

Biologie Cellulaire n°9
Mr Larghero
Lundi 13 Decembre 2010 (8h30-10h30)
Ronéotypeur : Jonas SITRUK
Ronéolectrice : Alexandra CASTARD

BIOLOGIE CELLULAIRE N°9

Thérapie Cellulaire

PLAN :

I – Thérapie Cellulaire : Définition et rappels

A/ Définition

B/ Deux notions sont essentielles à la compréhension du champ d'application de la thérapie cellulaire

C/ Les différents types de cellules souches

II - Thérapie cellulaire et Cellules Souches Hématopoïétiques (CSH)

A/ Historique

B/ Principe de greffe de CSH

C/ Ou prélever les CSH ?

- 1) PRELEVEMENT MEDULLAIRE DE MOELLE OSSEUSE
- 2) LE SANG PERIPHERIQUE
- 3) LE SANG PLACENTAIRE

D/ Différence d'utilisation Autogreffe et Allogreffe de CSH

- 1) AUTOGREFFE DE CSH
- 2) ALLOGREFFE DE CSH

E/ Manipulation et contrôle des greffons cellulaires :

- 1) OU ET DANS QUELLES CONDITIONS ?
- 2) QUELLES MANIPULATIONS EN LABO POUR QUELS GREFFONS ?
 - a. Moelle osseuse
 - b. Cellules Sang Périphériques
 - c. Sang de Cordon
 - d. Les manipulations
 - α - Méthode de sélection du greffon (=tout éliminer sauf les CSH)
 - β - Le sang de cordon ombilical : du prélèvement à la banque

III – Questions Ethiques : Banques de sang de cordon

A/ Présentation du problème

B/ Banques publiques Vs Banque privée

IV – Le contrôle des greffons cellulaires

IV – Les cellules souches embryonnaires (CSE)

A/ Loi bioéthique 2004 (France)

B/ Exemple d'utilisation de cellules dérivés de CSE : protocole de cardio

C/ Ingénierie Tissulaire

V – Les Cellules Souches Mésenchymateuses (CSM)

- Propriété de ces CSM
- CSM dans plusieurs protocoles thérapeutiques

VI – Réglementation de la thérapie cellulaire et génétique

Dédicaces

Dans ce cours on va voir ce qu'on peut faire en clinique avec les cellules souches. On va aussi parler du sang de cordon ombilicale et du commerce qui existe autour. De plus ce cours est d'actualité puisqu'il s'inscrit dans la révision de la Loi de Bioéthique. (Youhou !)

I – Thérapie Cellulaire : Définitions et rappels

A/ Définition

La thérapie cellulaire est l'utilisation de cellules vivantes manipulées ou modifiées à des fins thérapeutiques.

!!! Attention ne pas confondre avec la Thérapie génique ! Dans la thérapie cellulaire on ne touche pas au génome des cellules, on va les modifier, sélectionner, stimuler etc. Mais le génome restera intact.

- Des dispositions réglementaires fixent les modalités d'organisation de la thérapie cellulaire en France, c'est une des activités médicales les plus réglementées. (Cf. après)

B/ Deux notions sont essentielles à la compréhension du champ d'application de la thérapie cellulaire :

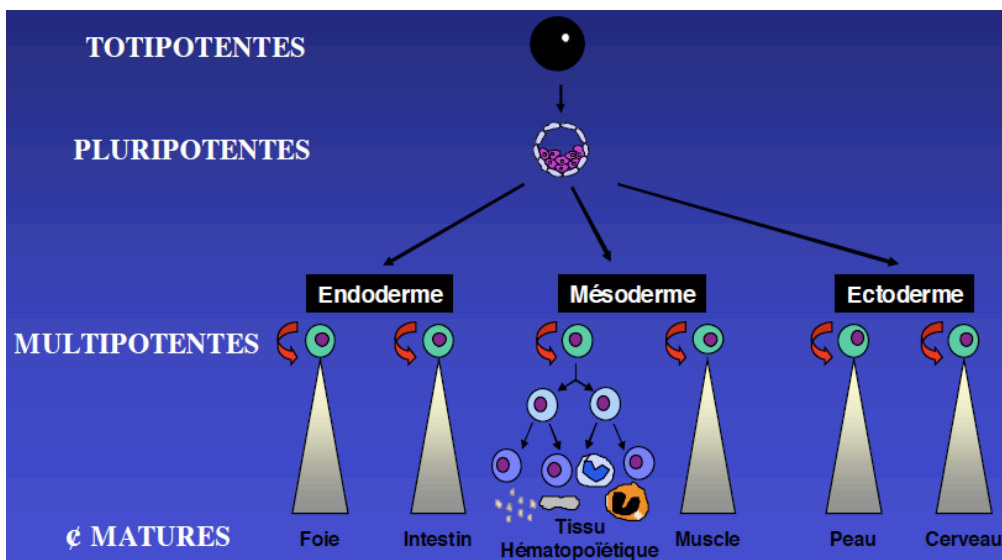
➤ Il existe de nombreux type de cellules utilisables :

- **Cellules souches des organes adultes**
- **Cellules adultes matures/spécialisées** (Ex : Des lymphocytes stimulés par des antigènes viraux, puis réinjection de ces lymphocytes activés)
- **Cellules souches fœtales** (Mais problème d'accessibilité)
- **Cellules embryonnaires (Sous condition!) :** Attention, quand on les utilise en thérapie cellulaire il ne s'agit pas d'injecter des cellules embryonnaires non différenciées ! (Risque cancer) On va utiliser des cellules qui se sont différenciées.

➤ Deux modalités de traitement sont possibles :

- **Autogreffe :** On est son propre donneur ; on prend des cellules a un patient A et on les réinjecte au patient A
- **Allogreffe :** On donne pour quelqu'un d'autre (que ce soit dans la fratrie ou quelqu'un d'inconnu). On parle de greffe allogénique.

C/ Les différents types de cellules souches :



- **Totipotente** : Chez le zygote
 - **Pluripotente** : Les cellules souches (CS) pouvant donner naissance à l'ensemble de cellules de tous les tissus et/ou organes. *C'est le cas des CS embryonnaires et des cellules iPS (=cellules pluripotentes induites, fabriquées par génie génétique)*
 - **Multipotente** : Les cellules souches qu'on retrouve le plus chez adultes (Plus différenciées que les pluripotentes) *Ex : Cellules hématopoïétiques.*
 - **Cellule mature, unipotente**
- > Chez l'adulte le maximum qu'on puisse trouver c'est multipotente. Du moins on n'a pas encore trouvé de cellule pluripotente.

Pour rappel : on retrouve des cellules souches dans presque tous les tissus et organes : épiderme, os, muscle, système nerveux, système hématopoïétique, intestin, hépato-biliaires, tissus conjonctifs squelette.

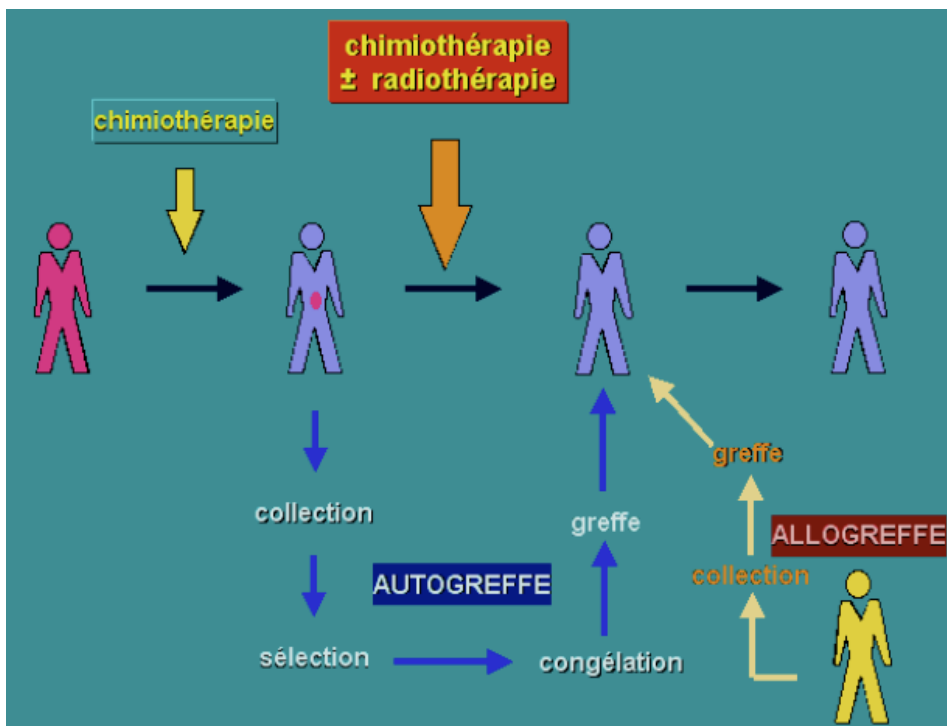
II - Thérapie cellulaire et Cellules Souches Hématopoïétiques (CSH)

(Attention ici on prend l'exemple des CSH, ce qu'on va décrire n'est pas applicable à toutes les greffes)

A/ Historique

- **1957 - 1959**: 1ères greffes de moelle osseuse
 - Reconstitution de l'hématopoïèse allogreffes après irradiation accidentelle (Mathé)
 - Traitement anticancéreux en phase de progression allogreffes (Thomas), autogreffes (Dameshek)
- **1975 – 1980**: amélioration des techniques de greffe
 - Conditionnements pré-greffe, greffes en période de rémission
- **1988**: 1ère greffe de sang de cordon ombilical (Gluckman)

B/ Principe de greffe de CSH



Le principe de départ pour l'allogreffe et l'autogreffe est le même :

1) On a un patient (rouge) qui a une maladie hématologique (Ex : Leucémie). On ne va pas prélever des CSH dans un but thérapeutique immédiatement alors qu'il a des cellules malades. Il faut d'abord détruire ces cellules malades.

Pour cela on va réaliser une première chimiothérapie, qui aura pour but de diminuer le nombre de cellules leucémiques.

2) On voit qu'il reste un petit point rouge : le patient est pas complètement guéri mais en situation de maladie résiduelle : le nombre de cellules tumoral est très faible voir indétectable. Donc la chimio a bien joué son rôle : elle a détruit la quasi totalité du nombre de cellules leucémiques.

3) A ce moment Différence Autogreffe/Allogreffe :

⇒ L'Autogreffe de moelle

En fait ce qu'on cherche à faire c'est détruire les cellules hématopoïétiques malades (ex : Leucémie) par une chimio et radiothérapie extrêmement forte. Seulement après le patient sera complètement affaibli car il n'aura plus de moelle hématopoïétique et donc de système de défense. On va lui en réinjecter.

a) Le protocole d'autogreffe passe par ce qu'on appelle la Collection (ou Mobilisation*) = récupération des cellules souches hématopoïétiques chez ce donneur.

b) On sélectionne dans ce prélèvement les cellules qu'on veut (les CSH)

c) Puis Cryoconservation : on met ces CSH au froid. Elles seront ainsi très bien conservées.

d) Et ainsi dès qu'on aura besoin d'injecter des CSH au patient, on décongèle et on injecte. (Cf. après pourquoi on réinjecte)

*Technique de mobilisation :

Technique permettant de faire passer les CSH de la moelle hématopoïétique vers la circulation sanguine périphérique (grâce a un facteur de croissance (le G-CSF) qu'on donne au donneur.), puis de prélever directement ces CSH dans le sang.

-> C'est un avantage pour le donneur car c'est beaucoup moins lourd que le pompage directement par voie intra-osseuse des CSH.

⇒ L'allogreffe de moelle

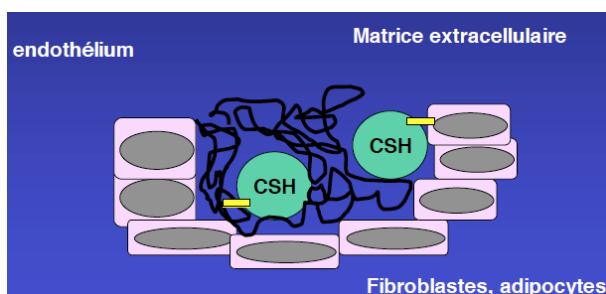
= le but est de remplacer une moelle qui est malade. On va donc faire ce qu'on appelle un **conditionnement a la greffe** : On associe de la chimiothérapie et de la radiothérapie qui permettent de détruire complètement la moelle du patient.

Ainsi on pourra injecter une toute nouvelle moelle provenant d'un donneur (*autre que le patient lui même, et donc en s'assurant de la compatibilité HLA*).

C/ Ou prélever les CSH ?

Il y a 3 méthodes de prélèvement de CSH :

1) PRELEVEMENT MEDULLAIRE DE MOELLE OSSEUSE



Les CSH sont dans une niche ou elles ont tout ce dont elles ont besoin : facteur de croissance pour autorenouvellement ou processus de différenciation.

C'est là qu'on va aller les chercher en faisant un prélèvement médullaire. Mais cela implique d'aller majoritairement dans les os du bassin (crête iliaque) pour pomper.



Ainsi il faut passer à travers l'os, avec un système de trocart (instrument de chir). Ceci se fait donc sous anesthésie générale.

On récupère environ 1L de moelle osseuse (5mL par 5mL). Dure environ 1h30

C'est donc une opération très lourde (*le donneur se fait quand même troué le cul.*), pour ainsi constituer le greffon.

2) LE SANG PERIPHERIQUE :

➤ Principe :

a) Technique de Mobilisation : à l'état basal, le nombre de CSH dans le sang est faible, avec le facteur de croissance (FDC) on va les faire venir de la moelle vers le sang. 2 possibilités :

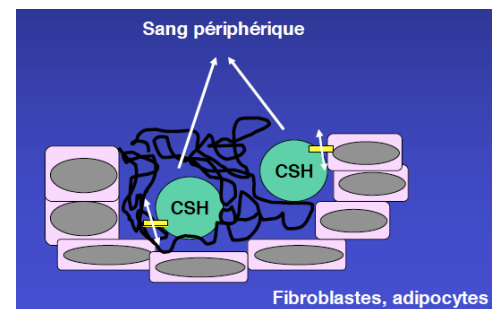
- Soit chez le patient lui même avec comme on l'a vu chimiothérapie d'abord + on injecte FDC.
- Soit chez un donneur sain en utilisant seulement le FDC (on ne va pas lui faire une chimio!)

b) Puis on va prélever les CSH par Technique de Cytaphérèse : système de centrifugation du sang qui permet de le séparer en 3 phases : Plasma + Globules rouges + Globules blancs.

- > On réinjecte au donneur le plasma et les globules rouges
- > On garde les globules blancs qui contiennent les fameuses CSH.

➤ Avantages :

- C'est donc une technique beaucoup moins invasive qui évite de faire des trous dans les os, et de faire une anesthésie générale. Et après le patient peut rentrer chez lui sans rester à l'hôpital comme pour le prélèvement médullaire. (*Par contre elle dure environ 5h*)
- Récupération hématopoïétique plus rapide pour le donneur : diminution de sa durée d'hospitalisation, et diminution aussi du nombre de transfusions.



3) LE SANG PLACENTAIRE



On prélève le sang dans le cordon ombilical en piquant dans la veine ombilicale (une fois que le bébé a été coupé du cordon évidemment).

Il faut prélever le plus possible de sang car il n'y a pas beaucoup de cellules dans le sang.

C'est une technique très simple

➤ Plusieurs avantages :

- Ceci va permettre de constituer des banques de sang de cordon à usage allogénique (*donc pour quelqu'un d'autre que le donneur*) et anonyme pour greffer à des gens se trouvant n'importe où dans le monde (grâce à des bases de données internationales). (Cas particulier : on peut aussi utiliser ce sang pour la fratrie)

- **Les cellules souches sont beaucoup plus jeunes du coup :**
 - La capacité de prolifération de ces CS sera plus importante ce qui permettra de compenser le fait que le prélèvement soit petit (peu de cellules).
 - Immaturité des cellules immunocompétentes : les lymphocytes sont encore naïfs, du coup cela va permettre de diminuer le risque de conflit immunologique entre les cellules du donneur et du receveur qu'on appelle GVH (=maladie du Greffon contre l'Hôte).
Quand on fait une greffe de moelle chez l'adulte il y a un conflit immunologique important donneur/receveur ce qui est logique, car on prélève 1L de moelle osseuse dans laquelle il y a aussi des lymphocytes. Si on greffe cette moelle, les lymphocytes du donneur vont reconnaître le receveur comme le « non soi », ils vont s'activer, et il va y avoir un conflit entre les cellules du donneur et du receveur.
 - ⇒ **Retenir : il y a moins de GVH, et le HLA est +/- compatible.** (HLA = marqueur du « soi »)

➤ **Inconvénient :**

- **Quantité limitée** : plus le receveur est gros plus on devra lui donner de CSH, or un cordon ne contient pas beaucoup de CSH. Du coup concerne les greffes pédiatriques en priorité
 => *Mais aujourd'hui ce qu'on fait c'est qu'on utilise 2 cordons pour un adulte, et au final on s'est rendu compte que ces 2 populations de CSH greffées (2 cordons) vont permettre la reconstruction hématopoïétique du sujet et qu'à terme il n'y en a une seule va rester.*

D/ Différence d'utilisation Autogreffe et Allogreffe de CSH

Les 2 n'ont pas le même but :

3) AUTOGREFFE DE CSH

Elle fait partie intégrante de la thérapeutique de : certaines hémopathies malignes (leucémie, myélome, lymphome) mais aussi de certaines cancers solides (cancer ovaire, testicule, sein)

Mais alors quel rapport ? Dans un cancer du sein par exemple, la moelle osseuse n'est pas touchée, pourquoi on ferait une greffe ?

Cela va permettre de faire des chimiothérapies à très forte doses pour soigner les cancers solides. Pourquoi ?

A part détruire les cellules cancéreuses, la chimio va aussi détruire toutes les cellules qui sont en renouvellement. Quels cellules sont constamment en renouvellement ?

- Les cellules de l'intestin -> la chimio va donner des nausées, vomissement

- Les cellules donnant cheveux -> la chimio va faire perdre les cheveux

- Les cellules souche hématopoïétique : elles sont en renouvellement permanent pour reconstituer l'ensemble des éléments figurés du sang -> donc chimio va faire que les patients vont être en aplasie de moelle osseuse avec anémie, sensibilité aux infections car plus de globules blancs, hémorragie car taux de plaquettes très bas. → **D'où l'intérêt de la greffe de CSH ! Pour une RESTAURATION de la moelle osseuse aplasique, et donc sortie de cette phase d'aplasie. Ce qui va permettre au patient atteint d'un cancer de récupérer plus vite après un cycle de chimio, et de pouvoir en enchaîner le plus vite possible pour tuer le cancer.**

Ainsi on prévoit avant de réaliser les chimio et radiothérapie très fortes une collecte de CSH chez le patient lui même pour lui réinjecter après sa chimio : on réalise une autogreffe de CSH. (C'est le schéma qu'on a vu au début du cours)

4) ALLOGREFFE DE CSH

Réservée à **certains hémopathies particulièrement graves**: cancers (*Leucémie*), aplasie médullaire, maladies constitutionnelles qui conduisent à une anomalie des cellules sanguines, maladies génétiques (*drépanocytose, thalassémie etc.*)

Le but ici est de **REPLACER une moelle hématopoïétique déficiente**

Par contre dans l'allogreffe (contrairement à l'autogreffe) on va ici avoir un problème immunocompatibilité : **La reconstitution hématopoïétique s'accompagne d'un double conflit entre donneur et receveur :**

- **Effet GVL (Bénéfique)** : les lymphocytes injectés tuent les cellules leucémiques restantes.

- **Effet GVH (Problématique)** : les lymphocytes injectés s'attaquent aux cellules saines l'organisme.

Ex : Leucémie => Allogreffe : on injecte CSH + les lymphocytes => Reconstruction de la moelle grâce aux CSH mais conflit immunologique à cause des lymphocytes...

Mais alors pourquoi on n'injecte pas juste les CSH ?

Parce que les lymphocytes ont aussi un effet très bénéfiques avec l'effet GVL : ils tuent les cellules leucémiques restantes et évitent donc la rechute de leucémie. Mais en même temps inconvénient de l'effet GVH.

→ **Nécessite du groupage et de la compatibilité HLA la plus fine possible entre donneur et receveur.** Même en ayant un HLA presque similaire on va avoir un effet GVH, d'où l'intérêt de trouver un HLA le plus proche possible pour limiter risque.

→ *Quand on va rechercher un donneur immunocompatible pour allogreffe. (Pas à savoir)*

- Intrafamiliale (=allogreffe géno-identique) d'abord, ca marche dans 30% des cas.

Si ca ne marche pas :

- Recherche sur fichiers internationaux (=allogreffe phéno-identique) (40%).

Si ca ne marche pas :

- Banque de sang cordon ombilical (le reste %) : on arrive généralement à trouver un cordon compatible.

Voici quelques chiffres à titre indicatif concernant le diagnostic et le type de greffe :

Diagnostic et autogreffe de CSH				Diagnostic et allogreffe de CSH			
Hémopathies (n=1856)	%	Tumeurs solides (n=411)	%		%		%
Lymphomes non hodgkiniens	38,7	Sein	35	Leucémie aiguë myéloïde	24,7	Myélome	2,6
Myélome	32,2	Neuroblastome	12,6	Leucémie aiguë lymphoblastique	23	Leucémie lymphoïde chronique	1,5
Hodgkin	8,6	Testicule	11,5	Leucémie myéloïde chronique	18,4	Hémoglobinopathies	0,8
Leucémie aiguë myéloïde	6,1	Système nerveux	11,3	Lymphomes non hodgkiniens	8,6	Hodgkin	0,5
Leucémie myéloïde chronique	6,1	Os	10,5	Myélodysplasie	5,8	Autres	3,7
Leucémie aiguë lymphoblastique	3,4	Ovaire	5,1	Aplasie	4,9		
Leucémie lymphoïde chronique	1,9	Sarcomes	3,6				
Myélodysplasie	0,7	Autres	10,6				
Autres	2,3						

E/ Manipulation et contrôle des greffons cellulaires :

3) OU ET DANS QUELLES CONDITIONS ?


Les zones de production sont extrêmement contrôlés : quasi stériles (=salles blanches)

Permet d'éviter la contamination des greffons, ce qui serait très dangereux pour les receveurs qui sont des patients immunodéprimés.


Une fois les échantillons fabriqués ils sont cryoconservés et on peut ainsi les garder 10, 20... 50ans.

4) QUELLES MANIPULATIONS EN LABO POUR QUELS GREFFONS ?


a. Moelle osseuse :

- Volume important : (≈ 1 à $1,5L$ de MO prélevée)
 - Agrégats possibles: *risque coagulation du fait qu'on fasse des petits prélèvements de 5mL par 5mL. Il ne faut pas qu'il y ait de caillot, sinon inutilisable.*
 - GR très nombreux (1/3 du prélèvement)
 - Présence de contaminants
- 
- Réduire le volume pour pouvoir l'injecter au receveur
 - Tenir compte de l'ABO incompatibilité ++ (groupe sanguin sur GR)

b. Cellules Sang Périphériques

- Volume ($\approx 300mL$)
 - Grande richesse cellulaire (*très concentré en cellules*)
 - GR peu nombreux
 - Problème du plasma
- 
- Tenir compte de l'ABO incompatibilité « sérique »: *ici il y a peu de globules rouges, mais en revanche il peut y avoir dans le plasma des anticorps ABO qui peuvent attaquer les GR du receveur...*
 - Thrombopénie du donneur

c. Sang de Cordon

- Volume faible ($\approx 100mL$)
 - Richesse Cellulaire assez faible
 - Congélation
 - Décongélation
- 
- Expansion: capacité de division très élevée. Ce qui va permettre d'augmenter le nombre de cellules. Permet greffe d'enfant mais aussi d'adulte. *Technique d'amplification*
 - Rendements cellulaires +++

d. Les manipulations

α - Méthode de sélection du greffon (=tout éliminer sauf les CSH)

= *Techniques pour sélectionner un seul type cellulaire présent dans le greffon. Car dans prélèvement on a vu qu'il y avait plein de choses en plus des CSH... Mais il ne faut pas toujours se débarrasser de ces choses car ca peut avoir un effet très bénéfique : on a vu avec l'histoire des lymphocytes et effet GVL (réaction du greffon contre la leucémie)*

Mais dans certain cas, notamment en pédiatrie, on ne trouve de donneur compatible ni dans la fratrie, ni sur les fichiers, ni cordon. On se retrouve avec des enfants dont on sait qu'il faut faire un processus de greffe et on n'a aucun donneur à proposer... Dans ce cas, on va prélever le père ou la mère, mais si on greffait tel quel ca serait la catastrophe, puisqu'ils ne seront compatible qu'à moitié. Et donc on va chercher à prendre que les CSH et à se débarrasser de tout le reste (lymphocyte...)

2 techniques :

➤ *Méthode Chimique : (Pas à connaître)*

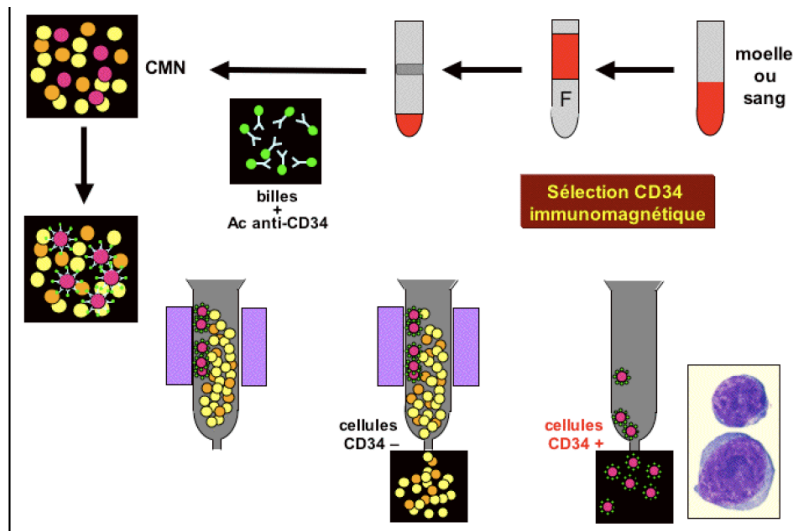
➤ Méthodes immunologiques (billes magnétiques)

Les CSH expriment toutes le marqueur CD34.

Ainsi on va faire un anticorps anti-CD34 sur lequel on a greffé des petites billes magnétiques.

On mélange le greffon avec ces anticorps. Il ne suffit plus qu'à passer ce mélange devant un aimant, et tout ce qui va être retenu par l'aimant correspondra aux CSH. Ainsi on ne gardera que les CSH et on virera le reste.

Mais comme vous l'avez compris on ne fait ça que dans certains cas bien particuliers.



β - Le sang de cordon ombilical : du prélèvement à la banque

⇒ Sécurisation

Implique qu'on sécurise le prélèvement cad on fait attention a la maman, au bébé, et surtout au greffon qui sera injecté à quelqu'un n'importe ou dans le monde.

- Sécurisation : Sérologique : recherche de virus chez la maman à différents moments (au moment de l'accouchement jusqu'à 6 semaines après) ; Groupe ABO ; HLA mère et cordon
- Système de contrôle du greffon : Volume, cellules, CSH, viabilité, Hb sang de cordon, bactériologie, carnet de santé...

⇒ Faut il chercher à augmenter le nombre de cellules ?

Rappel : problème sang cordon = volume faible, nombre cellules limités.

- Technique : Expansion du sang de cordon

Nécessité de protocole d'amplification des cellules : Il faut les faire proliférer en évitant au maximum qu'elles se différencient. Si les CSH se transforment en GB il n'y a plus aucun intérêt ! Il faut les garder à cet état immature de CSH.

- 1) On isole, à partir du sang de cordon, les CSH grâce à la méthode des billes magnétiques qu'on a vu juste avant
- 2) Etape d'amplification de ces CSH avec des facteurs de croissance pendant plusieurs jours.

Observation : il va y avoir une expansion : x12 du nombre de CSH et x180 du nombre de cellules nucléés total.

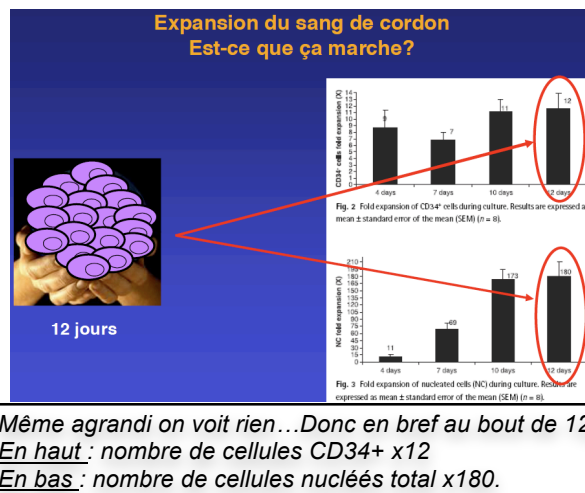
➔ On voit ainsi que quoi qu'il arrive on n'arrive pas a faire se multiplier les CSH sans qu'une partie se différencie.

- Conclusion : Expansion sang de cordon, oui mais...

C'est une technique qui permet de multiplier les CSH, certes, mais

- On perd aussi beaucoup de cellules à cause de la sélection à l'étape 1,
- Et de plus difficulté technique avec le processus (*suuuce*) d'amplification des cellules (étape 2). Et qui est long (=12jours)
- Il en découle que le cout de cette opération est très important. (≈10000Euro = 500 fois le WEI !)

Donc conclusion : technique pas encore totalement au point. On peut se demander si c'est vraiment utile, même si il y a des situations ou c'est indispensable. Aujourd'hui beaucoup de recherche dessus...



III – Questions Ethiques : Banques de sang de cordon

A/ Présentation du problème

3 cas possibles d'utilisation :

- **Banque de sang de cordon non apparenté** dans le cadre des greffes **allogéniques** de sang de cordon pour les pathologies hématologiques très majoritairement.

Bref : on prend le sang dans maternité, on le met dans fichier international. Ce sang de cordon qu'on va avoir à Saint Louis par exemple, est disponible pour n'importe quel receveur dans le monde.

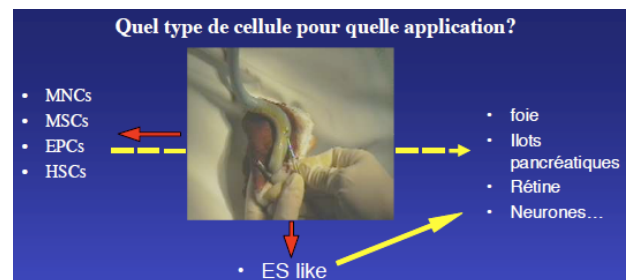
- **Banque de sang de cordon intrafamilial** dans le cadre d'une pathologie hématologique ou autre curable par greffe de cellules souches hématopoïétiques

Possibilité de prélever comme on l'a vu avant en intrafamilial dans des cas stricts

- **Banque de sang de cordon autologue** pour un usage potentiel ultérieur

Question de cette banque qui est autologue, et commerciale actuellement : en bref on nous dit « conservez le sang de cordon de votre enfant pour soigner son Parkinson dans 60ans, ça pourra peut être servir ». Donc la banque n'est plus comme pour les banques allogéniques : un don anonyme et gratuit. Est ce éthique...?

De plus on ne sait pas trop aujourd'hui ce qu'il y a exactement comme cellules souches dans ce sang. Mais il pourrait y en avoir de plusieurs sortes qui pourraient ainsi permettre de réparer un peu tous les organes et tissus (*Foie/cirrhose, ilots pancréatiques/diabète, rétine, neurones/alzheimer...*). C'est surtout la dessus que se basent ces banques privées autologues et commerciales.



B/ Banques publiques Vs Banque privée (Tout par coeur !)

	Banques publiques/allogénique	Banque privée/autologue
Bénéfice thérapeutique	Prouvé	inconnu
Qualité	Accréditation des banques, standard internationaux	Qualité variable
Financement	Public, absence de profit	Privé, profit++
Conservation	Garantie	Non garantie
Système	Solidarité (don anonyme et gratuit)	Compétition avec l'allogénique
Accès	Pour tous	Très inégal
Règlementation	Registre nationaux et internationaux Règlementations +++	Pas de registre
		Information biaisée ++ (les parents qui font ça pensent que ça marchera alors qu'on en sait encore rien du tout !)

(Nan je déconne pas tout par cœur... mais mieux vaut comprendre le principe allogénique/autologue, qcm possible !!)

⇒ Quid de la médecine régénératrice ?

- Pas (pas encore?) de bénéfice prouvé de la thérapie cellulaire régénératrice, encore moins avec les cellules du sang de cordon

- Les pathologies dégénératives sont des maladies du "grand âge": quelle sera la viabilité des cellules et leurs potentialités après une durée de conservation de 25 à 50 ans, voire plus?

- Dans 50 ans, les standards et la réglementation seront-ils compatibles avec ceux aujourd'hui appliqués pour le prélèvement et la conservation?

- Dans 50 ans, quels seront les nouveaux traitements ou les nouvelles connaissances qui rendront la thérapie cellulaire régénérative obsolète?
- Quelles propriétés ont les cellules du sang de cordon que n'ont pas les cellules de la moelle osseuse ou d'autres tissus

⇒ **Quand le commerce peut couter cher :**

- Le prélèvement de sang de cordon est réalisé dans des maternités autorisées à le faire. Puis déclaration à AFSSAPS du greffon pour passer les frontières. Et si on le fait illégalement : risque peine de prison et amende forte : le médecin et les parents !!
Tout trafic de cellule souche est puni par le code pénal
- De plus la qualité de conservation de ces prélèvements est pourrie, du fait de l'illégalité...
- Les banques commerciales ne sont pas autorisées en France.

⇒ **Critique d'un article par le prof sur le traitement du diabète (Cf. diapos si ca vous intéresse)**

En bref le prof nous a montré qu'il fallait conserver un esprit critique face aux articles publiés sur thérapie régénératrice. Il ne s'agit pas de dire que ces thérapies c'est du mito et que c'est nul, c'est de montrer qu'on se sait pas encore bien maitriser tout ca et qu'il ne faut pas croire tout ce qu'on nous dit. Et qu'avant de faire des tests chez l'homme il vaut mieux réfléchir avant...

IV – Le contrôle des greffons cellulaires

On ferme la parenthèse de thérapies hypothétiques et on revient aux thérapies qu'on fait aujourd'hui

Quelque soit le greffon qu'on a prélevé, il faut évidemment savoir ce qu'on va greffer chez le malade, il y a donc obligatoirement, et a toutes les étapes de manipulation un contrôle de ce qui a été fait et de ce qu'on a au final. Il faut que s'il y a un problème chez le receveur on sache si c'est lié a sa maladie ou a la greffe. Donc les différentes étapes :

◆ **Savoir si les cellules sont mortes ou vivantes :**

- **Numération et viabilité des cellules nucléées (compteurs)**

◆ **Savoir quel type de cellules et quelle dose on injecte au receveur :**

- **Etude phénotypique des cellules souches et quantification (Les CSH)**
 - Numération des cellules CD34+ (cytométrie de flux) : notion de seuil pour « autoriser » la greffe
 - Étude des sous populations CD34+/CD38- : cellules souches primitives
- **Etude phénotypique des cellules matures et quantification (Les lymphocytes surtout)**
Numération des cellules CD3+ et CD19+ (cytométrie de flux) : attention à ce qu'il y en ai pas trop pour qu'il n'y ai pas de problème conflit immunologique

◆ **Savoir si les CSH sont fonctionnelles :**

- **Etude fonctionnelle des cellules souches**
 - **Cultures clonogéniques** = évaluation de la fonction des CSH : on va mettre un petit échantillon de greffon en culture pendant 14 jours et on regarde le nombre de colonies qui sont apparues. Si colonie présente : on sait que CSH est fonctionnelle : rôle de progéniteur.

(!!! Attention, le prof a insisté sur ces techniques, il a dit qu'il avait déjà posé des qcm sur les cultures clonogéniques parce qu'il aime ca ☺)

IV – Les cellules souches embryonnaires (CSE)



Ces CSE sont isolées à partir de la masse interne d'un blastocyste. Elles sont pluripotentes (*elles ne sont plus totipotentes ! Petit rappel embryo ☺ : totipotence jusqu'à morula, après pluripotente !*) et vont pouvoir donner du mésoderme, endoderme et ectoderme.

A/ Loi bioéthique 2004 (France) :

L'expérimentation et les recherches sur l'embryon humain sont **interdites**.
Les recherches sur les CSE humaines sont interdites.

MAIS :

Dérogations dans le cadre de projets d'études et de recherches sur les CSE très particulières. Cette autorisation est donnée par l'Agence de Biomédecine pour une période de 5ans si : « progrès thérapeutiques majeurs »

La recherche se fait alors à partir :

- d'embryons surnuméraires obtenus in vitro pour lesquels il n'y a plus de « projet parental »
- d'embryons pour lesquels un diagnostic de maladie génétique a été posé
- lignées de cellules embryonnaires existantes

Cette loi de bioéthique va être révisée bientôt. Mais il semble que ca va rester dans le même esprit.

B/ Exemple d'utilisation de cellules dérivés de CSE : protocole de cardio

Dans l'insuffisance cardiaque sévère : l'idée est de dériver à partir de CSE humaines des progéniteurs de cardiomyocytes, et de greffer ces progéniteurs dans les zones touchées par un infarctus du myocarde. Aujourd'hui on commence à y arriver mais c'est encore très difficile.

C/ Ingénierie Tissulaire

(Tout ceci n'est pas à connaître, mais c'est super intéressant quand même... ☺)

Une fois qu'on a réussi à faire ces cellules progénitrices, il ne s'agit pas de les injecter comme ca dans la zone qu'on veut réparer... Pour cela on va coller ces cellules progénitrices sur une sorte de **patch** qu'on va aller déposer sur la zone lésée.

De nos jours l'ingénierie tissulaire crée des procédés utilisant ces cellules souches, en voici quelques exemples :

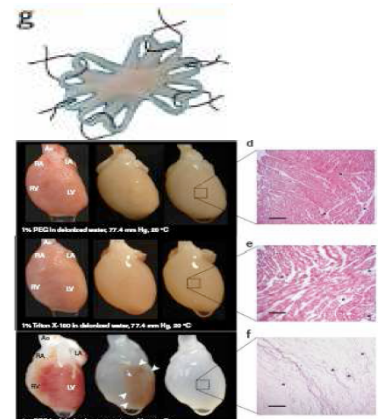
➤ Patches cellulaires

*C'est intéressant parce qu'on n'a pas de biomatrice associée aux cellules : on a juste une **monocouche de cellules** (un genre de crêpe cellulaire). Et on pose juste cette couche de cellules directement sur le cœur de rat par exemple comme on le voit sur la photo et pas besoin de sutures (comme pour le patch évoqué juste avant). Et c'est assez marrant (c'est le prof qui le dit...)*



➤ Bandages cellulaire

C'est un système de biomatériaux avec des cardiomyocytes dessus. Et on le fixe sur le cœur..



➤ Vers un cœur bio-artificiel ?

Ici il s'agit encore d'un projet. L'idée est de se dire que du fait qu'il y ait pénurie de cœur à greffer chez les morts en état de mort encéphalique, il s'agit ici de prélever un greffon 0 à 6mois après la mort. Et ce qui les intéresse c'est donc pas d'avoir un greffon viable avec des cellules, mais juste la matrice extra cellulaire (en utilisant un détergeant qui détruirait tout sauf la matrice dans un cœur pourri qu'ils ont récupéré). Et la technique serait d'utiliser cette matrice

comme un moule dans lequel on mettrait les cellules souches qui se différencieront en cardiomyocytes. Ainsi après une très longue culture, on obtiendra un cœur tout neuf qui sera capable de battre !!

V – Les Cellules Souches Mésoenchymateuses (CSM)

On va beaucoup en entendre parler dans le futur.

On les trouve initialement dans la moelle osseuse. Mais on en trouve maintenant un peu partout de ces CSM (Foie, sang de cordon, peau, tissu adipeux, moelle osseuse).

Il y a déjà pas mal d'essais cliniques mis en place en ce moment (pas encore au stade thérapeutique).

➤ Propriété de ces CSM :

- Propriété de différenciation +++ (Muscle, os...)
- Propriété d'immunosuppression : capacité à réguler la réponse immunitaire très bien face aux LT, LB, NK... probablement grâce à synthèse de facteurs de croissance et cytokines...

➤ Ainsi on peut utiliser ces CSM dans plusieurs protocoles thérapeutiques :

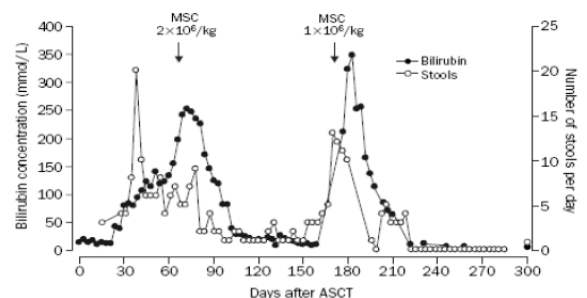
- En complément du traitement des maladies auto-immunes grâce aux capacités immunorégulatrices de ces CSM. On a vu de meilleurs résultats de guérison chez les rats.

- Diabète : en injectant des CSM à des souris on peut voir une reprise de l'insulinémie

- Traitement pour les maladies auto-immunes.. Exemple : Cf. les photos a droite... ! On peut voir une régénération de la peau à des endroits lésés par cette maladie auto-immune. (Cependant on est pas sur que ce soit suffisant à long terme)



- Traiter cas de GVH aigue (Maladie du greffon contre l'hôte) pour les patients chez qui aucun traitement actuel ne marche... Une équipe a testé la greffe de CSM, et apparemment ça pourrait réguler cette hyper activation des cellules immunocompétentes. (A droite on voit : a chaque injection de CSM chez un enfant les symptômes de GVH diminuent)



⇒ **Cependant, petit cas si vous avez bien suivi et compris ce cours... ☺**

On vient de voir que ces CSM pouvaient avoir un effet immunosuppresseur

Est ce que ce serait donc bien de faire un traitement CSM dans le cas d'allogreffe de moelle osseuse pour une leucémie? (Réfléchissez..)

Rappel : dans l'allogreffe de moelle osseuse, un des buts principaux (après le remplacement de la moelle osseuse malade) est qu'il y ai GVL ce qui permet de tuer les cellules leucémiques résiduelles après la chimio ultra puissante qui a tout détruit, et ainsi d'éviter la rechute après ce traitement extrêmement lourd.

Ainsi si on met des CSM pour limiter le conflit immunologique : certes on va diminuer l'effet problématique GVH, mais on va aussi diminuer l'effet bénéfique de GVL... Et donc pas d'élimination des cellules résiduelles. Donc l'allogreffe ne remplira pas complètement son rôle, et le risque de rechute pour le patient leucémique sera plus élevé.

Donc problème bénéfice/risque à étudier avant de faire greffe de CSM.

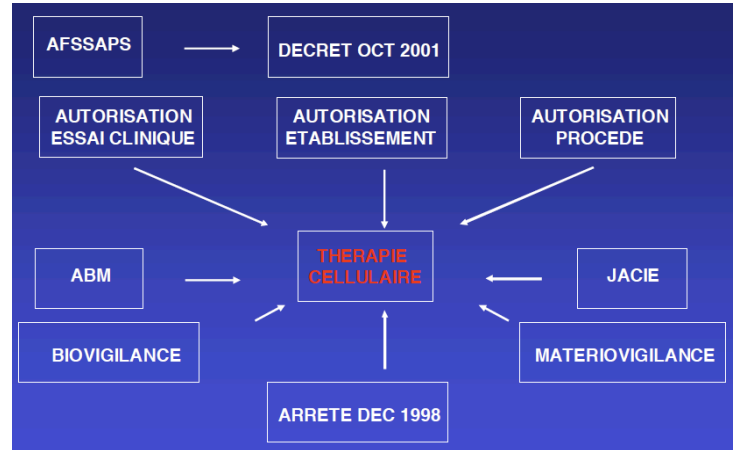
VI – Réglementation de la thérapie cellulaire et génétique

Juste savoir que la réglementation autour des activités de thérapie cellulaire est extrêmement importante. *Sur un peu tous les points il y a de la réglementation :*

- organisation des locaux, formation du personnel etc.
- sur les essais thérapeutiques : il y a des commissions à consulter à chaque fois.

Le plus important des textes règlementaires : **le Décret du 1^{er} octobre 2001**.

De plus l'une des agences règlementaires les plus importantes est l'AFSSAPS et l'Agence de Biomédecine. Et voilà un petit schéma (à droite) qui montre toutes les agences qui vont jouer un rôle dans ces activités.



Introduction

J'espère que vous avez apprécié le cours, jvous jure qu'à ronéotyper c'était une belle galère !! J'y ai passé 2 jours complets.

Donc ce cours étant dans la Ronéo 12 sur 12 (enfinnnn !!!), ma dédicace s'inscrit forcément dans un esprit de révision et de pleure sur chaque page de ronéo « mais j'y arriverai jamais » (si chui le seul à penser ça dite le moi que jme tue).. Mais ne vous inquiétez pas je suis là pour raviver la joie d'ouvrir sa ronéo n°12... ☺ Voici le plan de procrastination pré-travail que je vous ai prévu (parce que évidemment tu vas commencer par lire la dédicace avant le cours, on me la fait pas à moi...) :

I – Les remerciements, louanges et autre...

III – Les blagues

II – Les jeux

IV – Bonus

I – Les remerciements, louanges et autre...

Tout d'abord un grand remerciement à ma Ronéoelectrice (parce qu'elle a du relever près de 40 fautes dans mon cours..), ma camarade de stage infirmier, ma copine so chic, ma dancegirl, ma dextxtroo (:p). Je suis content de te connaître ma alex et j'espère que ça durera tout au long de notre très très long parcours en médecine qui s'annonce !

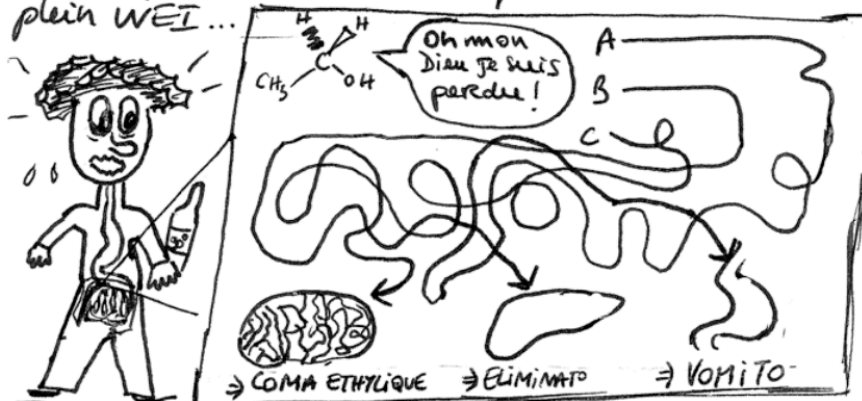
MERCI A :

- Toi qui lis ma ronéo, et bravo, on a réussi ! (J'adore lire cette phrase dans les dédicaces j'étais obligé de la mettre ^^)
- Ceux avec qui je kiff ma p2 : Aurianne que j'aime (voilaaaa t'es la preum's), mes ptits déchets adorés Diane et Tatiana, Hervé le meilleur des danseurs ^^, Alex C, Ylan, Hector, Meryl, Lorie, les 3K : Alex (alias dodem), Ylana (qui envoi du fat paté !), Sonia (alias maxitouf), David K, Salomé, Bijaoui, Yassine et Jess ! Et à Bryan, Hugo, Théo et tt les autres (la voilà votre dédicace !) ... Et à tous ceux que j'ai du oublié... dsl !
- A la meilleure équipe de stage infirmier : Alex Hervé Mathilde et toute l'équipe du service de chir vasco. A mon équipe du stage d'onco et chir plastique à St Louis
- Au WEI : Merci à ce wei de reve qui m'a converti à la déchèterie, aux chansons paillardes, au besoin irrésistible d'aller aux soirées médecine... je suis arrivé plein de bonne résolutions en p2 j'en ressors un vrai déchet, imperméable au travail.. mais quel bonheur !! Merci à tous les organisateurs de ce merveilleux WEI, au car ebisool qui était au top, au trashage incroyable, et surtout aux internes de la Roue du Cul et à la douche de pote qui m'a fait passé un moment gravé dans ma mémoire à jamais accompagné de mes 2 disciples déchets ambulants.. (Ettttttttttttttt douche.... ^^) Vivement le ski p2... :D
- Mon équipe d'Humalitaire : Mathilde, Golda, Thomas (meilleur équipe de papier cadeau !), Sophie, Hedia, Morgan et bien sur Yussuf !
- Mes regrettés de la p1 et que j'aurai révé d'avoir avec moi en p2 : Clara, Charlène, Jenna, Mimi, Sacha, Julia L, Théo A, Anna A, Zbili. Vous me manquez !!!

- Mes regrettés salopard qui ont fait le mauvais choix (dentaire) : Rachel, Rudy, mon trio du tuto : Léa et Caro (exprime toi!!!!).
- A tous les gens d'amphi de p1 que je ne connaissais pas mais qui ont eu leur nom : Saveur brune, Pududo, Avatar, la sorcière, le fantôme, Steuplai, la chi-ror-nienne du cœur, lady gaga, Frange, papillon de lumière, bizut major et bien d'autre que j'oublie... (Tout droit réservé aux Nienenbruk®)
- A ma lolo d'amour, qui je l'espère sera en p2 l'année prochaine ! Et à tous ceux que je connais qui repassent la p1 cette année, une pensée pour vous, la fin est proche, et courage pour ces 2 jours d'horreur qui ont lieu à l'heure à laquelle j'écris ca.
- Medisup : merci a tous mes surveillants pour leur soutien et surtout à Wafa, Anis et Jade qui ont été un soutien moral .
- A Larib (~~parce que bouuu bichhhattt~~), à l'amphi 1 et 2, à la gare du nord, a la photocop, au grenier a cafard euh.. pain (oups !), et a tous les faillots qui allaient tuer le prof de question a la fin de chaque cours ! Et aux profs légendaires : Mme Prost ~ Mr Onolfo, Rona, Cohen-Sollal, Farge et ses petits afgans qui pourraient profiter d'une couverture sociale et tant d'autres...
- Enfin merci à Barney, Yann Barthez, Cindy Sanders, Les robins des bois, Kakou, Foresti, Amy Winehouse, Joss Stone, Melody Gardot et bien d'autres sans qui mes journées de travail en p1 auraient été bcp moins sympa..
- Aller stop les remerciements, avant que je me mette a remercier la moquette de mon immeuble...

II – Les jeux

Aide cette molécule de ----- a trouver le bon chemin pour être éliminé du corps de ce nêo - P2 en plein WEI...



3					9							5						4	
5			2	9		1	8						1	2		6	4		5
					4	5	2	3				9	7	4	3				
	2		8		9	6		4				3		5	8		9		7
	6																		2
		4	5		7	2	3						8	1	7		6	9	
	5	2	9		6					6				6	3	8	1		
	7	9			2	5						4		5			3	6	
6	8	3						2				1					8	5	4
										2									
										4							5		
														8	6				
3	6	4						5				9				6	4		7
7	8			2		9							3	4			6	8	
4	1	6		5						1				8		5	3	1	
		5	8		9	4	2						6	9	2		8	5	
	1																		9
	9	3		7	1		8						3	7	6		1		4
					6	5	3	2					8	9	5	1			
4			9	5		8	7						4	3		5	2		1
	5												2						3

III – Les blagues (bon j'avoue je les ai prise sur internet...)

www.sudoku-gratuit.fr

Une dame va chez son médecin. Après l'avoir examinée, le médecin demande

- Alors, comment vont vos enfants ?
- Oh ! Mon premier à la grippe, le second couve une angine et mon dernier à la diarrhée ! Alors qu'est-ce que vous en dites ?
- Oh vous savez, moi et les charades...

Voilà, docteur, il paraît que je suis nymphomane. Vous croyez que c'est vrai ?

- Je ne sais pas, madame, mais s'il vous plaît, lâchez-moi la bite, ce sera plus facile pour faire l'ordonnance !

Dans une clinique, un médecin fait sa tournée des chambres, quand il tombe sur un type en train de se masturber violemment. Choqué, il interpelle un infirmier et lui demande ce qui se passe. L'infirmier lui répond :

- Ce monsieur souffre d'une maladie assez rare, qui occasionne une surproduction de sperme dans les testicules. Si ce monsieur ne se masturbe pas toutes les deux heures, ses testicules peuvent exploser et il peut mourir dans d'atroces souffrances... Le médecin est étonné, mais continue sa tournée et deux chambres plus loin, voilà une infirmière en train de sucer un patient comme si sa vie en dépendait ! Il rappelle l'infirmier et lui demande :
- Et ca, c'est quoi ?
- La même chose, mais lui, il a une excellente mutuelle...

Une femme chez le chirurgien esthétique: - J'aimerais avoir de plus gros seins. Combien cela me coûterait-il ?

Le chirurgien : - Cela coûterait environ 9 000 euros.

La femme: - Je ne peux pas me le permettre... N'y a-t-il pas une alternative à la chirurgie ?

Le docteur essayant d'être aimable: - Vous pourriez essayer de vous frotter les seins avec du papier toilette...

La femme: - Du papier toilette??? Comment cela pourrait-il me rendre les seins plus gros ?

Le docteur: - Ca a bien marché avec ton cul je vois pas pourquoi ca marcherait pas avec tes seins...

IV – Bonus

<http://www.youtube.com/watch?v=uRCqa3UGn9g>

http://www.youtube.com/watch?v=_OBlgSz8sSM

<http://www.youtube.com/watch?v=qaX7-LkBh1Q>

Et n'oubliez pas qu'il faut sauver bichât !

Pour ceux qui arrivent vraiment pas pas a bosser...

(Réponse a mon jeu pourrav: Ethanol et B)