

APPLICATION DE LA THÉRAPIE PAR EXPANSION EX VIVO DES CELLULES HÉMATOPOÏÉTIQUES A UN MODELE D'IRRADIATION ACCIDENTELLE.

Jean Marc Bertho, Alain Chapel, Marie Prat, Johanna Frick, Christelle Demarquay, Nicolas Dudoignon, Dominique Thierry.

Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire, Laboratoire de Recherches sur les Thérapie de l'Irradiation, B.P. n° 17, 92262 Fontenay aux roses cedex, France.

Le traitement de l'aplasie médullaire induite par une irradiation accidentelle reste difficile, notamment à cause de l'hétérogénéité de cette irradiation (1). Il en résulte qu'il reste toujours un territoire médullaire partiellement fonctionnel, à partir duquel une reconstitution de la moelle osseuse peut avoir lieu. Cette hétérogénéité implique que les greffes de cellules souches hématopoïétiques (CSH) allogéniques soient à l'heure actuelle peu recommandées du fait des risques de rejet de greffe (2). Malgré la stimulation de la moelle osseuse par injection de cytokines, il existe toujours une période d'aplasie de profondeur et de durée variable, qui met en jeu la vie de la victime d'irradiation accidentelle.

Nous avons montré récemment que la thérapie cellulaire par expansion *ex vivo* permet de traiter efficacement une aplasie radio-induite (3). Le principe de cette thérapie est de prélever de la moelle osseuse pour l'amplifier *in vitro* en présence de cytokines à fortes concentrations, avant de la réinjecter 24 heures après irradiation. Nous proposons d'appliquer ce principe de thérapie cellulaire au traitement des victimes d'irradiation accidentelle, en s'appuyant sur l'hétérogénéité de l'irradiation. De fait, il est théoriquement possible de recueillir des cellules hématopoïétiques après irradiation, de les expandre *in vitro* puis et de les réinjecter au patient. Cette approche présente plusieurs avantages, parmi lesquels le contexte autologue dans lequel se fait le traitement permet d'éviter le rejet de greffe ou la réaction du greffon contre l'hôte.

Afin de vérifier la possibilité d'appliquer cette thérapie au traitement d'une victime d'irradiation accidentelle, nous avons développé un modèle de primate non humain (*Macaca fascicularis*) irradié de façon hétérogène. Nous avons tout d'abord déterminé la capacité des cellules hématopoïétiques à proliférer et se différencier après irradiation *in vitro*. Les résultats ont montré qu'il est possible d'amplifier des cellules mononucléées (CMN) de moelle osseuse après une irradiation de 1 Gy sans différence significative avec des CMN non irradiées (Figure 1A). En particulier, les facteurs d'amplification des progéniteurs granulomonocytaires et érythrocytaires (Figure 1B), mais aussi des cellules hématopoïétiques immatures CD34⁺CD11b⁻ ne sont pas significativement différents après irradiation à 0.5 et 1 Gy par comparaison avec les cultures non irradiées. De plus nos résultats indiquent qu'une

expansion significative des CMN et des progéniteurs peut être obtenue après irradiation aux doses de 2 et 4 Gy.

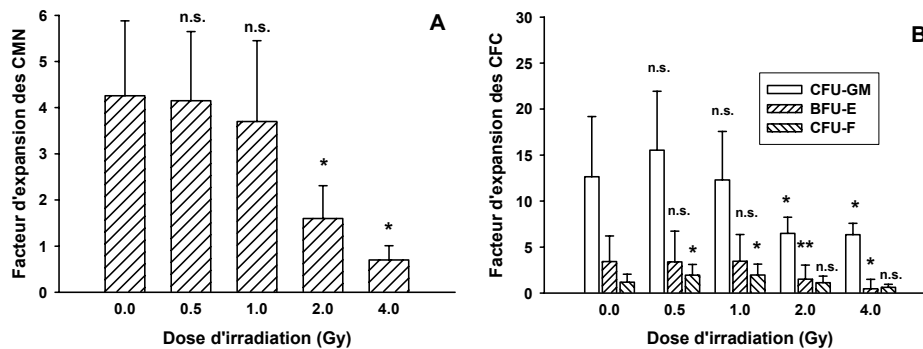


Figure 1 : Facteurs d'expansion des cellules mononucléées de moelle osseuse (A) et des progéniteurs (B) après expansion de cellules de moelle osseuse irradiées *in vitro*. Les différences, calculées par rapport aux cultures non irradiées (0 Gy) sont : ns : non significatives ; * : significatives pour $p < 0.05$; ** : significatives pour $p < 0.001$.

Cependant, ces expériences réalisées *in vitro* ne constituent qu'un reflet partiel de ce qui se passe *in vivo* lorsqu'un animal est irradié, ne serait-ce que pour des raisons environnementales. Il faut en effet tenir compte du rôle régulateur du microenvironnement médullaire sur l'hématopoïèse, mais également de l'influence de l'inflammation radio-induite sur l'hématopoïèse. Nous avons donc irradié des primates non-humain de façon hétérogène comme modèle d'une irradiation accidentelle. Les animaux ont reçu une dose de 8 ou 9 Gy au corps entier, sauf à un bras qui a été irradié à 2 ou 6 Gy (Animaux « 8/2 Gy », $n=6$ et « 9/6 Gy », $n=3$). Trois groupes ont été constitués, avec un groupe non traité (1 animal), un groupe traité par injection de CSH recueillies avant irradiation et mises en expansion pendant 7 jours (3 animaux) et un groupe traité par injection de CSH recueillies après irradiation et mises en expansion pendant 7 jours (5 animaux). Pour les deux derniers groupes, le produit d'expansion de 5×10^7 CMN par kg de poids corporel a été réinjecté au 7^{ème} jour après irradiation. Les animaux ont été suivis quotidiennement pour la numération-formule sanguine et pour différents paramètres biochimiques comme le Flt-3 ligand. Les résultats montrent tout d'abord qu'il est possible de recueillir après irradiation des cellules hématopoïétiques viables et d'amplifier ces cellules avec une bonne efficacité. D'autre part, nous montrons que la greffe du produit d'expansion 7 jours après irradiation n'induit qu'une modification mineure de l'efficacité thérapeutique des cellules injectées par comparaison avec des contrôles historiques lorsque les cellules sont prélevées avant irradiation (3). Enfin, nous montrons que la réinjection des cellules produites par expansion *ex vivo* à partir d'une prélèvement de moelle osseuse fait après irradiation permet de diminuer la profondeur et la

durée de l'aplasie radio-induite, dans des proportions directement corrélées avec la dose d'irradiation reçue par le territoire médullaire dans lequel ont été prélevées les cellules (Figure 2).

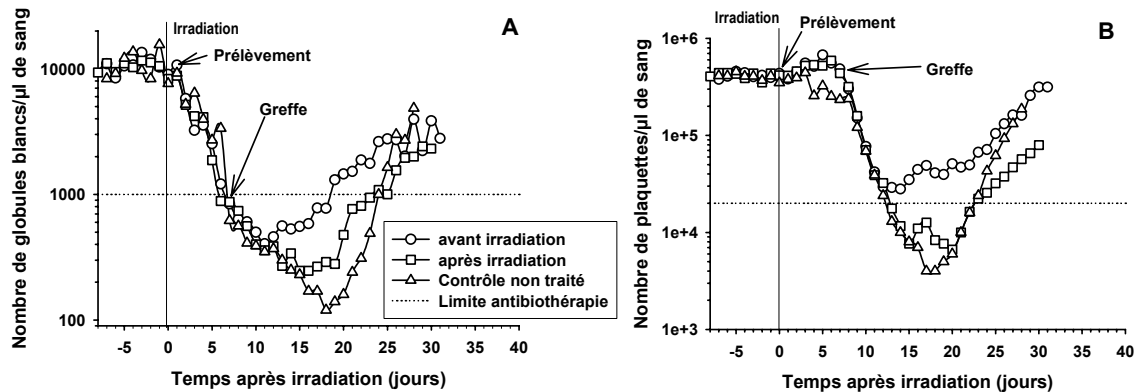


Figure 2 : Suivi du nombre de globules blancs (A) et du nombre de plaquettes (B) chez les animaux irradiés en configuration « 8/2 Gy » et traités par expansion de cellules hématopoïétiques prélevées avant irradiation (cercles, n=2), après irradiation (carrés, n=3) ou non traités (triangles, n=1).

Dans la configuration d'irradiation « 8/2 Gy », la comparaison des animaux traités par expansion après irradiation avec l'animal irradié non traité montre une différence essentiellement sur la profondeur de l'aplasie (Figure 2). Dans la configuration « 9/6 Gy » aussi bien que dans la configuration « 8/2 Gy », nous avons pu montrer, notamment par le suivi du Flt-3 ligand (4), que la réinjection du produit d'expansion permet de traiter au moins partiellement l'aplasie médullaire, puisqu'une forte réduction de la concentration plasmatique de Flt-3 ligand apparaît après la réinjection du produit d'expansion. Dans tous les cas, l'apport de cellules fonctionnelles aux animaux irradiés permet de retarder voire de supprimer l'apparition d'une atteinte digestive tardive sévère, qui se manifeste par un arrêt du transit intestinal et des intussusceptions. Ces résultats démontrent à l'évidence qu'une thérapie par expansion de CSH recueillies après irradiation est faisable et efficace dans une certaine limite de dose d'irradiation. Si la dose d'irradiation au corps entier est trop élevée, alors la réinjection de CSH mises en expansion *ex vivo* permet au mieux de retarder la survenue d'autres pathologies, en particulier gastro-intestinales. L'approche de thérapie cellulaire pour compenser les déficits radio-induits apparaît donc prometteuse, et pourrait être appliquée à d'autres types cellulaires comme les cellules souches mésenchymateuses (5) ou les cellules souches de l'adulte. Un traitement combiné par expansion *ex vivo* des cellules hématopoïétiques avec d'autres approches thérapeutiques devrait permettre à terme de traiter le syndrome multi-organe radio-induit de façon efficace.

Références

- 1- D. Thierry et coll., *Int. J. Radiat. Biol*, 67 :103-117.
- 2- M.R. Bishop, *Stem Cells*, 15(sup2):305-310.
- 3- J.M. Bertho et coll, *J. Hematother and Stem Cell Research*, 11 :549-564, 2002.
- 4- J.M. Bertho et coll, *Int. J. Radiat. Biol*, 77 :703-712, 2001.
- 5- L. Fouillard et coll., *Leukemia*, 17 :474-476, 2003.