

Traitement des dystrophies rétinienne affectant l'épithélium pigmentaire par ingénierie tissulaire fondée sur les cellules souches embryonnaires humaines

Karim Ben M'Barek¹⁻³, Walter Habeler¹⁻³, Olivier Goureau^{4*}, Christelle Monville^{1,2*}

¹Inserm U861, I-Stem, AFM, *Institute for stem cell therapy and exploration of monogenic diseases*, 28, rue Henri Desbruères, 91100 Corbeil-Essonnes, France.

²UEVE Inserm U861, I-Stem, AFM, *Institute for stem cell therapy and exploration of monogenic diseases*, 28, rue Henri Desbruères, 91100 Corbeil-Essonnes, France.

³CECS, I-Stem, AFM, *Institute for stem cell therapy and exploration of monogenic diseases*, 28, rue Henri Desbruères, 91100 Corbeil-Essonnes, France.

⁴Institut de la vision, Sorbonne Université, Inserm, CNRS, 75012 Paris, France.

*Contributions identiques
christelle.monville@univ-evry.fr
olivier.goureau@inserm.fr

> La conversion du signal lumineux en influx électrique par la rétine puis sa transmission au cerveau sont le fondement des mécanismes permettant la vision. Les cellules rétinienne sensibles à la lumière, ou photorécepteurs, sont l'objet de subtiles régulations garantissant leur homéostasie et leur survie, notamment grâce à la présence d'un feuillet cellulaire adjacent : l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR). Cet épithélium permet le fonctionnement adéquat des photorécepteurs en sécrétant des protéines ayant une activité trophique, en éliminant les débris provenant des photorécepteurs (par un mécanisme de phagocytose), en favorisant le transport d'ions, de la vitamine A et du glucose, en absorbant le surplus de rayons lumineux ou en participant au recyclage de certaines protéines impliquées dans la détection de la lumière [1].

Cet EPR est altéré dans de nombreuses dystrophies rétinienne. Dans le cadre de la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA), celui-ci peut être atrophié avec la mort des cellules qui le constituent. Certaines rétinites pigmentaires, pathologies formant un groupe de maladies génétiques rares, ont pour origine une mutation des gènes spécifiques des cellules de l'EPR. Il en résulte un défaut de fonctionnement de celui-ci, entraînant la mort des photorécepteurs et la cécité. Pour toutes ces maladies, il n'existe pas de

traitement curatif. La thérapie cellulaire, qui repose sur la génération, en laboratoire, de cellules de l'EPR dans le but de remplacer celles qui sont mortes ou non fonctionnelles chez certains patients est une piste prometteuse [2] (→).

Des essais cliniques ont d'ores et déjà débuté avec de premiers résultats encourageants en termes de sécurité pour des patients atteints de DMLA [3]. Cependant le domaine est encore balbutiant et ces technologies doivent être optimisées.

L'une des voies d'amélioration majeure envisagée de la thérapie cellulaire dans ce domaine est la formulation du produit qui est administré au patient. Pour les premiers essais chez l'homme, les cellules de l'EPR ont été injectées sous la forme d'une suspension liquide. Cette stratégie à l'avantage d'être simple : la fabrication et la préparation avant greffe sont rapides et la chirurgie requise pour implanter ces cellules existe déjà. Cependant la survie des cellules greffées est limitée et leur intégration dans la rétine n'est pas optimale. Pour être pleinement fonctionnelles, les cellules doivent, en effet, s'organiser en feuillet épithélial. La recherche s'oriente ainsi actuellement vers la fabrication préalable d'un tissu épithélial déjà organisé qui sera ensuite greffé [4, 5].

Reconstitution *in vitro* par ingénierie tissulaire de l'EPR

Dans le cadre d'une collaboration entre l'institut de la vision, l'I-Stem (AFM-Téléthon, Inserm, université d'Évry) et l'hôpital Saint Louis, nous avons reconstitué, en laboratoire, un feuillet épithélial d'EPR par ingénierie tissulaire [6]. Comme source de cellules, nous avons utilisé des cellules souches embryonnaires humaines. Ces cellules ont la propriété de proliférer indéfiniment tout en maintenant leur capacité à se différencier en tous types de cellules [7]. Nous avons ensuite développé un protocole afin d'orienter spécifiquement la différenciation de ces cellules souches en cellules d'EPR. Ce procédé de production robuste permet la conversion de toutes les cellules souches embryonnaires humaines en cellules d'EPR (avec moins de 0,05 % de cellules souches résiduelles). Les cellules d'EPR obtenues ont un niveau de pureté élevé (entre 96,5 et 99,3 %, selon les marqueurs utilisés). De larges banques de cellules EPR ont ainsi pu être produites. Elles ont été finement caractérisées selon différents critères : leur identité, leur pureté, leur fonctionnalité, leur degré de sécurité et leur stabilité.

Le tissu épithélial a été obtenu en cultivant les cellules d'EPR issues des cellules souches sur des fragments de membrane amniotique humaine (qui peuvent être conservés congelés après

(→) Voir la Nouvelle de S. Reichman *et al.*, *m/s* n° 10, octobre 2014, page 845



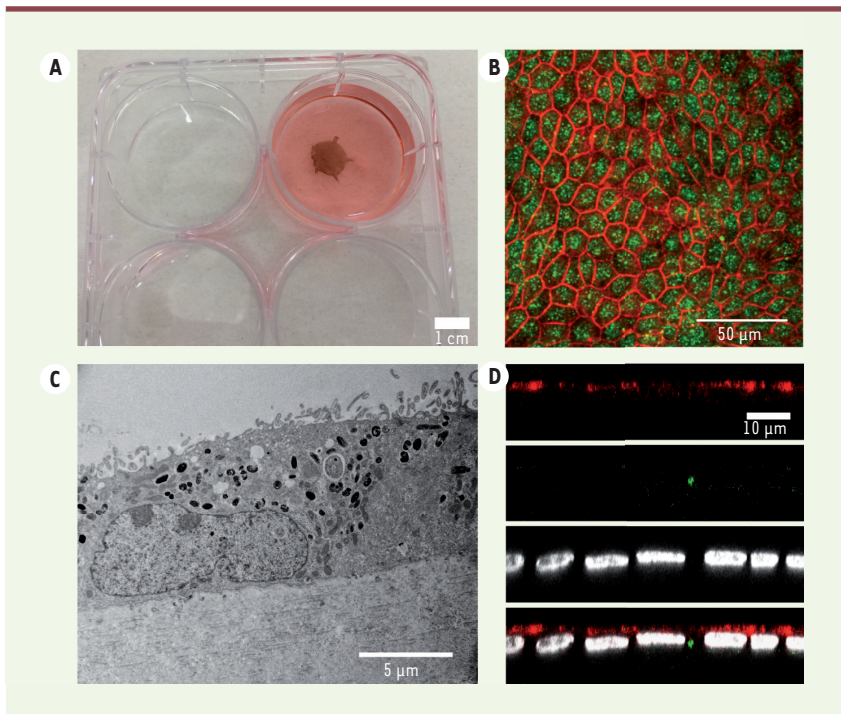


Figure 1. Production d'un épithélium de cellules de l'EPR en laboratoire à partir de cellules souches embryonnaires humaines. **A.** Photo d'un tissu reconstitué de l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR) sur une membrane amniotique dans une boîte de culture. **B.** Les cellules de l'EPR obtenues après différenciation expriment des marqueurs caractéristiques : PAX-6 (le facteur de transcription *paired box protein*, en vert) et Ezrine (une protéine liant le cytosquelette à la membrane plasmique, en rouge). **C.** Photo en microscopie électronique montrant la structure des cellules de l'EPR sur membrane. **D.** Le tissu reconstitué exprime MERTK (*myeloid-epithelial-reproductive tyrosine kinase*, récepteur apical, en rouge) et est fonctionnel via sa capacité à capter et éliminer les débris de photorécepteurs (en vert). Les noyaux contre-colorés par du DAPI apparaissent en blanc.

leur obtention lors de césariennes). La membrane amniotique présente une membrane basale similaire à celle sur laquelle les cellules d'EPR reposent pour former l'épithélium en contact avec les photorécepteurs. Les cellules d'EPR générées en laboratoire sont capables de s'attacher à cette membrane amniotique. Elles s'organisent en un tissu épithélial complet après quatre semaines de culture minimum (Figure 1). Au cours de cette période, elles vont, entre autres, commencer à se pigmenter, à former des jonctions serrées entre elles et des microvilli à leur surface apicale. Le feuillet reconstitué est fonctionnel *in vitro* : il est en effet capable d'éliminer des débris de photorécepteurs et de sécréter des protéines à activité trophique.

Le feuillet épithélial reconstitué n'étant pas rigide et se froissant très facilement, le développement d'une stratégie de transplantation dans l'œil a donc été nécessaire. Le feuillet a été enrobé de deux fines couches de gélatine (sous forme solide à 4 °C) puis placé dans une canule transparente très fine dans laquelle il se replie sur lui-même (la zone cellulaire étant à l'intérieur). À la sortie de la canule, le feuillet se déplie, grâce à l'élasticité de la gélatine, pour se placer directement au contact des photorécepteurs de la rétine. À la température corporelle, la gélatine se liquéfie très rapidement et est éliminée. Les cellules d'EPR ainsi implantées peuvent alors interagir avec les photorécepteurs. Nous avons démontré que le tissu reconstitué de cellules EPR n'était pas altéré par

cette méthode et que son positionnement sous la rétine était adéquat après cette chirurgie.

Le tissu reconstitué de l'EPR est plus efficace que la formulation en suspension cellulaire

Pour démontrer l'activité thérapeutique d'une telle formulation, nous avons utilisé un modèle murin de rétinite pigmentaire : le rat RCS (*royal college of surgeons*) qui présente une mutation d'un gène responsable d'une des fonctions des cellules de l'EPR. Elle est à l'origine d'une perte rapide des photorécepteurs et, par conséquent, de la vision [8]. L'opération de ces animaux, avant la perte définitive des photorécepteurs, a révélé que la greffe d'un tissu composé de cellules EPR permet une préservation plus importante et prolongée des fonctions visuelles, et de la structure de la rétine, que la méthode de la suspension cellulaire (sur une période de suivi de 3 mois), telle qu'évaluée par l'activité électrique résultant de la perception des signaux lumineux par les photorécepteurs. L'analyse de la structure de la rétine, par tomographie par cohérence optique, indique également une préservation accrue du nombre de photorécepteurs dans la zone de greffe. Enfin, des études comportementales ont permis de confirmer une amélioration de l'acuité visuelle : les rats greffés étant capables de détecter des objets en mouvement. Notre étude démontre que la formulation des produits de thérapie cellulaire pour le traitement des dystrophies rétiniennes est cruciale pour obtenir un bénéfice thérapeutique maximal chez le patient (Figure 2). Nous avons réalisé ce tissu thérapeutique avec un support biologique, la membrane amniotique. D'autres équipes de recherche travaillent actuellement sur des supports synthétiques, à base de polymères stables (comme le polyester ou le pyralène), ou biodégradables (comme le copolymère PLGA, poly-[acide lactide-co-glycolide]) [4, 9]. Une équipe japonaise réalise des essais cliniques sans aucun support [10]. La diversité des

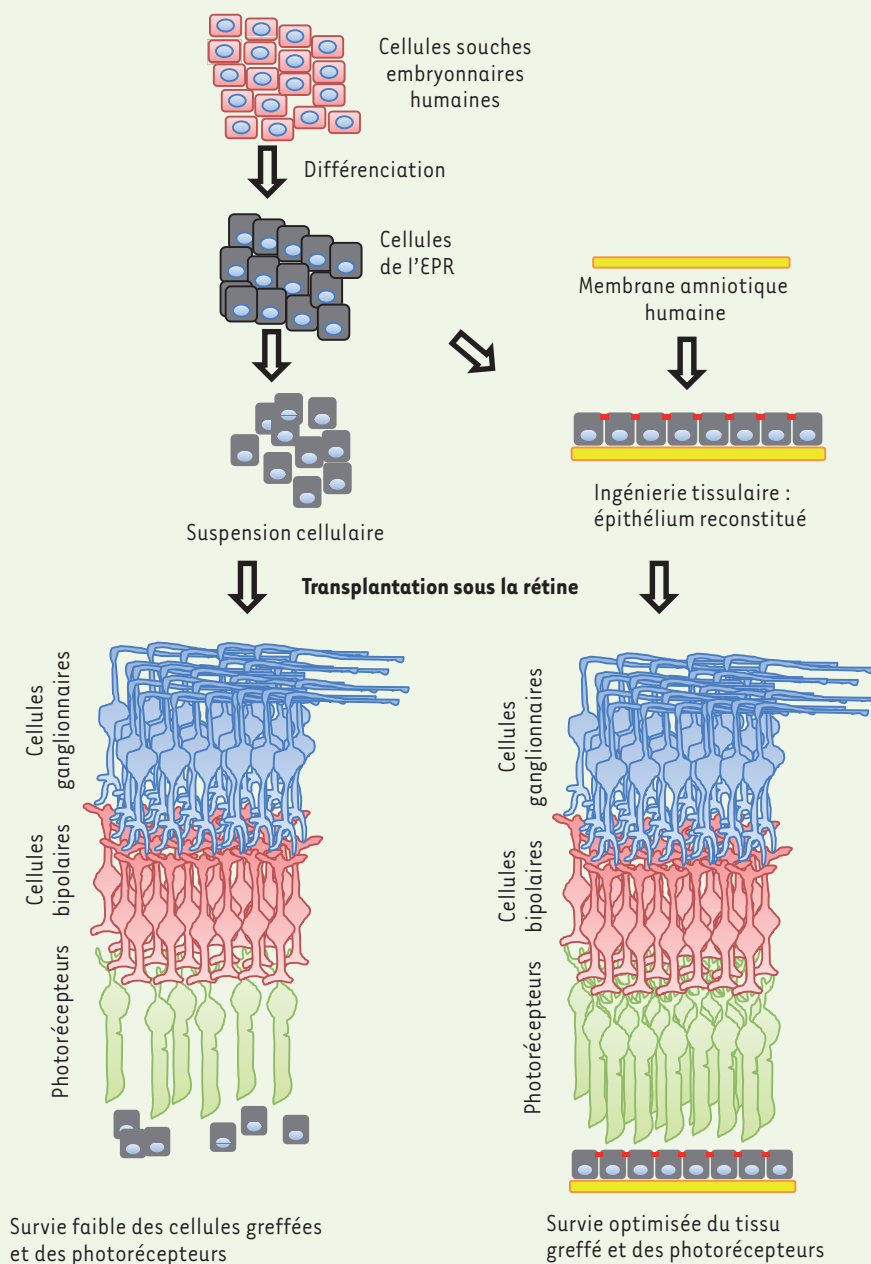


Figure 2. Schéma décrivant les deux méthodes de formulation du produit de thérapie cellulaire et les effets sur la rétine.

approches testées contribuera à développer la meilleure stratégie possible au bénéfice des patients. Nous évaluons désormais la sécurité du geste chirurgical, chez le primate, dont l'œil a une taille et une forme comparables à celles de l'œil humain. Nous espérons pouvoir traiter les premiers patients atteints de rétinite pigmentaire ayant pour origine un défaut de fonction de l'ÉPR, dans le cadre d'un

essai clinique de phase I/II au cours de l'année 2019. ♦

Treating retinal dystrophies affecting retinal pigment epithelium using tissue engineering obtained from human embryonic stem cells

LIENS D'INTÉRÊT

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

RÉFÉRENCES

1. Strauss O. The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol Rev* 2005 ; 85 : 845-81.
2. Reichman S, Sahel JA, Goureau O. Production de rétines *in vitro* à partir de cellules pluripotentes humaines. Un nouvel outil thérapeutique. *Med Sci (Paris)* 2014 ; 30 : 845-8.
3. Schwartz SD, Regillo CD, Lam BL, et al. Human embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium in patients with age-related macular degeneration and Stargardt's macular dystrophy: follow-up of two open-label phase 1/2 studies. *Lancet* 2015 ; 385 : 509-16.

RÉFÉRENCES

- Nazari H, Zhang L, Zhu D, et al. Stem cell based therapies for age-related macular degeneration: The promises and the challenges. *Prog Retin Eye Res* 2015 ; 48 : 1-39.
- Carr AJ, Smart MJ, Ramsden CM, et al. Development of human embryonic stem cell therapies for age-related macular degeneration. *Trends Neurosci* 2013 ; 36 : 385-95.
- Ben M'Barek K, Habeler W, Plancheron A, et al. Human ESC-derived retinal epithelial cell sheets potentiate rescue of photoreceptor cell loss in rats with retinal degeneration. *Sci Transl Med* 2017 ; 9 (421).
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998 ; 282 : 1145-7.
- D'Cruz PM, Yasumura D, Weir J, et al. Mutation of the receptor tyrosine kinase gene *Mertk* in the retinal dystrophic RCS rat. *Hum Mol Gen* 2000 ; 9 : 645-51.
- Bharti K, Rao M, Hull SC, et al. Developing cellular therapies for retinal degenerative diseases. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014 ; 55 : 1191-202.
- Mandai M, Watanabe A, Kurimoto Y, et al. Autologous induced stem-cell-derived retinal cells for macular degeneration. *N Engl J Med* 2017 ; 376 : 1038-46.

NOUVELLE

Une voie dopaminergique descendante pour contrôler le mouvement

Maxime Fougère¹, Dimitri Ryczko^{1,2}

Dopamine et locomotion

La locomotion est une activité quotidienne fondamentale. Elle se manifeste sous différentes formes comme la marche chez l'humain, la nage chez le poisson ou le vol chez l'oiseau. Chez les vertébrés, les neurones dopaminergiques méso-diencephaliques sont connus pour jouer un rôle important dans la modulation de la locomotion. L'augmentation de la concentration de dopamine à la synapse par les psychostimulants ou la lévodopa¹ entraîne une augmentation de l'activité locomotrice. À l'inverse, lorsque les neurones dopaminergiques meurent, comme dans la maladie de Parkinson, des déficits locomoteurs apparaissent. Traditionnellement, les effets locomoteurs de la dopamine sont associés aux projections ascendantes des neurones dopaminergiques de la *substantia nigra pars compacta* vers les ganglions de la base, un groupe de structures cérébrales impliquées dans la programmation du mouvement [1] (Figure 1). En retour, les ganglions de la base projettent vers la région locomotrice mésencéphalique (*mesencephalic locomotor region*, MLR) [2, 3],

une région du tronc cérébral contrôlant la locomotion chez les vertébrés. La MLR envoie des projections vers les neurones réticulospinaux, qui relaient la commande locomotrice vers la moelle épinière (Figure 1). Découverte initialement chez le chat [2], la MLR a ensuite été identifiée chez les poissons, les amphibiens, les autres mammifères et les oiseaux [4]. Anatomiquement, la MLR correspond au noyau pédonculopontin et au noyau latérodorsal du tegmentum chez les vertébrés basaux². Chez le mammifère, elle comprend le noyau pédonculopontin et le noyau cunéiforme [4]. Chez l'humain, l'activité locomotrice est associée à une activation de la MLR, et des déficits locomoteurs apparaissent quand cette région est lésée [4]. Ainsi, dans les circuits nerveux que nous venons de décrire, le lien entre les neurones dopaminergiques et le circuit locomoteur est classiquement considéré comme indirect, puisqu'il implique un relai par les ganglions de la base.

Une voie dopaminergique descendante innerve la région locomotrice mésencéphalique

Une série d'études récentes a montré qu'en plus de leurs projections ascendantes aux ganglions de la base, les neurones dopaminergiques envoient des projections descendantes directement à la MLR [5-8] (pour une revue voir [4]) (Figure 1). Une innervation dopaminergique de la MLR a tout d'abord été décrite chez le singe [9]. L'origine et le rôle de cette innervation étaient cependant inconnus. Des études réalisées chez différentes espèces ont permis de faire progresser ces questions importantes. Chez la lamproie (un poisson primitif) [5, 6, 8] et la salamandre [7], l'origine de la voie dopaminergique descendante est le tubercule postérieur. Cette région du diencephale est considérée homologue à la *substantia nigra pars compacta* et/ou à l'aire tegmentale ventrale, car elle envoie des projections ascendantes aux ganglions de la base [4]. Chez le rat, l'innervation dopaminergique du noyau pédonculopontin (une partie de la MLR) est issue principalement de la *substantia nigra pars compacta* et, dans une moindre mesure, de la région rétro-rubrale [7]. Finalement, l'innervation dopaminergique du

¹Département de pharmacologie-physiologie, faculté de médecine et des sciences de la santé, université de Sherbrooke, 3001, 12^e Avenue Nord, J1H 5N4 Sherbrooke, Québec, Canada.

²Centre de recherche du centre hospitalier universitaire de Sherbrooke, J1H 5N4 Sherbrooke, Québec, Canada.
dimitri.ryczko@gmail.com

¹ Médicament prescrit dans le traitement de la maladie de Parkinson.

² À la base de l'arbre phylogénétique des vertébrés.