

CELLULES SOUCHES ET MÉDECINE RÉGÉNÉRATIVE, APPLICATION EN RADIOBIOLOGIE

STEM CELLS AND REGENERATIVE MEDICINE, APPLICATION IN RADIOBIOLOGY

Par Alain CHAPEL⁽¹⁾
(mémoire présenté le 21 février 2008)

RÉSUMÉ

La médecine régénérative a pour objectif de remplacer les tissus humains endommagés. Elle a pour principe de prélever et de purifier des cellules souches, de les multiplier *in vitro*, en maintenant leur multipotentialité pour les injecter ensuite dans l'organisme afin de leur faire fabriquer, directement, les tissus nécessaires à la réparation d'un organe, ou en orientant *in vitro* leur différenciation vers le tissu à traiter, avant de les injecter. Elle doit son essor aux récentes découvertes sur les cellules souches. Les perspectives sont le traitement de certains cancers, du diabète, des maladies dégénératives, des effets secondaires de la radiothérapie... Il existe des cellules souches à tous les stades du développement depuis l'œuf fécondé jusqu'aux cellules souches adultes. Les cellules souches embryonnaires, parce qu'elles sont une source illimitée de cellules souches, semblent être l'avenir de la médecine régénérative. Cependant, parce qu'elles sont issues de l'embryon, elles sont au centre d'un débat éthique mondial. En revanche, les cellules souches adultes ne soulèvent pas de problèmes éthiques. Elles en sont déjà au stade de l'expérimentation clinique. Bien que présentes en nombres infimes, les cellules souches adultes sont facilement prélevées à partir de trois tissus : la moelle osseuse, le tissu adipeux et le muscle. Le nombre de leurs cellules souches peut être augmenté par des techniques simples. Le résultat le plus spectaculaire concerne la moelle osseuse, qui est utilisée depuis plus de quarante ans pour le traitement de la leucémie. L'Institut de Radioprotection et de Sécurité Nucléaire a participé à des études expérimentales contribuant à l'utilisation clinique des cellules souches mésenchymateuses dans le traitement des tissus sains irradiés. Deux éléments majeurs sont en train de révolutionner la médecine régénérative : les cellules souches mésenchymateuses sont utilisées comme moyen thérapeutique au même titre qu'un médicament et grâce à l'absence de leur rejet, un seul donneur permettrait de traiter de multiples receveurs dans de nombreuses pathologies ; la reprogrammation des cellules adultes différenciées permet d'obtenir des cellules souches aux propriétés analogues à celles des cellules souches embryonnaires (sources illimitées de cellules pluripotentes).

Mots-clés : cellules souches, médecine régénérative, irradiation.

(1) Institut de Radioprotection et de Sécurité Nucléaire, Direction de Radioprotection de l'Homme. IRSN, DRPH, BP17, 92262 Fontenay aux roses cedex.
Tél. : 0158359546. Correspondance adressée à A Chapel : Adresse électronique : Alain.chapel@irsn.fr

SUMMARY

The objective of regenerative medicine is to replace damaged human tissues. The principle is to collect multipotent stem cells from the body, purify them, multiply them in vitro, and either inject them so that they can produce, directly in the body the tissues needed to regenerate a functional organ, or lead in vitro their differentiation to the type of the tissue to be regenerated before injecting them. It owes its development to the recent discoveries on stem cells. Perspectives include the treatment of certain cancers, diabetes, degenerative diseases, side effects of radiotherapy... Stem cells are present in all development stages, from the fertilized egg to adult cells. The source of embryonic stem cells is unlimited, and therefore they seem to be the future of regenerative medicine. However, because they come from embryos, they are also at the center of a worldwide ethical debate. Adult stem cells, however, do not raise such ethical questions, and they are already undergoing clinical studies. Although they are present in limited numbers, adult stem cells can be collected easily from three tissues: bone marrow, fat tissue and muscle. Their numbers can be increased using simple techniques. The most spectacular results are obtained with bone marrow, which has been used for over 40 years for the treatment of leukaemia. The French Institute of Radioprotection and Nuclear Safety participated in experimental studies on the clinical use of mesenchymal stem cells in the treatment of irradiated healthy tissues. Two major elements are currently revolutionizing regenerative medicine. Firstly, mesenchymal stem cells are used as therapeutic means, just like drugs, and as they elicit no rejection from the body, a single donor may be used to treat multiple recipients with a wide range of conditions. Secondly, reprogramming of differentiated adult cells produces stem cells with properties similar to those of embryonic stem cells (source of unlimited multipotent cells).

Key words: stem cells, regenerative medicine, irradiation.

INTRODUCTION

En permettant de régénérer nos organes sans les changer, la médecine régénérative représente une révolution thérapeutique prometteuse qui devrait se développer largement au cours du 21^e siècle. Grâce à elle, il est désormais envisageable de régénérer les tissus et organes lésés par une maladie ou un accident (brûlures graves,...), les tissus génétiquement déficients (myopathie,...), ou simplement altérés par le vieillissement. Elle est utilisée depuis plus de quarante ans pour le traitement de la leucémie mais elle doit son essor actuel aux récentes découvertes concernant les cellules souches. Ces cellules, en effet, sont capables de produire n'importe quel type de cellules différenciées et pourront être d'un grand secours pour le traitement de maladies comme la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson ou le diabète. Ces «cellules-médicaments» sont une thérapeutique de l'avenir, elles sont également au centre des bouleversements bioéthiques (Aejaz *et al.* 2007).

DÉFINITION DE LA CELLULE SOUCHE

Le terme de «**cellule souche**» désigne une cellule qui, dans un environnement tissulaire approprié (appelé **niche**), est capable de se multiplier (capacité de **prolifération**) et de produire des cellules spécialisées (**figure 1**). Une cellule souche, ne possède aucune spécialisation, elle est indifférenciée. La niche est constituée de cellules spécialisées, de matrice extracellulaire, de molécules d'adhésion et de facteurs de croissance en contact étroit avec les cellules souches (Lin 2008). Elle assure un environnement dans lequel chaque cellule souche se divise, l'une des cellules filles participant au maintien constant de leur nombre, l'autre s'engageant dans une voie de **différenciation** spécifique d'un tissu ou d'un organe (épiderme, os, muscle...).

Exemple de l'hématopoïèse chez la souris

Les expériences permettant la mise en évidence de cellules souches ont, pour la plupart, été réalisées chez la souris. En effet,

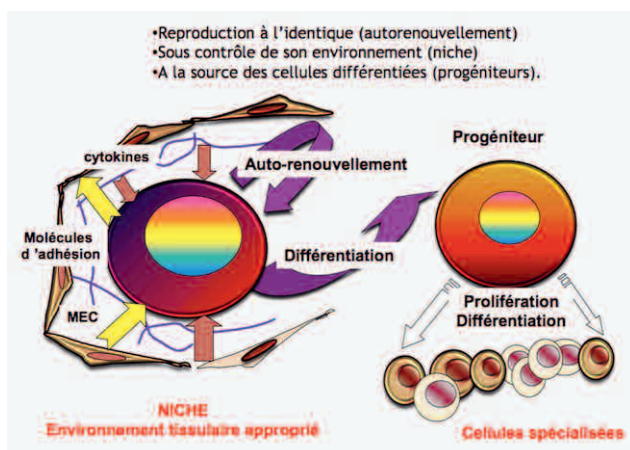


Figure 1 : Définition de la cellule souche

Une cellule souche est indifférenciée. Au sein de la niche, la cellule souche assure sa fonction d'autorenouvellement, c'est-à-dire sa reproduction à l'identique qui permet de maintenir constant le nombre de cellules souches, et la production de cellules qui s'engagent dans une ou plusieurs voies de différenciation. La niche est constituée de cellules spécialisées, de matrice extracellulaire, de molécules d'adhésion et de facteurs de croissance en contact étroit avec les cellules souches.

si on irradie des souris, la destruction des cellules de leur moelle osseuse provoque inévitablement leur mort à terme par défaut de remplacement des cellules du sang et du système immunitaire. Par contre, lorsque la moelle d'une souris donneuse est injectée à une souris irradiée, les cellules médullaires colonisent la moelle de la receveuse, puis produisent des cellules différenciées qui repeuplent son sang et reconstitue son système immunitaire. Ceci démontre que la moelle osseuse contient les cellules souches hématopoïétiques responsables de la restauration des cellules du sang et du système immunitaire. Les cellules souches hématopoïétiques peuvent être purifiées, isolées et réinjectées ensuite à des souris irradiées, démontrant leur capacité d'autorenouvellement et de différenciation (Jordan *et al.* 1990, Osawa *et al.* 1996) ⁽²⁾.

POTENTIEL DES CELLULES SOUCHES

Classification des cellules souches (figure 2)

Les cellules souches sont classées en fonction de leurs propriétés. Les cellules **totipotentes** sont celles qui dérivent d'embryons très précoces (jusqu'au 4^e jour chez la souris). Les cellules de ce type permettent le développement complet d'un individu. Les cellules souches embryonnaires (cellules ES), issues d'un embryon de 5 à 7 jours, sont **pluripotentes** car capables de donner naissance à tous les types cellulaires présents dans l'organisme. Les cellules **multipotentes** donnent naissance à plu-

sieurs types cellulaires, comme par exemple les cellules souches myéloïdes de la moelle osseuse (figure 2), qui sont à l'origine des cellules sanguines (érythrocytes, monocytes, granulocytes...). Ce sont des cellules souches fœtales et adultes. Les cellules **unipotentes** donnent naissance à un type cellulaire unique, comme les kératinocytes qui sont à l'origine des cellules de l'épiderme (Fortier *et al.* 2005).

Transdifférenciation des cellules souches adultes

La médecine régénérative est en pleine essor parce qu'il est désormais possible de traiter de nombreuses maladies dégénératives en greffant un seul type de cellules souches. En fait, restaurer des organes revient à régénérer les types cellulaires des zones endommagées. La solution consiste à greffer un seul type de cellule souche capable de remplacer n'importe quelle cellule de l'organe. Les cellules souches utilisées doivent alors posséder des propriétés de **transdifférenciation** (Hadorn *et al.* 1968). Le terme de trans-différenciation signifie qu'une cellule souche

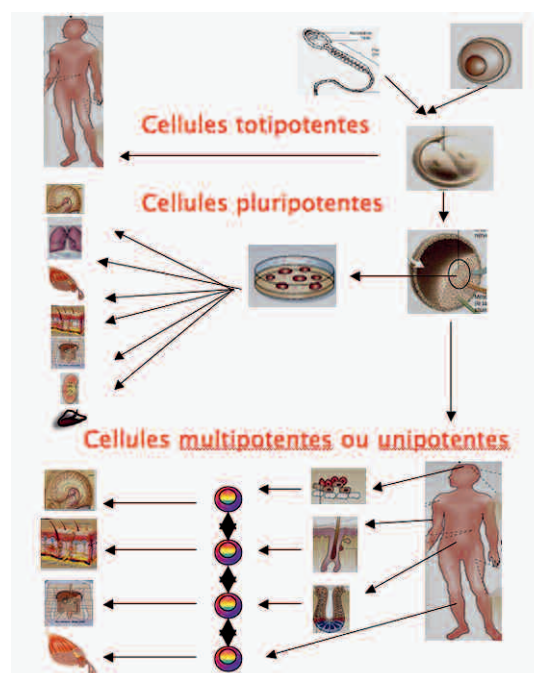


Figure 2 : Propriétés des cellules souches

Les cellules totipotentes issues des divisions de l'œuf fécondé permettent le développement complet d'un individu. Les cellules souches embryonnaires (cellules ES) sont pluripotentes, capables de donner naissance à tous les types cellulaires présents dans l'organisme. Les cellules souches fœtales et adultes sont multipotentes, capables de donner naissance seulement à plusieurs types cellulaires. Les cellules unipotentes donnent naissance à un type cellulaire unique.

(2) Il est à noter que nous parlons de cellules souches pour tous les types cellulaires, alors que l'autorenouvellement n'a été démontré que dans de très rares cas, le terme de cellules progénitrices serait plus juste.

d'un tissu peut se différencier en une cellule spécialisée d'un autre tissu, issue ou non du même feuillet embryonnaire (Raff *et al.* 2003). C'est le cas des cellules souches hématopoïétiques : dans les années 1998-2002, de nombreux travaux ont mis en évidence qu'elles pouvaient produire des cellules différenciées de différents tissus, parmi lesquels ceux du cerveau, des muscles cardiaque et squelettique, du foie et du rein, (revue dans Li *et al.* 2005). Cette découverte a fait naître l'espoir de soigner de nombreuses maladies dégénératives en ne greffant qu'un seul type de cellules souches (Tosh *et al.* 2002, Wagers 2004, 2005).

La question de la transdifférenciation est posée. Lors de la conversion de cellules-souches issues du tissu adipeux humain en cellules musculaires après transplantation dans le muscle des souris mdx, a-t-on affaire à une véritable transdifférenciation, c'est-à-dire à une différenciation des cellules transplantées en myoblastes puis myotubes, ou bien d'une fusion des cellules non différenciées avec les cellules du tissu greffé, avec reprogrammation du noyau humain par les facteurs myogéniques de la cellule hôte ? (Dani 2006). Si l'on entend par transdifférenciation la réorientation complète d'une cellule qui a déjà acquis un certain nombre de caractéristiques de cellules différenciées, cela n'est pas à exclure au sein d'une même couche embryonnaire. Ainsi on décrit des myoblastes, déjà engagés dans leur programme de différenciation, donnant des adipocytes, mais ces cellules sont toutes deux issues du même feuillet mésodermique. De même, les différentes lignées hématopoïétiques sont proches d'un point de vue embryologique, et des cellules engagées dans un lignage lymphoïde peuvent s'orienter vers un lignage myéloïde. Dire qu'un myoblaste par exemple peut donner un neurone, ou qu'un neurone peut être réorienté en cellule sanguine, est discutable. On ne sait que très peu de choses sur les mécanismes génétiques qui pourraient être impliqués (Casteilla 2006).

LES DIFFÉRENTS TYPES DE CELLULES SOUCHES

Les cellules souches peuvent être classées selon leur origine ; les cellules souches embryonnaires, les cellules souches fœtales et les cellules souches des tissus adultes.

Les cellules souches embryonnaires (cellules ES, *embryonic stem cell*)

Ces cellules semblent avoir, au moins théoriquement, des applications illimitées pour la régénération d'organes. Deux méthodes permettent d'obtenir des cellules souches embryonnaires. Dans la première, quelques cellules sont prélevées du blastocyste d'un embryon. Les cellules ES isolées n'ont pas la possibilité de donner un embryon à elles seules. En revanche, elles peuvent participer à sa formation. Elles peuvent être multipliées *in vitro* indéfiniment, tout en gardant leur pluripotence (Lovell-Badge *et al.* 1985). La première lignée de cellules ES humaines (hES) a été dérivée par l'équipe de Thomson *et al.* en 1998. La seconde méthode est appelée **clonage thérapeutique** ou « transfert nucléaire de cellules somatiques » (SCNT). Elle consiste

à insérer le noyau d'une cellule somatique différenciée du donneur dans un ovocyte receveur énucléé. Cette cellule se développe jusqu'au stade blastocyste à partir duquel on isole des cellules souches embryonnaires (ES) (Munsie *et al.* 2000). L'intérêt, dans ce cas, est que les cellules ES obtenues sont génétiquement identiques à celles du donneur et sont, par conséquent, épargnées par le système immunitaire, évitant ainsi les problèmes de rejet. Cependant, seulement 1 à 3 % des noyaux somatiques ainsi transférés conduisent à une lignée de cellules ES chez la souris (Munsie *et al.* 2000). Le clonage thérapeutique a été utilisé dans un modèle de la maladie de Parkinson chez la souris (Barberi *et al.* 2003). Des cellules de la peau de l'animal ont été prélevées pour obtenir des neurones dopaminergiques (les neurones endommagés dans la maladie de Parkinson), dits autologues (provenant du même organisme et transplanté à celui-ci). La souris modèle de la maladie de Parkinson, qui a reçu ces neurones compatibles, a présenté une amélioration des symptômes neurologiques.

Depuis la découverte des cellules ES humaines, leur utilisation en clinique se heurte à plusieurs obstacles. Actuellement, les conditions de culture ont recours à des cellules nourricières et à des milieux conditionnés issus d'espèces animales, qu'il faut remplacer par des milieux de culture synthétiques. Les cellules ES, au pouvoir de division illimité, présentent un risque potentiel de formation de tumeur, qui n'existe plus si toutes les cellules réinjectées se différencient, mais dans ce cas, elles sont reconnues comme étrangères par le receveur. La solution demeure le clonage thérapeutique. Mais l'obstacle majeur est éthique. Il réside dans l'idée d'utiliser des embryons comme « pièces détachées » pour réparer les humains.

Les cellules souches fœtales

Les cellules souches fœtales sont prélevées chez des fœtus issus d'une interruption volontaire de grossesse. Les isoler d'un fœtus pose des problèmes éthiques évidents, elles ont permis cependant des progrès décisifs dans des cas de dégénérescence supposée irréversible chez l'adulte. Par exemple, la greffe de neurones fœtaux a été réalisée pour remplacer les neurones disparus dans les cas de maladies neurodégénératives (Freeman *et al.* 2000; Reubinoff *et al.* 2001). Vingt-cinq interventions portant sur les deux hémisphères cérébraux ont été pratiquées chez treize malades parkinsoniens. Une amélioration des symptômes, de 30 à 40 % par rapport à l'état antérieur, a été observée dans la majorité des cas (Reed *et al.* 2001). À partir de 1996, une étude expérimentale et clinique a été menée sur la greffe de neurones fœtaux pour le traitement de la chorée de Huntington, maladie neurodégénérative de l'adulte, d'origine génétique, et aboutissant à la démence. Cinq patients ont fait l'objet d'implantations bilatérales. Les cellules transplantées survivent jusqu'à dix ans après la greffe, sans signe de lésion dégénérative du greffon chez l'homme (Bachoud-Levi *et al.* 2006), indiquant une bonne tolérance du greffon fœtal par le système immunitaire. La transplantation cellulaire dans le système nerveux central constitue un **cas particulier**, le cerveau adulte tolérant la greffe de neu-

rones fœtaux car il ne possède pas de tissus lymphoïdes. La réponse immune de rejet de ces cellules ne peut résulter que de l'infiltration par des cellules immunitaires. En dehors des considérations éthiques évidentes, la nécessité d'utiliser au moins six fœtus, pour disposer de suffisamment de cellules pour un seul patient, stimule la recherche de nouvelles sources de cellules, afin de traiter les maladies neurodégénératives.

Actuellement, les **cellules souches provenant du sang du cordon ombilical** des nouveau-nés sont congelées dans des banques de cellules souches qui permettent, au niveau mondial, de disposer de cellules hématopoïétiques compatibles pour greffer les patients. Elles sont également un enjeu commercial, car plusieurs firmes proposent aux parents de les stocker pour permettre aux enfants d'avoir recours à leurs propres cellules souches adultes, en cas de grave maladie (*Umbilical cord blood banking Richard Branson's way*, 2007, *Lancet* 369, 437). Ces cellules possèdent une multipotentialité plus élevée que les cellules adultes. Cependant, le nombre limité de cellules souches présentes dans le sang du cordon ombilical restreint leur application aux enfants ou nécessite leur multiplication *in vitro*. Utilisé chez l'adulte, il faut en effet sang de cordon de plusieurs donneurs pour traiter un seul patient. Les cellules souches du sang de cordon ombilical ont permis, depuis 1989, plus de 7.000 transplantations dans le monde entier (Templeton & Braude, 2007).

Les cellules souches pluripotentes induites

Découvertes il y a deux ans, les cellules souches pluripotentes induites (iPS cells pour inductive pluripotent stem cells) (**figure 3**) sont peut-être une alternative aux autres sources de cellules souches. Elles constituent une avancée majeure dans la recherche des cellules souches car elles permettent d'avoir des cellules souches pluripotentes sans avoir recours à des embryons. La découverte des cellules iPS est issue des connaissances accumulées sur les cellules ES. En effet, les gènes res-

ponsables de la pluripotentialité des cellules ES sont maintenant connus. En introduisant certains de ces gènes dans des cellules somatiques adultes différenciées, il est possible de les reprogrammer en cellules pluripotentes. Les cellules iPS sont pluripotentes comme les cellules ES. Elles ont été produites pour la première fois en 2006 à partir de fibroblastes de souris (Takahashi & Yamanaka, 2006), puis en 2007 à partir de cellules humaines (Thomson *et al.* 2007; Yamanaka *et al.* 2007; Yu *et al.* 2007). Elles sont obtenues en insérant dans leur noyau, par transfection au moyen de vecteurs rétroviraux, quatre gènes Oct-3/4, SOX2, Klf4 et c-Myc ou Lin28 qui ne s'expriment normalement qu'au stade embryonnaire et dont l'expression devient alors constitutive. Après trois à quatre semaines, un petit nombre de cellules sont considérées comme des cellules pluripotentes, identifiées par la présence du marqueur Nanog, un critère majeur de la pluripotentialité. Comme les cellules ES, elles ne peuvent à elles seules former un embryon. Les avantages qu'elles présentent sont de ne pas poser de problème éthique majeur, puisqu'elles ne sont pas issues d'embryons et de pouvoir produire des cellules pluripotentes à partir des cellules différenciées. Une des limitations de leur usage en thérapeutique est le transfert aléatoire des gènes viraux dans le génome des cellules. Cette insertion peut induire des mutations aboutissant à leur immortalisation (Thomson *et al.* 2007).

Les cellules souches adultes

Les cellules souches adultes sont celles dont l'obtention est **plus difficile** et elles sont pourtant utilisées en clinique. Elles présentent comme premier avantage de **ne poser aucun problème d'éthique**, puisque dans le cas des autogreffes, ce sont les propres cellules souches du patient qui sont extraites, pour lui être ensuite injectées (Hearn *et al.* 2007). Elles sont pluripotentes et peuvent produire des cellules de morphologie et de fonction très différentes, généralement groupées au sein d'un même organe ou tissu.

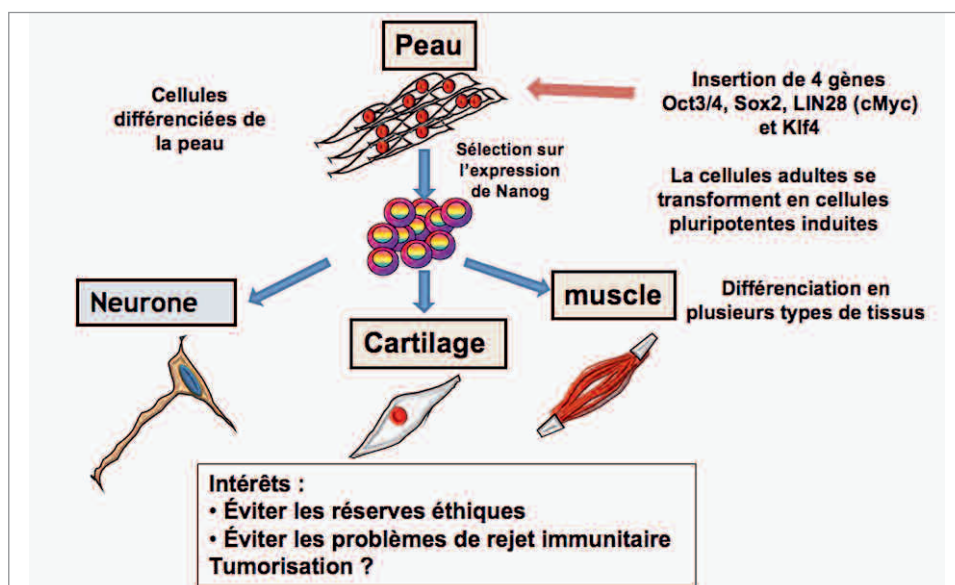


Figure 3: Les cellules souches pluripotentes induites (inductive pluripotent stem cells, iPS cells)

Les cellules souches adultes sont reprogrammées pour leur conférer des propriétés similaires à celles des cellules souches embryonnaires. Les cellules iPS sont ainsi obtenues par transfert de quatre gènes Oct-3/4, SOX2, Klf4, c-Myc ou Lin28. Après 3 à 4 semaines, un petit nombre de cellules deviennent morphologiquement et biochimiquement similaires à des cellules pluripotentes. Les cellules iPS ont été sélectionnées par un marqueur appelé Nanog qui est un déterminant majeur de la pluripotentialité. Les cellules iPS sont semblables aux cellules ES.

Homéostasie

Les cellules souches hématopoïétiques assurent en permanence le remplacement des globules rouges et des globules blancs. La durée de vie des globules rouges est de seulement 120 à 130 jours chez l'homme. Environ 350 millions de nouveaux globules rouges sont fabriqués par minute par les cellules souches hématopoïétiques chez l'homme. La plupart des autres cellules de l'organisme sont elles aussi régulièrement remplacées, les cellules hépatiques le sont au bout de 10 à 15 jours, les globules blancs, en un à trois jours. La fonction de la cellule souche est d'assurer l'**homéostasie**, c'est-à-dire le maintien physiologique d'un organe, en remplaçant les cellules disparues, assurant ainsi la fonction de l'organe pendant toute la vie de l'individu. Elle remplit cette fonction, grâce à son autorenouvellement (évitant l'appauvrissement du réservoir de cellules souches) et en se différenciant, afin d'acquérir les caractéristiques du tissu à renouveler. Il faut distinguer deux catégories de tissus : les tissus renouvelés en permanence par des cellules souches et les tissus qui contiennent des cellules souches qui ne sont pas actives en permanence. Les cellules du tissu sanguin, de l'épiderme, de l'intestin, de l'os et de l'épithélium respiratoire se renouvellent en permanence pendant la vie. Ce renouvellement permanent démontre l'existence de cellules souches perpétuellement actives (Morrison *et al.* 2008).

Les tissus sources des cellules souches adultes

Les cellules souches adultes ont été isolées à partir de presque tous les tissus de l'organisme (Jones *et al.* 2008; Laird *et al.* 2008). Leurs niches ont été identifiées dans l'intestin (Potten

et al. 1997), dans l'ovaire (Xie *et al.* 1998), dans le cerveau (Palmer *et al.* 2000), dans le muscle (Collins *et al.* 2005), dans le testicule (Chiarini-Garcia *et al.* 2003) et dans l'épiderme (Sun *et al.* 2007).

La moelle osseuse chez un homme adulte comporte plusieurs types de cellules souches et progéniteurs : les cellules souches hématopoïétiques et non hématopoïétiques (Zhang *et al.* 2003). Ces dernières, ou cellules souches mésenchymateuses (CSM), constituent une population cellulaire de la moelle osseuse, différente de celle des cellules souches hématopoïétiques. Elles sont isolées principalement de la moelle osseuse mais aussi du tissu adipeux (Bieback *et al.* 2008) et du sang du cordon ombilical (Romanov *et al.* 2003). Elles se caractérisent par leur propriété d'adhérence, leur phénotype et leur capacité, *in vitro*, de se différencier en de nombreux types cellulaires du mésoderme, de l'endoderme et de l'ectoderme (Pittenger *et al.* 2008); *in vivo*, elles ont la capacité de migrer vers un organe lésé. Cet adressage est expliqué par la sécrétion de molécules de domiciliation (SDF-1, Chemokines, HGF) par l'organe lésé (François *et al.* 2006). Elles ont également des propriétés d'immunomodulation et peuvent, grâce à la sécrétion nombreux facteurs de croissance, aider à la réparation tissulaire.

Principes de la médecine régénérative par les cellules souches adultes (figure 4)

Il n'existe pas une thérapie cellulaire unique permettant de faire de la médecine régénérative mais autant de méthodes qu'il y a de pathologies à traiter. De nombreuses maladies sont liées à une déplétion cellulaire. La seule solution consiste généralement

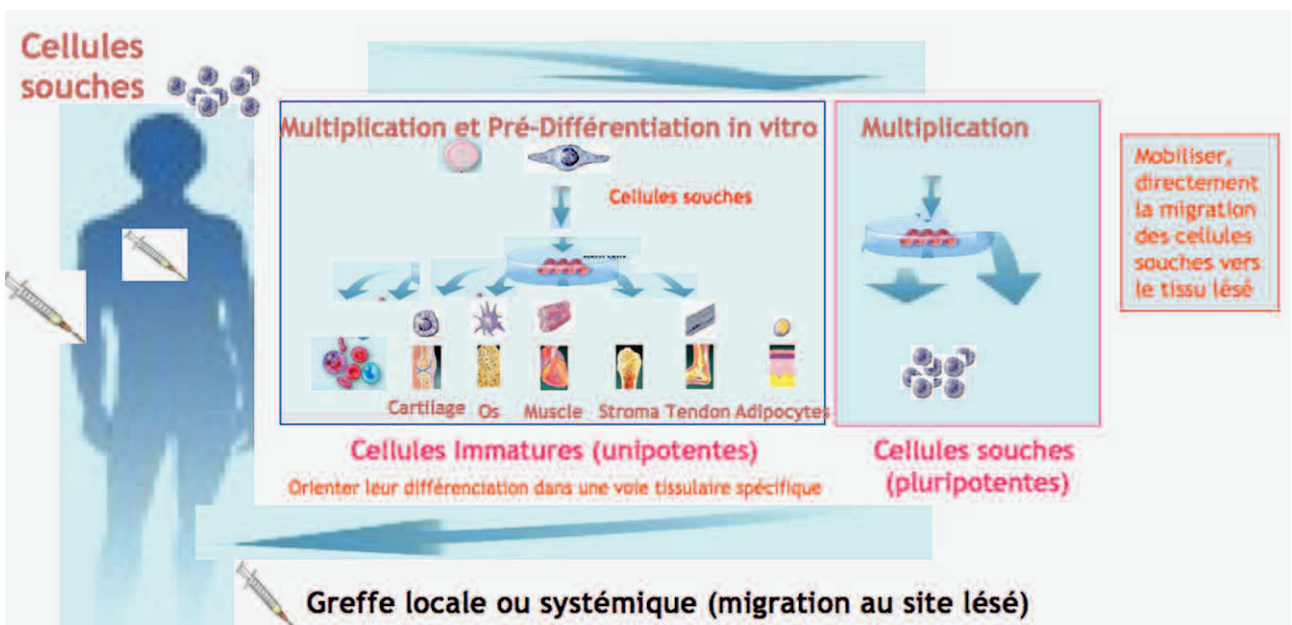


Figure 4: Principes de la thérapie cellulaire

La thérapie cellulaire a pour principe de prélever des cellules souches du corps, de les purifier, de les faire se multiplier *in vitro*, puis de les injecter. Les cellules souches sont multipliées *in vitro* soit en maintenant leur multipotentialité, soit en orientant leur différenciation vers le tissu à traiter (cellules immatures unipotentes). Elles peuvent être également directement mobilisées. Les cellules produites peuvent être injectées par voie intraveineuse (injection systémique), injectées seules localement dans le site lésé ou combinées à des biomatériaux.

en une greffe mais face aux problèmes de compatibilité, s'ajoute la faible offre de greffons par rapport au nombre de personnes malades. La thérapie cellulaire a pour principe de prélever des cellules souches, de les purifier, de les multiplier *in vitro*, puis soit de les injecter dans l'organisme pour leur faire élaborer les tissus nécessaires à la réparation de l'organe lésé, soit auparavant d'orienter *in vitro* leur différenciation vers le tissu à traiter, avant de les réinjecter. Moins lourde pour le patient que la greffe d'organe, cette méthode de régénération tissulaire n'induit pas le rejet de l'organe entier (Gorin *et al.* 1977; Douay *et al.* 1985). On peut ainsi traiter des zones difficilement accessibles comme le cerveau. Les cellules produites peuvent être injectées par voie intraveineuse (injection systémique); elles migrent vers le tissu lésé et favorisent alors le processus de guérison, notamment dans le traitement des lésions tissulaires radio-induites (Chapel *et al.* 2003). Elles peuvent être également injectées seules localement dans le site lésé, (Lataillade *et al.* 2007) ou combinées à des biomatériaux (Gardner *et al.* 2007).

Recueil et multiplication de cellules souches adultes

Pour traiter une pathologie par les cellules souches, une autorisation auprès des autorités de surveillance (Agence française de sécurité sanitaire, Comités Consultatifs de Protection des Personnes dans la Recherche Biomédicale) doit être obtenue. Certaines cellules souches adultes, comme les cellules souches nerveuses, épidermiques, ou mésenchymateuses, se multiplient très efficacement en culture, en conservant intacte leur multipotentialité. D'autres perdent leur potentiel en culture (cellules souches hématopoïétiques) ou bien prolifèrent très peu *in vitro*. Leur comportement *in vitro* est essentiel pour leur manipulation dans un but thérapeutique car, pour une application clinique, il est essentiel d'obtenir un nombre de cellules souches adultes ou spécialisées compatibles avec la réparation tissulaire chez le patient. Cela implique de définir des conditions de culture (facteurs nutritifs) pour multiplier les cellules, tout en conservant intacte leur capacité de produire des cellules spécialisées réparant le tissu *in vivo*. En conséquence, il est nécessaire de contrôler le phénotype des cellules et d'évaluer les fonctions des cellules qui se sont multipliées (Gregory *et al.* 2005; Wagner & Ho Ad, 2007).

Obstacles majeurs à l'utilisation des cellules souches adultes en clinique

Plusieurs obstacles limitent l'utilisation expérimentale et thérapeutique des cellules souches adultes : les cellules souches de ces organes sont enfouies dans le tissu et donc, très difficiles d'accès; elles existent en nombre infime; l'absence de marqueurs spécifiques ne permet pas de les purifier; les conditions pour les faire se multiplier *in vitro* ne sont pas connues et il existe peu de modèles animaux proches des pathologies observées chez l'homme pour évaluer leur fonction. Enfin, les cellules souches adultes sont généralement programmées pour un tissu donné. Une grande importance semble également devoir être attachée à la qualité des cellules souches utilisées. Plus l'individu est âgé et plus la capacité de ses cellules souches à se diviser et à survivre est réduite (Roobrouck *et al.* 2008). Il apparaît donc que

pour les maladies qui apparaissent à un stade avancé de la vie, les cellules souches auront peut-être épuisé leur potentiel thérapeutique.

En dehors du choix de la méthode optimale pour régénérer les tissus, la question des effets secondaires est aussi fondamentale. Parmi les effets secondaires, le problème majeur est d'augmenter le risque de cancer en favorisant la prolifération de cellules tumorales présentes chez le receveur, ou par transformation des cellules souches greffées. Les cellules souches adultes, qui ont été transplantées directement dans un but thérapeutique, n'augmentent pas le risque de formation de tumeurs, si le patient n'est pas atteint d'une maladie cancéreuse. L'exception concerne une tumeur existante qui peut continuer à croître en raison de l'apport de cellules souches adultes. Les cellules souches adultes, multipliées en culture pendant une longue période, pourraient dégénérer en cellules souches cancéreuses, la probabilité d'accumulation des défauts génétiques pouvant augmenter avec le nombre de divisions cellulaires.

Les cellules souches adultes en clinique

Au contraire des cellules souches embryonnaires dont les études sont encore expérimentales et malgré les obstacles signalés, les cellules souches adultes en sont déjà au stade de l'expérimentation clinique.

Peu de sources sont utilisables en clinique, seuls les tissus d'accès facile peuvent servir pour produire des cellules souches réparatrices. La **moelle osseuse, le tissu adipeux et le muscle** présentent l'avantage de la facilité de prélèvement et la possibilité de pouvoir réaliser des autogreffes. Par exemple, les cellules souches issues du tissu adipeux se différencient *in vitro* en cellules adipeuses, musculaires, osseuses et nerveuses. Les domaines d'utilisation des cellules souches adultes couvrent ceux de la neurologie, de l'endocrinologie et de la réparation tissulaire.

Résultats cliniques

- Le domaine de la neurologie fait l'objet d'une recherche intensive. L'objectif est de remplacer ou de régénérer les cellules nerveuses altérées. L'utilisation de cellules souches adultes (comme les cellules souches mésenchymateuses) devrait offrir une nouvelle stratégie de traitement pour des maladies jusqu'à présent incurables telles que la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson ou la sclérose en plaques (Gupta *et al.* 2007).
- En 2007, il a été montré pour la première fois que la production d'insuline endogène chez les diabétiques de type 1 et de type 2 est stimulée par le traitement par des cellules souches adultes d'origine pancréatique ou médullaire (Sordi *et al.* 2008).
- L'infarctus du myocarde reste une des premières causes de décès dans les pays occidentaux. En thérapie cellulaire, la procédure consiste à prélever par biopsie un petit fragment dans un muscle de la cuisse du patient. À partir de cet échantillon, des cellules souches musculaires sont isolées, puis cultivées, avant d'être injectées directement dans le muscle cardiaque au site de l'infarctus. La première application clinique a eu

lieu en 2000 en France, chez dix patients inclus dans une étude de phase I, dans le cadre d'un protocole hospitalier de recherche clinique. Les résultats obtenus montrent l'amélioration de la fonction cardiaque. Sur les dix patients, quatre ont souffert d'arythmies (Menasché *et al.* 2008). L'étude SEISMIC de phase II, menée en Europe chez quarante patients, qui présentent une insuffisance cardiaque congestive, a évalué l'efficacité de la greffe de cellules myoblastiques. Les premiers résultats à six mois indiquent une évolution positive des bénéfices cliniques dans le groupe traité, par rapport au groupe témoin sans prévalence supérieure des arythmies (<http://www.cardiosource.com/clinicaltrials>).

- Il est également possible, à partir d'un prélèvement de moelle osseuse adulte, d'améliorer certaines pathologies touchant des organes tels que la peau, le foie, le muscle.
- En clinique, l'injection de CSM de la moelle a permis d'améliorer la reconstitution hématopoïétique (Fouillard *et al.* 2003, 2007).
- Horwitz a montré, chez des enfants atteints d'ostéogénèse imparfaite, que l'injection intraveineuse de CSM allogéniques de la moelle osseuse, (c'est-à-dire provenant d'un donneur non histo-compatible) était suivie d'une reprise de la croissance, alors que la détection des CSM allogéniques dans le tissu osseux ne dépassait pas un taux de 1 % (Horwitz *et al.* 2002). Bien qu'il existe un bénéfice thérapeutique clair, le nombre de CSM demeure toujours faible et les mécanismes ne sont pas élucidés. Dans les dommages osseux importants, la réparation osseuse est accélérée par l'implantation de matériaux artificiels combinés à des cellules souches mésenchymateuses isolées à partir de la moelle osseuse. Par exemple, une équipe japonaise qui a pré-orienté des cellules souches mésenchymateuses vers la différenciation ostéoblastique, a ensuite cultivé ces cellules sur des céramiques d'hydroxy-apatite, qui ont été implantées au niveau de la perte osseuse (Morishita *et al.* 2006).
- Les CSM de la moelle osseuse sont également utilisées dans le traitement de la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD). La GVHD peut aboutir, dans ses formes les plus sévères, à la mort du patient. L'injection de CSM a permis d'améliorer rapidement les signes cliniques d'un patient atteint de GVHD sévère du foie et des intestins, réfractaire à tous les traitements immunosuppresseurs. L'efficacité du traitement semble due à l'effet immunomodulateur des CSM sur les lymphocytes de l'hôte. Les CSM permettraient une récupération fonctionnelle de l'intestin (Leblanc *et al.* 2004).
- Plus récemment, des CSM isolées à partir d'une lipoaspiration du tissu adipeux ont été utilisées, chez cinq patients, pour le traitement de fistules apparaissant dans la maladie de Crohn (Garcia-Olmo *et al.* 2005). L'étude montre que dans 75 % des fistules, la muqueuse intestinale est recouverte d'un épithélium au bout de huit semaines et les patients ne présentent pas d'effets secondaires jusqu'à trente mois après l'inoculation, suggérant la sécrétion de facteurs induisant la régénération de la

muqueuse intestinale. Dernièrement, chez dix patients présentant des perforations coliques, des cystites hémorragiques et/ou un pneumomédiastinum, l'injection de CSM aboutit à la disparition des cystites chez cinq d'entre eux et du pneumomédiastinum chez deux autres (Ringdén *et al.* 2007).

Les CSM cellules médicament et cellules réparatrices universelles

Grâce à leurs propriétés, les CSM ont un statut de cellules-médicaments et de cellules réparatrices universelles. En effet, leurs propriétés immunomodulatrices permettent d'envisager leur utilisation en s'affranchissant de la compatibilité du donneur et du receveur. Ainsi, la société Osiris Therapeutics (www.osiris.com/products) utilise actuellement les CSM d'un donneur pour traiter plusieurs patients. La démonstration des effets thérapeutiques dans des pathologies variées permet de les considérer comme des cellules réparatrices universelles. L'intégration des CSM dans les tissus endommagés, ainsi que leurs propriétés anti-inflammatoire et angiogénique, participeraient à la régénération tissulaire (François 2006; Nasef *et al.* 2007; Zhang *et al.* 2007). Les CSM, délivrées sous forme de spray, ont montré leur effet thérapeutique sur des brûlures (Falanga *et al.* 2007). La société Athersys (www.athersys.com/technology/multistem) propose un programme de thérapie appelé Multistem, basé sur une approche similaire à celle de la société Osiris Therapeutics pour le traitement des désordres hématologiques et immunologiques, les maladies auto-immunes, et les complications orthopédiques. Les CSM, conditionnées sous différentes formes par Osiris Therapeutics (Prochymal, Provacel, Chondrogen), sont utilisées dans des essais thérapeutiques de phase I à III dans le traitement de la GVH, de la maladie de Crohn (Prochymal), de l'infarctus (Provacel) et de l'arthrite (Chondrogen).

APPLICATION EN RADIOBIOLOGIE

L'exposition d'un individu à une irradiation, d'origine accidentelle ou thérapeutique, entraîne une atteinte des tissus sains. Le nombre d'irradiations accidentelles est réduit mais la prise en charge est complexe (Thierry *et al.* 2005). En revanche, le nombre de traitements par radiothérapie, effectués dans le monde entre 1991 et 1996, est estimé à 5,1 millions, la majorité d'entre eux étant réalisés dans les pays développés. Le but de l'irradiation thérapeutique est d'utiliser une dose suffisante pour tuer les cellules tumorales en lésant le moins possible les tissus. Cependant, ces traitements sont souvent accompagnés d'effets secondaires dus aux atteintes des tissus sains. Les doses d'irradiation nécessaires au contrôle du développement tumoral, engendrent des phénomènes de toxicité aiguë, qui affectent la qualité de vie des patients. L'objectif de l'Institut de Radioprotection et de Sécurité Nucléaire est de proposer une thérapie innovante, en apportant des cellules souches mésenchymateuses (CSM) dans un environnement altéré par les rayonnements ionisants. Trois principaux organes ont été choisis : la peau qui, par sa localisation anatomique, est le premier organe exposé lors des irradiations, l'intestin car la toxicité des rayonnements ionisants est l'une des

principales limitations de la radiothérapie dans les cancers de la sphère abdomino-pelvienne et le foie qui, physiologiquement lié à l'intestin, peut être affecté par l'irradiation.

Nous avons montré que, lors de la thérapie cellulaire, les cellules injectées migrent jusqu'aux tissus irradiés mais nous ne disposons que de peu d'informations sur leur devenir et leur potentiel thérapeutique. Les premiers travaux ont mis en évidence que les CSM de primates non humains (Chapel *et al.* 2003) et humains (Bensidhoum *et al.* 2004) avaient la capacité de migrer vers les tissus lésés : le taux de CSMh implantées est plus important dans les zones irradiées à forte dose, démontrant que la colonisation des tissus par les CSMh, après irradiation, dépend de la configuration d'irradiation (François *et al.* 2006a; Mouiseddine *et al.* 2007). La thérapie cellulaire par les CSM est une thérapie innovante pour la régénération des tissus normaux lésés, suite à une irradiation accidentelle ou chez les patients soumis à une radiothérapie (revue dans François *et al.* 2007a).

Étude de l'impact d'une greffe de CSM de la moelle osseuse sur la régénération structurale de l'intestin (figure 5)

L'irradiation induit des atteintes structurales et fonctionnelles de l'intestin. Les conséquences cliniques sont des vomissements, puis des diarrhées aiguës, des saignements et des infections. L'agression sévère du tractus gastro-intestinal se caractérise par

la perte d'intégrité de la barrière intestinale. Nous avons étudié l'effet d'une injection de CSM sur ces atteintes radio-induites. Des souris NOD/SCID ont été irradiées en région abdominale. Les CSM s'implantent dans l'intestin et permettent la régénération accélérée de l'épithélium de l'intestin grêle, appréciée par l'augmentation de la taille des villosités intestinales (Semont *et al.* 2006). Les CSM rétablissent l'homéostasie cellulaire en régulant spécifiquement l'apoptose radio-induite et en stimulant la prolifération des cellules souches de l'épithélium intestinal (Mouiseddine 2008).

Utilisation des CSM de la moelle osseuse dans le traitement des atteintes hépatiques radio-induites (figure 6)

La régénération de l'intestin par les CSM peut-elle prévenir les effets néfastes, induits par l'irradiation, sur d'autres tissus du tube digestif tel que le foie? Nous avons montré que l'irradiation induit une altération de l'intégrité hépatique, avec une élévation du taux des transaminases, associée à une augmentation du nombre de cellules lysées autour des vaisseaux et des canaux biliaires (Scanff *et al.* 2004; Souidi *et al.* 2007). L'injection de CSM permet le retour à la normale. Selon que le foie est atteint ou non par l'irradiation, les CSM rétablissent l'intégrité hépatique par des mécanismes qui diffèrent. Si le foie est irradié dans sa totalité, les CSM colonisent les zones périvasculaires du foie, protégeant ainsi la vascularisation et évitant la cytolyse des hépatocytes : elles permettent la

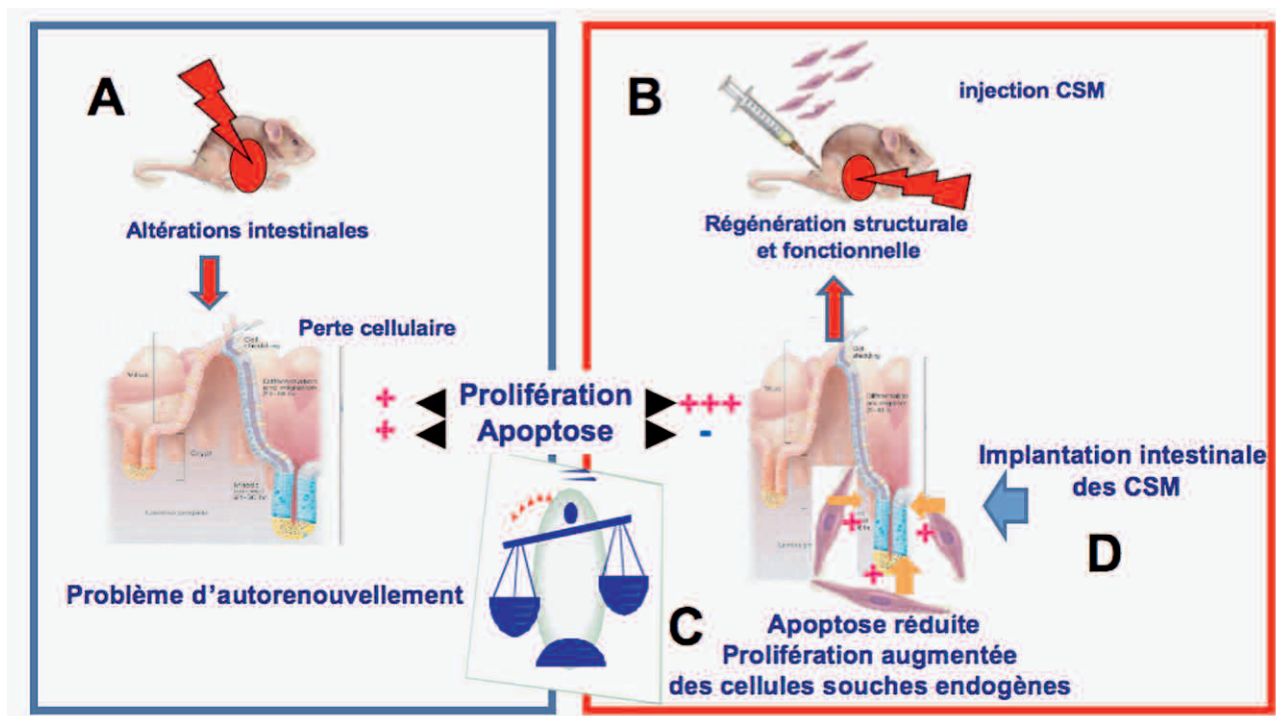


Figure 5 : Étude de l'effet d'une greffe de cellules souches mésenchymateuses (CSM) sur la régénération structurale de l'intestin (A) Une irradiation de l'abdomen entraîne des atteintes fonctionnelles de l'intestin grêle. (B) La greffe de CSM restaure l'intégrité structurale de l'intestin altérée par l'irradiation. Les CSM favorisent la ré-épithélisation de la muqueuse intestinale (augmentation de la taille des villosités intestinales), accélérant ainsi le processus de régénération. L'action des CSM s'exerce par une réduction de l'apoptose radio-induite (C) et la stimulation de la prolifération cellulaire (D).

restauration du taux plasmatique des transaminases et la diminution de l'apoptose des hépatocytes et des cellules endothéliales. (François 2006). Au contraire, lors d'une irradiation abdominale, les CSM ne s'implantent pas dans le foie : la restauration de l'intégrité hépatique par les CSM résulte d'un effet indirect. On observe une augmentation du taux d'un acide biliaire hydrophobe dans le foie, l'acide desoxycholique (ADC) connu comme cytotoxique. Or l'ADC provient de l'intestin et fait partie du cycle entéro-hépatique. La lésion de l'intestin, consécutive à l'irradiation abdominale, entraîne un dysfonctionnement du transport des acides biliaires. L'injection de CSM, en induisant la régénération de l'épithélium intestinal permet de ramener le taux d'ADC hépatique à son niveau physiologique et de limiter l'apoptose des hépatocytes, protégeant ainsi l'intégrité hépatique de la toxicité des acides biliaires hydrophobes (Mouiseddine 2008). Les CSM protègent donc le foie des effets de l'irradiation principalement par leur action sur l'intestin. Le traitement des atteintes hépatiques par les CSM est un domaine où les applications cliniques vont se développer comme le montre le premier essai clinique du traitement de patients en stade terminal de cirrhose hépatique (clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00420134).

Les atteintes de la peau : limitation de la radionécrose et accélération de la cicatrisation (figure 6)

Nous avons ensuite montré que les CSM de la moelle osseuse, présentes dans les territoires irradiés, pouvaient avoir une action sur la régénération de la peau et du muscle. Parmi les accidents d'irradiation, 54 % sont des irradiations externes et localisées (Lefaix *et al.* 1998), qui entraînent une radio-dermite plus ou moins sévère. Le syndrome cutané est également l'un des effets secondaires en radiothérapie et en radio-oncologie. Chez des patients subissant des radiothérapies, 95 % développent des réactions cutanées précoces ou tardives d'intensité variée. La capacité des CSM à réduire les lésions cutanées radio-induite a été étudiée. Ces travaux s'inscrivent dans une démarche d'étude préclinique de l'utilisation de la thérapie cellulaire, pour la gestion médicale des lésions précoces d'une irradiation localisée (François *et al.* 2006b). Pour induire des lésions sévères de la peau, des souris immunotolérantes NOD/SCID ont été irradiées au niveau d'un membre, puis traitées par l'injection de CSM humaines. L'observation macroscopique des lésions et les analyses histologiques correspondantes montrent

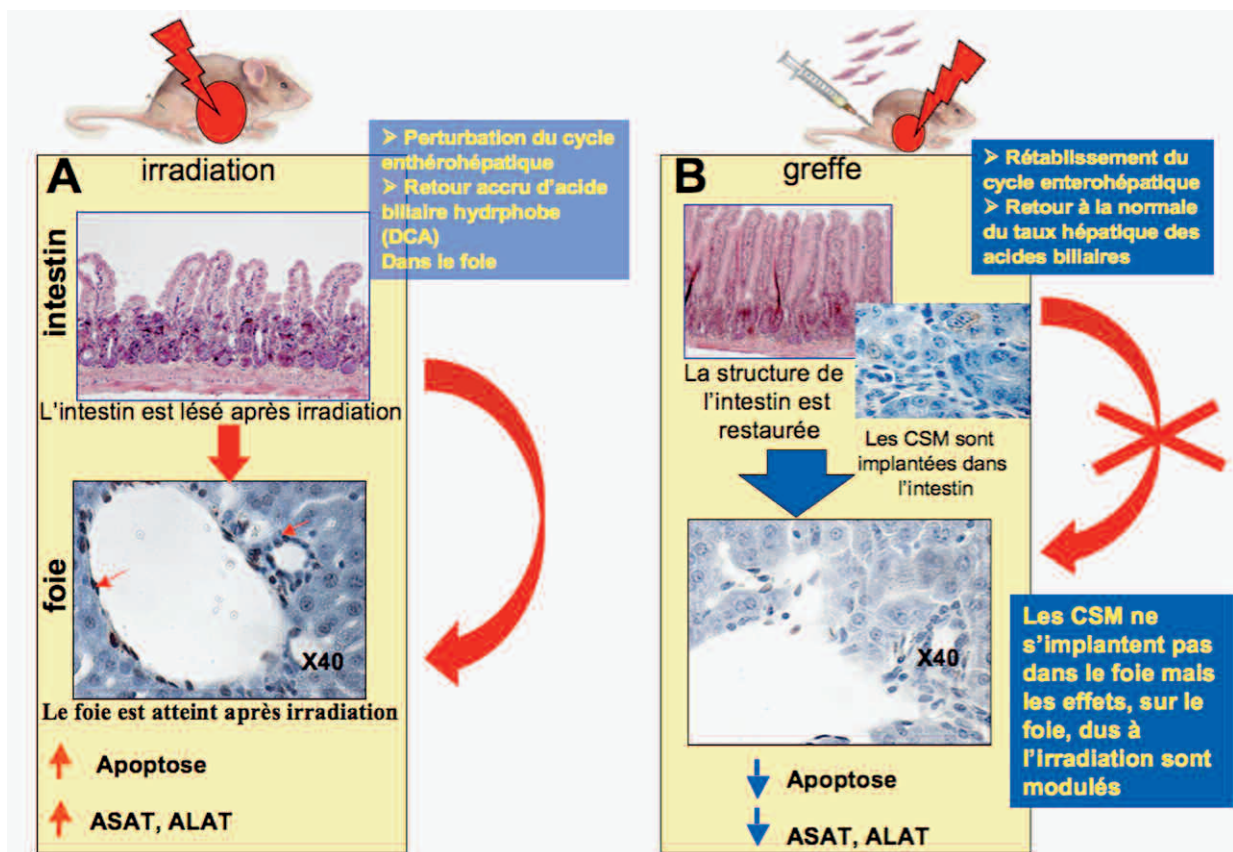


Figure 6 : Les CSM rétablissent l'intégrité du foie de façon indirecte, secondairement à leur action sur l'intestin
 (A) Une irradiation de l'abdomen induit une hépatotoxicité et une augmentation du nombre de cellules en apoptose autour des vaisseaux et des canaux biliaires. Suite à la lésion de l'intestin, l'irradiation a perturbé le cycle entéro-hépatique des acides biliaires, avec pour conséquence une augmentation du taux de l'acide desoxycholique (DCA, flèche rouge)). (B) Les CSM injectées ne s'implantent pas dans le foie mais dans l'intestin. La régénération intestinale induite par les CSM aboutit à un rétablissement de l'homéostasie des acides biliaires hydrophobes, protégeant ainsi l'intégrité hépatique et limitant la mort cellulaire des hépatocytes.

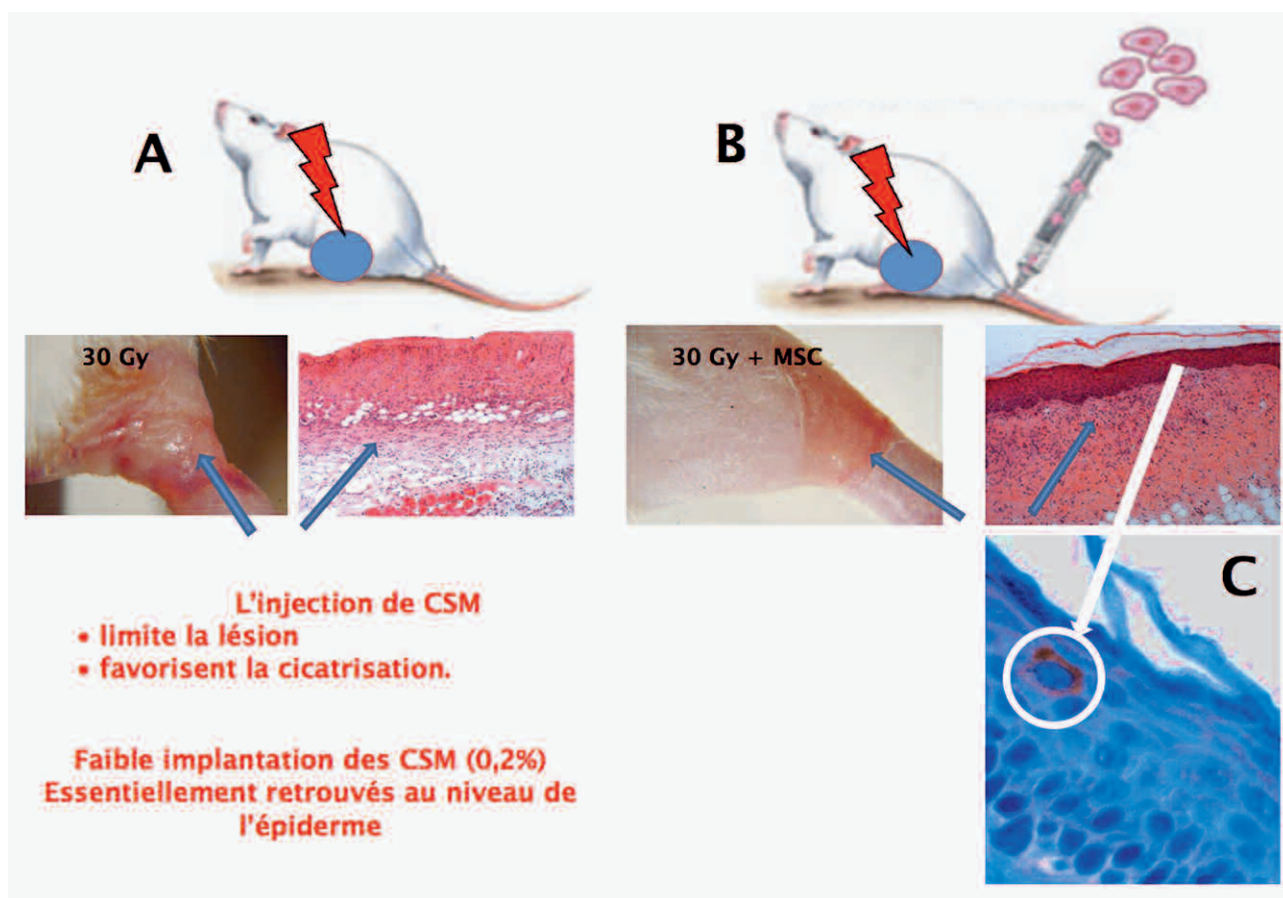


Figure 7: Les CSM accélèrent le processus de réparation de la peau en limitant les complications tissulaires radio-induites
 Pour induire des lésions sévères de la peau, le membre postérieur droit de souris NOD/SCID a été irradié. Les observations morphologiques et histologiques montrent que chez les souris témoins (A) les atteintes cutanées sont plus importantes et la cicatrisation est moins rapide que chez les souris ayant reçu des CSM (B). Un faible pourcentage de CSM est capable de coloniser l'épiderme de la peau lésée (C, D). (Francois et al. 2006a, 2006b).

que les lésions cutanées des animaux traités n'évoluent pas jusqu'à l'ulcération, contrairement à ce qui est observé chez les animaux témoins. La cicatrisation de la lésion cutanée radio-induite est plus rapide et la perte de masse musculaire est plus faible chez les souris traitées. L'ensemble de ces résultats met en évidence la récupération des capacités motrices du membre irradié. Les tissus irradiés ne nécessitant que très peu de CSM exogènes injectées en leur sein pour obtenir un résultat significatif, on peut supposer une action stimulatrice de la part de ces cellules.

Grefe de CSM de la moelle osseuse après brûlure par irradiation accidentelle (figure 7)

Ces travaux ont permis de proposer un protocole thérapeutique par injection de CSM, afin de traiter des patients ayant subi des brûlures cutanées. La brûlure radioactive est très différente de la brûlure thermique. Elle peut évoluer pendant des mois en profondeur et en largeur. Elle implique à la fois la peau et le muscle. Elle est extrêmement douloureuse et peut aboutir à l'amputation. Actuellement, pour les patients irradiés loca-

lement par de fortes doses, et en cas d'ulcération massive, l'ablation des tissus irradiés est nécessaire afin de greffer une peau sur un territoire sain. Cette approche pose des problèmes de qualité de cicatrisation et de récurrence sur la zone greffée. Au cours des deux dernières années, deux victimes de brûlures radiologiques accidentelles ont bénéficié d'une thérapie cellulaire consistant en l'administration de CSM médullaires. La première victime présentait des lésions radio-induites de la main et de la fesse. Elle a été traitée précocement par une combinaison de la chirurgie et de l'injection locale de CSM au niveau des lésions et dans les zones péri-lésionnelles. Un mois après, la progression de la brûlure a été arrêtée. La main a retrouvé des fonctions normales. Le second accidenté présentait une radionécrose extensive du bras gauche. Des CSM ont été injectées localement au patient en association avec le traitement chirurgical. Chez les deux victimes, les douleurs ont cessé. Très rapidement, l'évolution clinique est devenue favorable. La thérapie cellulaire a ainsi démontré son utilité pour la médecine réparatrice dans le traitement des irradiations locales (Lataillade et al. 2007; Bey et al. 2007).

PERSPECTIVES

L'utilisation des cellules souches doit être envisagée suivant le type cellulaire utilisé et la pathologie à traiter. Les cellules souches embryonnaires sont une source inépuisable de cellules souches pluripotentes permettant de reconstituer tous les tissus. Cependant elles sont loin de pouvoir être utilisées en clinique. En revanche, à l'heure actuelle, elles sont un formidable outil de recherche. Les cellules iPS issues de cellules adultes différenciées par reprogrammation, ont des propriétés semblables à celles des cellules ES, sans en avoir les inconvénients éthiques. Elles apportent un formidable espoir pour la reconstruction tissulaire. Les cellules souches fœtales ont permis de démontrer que la thérapie cellulaire pouvait s'appliquer aux maladies dégénératives du système nerveux mais elles nécessitent la récupération de nombreux fœtus (issus d'interruption volontaire de grossesse) pour traiter un patient. Les cellules souches issues du

sang de cordon recueilli au moment de l'accouchement sont une source de cellules souches plus immatures que les cellules adultes. Elles sont utilisées dans le traitement des hémopathies. Elles sont un enjeu économique important pour des firmes, en proposant aux parents de conserver les cellules de leur enfant pour des traitements ultérieurs. Les cellules souches adultes pourraient représenter le passé de la médecine régénérative puisqu'elles sont utilisées depuis quarante ans pour les greffes de moelle. Elles en sont également le présent puisqu'elles sont actuellement utilisées dans de nombreuses pathologies, les sources essentielles étant le muscle, le tissu adipeux et la moelle. Parmi les cellules souches adultes, les cellules souches mésenchymateuses ont une place à part. Il n'est pas nécessaire d'avoir une compatibilité entre le donneur et le receveur pour utiliser ces cellules. Ces propriétés font d'elles des cellules médicamenteuses à usage de régénération tissulaire dans des pathologies multiples. Elles montrent là tout leur intérêt en radiobiologie.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier mes pères scientifiques, René Buwet et Dominique Dormont.

BIBLIOGRAPHIE

- Aejaz, H.M., Aleem, A.K., Parveen, N., Khaja, M.N., Narusu, M.L., Habibullah, C.M. 2007. Stem cell therapy-present status. *Transplant Proc.* 39: 694–699.
- Bachoud-Lévi, A.C., Gaura, V., Brugières, P., Lefaucheur, J.P., Boissé, M.F., Maison, P., Baudic, S., Ribeiro, M.J., Bourdet, C., Remy, P., Césaro, P., Hantraye, P., Peschanski, M. 2006. Effect of fetal neural transplants in patients with Huntington's disease 6 years after surgery: a long-term follow-up study. *Lancet Neurol.* 5: 303 – 309.
- Ash, D. 2007; Lessons from Epinal. *Clin Oncol. (R Coll Radiol.)* 19: 614 – 615.
- Barberi, T., Klivenyi, P., Calingasan, N. Y., Lee, H., Kawamata, H., Loonam, K., Perrier, A. L., Bruses, J., Rubio, M. E., Topf, N., Tabar, V., Harrison, N. L., Beal, M. F., Moore, M. A., Studer, L. 2003. Neural subtype specification of fertilization and nuclear transfer embryonic stem cells and application in parkinsonian mice. *Nat Biotechnol.* 21(10): 1200 – 7. Epub 2003 Sep 21.
- Bensidhoum, M., Chapel, A., François, S., Demarquay, C., Mazurier, C., Fouillard, L., Bouchet, S., Gourmelon, P., Aigueperse, J., Thierry, D., Charbord, P., Gorin, N.C., Lopez, M.2004. Homing of in vitro expanded Stro-1- or Stro-1 + human mesenchymal stem cells into the NOD/SCID mouse. Their role in supporting human CD34 cell engraftment. *Blood* 103: 3313 – 3319.
- Bensidhoum, M., Gobin, S., Chapel, A., Lemaitre, G. Bouet, S., Waksman, G., Thierry, D., Martin, M.T.2005. Therapeutic effect of human mesenchymal stem cells in skin after radiation damage. *Journal de la Société de Biologie* 199: 337 – 341.
- Bertho, J.M., Prat, M., Frick, J., Demarquay, C., Gaugler, M.H., Dudoignon, N., Clairand, I., Chapel, A., Gorin, N.C., Thierry, D., Gourmelon, P.2005. Application of autologous hematopoietic cell therapy to a non human primate model of heterogeneous high dose irradiation. *Radiation research* 163: 557 – 570.
- Bey, E., Duhamel, P., Lataillade, J.J., De Revel, T., Carsin, H., Gourmelon, P. 2007. Treatment of radiation burns with surgery and cell therapy. A report of two cases. *Bull Acad Natl Med.* 191: 971 – 979.
- Bieback, K., Kern, S., Kocaömer, A., Ferlik, K., Bugert, P. 2008. Comparing mesenchymal stromal cells from different human tissues: bone marrow, adipose tissue and umbilical cord blood. *Biomed Mater Eng.* 18: S71 – S76.
- Bjorklund, L.M., Sanchez-Pernaute, R., Chung, S. 2002. Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model. *Proc Natl Acad Sci. USA* 99: 2344 – 2349.
- Casteilla, L. 2006. Débat: transdifférenciation, fait ou artifact. *INSERM Actualités*, N°196, février 2006.
- Chapel, A., Deas, O., Bensidhoum, M., Bouchet, S., Guillaume, T., Poncet, P., Hirsch, E., Thierry, D. 2004. *In vivo* gene targeting of IL-3 into hematopoietic progenitor cells through CD117 receptor mediated antibody gene delivery: possible implication for the treatment of aplastic anemia by gene therapy. *Genetic vaccines and gene therapy* 2: 16.
- Chiarini-Garcia, H., Raymer, AM, Russell L.D. 2003. Non-random distribution of spermatogonia in rats: evidence of niches in the seminiferous tubules. *Reproduction* 126: 669 – 680.
- Thierry, D., Bertho, J.M., Chapel, A., Gourmelon, P.2005. Cell Therapy for the Treatment of Accidental Radiation Overexposure. *British J Radiology* 27: 175 – 179.
- Dani, C. 2006. Débat: transdifférenciation, fait ou artifact. *INSERM Actualités*, N°196, février 2006.
- Collins, C.A., Olsen, I., Zammit, P.S., Heslop, L., Petrie, A., Partridge, T.A., Morgan, J.E. 2005. Stem cell function, self-renewal, and behavioral heterogeneity of cells from the adult muscle satellite cell niche. *Cell.* 122: 289 – 301.
- Douay, L.1985. Hematopoietic stem cells controls for autologous bone marrow transplantation monitoring. *Rev Fr Transfus Immunohematol.* 28: 397 – 409.
- Falanga, V., Iwamoto, S/, Chartier, M/, Yufit, T., Butmarc, J., Kouttab, N., Shraye, D., Carson, P.2007. Autologous bone marrow-derived cultured mesenchymal stem cells delivered in a fibrin spray accelerate healing in murine and human cutaneous wounds. *Tissue Eng.* 13: 1299 – 1312.
- Fortier, L.A. 2005. Stem Cells Classifications, controversies and clinical applications. *Veterinary Surgery* 34: 415 – 423.
- Fouillard, L., Bensidhoum, M., Bories, D., Bonte, H., Lopez, M., Moseley, A.M., Smith, A., Lesage, S., Beaujean, F., Thierry, D., Gourmelon, P., Najman, A., Gorin, N.C. 2003. Engraftment of allogeneic mesenchymal stem cells in the bone marrow of a patient with severe idiopathic aplastic anemia improves stroma. *Leukemia.* *Leukemia* 17: 474 – 476.
- Fouillard, L., Chapel, A., Bories, D., Bouchet, S., Costa, J.M., Rouard, H., Hervé, P., Gourmelon, P., Thierry, D., Lopez, M., Gorin, N.C. 2007. Infusion of allogeneic-related HLA mismatched mesenchymal stem cells for the treatment of incomplete engraftment following autologous haematopoietic stem cell transplantation *Leukemia* 21: 568 – 570.
- François, S. 2006. *Étude de la plasticité des cellules souches mésenchymateuses humaines (CSMh) après irradiation du tissu receveur dans le cadre d'une approche thérapeutique de l'atteinte multi-organe radio-induite.* Thèse de l'Université de Versailles-Saint Quentin en Yvelines, 205 p.
- François, S., Bensidhoum, M., Mouiseddine, M., Mazurier, C., Allenet, B., Semont, A., Frick, J., Saché, A., Bouchet, S., Thierry, D., Gourmelon, P., Gorin, N.C., Chapel, A.2006a. Local irradiation induces not only homing of human Mesenchymal Stem Cells (hMSC) at exposed sites but promotes their widespread engraftment to multiple organs: A study of their quantitative distribution following irradiation damages. *Stem Cells* 24: 1020 – 1029.
- François, S., Mouiseddine, M., Mathieu, N., Semont, A., Monti, P., Dudoignon, N., Saché, A., Boutarfa, A., Thierry, D., Voisin, P., Gourmelon, P., Chapel, A. 2006b. Mesenchymal Stem cells Favour healing of the cutaneous radiation syndrome. *Radioprotection* 41: 441 – 454.
- François, S., Mouiseddine, M., Mathieu, N., Semont, A., Monti, P., Dudoignon, N., Saché, A., Boutarfa, A., Thierry, D., Voisin, P., Gourmelon, P., Chapel, A. 2007a. Thérapie cellulaire par cellules souches mésenchymateuses d'une atteinte multi-organe radio-induite: modèle expérimental. *Radioprotection* 42: 351 – 367.
- François, S., Mouiseddine, M., Mathieu, N., Semont, A., Monti, P., Dudoignon, N., Saché, A., Boutarfa, A., Thierry, D., Gourmelon, P., Chapel, A. 2006b. Human mesenchymal stem cells favour healing of the cutaneous radiation syndrome in Non Obese Diabetes/Severe Combined a xenogenic transplant model. *Immunodeficiency mouse model. Annals of Hematology* 86: 1 – 8.
- Freeman, T.B., Cicchetti, F, Hauser, R.A.2000. Transplanted fetal striatum in Huntington's disease: phenotypic development and lack of pathology. *Proc Natl Acad Sci. USA* 97: 13877 – 13882.
- García-Olmo, D., García-Arranz, M., Herreros, D., Pascual, I., Peiro, C., Rodríguez-Montes, J. 2005. A phase I clinical trial of the treatment of Crohn's fistula by adipose mesenchymal stem cell transplantation. *Dis Colon Rectum* 48: 1416 – 1423.
- Gardner, R.L.2007. Stem cells and regenerative medicine: principles, prospects and problems. *C R Biol.* 330: 465 – 473.
- Gorin, N.C., Najman, A., Duhamel, G.1977. Autologous bone-marrow transplantation in acute myelocytic leukaemia. *Lancet* 1: 1050.

- Gregory, C.A., Ylostalo, J., Prockop, D.J. 2005. Adult bone marrow stem/progenitor cells (MSCs) are preconditioned by microenvironmental "niches" in culture: a two-stage hypothesis for regulation of MSC fate. *Sci Stroke*. 294: pe37.
- Grusby, M.J., Auchincloss, H.Jr, Lee, R., Johnson, R.S., Spencer, J.P., Zijlstra, M., Jaenisch, R., Papaioannou, V.E., Glimcher, L.H. 1993. Mice lacking major histocompatibility complex class I and class II molecules. *Proc Natl Acad Sci. USA* 90: 3913 – 3917.
- Gupta, A. & Dawson, T.M. 2007. The role of stem cells in Parkinson's disease. *Neurosurg Clin N Am*. 18: 129 – 142.
- Hadorn, E. 1968. Transdetermination in cells. *Scientific American* 219: 110 – 120.
- Hearn, J. 2007. Stem cell frontiers: science, ethics and regulation. *J Law Med*. 15: 32 – 35.
- Horwitz, E.M., Gordon, P.L., Koo, W.K., Marx, J.C., Neel, M.D., McNall, R.Y., Muul, L., Hofmann, T. 2002. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Proc Natl Acad Sci. USA* 98: 8932 – 8937.
- Huisman, C., Meijer, E., Petersen, E.J., Lokhorst, H.M., Verdonck, L.F. 2008. Hematopoietic stem cell transplantation after reduced intensity conditioning in acute myelogenous leukemia patients older than 40 years. *Biol Blood Marrow Transplant*. 14: 181 – 186.
- Jones, D.L. & Wagers, A.J. 2008. No place like home: anatomy and function of the stem cell niche. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 1: 11 – 21.
- Jordan, C.T. & Lemischka, I.R. 1990. Clonal and systemic analysis of long-term hematopoiesis in the mouse. *Genes Dev*. 4: 220 – 232.
- Laird, D.J., Von Andrian, U.H., Wagers, A.J. 2008. Stem cell trafficking in tissue development, growth, and disease. *Cell* 132: 612 – 630.
- Lataillade, J.J., Doucet, C., Bey, E., Carsin, H., Huet, C., Clairand, I., Bottolier-Depois, J.F., Chapel, A., Ernou, I., Gourven, M., Boutin, L., Hayden, A., Carcamo, C., Buglova, E., De Revel, T., Gourmelon, P. 2007. A new approach of radiation-burn treatment by dosimetry-guides surgery combined with autologous mesenchymal stem cells therapy. *Regen Med*. 2: 785 – 794.
- Lasic, S.E. & Barker, R.A. 2003. The future of cell-based transplantation therapies for neurodegenerative disorders. *J Hematother Stem Cell Res*. 12: 635 – 642.
- Le Blanc, K., Rasmusson, I., Sundberg, B., Götherström, C., Hassan, M., Uzunel, M., Ringdén, O. 2004. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet* 363: 1439 – 1441.
- Lefaix, J.L. & Daburon, F. 1998. Diagnosis of acute localized irradiation lesions: review of the French experimental experience. *Health Phys*. 75, 375 – 384.
- Li, W.C., Yu, W.Y., Quinlan, J.M., Burke, Z.D., Tosh, D. 2005. The molecular basis of transdifferentiation. *J Cell Mol Med*. 9: 569 – 582.
- Lin, H. 2008. Cell biology of stem cells: an enigma of asymmetry and self-renewal. *J Cell Biol*. 180: 257 – 260.
- Lovell-Badge, R.H., Bygrave, A.E., Bradley, A., Robertson, E., Evans, M.J., Cheah, K.S. 1985. Transformation of embryonic stem cells with the human type-II collagen gene and its expression in chimeric mice. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 50: 707 – 711.
- Menasché, P., Alfieri, O., Janssens, S., McKenna, W., Reichenspurner, H., Trinquart, L., Vilquin, J.T., Marolleau, J.P., Seymour, B., Larghero, J., Lake, S., Chatellier, G., Solomon, S., Desnos, M., Hagège, A.A. 2008. The Myoblast Autologous Grafting in Ischemic Cardiomyopathy (MAGIC) trial: first randomized placebo-controlled study of myoblast transplantation. *Circulation* 117: 1189 – 1200.
- Mitsiadis, T.A., Barrandon, O., Rochat, A., Barrandon Y., De Bari, C. 2007. Stem cell niches in mammals. *Exp Cell Res*. 313: 3377 – 3385.
- Morishita T, Honoki K, Ohgushi H, Kotobuki N, Matsushima A, Takakura Y. 2006. Tissue engineering approach to the treatment of bone tumors: three cases of cultured bone grafts derived from patients' mesenchymal stem cells. *Artif Organs*. 30: 115 – 118.
- Morrison, S.J. & Spradling, A.C. 2008. Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell* 132: 598 – 611.
- Mouisseddine, M. 2008. *Utilisation des Cellules Souches Mésochymateuses humaines dans les atteintes tissulaires radio induites*. Thèse de l'Université de Versailles-Saint Quentin en Yvelines, 182 p.
- Mouisseddine, M., François, S., Semont, A., Saché, A., Allenet, B., Mathieu, N., Frick, J., Thierry, D., Chapel, A. 2007. Human mesenchymal stem cells home specifically to radiation-injured tissues in a non-obese diabetes/severe combined immunodeficiency mouse model. *Br J Radiol*. 80: 49 – 55.
- Munsie, M.J., Michalska, A.E., O'Brien, C.M., Trounson, A.O., Pera, M.F., Mountford, P.S. 2000. Isolation of pluripotent embryonic stem cells from reprogrammed adult mouse somatic cell nuclei. *Curr Biol*. 10: 989 – 992.
- Nasef, A., Chapel, A., Mazurier, C., Bouchet, S., Lopez, M., Mathieu, N., Sensebe, L., Zhang, Y., Gorin, N.C., Thierry, D., Fouillard, L. 2007. Identification of IL-10 and TGF-beta transcripts involved in the inhibition of T-lymphocyte proliferation during cell contact with human mesenchymal stem cells. *Gene Expr*. 13: 217 – 226.
- Nasef, A., Mathieu, N., Chapel, A., Frick, J., François, S., Mazurier, C., Boutarfa, A., Bouchet, S., Gorin, N.C., Thierry, D., Fouillard, L. 2007. Immunosuppressive effects of mesenchymal stem cells: involvement of HLA-G. *Transplantation* 84: 231 – 237.
- Odorico, J.S., Kaufman, D.S., Thomson, J.A. 1999. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem cells* 19: 193 – 204.
- Osawa, M., Hanada, K., Hamada, H., Nakauchi, H. 1996. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science* 272: 242 – 245.
- Palmer, T.D., Willhoite, A.R., Gage, F.H. 2000. Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *J Comp Neurol*. 425, 479 – 494.
- Peiffert, A.D., Simon, J.M., Eschwege, F. 2007. Epinal radiotherapy accident: passed, present, future. *Cancer Radiother*. 11: 309–312.
- Piccini, P., Brooks, D.J., Bjorklund, A. 1992. Dopamine release from nigral transplants visualized in vivo in a Parkinson's patient. *Nat Neurosci*. 2: 1137 – 1140.
- Pittenger, M.F. 2008. Mesenchymal stem cells from adult bone marrow. *Methods Mol Biol*. 449: 27 – 44.
- Potten, C.S. 1997. Epithelial cell growth and differentiation. II. Intestinal apoptosis. *Am J Physiol*. 273: 253 – 257.
- Potten, C.S. & Booth, C. 1997. The role of radiation-induced and spontaneous apoptosis in the homeostasis of the gastrointestinal epithelium: a brief review. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 118: 473 – 478.
- Raff, M. 2003. Adult stem cell plasticity: fact or artifact. *Annual Reviews of Cell and Developmental Biology* 19: 1 – 22.
- Reed, C.R., Greene, P.E., Breeze, R.E., Wei-Yann, T., Dumoichel, W., Kao, R., Dillon, R.N., Winfiel, F., Culver, S., Trojanowski, J.Q., Eidelberg, D., Fahn, S. 2001. Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe parkinson's disease. *The New England Journal of Medicine* 344: 710 – 719.
- Reubinoff, B.E., Itsykson, P., Turetsky, T. 2001. Neural progenitors from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*. 19: 1134 – 1140.
- Ringdén, O., Uzunel, M., Sundberg, B., Lönnies, L., Nava, S., Gustafsson, J., Henningsohn, L., Le Blanc, K. 2007. Tissue repair using allogeneic mesenchymal stem cells for hemorrhagic cystitis, pneumomediastinum and perforated colon. *Leukemia* 11: 2271 – 2276.

- Romanov, Y.A., Svintsitskaya, V.A., Smirnov, V.N. 2003. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. *Stem Cells*. 21: 105 – 110.
- Roobrouck, V.D., Ulloa-Montoya, F., Verfaillie, C.M. 2008. Self-renewal and differentiation capacity of young and aged stem cells. *Exp Cell Res*. 314: 1937 – 1944.
- Scanff, P., Souidi, M., Grison, S., Griffiths, N.M., Gourmelon, P. 2004. Alteration of the enterohepatic recirculation of bile acids in rats after exposure to ionizing radiation. *Can J Physiol Pharmacol*. 82: 114 – 124.
- Semont, S., François, M., Mouiseddine, A., François, A., Saché, J., Frick, J., Thierry, D., Chapel, A. 2006. Mesenchymal stem cells increase self-renewal of small intestinal epithelium and accelerate its structural recover after radiation injury. *Adv Exp Med Biol*. 585: 19 – 30.
- Sordi, V., Bertuzzi, F., Piemonti, L. 2008. Diabetes mellitus: an opportunity for therapy with stem cells? *Regen Med*. 3: 377 – 397.
- Souidi, M., Scanff, P., Grison, S., Gourmelon, P., Aigueperse, J. 2007. Effects of ionizing radiation on the activity of the major hepatic enzymes implicated in bile acid biosynthesis in the rat. *C R Biol*. 330: 861 – 870.
- Sun, X., Fu, X., Sheng, Z. 2007. Cutaneous stem cells: something new and something borrowed. *Wound Repair Regen*. 15: 775 – 785.
- Takahashi, K. & Yamanaka, S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126: 663–676.
- Templeton, A. & Braude, P. 2007. Umbilical cord blood banking and the RCOG. *The Lancet* 369: 1077.
- Thierry, D., Bertho, J.M., Chapel, A., Gourmelon, P. 2005. Cell therapy for the treatment of accidental radiation overexposure. *BJR* 27: 175 – 179.
- Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., Jones, J.M. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282: 1145 – 1147.
- Tosh, D. & Slack J.M.W. 2002. How cells change their phenotype. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 3: 187 – 194.
- Wagers, A.J. 2004. Plasticity of adult stem cells. *Cell* 116: 639 – 648.
- Wagers, A.J. (2005), Stem cell grand SLAM. *Cell* 7: 967 – 970.
- Wagner, W. & Ho AD. 2007. Mesenchymal stem cell preparations-comparing apples and oranges. *Stem Cell Rev*. 3: 239 – 248.
- Xie, T. & Spradling, A.C. 1998. Decapentaplegic is essential for the maintenance and division of germline stem cells in the Drosophila ovary. *Cell* 94: 251 – 260.
- Yamanaka, S. 2007. Strategies and new developments in the generation of patient-specific pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 1: 39 – 49.
- Yu, J., Vodyanik, M.A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J.L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G.A., Ruotti, V., Stewart, R., Slukvin, I.I., Thomson, J.A. 2007. Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells. *Science* 318: 1917 – 1920.
- Zhang, S.C., Wernig, M., Duncan, I.D., Brustle, O., Thomson, J.A. 2001. In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*. 19: 1129 – 1133.
- Zhang, Y.Z., Fouillard, L., Chapel, A., Bensidhoum, M., Mazurier, C., Nasef, A., Bouchet, S., Lopez, M., Thierry, D., Gorin, N.C., Da, W.M. 2005. Mesenchymal stem cells from human proximal femurs possess immunosuppressive activity. *National Medical Journal of China* 85: 2780 – 2784.

