heart. *Future Cardiol* **9**: 215-227.
118. Angelopoulou, M, *et al.* (2003). Cotransplantation of human mesenchymal stem cells enhances human myelopoiesis and megakaryocytopoiesis in NOD/SCID mice. *Exp Hematol* **31**: 413-420.

119. Daemen, JH, de Wit, RJ, Bronkhorst, MW, Yin, M, Heineman, E, and Kootstra, G (1996). Non-heart-beating donor program contributes 40% of kidneys for transplantation. *Transplant Proc* **28**: 105-106.
120. Kootstra, G, and van Heurn, E (2007). Non-heartbeating donation of kidneys for transplantation. *Nat Clin Pract Nephrol* **3**: 154-163.
121. Moers, C, Kornmann, NS, Leuvenink, HG, and Ploeg, RJ (2009). The influence of deceased donor age and old-for-old allocation on kidney transplant outcome. *Transplantation* **88**: 542-552.
122. Chavalitdhamrong, D, *et al.* (2008). Patient and graft outcomes from deceased kidney donors age 70 years and older: an analysis of the Organ Procurement Transplant Network/United Network of Organ Sharing database. *Transplantation* **85**: 1573-1579.
123. Hernandez-Alejandro, R, *et al.* (2010). Kidney and liver transplants from donors after cardiac death: initial experience at the London Health Sciences Centre. *Can J Surg* **53**: 93-102.
124. Ojo, AO (2005). Expanded criteria donors: process and outcomes. *Semin Dial* **18**: 463-468.
125. Hoogland, ER, Snoeijs, MG, and van Heurn, LW (2010). DCD kidney transplantation: results and measures to improve outcome. *Curr Opin Organ Transplant* **15**: 177-182.
126. Moers, C, *et al.* (2009). Machine perfusion or cold storage in deceased-donor kidney transplantation. *N Engl J Med* **360**: 7-19.
127. Pine, JK, *et al.* (2010). Impact of age matching of donors to recipients on renal transplant outcomes following donation after cardiac death. *Transplant Proc* **42**: 3954-3956.
128. Ledin, H, *et al.* (2010). Results of kidney transplantation from donors after cardiac death. *Transplant Proc* **42**: 2407-2414.
129. Watson, CJ, and Bradley, JA (2012). Cold storage of deceased donor kidneys: does the solution matter or is the solution elsewhere? *Am J Transplant* **12**: 806-807.
130. Bon, D, Chatauret, N, Giraud, S, Thuillier, R, Favreau, F, and Hauet, T (2012). New strategies to optimize kidney recovery and preservation in transplantation. *Nat Rev Nephrol* **8**: 339-347.
131. Thurman, JM (2007). Triggers of inflammation after renal ischemia/reperfusion. *Clin Immunol* **123**: 7-13.
132. Dragun, D, *et al.* (2000). Ischemia-reperfusion injury in renal transplantation is independent of the immunologic background. *Kidney Int* **58**: 2166-2177.
133. Perico, N, Cattaneo, D, Sayegh, MH, and Remuzzi, G (2004). Delayed graft function in kidney transplantation. *Lancet* **364**: 1814-1827.
134. Eltzhig, HK, and Eckle, T (2011). Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation. *Nat Med* **17**: 1391-1401.
135. Bonventre, JV, and Cheung, JY (1985). Effects of metabolic acidosis on viability of cells exposed to anoxia. *Am J Physiol* **249**: C149-159.
136. Allen, DG, and Xiao, XH (2003). Role of the cardiac Na⁺/H⁺ exchanger during ischemia and reperfusion. *Cardiovasc Res* **57**: 934-941.
137. Kribben, A, *et al.* (1994). Evidence for role of cytosolic free calcium in hypoxia-induced proximal tubule injury. *J Clin Invest* **93**: 1922-1929.
138. Garlicki, M, *et al.* (1999). Myocardial protection for transplantation. *Transplant Proc* **31**: 2079-2083.
139. Goll, DE, Thompson, VF, Li, H, Wei, W, and Cong, J (2003). The calpain system. *Physiol Rev* **83**: 731-801.
140. Maathuis, MH, Leuvenink, HG, and Ploeg, RJ (2007). Perspectives in organ preservation. *Transplantation* **83**: 1289-1298.

141. Macknight, AD, and Leaf, A (1977). Regulation of cellular volume. *Physiol Rev* **57**: 510-573.
142. Crompton, M (1999). The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J* **341 (Pt 2)**: 233-249.
143. Jassem, W, and Heaton, ND (2004). The role of mitochondria in ischemia/reperfusion injury in organ transplantation. *Kidney Int* **66**: 514-517.
144. Salahudeen, AK, Huang, H, Joshi, M, Moore, NA, and Jenkins, JK (2003). Involvement of the mitochondrial pathway in cold storage and rewarming-associated apoptosis of human renal proximal tubular cells. *Am J Transplant* **3**: 273-280.
145. Djamali, A (2007). Oxidative stress as a common pathway to chronic tubulointerstitial injury in kidney allografts. *Am J Physiol Renal Physiol* **293**: F445-455.
146. Li, C, and Jackson, RM (2002). Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. *Am J Physiol Cell Physiol* **282**: C227-241.
147. Basile, DP (2007). The endothelial cell in ischemic acute kidney injury: implications for acute and chronic function. *Kidney Int* **72**: 151-156.
148. Basile, DP (2004). Rarefaction of peritubular capillaries following ischemic acute renal failure: a potential factor predisposing to progressive nephropathy. *Current opinion in nephrology and hypertension* **13**: 1-7.
149. Cicco, G, Panzera, PC, Catalano, G, and Memeo, V (2005). Microcirculation and reperfusion injury in organ transplantation. *Advances in experimental medicine and biology* **566**: 363-373.
150. Jang, HR, and Rabb, H (2009). The innate immune response in ischemic acute kidney injury. *Clin Immunol* **130**: 41-50.
151. Li, L, and Okusa, MD (2010). Macrophages, dendritic cells, and kidney ischemia-reperfusion injury. *Semin Nephrol* **30**: 268-277.
152. Thuillier, R, *et al.* (2011). Improving long-term outcome in allograft transplantation: role of ionic composition and polyethylene glycol. *Transplantation* **91**: 605-614.
153. Chatauret, N, Thuillier, R, and Hauet, T (2011). Preservation strategies to reduce ischemic injury in kidney transplantation: pharmacological and genetic approaches. *Curr Opin Organ Transplant* **16**: 180-187.
154. Hauet, T, and Eugene, M (2008). A new approach in organ preservation: potential role of new polymers. *Kidney Int* **74**: 998-1003.
155. Hosgood, SA, and Nicholson, ML (2011). Normothermic kidney preservation. *Curr Opin Organ Transplant* **16**: 169-173.
156. Van Raemdonck, D, Neyrinck, A, Rega, F, Devos, T, and Pirenne, J (2013). Machine perfusion in organ transplantation: a tool for ex-vivo graft conditioning with mesenchymal stem cells? *Curr Opin Organ Transplant* **18**: 24-33.
157. Favreau, F, *et al.* (2010). Anti-thrombin therapy during warm ischemia and cold preservation prevents chronic kidney graft fibrosis in a DCD model. *Am J Transplant* **10**: 30-39.
158. Giraud, S, *et al.* (2009). Direct thrombin inhibitor prevents delayed graft function in a porcine model of renal transplantation. *Transplantation* **87**: 1636-1644.
159. Cau, J, Favreau, F, Tillement, JP, Lerman, LO, Hauet, T, and Goujon, JM (2008). Trimetazidine reduces early and long-term effects of experimental renal warm ischemia: a dose effect study. *J Vasc Surg* **47**: 852-860.
160. Thuillier, R, *et al.* (2011). Supplementation with a new therapeutic oxygen carrier reduces chronic fibrosis and organ dysfunction in kidney static preservation. *Am J Transplant* **11**: 1845-1860.
161. You, Q, *et al.* (2009). The biological characteristics of human third trimester amniotic fluid stem cells. *J Int Med Res* **37**: 105-112.

162. Mujezinovic, F, and Alfirevic, Z (2007). Procedure-related complications of amniocentesis and chorionic villous sampling: a systematic review. *Obstet Gynecol* **110**: 687-694.
163. Hristov, M, Erl, W, and Weber, PC (2003). Endothelial progenitor cells: mobilization, differentiation, and homing. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **23**: 1185-1189.
164. Rossard, L, *et al.* (2012). Evaluation of early regenerative processes in a preclinical pig model of acute kidney injury. *Curr Mol Med* **12**: 502-505.
165. Giraud, S, Favreau, F, Chatauret, N, Thuillier, R, Maiga, S, and Hauet, T (2011). Contribution of large pig for renal ischemia-reperfusion and transplantation studies: the preclinical model. *J Biomed Biotechnol* **2011**: 532127.
166. Bagetti Filho, HJ, Pereira-Sampaio, MA, Favorito, LA, and Sampaio, FJ (2008). Pig kidney: anatomical relationships between the renal venous arrangement and the kidney collecting system. *J Urol* **179**: 1627-1630.
167. Jayle, C, *et al.* (2007). Comparison of protective effects of trimetazidine against experimental warm ischemia of different durations: early and long-term effects in a pig kidney model. *Am J Physiol Renal Physiol* **292**: F1082-1093.
168. Becker, HM, Chen, M, Hay, JB, and Cybulsky, MI (2004). Tracking of leukocyte recruitment into tissues of mice by in situ labeling of blood cells with the fluorescent dye CFDA SE. *J Immunol Methods* **286**: 69-78.
169. Lin, CS, *et al.* (2012). Stem cell therapy for erectile dysfunction: a critical review. *Stem Cells Dev* **21**: 343-351.
170. Polzer, H, *et al.* (2012). Long-term detection of fluorescently labeled human mesenchymal stem cell in vitro and in vivo by semi-automated microscopy. *Tissue Eng Part C Methods* **18**: 156-165.
171. Autiero, M, *et al.* (2003). Role of PlGF in the intra- and intermolecular cross talk between the VEGF receptors Flt1 and Flk1. *Nat Med* **9**: 936-943.
172. Li, XD, Chen, J, Ruan, CC, Zhu, DL, and Gao, PJ (2012). Vascular endothelial growth factor-induced osteopontin expression mediates vascular inflammation and neointima formation via Flt-1 in adventitial fibroblasts. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **32**: 2250-2258.
173. ten Dijke, P, and Arthur, HM (2007). Extracellular control of TGFbeta signalling in vascular development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**: 857-869.
174. van Meeteren, LA, and ten Dijke, P (2012). Regulation of endothelial cell plasticity by TGF-beta. *Cell Tissue Res* **347**: 177-186.

SERMENT DE GALIEN

En présence de mes maîtres et de mes condisciples, **je jure** :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si je manque à mes engagements.

RESUME

Titre de la thèse : Médecine régénérative : utilisation potentielle des cellules souches issues du liquide amniotique en transplantation rénale

L'objectif de cette thèse est de définir deux composants de la médecine régénérative, les cellules souches d'une part et la transplantation rénale d'autre part puis de tester cette association dans un modèle animal qui soit le plus proche possible de l'Homme.

La première partie de cette thèse définit les cellules souches, les cadres réglementaires régissant leur utilisation et décrit l'exploitation potentielle de leurs propriétés en thérapeutique humaine. Les cellules souches issues du liquide amniotique (AFSC) sont des cellules souches mésenchymateuses (CSM) et sont dotées propriétés thérapeutiques potentielles remarquables. Le cadre légal des CSM est plus souple que celui des cellules souches embryonnaires, et les propriétés spécifiques des CSM, comme la sécrétion de facteurs de croissance, font que ces cellules font actuellement objet d'études cliniques et précliniques avancées.

En revanche, aucun travail expérimental n'a pour le moment visé à tester l'utilisation des AFSC dans le cadre de la transplantation rénale chez le gros animal.

Dans la deuxième partie, nous montrons que la transplantation rénale est le traitement de choix de l'insuffisance rénale chronique terminale. Néanmoins, le développement de la transplantation rénale est limité par la pénurie actuelle de greffons. Une des solutions à cette pénurie pourrait être la sélection des donneurs pour le moment écartés en raison de la mauvaise qualité de leurs greffons, comme les donneurs décédés après arrêt cardiaque. Dans ce contexte, l'utilisation des cellules souches et notamment des AFSC pourrait permettre de limiter les lésions infligées au greffon et donc d'augmenter le nombre d'organes disponibles pour la transplantation.

Il est néanmoins nécessaire d'apporter une preuve de la faisabilité de ce concept dans un modèle animal préclinique.

Dans la partie expérimentale de cette thèse, nous démontrons que les AFSC autologues ont un effet bénéfique dans un modèle porcin d'autotransplantation rénale mimant la greffe d'organes issus de donneurs décédés après arrêt cardiaque. Ces cellules augmentent la vitesse de récupération des fonctions glomérulaires et tubulaires du greffon, limitent le développement de l'inflammation et de la fibrose rénale, et semblent favoriser l'instauration d'un environnement pro angiogénique au sein de l'organe. Le modèle animal mis au point dans cette étude est doté d'une forte valeur translationnelle, et peut servir à l'évaluation de l'utilisation d'autres cellules souches dans le cadre de la transplantation rénale.

Mots clefs : Cellules souches, transplantation rénale, modèle préclinique, médecine régénérative