

Diabète : l'autogreffe de cellules de sang périphérique pour éviter l'amputation

Soigner l'ischémie critique des membres inférieurs chez les patients diabétiques par autogreffe de cellules proangiogéniques du sang périphérique ? C'est peut être pour demain.

Chaque année en France, on compte plus de 10 000 amputations dues au diabète. Les troubles de la circulation sanguine sont l'une des principales complications de cette maladie métabolique, qu'il s'agisse du diabète de type 1 ou de type 2. Si ces anomalies vasculaires touchent aussi le cœur, les reins et la rétine, le plus souvent, ce sont les membres inférieurs qui sont atteints. L'ischémie critique des membres inférieurs aboutit, dans 15 à 30 % des cas, à des amputations multiples, et est l'une des principales causes de morbidité et de mortalité chez les diabétiques.

Dans des conditions normales, à l'apparition d'un début d'ischémie, donc d'hypoxie, une série de mécanismes se met en route et donne naissance à un nouveau réseau de « néo-vaisseaux ». Mais chez le patient diabétique, ces mécanismes fonctionnent mal et lorsque l'ischémie s'aggrave, c'est l'escalade : pieds froids, cicatrisation difficile, claudication, ulcère, gangrène... Le Pr Bernard Levy, de l'Institut des Vaisseaux et du Sang (IVS) déplore : « *Quand on a atteint le stade des complications vasculaires périphériques, il n'y a plus beaucoup de solutions médicales. Reste la radiologie interventionnelle, la pose de stents ou encore les pontages, mais lorsque la chirurgie n'a plus de possibilités, on ne peut plus rien faire.* »

Pour lutter contre cette fatalité, le Pr Bernard Levy et son équipe mènent depuis longtemps des travaux poussés sur l'angiogenèse dans le laboratoire de l'IVS à l'Hôpital Lariboisière Paris. « *Depuis plus de 15 ans nous cherchons à comprendre pourquoi le diabétique a de moins bonnes capacités de régénération vasculaire que le non diabétique. Ces études nous ont naturellement menés à la recherche de thérapies pour guérir ces problèmes de circulation périphérique* », explique le professeur.

Après quelques tâtonnements du côté de la protéine VEGF (facteur de croissance de l'endothélium vasculaire), les recherches se sont tournées vers les cellules souches de moelle osseuse dites médullaires. Et ça marche ! « *Tous les essais cliniques ont été positifs, les cellules souches de moelle sont capables de régénérer des vaisseaux ; nous savons déjà le faire depuis 2006, mais c'est une procédure extrêmement lourde.* » Une opération qui se traduit par un prélèvement de moelle sous anesthésie générale et trois, cinq parfois même dix ponctions osseuses, pour avoir suffisamment de cellules de moelle. Ce sont des cellules progénitrices jeunes, qui vont donner à terme des cellules vasculaires (cellules progénitrices endothéliales), qui sont sélectionnées, isolées et injectées directement dans le membre malade. Pour autant le Pr Levy prévient : « *dans l'état de santé dans lequel est généralement un patient diabétique souffrant d'ischémie critique des membres inférieurs, l'opération est très lourde et peut rarement être renouvelée.* »

Autre alternative, l'utilisation de cellules souches de sang de cordon. La solution n'est pas non plus idéale : des problèmes de compatibilité biologique apparaissent.

« *Au même moment, des recherches étaient menées sur le rôle des éphrines dans le développement, et nous étions fascinés par le fait que cette protéine était capable de différencier les vaisseaux primitifs en artères et en veines.* » Est donc venue l'idée de se servir de cette protéine : « *nous avons*

d'abord essayé de voir si elle avait un effet accélérateur sur les cellules progénitrices de sang de cordon. » Bingo : le travail princeps, publié en 2007 dans le *Journal of Clinical Investigation*, montre que l'éphrine B2 rend les cellules progénitrices endothéliales du sang de cordon hyperactives (2 à 5 fois plus que lorsqu'elles ne sont pas stimulées) et qu'elles adhèrent de manière bien plus importante aux cellules endothéliales de la zone en souffrance.

Les scientifiques de l'IVS suivent alors le raisonnement suivant : les cellules de sang de cordon sont difficiles à obtenir et peuvent être immunogènes, alors pourquoi ne pas essayer avec du sang périphérique autologue ? « *Retransformer des cellules adultes, c'est là l'originalité de notre procédé !* », s'exclame le Pr Levy.

Des cellules de sang périphériques dé-différenciées pour lutter contre l'ischémie

C'est donc là l'objet de leurs recherches : « *Nous partons de cellules mononuclées du sang périphérique des patients diabétiques – essentiellement des monocytes et des lymphocytes – arrivées au bout de leur différenciation. Ce sont donc des cellules adultes. Lorsqu'elles sont mises en contact pendant 30 minutes avec l'éphrine B2, environ 15 % de ces cellules se dédifférencient et acquièrent des propriétés de cellules progénitrices endothéliales (EPC). 15 % c'est relativement peu, mais c'est énorme par rapport aux quantités circulantes disponibles de cellules souches.* »

Une fois stimulées, les cellules sont lavées de manière à ne pas injecter d'éphrine au patient. Lorsqu'elles sont injectées, les cellules mononuclées activées circulent dans le flux sanguin et s'arrêtent dans les zones ischémiques. « *Là, elles stimulent la production d'une grande quantité de produits angiogéniques : VEGF, monoxyde d'azote, cytokines IL6, IL10, M-CSF, etc., sont parmi ceux que nous avons identifiés* », explique le Pr Levy.

Ces cellules restent actives plusieurs jours, jusqu'à 21 jours chez la souris. « *Il suffit qu'elles aient été actives quelques jours pour avoir un effet pro-angiogénique* », précise le Pr Levy. Un certain nombre d'entre elles est détruit, dans la rate et dans les poumons par exemple. « *Chez la souris, nous avons recherché la présence des cellules activées dans les différentes parties du corps et nous avons constaté que l'essentiel d'entre elles se concentre dans la patte ischémique* », ce qui démontre qu'elles détectent les régions en souffrance.

« *Nous avons fait toutes les manipulations animales, à partir de sang humain et validé le concept chez la souris diabétique à qui nous avons ligaturé l'artère fémorale d'une patte pour mimer une ischémie critique.* »

Des cellules proangiogéniques conservées dans une biobanque

Les chercheurs travaillent actuellement sur la conservation de ces cellules proangiogéniques dans le temps. Le superflu d'échantillons est refroidi dans l'azote liquide puis vérifié dans les mois suivants pour juger de l'efficacité des cellules après congélation. « *L'idée est qu'un même patient pourrait venir donner ses cellules mononuclées une fois et garder dans une bio-banque 10 à 30 tubes qui lui permettront de recevoir 10 à 30 fois le traitement sans devoir être de nouveau prélevé.* » Le processus de prélèvement étant chiffré à près de 700 €, selon le Pr Lévy, cela permettrait d'amortir les coûts. La stratégie envisagée et celle de prélèvements par cytophèrese ce qui permettrait d'obtenir jusqu'à 10^{10} , voire 10^{11} ou même 10^{12} cellules mononuclées, un nombre suffisant pour réaliser plusieurs dizaines de traitements sur le même patient.

Vers une étude clinique

Pour l'heure, en association avec l'Établissement français du sang (EFS), l'étude est entrée en phase clinique 1-A : *« des donneurs volontaires sains sont sollicités et nous vérifions si la stimulation de leurs cellules mononuclées – dans des conditions qui sont susceptibles d'être utilisées chez le patient – ont un potentiel proangiogéniques important. »* Les résultats de cette phase 1A devraient arriver en octobre. *« Nous validons la technique et l'efficacité des cellules congelées. Nous ne savons pas bien pourquoi, mais le sang de patient diabétique est aussi efficace, voire plus, que celui de volontaires sains, explique le Pr Levy. Peut être parce que le diabétique est à un stade d'inflammation chronique ; il pourrait donc être plus susceptible à la stimulation par l'éphrine B2. »*

Prochaine étape, un essai clinique multicentrique de phase 1-2 à trois bras mené sur 75 à 100 patients: un groupe de patients à qui les injections seront faites directement dans le muscle qui en a besoin (à l'image de ce qui est déjà réalisé avec les cellules souche de moelle) ; un groupe de patients à qui les injections seront faites en intraveineuse, (à l'instar de ce qui est déjà fait chez la souris), afin de valider que les cellules proangiogéniques détectent bien la zone en souffrance et s'y dirigent, et un troisième groupe qui sera injecté lors d'une procédure de réparation endovasculaire, en supplément du procédé mécanique (chirurgical), afin d'accélérer la cicatrisation. *« Ce sera très certainement l'EFS, qui comprend une structure spécialisée dans la thérapie cellulaire à Créteil, qui s'occupera du traitement du sang et enverra les cellules dans les différents services cliniques pour les injecter aux patients »*, précise le Pr Lévy.

Comme souvent, c'est à ce stade qu'émergent les questions de budget. *« Il s'agit là d'un processus avec une échelle qui dépasse celle d'un labo comme l'IVS. »* Si les résultats d'octobre sont positifs, il faudra alors se tourner vers l'ANSM (Agence nationale de sécurité du médicament) pour discuter de la mise en place de l'essai de phase 1-2 et des financements du projet. Et le Pr Lévy de conclure : *« Tout ceci est breveté et nous espérons maintenant trouver un, ou des, industriels qui croient au projet et qui financeraient la phase 1 et 2 »*.

ENCADRE 1

En chiffres

Le diabète de type 2 représente près de 90 % des diabètes dans le monde.

50 à 80 % des décès chez les diabétiques sont dus à une maladie cardio-vasculaire.

En France, en 2009, on comptait 4,4 % de diabétiques dans la population, soit près de 3 millions de personnes, et on estime à plus 500 000 le nombre de diabétiques qui s'ignorent.

10 000 amputations dues au diabète sont pratiquées chaque année en France.

Le diabète pourrait devenir la 7^e principale cause de décès dans le monde d'ici 2030.

ENCADRE 2

Zoom sur l'éphrine B2

L'éphrine B2 est une « grosse » protéine de 333 acides aminés et 49 kDa, dont le rôle connu est la neuroguidance (le guidage des axones) et la différenciation artério-veineuse lors du développement de l'embryon et du jeune fœtus. « *Il y a encore quelques années, nous pensions qu'il n'y en avait pas chez l'adulte* », explique le Pr Bernard Levy. « *Nous savons maintenant qu'il y a de l'éphrine B2 chez l'adulte dans le plasma. Elle participe notamment à l'artériosclérose, mais tout son spectre d'action reste encore flou* ». *In vitro*, au contact des monocytes, l'éphrine B2, en concentration importante, active des cytokines pro-inflammatoires et pro-angiogéniques dans les monocytes qui vont alors sécréter des substances paracrines proangiogéniques.

Image éphrine B2

http://en.wikipedia.org/wiki/File:Protein_EFNB2_PDB_1ko.png