

Thérapie cellulaire des lésions radio-induites

Cellules souches mésenchymateuses et cellules MUSE

Résumé À ce jour, les conséquences d'une irradiation des tissus sains, qu'elle soit accidentelle ou malveillante, sont nombreuses et complexes, et posent un problème majeur pour la prise en charge des patients surexposés. Le progrès de la thérapie cellulaire a ouvert de nouvelles opportunités pour favoriser la réparation des lésions radio-induites sévères, en particulier *via* l'utilisation des cellules souches mésenchymateuses dérivées du tissu adipeux et de leur sous-population, dont les cellules MUSE. Devant plusieurs paramètres limitants d'utilisation des cellules souches mésenchymateuses, de nouvelles stratégies innovantes, telles que la thérapie acellulaire, sont actuellement à l'étude.

Mots-clés Médecine régénérative, irradiation, inflammation, thérapie cellulaire, microvésicules.

Abstract Cell therapy of radiation-induced lesions: mesenchymal stem cells and MUSE cells

Nowadays, the consequences of healthy tissue irradiation, accidental or malicious, are numerous and complex, leading to a major problem in the care of overexposed patients. The progresses of cell therapy opening news fields of research to promote repair of severe radiation-induced lesions, *via* the use of mesenchymal stem cells derived from adipose tissue and MUSE cells, are promising. Due to the many limiting parameters associated with the use of mesenchymal stem cells, new innovative strategies such as acellular therapy are also investigated.

Keywords Regenerative medicine, radiation, inflammation, cell therapy, microvesicles.

Les lésions radio-induites, des pathologies bien spécifiques

Les contextes d'irradiation accidentelle ou malveillante à fortes doses sont multiples. Il peut s'agir d'actes terroristes tels qu'une source scellée de forte activité dans une zone à grande densité de population, d'accidents de surexposition en radiothérapie ou dans le domaine industriel (Sénégal 2006, Tokai-Mura au Japon 1999). Les irradiations à forte dose sont à l'origine du syndrome aigu d'irradiation (SAI) touchant principalement les tissus hématologiques, neurovasculaires et gastro-intestinaux, ainsi que le tissu cutané-musculaire. La rapidité d'apparition des premiers symptômes dépend de la vitesse de renouvellement tissulaire et de la radiosensibilité des cellules souches et progénitrices du tissu irradié. D'autres tissus, tels que les poumons, peuvent aussi être impactés directement ou indirectement [1].

Il n'existe pas à ce jour de traitement unique et standard du syndrome aigu d'irradiation. La prise en charge médicale, le plus souvent symptomatique, est réalisée organe par organe, chez des patients dont le système immunitaire est appauvri par la destruction radio-induite des cellules hématopoïétiques* entraînant un fort risque infectieux et hémorragique. L'émergence de l'utilisation des cellules souches en médecine régénérative a ouvert de nouvelles opportunités dans le traitement des lésions radio-induites sévères, dont les atteintes cutané-musculaires et la fibrose.

L'atteinte cutané-musculaire, appelée syndrome cutané-musculaire radio-induit (SCR), ne présente pas de signes pathognomoniques* mais une évolution clinique spécifique. Ce syndrome débute par un érythème suivi d'une phase de latence d'autant plus courte que la dose est importante. Une desquamation sèche puis humide est ensuite observée, évoluant vers la fibrose pour les doses supérieures à 15 Gy et la nécrose pour les doses supérieures à 25 Gy. Dans les deux cas, ces lésions aboutissent à une importante perte de substance

tissulaire invalidante. Ces symptômes cliniques sont associés à des vagues inflammatoires extensives, imprévisibles, conditionnant la majeure partie des mécanismes physiopathologiques du SCR [2]. Jusqu'en 2000, le SCR n'avait pas de traitement spécifique. L'association de greffes de cellules souches mésenchymateuses* de la moelle osseuse (CSM-MO) à une chirurgie d'exérèse* guidée par dosimétrie et à des greffes de peau autologues* ont permis d'éviter les chirurgies de démembrement, tout en réduisant la douleur [1]. Depuis 2009, la prise en charge du SCR par ce protocole est le traitement de référence pour l'Agence internationale de l'énergie atomique (IAEA)⁽¹⁾. Malgré ce traitement, une impotence fonctionnelle persiste, nécessitant une optimisation du traitement. En dépit de l'amélioration des conditions de délivrance de la radiothérapie pour réduire les dommages aux tissus sains, le thorax, qui se trouve inclus dans le champ d'irradiation de nombreuses tumeurs solides, peut être irradié. Cette irradiation peut entraîner une toxicité au niveau du tissu pulmonaire et le développement d'une fibrose radio-induite irréversible, celle-ci pouvant être décomposée en quatre grandes phases : des lésions vasculaires et épithéliales ; une infiltration de cellules inflammatoires et une sécrétion de cytokines inflammatoires ; une prolifération et activation de fibroblastes en myofibroblastes* ; et un remodelage du tissu avec un excès de dépôt de composants de la matrice extracellulaire [3]. Ce défaut de restructuration tissulaire entraîne une perte de fonctionnalité des poumons. Cette pathologie secondaire liée aux irradiations diminue la qualité de vie des patients et, selon la gravité lésionnelle, peut entraîner la mort du patient. À ce jour, les options thérapeutiques restent limitées.

Thérapies cellulaires

Les cellules souches dérivées du tissu adipeux

Les cellules souches mésenchymateuses (CSM) présentes dans de nombreux tissus, principalement dans la moelle

Glossaire

Les termes suivis par un astérisque* dans le texte sont définis ci-dessous.

Caryotype (ou caryogramme) : arrangement standard de l'ensemble des chromosomes d'une cellule.

Cellules somatiques : cellules adultes représentant la totalité des cellules de l'organisme à l'exception des cellules germinales.

Cellules souches mésenchymateuses (CSM) : cellules adultes capables d'auto-renouvellement et de se différencier en de nombreux types cellulaires.

Cellules souches hématopoïétiques : cellules à l'origine des différentes cellules sanguines.

CSPI : cellules souches pluripotentes induites par l'homme.

Exérèse : opération chirurgicale consistant à retirer de l'organisme un élément malade, nuisible ou inutile.

Glomérule rénal : structure la plus proximale du néphron ; il permet la filtration sanguine et la formation d'urine primitive.

Grefe autologue (ou autogrefe) : greffe d'un tissu ou de cellules provenant de son organisme à soi et administrés à soi.

Grefe xénogénique : greffe entre individus d'espèces différentes (entraînant un rejet immunologique).

IL : interleukine.

Immunogène : qui induit une réaction immunitaire.

Immuno-modulateur : qui modifie le déroulement des réactions immunitaires.

MO : moelle osseuse.

MUSE : « multilineage differentiating stress enduring ».

Myofibroblastes : cellules impliquées dans la réparation tissulaire.

Pluripotence : faculté de certaines cellules à se différencier.

SAI : syndrome aigu d'irradiation.

SCR : syndrome cutané-musculaire radio-induit.

Sécrétome : ensemble des molécules sécrétées par une cellule, un tissu ou un organisme.

Signe pathognomonique : qui caractérise spécifiquement une maladie, permettant le diagnostic certain.

SSEA-3 : « stage specific embryonic antigen-3 », marqueur de surface des cellules embryonnaires humaines.

TA : tissu adipeux.

Télomérase : enzyme contrôlant la longueur des chromosomes.

osseuse (MO) et le tissu adipeux (TA), sont décrites pour être faiblement immunogènes*, immuno-modulatrices*, pouvant se différencier en ostéocytes, chondrocytes et adipocytes (respectivement, cellules de l'os, du cartilage et de la graisse) et migrer au site de lésions. Leur action dans la réparation tissulaire semble impliquer leur potentiel de sécrétion plutôt que leur potentiel de différenciation *in situ*. Le sécrétome* des CSM dépend de leur environnement et peut avoir divers effets dans le processus de réparation tissulaire en favorisant la formation de vaisseaux (angiogenèse), la stimulation des progéniteurs et leur différenciation. Le tissu adipeux est la source la plus accessible et abondante de CSM (CSM-TA), décrites pour avoir des capacités régénératives équivalentes aux CSM isolées de la moelle osseuse (CSM-MO) et un potentiel pro-angiogénique plus important [4].

Des travaux précliniques utilisant des injections locales de CSM-TA dans le cadre du SCR ont révélé leur potentiel régénératif *via* l'accélération de la cicatrisation sans développement de nécrose. Les CSM-TA semblent agir sur trois processus clés pour favoriser la réparation tissulaire post-irradiation : la réépithélialisation (régénération de l'épiderme), la revascularisation et la réponse inflammatoire [2-4].

• Les CSM-TA potentialisent la réépithélialisation après irradiation

La réépithélialisation de la lésion cutanée est associée à une colonisation du tissu de granulation par différentes cellules dont les fibroblastes et les macrophages et à une différenciation des kératinocytes. La reconstitution d'un épithélium stratifié nécessite une prolifération cellulaire des kératinocytes et des fibroblastes, lesquelles sont stimulées par la sécrétion de facteurs de croissance EGF (« endothelial growth factor »), FGF (« fibroblast growth factor »), KGF (« keratinocyte growth factor ») et IGF1 (« insulin-like growth factor 1 ») [5]. Les CSM-TA favorisent la réépithélialisation et la formation d'un épiderme stratifié fonctionnel dans un modèle de SCR ; cette action semble liée à la sécrétion des facteurs décrits ci-dessus par les CSM-TA injectées [2-4] (figure 1).

• Les CSM-TA favorisent l'angiogenèse

Dans la cinétique de réparation tissulaire, à l'issue de la phase inflammatoire, un processus de néovascularisation s'établit par stimulation de l'angiogenèse. La formation de nouveaux vaisseaux fonctionnels est activée par de nombreux facteurs de croissance sécrétés par les cellules endothéliales lésées et les macrophages, dont EGF, FGF, VEGF (« vascular endothelial growth factor »), ANG1 (« angiopoietine 1 ») et TGF- β (« tumor growth factor β »). Ces molécules ont pour fonction de favoriser la migration, la prolifération et la différenciation des cellules endothéliales. Elles sont contenues dans le sécrétome des CSM-TA et leur confèrent un potentiel pro-angiogénique, démontré dans le SCR où les injections locales de CSM-TA favorisent une revascularisation du derme [2] (figure 1).

• Les CSM-TA interviennent dans la polarisation de l'inflammation

La réponse inflammatoire est un processus biologique qui va orienter l'évolution d'une lésion vers la cicatrisation ou la fibrose. Une réponse pro-inflammatoire initiale dite de type M1 est nécessaire pour permettre le recrutement des cellules inflammatoires circulantes au site lésé, l'activation des cellules impliquées dans la réparation et le remodelage tissulaire avec la production de matrice extracellulaire. Elle se caractérise par la présence de macrophages M1 (CD68⁺/CD80⁺) et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que IL*-1 ou IL-6. Une réorientation de la réponse inflammatoire vers une réponse anti-inflammatoire dite de type M2 associée à la présence de macrophages M2 (CD68⁺/CD206⁺) permet la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires (IL-10, TGF- β) et l'activation de l'apoptose des myofibroblastes, nécessaire pour l'obtention d'une réparation complète [5]. Lors de réparations pathologiques, cette réorientation inflammatoire n'a pas lieu. La persistance de la réponse pro-inflammatoire M1 est associée à un excès de myofibroblastes, aboutissant au développement d'une fibrose tissulaire. Récemment, les CSM-TA ont été décrites pour favoriser la réorientation de la réponse inflammatoire M1 vers M2. Dans le muscle d'un modèle porcin de SCR traité par injections locales de CSM-TA, le développement de la fibrose est limité, les CSM-TA permettant ainsi d'orienter précocement le processus de réparation tissulaire [6] (figure 2).

Les propriétés sécrétoires des CSM-TA en font un bon candidat pour mettre en place une nouvelle stratégie thérapeutique du SCR. Au cours d'études précliniques, plusieurs injections locales de CSM-TA ont été effectuées dans et autour de la zone irradiée, avant l'apparition des symptômes cliniques cutanés. Par ailleurs, les nouveaux travaux sur la

**Tissu cutané irradié traité
par CSM-TA (J120)**

**Tissu cutané irradié non traité
(J120)**

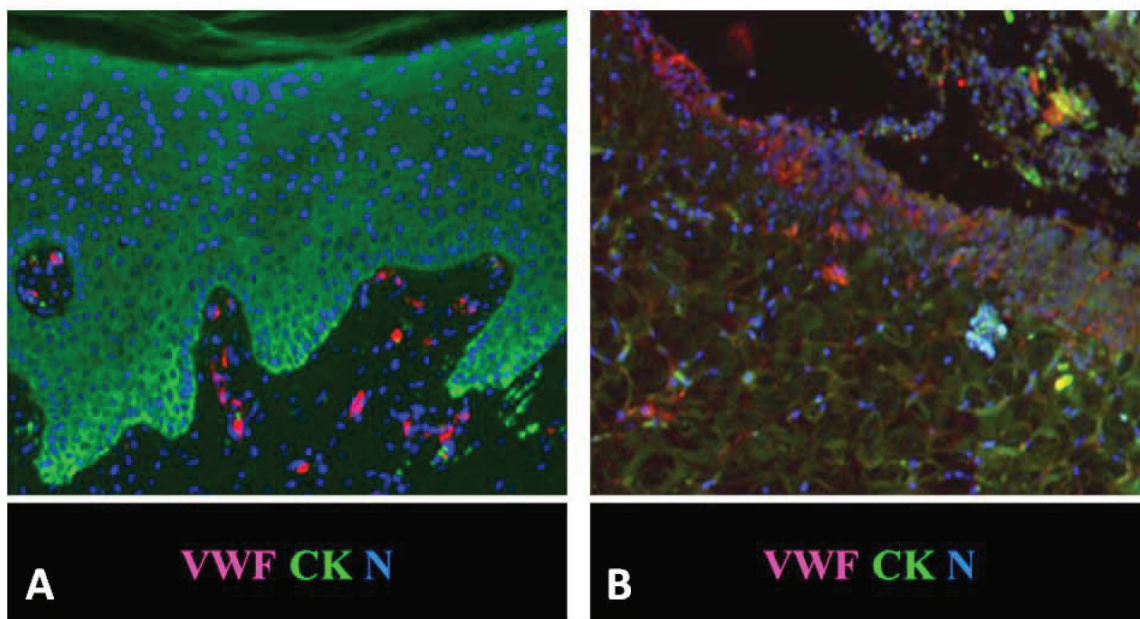


Figure 1 - **Les injections locales de CSM-TA favorisent la réparation cutanée dans un modèle préclinique** [9]. A) Le tissu irradié traité par CSM-TA présente une revascularisation, une réépithélialisation avec prolifération kératinocytaire et une organisation stratifiée des couches de l'épiderme 120 jours après irradiation. B) Le tissu cutané irradié non traité révèle une absence de ré-épithélialisation et une désorganisation totale du derme et de l'épiderme 120 jours après irradiation.

VWF : facteur de von Willebrandt, marqueur de la revascularisation (rose) ; N : noyaux cellulaires (bleu) ; CK : cytokératine, marqueur des kératinocytes (réépithélialisation) (vert) ; J : jours post-injections locales de CSM-TA ; CSM-TA : cellules souches mésenchymateuses isolées du tissu adipeux.

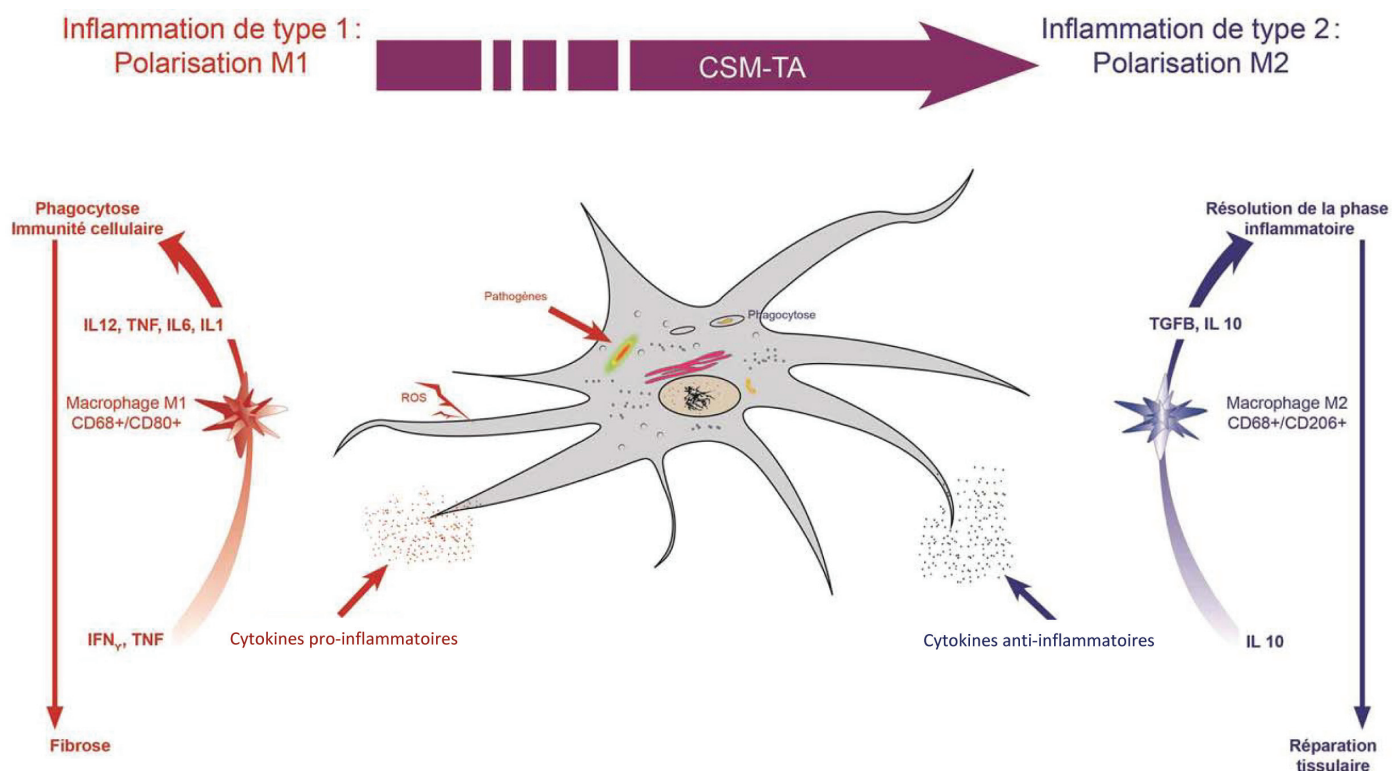


Figure 2 - **Rôle de la réponse inflammatoire dans la réparation tissulaire et impact immuno-modulateur des CSM-TA.** La polarisation M1 est une réponse immunitaire pro-inflammatoire nécessaire à l'initiation des mécanismes de cicatrisation tissulaire. Dans la réparation normale, une réorientation immunitaire de type M2, anti-inflammatoire, active ensuite les mécanismes cellulaires permettant une cicatrisation complète. En cas d'inflammation pathologique, cette réorientation n'a pas lieu, aboutissant à la persistance de la polarisation M1 et au développement d'une fibrose. Les injections de CSM-TA permettent de réorienter la réponse inflammatoire vers une polarisation M2 et une réparation tissulaire (graphisme : David Blois, IRBA).

IL : interleukine ; TNF : « tumor necrotic factor » ; IFN γ : interféron γ ; ROS : espèces réactives de l'oxygène ; TGF- β : « tumor growth factor β » ; CSM-TA : cellules souches mésenchymateuses isolées du tissu adipeux.

cryopréservation de ces cellules permettent d'envisager leur stockage et leur utilisation après congélation.

Les cellules MUSE

En 2010, une sous-population de cellules souches mésenchymateuses a été décrite et appelée « multilineage differentiating stress enduring (MUSE) cells ». Les cellules MUSE sont obtenues à partir de tissus mésenchymateux ou de cellules mésenchymateuses en culture, le tissu adipeux étant le plus riche en cellules MUSE (250 000 cellules par gramme de tissu chez l'homme). Ces cellules sont caractérisées principalement par l'expression des marqueurs de surface SSEA-3* (marqueur de surface des cellules embryonnaires humaines), CD105 (marqueur des cellules mésenchymateuses) et l'expression de marqueurs de pluripotence* tels que Oct3/4, Sox2 et Nanog. La combinaison des marqueurs membranaires CD45, SSEA-3 et CD105 permet d'isoler les cellules MUSE (CD45⁻SSEA-3⁺CD105⁺) de façon homogène par tri cellulaire et de les différencier des CSM SSEA-3⁻CD105⁺CD45⁻. *In vitro*, ces cellules ont la capacité d'auto-renouvellement pendant de nombreux passages et peuvent aussi, à l'échelon unicellulaire, se différencier en cellules issues des trois feuilletts embryonnaires (endoderme, ectoderme et mésoderme) [7] (figure 3).

In vivo, ces cellules ne sont pas tumorigènes, contrairement aux cellules souches embryonnaires ou aux cellules souches pluripotentes. Elles présentent une stabilité génétique avec un caryotype* stable avec peu de modifications épigénétiques et une faible activité télomérase*. Les cellules MUSE

ne sont pas rejetées, même en greffe xénogénique*, ce qui renforce leur qualité en tant que greffons. Comme les CSM, les cellules MUSE ont des propriétés immuno-modulatrices associées à une forte expression du TGF-β. Injectées par voie intraveineuse, ces cellules sont capables de migrer vers les tissus endommagés, d'y amener leur fonction immuno-modulatrice et de se différencier sans fusion cellulaire, pour remplacer les cellules endommagées, comme décrit dans les atteintes hépatiques (fibrose ou hépatite aiguë). Fonctionnellement, l'injection de cellules MUSE diminue la fibrose hépatique et rétablit les fonctions hépatiques telles que la production d'albumine [8]. Dans un modèle d'atteinte rénale par sclérose glomérulaire segmentaire, l'injection intraveineuse de cellules MUSE montre une intégration préférentielle de ces cellules dans le glomérule rénal* lésé et une récupération de la fonction rénale. Ces effets sont spécifiques des cellules MUSE du fait que l'injection de cellules non-MUSE (SSEA-3⁻) n'a aucun effet sur cette pathologie.

La présence de cellules MUSE dans le sang périphérique de patients ayant eu un accident vasculaire cérébral a suscité leur utilisation dans des modèles précliniques de pathologies neurologiques. Il a été observé que les cellules MUSE injectées ont intégré les zones lésées avec une capacité à se différencier en neurones. Cette différenciation s'est accompagnée d'une récupération partielle du traumatisme neurologique.

Enfin, la reconstruction dermique, suite à des accidents ou des brûlures, reste un problème majeur de santé publique.

Auto-renouvellement et expression de marqueurs similaires aux CSPi

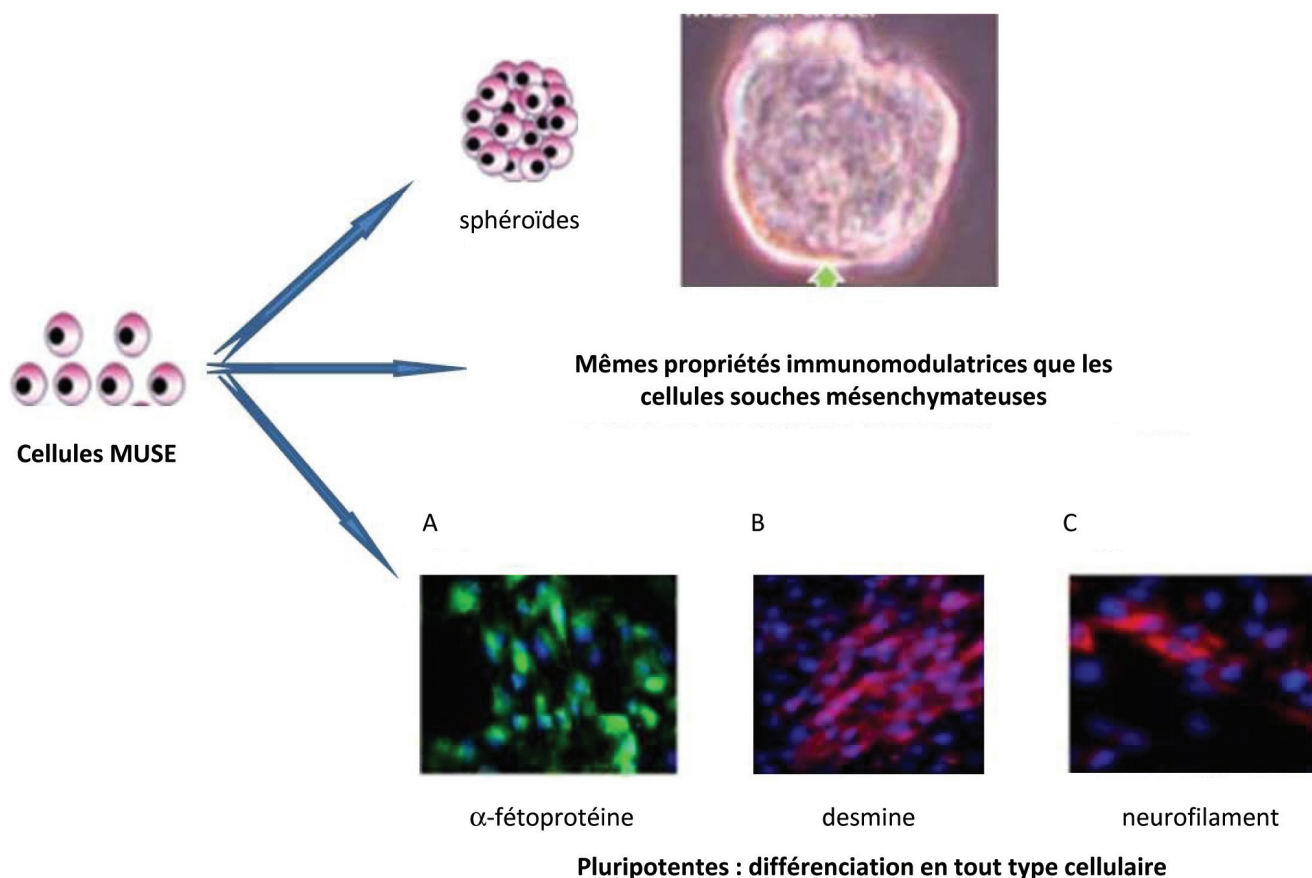


Figure 3 - Propriétés biologiques des cellules MUSE. Elles se caractérisent par des marqueurs de surface des cellules souches pluripotentes induites (CSPi), des propriétés d'auto-renouvellement, d'immuno-modulation et de pluripotence.

A) Immuno-marquage de l'α-fétoprotéine en vert (spécifique des hépatocytes) ; B) Immuno-marquage de la desmine en rouge (spécifique des muscles squelettiques) ; C) Immuno-marquage des neurofilaments en rouge (spécifiques des cellules nerveuses). Noyaux cellulaires en bleu.

L'utilisation des cellules MUSE pour cette régénération a récemment montré qu'elles pouvaient se différencier en fibroblastes puis en kératinocytes et participer à la reconstitution d'une peau lésée [8].

Le grand intérêt des cellules MUSE lors de perte de fonctions d'un tissu réside donc dans leur tolérance immunitaire, dans leur capacité d'immuno-modulation, dans leur capacité de migration sans être complètement piégées par le poumon comme c'est le cas pour les CSM, et surtout dans leur capacité d'intégration tissulaire à long terme et de différenciation dans les sites inflammatoires ou les tissus lésés. Ces cellules présentent donc des propriétés prometteuses pour être exploitées dans la prise en charge de lésions radio-induites. Malgré le haut potentiel d'utilisation des cellules MUSE en médecine régénérative, l'obtention d'une quantité suffisante pour un greffon humain reste cependant limitante à ce jour. De ce fait, la caractérisation de leur sécrétome dans les processus d'apoptose et d'immuno-modulation est en cours d'investigation.

Optimisation des traitements actuels et nouvelles pistes thérapeutiques

Outre la réglementation et le coût financier, de nombreux points limitants persistent actuellement dans le domaine de la thérapie cellulaire et son application à l'homme reste restreinte aux essais cliniques ou aux traitements compassionnels. En thérapie cellulaire, deux types de greffes existent : les greffes autologues (ou autogreffes) qui correspondent à l'injection de cellules prélevées sur le patient lui-même, et les greffes allogéniques (allogreffes) composées de cellules provenant d'un donneur. Bien que les CSM soient très peu immunogènes, le rejet de greffe et leur perte d'efficacité dans un cadre allogénique reste une limitation majeure à leur utilisation et, actuellement, seules les autogreffes ont une efficacité prouvée – quarante et un essais cliniques (dont huit sont terminés) référencés utilisant les CSM-TA allogéniques, dans des pathologies allant de l'arthrose aux fistules digestives, aux pathologies cardiaques et à la réaction du greffon contre l'hôte. Des travaux précliniques ont montré que l'utilisation de CSM autologues avait un effet supérieur à celle de cellules allogéniques, par exemple dans le traitement de brûlures thermiques ou radiologiques [2].

La capacité à générer des cellules souches pluripotentes induites par l'homme (CSPi) à partir de cellules somatiques* représente une formidable opportunité pour la médecine régénérative et son utilisation dans le traitement par autogreffe. De nombreuses recherches sont menées sur les méthodes de reprogrammation telles que la détermination de la source de cellules somatiques optimale, la combinaison de facteurs inducteurs, la méthode utilisée pour l'expression des facteurs de reprogrammation, et les conditions de culture [9]. Cependant, le risque de formation de tumeur est un frein majeur au traitement par greffe de cellules dérivées de CSPi. À ce jour, les préoccupations éthiques, la manipulation des cellules souches et les conditions de stockage optimales pour maintenir la viabilité et la fonctionnalité de ces cellules restent des problèmes non résolus.

Il est donc nécessaire de développer de nouvelles stratégies pour surmonter les inconvénients de la thérapie par transplantation cellulaire. Récemment, les effets des vésicules extracellulaires présentes dans le sécrétome des CSM ont été caractérisés. Ces vésicules impliquées dans la communication intercellulaire peuvent agir sur les processus de cicatrisation et régénération tissulaire. Elles contiennent des molécules bioactives (cytokines, facteurs de croissance, lipides de signalisation, des ARNm et des miARN régulateurs) et sont capables de transférer leur contenu à une cellule cible, faisant d'elles un outil précieux pour une médecine régénérative acellulaire [10]. La production de vésicules extracellulaires de cellules souches mésenchymateuses pourrait ainsi fournir un nouveau paradigme thérapeutique pour les thérapies sans cellules, sans risque tumorigène ni rejet.

(1) www-pub.iaea.org/MTCD/publications/PDF/EPR-Biodosimetry%202011_web.pdf

[1] Dörr H., Meineke V., Acute radiation syndrome caused by accidental radiation exposure: therapeutic principles, *BMC Med.*, **2011**, 9, p. 126.

[2] Forcheron F., Agay D., Scherthan H., Riccobono D., Herodin F., Meineke V., Drouet M., Autologous adipocyte derived stem cells favour healing in a minipig model of cutaneous radiation syndrome, *PLoS One*, **2012**, 7(2):e31694.

[3] Simone C.B., Thoracic radiation normal tissue injury, *Semin. Radiat. Oncol.*, **2017**, 27, p. 370.

[4] Riccobono D., François S., Valente M., Forcheron F., Drouet M., Advances in stem cell therapy: specific applications in the treatment of cutaneous radiation syndrome, *J. Stem Cell Res. Ther.*, **2014**, 4:186, doi: 10.4172/2157-7633.1000186.

[5] Hesketh M., Sahin K.B., West Z.E., Murray R.Z., Macrophage phenotypes regulate scar formation and chronic wound healing, *Int. J. Mol. Sci.*, **2017**, 18(7), p. E1545.

[6] Riccobono D., Nikovics K., François S., Favier A.L., Jullien N., Schrock G., Scherthan H., Drouet M., First insights into the M2 inflammatory response after adipose-tissue-derived stem cell injections in radiation-injured muscles, *Health Phys.*, **2018**, 115, p. 37.

[7] Ogura F. et al., Human adipose tissue possesses a unique population of pluripotent stem cells with nontumorigenic and low telomerase activities: potential implications in regenerative medicine, *Stem Cells Dev.*, **2014**, 23, p. 717.

[8] Fisch S.C. et al., Pluripotent nontumorigenic multilineage differentiating stress enduring cells (Muse cells): a seven-year retrospective, *Stem Cell Res. Ther.*, **2017**, 8, p. 227.

[9] Brouwer M., Zhou H., Nadif Kasri N., Choices for induction of pluripotency: recent developments in human induced pluripotent stem cell reprogramming strategies, *Stem Cell Rev.*, **2016**, 12, p. 54.

[10] Phinney D.G., Pittenger M.F., Concise review: MSC-derived exosomes for cell-free therapy, *Stem Cells*, **2017**, 35, p. 851.

Sabine FRANÇOIS et **Sophie CAVALLERO**, chercheuses (PhD), Institut de Recherche Biomédicale des Armées (IRBA), Brétigny-sur-Orge.

Paul Henri ROMEO, responsable du Laboratoire de recherche sur la réparation et la transcription dans les cellules souches hématopoïétiques, Institut de Biologie François Jacob-CEA, Fontenay-aux-Roses.

Michel DROUET et **Diane RICCOBONO***, médecins-chercheurs (MD, PhD), IRBA, Brétigny-sur-Orge.

* diane.riccobono@def.gouv.fr