

F. Hérodin, J. Mathieu, M. Drouet, N. Grenier, L. Grange, P. Bourin,
J. Vétillard, D. Thierry et J.C. Mestries

RÉSUMÉ – Le traitement de l'aplasie médullaire consécutive à une surexposition accidentelle à des doses élevées de radiations ionisantes peut nécessiter un apport à type d'autogreffe. Une nouvelle approche expérimentale, développée chez le primate, est fondée sur la manipulation *ex vivo* de cellules hématopoïétiques collectées sur des sujets irradiés, par incubation en présence de cytokines régulatrices positives et négatives de l'hématopoïèse.

NEW EXPERIMENTAL APPROACH TO TREATMENT OF RADIATION-INDUCED BONE MARROW APLASIA :
EX VIVO EXPANSION OF HEMATOPOIETIC CELLS

ABSTRACT – The management of bone marrow aplasia secondary to accidental exposure to high doses of ionizing radiations requires new therapeutic protocols in addition to cytokine therapy. The *in vitro* incubation of hematopoietic stem and progenitor cells from irradiated nonhuman primates with negative and positive regulators of hematopoiesis may lead to helpful products of transfusion.

INTRODUCTION

L'aplasie médullaire est la conséquence prédominante d'une exposition globale aiguë à des radiations ionisantes pour des doses allant de 2 à 10 Gy.

L'hétérogénéité qui caractérise la plupart des irradiations accidentelles a pour résultat l'existence de territoires hématopoïétiques relativement sous-exposés au sein desquels subsistent des cellules souches et progéniteurs épargnés. Ce contexte est favorable à l'utilisation *in vivo* des facteurs de croissance hématopoïétique (FCH) qui vont stimuler la prolifération et/ou la différenciation des précurseurs épargnés. Cependant dans le cas d'expositions à des doses élevées de radiations, il peut être nécessaire de pratiquer un apport cellulaire approprié, pour assurer la reconstitution hématologique tant à court terme qu'à long terme. En effet l'efficacité thérapeutique des FCH vis à vis de l'aplasie médullaire radio-induite dépend du nombre résiduel de cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques viables donc de l'inhomogénéité de l'exposition et de la dose d'irradiation moyenne reçue par la victime (1, 2). De plus l'utilisation *in vivo* des FCH est limitée par la toxicité intrinsèque de ces cytokines, liée essentiellement à leur activité inflammatoire qui s'ajoute au processus inflammatoire propre à l'irradiation.

Afin de réduire les risques de morbidité ou de mortalité liés à la survenue inévitable d'une aplasie pour des doses supérieures à 5 Gy, il est indispensable de renforcer le travail des FCH administrés *in vivo* pour accélérer la reprise hématopoïétique du sujet irradié. Nous avons donc envisagé d'adapter au contexte de l'accident nucléaire le traitement par autogreffe, fondé sur l'expansion *ex vivo*, proposé chez des patients cancéreux soumis à des chimiothérapies très aplasiantes. Le principe est de collecter des précurseurs hématopoïétiques à partir de la moelle ou du sang, après mobilisation, puis de les multiplier *in vitro* par culture en présence de cytokines appropriées dans le but de produire un greffon autologue efficace.

La question fondamentale dans le cadre de l'irradiation corporelle totale aiguë (doses entre 5 et 10 Gy) est d'ordre quantitatif et qualitatif. Les cellules souches et progéniteurs viables sont-ils en nombre suffisant après irradiation pour être collectés en quantité significative afin de produire *in vitro* un greffon utile, sans obérer par ailleurs les chances de survie de la victime?

Nous présentons ici les modèles animaux choisis, le babouin et le macaque, et la méthodologie suivie pour collecter des cellules hématopoïétiques normales, purifier la fraction exprimant l'antigène CD34 (3), trier des sous-populations très immatures, cultiver des cellules CD34 positives en milieu liquide en présence de cytokines et évaluer certains aspects fonctionnels des cellules cultivées.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Modèles animaux

Les primates non humains de grande taille constituent les meilleurs modèles pour reproduire les accidents d'irradiation chez l'homme. En effet l'exposition unilatérale de tels animaux dans un champ homogène d'irradiation entraîne un dommage radiobiologique hétérogène.

Les primates retenus sont le babouin (différentes espèces du genre *Papio*) et le macaque cynomolgus (*Macaca fascicularis*), pour lesquels la littérature scientifique est riche de références en hématologie. Le babouin reste jusqu'à présent le modèle de choix, compte tenu des volémies requises par les principaux appareils de cytophèrese disponibles sur le marché.

Prélèvement des cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques

Les cellules CD34 positives (CD34+) renferment la totalité des cellules hématopoïétiques immatures capables de reconstituer la moelle (3). Elles représentent environ 1,5 % des cellules mononucléées de la moelle et moins de 0,5 % des cellules mononucléées du sang périphérique à l'état d'équilibre. Cette sous-population reste néanmoins très hétérogène puisqu'elle comprend les cellules souches, les précurseurs clonogènes (colony-forming unit ou CFU) et les blastes présentant un pouvoir prolifératif limité à quelques divisions cellulaires.

Les deux sources cellulaires que nous utilisons sont la moelle et le sang.

Les prélèvements médullaires se font par ponction-aspiration sous anesthésie générale. Les animaux peuvent être préalablement stimulés à l'aide de G-CSF (3 administrations de 5 à 10 µg/kg en 36 heures) ce qui augmente le pourcentage de cellules CD34 de 100 à 150 %. Plusieurs millions de cellules CD34+ peuvent être ainsi collectées.

Le prélèvement par cytophèrese se fait chez l'animal anesthésié, (acte pratiqué chez l'homme vigile). En raison de la rareté des cellules CD34+ dans le sang, les cytophèreses sont pratiquées après mobilisation au niveau circulant par administration de différentes cytokines. Nous avons utilisé le G-CSF (mobilisation intense en 4 à 5 jours) (4) et l'interleukine 8 (mobilisation modérée en 60 à 90 minutes) (5).

L'appareil de cytophèrese que nous utilisons est un séparateur Frésenius AS 104 qui s'adapte bien au babouin et permet de pratiquer de 7 à 9 cycles de collection soit près de 2 fois la volémie. Le produit d'une telle cytophèrese peut renfermer quelques dizaines de millions de cellules CD34+.

Purification des cellules CD34 positives

Nous avons choisi comme technique de purification le système CellPro (Bothell, WA, USA) (4). L'enrichissement en cellules CD34+ est réalisé par chromatographie d'immuno-affinité sur colonne de gel avidiné; les cellules cibles, préalablement incubées avec l'anticorps anti-CD34 humain 12.8 couplé à la biotine, se lient sélectivement aux billes du gel par interaction avidine-biotine. Après élution des cellules CD34 négatives, les cellules CD34+ sont recueillies par pression mécanique. Le choix de cette technique est dicté par le fait que le clone 12.8 présente une forte réaction croisée avec les antigènes CD34 de primates. Le pourcentage de pureté des cellules CD34+ en sortie de colonne varie entre 60 et 90 %. Ce matériel cellulaire est directement utilisable pour l'expansion *ex vivo*.

Tri des précurseurs CD34+ très immatures

Suivant l'objectif d'expansion recherché, on peut séparer certaines sous-populations de cellules CD34+, par exemple les cellules pluri-

potentes initiant les cultures à long terme (LTC-IC). En utilisant un anticorps anti-CD34 de classe III, le clone 566, très discriminant chez le primate, nous nous dirigeons vers une sélection de cellules CD34+ Thy1+ faiblement HLADR+ que nous séparons à l'aide d'un trieur-cytomètre de flux (Facs Vantage, Becton-Dickinson) équipé d'un module autoclone permettant de trier les cellules individuellement et de les ensemercer en plaques de culture. Le pourcentage de pureté des cellules triées est de 95 à 99 %, d'après nos résultats.

Expansion *ex vivo* des cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques

Elle est fondée sur l'incubation des cellules hématopoïétiques en milieu liquide (milieu type Iscove ou RPMI) ou sur une matrice (ex : stroma allogénique ou xénogénique irradié) en présence de cytokines. Les cellules normales peuvent être stimulées dès leur mise en culture. Le but est de favoriser la prolifération et/ou la différenciation. On souhaite essentiellement produire le plus rapidement possible (en 7 à 14 jours) un grand nombre de cellules matures fonctionnelles (polynucléaires neutrophiles et plaquettes, pour couvrir les risques infectieux et hémorragique). Dans cette perspective, nous avons choisi de stimuler les cellules avec un "cocktail" de cinq cytokines recombinantes humaines : interleukine 1 (IL-1), IL-3, IL-6, granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) et Stem Cell Factor (SCF) (6). Les concentrations utilisées *in vitro* jusqu'à présent sont assez élevées (de 100 à 500 ng/ml) car l'activité des cytokines humaines n'est pas optimale chez les primates non humains. Le taux d'ensemencement des cellules CD34+ et la nature du contenant (flasques, plaques multi-puits) sont des facteurs déterminants pour le rendement de la croissance.

Dans nos conditions, nous obtenons un taux d'amplification cellulaire de 50 à 80 en 7 jours (ensemble hétérogène de blastes et de cellules plus différenciées, tels mégacaryocytes et myélocytes) et de 600 à 800 en 14 jours (essentiellement des cellules matures avec une majorité de polynucléaires).

L'utilisation de régulateurs négatifs et positifs selon plusieurs schémas (négatifs puis positifs, positifs d'emblée, négatifs et positifs) peut permettre de produire plus ou moins rapidement un produit transfusionnel composé de cellules matures fonctionnelles et/ou de progéniteurs de type CFU qui devraient poursuivre leur différenciation après transfusion. Ainsi l'addition préalable d'un inhibiteur tel le TGF- β à la culture nous a permis de maintenir un certain degré d'immaturité et un retard à la prolifération/différenciation qui peut être levé par addition ultérieure des FCH. Nous étudions également l'effet du ligand du Flt-3/Flk-2 (FL), ligand d'un récepteur à activité tyrosine-kinase des protéines proche du c-kit.

Phénotype et fonctionnalité des cellules issues de l'expansion *ex vivo* en flux.

Le phénotype des cellules cultivées est déterminé par cytométrie en flux.

La fonctionnalité des cellules amplifiées est évaluée selon différents critères. Il s'agit essentiellement de tests *in vitro* :

- cultures à long terme pour quantifier les cellules assurant la repopulation hématopoïétique au long cours (LTC-IC);
- essais de clonogénicité des différents types de progéniteurs (progéniteurs pluripotents HPP-CFC, CFU-GEMM ou progéniteurs engagés CFU-GM, BFUe, CFU-Meg);
- tests fonctionnels des cellules matures (ex : mesure de la production d'espèces oxygénées réactives pour les polynucléaires neutrophiles);
- l'expansion *ex vivo* elle-même est un test fonctionnel puisque le rendement de culture rend compte de la sensibilité des progéniteurs collectés à l'action stimulante des FCH (dans le cas de cellules irradiées ce critère pourrait renseigner sur les chances de sortie d'aplasie).

Dans nos conditions, les cellules conservent un taux de clonogénicité correct après 7 jours de culture. Une expansion de 14 jours fournit des phagocytes répondant normalement à plusieurs tests fonctionnels.

DISCUSSION

Problèmes soulevés par l'application de l'expansion *ex vivo* des progéniteurs hématopoïétiques aux cellules d'un organisme irradié

L'étape ultérieure, actuellement en cours, est d'appliquer la méthodologie décrite ci-dessus à des cellules irradiées *in vitro* puis à un contexte d'irradiation *in vivo*. De nombreuses questions doivent être élucidées :

Définir une période optimale pour prélever les cellules qui n'aggrave pas le syndrome initial de l'irradiation.

S'il existe une augmentation de la circulation des cellules souches au niveau du sang périphérique après irradiation, ce phénomène, que nous vérifions actuellement, est vraisemblablement transitoire. Le recueil de ces cellules par cytophèrese ne pourrait être fait que pendant une période de temps limitée après l'irradiation. La mobilisation des cellules CD34+ au niveau du sang périphérique pourrait être renforcée par administration d'une cytokine d'action rapide et brève.

La nature du prélèvement (ponction de moelle, cytophèrese), le choix des territoires médullaires prélevés en fonction de l'hétérogénéité de la radioexposition (que l'on ignore d'ailleurs le plus souvent dans les heures suivant l'accident), conditionnent également le degré de viabilité des cellules recueillies.

De plus, des travaux sont en cours au laboratoire pour préciser les lésions caractérisant les cellules CD34+ irradiées ainsi que l'expression des ARN messagers correspondant aux récepteurs et aux cytokines impliqués dans la survie et la capacité de prolifération/différenciation hématopoïétique.

L'expansion *ex vivo* des cellules, doit être pratiquée en respectant ou favorisant, pendant les 24 premières heures de la culture, les phénomènes de réparation du dommage radiobiologique.

Il faut estimer les caractéristiques du greffon produit *in vitro* (progéniteurs très immatures et/ou cellules plus différenciées). Peut-il coloniser efficacement l'organisme irradié et sur quelle durée?

Nos résultats confirment que la capacité d'amplification *in vitro* est en proportion inverse de la dose d'irradiation (modèle *in vitro*). Il semble actuellement possible d'assurer la prolifération de cellules irradiées jusqu'à la dose de 4 Gy gamma. L'approche expérimentale trouve ici une limite qu'il faut dépasser. Nous nous efforçons de rendre notre modèle expérimental plus fiable pour rendre compte de l'hétérogénéité des irradiations accidentelles. Ainsi nous étudions les capacités d'expansion d'un ensemble hétérogène constitué de cellules non irradiées et irradiées à des doses croissantes.

En conclusion, la manipulation *ex vivo* des cellules hématopoïétiques provenant de sujets irradiés semble réservée à la production d'une greffe-transfusionnelle constituée de cellules plus ou moins différenciées permettant une couverture de la période de cytopénie. Tout récemment, la culture *in vitro* de cellules CD34+ du sang périphérique provenant d'un sujet irradié accidentellement à une dose estimée entre 1,2 et 2,7 Gy (Césium 137) a été réalisée avec succès en présence d'une combinaison d'IL-3, IL-6, SCF, FL et Thrombopoïétine, dans un but d'autogreffe. Le traitement d'un état de myélosuppression touchant sévèrement le compartiment des cellules souches ne pourrait vraisemblablement être abordé que sous l'angle de la greffe allogénique.

(C.R.S.S.A., La Tronche - Grenoble,
C.T.S.A., Clamart et C.E.A., Fontenay-aux-Roses)

RÉFÉRENCES

- 1 R.A. NASH, F. SCHUENING, F.R. APPELBAUM, T. BOONE, H.J. DEEG, T.C. GRAHAM et R. STORB - Effect of recombinant canine GM-CSF on hematopoietic recovery after otherwise lethal total body irradiation. *Blood*, 1994, 83, 1963.
- 2 F.G. SCHUENING, R. STORB, T.C. GRAHAM, F.R. APPELBAUM et L.M. SOUZA - Effect of recombinant human G-CSF on hematopoiesis of normal dogs and on hematopoietic recovery after otherwise lethal total body irradiation. *Blood*, 1989, 74, 1308.
- 3 D.S. KRAUSE, M.J. FACKLER, C.I. CIVIN et W.S. MAY - CD34 : Structure, biology, and clinical utility. *Blood*, 1996, 87, 1.
- 4 S. HEIMFELD, B. FOGARTY, K. MCGUIRE, S. WILLIAMS S, R.J. BERENSON - Peripheral blood stem cell mobilization after SCF or G-CSF treatment : rapid enrichment for stem and progenitor cells using the Ceprate immunoaffinity separation system. *Transplantation Proc.*, 1992, 24, 2818.
- 5 L. LATERVEER, I.J.D. LINDLEY, R. WILLEMZE et W.E. FIBBE - Rapid mobilization of hematopoietic progenitor cells in rhesus monkeys by a single intravenous injection of interleukin-8. *Blood*, 1996, 87, 781-788.
- 6 W. BRUGGER, W. MOCKLIN, S. HEIMFELD, R.J. BERENSON, L. MERTELSMANN, L. KANZ - *Ex vivo* expansion of enriched peripheral blood CD34+ progenitor cells by SCF, IL-6, IL-3, interferon-gamma, and erythropoietin. *Blood*, 1993, 81, 2579.
- 7 B.L. ZIEGLER *et al.* - *Ex vivo* expansion of peripheral blood hematopoietic CD34+ cells from an accidentally irradiated patient in serum-free liquid suspension culture. *Conférence sur le traitement des syndromes de l'irradiation par les cytokines*, Académie du Service de Santé de la Bundeswehr, Munich, 28 et 29 février 1996.