



## RÉFÉRENCES

1. Pispa J, Thesleff I. Mechanisms of ectodermal organogenesis. *Dev Biol* 2003 ; 262 : 195-205.
2. Biggs LC, Mikkola ML. Early inductive events in ectodermal appendage morphogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 2014 ; 25-26 : 11-21.
3. Duverger O, Ohara T, Shaffer JR, et al. Hair keratin mutations in tooth enamel increase dental decay risk. *J Clin Invest* 2014 ; 124 : 5219-24.
4. Robinson C, Shore RC, Kirkham J. Tuft protein: its relationship with the keratins and the developing enamel matrix. *Calcif Tissue Int* 1989 ; 44 : 393-8.
5. Pautard FG. Mineralization of keratin and its comparison with the enamel matrix. *Nature* 1963 ; 199 : 531-5.
6. Winter H, Schissel D, Parry DA, et al. An unusual Ala12Thr polymorphism in the 1A alpha-helical segment of the companion layer-specific keratin K6hf: evidence for a risk factor in the etiology of the common hair disorder pseudofolliculitis barbae. *J Invest Dermatol* 2004 ; 122 : 652-7.
7. Chapalain V, Winter H, Langbein L, et al. Is the loose anagen hair syndrome a keratin disorder? A clinical and molecular study. *Arch Dermatol* 2002 ; 138 : 501-6.
8. Pincus P. Relation of enamel protein to dental caries. *Nature* 1948 ; 161 : 1014.
9. Little K. Caries-prone and caries-resistant teeth. *Nature* 1962 ; 193 : 388-9.
10. Shaw JH. Causes and control of dental caries. *N Engl J Med* 1987 ; 317 : 996-1004.

## NOUVELLE

### Traitement de la protéinose alvéolaire par transplantation intrapulmonaire de macrophages

Raphael Borie<sup>1-3</sup>, Claire Danel<sup>3,4</sup>, Catherine Lainé<sup>5</sup>,  
Caroline Kannengiesser<sup>3,6</sup>, Bruno Crestani<sup>1-3</sup>

#### La protéinose alvéolaire pulmonaire

La protéinose alvéolaire pulmonaire (PAP) est une maladie rare caractérisée par une accumulation de matériel phospholipoprotéinacé (protéines et lipides du surfactant) dans les alvéoles pulmonaires. Cette accumulation est liée à un défaut de clairance par les macrophages alvéolaires. Le diagnostic de protéinose alvéolaire pulmonaire est suggéré par un scanner thoracique évocateur (Figure 1), et confirmé par une lecture spécifique du lavage broncho-alvéolaire [1, 2].

On distingue trois types de protéinose alvéolaire pulmonaire en fonction de leur étiologie : auto-immunes, secondaires et génétiques. Chez l'adulte, les formes auto-immunes, avec présence d'auto-anticorps sériques anti GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) sont les plus fréquentes. Les formes secondaires sont dues le plus souvent à une inhalation de toxiques ou à une dysfonction du macrophage alvéolaire, en rapport soit avec une maladie hématologique, soit avec un déficit immunitaire. On ne

détecte pas d'anticorps anti GM-CSF dans ces formes.

Les protéinoses alvéolaires pulmonaires d'origine génétique peuvent s'intégrer dans des syndromes touchant plusieurs organes, elles s'observent essentiellement chez l'enfant et leur présentation radio-clinique est relativement spécifique du gène en cause.

Les symptômes sont peu spécifiques et se limitent le plus souvent à une dyspnée. Il existe un risque d'infection opportuniste au cours des protéinoses alvéolaires pulmonaires auto-immunes, et la présence d'anticorps anti-GM-CSF pourrait être associée à un risque spécifique de méningite à cryptocoque [3].

#### Physiopathologie

Le surfactant est composé d'un mélange de protéines et de lipides (essentiellement de la phosphatidylcholine) sécrétés par les pneumocytes de type II. La clairance du surfactant est réalisée par les pneumocytes de type II et les macrophages alvéolaires [4]. Le surfactant réduit la tension de surface alvéolaire et empêche le collapsus alvéolaire au cours

<sup>1</sup> APHP, hôpital Bichat, DHU Fire, service de pneumologie A, centre de compétence des maladies pulmonaires rares, 46, rue Henri Huchard, 75018 Paris, France ;

<sup>2</sup> Inserm unité 1152, Paris, France ;

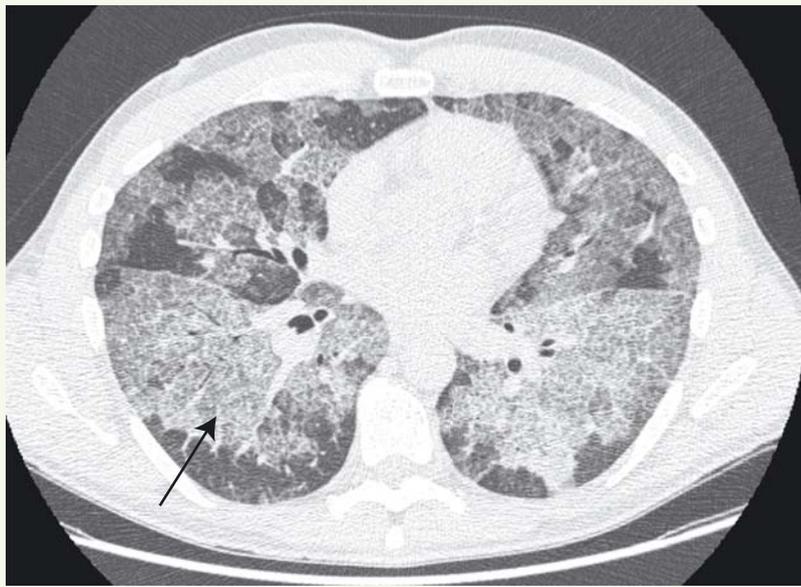
<sup>3</sup> Université Paris Diderot, Paris, France ;

<sup>4</sup> APHP, hôpital Bichat, service d'anatomopathologie, 46, rue Henri Huchard, 75018 Paris, France ;

<sup>5</sup> service d'immunologie-thérapie cellulaire et hématopoïèse, centre hospitalo-universitaire Pontchaillou, Rennes, France ;

<sup>6</sup> APHP, hôpital Bichat, service de génétique, 46, rue Henri Huchard, 75018 Paris, France. [raphael.borie@bch.aphp.fr](mailto:raphael.borie@bch.aphp.fr)

du cycle ventilatoire. Il intervient aussi dans la régulation de la réponse anti-infectieuse alvéolaire. L'insuffisance de surfactant chez les nouveau-nés prématurés (maladie des membranes hyalines), ou son altération au cours du syndrome de détresse respiratoire aiguë, sont ainsi responsables d'atélectasies conduisant à l'insuffisance respiratoire. Le GM-CSF joue un rôle capital dans la physiopathologie de la protéinose alvéolaire pulmonaire. Ce facteur de croissance des lignées granuleuses et monocytaires stimule *in vitro* la différenciation, la prolifération et la survie des cellules myéloïdes : monocytes, macrophages, éosinophiles, neutrophiles et cellules dendritiques. Le développement des souris mutantes déficientes (*knock-out*) pour le gène codant pour le GM-CSF a permis de manière inattendue d'identifier la responsabilité de cette cytokine dans la physiopathologie de la maladie [5]. Ces souris développent une protéi-



**Figure 1. Scanner thoracique chez un patient atteint de protéinose alvéolaire.** Scanner en coupe parenchymateuse mettant en évidence des opacités bilatérales en verre dépoli (n'effaçant pas les vaisseaux) mal limitées sur lesquelles se superposent des réticulations (opacités linéaires dessinant les septums inter-alvéolaires) dites en « crazy paving » très évocatrices du diagnostic de protéinose alvéolaire.

nose alvéolaire pulmonaire semblable à la maladie humaine, dont l'apparition est secondaire à un défaut d'élimination du surfactant par les macrophages alvéolaires. Chez la souris, les effets du GM-CSF sur les macrophages alvéolaires font intervenir le facteur de transcription PU.1. Les souris mutantes déficientes en PU.1 présentent également une protéinose alvéolaire pulmonaire, et la réexpression de PU.1 prévient l'apparition de la symptomatologie [6].

Chez l'homme, le récepteur du GM-CSF est composé d'une sous-unité  $\alpha$  et d'une sous-unité  $\beta$ . Des mutations sur les gènes codant pour les deux sous-unités de ce récepteur, *CSF2RA* et *CSF2RB*, sont responsables d'une protéinose alvéolaire pulmonaire avec accumulation de surfactant dans les alvéoles sans anomalie de l'interstitium pulmonaire. Dans cette forme, les taux sanguins et alvéolaires de GM-CSF sont augmentés et la recherche d'anticorps sériques anti-GM-CSF est négative [7].

Dans les protéinoses alvéolaires pulmonaires associées aux maladies hémato-

logiques ou aux déficits immunitaires, les macrophages alvéolaires seraient numériquement ou fonctionnellement incapables d'assurer la clairance du surfactant. Ainsi, un défaut fonctionnel des macrophages stimulés par le GM-CSF ou l'interleukine (IL) 3 a été démontré chez trois patients atteints d'une protéinose alvéolaire pulmonaire associée à une leucémie aiguë myéloïde, et chez une patiente atteinte d'un lupus traité par immunosuppresseurs. Ces anomalies phénotypiques et fonctionnelles étaient corrigées après le traitement de la leucémie ou la diminution du traitement immunosuppresseur.

Enfin, au cours de la protéinose alvéolaire auto-immune, la présence d'un titre élevé d'anticorps anti GM-CSF, d'isotype IgG, est spécifique de la maladie [8]. Ces auto-anticorps anti GM-CSF captent le facteur de croissance avec une grande affinité et neutralisent complètement son activité fonctionnelle. Les fonctions des macrophages alvéolaires en sont affectées, ce qui entraîne un défaut de clairance du surfactant, mais aussi un

déficit de l'immunité innée et de l'immunité acquise. En effet, via la sécrétion d'IL-12 et d'IL-18, les macrophages alvéolaires stimulent les lymphocytes T helper de type 1 et les lymphocytes natural killer. Outre le défaut fonctionnel des macrophages alvéolaires, les polynucléaires neutrophiles des patients atteints de protéinose alvéolaire pulmonaire ne fonctionnent pas correctement. Il a ainsi été démontré que le transfert d'anticorps anti-GM-CSF *in vitro* sur des cellules myéloïdes de sujets sains reproduit les anomalies mises en évidence chez les patients atteints de protéinose alvéolaire [9]. S'y ajoutent des anomalies fonctionnelles lymphocytaires, qui participent au risque de complications infectieuses opportunistes.

Enfin, le transfert d'anticorps anti GM-CSF humains à des primates non humains reproduit une maladie en tout point semblable à la maladie humaine, avec notamment une diminution de l'expression des ARNm de PU-1 et de PPAR $\gamma$  (*peroxisome proliferator-activated receptor*), et un dysfonctionnement des polynucléaires neutrophiles sanguins circulants.

### Traitement

Le traitement de référence est symptomatique. Il consiste en un lavage pulmonaire. Le lavage au sérum physiologique est réalisé litre par litre jusqu'à clarification du liquide de lavage pulmonaire, sous anesthésie générale, un poumon à la fois, tandis que l'autre est ventilé. En moyenne, 15 litres de sérum physiologique sont nécessaires [10, 11]. Chez 30 à 50 % des patients un second lavage est nécessaire, et chez 10 % des lavages répétés [1].

D'autres traitements plus « physiopathologiques » peuvent être utilisés. Ainsi le GM-CSF (Sargramostim<sup>®</sup>) ciblant directement le macrophage alvéolaire, peut être utilisé par voie inhalée ou sous-cutanée. L'effet serait supérieur par voie inhalée avec un taux de réponse de 76,5 % et un taux de rechute de 12,5 % dans les protéinoses auto-immunes [12]. Les traitements immu-



nosuppresseurs, en particulier les corticoïdes, sont dangereux et inefficaces. Cependant, dans quelques cas cliniques et chez sept patients d'une série de neuf patients traités par rituximab, un anticorps monoclonal anti-CD20, une amélioration de la protéinose a été observée, associée à une diminution du taux d'anticorps sériques [13, 14].

Le lavage thérapeutique est bénéfique chez moins de 20 % des patients dont la maladie est secondaire à une affection hématologique [15]. Le traitement hématologique, chimiothérapie et/ou la greffe de moelle, peut entraîner une guérison de la protéinose alvéolaire, en particulier au cours des leucémies aiguës [16]. Enfin le lavage thérapeutique pourrait être efficace au cours des protéinoses alvéolaires secondaires aux mutations de *CSF2RA* ou *CSF2RB* [17]. Le traitement par GM-CSF ne semble pas efficace [17-19]. L'évolution de la maladie n'est pas prévisible, et une rémission spontanée survient dans 5 à 7 % des cas. La survie à 5 ans est d'environ 95 % dans les formes auto-immunes.

### Thérapie génique

La thérapie génique est le Graal de la médecine thérapeutique. Cependant, les résultats en sont, sauf exception, régulièrement décevants [20]. Elle se heurte en effet à plusieurs difficultés dont l'utilisation d'une procédure myéloablatrice nécessaire à la greffe cellulaire, et/ou les problèmes de vecteurs requis pour l'insertion du gène corrigé. Une des méthodes pour pallier ces difficultés consiste à se placer en situation de greffe autologue, c'est-à-dire prélever des cellules du patient, les modifier *ex vivo*, puis les réinjecter, ce qui élimine le risque de rejet et la nécessité d'un traitement immunosuppresseur. La nature de la cellule à modifier peut être limitante, mais dans les cas de protéinoses alvéolaires secondaires à une mutation du récepteur du GM-CSF, cette approche pouvait s'avérer efficace. Une équipe américaine a récemment élégamment confirmé cette hypothèse chez la souris [21].

Les souris dont la sous-unité  $\beta$  du récepteur au GM-CSF a été invalidée (*Csf2rb*<sup>-/-</sup>) présentent une protéinose alvéolaire identique à celle des enfants présentant une mutation de ce même récepteur. Dans un premier temps, les auteurs ont instillé, dans les poumons des souris *Csf2rb*<sup>-/-</sup>, des macrophages dérivés de biopsie ostéo-médullaire de souris sauvages. L'injection chez l'animal anesthésié de deux millions de cellules améliorait la protéinose de manière objective : le lavage alvéolaire était moins opaque et contenait moins de surfactant. Le taux d'hémoglobine diminuait, traduisant une correction de l'hypoxémie *via* une diminution de la sécrétion d'érythropoïétine. Ainsi, quatre mois après la transplantation, les lésions histologiques pulmonaires étaient moins importantes, et, finalement, la survie globale des souris était améliorée.

De manière intéressante, les macrophages issus de la transplantation avaient un avantage de survie comparés aux macrophages *csf2rb*<sup>-/-</sup>, et étaient toujours détectables dans le lavage alvéolaire un an après la procédure. Ce que confirmait l'augmentation persistante de la transcription de certains biomarqueurs comme PU.1. Les auteurs ont confirmé ces résultats par l'injection de macrophages différenciés *in vitro* à partir de cellules souches hématopoïétiques issues de souris *csf2rb*<sup>-/-</sup>, dans lesquelles le gène sauvage avait été réintroduit *via* un vecteur lentiviral. Les résultats étaient équivalents à ceux obtenus par l'injection de macrophages issus de souris sauvages.

Aucune anomalie hématologique, ni lésion pulmonaire inflammatoire ou fibrosante n'ont compliqué la transplantation pulmonaire de ces macrophages.

### Conclusion

Ces résultats sont très encourageants et ouvrent la voie à un essai thérapeutique chez l'homme dans les protéinoses alvéolaires d'origine génétique, compte-tenu de la similitude des

maladies chez l'homme et la souris. Ces résultats permettent aussi d'envisager cette méthode pour traiter d'autres maladies pulmonaires d'origine génétique ou non. La transplantation de macrophages pourrait ainsi être envisagée pour apporter une protéine ou un facteur de croissance déficient comme au cours du syndrome de détresse respiratoire aiguë. Il est amusant de noter que les connaissances sur la physiopathologie de la protéinose alvéolaire ont fait un bon en avant grâce au modèle de souris *knock-out* pour le gène GM-CSF. L'avenir nous dira si c'est un autre modèle murin *knock-out* qui résoudra les problèmes thérapeutiques.  $\diamond$

### Treatment of alveolar proteinosis by intrapulmonary transplantation of macrophages

#### LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

#### RÉFÉRENCES

1. Seymour JF, Presneill JJ. Pulmonary alveolar proteinosis: progress in the first 44 years. *Am J Respir Crit Care Med* 2002 ; 166 : 215-35.
2. Borie R, Danel C, Debray MP, et al. Pulmonary alveolar proteinosis. *Eur Respir Rev* 2011 ; 20 : 98-107.
3. Rosen LB, Freeman AF, Yang LM, et al. Anti-GM-CSF autoantibodies in patients with cryptococcal meningitis. *J Immunol* 2013 ; 190 : 3959-66.
4. Whitsett JA, Wert SE, Weaver TE. Alveolar surfactant homeostasis and the pathogenesis of pulmonary disease. *Annu Rev Med* 2010 ; 61 : 105-19.
5. Stanley E, Lieschke GJ, Grail D, et al. Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor-deficient mice show no major perturbation of hematopoiesis but develop a characteristic pulmonary pathology. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994 ; 91 : 5592-6.
6. Shibata Y, Berclaz PY, Chronos ZC, et al. GM-CSF regulates alveolar macrophage differentiation and innate immunity in the lung through PU.1. *Immunity* 2001 ; 15 : 557-67.
7. Suzuki T, Sakagami T, Young LR, et al. Hereditary pulmonary alveolar proteinosis: pathogenesis, presentation, diagnosis, and therapy. *Am J Respir Crit Care Med* 2010 ; 182 : 1292-304.
8. Greenhill SR, Kotton DN. Pulmonary alveolar proteinosis: a bench-to-bedside story of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor dysfunction. *Chest* 2009 ; 136 : 571-7.
9. Uchida K, Beck DC, Yamamoto T, et al. GM-CSF autoantibodies and neutrophil dysfunction in pulmonary alveolar proteinosis. *N Engl J Med* 2007 ; 356 : 567-79.
10. Michaud G, Reddy C, Ernst A. Whole-lung lavage for pulmonary alveolar proteinosis. *Chest* 2009 ; 136 : 1678-81.

## RÉFÉRENCES

- Briens E, Delaval P, Mairese MP, et al. La protéinose alvéolaire pulmonaire. *Rev Mal Respir* 2002 ; 19 : 166-82.
- Tazawa R, Inoue Y, Arai T, et al. Duration of benefit in patients with autoimmune pulmonary alveolar proteinosis after inhaled granulocyte-macrophage colony-stimulating factor therapy. *Chest* 2014 ; 145 : 729-37.
- Kavuru MS, Malur A, Marshall A, et al. An open-label trial of rituximab therapy in pulmonary alveolar proteinosis. *Eur Respir J* 2011 ; 38 : 1361-7.
- Borie R, Debray V, Laine C, et al. Rituximab therapy in autoimmune pulmonary alveolar proteinosis. *Eur Respir J* 2009 ; 33 : 1503-6.
- Ishii H, Seymour JF, Tazawa R, et al. Secondary pulmonary alveolar proteinosis complicating myelodysplastic syndrome results in worsening of prognosis: a retrospective cohort study in Japan. *BMC Pulm Med* 2014 ; 14 : 37.
- Ishii H, Nakata K, Inoue Y, et al. Clinical course of GM-CSF autoantibody negative pulmonary alveolar proteinosis (NAPAP): efficacy of lavage therapy. *Am J Respir Crit Care Med* 2009 ; 179 : A3035.
- Suzuki T, Sakagami T, Rubin BK, et al. Familial pulmonary alveolar proteinosis caused by mutations in CSF2RA. *J Exp Med* 2008 ; 205 : 2703-10.
- Martinez-Moczygemba M, Doan ML, Elidemir O, et al. Pulmonary alveolar proteinosis caused by deletion of the GM-CSFRalpha gene in the X chromosome pseudoautosomal region 1. *J Exp Med* 2008 ; 205 : 2711-6.
- Dirksen U, Nishinakamura R, Gronckel P, et al. Human pulmonary alveolar proteinosis associated with a defect in GM-CSF/IL-3/IL-5 receptor common beta chain expression. *J Clin Invest* 1997 ; 100 : 2211-7.
- Hacein-Bey-Abina S, Pai SY, Gaspar HB, et al. A modified gamma-retrovirus vector for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med* 2014 ; 371 : 1407-17.
- Suzuki T, Arumugam P, Sakagami T, et al. Pulmonary macrophage transplantation therapy. *Nature* 2014 ; 514 : 450-4.

## NOUVELLE

### Un nouvel interrupteur oncogénique dans la progression du cancer de la prostate

L'« exceptionnel » ORAI3

Charlotte Dubois, Fabien Vanden Abeele, Natalia Prevarskaya

Inserm U1003, laboratoire d'excellence, canaux ioniques d'intérêt thérapeutique, équipe labellisée par la Ligue nationale contre le cancer, SIRIC ONCOLille, université des sciences et technologies de Lille, rue Paul Langevin, 59656 Villeneuve d'Ascq Cedex, France. [charlottedubois2@aol.com](mailto:charlottedubois2@aol.com)

► Le cancer est sans aucun doute l'un des systèmes biologiques les plus complexes. Ces dernières années, les scientifiques ont découvert une multitude de facteurs et de voies de signalisation qui leur sont associées, qui agissent de concert afin de permettre la croissance tumorale et de faire échouer les nombreuses thérapies. Certaines caractéristiques du cancer sont évidentes, mais beaucoup d'autres sont plus subtiles et très difficiles à identifier. L'enjeu sous-jacent est d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques spécifiques.

#### Les perturbations de l'homéostasie calcique au cours de la progression tumorale : rôle des canaux calciques

Les canaux calciques sont peu à peu apparus comme des acteurs cruciaux de la progression tumorale, même si la perspective d'en faire des cibles thérapeutiques spécifiques dans la guerre contre le cancer était sujette à débat. En effet, le calcium est un second messager

intracellulaire ubiquitaire impliqué dans des processus tels que la prolifération, l'apoptose, la sécrétion ou encore la migration cellulaires [1]. Les canaux calciques de la membrane plasmique contrôlent ces processus grâce à la régulation des échanges d'ions calcium entre le milieu extracellulaire et le cytosol où de nombreux effecteurs dépendants du calcium sont présents. Plusieurs études ont montré l'existence de différents types de perturbations pouvant affecter au final le rôle physiologique des canaux ioniques (Figure 1). Ainsi, depuis une quinzaine d'années, des chercheurs ont tenté d'identifier les acteurs moléculaires qui permettent au calcium de participer à la progression tumorale. Comme c'est le cas dans les cellules normales, dans les cellules tumorales aussi les processus cellulaires régulés par le calcium sont soumis à une régulation très fine, orchestrée par différents canaux et pompes calciques. De façon tout à fait intéressante, quelques canaux ioniques

ont une distribution tissulaire très spécifique, et l'altération de leur expression est notamment une caractéristique de certains cancers [2].

#### Rôles des protéines ORAI et STIM dans la progression tumorale

Dans une étude récente [3], nous révélons un nouveau niveau de complexité concernant les perturbations de la signalisation calcique observées au cours de la progression du cancer. Le domaine de la signalisation calcique a connu une révolution en 2005 et 2006 avec la découverte des protéines ORAI1 et STIM1, acteurs moléculaires de l'entrée calcique de type SOCE (store operated calcium entry) [4, 5, 12]. Le mécanisme de cet influx calcique a été décrit pour la première fois en 1986 par Putney [6] : l'épuisement des stocks calciques du réticulum endoplasmique de la cellule, qui représentent la majeure partie des stocks calciques intracellulaires, était capable d'activer un influx de calcium