

Présentation des projets financés au titre de l'édition du 2010  
 Programme « Recherche Finalisée sur les Cellules Souches RFCS »

<b>CAPSULE</b> – Encapsulation des facteurs paracrines des cellules souches mésenchymateuses gingivales (CSMg) en vue de leur utilisation thérapeutique. ....	2
<b>GERMPLAST</b> – Cellules souches germinales et progéniteurs: caractérisation et reprogrammation .....	4
<b>GPiPS</b> – Dérivation de cellules pluripotentes induites (iPS) humaines normales et pathologiques en photorécepteurs: applications thérapeutiques pour les rétinites pigmentaires.....	6
<b>HD-SCT</b> – Evaluation préclinique d'une thérapie cellulaire de la maladie de Huntington fondée sur l'utilisation de cellules souches pluripotentes.....	8
<b>hiPS-DC-testing</b> – Développement de modèles de cellules dendritiques dérivées de cellules iPS humaines pour les tests de criblage in vitro .....	10
<b>Liv-iPS</b> – Modélisation et approches thérapeutiques de maladies génétiques hépatiques à l'aide de cellules iPS spécifiques de patients .....	12
<b>MobiNiCSH</b> – Mobilisation et nichage des cellules souches hématopoïétiques : apport des mimes d'héparane sulfate.....	14
<b>STREAM</b> – Rétention différentielle de cellules souches sur des critères d'affinité ou mécaniques .....	16

# Programme RFCS

Edition 2010

<b>Titre du projet</b>	<b>CAPSULE</b> – Encapsulation des facteurs paracrines des cellules souches mésenchymateuses gingivales (CSMg) en vue de leur utilisation thérapeutique
<b>Résumé</b>	<p>Les Cellules Souches Stromales Mésenchymateuses (CSM) font l'objet de nombreux essais cliniques dans le domaine de la médecine régénérative du fait de leur propriété multipotente mais surtout de leur propriété stromale. En effet, elles sont capables de produire un ensemble de facteurs de croissance, cytokines, chimiokines aux multiples actions trophiques, anti-inflammatoires, antiseptiques et antalgiques. C'est le rôle de ces facteurs, d'action paracrine, qui font aujourd'hui parler de ces cellules comme des cellules "médicaments". Les CSM qui sont utilisées aujourd'hui dans la plupart des essais cliniques, sont d'origine médullaire ou adipeuse. Il existe une nouvelle source originale représentée par la muqueuse gingivale qui commence seulement à être explorée. En effet, la Cellule Souche Stromale Mésenchymateuse Gingivale (CSMg) est une cellule aux caractéristiques de cellules progénitrices et qui donne à la gencive une capacité de cicatrisation exceptionnelle, de type embryonnaire, sans cicatrice anormale ni fibrose. Ces propriétés seraient liées à une capacité de production particulière de certains facteurs impliqués dans le remodelage matriciel. Si les CSM et les CSMg en particulier, représentent un intérêt croissant dans le domaine de la régénération tissulaire lié à leurs produits de sécrétion, se pose alors le problème de la production de ces produits en quantité et qualité compatibles avec une utilisation thérapeutique et le problème de leur mode d'administration. Notre projet propose : 1/d'optimiser la sécrétion des facteurs paracrines par les CSMg en les cultivant dans un environnement à faible concentration d'oxygène (hypoxie) 2/de mettre au point un protocole de production standardisé basé sur l'établissement d'une lignée cellulaire de CSMg immortalisée 3/de proposer une forme de présentation originale qui permettra une administration cutanée adaptée à un relargage contrôlé des facteurs</p>

paracrines des CSMg. Le projet repose sur l'association de groupes aux compétences techniques et scientifiques complémentaires : biologistes cellulaires, physico-chimistes et spécialistes en thérapie cellulaire. Il associe l'expertise de trois laboratoires académiques (Université Paris Descartes; Inserm et Collège de France) et associe une Société de biothérapie (ScarCell Therapeutics). Il se positionne dans une recherche de type industrielle pouvant déboucher sur la mise sur le marché d'un produit bio-actif visant à améliorer la qualité du processus de cicatrisation par une action ciblant le remodelage tissulaire.

**Partenaires**

Université Paris Descartes (UPD)  
Laboratoire Chimie de la Matière de Paris - UMR7574 - N. NASSIF  
Inserm U972 - J.J. LATAILLADE  
ScarCell Therapeutics - L. LALLEMENT

**Coordinateur**

Bernard COULOMB - Université Paris Descartes (UPD)  
bernard.coulomb@parisdescartes.fr

**Aide de l'ANR**

500 397€

**Début et durée**

Mars 2011 - 24 mois

**Label pôle**

Medicen

**Titre du projet****GERMPLAST** – Cellules souches germinales et progéniteurs: caractérisation et reprogrammation**Résumé**

Les cellules souches germinales (CSG) assurent le maintien de la spermatogenèse dans le testicule des mammifères tout au long de la vie d'un individu. In vitro, les GSG et/ou les progéniteurs germinaux peuvent se reprogrammer spontanément en cellules souches pluripotentes, et nous avons montré chez la souris que les progéniteurs germinaux peuvent se reprogrammer in vivo en cellules souches fonctionnelles. Ce projet vise à caractériser, dans le modèle murin et chez l'homme, les CSG et les progéniteurs qui pourraient constituer une nouvelle source de cellules souches en thérapie cellulaire. Nos objectifs sont (i) d'identifier les marqueurs phénotypiques permettant de purifier chez l'homme la population de CSG et les populations de progéniteurs spermatogoniaux, (ii) de développer des méthodes de culture afin d'amplifier les CSG humaines in vitro, (iii) d'étudier les mécanismes de reprogrammation touchant les CSG et les progéniteurs germinaux dans le modèle murin et chez l'homme. Nous chercherons notamment à augmenter l'efficacité de cette reprogrammation in vitro à l'aide de molécules pharmacologiques, et nous étudierons si le gène suppresseur de tumeur p53 et le gène p21WAF1/CIP1 contrôlent et inhibent cette reprogrammation germinale. Ce projet s'inscrit dans les axes thématiques 1 (Amélioration des techniques d'obtention, de production, d'amplification et de conservation des cellules souches) et 2 (Maîtrise de la reprogrammation) du présent appel d'offres. Un des atouts de notre proposition est de réunir dans un même projet une approche combinant deux modèles, la souris et l'homme, et une approche cellulaire, génétique et moléculaire afin d'avancer dans la compréhension des mécanismes régulant cette plasticité. Ce projet réunit dans un effort commun des équipes de différentes institutions à Paris (CEA-INSERM-APHP-University Paris V). Un des objectifs majeurs est de créer de fortes interactions entre des équipes de recherche et des services cliniques de reproduction comme le Centre d'Etude et de Conservation des Oeufs et du Sperme de l'Hôpital Cochin autour de ce sujet, afin à terme de traduire les résultats scientifiques de recherche fondamentale en application médicale et au développement d'une thérapie

cellulaire. Ces études devraient contribuer à déterminer si les CSG et les progéniteurs peuvent constituer une source alternative de cellules pour (i) la génération in vitro de cellule souches pluripotentes histocompatibles à partir de biopsie testiculaire d'un patient adulte, mais également pour (ii) le traitement de problèmes d'infertilité par thérapie cellulaire après transplantation testiculaire. Enfin, les travaux sur la plasticité germinale devraient également aider à déterminer si des mécanismes moléculaires communs régulent les différents modèles cellulaires de reprogrammation, et ainsi contribuer à améliorer les techniques de reprogrammation d'autres modèles comme les iPS.

**Partenaires** CEA/DSV/IRCM/SCSR/LGAG  
SHEBR/APHP – J.P. Wolf

**Coordinateur** Pierre FOUCHET - CEA/DSV/IRCM/SCSR/LGAG  
pierre.fouchet@cea.fr

**Aide de l'ANR** 495 304€

**Début et durée** Mars 2011 - 36 mois

**Label pôle**

**Titre du projet****GPiPS** – Dérivation de cellules pluripotentes induites (iPS) humaines normales et pathologiques en photorécepteurs: applications thérapeutiques pour les rétinites pigmentaires**Résumé**

La possibilité de reprogrammer des cellules somatiques en cellules pluripotentes (iPS) offre un énorme potentiel en médecine régénérative. Dans les pathologies touchant la rétine, et plus particulièrement les rétinites pigmentaires (RP) liées à une perte des photorécepteurs, la transplantation de cellules permettant la restauration de la vision peut être considérée comme une approche alternative à la thérapie génique, aux vues de l'hétérogénéité étiologique touchant les patients souffrant de RP. Par ailleurs la génération de cellules iPS de patients souffrant de RP offre une opportunité pour étudier dans un modèle in vitro les effets d'un gène déficient dans le développement rétinien humain. L'utilisation des cellules souches pluripotentes nécessite une compréhension détaillée des processus développementaux qui sous-tendent la formation de la rétine et l'identification des facteurs clés impliqués dans la différenciation des photorécepteurs. Cette approche est actuellement développée dans l'équipe d'O. Goureau à l'Institut de la Vision (INSERM UMR\_S968) en utilisant différentes approches transcriptomiques et par la mise au point d'un protocole permettant la différenciation des cellules ES humaines en photorécepteurs en collaboration avec l'INSERM UMR861-ISTem (Drs C. Monville et Y. Laabi). La participation du CIC503 du CHNO des Quinze-Vingts, associé au centre des maladies rares, qui est centralisé sur les pathologies de la rétine, permettra de générer de cellules iPS de patients souffrant de RP. L'objectif principal de ce projet est de développer des études précliniques indispensables au développement de thérapies cellulaires en ophtalmologie utilisant les cellules iPS. Nous souhaitons ainsi i) reprogrammer des keratinocytes issus de cheveux de patients sains et souffrant de RP en cellules iPS, ii) développer des lignées reportrices de cellules iPS permettant de produire de produire et d'isoler efficacement des précurseurs des photorécepteurs à partir de ces lignées et iii) développer des modèles humains in vitro de RP (inexistants actuellement) à partir des cellules iPS de patients atteints

de RP. L'utilisation des cellules iPS offre l'opportunité de customiser des lignées de cellules iPS pour évaluer rapidement leur engagement et leur différenciation dans les lignages rétiniens. Nous construirons ainsi des lignées d'iPS exprimant un fluorochrome différent en fonction de leur stade d'engagement dans le processus de différenciation rétinienne et plus spécifiquement en photorécepteurs. Cette lignée exprimera une « cassette fluorescente reportrice » qui contient les gènes codant pour les protéines fluorescentes eCFP, eYFP ou Cherry, respectivement sous le contrôle d'un promoteur spécifique d'un phénotype rétinien particulier, Chx10 (progéniteurs de la rétine neurale), Nrl (précurseurs des photorécepteurs) et rhodopsine (photorécepteurs à bâtonnet). Cette lignée de cellules iPS- [Chx10p-eCFP / Nrlp-eYFP / Rhop-Cherry] nous permettra également de purifier rapidement des cellules au phénotype désiré afin d'obtenir une population cellulaire homogène, pour des études plus fines de caractérisation moléculaire (transcriptome, antigènes de surface,...) et des études de transplantation in vitro dans des explants rétiniens. Nous produirons ces lignées iPS customisées à partir de keratinocytes de patients sains mais également de patients souffrant de RP (mutation identifiée sur le gène de la rhodopsine et sur celui du facteur de transcription crx). L'utilisation des iPS portant la mutation de type RP nous permettra de décortiquer les mécanismes moléculaires et cellulaires qui sous-tendent la perte des photorécepteurs dans ces RP spécifiques. Nous chercherons ainsi à identifier des biomarqueurs cellulaires accompagnant ces pathologies en comparant les lignées iPS natives et mutantes par différentes approches (transcriptome, cytométrie en flux, ...)

**Partenaires**

U 968  
INSERM U 861 - ISTEM – C. Monville  
CIC 503 – I. Audo

**Coordinateur**

Olivier Goureau - U 968  
olivier.goureau@inserm.fr

**Aide de l'ANR**

450 580€

**Début et durée**

Mars 2011 - 36 mois

**Label pôle**

**Titre du projet****HD-SCT** – Evaluation préclinique d’une thérapie cellulaire de la maladie de Huntington fondée sur l’utilisation de cellules souches pluripotentes**Résumé**

La maladie de Huntington (MH) est une maladie monogénique dévastatrice. Il n'existe aucun traitement connu de cette pathologie. Les symptômes (moteurs, cognitifs, psychiatriques) sont associés à une dégénérescence massive des neurones moyens épineux GABA du striatum. Les patients ne survivent que 15-18 ans à l'apparition des premiers symptômes. Un essai clinique récent a montré que la MH serait améliorée par une approche de thérapie cellulaire fondée sur l'utilisation de cellules fœtales humaines. Cependant, cette technique est contrainte par d'importants problèmes logistiques et éthiques qui en limitent considérablement l'application clinique. Des types cellulaires plus adaptés à une utilisation en milieu hospitalier sont donc requis au plus vite. Identifier et valider l'efficacité thérapeutique de telles cellules reste une étape incontournable du redéploiement clinique de la stratégie de thérapie cellulaire. En raison de leur énorme potentiel de différenciation et d'autorenouvellement, les cellules souches pluripotentes humaines pourraient constituer, de parfaits candidats au remplacement des cellules embryonnaires précédemment utilisées. En effet, nous avons démontré récemment que les cellules ES d'homme peuvent être différenciées en progéniteurs, puis en neurones du striatum aussi bien in vitro qu'in vivo chez le rat, dans un modèle de la MH. Ceci suggère un réel potentiel thérapeutique de ces types de cellules. Le programme de recherche HD-SCT proposé, s'appuiera sur les avancées récentes en biologie des cellules souches, sur les essais pré-cliniques et cliniques utilisant des cellules fœtales réalisés dans des modèles singes de la MH et chez des patients. Les objectifs de HD-SCT sont d'évaluer le potentiel thérapeutique des cellules souches pluripotentes dans un contexte pré-clinique (allogreffe) et de développer les protocoles nécessaires à l'établissement de banques de « grade clinique » de lots progéniteurs de neurones striataux, prêts à l'emploi, standardisés et surs. L'efficacité thérapeutique des tissus fœtaux greffés aux patients MH a été validée dans des modèles de la MH chez le primate. Cela s'explique par le fait que les neurones humains se développent trop lentement pour être évalués chez le rat. De plus, les tests cognitifs et moteurs chez le singe sont plus pertinents. Enfin une stratégie de thérapie cellulaire «



allogreffe » est mieux à même d'imiter la situation clinique (réponse immunitaire de l'hôte en réponse à la greffe). En conséquence, notre premier objectif est d'évaluer le potentiel thérapeutique des cellules striatales provenant de cellules ES et iPSC de singe dans un modèle simien de la MH. Plusieurs techniques de neuro-imagerie et de multiples tests comportementaux seront utilisées afin de mesurer la fonctionnalité du greffon, sa maturation et son intégration anatomique. En parallèle, le deuxième objectif de ce projet sera de modifier les protocoles de différenciation mis au point dans le cadre de la recherche académique afin de les adapter aux normes de qualité « grade clinique », indispensables à une utilisation en milieu clinique. La question du développement des protocoles nécessaires à la constitution de banques de cellules striatales « prêtes-à-greffer » sera également étudiée. Enfin, HD-SCT abordera la génération d'une lignée de cellules souches pluripotentes « prêtes-pour-la-transgénése » en testant la technologie de recombinaison homologue facilitée par l'utilisation de méganucleases sur les cellules ES. L'impact attendu du programme HD-SCT est d'accélérer le développement d'une application clinique de cellules souches pluripotentes humaines pour le traitement de la maladie de Huntington. Pour cela, HD-SCT s'appuiera sur un consortium de trois partenaires expérimentés dans le domaine de la biologie des cellules souches, des études précliniques chez le primate, des études cliniques chez des patients MH et de l'ingénierie génomique.

**Partenaires**

Inserm/UEVE UMR861, I-STEM  
CEA/CNRS URA2210, MIRCEN – P. HANTRAYE  
Collectis SA – D. Sourdive

**Coordinateur**

Anselme Perrier - I-STEM  
aperrier@istem.fr

**Aide de l'ANR**

617 340€

**Début et durée**

Mars 2011 - 36 mois

**Label pôle**

Medicen

**Titre du projet****hiPS-DC-testing** – Développement de modèles de cellules dendritiques dérivées de cellules iPS humaines pour les tests de criblage in vitro**Résumé**

Le développement de nouveaux modèles cellulaires pertinents est devenu incontournable pour tester la toxicité des substances cosmétiques. Les enjeux industriels sont d'autant plus importants que les directives européennes interdiront, dès 2013, l'utilisation de modèle animal en dermatologie et cosmétologie. L'absence d'alternatives crédibles limite le développement industriel et la mise sur le marché des nouveaux produits, constituant un enjeu de développement majeur pour l'industrie. L'urgence est d'autant plus forte que l'utilisation de produits allergisants, irritants et/ou inflammatoires ne cesse de progresser dans la consommation courante. Les cellules dendritiques (DC) définissent un excellent modèle permettant de tester les propriétés inflammatoires et allergisantes d'un produit. La source utilisée habituellement pour obtenir des DC est le monocyte sanguin qui différencie en DC sous l'influence de cytokines. Cependant, plusieurs obstacles limitent l'utilisation courante des monocytes, i) la nécessité d'utiliser des produits sanguins, ii) la quantité limitée de monocytes et leur durée de vie, iii) la variabilité introduite par l'origine des donneurs affecte la reproductibilité inter-tests des essais. Dans ce projet, nous proposons d'utiliser les cellules humaines pluripotentes reprogrammées (hiPS) pour générer des DC fonctionnelles. Ces DC dérivées d'hiPS représentent un modèle attractif et pertinent pour des applications industrielles, notamment en matière de reproductibilité et de stabilité. Il est important de constater que jusqu'à présent la possibilité de générer de manière standardisée des DC à partir de cellules souches n'est pas encore exploitée. Le consortium qui anime ce projet est constitué par 3 équipes expérimentées et complémentaires : la différenciation de cellules souches (UMR CNRS), la production gmp de DC pour des applications de thérapie cellulaire (UTCG), l'utilisation de tests in vitro pour des applications industrielles (ImmunoSearch). Les résultats préliminaires obtenus par le consortium attestent de la faisabilité scientifique du projet proposé. A partir de clones de hiPS, obtenus par reprogrammation de cellules de tissu adipeux humain, nous avons pu démontrer leur potentialité à générer des DC et notamment des DC présentant un

phénotype similaire à celui des DC résidentes de la peau. Les principaux objectifs seront d'optimiser le procédé de différenciation des hiPS en DC et de mettre en place un prototype de production standardisé compatible avec une première application industrielle déjà identifiée (ImmunoSearch). Les principales étapes du programme concernent, i) la sélection de clones iPS (issus de donneurs différents) qui présentent une forte potentialité « dendritique », ii) la recherche des meilleures conditions de différenciation pour générer des DC fonctionnelles et similaires aux DC de la peau, iii) la standardisation d'un prototype de production de DC dérivées d'hiPS, iv) la validation par une application industrielle du prototype de production ouvrant vers une utilisation industrielle à plus large échelle. Les retombées scientifiques de ce projet sont prometteuses et concernent notamment l'étude de la différenciation de DC à partir de cellules souches. Les retombées industrielles sont nombreuses avec une première validation réalisée en collaboration avec Immunosearch. Cette validation industrielle permettra de valoriser les efforts de développement de chaque partenaire dans le cadre d'un accord de consortium et facilitera l'exploitation et la diffusion de ce modèle à d'autres acteurs industriels. L'ensemble de ce projet est parfaitement intégré et en cohérence avec les items présentés dans le cadre de l'axe 4 du présent appel à projet ANR.

**Partenaires**

UMR6543 -Cellules souches et differenciation  
Unité de Thérapie Cellulaire et Génique – A. DOGLIO  
ImmunoSearch – H. Groux

**Coordinateur**

Christian DANI - CNRS-IBDC  
dani@unice.fr

**Aide de l'ANR**

347 724€

**Début et durée**

Mars 2011- 24 mois

**Label pôle**

**Titre du projet****Liv-iPS – Modélisation et approches thérapeutiques de maladies génétiques hépatiques à l'aide de cellules iPS spécifiques de patients****Résumé**

La transplantation d'hépatocytes est maintenant une alternative à la greffe orthotopique du foie pour le traitement des maladies métaboliques sévères. Cependant la pénurie d'organes transplantables s'aggrave et les hépatocytes ne peuvent être amplifiés in vitro. Il y a donc un réel besoin de trouver des sources alternatives de cellules telles que les cellules souches qui pourraient être amplifiées puis différenciées en hépatocytes in vitro. Les cellules souches humaines pluripotentes induites (iPS) par reprogrammation de cellules somatiques sont une source attractive de cellules souches puisqu'elles sont capables à la fois de proliférer indéfiniment in vitro et de se différencier en un grand nombre de tissus adultes. De plus ces cellules sont faciles d'accès, ne posent pas de problèmes éthiques et peuvent être dérivées de patients. Deux types d'applications distinctes peuvent être envisagées selon l'origine des cellules iPS. - Les hépatocytes dérivés d'iPS d'individus normaux peuvent être utilisés pour des banques de cellules en vue d'applications en médecine régénérative. La génération d'hépatocytes à partir d'iPS d'individus adultes sélectionnés faciliterait la constitution de banques de lignées cellulaires de génotypes connus, offrant aux patients une relative compatibilité génétique et impliquant une immunosuppression minimale lors de la transplantation. Ces cellules pourraient aussi être utilisées dans des foies bioartificiels pour le traitement transitoire des insuffisances hépatiques aiguës. - Les hépatocytes dérivés d'iPS d'individus atteints de maladies monogéniques : la thérapie génique/cellulaire spécifique par patient est la thérapie idéale pour éviter un rejet cellulaire et la nécessité d'une immunosuppression lorsque l'expression à long terme du transgène est requise, ce qui est le cas pour la correction génétique des maladies métaboliques du foie. Ainsi, outre la différenciation en hépatocytes normaux, nous nous focaliserons sur deux maladies métaboliques pour lesquelles nous développons des approches de thérapie génique/cellulaire ex vivo : L'hypercholestérolémie familiale de type IIa, due à une mutation dans le récepteur des

lipoprotéines de faible densité (LDLR), résulte en l'élévation anormale du taux de cholestérol conjugué aux LDL (LDLc). En effet, seuls les hépatocytes peuvent endocyter et dégrader les LDLc, via le LDLR. Les patients hétérozygotes (1/500) sont traités, avec une efficacité variable, par une combinaison de médicaments, dont les statines, et ont des accidents cardiovasculaires dès 40 ans. Les patients FH homozygotes (1/106) ont des problèmes cardiovasculaires sévères dès l'enfance. Seule l'aphérèse est efficace, mais agressive, pour diminuer leur taux de cholestérol mais, en dépit du traitement, ces patients décèdent d'accidents cardiovasculaires dès 50 ans. L'hémophilie B, due à des mutations du gène codant le facteur IX (FIX) de la coagulation, situé sur le chromosome X, est une maladie hémorragique de prévalence 1/60 000 chez les garçons. La gravité de la maladie est inversement corrélée à l'activité résiduelle du FIX. Une augmentation de 5% de cette activité résiduelle suffit à transformer une hémophilie sévère très invalidante en hémophilie modérée avec une qualité de vie bien meilleure. Un traitement substitutif avec du FIX recombinant ou purifié du plasma est disponible, mais très coûteux et contraignant. De plus ce traitement peut entraîner l'apparition d'anticorps anti-FIX neutralisants. Nos objectifs scientifiques sont d'établir la validité 1) de nos conditions de différenciation des cellules iPS humaines et simiennes en hépatocytes différenciés. 2) de leur utilisation dans notre approche de thérapie génique ex vivo évaluée dans un modèle primate proche de l'homme. Les objectifs économiques sont de proposer aux partenaires industriels des hépatocytes différenciés dérivés de cellules iPS normales et pathologiques pour le criblage de médicaments.

**Partenaires**

InsermU972  
Cambridge University – L. Vallier  
CEA/IMETI - InsermU962 – P. Leboulch

**Coordinateur**

Anne Weber-Benarous - InsermU972  
anne.weber@inserm.fr

**Aide de l'ANR**

699 996€

**Début et durée**

Janvier 2011 - 36 mois

**Label pôle**

**Titre du projet****MobiNiCSH – Mobilisation et nichage des cellules souches hématopoïétiques : apport des mimes d'héparane sulfate****Résumé**

La transplantation de cellules souches hématopoïétiques autologues (auto-HSCT) est le moyen le plus utilisé pour prévenir l'aplasie chez des patients traités par chimiothérapie à haute dose (Villanueva et al., 2006). Le succès de l'auto-HSCT dépend de la quantité des cellules souches hématopoïétiques (CSHs) injectées et de leurs capacités à retourner dans la moelle osseuse, à s'y nicher et à reconstituer une hématopoïèse normale (Jillella et al., 2004). Actuellement, l'auto-HSCT est pratiquée après mobilisation et injection de cellules hématopoïétiques enrichies en CSHs, mais le protocole permettant de mobiliser, manipuler et transplanter les cellules hématopoïétiques autologues enrichies en CSHs n'est pas clairement établi. Les progrès dans l'auto-HSCT se basent sur la connaissance des interactions entre les CSHs et leur microenvironnement médullaire mais très peu de méthodes sont actuellement disponibles pour étudier ces processus in vivo en temps réel et sans interférence. Parmi ces méthodes, les stratégies d'imagerie cellulaire in vivo qui permettent d'observer le devenir d'un très petit nombre de CSHs dans un organisme vivant sont les approches les plus prometteuses pour suivre in vivo le devenir de CSHs transplantées et la régulation de leur devenir par le microenvironnement médullaire. Nous avons récemment développé un système d'imagerie confocal par fibre optique qui est insérée à l'intérieur du fémur d'une souris et qui permet, par navigation dans la cavité fémorale, d'observer les cellules fluorescentes résidentes dans les fémurs d'animaux vivants. En utilisant ce système d'imagerie, nous avons visualisé la reconstitution hématopoïétique chez des souris irradiées à 10 Gy et transplantées avec 1000 CSHs, avec des observations allant de quelques heures à plusieurs jours ou plusieurs semaines chez le même animal (Lewandowski et al., 2010). En utilisant et développant ce système d'imagerie, nous étudierons le rôle de molécules régulatrices du nichage et de la prise de greffe des CSHs mobilisées dans des microenvironnements médullaires normaux ou perturbés et évaluerons (i) la mobilisation des CSHs par de nouvelles molécules originales, les mimes d'héparane sulfate (produits d'ENDOTIS Pharma), conçues

pour améliorer la mobilisation des CSHs, (ii) les effets in vivo des molécules qui peuvent améliorer le nichage et/ou la prise de greffe de CSH mobilisées en agissant sur les CSHs mobilisées et/ou le microenvironnement médullaire des souris receveuses et (iii) les effets des molécules qui mobilisent les CSHs sur la susceptibilité des cellules leucémiques aux drogues utilisées lors de chimiothérapies des leucémies. Nous pensons que les résultats de ces expériences amélioreront les connaissances sur les cellules souches hématopoïétiques et leurs interactions avec le microenvironnement médullaire et auront des implications cliniques sur les protocoles utilisés en auto-HSCT et dans le traitement des leucémies. Villanueva ML, Vose JM. The role of hematopoietic stem cell transplantation in non-Hodgkin lymphoma. Clin Adv Hematol Oncol. 2006;4(7):521-30. Jillella AP, Ustun C. What is the optimum number of CD34+ peripheral blood stem cells for an autologous transplant?. Stem Cells Dev. 2004;13(6):598-606. Lewandowski D, Barroca V, Ducongé F et al. In vivo cellular imaging pinpoints the role of reactive oxygen species in the early steps of adult hematopoietic reconstitution. Blood. 2010;115(3):443-52.

**Partenaires**

CEA/DSV/IRCM/SCSR/LRTS - Laboratoire de recherche sur la Réparation et la Transcription dans les Cellules Souches

**Coordinateur**

Paul- Henri Romeo - CEA/DSV/IRCM/SCSR/LRTS  
paul-henri.romeo@cea.fr

**Aide de l'ANR**

530 650€

**Début et durée**

Mars 2011 - 48 mois

**Label pôle**

**Titre du projet****STREAM – Rétention différentielle de cellules souches sur des critères d'affinité ou mécaniques****Résumé**

Le projet STREAM s'inscrit dans le cadre du procédé de thérapie cellulaire le plus abouti à ce jour : la greffe de Cellules Souches Hématopoïétiques (CSH) pour la reconstitution de la moelle osseuse, dans le cadre du traitement d'hémopathies malignes (leucémies aiguës, lymphomes, myélomes) et de certains cancers. Le projet STREAM vise à y apporter des méthodes innovantes dans la préparation des greffons, pour les rendre plus efficaces et moins coûteux. L'étape ciblée est celle de la sélection des CSH/progéniteurs parmi des populations cellulaires hétérogènes (i) in vivo : sang périphérique à l'état basal ou après stimulation par la cytokine G-CSF, moelle osseuse ou sang du cordon ombilical, (ii) ex vivo : après divers procédés d'amplification. Aujourd'hui sélectionner des cellules par un procédé de grade clinique peut se faire uniquement de manière immuno-magnétique (Magnetic Assisted Cell Sorting, MACS). Le projet STREAM vise à dépasser les limites de cette technologie et à améliorer la sélection cellulaire, en termes de rendement, pureté, accessibilité et coût, par : 1) Le développement d'un principe alternatif à la sélection immunomagnétique: la rétention différentielle des cellules souches sur des surfaces optimisées, en flux contrôlé. La sélectivité sera apportée par une fonctionnalisation de ces surfaces par des ligands biologiques (anticorps, lectines...) et/ou des critères physico-mécaniques ; 2) L'automatisation du procédé avec un démonstrateur et un consommable appropriés qui assureront la potentielle compatibilité clinique et la reproductibilité ; 3) L'optimisation de la qualité des cellules purifiées, en termes de viabilité des cellules, pureté, et fonctionnalité, ce qui constitue notre principal objectif. Les cellules triées subiront des contrôles in vitro (phenotypage, essais fonctionnels) et in vivo (en utilisant le modèle murin NOD/SCID). L'efficacité du procédé de sélection sera également testée sur des cellules amplifiées ex vivo, ce qui, si cela s'avérait concluant, serait un avantage important pour un future usage clinique. Un tel objectif pourra être atteint grâce aux compétences multidisciplinaires réunies au sein du consortium de STREAM. Chacun des trois axe décrits ci-dessus sera mené à bien grâce à l'expertise



apportée par certains partenaires du consortium, respectivement composé : 1) de physiciens avec une expertise avérée dans le domaine de la physico-chimie de l'adhésion cellulaire : l'UMR 7195 PECSA/ Laboratoire des Colloïdes et Matériaux Divisés (LCMD); 2) de spécialistes de l'automatisation de procédés biologiques: l'entreprise Bertin Technologies; 3) de spécialistes des cellules souches et de la thérapie cellulaire : l'UMR\_S 938 « Prolifération et différenciation des cellules souches : application à la thérapie cellulaire hématopoïétique » et l'Institut de Recherche en Hématologie et Transplantation (IRHT), qui représente également l'utilisateur final de la technologie. Les membres du consortium ont déjà collaboré sur plusieurs projets de R&D, dont l'un a abouti à un produit commercialisé par Bertin (l'analyseur KIM). Ce passé collaboratif fructueux assurera la meilleure synergie possible entre les partenaires au cours du projet STREAM. Le projet STREAM vise à poser les bases d'un développement industriel qui aboutirait à de nouveaux produits et une nouvelle ligne d'activité pour Bertin Technologies.

**Partenaires**

Laboratoire des Colloïdes et Matériaux Divisés LCMD - PECSA  
Bertin Technologies – E. Brient-Litzler  
UMR-S 938 Prolifération et différenciation des cellules souches- L.Douay  
Institut de Recherche en Hématologie et Transplantation-P.HENON

**Coordinateur**

Jean Baudry - PECSA - LCMD  
jean.baudry@espci.fr

**Aide de l'ANR**

741 155€

**Début et durée**

Mars 2011 - 36 mois

**Label pôle**