



RECHERCHE EXPÉRIMENTALE
ET PROTECTION DE L'ANIMAL DE LABORATOIRE

REEMPLACER. RÉDUIRE. RAFFINER

(Russell et Burch-1959)

REEMPLACER
REEMPLACER
REEMPLACER
REEMPLACER

REEMPLACER L'ANIMAL DE LABORATOIRE ?

Réalités et perspectives

*lignées cellulaires, cellules souches,
cellules humaines, biotechnologies,
screening virtuel, bases de données*

COLLOQUE

ORGANISÉ PAR L'OPAL

MARDI 14 OCTOBRE 2003

MAISON DE LA CHIMIE • 28, RUE SAINT-DOMINIQUE, 75007 PARIS

**SOUS LA PRÉSIDENTE DE
CHANTAL AUTISSIER**

RENSEIGNEMENTS & INSCRIPTIONS :

OPAL - 28, RUE SAINT-DOMINIQUE, 75007 PARIS
Tél. : 01 47 53 09 12 - E-mail : OPALassociation@aol.com

Introduction

Dr Chantal AUTISSIER (Présidente du Colloque)

Pr Jean-Pierre CLOT (Président de l'OPAL)

OPAL

Recherche Expérimentale et Protection de l'Animal de Laboratoire

28, rue Saint Dominique

75007 Paris

mail : OPALassociation@aol.com

L'OPAL a pour objectifs de promouvoir et de soutenir toutes les actions en faveur du respect dû aux animaux de laboratoire, et plus particulièrement de contribuer au développement de méthodes alternatives ou complémentaires fiables permettant de limiter le recours à l'animal, ainsi que d'améliorer les conditions d'hébergement et d'utilisation.

Remplacer, réduire, raffiner... les mots-clés de la publication de 1959 de Russell et Burch font depuis longtemps l'unanimité parmi les expérimentateurs. Et ces objectifs en matière d'expérimentation animale, ont également été pris en compte dans notre réglementation européenne.

Le colloque, organisé par l'OPAL en octobre 2003, avait pour but de faire le point sur le développement des différentes méthodologies utilisées ces dernières années en recherche biomédicale. Ces méthodes ont permis progressivement de diminuer le recours à l'animal de laboratoire, voire de le remplacer.

Il faut distinguer le remplacement " relatif " qui recourt à l'animal pour obtenir soit ses tissus, soit ses cellules, ou encore les embryons, et le remplacement " absolu " grâce entre autres aux techniques physico-chimiques, aux bases de données informatisées ou encore à la bioinformatique structurale.

Il y a également de plus en plus d'études sur tissu humain qui permettent d'obtenir des données fiables directement transposables à l'organisme humain ainsi que des études pharmacocliniques sur l'homme, au tout début du développement d'un médicament.

Toutes ces méthodes ne permettent pas de s'affranchir complètement du recours à l'animal entier qui, seul, en l'état actuel de nos connaissances peut fournir des données intégrées complexes de physiologie.

Les orateurs, dont le propos a été réactualisé et figure dans ce fascicule, ont abordé les principaux domaines de recherche pour les méthodes alternatives :

Francelyne Marano expose les deux grands axes de développement de l'utilisation des cultures cellulaires dans le domaine de la pharmacotoxicologie :

- le criblage des nouvelles molécules utilisant des lignées cellulaires,

- les recherches dans la compréhension de la physiologie des cellules différenciées et dans l'étude des mécanismes d'action des xénobiotiques, mettant en oeuvre de nouvelles techniques de culture, notamment cultures sur matrice et cultures tridimensionnelles.

Pascale Gaussem fait ressortir les extraordinaires applications biomédicales potentielles des différents types de cellules souches qui pourront également être utilisées en remplacement de modèles animaux au cours, notamment, du criblage de nouvelles molécules.

André Guillouzo souligne les avantages et les limites des différents modèles cellulaires hépatiques. En particulier, les hépatocytes humains en culture sont maintenant largement utilisés pour des études physiologiques, pharmacotoxicologiques avec, en particulier, la recherche d'interactions médicamenteuses, mais également en suppléance hépatique. Le principal problème est la dédifférenciation rapide de ces cellules, qui peut cependant être retardée par immobilisation, support matriciel, coculture,...

Maïté Corvol traite ensuite les potentialités et les limites de l'utilisation des chondrocytes humains en pharmacologie. Les progrès récents de la biologie et de la génétique moléculaire ont permis d'établir des lignées de chondrocytes humains ou murins immortalisées, utilisables à la fois pour le criblage et pour la recherche fondamentale. La culture de chondrocytes humains laisse même entrevoir la possibilité de thérapie cellulaire.

Dominique Bellet montre l'intérêt du modèle *in vitro* de sphéroïdes de cellules tumorales en 3-D qui mime les micrométastases avasculaires *in vivo*. Ce modèle présente l'avantage par rapport aux cultures classiques en 2-D, de prendre en compte les forces mécaniques et la complexité du microenvironnement qui influencent les propriétés des cellules tumorales, et permet de repousser l'utilisation des modèles animaux.

Valérie Audinot met l'accent sur la diminution massive de l'utilisation d'animaux dans les expériences de

réceptologie et de criblage de molécules, puisque, très rapidement, beaucoup d'informations sont obtenues grâce aux lignées cellulaires, ce qui permet de diminuer assez tôt, lors du développement des médicaments, le nombre de produits à tester chez l'animal.

Bruno Villoutreix développe certaines notions de bioinformatique structurale en se concentrant sur l'aspect criblage *in silico* ou criblage virtuel. Cette approche *in silico* permet d'explorer rapidement un maximum d'hypothèses pour se consacrer aux seules molécules qui offrent la plus grande probabilité d'atteindre la phase clinique.

Enfin André Michel traite de l'expérimentation virtuelle en recherche pharmaceutique développée par la société Aureus Pharma. Il s'agit d'un système d'intégration de bases de

données traitant de l'expérimentation biologique et pharmacochimique décrite dans la littérature. Ce système permet de choisir *a priori* les structures moléculaires les plus à même d'entraîner une réponse sur une cible déterminée, de prévoir de nouvelles applications pour des produits donnés ou encore de prévoir le risque d'apparition d'effets indésirables.

Les différents intervenants ont fait ressortir les développements actuels et prévisibles des expérimentations *in vitro* utilisant des techniques de culture cellulaire de plus en plus complexes, des lignées cellulaires et, de plus en plus, les cellules souches humaines et animales. Ils ont également montré les apports de la bioinformatique structurale et de bases de données dans la stratégie de découverte de nouvelles molécules à usage thérapeutique.

Les approches cellulaires *in vitro* et leurs limites

Application à la toxicologie

Francelyne MARANO

Laboratoire de Cytophysiologie et Toxicologie,
Université Paris 7 - Denis Diderot
2 place Jussieu - 75005 Paris
mail : marano@paris7.jussieu.fr

Les méthodes *in vitro* représentent actuellement une partie très importante des méthodes « alternatives » et comprennent l'utilisation d'organes isolés, de tranches d'organes, de cultures cellulaires, d'organites ou de molécules biologiques. Elles permettent de limiter de façon notable et dans certains cas de remplacer le recours à l'expérimentation animale, notamment dans le domaine de la toxicologie. Nous allons ici nous focaliser sur les cultures cellulaires qui sont utilisées en pharmaco-toxicologie pour le criblage de nouvelles molécules, pour la toxicité organospécifique et pour l'étude du mécanisme d'action des xénobiotiques.

Cultures cellulaires : de la recherche fondamentale aux applications

Les cultures cellulaires se sont d'abord développées dans le domaine de la recherche fondamentale. Alexis Carel a été le premier, au début du 20^e siècle, à isoler un fragment d'organe, à le maintenir dans des conditions de milieu adéquates et à constater que finalement ce fragment d'organe pouvait survivre hors de l'organisme. Cependant, c'est Moscona en 1952 qui, en découvrant la trypsination et l'isolement de cellules à partir de tissus, réalisa les premières cultures de cellules. L'extension de ces techniques a été ensuite considérable et nous leur devons en partie l'essor de nos connaissances en biologie cellulaire. Ensuite, tous les modèles développés pour mieux comprendre le fonctionnement des cellules, ont été utilisés dans d'autres domaines plus appliqués, comme en pharmacotoxicologie, mais aussi - et c'est plus récent - en médecine régénératrice. Un exemple frappant est l'utilisation de cultures de peau pour le traitement des grands brûlés. Un autre domaine émergent est celui des cellules souches, qu'il s'agisse des cellules d'origine embryonnaire ou des cellules souches adultes que nous parvenons maintenant à mieux connaître. Ce domaine a certainement un grand avenir, notamment en thérapie cellulaire et grâce à l'utilisation des outils de la transgénèse permettant de transformer les cellules au moyen de gènes d'intérêt. Dernière application : la recherche de nouveaux agents anticancéreux qui sont testés essentiellement sur des lignées tumorales.

Un problème de fond : préserver la différenciation

Le challenge essentiel des cultures cellulaires est le maintien *in vitro* de l'état différencié tel qu'il est observé *in vivo*. A cette fin, différentes méthodes ont été développées :

Les cultures organotypiques, tout d'abord, consistent à isoler et à maintenir en survie un fragment d'organe ou de tissu. C'est à ce type de cultures qu'appartiennent les tranches d'organe largement utilisées en pharmacotoxicologie : tranches de foie, de poumon, de rein, voire de cerveau. Leur avantage est de pouvoir maintenir *in vitro* différents types de tissus dans toute leur complexité. Leur inconvénient est qu'elles fournissent une réponse globale dont on ne sait pas toujours l'origine, ce qui a conduit au

Résumé

Les cultures cellulaires représentent actuellement la plus grande partie de ce qu'on appelle « méthodes alternatives » à l'expérimentation animale. Elles sont utilisées pour le criblage de nouvelles molécules, pour l'étude de la toxicité organospécifique en complément de l'expérimentation animale et pour les études sur le mécanisme d'action des xénobiotiques. Cette présentation avait pour but de montrer, à partir d'exemples, en quoi elles pouvaient apporter des réponses aux questions posées par la pharmacologie et la toxicologie ainsi que les limites de leur utilisation.

Mots clés : Cultures cellulaires, méthodes alternatives, épithélium respiratoire, toxicologie des particules atmosphériques.

Summary

Cell cultures represent now the most part of alternative methods. They are used for the screening of drugs, for studies on organ toxicity in complement of animal experiments and for mechanistical studies. In this presentation, we have focused on the uses of these methods in pharmaco-toxicology and their limits.

développement des cultures primaires. Il s'agit alors d'isoler un type cellulaire et de le maintenir le mieux possible *in vitro* dans les milieux adéquats. Cependant, en général, on observe une rapide dédifférenciation en culture. Parallèlement, on a assisté au développement des lignées cellulaires, d'abord d'origine cancéreuse ou embryonnaire, puis des lignées immortalisées par transfection. Ces dernières sont des cellules normales qui pour certaines d'entre elles – nombreuses actuellement – sont d'origine humaine.. (*)

Les lignées transformées ont eu au cours des dernières années un développement véritablement exponentiel. Transfecter des cellules devient une pratique courante dans les laboratoires, ceci pour les transformer de façon définitive en les immortalisant ou de façon transitoire au moyen d'un gène d'intérêt. Ces immortalisations ont été réalisées, le plus souvent, avec des oncogènes. On a beaucoup utilisé l'antigène T du virus SV40. Mais, le problème de ces lignées, là encore, est celui, d'une perte partielle ou totale des fonctions différenciées. Notons qu'on peut obtenir une meilleure différenciation *in vitro* avec des lignées obtenues à partir de souris transgéniques, en associant au transgène un promoteur spécifique de tissu. Nous avons également la possibilité, avec l'immortalisation, d'introduire des promoteurs inductibles qui sont par exemple inductibles par la chaleur ou par des antibiotiques, et qui vont permettre de jouer sur la balance prolifération-différenciation.

Ainsi, voit-on bien que le maintien de la différenciation est le problème central. Il est apparu que le microenvironnement jouait un rôle déterminant. Ce microenvironnement est fait de ce que la cellule va sécréter, les protéines de la matrice qui peuvent avoir pour origine la cellule elle-même ou les cellules voisines. Mais il résulte aussi des contacts que les cellules établissent entre elles et qui vont être essentiels pour la différenciation d'abord, puis, ensuite, pour le maintien de l'état différencié. Pour maintenir, *in vitro*, cet état différencié, il faut évidemment utiliser les bons outils, les bonnes protéines de la matrice. Le rôle de la polarité cellulaire pour les cellules polarisées est aussi extrêmement important, et il faut faire en sorte de la maintenir *in vitro*. Pour cela, différentes solutions ont été trouvées : la culture sur filtre, la culture tridimensionnelle, par exemple. Nous pourrions aussi évoquer les cocultures qui, en associant deux types de cellules qui, dans l'organisme, sont très directement en contact, permettent un bon maintien de l'état différencié.

Il existe quelques lignées cellulaires qui permettent d'assurer cette bonne différenciation

par exemple, Caco2 - qui est une lignée d'origine intestinale (entérocytes) - qui peut se différencier de façon tout à fait remarquable dans un système de type Transwell sur filtre. Mais ces lignées différenciables restent, malheureusement, beaucoup trop rares.

Un tissu humain complexe : l'épithélium respiratoire

Prenons un exemple: l'épithélium respiratoire. On peut utiliser des tissus d'origine animale, en particulier à partir de trachée de lapin ou de rat, pour réaliser des cultures primaires. Mais on peut également utiliser des muqueuses d'origine humaine qu'on peut se procurer, après autorisation des comités d'éthique, auprès des services de chirurgie ORL ou de pneumologie.

L'épithélium respiratoire est un tissu complexe. Il borde les voies aériennes depuis le nez jusqu'aux bronchioles. C'est un épithélium pseudostratifié avec deux types de cellules très spécialisées : les cellules sécrétrices - en particulier les cellules à mucus - les cellules ciliées qui permettent le mouvement unidirectionnel de ce mucus et, enfin, des cellules basales, impliquées dans le renouvellement de cet épithélium, en particulier dans la réparation de celui-ci. On y distingue également des glandes séreuses ou muqueuses qui possèdent un épithélium unistratifié, simple, et concourent à la constitution du mucus. Cet épithélium est intéressant à cultiver *in vitro* parce que :

- Il joue un rôle très important de protection de l'organisme vis-à-vis des aérocontaminants ;
- Il est aussi la cible d'un certain nombre de pathologies, ainsi que de polluants environnementaux et de maladies génétiques.

Comme pour la peau, ou la plupart des épithéliums, l'intérêt de celui-ci provient de la fonction importante d'interface qu'il remplit.

Les méthodes de culture ont déjà été évoquées. Pour les cultures primaires, on peut dissocier des polypes ou des cornets nasaux. Dans un premier temps, les cellules épithéliales prolifèrent sur une matrice de collagène. A confluence, on sépare alors le tapis cellulaire de la matrice. Ce tapis est mis, ensuite, en agitation rotationnelle dans un milieu adéquat, additionné de facteurs de croissance. La définition du milieu est déterminante pour éviter la perte de différenciation. En effet, quand les cellules prolifèrent – c'est une règle assez générale – il y a, très souvent, perte de la différenciation. Elles conservent leur caractère épithélial, mais elles ne sont plus ni sécrétrices, ni ciliées alors qu'au départ, on avait des cellules sécrétrices et ciliées. La prolifération est essentiellement le fait des

* "Culture de cellules animales", aux Editions Technique de l'INSERM par Georgia Barlovatz-Meimon et Monique Adolphe.

cellules basales. Ici, l'agitation rotationnelle bloque la prolifération et permet la différenciation. On obtient ainsi un épithélium mucociliaire tout à fait comparable à la muqueuse humaine d'origine.

En pratique : des applications en pharmacologie

Pour suivre la différenciation, on va utiliser des marqueurs spécifiques, par exemple un marqueur des cils. Il s'agit d'un anticorps dirigé contre une modification post-traductionnelle de la tubuline qui est la protéine majoritaire des cils. On peut voir que lorsqu'on met en agitation, il n'y a plus du tout de cellules ciliées. Elles commencent à apparaître au bout de 10 jours. On observe leur augmentation jusqu'au vingtième jour où l'on obtient de magnifiques ciliatures.

On peut réaliser le même type d'expériences pour suivre la différenciation des cellules à mucus. En effet, dans cette approche, on ne cherche pas à séparer les types cellulaires considérant qu'il est au contraire important de conserver leurs interactions pour reconstituer un épithélium *in vitro*.

On peut également avec ce modèle étudier *in vitro* les mécanismes de réparation de l'épithélium. Les lésions-réparations sont quasi continues dans les voies aériennes, lésions mécaniques, chimiques ou infections. Les polluants atmosphériques, par exemple, provoquent des lésions. On assiste alors à une dénudation de la lame basale et la migration cellulaire va permettre de reconstituer le plus rapidement possible l'épithélium. Sinon les aérocontaminants pourraient franchir cette barrière endommagée, en particulier les bactéries, les champignons, les virus, les polluants etc... On assiste donc d'abord à une prolifération intense au cours de laquelle l'épithélium se stratifie et prend un aspect tout à fait différent de l'épithélium mucociliaire normal. C'est la différenciation épidermoïde. Nous pensons que cette étape pourrait, dans certains cas, évoluer vers la cancérogenèse. On trouve d'ailleurs assez souvent ces foyers de métaplasie épidermoïde - qui apparaissent notamment chez le fumeur - associés avec des foyers cancéreux. Ensuite, s'il n'y a pas cancérisation, ces cellules desquament et retournent à un épithélium mucociliaire pseudostratifié.

On comprend aisément que tout ce processus est soumis à un contrôle très précis. Différents facteurs de croissance interviennent. Il a donc fallu les identifier. C'est très important pour les applications, aussi bien sur le plan de la connaissance des maladies respiratoires, que pour trouver des médicaments qui permettent

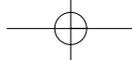
de contrôler l'ensemble de ce processus. Ainsi, a-t-on pu déterminer, par exemple, que la différenciation épidermoïde était contrôlée par le TGF β , et que le processus de réversion est associé à la vitamine A qui joue un rôle essentiel dans le maintien ou le retour vers un état mucociliaire.

Il y a d'autres techniques qui permettent de réaliser ce type d'études *in vitro*. Il s'agit, par exemple, de la technique des chambres à deux compartiments avec un filtre ayant des pores de 0,4 micron et un *coating* - c'est-à-dire une matrice reconstituée. Le milieu se trouve ici au-dessus et en dessous. Il y a prolifération jusqu'à confluence et pas de différenciation dans ces conditions. On enlève alors le milieu au pôle apical de façon à reconstituer une interface air liquide qui est celle qu'on retrouve dans l'appareil respiratoire. Le milieu est maintenu au pôle basal et la polarité est ainsi reconstituée d'un point de vue nutritionnel.

Selon qu'on ajoute de l'acide rétinoïque ou pas, nous allons avoir une différenciation normale, mucociliaire, ou une différenciation épidermoïde. Ce système permet d'étudier des agents pharmacologiques susceptibles d'agir sur la différenciation, voire la réversion de l'état épidermoïde. Nous avons, d'ailleurs, utilisé ce modèle pour étudier une série d'analogues de l'acide rétinoïque. Alors que c'est l'expérimentation animale qui était utilisée, à l'origine, pour étudier la réversion des atteintes de l'appareil respiratoire et de la muqueuse, c'est ce modèle *in vitro* qui a permis, sans avoir recours à une expérimentation animale, d'étudier une série de molécules intéressantes pour préserver ou retrouver une bonne différenciation au niveau de cette muqueuse. C'est une belle illustration de méthode alternative.

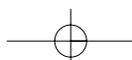
Une application environnementale : les particules de diesel

La toxicité de particules diesel a été étudiée au laboratoire sur une lignée bronchique humaine transfectée par le gène T du virus SV40, mais qui a conservé ses caractéristiques épithéliales, certaines de ses capacités de métabolisation et de sécrétion, après induction, des cytokines. Une étude mécanistique a été faite à l'aide de cette lignée, étude qui a été complétée sur culture primaire. Selon de nombreuses études épidémiologiques les particules atmosphériques sont incriminées dans la mortalité et la morbidité respiratoire et cardio-vasculaire. Les études *in vitro* sur cultures cellulaires associées à des études chez l'animal et à des études humaines sur des volontaires ont permis de donner une explication causale à ces données épidémiologiques.



Une des conclusions concerne le rôle essentiel des composés organiques adsorbés sur les particules. Ces données ont été importantes pour les constructeurs automobiles car cela les a incité à diminuer la fraction organique grâce à l'utilisation de pots catalytiques. Mais on a aussi mis en évidence le rôle du « cœur » carboné de ces particules fines et ultrafines, ce qui a conduit au développement des filtres à particules que nous connaissons, aujourd'hui. Nous avons ainsi pu déterminer les mécanismes moléculaires qui conduisaient à un processus pro-inflammatoire à partir de la cellule épithéliale. Cette approche mécanistique est quelque chose qui relève vraiment typiquement du domaine des cultures cellulaires et de l'approche *in vitro*.

En conclusion, on voit donc que les cultures cellulaires ont des applications multiples. Dans certains cas, elles peuvent éventuellement être considérées comme une alternative, au sens anglosaxon du terme, à l'expérimentation animale. Mais, malgré tout, il apparaît qu'une limite infranchissable demeure, qui est celle de la complexité de l'organisme. Pour le moment, malgré les outils, de plus en plus performants, développés dans le domaine de la culture cellulaire et la connaissance de plus en plus fine que nous avons du fonctionnement des cellules et des interactions cellulaires, il n'est pas possible de répondre *in vitro* à toutes les questions que soulève l'approche intégrée au niveau de l'organisme entier.



Les cellules souches comme modèles cellulaires

Pascale GAUSSEM

Service d'Hématologie Biologique, Hôpital Européen Georges Pompidou,
INSERM U. 765, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques
Université Paris 5 - René Descartes
4 avenue de l'Observatoire - 75006 Paris
mail: pascale.gaussem@egp.aphp.fr

Introduction

Les cellules souches ne sont pas seulement utilisées comme modèles cellulaires, mais elles sont également à la base de toute une nouvelle méthodologie d'étude conduisant à leur utilisation en thérapie cellulaire.

Cellule souche et cellules souches

Qu'est-ce qu'une cellule souche ? C'est une cellule extrêmement curieuse que l'on connaît depuis longtemps du point de vue hématologique. Elle a la capacité de proliférer et de redonner la même cellule, c'est ce qu'on appelle l'autorenouvellement. Cette propriété d'immortalité commence à être élucidée. Elle serait notamment due à une activité télomérase élevée dans les cellules souches, empêchant la dégénérescence chromosomique. La cellule souche peut se maintenir également dans un état quiescent en phase G du cycle cellulaire. Ainsi, des facteurs de transcription permettant de maintenir les cellules à l'état « souche » commencent à être connus. Ensuite, sans que nous en connaissions le mécanisme, elle peut se transformer en progéniteur et se différencier, proliférer, et donner naissance à des cellules différenciées. A ce jour, il existe deux types de cellules souches : les cellules souches embryonnaires et les cellules souches adultes.

S'agissant des cellules souches embryonnaires, on peut en décrire trois types :

- Les cellules ES (*embryonic stem*) qui proviennent du blastocyste
- Les cellules EG qui proviennent du fœtus (*embryonic germ cells*)
- Les cellules EC (*embryonal carcinoma*) qui sont issues d'une tumeur, un tératocarcinome.

Ces cellules sont dites pluripotentes car elles peuvent donner naissance à plusieurs lignées. En culture, il est nécessaire de supprimer leurs cellules nourricières, notamment les fibroblastes et le stroma, qui sécrèteraient des substances qui les maintiennent à l'état de cellule souche. Si on cultive les cellules embryonnaires en suspension, on obtient des corps embryonnaires. Cultivées sur une matrice appropriée et en présence de milieu de culture bien déterminés, les cellules peuvent donner naissance à différents types cellulaires : cellules hématopoïétiques, îlots pancréatiques, cellules musculaires, cellules nerveuses, kératinocytes etc... C'est, indiscutablement dans ce dernier domaine que de gros progrès ont été réalisés ces dernières années, grâce à la découverte des facteurs de croissance spécifiques de chaque lignée. C'est ainsi que les cellules ES de souris, sous forme de corps embryonnaires, ont pu être transformées - à partir de la même cellule souche - en neurones, ou en cellules pancréatiques sécrétrices d'insuline. Si on utilise des cellules embryonnaires, et selon le feuillet auquel on s'adresse, on peut obtenir des cellules de différents tissus issus de ce feuillet. De même, chez l'adulte, des cellules progénitrices

Summary

Embryonic stem cells are derived from the inner mass of blastocyst. Recently, adult stem cells have been identified in many organs and tissues, although in a very small number. They remain quiescent and are supposed to be activated by disease or tissue injury. Stem cells have two important characteristics when compared to mature cells. First, they are unspecialized cells that renew themselves and, second, under special experimental conditions, they can generate cells with special functions. A typical example of the use of progenitor cell derived from adult stem cells is the endothelial cell therapy, based the presence of circulating endothelial progenitor cells. This has completely modified the concept of post-natal angiogenesis and raised new hopes for the treatment of cardiovascular diseases based on cell therapy. These cells, originating from bone marrow, contribute to the development of collateral arteries and capillary networks to promote ischemic tissue revascularisation. The proof of concept was obtained *in vivo* in a series of animal models such as hind limb ischemia, myocardial infarction or vascular prosthesis revascularisation. Besides the preclinical studies, a number of *in vitro* experiments are designed to prove the angiogenic capacity of such cells such as the determination of the "endothelial phenotype", the formation of capillary-like structures in matrigel and the migration in a Boyden chamber upon a VEGF gradient.

mésodermiques en présence de milieux de culture appropriés peuvent générer des ostéoblastes, des chondroblastes etc., c'est à dire toutes les cellules du tissu issu du mésoderme.

Les cellules ES humaines

Les cellules ES humaines posent, pour leur part, un certain nombre de problèmes qu'il faut résoudre. Rappelons tout de suite qu'en France, cette recherche n'est pas encore autorisée. Lorsqu'elle est autorisée, il faut évidemment, tout d'abord, pouvoir trouver des alternatives aux cellules nourricières pour l'expansion, c'est-à-dire pour les maintenir à l'état de cellule souche. On peut envisager d'établir des lignées de cellules souches différenciées. Dans une optique de thérapie cellulaire, ce qui est fondamental est de caractériser les fonctions cellulaires *in vitro*. Or, lorsqu'on part de cellules souches pour aboutir à une lignée déterminée, il faut bien, pour les étudier, en connaître au préalable toutes les fonctions, la morphologie, le phénotype... Ce n'est qu'ensuite qu'on en démontrera l'efficacité, d'abord chez des rongeurs, puis éventuellement chez des primates. Quand on administre ces cellules à l'homme, on peut imaginer en prévenir le rejet lors des études cliniques. Un des exemples assez ambitieux est de transfecter ces cellules avec des gènes du complexe majeur d'histocompatibilité humain. Enfin, il faut démontrer la sécurité de ces cellules, par exemple l'absence de formation de tumeurs ou de transmission d'agent infectieux.

Les cellules souches adultes : espoirs et interrogations

De nouveaux espoirs sont nés avec la découverte de la cellule souche adulte. Elle existe dans chacun des tissus de l'organisme. Mais il y a un certain nombre de questions qui restent en suspens. On ne sait pas d'où elle provient : de la moelle osseuse ? du cerveau ? du foie ?... Quel est le signal qui induit la différenciation des cellules en un tissu donné ? Existe-t-il un seul type de cellules souches adultes ? Nous savons que dans tous les tissus il existe des cellules souches qui sont capables de donner les cellules du tissu d'origine. C'est-à-dire qu'une cellule de la moelle (le MAPC : *multipotent adult progenitor cell*) peut donner des cellules sanguines, mais également des adipocytes, etc... On sait également qu'en prenant des cellules souches dans un tissu donné, on peut les transdifférencier, c'est-à-dire les transformer en cellules d'un autre tissu. Ainsi, même si un certain nombre de points d'interrogations subsistent, ces cellules souches adultes représentent un réel espoir notamment en thérapeutique.

Des perspectives thérapeutiques

En France, pour ce qui concerne la recherche sur les cellules souches embryonnaires, la question est en suspens. Dans l'hypothèse d'utilisation des cellules fœtales, on a déjà évoqué la culture de neurones susceptibles de soigner la maladie de Parkinson, ou des cellules, des îlots de Langerhans dans une application : le diabète. On peut aussi citer la cellule souche hématopoïétique, obtenue à partir de sang de cordon. Il s'agit bien d'une cellule fœtale puisque le sang de cordon est le sang du fœtus. Le sang placentaire est extrêmement riche en cellules souches hématopoïétiques. Il y a d'ailleurs, maintenant, tout un réseau de banques de sang de cordon qui sont agréées et réglementées. Pour les cellules souches adultes, de très nombreux travaux sont en cours. S'agissant des cellules hématopoïétiques, ce n'est pas une nouveauté, puisque cela fait plus de 40 ans qu'on pratique des greffes de moelle, des allogreffes ou des autogreffes, le plus souvent, aujourd'hui, à partir du sang mobilisé par des facteurs de croissance, plutôt qu'avec de la moelle. On a, aussi, déjà évoqué les kératinocytes pour les greffes de peau chez les brûlés, les myoblastes.

Développer un protocole de thérapie cellulaire ?

Lorsqu'on veut développer un protocole de thérapie cellulaire, on doit évidemment répondre aux critères destinés à assurer la sécurité dans les essais cliniques. Comment, alors, replacer le modèle animal dans ces critères-là ? Si l'on travaille en autologue, c'est assez simple. Il n'y a pas de problème de rejet de greffe. Mais si on travaille en allogénique, il faut évidemment faire un criblage des donneurs pour détecter les agents infectieux, les anomalies génétiques, qui ne seraient pas désirables. Ensuite, le problème essentiel de savoir comment cultiver des cellules dans un but thérapeutique. En effet, nous quittons totalement le milieu expérimental, pour les cultiver dans ce qu'on appelle les "grades cliniques", c'est à dire avec des produits qui ont l'autorisation de mise sur le marché et devant être compatibles avec l'administration à l'homme. On doit se conformer aux procédures de l'assurance et du contrôle de qualité, puis, autre contrainte importante, établir des procédures standardisées et sécurisées. Avant de passer au modèle animal, il va falloir définir tous les critères de caractérisation de ces cellules qui seront utilisées en thérapie cellulaire : leur morphologie, leur phénotype. Il est donc nécessaire de définir toute une série de critères morphologiques et fonctionnels de ces cellules. Enfin, il appartiendra à l'étude pré-clinique, inévitable, de démontrer la validité du concept.

Comme exemple, on va d'abord vérifier, dans des modèles animaux qui reproduisent la maladie, si les cellules migrent et font leur *homing*, c'est à-dire retrouvent le site où elles doivent aller, en fonction de leur tropisme. On vérifiera, ensuite, la toxicité, le potentiel de prolifération de ces cellules. C'est facile chez l'animal, puisqu'on dispose des marqueurs qui permettent de reconnaître les cellules humaines. En fin de compte, on n'aura plus qu'à définir les protocoles d'études cliniques de phase I.

La thérapie cellulaire endothéliale. une illustration

La thérapie cellulaire endothéliale est une bonne illustration de la thérapie cellulaire émergente. On a longtemps conservé une représentation traditionnelle de la moelle dans des os longs. Or la moelle hématopoïétique se trouve, sauf chez le fœtus, dans les os plats. La cellule souche hématopoïétique donne naissance à toutes les cellules du sang circulant, les leucocytes, les globules rouges et les plaquettes. En 1997, est découverte une cellule appelée hémangioblaste car elle peut donner naissance aux cellules souches hématopoïétiques et également aux cellules endothéliales (Figure). Pour la simplicité du raisonnement on peut ne retenir que deux marqueurs permettant de caractériser ces cellules :

- Le CD34 qui est un marqueur d'immaturation des cellules hématopoïétiques et endothéliales
- Le récepteur au VEGF qui est un des facteurs de croissance spécifiques de la lignée endothéliale.

On a non seulement pu démontrer l'origine médullaire de l'hémangioblaste, mais, en plus, que ce progéniteur endothélial - progéniteur parce que c'est une cellule souche déjà engagée dans une lignée - pouvait circuler dans le sang périphérique humain. C'est Asahara qui, en 1997, a été le premier à mettre en évidence ces cellules par tri des cellules qui possèdent les marqueurs CD34 et VEGFR2. En les mettant en culture et en les amplifiant, il a obtenu des cellules qui avaient toutes les caractéristiques fonctionnelles des cellules endothéliales et qui, injectées à l'animal chez qui on avait fait une ischémie de la patte postérieure, s'incorporaient aux sites d'angiogenèse.

De nombreux travaux ont suivi qui ont abouti à un nouveau concept. Ainsi, le concept de néovascularisation chez l'adulte, résultant de la prolifération et de la migration des cellules endothéliales matures avoisinantes, a été récemment révisé depuis la mise en évidence de ces progéniteurs endothéliaux circulants, cellules capables de participer à la revascularisation de tissus ischémiés. Ces cellules progénitrices ont

un fort pouvoir de prolifération, contrairement aux cellules endothéliales matures et, en culture, peuvent proliférer pendant 50 à 60 jours sans perdre leurs caractéristiques morphologiques.

Les essais précliniques de thérapie cellulaire endothéliale ont principalement utilisé le modèle d'ischémie de la patte postérieure de la souris immunodéficiente, par ligature ou section de l'artère fémorale. L'ischémie est quantifiée par la méthode au laser doppler qui permet de suivre les progrès de la revascularisation. Il existe toujours après 28 jours une récupération spontanée de la vascularisation qui est fortement améliorée par l'injection *in situ* de progéniteurs endothéliaux. La plupart des essais cliniques réalisés chez l'homme qui ont suivi se sont basés sur l'hypothèse de la présence de progéniteurs endothéliaux dans la moelle ou le sang et utilisent des préparations de cellules mononucléées sanguines ou médullaires plus ou moins bien caractérisées.

Ainsi, une équipe de chercheurs japonais a publié dans le *Lancet* un essai de faisabilité d'innocuité chez l'homme. Ils ont inclus une quarantaine de sujets avec une ischémie du membre inférieur unilatérale ou bilatérale. Un prélèvement de 500 ml de moelle a été effectué sous anesthésie générale, puis les cellules mononucléées ont été concentrées sous un volume final de 30 ml. Les cellules ont été administrées dans les trois heures suivant le prélèvement en 40 injections intramusculaires locales au niveau du membre ischémié. Les résultats ont été spectaculaires. Au bout de 8 semaines, les nécroses et les ulcères se sont atténués et tous les autres paramètres mesurés se sont également améliorés.

Des questions en suspens...

Cette étude a suscité de nombreux travaux, principalement dans l'ischémie myocardique. Dans ces essais thérapeutiques, il s'agissait de cellules mononucléées qui provenaient soit du sang soit de la moelle osseuse autologue. C'est évidemment le plus facile parce qu'il n'y a pas de problème de rejet. Mais cela laisse en suspens un certain nombre de questions.

Ces cellules mononucléées sont mal caractérisées. Et, on ne sait pas à l'heure actuelle, par exemple, s'il faut vraiment prendre des progéniteurs endothéliaux en lignée homogène, ou s'il est nécessaire d'avoir les autres cellules mononucléées afin d'obtenir une coopération cellulaire.

C'est pour essayer de répondre à ces questions qu'a été créé un réseau INSERM de recherche sur les cellules souches dont Martine Aiach est la coordinatrice. Première question à laquelle nous tentons de répondre : la mise au point de

l'isolement des progéniteurs à partir de sang périphérique et leur caractérisation. Ceci a conduit à déposer un projet de recherche clinique destiné à reproduire l'expérience des japonais : « faisabilité, innocuité chez l'homme ». Le programme consistera à utiliser le sang et la moelle des sujets pour caractériser parfaitement les cellules et pour réaliser et développer un procédé d'expansion de cellules, afin d'aboutir à un produit de thérapie cellulaire et d'identifier finalement le principe actif contenu dans ces préparations cellulaires.

Cela pose, évidemment le problème de la mise au point de modèles précliniques adaptés, avant de passer aux essais cliniques.

Des modèles

Les expériences préliminaires ont été réalisées à partir de progéniteurs issus de sang de cordon. Ce sang est très riche en progéniteurs, hématopoïétiques et endothéliaux. Ces derniers ont été sélectionnés par tri positif grâce à des billes magnétiques puis cultivées dans un milieu qui contient des facteurs de croissance spécifiques, notamment le VEGF, le FGF, afin d'obtenir au bout de 14 jours des cultures de cellules de précurseurs endothéliaux.

Avant de passer aux phases pré-cliniques, il faut caractériser parfaitement ces cellules. En immunohistochimie, par exemple, on voit que ces cellules expriment le facteur Willebrand qui est spécifique de la lignée endothéliale. On peut ensuite quantifier le nombre de récepteurs à la surface de ces cellules à l'aide d'une méthode de cytométrie en flux quantitative. Après quoi, on peut développer des modèles d'angiogenèse *in vitro* pour voir si ces cellules sont capables de donner des vaisseaux. La question est alors de savoir ce qu'on peut faire *in vitro* pour remplacer le modèle animal ? Si l'on part de l'hypothèse que le tissu ischémique va sécréter du VEGF qui va mobiliser ces cellules à partir de la moelle, cellules qui vont ensuite coloniser les sites d'ischémie, on peut faire des tests de migration de cellules en chambre de Boyden selon un gradient de concentration de VEGF. Les progéniteurs sont placés dans la chambre supérieure et on regarde leur possibilité de migration à travers une membrane. On constate que plus on augmente la concentration de VEGF dans la chambre inférieure, plus les cellules vont migrer. Cela signifie qu'elles répondent au VEGF. On peut tester, enfin, l'angiogenèse *in vitro* par la formation de microtubules ou de pseudo-tubes vasculaires en Matrigel. Ce modèle permet de montrer que les progéniteurs endothéliaux ont des capacités angiogéniques comparables au

modèle utilisé le plus couramment : les HUVEC, c'est à dire les cellules isolées du cordon ombilical humain.

Ces cellules une fois obtenues, doivent être amplifiées dans des conditions de grade clinique, et conditionnées de façon à ce qu'elles se dirigent réellement vers les sites d'ischémie. C'est seulement quand on aura obtenu une population de cellules bien caractérisées que les essais précliniques chez l'animal seront débutés. Enfin, les études de phase I chez l'homme permettront de définir le nombre de cellules à injecter, ainsi que la voie d'administration.

À titre d'exemple, on peut retenir deux modèles validés chez l'animal :

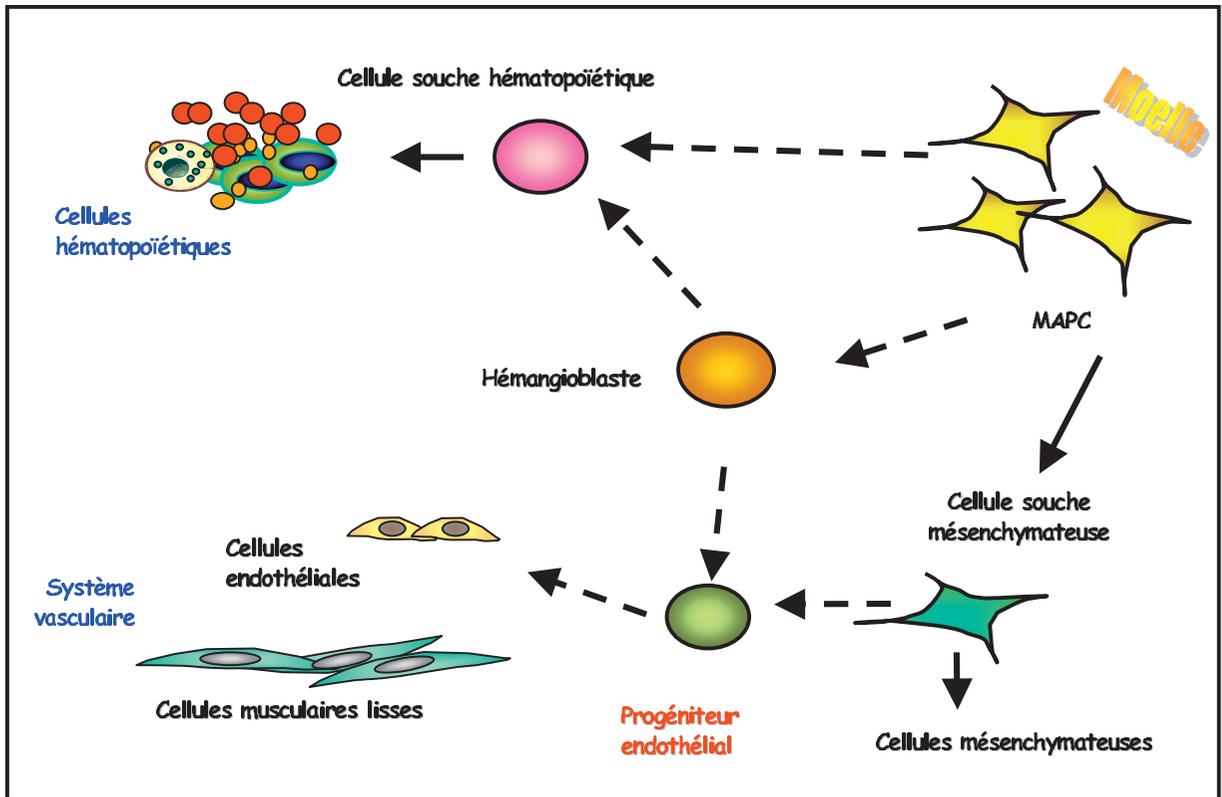
- Un premier modèle assez simple à réaliser utilise un implant de matrigel sous cutané chez une souris. On utilise des souris immunodéprimées afin qu'elles tolèrent les cellules humaines. L'implant de matrigel libère des facteurs de croissance spécifiques et attire les cellules humaines injectées à la souris. Puis, en reprenant cet implant de matrigel et en faisant des coupes, on peut mettre en évidence les cellules humaines qui ont colonisé cet implant, en réponse aux facteurs de croissance.

- Le second modèle est la ligature de l'artère fémorale de la souris, qui entraîne une ischémie de la patte postérieure. On mesure alors la reperfusion du membre ischémié par laser doppler en fonction du traitement (cellules ou placebo).

Il faut également étudier le potentiel cancérogène de ces cellules puisque l'angiogenèse est impliquée dans la croissance des tumeurs. C'est un test préalable au développement d'un produit de thérapie cellulaire. Des cellules tumorales seront injectées aux souris, générant des tumeurs qui sont soit à croissance rapide soit à croissance lente, pour voir si le traitement par les progéniteurs endothéliaux fait augmenter la taille des tumeurs. On pourrait très bien imaginer que ces cellules vont aller coloniser la tumeur et favoriser l'angiogenèse au niveau de celle-ci. C'est un peu le cas des facteurs de croissance, comme le VEGF, qui ont une AMM et qu'on hésite à administrer parce qu'ils pourraient faire "flamber" des tumeurs.

L'important, au bout du compte, est de bien comprendre comment et pourquoi ces modèles animaux se replacent dans les projets de développement de produits de thérapie cellulaire et surtout l'importance qu'ils y prennent.

Figure - Filiation du progéniteur endothélial. MAPC : *multipotent adult progenitor cell*.



L'hépatocyte *in vitro* : Intérêts et limites

André GUILLOUZO

INSERM U 620
Université de Rennes 1
Mail : andre.guillouzo@univ-rennes1.fr

Le foie est le siège de fonctions essentielles pour l'organisme, incluant celle de détoxification des produits chimiques; il est aussi une cible privilégiée des métabolites toxiques formés et de virus hépatotropes et une étape obligée de certains parasites. Cependant il existe des variations qualitatives et quantitatives souvent importantes entre les résultats obtenus chez l'homme et l'animal, ce qui rend aléatoire l'extrapolation des résultats d'une espèce à l'autre. De plus de fortes différences individuelles sont fréquemment observées chez l'homme.

Très tôt, il est donc apparu nécessaire de pouvoir disposer de modèles hépatiques *in vitro* pour étudier les principales fonctions du foie et en particulier sa capacité de détoxification. Les principaux modèles incluent le foie isolé perfusé, les tranches d'organe, les hépatocytes isolés en suspension ou en culture primaire, les lignées cellulaires obtenues à partir d'hépatocytes tumoraux ou immortalisés, les microsomes, la fraction S9 et les cellules recombinées exprimant une ou plusieurs fonctions hépatiques. Tous ces modèles ont des intérêts et des limites, certains étant plus dédiés à des études particulières (par exemple la fraction S9 de foie de rat au test de mutagenèse de Ames). Le modèle considéré comme le plus intéressant est l'hépatocyte isolé. La mise au point de conditions de culture permettant sa survie et le maintien de ses fonctions au-delà de quelques heures ou quelques jours a fait l'objet d'un nombre d'études considérable. Il est apparu que seules des conditions de culture sophistiquées pouvaient au moins partiellement répondre à cette attente. Les domaines d'utilisation des hépatocytes sont multiples, notamment l'étude de la biologie de cette cellule et les applications en pharmaco-toxicologie, virologie, parasitologie, thérapie cellulaire,... L'hépatocyte a été largement utilisé, souvent en association avec d'autres modèles hépatiques *in vitro*, pour étudier les propriétés pharmacocinétiques et le profil métabolique interspèce de xénobiotiques, prédire les interactions médicamenteuses de molécules en développement, préciser les mécanismes de toxicité de composés toxiques,... Bien qu'elles aient des limites, les études sur hépatocytes sont aujourd'hui reconnues par les agences d'enregistrement.

Si les hépatocytes humains sont le modèle de choix, les difficultés d'obtention et les différences fonctionnelles d'une population cellulaire à l'autre liées non seulement au donneur mais aussi à la qualité des cellules après leur isolement en limitent leur utilisation. Certaines lignées d'hépatocytes humains tumoraux peuvent, dans certains cas, être utilisées. La solution pourrait bientôt venir des cellules souches lorsque les conditions expérimentales permettant le maintien de leur prolifération ou leur différenciation en hépatocytes auront été maîtrisées.

Au total, même si aucun test n'est validé, l'hépatocyte isolé continuera d'être très largement utilisé dans de nombreux domaines et a donc encore un bel avenir. Il réduira et remplacera dans bien des cas l'expérimentation animale.

Les chondrocytes humains en pharmacologie: potentialités et limites.

Maité CORVOL

Inserm-UMR-S 747 ; Université Paris 5 – René Descartes
Pharmacologie et signalisation cellulaire du cartilage
UFR Biomédicale,
45 Rue des St Pères - 75006 Paris
Mail : maite.corvol@univ-paris5.fr

Introduction

Les chondrocytes humains en culture sont utilisés dans les études pharmacologiques concernant les molécules destinées au traitement symptomatique des pathologies articulaires comme l'arthrose ou la polyarthrite : pharmacologie moléculaire des anti-inflammatoires, de la dégradation du cartilage, de l'apoptose chondrocytaire... La culture de chondrocytes humains est également utilisée pour des recherches plus fondamentales destinées à caractériser les points de dysfonctionnement des chondrocytes pathologiques par rapport aux chondrocytes de cartilage normaux. Dans tous les cas, le but est de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques. Plus récemment, il a été proposé d'utiliser les chondrocytes humains, après expansion en culture, pour la thérapie cellulaire des lésions du cartilage.

La culture des chondrocytes humains a été mise au point il y a plusieurs dizaines d'années, mais nous allons voir qu'en raison de l'instabilité phénotypique de ces cellules cet outil biologique doit être utilisé avec prudence et dans des conditions bien précises.

1. Le cartilage normal et pathologique

Le cartilage est un tissu qui joue un rôle fondamental tout au long de la vie. De la période embryonnaire jusqu'à la période de croissance post natale, c'est au cartilage de croissance que nous devons toute la structuration du squelette ainsi que la croissance en longueur des os longs. Le cartilage de croissance disparaît à l'adolescence et seul le cartilage articulaire qui recouvre toutes les épiphyses osseuses reste présent toute la vie.

La fonction du cartilage articulaire est de permettre le mouvement d'une articulation et de protéger l'os sous-jacent contre les agressions mécaniques et traumatiques (1). Ces caractéristiques fonctionnelles sont assurées grâce à la présence des constituants protéiques de la matrice cartilagineuse (2), essentiellement composés de collagène de type II et de protéoglycanes particuliers, les agrécanes. Ces derniers sont chargés négativement et retiennent les molécules d'eau qui constituent 70 % de la matrice du cartilage. C'est au sein de cette matrice que se trouve l'unique type cellulaire : le chondrocyte.

Dans les conditions physiologiques, les chondrocytes sont le siège d'un processus de maturation cellulaire qui se termine par leur mort par apoptose (3). Ce processus est très lent ce qui permet aux chondrocytes de persister en nombre suffisant pendant toute la durée de la vie. En outre, les chondrocytes assurent un équilibre précis entre synthèse et dégradation des différents constituants de la matrice. Cet équilibre métabolique se fait dans un environnement hypoxique, grâce aux éléments nutritifs qui proviennent du

Summary

Human chondrocytes in culture are used as a biological material for the pharmacological screening of anti-inflammatory, anti-degradative, or anti-apoptotic drugs used in osteoarthritis or rheumatoid arthritis. Since the cause of these diseases are not known, human chondrocytes in culture are also used in basic research to study the molecular disorders of pathological chondrocytes as compared to normal cells. The aim is to find new target genes, and in turn, new therapeutic targets. More recently, human autologous chondrocytes have been proposed as cell therapy for post-traumatic cartilage defect.

The technical procedure for culturing human chondrocytes has been described many years ago. Because of the instability of their phenotype when these cells were cultured at low density on plastic supports, natural and artificial three-dimensional matrices have been extensively used in order to maintain the chondrocytic characteristics of the cells *in vitro*. Beneficial effects have been reported with either natural polymers such as fibrin, hyaluronan, collagen, calcium alginate gels, chitosan, or synthetic polymers such as polyesters, polyglycolic acid, or polyethylene oxide.

Since human chondrocytes represent the actual trend in articular cartilage repair, many efforts are directed toward the production of new biomaterial for cartilage engineering, having good similarities with the normal components of the natural matrix.

liquide synovial, puisque le cartilage n'est pas vascularisé.

Toute atteinte à l'intégrité du réseau matriciel entraîne une modification du phénotype des chondrocytes qui se différencient (3). Nous verrons que cette instabilité phénotypique des chondrocytes in vivo est aussi observée in vitro lorsque les cellules sont mises en culture en absence de matrice extra-cellulaire.

2. Intérêt de la culture de chondrocytes humains dans la pharmacologie des pathologies dégénératives et inflammatoires du cartilage

Dans les pathologies articulaires dégénératives et inflammatoires les plus fréquentes, comme l'arthrose ou la polyarthrite, les constituants de la matrice sont dégradés et l'articulation est le siège d'un processus inflammatoire avec production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'interleukine-1 beta (IL-1 β), ou le TNF alpha qui entretiennent les processus de dégradation et d'inflammation locaux. L'ensemble conduit à la destruction du cartilage. A ce stade, le chondrocyte n'est pas capable de réparer les lésions et meurt.

La cause de ces pathologies n'étant pas connue les traitements utilisés sont essentiellement symptomatiques. Les recherches pharmacologiques portent depuis de nombreuses années sur la production d'anti-inflammatoires, et de molécules susceptibles de s'opposer à la dégradation du cartilage (molécules à activité anti-métalloprotéase) ou capables de stimuler la néosynthèse des protéines matricielles. Les chondrocytes en culture, d'origine humaine ou animale, ont rapidement supplanté l'utilisation de tranches de cartilage incubées in vitro en présence et en absence de cytokines, pour évaluer les effets de ces molécules.

Des progrès récents ont été réalisés dans le domaine de la biologie cellulaire et moléculaire du cartilage ainsi que des avancées dans le domaine de la signalisation des cytokines (voies AP1 ou NF κ B, interactions avec les prostaglandines ou d'autres facteurs de transcriptions tels que les récepteurs PPARs...). De nouvelles cibles thérapeutiques sont ainsi envisagées. En raison de la diversité des réponses biologiques observées suivant les espèces, l'utilisation de chondrocytes d'origine humaine s'impose plutôt que d'origine animale.

3. La culture de chondrocytes humains

Les débuts

Les premières expériences remontent aux années 70/80 (4). On utilise des pièces

opératoires ou des prélèvements effectués sous arthroscopie. La biopsie de cartilage doit être transportée à 4°C et la mise en culture effectuée dans les 48h. Les chondrocytes sont obtenus après digestion enzymatique. Le nombre de cellules par cm³ de cartilage diminue avec l'âge. Les premières mises en culture ont été effectuées sur des boîtes en plastique à faible densité cellulaire. Dans ces conditions les chondrocytes se différencient en prenant l'apparence de fibroblastes et synthétisent du collagène I et III au lieu du collagène II, ainsi que des protéoglycanes non cartilagineux (5).

Des avancées significatives

Ce phénomène de dé-différenciation est réversible, du moins pour les chondrocytes d'origine animale (6). En effet, lorsque les chondrocytes différenciés sont placés dans un environnement tri-dimensionnel (gel d'alginate, fibrine), les cellules re-expriment un phénotype chondrocytaire. Cette réversibilité est également observée pour les chondrocytes humains provenant de sujets jeunes, enfants, adolescents ou adultes < 40 ans (7).

Cela n'empêche pas, néanmoins, d'utiliser les cultures de chondrocytes humains pour les études pharmacologiques. Leur phénotype est en effet conservé lorsque les cellules sont ensemencées à haute densité et utilisées uniquement en culture primaire ou secondaire (8). On peut ainsi évaluer par les techniques de transcriptome ou de protéome les marqueurs de différenciation et de dé-différenciation chondrocytaire et mesurer les activités des effecteurs. Toutes les techniques d'immunocytochimie sont, bien entendu, utilisables, en particulier grâce au microscope confocal et au microscope à déconvolution. Cela permet notamment d'étudier, au niveau de la cellule, la mécanistique d'un certain nombre de molécules.

Les études actuelles sont orientées vers la recherche de matrices naturelles ou synthétiques pouvant permettre à ces cellules de maintenir leur phénotype (9). Des effets bénéfiques ont été rapportés avec des polymères naturels tels que la fibrine, l'acide hyaluronique, le collagène, les gels d'alginate ou de chitosan ou encore avec des polymères synthétiques tels que les polyesters, l'acide poly lactique (10)...

Une autre voie possible d'amélioration consiste à immortaliser des lignées de chondrocytes humains (11). Mais toutes les lignées existantes ont perdu l'une ou l'autre des caractéristiques chondrocytaires.

Intérêt de la culture de chondrocytes humains dans la thérapie cellulaire du cartilage

L'existence de traumatismes du cartilage ainsi que la pratique sportive de haut niveau ont été clairement incriminées dans la genèse à long terme d'une arthrose (12). Agir précocement sur les lésions traumatiques du cartilage serait une façon de prévenir l'arthrose et de reculer d'autant l'heure de la chirurgie prothétique (13). Ce concept est à la base de la réparation des lésions du cartilage par thérapie cellulaire de chondrocytes autologues.

Une équipe suédoise, l'équipe de Brittberg, a donc pensé à retarder l'échéance de la prothèse en ayant recours à la greffe de chondrocytes autologues (14). Le principe consiste à prélever du cartilage sain un peu au-dessus de la lésion, d'extraire ses chondrocytes, de les mettre en culture, de les faire proliférer et de les réinjecter ensuite dans la lésion en les recouvrant d'un morceau d'aponévrose. C'est une première voie

ouverte dans le domaine de la thérapie cellulaire du cartilage et les résultats cliniques sont jugés excellents dans une fourchette allant de 70% à 89% des cas (15). Toutefois, les critères d'évaluation ne sont pas standardisés et l'ensemble des essais correspond à des études ouvertes sans contrôle. Les complications et les échecs sont souvent passés sous silence. Ils sont en partie dûs au degré avancé de maturation cellulaire des chondrocytes.

En conclusion

Les recherches actuelles sont tournées dans deux directions : 1) la culture tri-dimensionnelle des chondrocytes humains. De très nombreuses équipes essayent de trouver des molécules, soit naturelles, soit synthétiques qui vont jouer le rôle de leurre pour les chondrocytes. Outre le maintien du phénotype chondrocytaire, l'utilisation de ces matrices devrait permettre de produire in vitro un néo-cartilage dont il serait alors possible d'étudier les propriétés mécaniques. 2) la recherche de cellules souches et leur induction vers la lignée chondrogénique (16). Ceci permettrait d'obtenir des chondrocytes en plus grand nombre, dont on pourrait étudier les facteurs de vieillissement.

Bibliographie

1. Chevalier, X. (1998) *Presse Med* 27, 75-80
2. Hunziker, E. B., Quinn, T. M., and Hauselmann, H. J. (2002) *Osteoarthritis Cartilage* 10, 564-572
3. Corvol, M. T. (2000) *Joint Bone Spine* 67, 557-560
4. Corvol, M. T., Malesud, C. J., and Sokoloff, L. (1972) *Endocrinology* 90, 262-271
5. Adolphe, M., and Demignot, S. (2000) *Bull Acad Natl Med* 184, 593-600 ; discussion 601-594
6. Benya, P. D., and Shaffer, J. D. (1982) *Cell* 30, 215-224
7. Dell'Accio, F., De Bari, C., and Luyten, F. P. (2003) *Exp Cell Res* 287, 16-27
8. Dell'Accio, F., Vanlauwe, J., Bellemans, J., Neys, J., De Bari, C., and Luyten, F. P. (2003) *J Orthop Res* 21, 123-131
9. Lee, V., Cao, L., Zhang, Y., Kiani, C., Adams, M. E., and Yang, B. B. (2000) *J Cell Biochem* 79, 322-333
10. Kisiday, J., Jin, M., Kurz, B., Hung, H., Semino, C., Zhang, S., and Grodzinsky, A. J. (2002) *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 9996-10001
11. Robbins, J. R., Thomas, B., Tan, L., Choy, B., Arbiser, J. L., Berenbaum, F., and Goldring, M. B. (2000) *Arthritis Rheum* 43, 2189-2201
12. Buckwalter, J. A., and Lane, N. E. (1997) *Am J Sports Med* 25, 873-881
13. Chevalier, X. (2000) *Joint Bone Spine* 67, 572-578
14. Brittberg, M., Lindahl, A., Nilsson, A., Ohlsson, C., Isaksson, O., and Peterson, L. (1994) *N Engl J Med* 331, 889-895
15. Peterson, L., Minas, T., Brittberg, M., and Lindahl, A. (2003) *J Bone Joint Surg Am* 85-A Suppl 2, 17-24
16. Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S., and Marshak, D. R. (1999) *Science* 284, 143-147

Le modèle *in vitro* de cellules tumorales en 3 dimensions : les sphéroïdes

Virginie DANGLES-MARIE^{1,2}, Dominique BELLET^{1,3}

1. Laboratoire de physiopathologie hépatique UMR 8149 CNRS - Faculté des sciences pharmaceutiques et biologiques Université Paris 5 - René Descartes - 4 avenue de l'Observatoire - 75006 Paris
2. Centre de Recherche - Institut Curie - 26 rue d'Ulm - 75005 Paris - Mail : virginie.dangles@univ-paris5.fr
3. Laboratoire d'oncobiologie - Centre René Huguenin - 35 rue Dailly - 92210 Saint-Cloud - Mail : bellet@crh1.org

Les sphéroïdes constituent un modèle décrit dans les années 70 et largement utilisé (1). Ce modèle tumoral tridimensionnel (3D) repose sur une agrégation cellulaire induite *in vitro* en supprimant l'adhésion des cellules à un support de culture. Les sphéroïdes sont préparées le plus souvent à partir de lignées tumorales établies. Moins fréquemment, elles sont réalisées directement à partir de cellules tumorales primaires.

Caractéristiques des sphéroïdes

Par rapport aux cultures cellulaires traditionnellement utilisées en tapis cellulaire, les sphéroïdes ressemblent plus étroitement à la situation observée *in vivo* à la fois par la forme adoptée par les cellules et par le microenvironnement créé. Ce modèle représente une complexité intermédiaire entre les tumeurs solides *in vivo* et les cultures en monocouches. Il est à noter cependant que toutes les lignées cellulaires d'origine carcinomateuse n'ont pas la propriété de former des sphéroïdes *in vitro*. D'une taille pouvant atteindre 1 à 3 mm de diamètre, cette formation tridimensionnelle peut être comparée à une microtumeur avasculaire (cf Figure 1). Ainsi, beaucoup de caractéristiques sont communes :

- L'aspect morphologique des sphéroïdes reproduit une architecture plus ou moins compactée selon les cellules utilisées et très organisée. Dans les plus grosses sphéroïdes, il est possible de distinguer : une couche périphérique de cellules se multipliant activement, une couche interne de cellules quiescentes et un centre nécrotique. Le développement de ce centre nécrotique et la quiescence des cellules intermédiaires sont attribués à un état d'hypoxie consécutive à une mauvaise diffusion de l'oxygène et des métabolites. La ressemblance morphologique des sphéroïdes avec les agrégats de cellules tumorales observés par les anatomopathologistes dans les ascites tumorales suggère que ces microtumeurs *in vitro* constituent des modèles de micrométastases.

- La dynamique de croissance des sphéroïdes est également proche des tumeurs solides *in vivo*. De nombreux modèles mathématiques mettent en évidence une courbe de croissance similaire entre les tumeurs *in vivo* et les sphéroïdes, cette courbe étant différente de celle observée avec les tapis cellulaires.

- L'organisation spatiale des sphéroïdes repose sur des interactions cellulaires qui semblent très différentes des interactions existant dans les cultures en monocouches. En effet, la synthèse des composants de la matrice extracellulaire et de leurs récepteurs peut être largement influencée par les conditions de culture.

Summary

The growth of tumour cells as three-dimensional multicellular spheroids *in vitro* has led to important insights in tumour biology, since the spheroid model is admitted to mimic avascular tumours of limited size in many characteristics (morphology, compacted organization, growth dynamics, multidrug resistance similar to that observed in clinical setting). Whereas cells *in vivo* display a three-dimensional (3D) geometry, most of *in vitro* tests are performed with conventional two-dimensional (2D) cell monolayer. Tumour architecture has still been shown to have a great influence on biological responses of cells to differing stimuli. Our group demonstrated that cellular architecture has a dramatic impact on gene expression profile. Likewise, we found that changes in the tumour structure from 2D to 3D led cancer cells to display a lower capacity of activating cytotoxic T lymphocytes. These latter observations have to be put in line with clinical responses which remain limited in cancer immunotherapy trials.

In a broader perspective, drug screening with spheroid models could lead to reduced number of animal used in preclinical tests.



Figure 1 -
Sphéroïde formée de 6.000 cellules de la lignée humaine de cancer du côlon HT29.

Des sphéroïdes mixtes peuvent également être générées en co-cultivant sous forme tridimensionnelle des cellules tumorales avec des cellules endothéliales.

Les sphéroïdes ont montré tout leur intérêt lors des études de la résistance des tumeurs aux drogues anticancéreuses et à la radiothérapie : les résultats obtenus avec les sphéroïdes sont très proches de ceux obtenus chez les patients alors qu'il n'est pas possible de les reproduire *in vitro* avec les cultures cellulaires en monocouche. Cette résistance, de type *mdr* (pour *multidrug resistance*) reposerait notamment à la fois sur les interactions intercellulaires et sur l'hypoxie existant dans l'architecture tridimensionnelle.

Influence de l'architecture cellulaire sur l'expression génique

Nous avons cherché au laboratoire à déterminer si l'architecture cellulaire pouvait modifier le niveau d'expression génique. Nous avons dans un premier temps sélectionné 28 gènes impliqués dans six fonctions gouvernant la cancérogénèse : échappement à l'apoptose, autosuffisance en facteurs de croissance, insensibilité aux signaux inhibiteurs de croissance, invasion et métastases, potentiel de réplication incontrôlé et angiogénèse. Nous avons déterminé l'expression de ces gènes par quantification de gènes en temps réel (TaqMan®) soit dans les prélèvements tumoraux du patient, soit dans les cellules de lignées tumorales établies à partir de ces mêmes prélèvements. Ces cellules étaient cultivées en suspension, en tapis cellulaire et sous forme de sphéroïdes. Nous avons alors montré que l'architecture tumorale a un impact considérable sur l'expression de ces gènes clés : des différences d'expression variant de 2 à 63 sont trouvées pour 24 gènes sur 28 (2). De plus, nous avons recherché l'architecture cellulaire *in vitro* conduisant à des profils d'expression de gènes identiques ou proches de ceux observés *in vivo*. Il apparaît qu'il est nécessaire de définir pour chaque patient et pour chaque gène étudié le modèle *in vitro* le plus proche de la situation *in vivo*. Ces données sont particulièrement

importantes au moment où se développent en cancérologie des thérapies ciblées et où l'action d'une drogue pourra être tout à fait différente selon le profil d'expression du gène cible.

Influence de l'architecture cellulaire en immunologie antitumorale

Nous nous sommes également intéressés au rôle potentiel de l'architecture tridimensionnelle dans la réponse immune cellulaire antitumorale. En effet, les premiers résultats d'essais cliniques d'immunothérapie anticancéreuse montraient une fréquente inadéquation entre les réponses cliniques observées chez les patients traités et les données observées *in vitro* avec des cultures cellulaires effectuées à partir de cellules de ces mêmes patients. Ces données sont généralement observées avec des cultures cellulaires en tapis ou en suspension. Nous avons alors utilisé le modèle des sphéroïdes pour étudier l'influence de l'architecture cellulaire sur l'activation de lymphocytes T infiltrant les tumeurs (TIL). Ceci a été réalisé en mettant en présence des TIL cytotoxiques et les cellules humaines tumorales urothéliales autologues établis au laboratoire. Nous avons démontré qu'un changement de conformation spatiale des cellules tumorales modifiait considérablement la capacité des cellules à stimuler les TIL (3). En effet, la production de cytokines (Tumor Necrosis Factor, Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor et Interféron γ) par les TIL est fortement diminuée, voire annulée, lors de co-cultures avec les sphéroïdes par rapport aux co-cultures avec les cellules tumorales en tapis, bien que les TIL réussissent à pénétrer uniformément à l'intérieur de la sphéroïde.

Afin d'identifier les mécanismes impliqués dans la diminution de l'activation des cellules T par les cellules tumorales sous forme de sphéroïdes, nous avons réalisé, en collaboration avec l'équipe de F. Mami-Chouaib (INSERM U487, Villejuif) des co-cultures d'un clone de lymphocytes T humains avec des cellules autologues de cancer du poumon. Dans ce système, le peptide antigénique cible du clone T était identifié. Nous avons démontré que la baisse d'activation des cellules T cytotoxiques est due à un défaut de présentation de l'antigène par la cellule tumorale lorsque celle-ci est dans une conformation tridimensionnelle. De plus, grâce à l'utilisation de cellules tumorales cibles transfectées avec une construction codant la protéine hsp70, nous avons montré que le défaut de présentation de l'antigène par les sphéroïdes

est corrélé à une baisse d'expression de la molécule hsp70 (4).

Ainsi les sphéroïdes constituent un modèle *in vitro* de microtumeurs qui semble donner des résultats plus proches de la réalité du vivant. Il serait maintenant intéressant d'étudier en parallèle les résultats obtenus *in vitro* sur les sphéroïdes avec ceux observés *in vivo* chez l'animal. De telles études devraient permettre d'optimiser l'utilisation des modèles *in vitro* en 3D et de réduire l'utilisation de modèles animaux, notamment pour la sélection de molécules dans le cadre d'essais précliniques.

Bibliographie

1. Sutherland R., McCredie J. and Inch W. Growth of multicell spheroids in tissue culture as a model of nodular carcinomas. *J. Natl. Cancer Inst.*, 46, 113-20, 1971.
2. Dangles V., Lazar V., Validire P., Richon S., Wertheimer M., Laville V., Janneau, J-L, Barrois M., Bovin C., Poynard T., Vallancien G. and Bellet D. Gene expression profiles of bladder cancers: evidence for a striking effect of *in vitro* cell models on gene patterns. *Br. J. Cancer*, 86,1283-1289, 2002.
3. Dangles V., Validire P., Wertheimer M, Richon S., Bovin C., Zeliszewski D., Vallancien G. and Bellet D. Impact of bladder cancer cell architecture on autologous T-lymphocyte activation. *Int. J. Cancer*, 98, 51-56, 2002.
4. Dangles-Marie V., Richon S., El Behi M., Echchakir H., Dorothée G., Thiery J., Validire P., Vergnon I., Menez I., Lafjimi M., Chouaib S., Bellet D. and Mami-Chouaib F. A three-dimensional tumor cell defect in activating autologous CTLs is associated with inefficient antigen presentation correlated with heat shock protein-70 down-regulation. *Cancer Res.*, 63, 3682-87, 2003.

La réceptologie ou « comment est-on passé de l'animal à la cellule »

Valérie AUDINOT

Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire
Institut de Recherches Servier
125 chemin de Ronde - 78290 Croissy/Seine
valerie.audinot@fr.netgrs.com

La réceptologie est l'étude des récepteurs, entités protéiques responsables de la transmission d'un signal à la cellule. Les récepteurs sont des protéines qui lient des ligands physiologiques. Il existe plusieurs types de récepteurs localisés à la surface membranaire de la cellule mais aussi des récepteurs situés dans le noyau même de la cellule. Les cibles thérapeutiques sont très souvent des récepteurs dont le fonctionnement se trouve dérégulé.

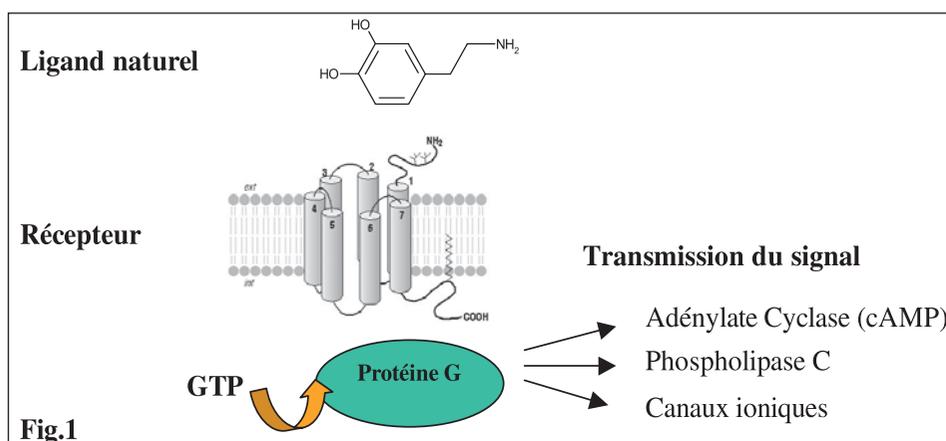
RCPG : récepteurs couplés aux protéines G (Fig.1)

La classe des récepteurs couplés aux protéines G ou RCPG est importante car environ 40 à 50 % des médicaments présents sur le marché agissent sur des récepteurs de cette famille. Sur les cent médicaments les plus vendus aux USA, en 2000, 26 avaient pour cible les récepteurs couplés aux protéines G.

Les visées thérapeutiques sont très diverses. Si l'on reprend les médicaments les plus vendus aux USA on constate des indications centrales comme la schizophrénie, la migraine ou la dépression qui impliquent des récepteurs du neuromédiateur sérotonine (5-HT) de sous-types différents ou des récepteurs de la dopamine comme les récepteurs D2.

L'allergie est également une visée RCPG impliquant des récepteurs de type histaminergique H1, alors que les récepteurs de type histaminergique H2 ont pour indication l'ulcère. D'autres indications encore, telle l'hypertension ou encore l'asthme ont pour cible les RCPG.

Qu'est ce qu'un RCPG ? C'est une protéine de 350 à 450 acides aminés, dont la particularité est de traverser 7 fois la membrane plasmatique, un peu comme un serpent qui ondulerait et qui formerait 7 passages à travers la membrane. L'extrémité N-terminale est à l'extérieur de la cellule ; l'extrémité C-terminale est à l'intérieur. Le récepteur va lier un ligand physiologique naturel comme, par



Summary

Receptors are cellular proteins located at the plasma membrane of the cell that transmit the information of extracellular endogenous compounds to the cell. This interaction can be drawn by a key locker model, where the locker is the receptor and the ligand is the key that activates (agonist) or inactivates (antagonist) the signal.

These receptors are targets of many pharmaceuticals drugs to restore an impaired signalling from the endogenous compound. To characterise these receptors and to find new chemical drugs, an access to these receptors is needed. Before the late 1980's, experiments were performed on animal tissues that were dissected after sacrifice. But the molecular biology technology has permitted, in most cases, to stop working on animal tissues since it became possible to transform cell lines to express the receptor of interest.

This approach coupled to assay miniaturization and robotisation enables now the screening of a large number of chemical entities both for their affinity (ability to recognize the receptor) and their functionality (agonist or antagonist) at a given receptor target.

This higher throughput screening should lead to the discovery of new and diverse chemical entities. Besides, the characterization of the selectivity profile of the leader compound towards the other receptors is also crucial to be detailed, to verify its selectivity and to know potential security problems at a very early stage of the development.

Finally, all these in vitro informations also considerably reduce the number of compounds to be tested in animal pathophysiological models.

exemple, la dopamine pour les récepteurs dopaminergiques ou l'histamine pour les récepteurs histaminergiques. C'est la liaison du ligand qui entraîne l'association du récepteur aux protéines G. Cette association va ensuite transmettre le signal à la cellule. La transmission du signal utilise des voies qui conduiront à la réponse cellulaire aujourd'hui bien décrite : celle de l'adénylate-cyclase avec formation d'AMP cyclique ; celle de la phospholipase C ; ou encore celle des canaux ioniques .

Le ligand et le récepteur : la clé et la serrure (Fig.2)

L'interaction ligand-récepteur peut être représentée par un modèle où le ligand – la molécule – est la clé qui irait se lier au récepteur qui serait la serrure.

Si la clé ouvre la serrure, on parle d'un ligand agoniste. Il y a activation du récepteur. Si la clé, au contraire, ferme la serrure, cela signifie que l'on est en présence d'un ligand antagoniste : il y a donc inhibition du système. En fait, la plupart des médicaments qui ciblent les RCPG sont des antagonistes, il est souvent en effet nécessaire de freiner un système qui s'est emballé.

L'affinité

La première étape dans la recherche de molécules à visée thérapeutique est la mesure de l'affinité, c'est-à-dire de la capacité de nouveaux composés chimiques à se lier avec le récepteur (ou de la clé à rentrer dans la serrure).

L'approche traditionnelle est une approche de chimie médicinale, en partant du ligand naturel ou d'une structure chimique décrite dans la littérature ou dans les brevets. Il faut évidemment rester très attentif à la description des produits dans les brevets pour éviter d'être éventuellement dépendant d'un concurrent.

Une approche plus récente dans la recherche de nouveaux composés est le HTS (High Throughput Screening) ou encore criblage à haut débit, qui permet de tester un nombre très

important de composés de structures chimiques les plus diverses (des collections de produits, des extraits naturels d'éponges, de plantes...) afin de trouver des structures particulièrement originales et innovantes.

Comment, concrètement, est mesurée l'affinité d'un composé pour son récepteur?

On utilise un radioligand (molécule radioactive que l'on va pouvoir suivre), dont la propriété est d'être affine pour le récepteur. Le radioligand seul induit une certaine liaison totale. Lorsqu'on introduira le ligand compétiteur, si celui-ci reconnaît aussi le récepteur, il y aura moins de radioligand lié au récepteur. On diminuera ainsi la liaison mesurée. C'est cette diminution qui permettra de mesurer l'affinité relative du ligand compétiteur et de sélectionner ce composé parmi d'autres peu ou pas affins.

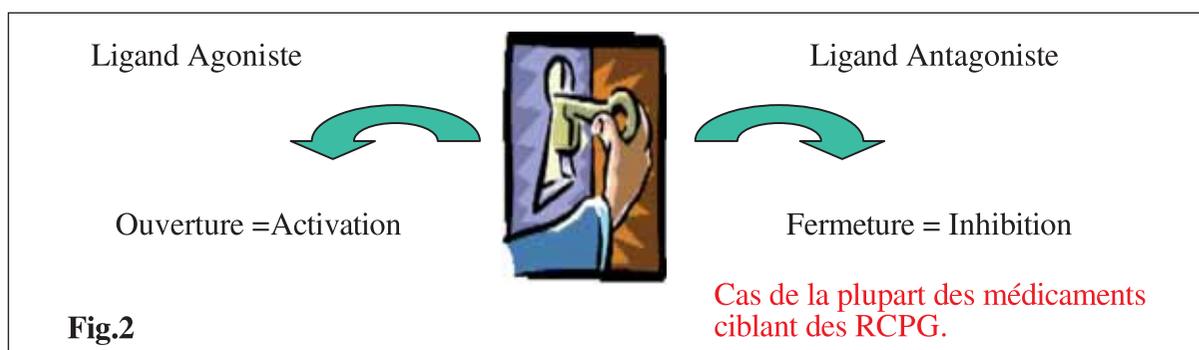
La sélectivité

La sélectivité est un aspect très important car il est très utile d'évaluer l'affinité du ligand sélectionné vis à vis d'autres types de récepteurs, affinité qui peut être non souhaitée pour éviter les effets secondaires, ou au contraire souhaitée. Ainsi, la plupart des composés antipsychotiques sont des ligands qui agissent à la fois sur les récepteurs sérotoninergiques de type 5-HT₂ et les récepteurs dopaminergiques de type D₂ pour optimiser leur efficacité chez les patients schizophrènes.

Ces études de sélectivité sont capitales à un stade précoce du développement du produit, non seulement pour réorienter la synthèse vers de nouveaux composés mais aussi pour stopper le développement de composés ayant un profil de sécurité non favorable, ce avant d'engager trop d'études sur l'animal.

La fonctionnalité

Le dernier aspect à aborder quand on étudie un ligand est sa fonctionnalité: va-t-il ouvrir ou fermer la serrure ? Va-t-il être activateur, agoniste, ou bien inhibiteur, antagoniste ? Selon le type ou la famille de récepteurs concernés, il existe plusieurs types de tests membranaires ou cellulaires pour vérifier la fonctionnalité du ligand.



Voilà les informations minimales et indispensables pour caractériser un candidat médicament, ligand d'un récepteur couplé aux Protéines G.

Le tournant des années 80

Jusque dans les années 80, les études précédemment décrites s'effectuaient essentiellement sur tissus disséqués, nécessitant par conséquent un sacrifice important d'animaux.

Certaines expériences continuent, encore aujourd'hui, à ne pouvoir se faire que sur tissus, car certains récepteurs ont besoin du contexte cellulaire ou tissulaire d'origine. Certains modèles in vitro, en effet, ne reflètent pas ce qui se passe dans le tissu. Certaines études restent également impossibles à réaliser autrement. Par exemple, lorsqu'on étudie l'effet de conditions expérimentales comme l'âge, le sexe des animaux, le rythme circadien... Ou lorsque l'on veut étudier l'effet de l'administration d'un produit en aigu ou en chronique, sur l'occupation des récepteurs. Enfin, autre type d'étude que l'on ne peut, à l'évidence, effectuer que sur tissu: les autoradiographies qui consistent à obtenir des informations sur la distribution d'un type donné de récepteurs dans le cerveau en particulier.

Les limites des études sur tissus sont, bien sûr, le nombre d'animaux nécessaires, et aussi, le manque de spécificité car on peut avoir en présence, plusieurs sous-types d'une même famille de récepteurs.

En fait, il a fallu attendre 1986 pour que les études de réceptologie ne soient plus faites exclusivement sur tissus animaux. En effet, avec l'avènement des techniques de biologie moléculaire, ont été clonés les deux premiers récepteurs couplés aux protéines G : le récepteur Beta adrénergique et le récepteur muscarinique de type M1. Depuis, environ 350 RCPG sont

désormais clonés. Environ 250 sont caractérisés, c'est-à-dire que leur ligand physiologique est connu, qu'il s'agisse de neurotransmetteurs comme l'histamine ou la dopamine, ou bien de peptides. Il en reste une centaine qui sont dits orphelins parce que seul le récepteur est connu, mais pas son ligand physiologique.

Etablissement d'une lignée stable

Un intérêt majeur de cette approche est que l'on peut choisir très précisément l'espèce que l'on veut étudier. La plupart du temps, on travaille directement sur des récepteurs issus de l'espèce humaine. Le gène codant pour le récepteur est cloné à partir d'un tissu de l'espèce choisie.

L'ADN est alors mis dans un vecteur d'expression, introduit (transfecté) dans une lignée cellulaire (type de cellule capable de se multiplier). Il existe ensuite des moyens pour sélectionner la cellule qui aura intégré dans son génome, l'ADN codant pour le récepteur, et qui l'exprimera de façon stable. A partir de cette cellule, les cellules filles vont créer une nouvelle lignée dite recombinante pour le gène inséré. Cette lignée est ensuite produite en masse et les tests sont réalisés à partir de ces cellules exprimant le récepteur d'intérêt.

Miniaturisation et robotisation (Fig.3)

La miniaturisation et la robotisation ont révolutionné les domaines de la réceptologie au niveau industriel.

Tant que l'on travaillait sur tissus animaux on ne disposait que de peu de récepteurs, la manipulation restait complètement manuelle et

Réceptologie sur tissus animaux :



! Peu de récepteurs



Criblage à faible débit

Réceptologie sur lignées cellulaires transfectées :



Beaucoup de récepteurs



Criblage à haut débit (HTS)

Fig.3

le faible débit du criblage ne permettait de tester qu'un nombre réduit de molécules.

Sur lignées cellulaires transfectées, au contraire, on dispose de récepteurs en quantité quasi-illimitée. L'utilisation de robots est rendue possible par la miniaturisation des volumes d'essais. Le criblage passe au haut débit puisque la réalisation des tests est automatisée. On peut donc espérer découvrir des composés plus nombreux et plus originaux.

Miniaturisation et robotisation ont permis de passer ainsi du format de tube au format de plaque multipuits permettant de traiter simultanément selon le format de la plaque, 96, 384 ou même 1536 échantillons.

Des acquis et des limites

Les acquis de la réceptologie moderne peuvent être résumés ainsi :

- diminution voire absence d'animaux ;
- accès aux récepteurs humains ;
- production de récepteurs en grande quantité ;
- satisfaction du critère de spécificité ;
- facilitation du contrôle de l'affinité ;
- possibilité de criblage d'un très grand nombre de produits ;
- meilleure appréhension de la fonctionnalité des récepteurs ;
- perspectives de développement des techniques de fluorescence pour limiter l'usage de la radioactivité, donc réduction des risques environnementaux et des coûts liés aux déchets, tout en assurant une plus grande sécurité aux manipulateurs.

Mais à côté de tous ces aspects très positifs, il faut, quand même, noter que les lignées cellulaires ont leurs limites. Certains modèles peuvent être difficiles à obtenir. Le contexte cellulaire de la lignée hôte peut être insuffisant pour l'expression fonctionnelle de récepteur. Il peut manquer des protéines qui accompagnent le récepteur (comme, par exemple, la protéine RAMP pour le récepteur CGRP). Dans certains cas, peuvent survenir l'association de deux récepteurs ou dimérisation, qu'il s'agisse d'homodimérisation quand les deux récepteurs sont identiques, ou d'hétérodimérisations quand les récepteurs sont différents, ce qui peut conduire à des réponses pharmacologiques spécifiques.

Il arrive aussi que l'on constate des effets fonctionnels erronés dus au fort taux d'expression des lignées cellulaires. On peut aussi constater des effets paradoxaux dus à la transfection qui peut induire de façon aléatoire

l'expression de certains gènes dès lors que l'insertion du vecteur est effectuée de façon, elle-même, aléatoire dans le génome.

Une autre limite provient de la différence entre espèces. Le criblage s'effectue en général sur récepteurs humains recombinants. Mais il est parfois nécessaire de revenir aux tissus animaux ou bien de cloner le récepteur de l'espèce animale travaillée par la suite *in vivo*, pour contrôler d'éventuelles différences d'affinité interespèces.

La toute dernière limitation tient à l'existence des brevets. Outre les brevets sur les produits, il existe désormais des prises de brevets sur les récepteurs. En effet, les nouveaux récepteurs clonés sont brevetés en particulier pour l'utilisation de la séquence à des fins thérapeutiques.

L'apport de la Bioinformatique

La création de bases de données, tant au niveau génomique incluant les données du séquençage du génome humain, qu'au niveau chimique décrivant les composés, qu'au niveau pharmacologique reprenant l'énorme quantité de données générées en réceptologie (notamment avec l'apport du HTS), et leur mise en réseau représente un outil très puissant d'analyse et d'informations.

Des logiciels informatiques permettent désormais le criblage *in silico* de collections de molécules qui sont testées sur la modélisation moléculaire du site récepteuriel responsable de la liaison. L'interaction des molécules sélectionnées avec le récepteur est ensuite vérifiée expérimentalement.

Un outil capital pour la découverte de nouveaux médicaments

Pour l'industrie pharmaceutique, l'établissement des lignées cellulaires recombinantes joint au développement de la robotique représente vraiment un outil capital pour la découverte de nouveaux médicaments. La conclusion qui s'impose est la diminution massive de l'utilisation d'animaux, non seulement pour l'expérimentation en réceptologie proprement dite, mais aussi pour des tests dans des modèles cellulaires plus complexes. L'on recueille très rapidement quantités d'informations, notamment l'affinité, la fonctionnalité et la sélectivité permettant de sélectionner très tôt un nombre restreint de produits intéressants à étudier ensuite dans des modèles patho-physiologiques chez l'animal.

Bioinformatique structurale, criblage in silico en 3 D

Bruno VILLOUTREIX

Unité de recherche Inserm U648
Université Paris 5 - René Descartes
45 rue des Sts Pères - 75006 Paris
bruno.villoutreix@univ-paris5.fr

Pour aborder les éléments de bioinformatique et de criblage virtuel, il faut revenir sur les principales étapes de la recherche de médicaments, sur ce qu'est la bioinformatique structurale et le *drug design*, puis se centrer sur le criblage *in silico* qui est une des fenêtres du *drug design*.

Les méthodes les plus pertinentes de criblage *in silico* (voir Figure 1) impliquent généralement de connaître la structure 3D des cibles (souvent des protéines), ces informations peuvent être obtenues expérimentalement ou de manière théorique. Il faut aussi des outils informatiques pour pouvoir prédire les sites de fixation des médicaments potentiels et pour générer des banques de petites molécules chimiques. Il est donc nécessaire de construire des banques de données et d'avoir des filtres informatiques (ADME/Tox) pour essayer d'en extraire toutes les molécules pouvant se révéler comme toxique. Ensuite, nous avons besoin d'outils mathématiques et informatiques pour combiner ces

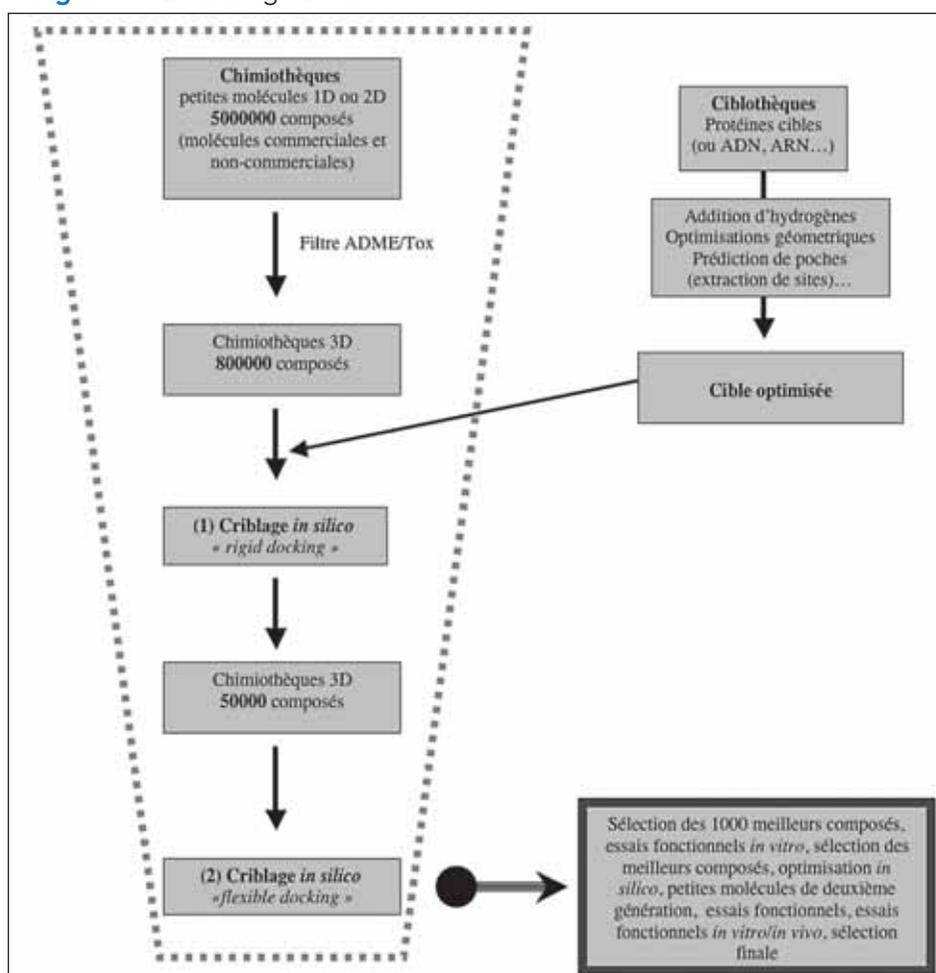
Summary

As the structures of more and more proteins and nucleic acids

become available via Structural Genomics projects, *in silico* ligand screening (or virtual ligand screening or VLS) is increasingly considered for lead discovery. As more structures are determined experimentally, docking against homology-modeled targets also becomes possible for more proteins. The protocol involves generation of large compound collections in 3D and selection of drug-like compounds via ADME/Tox filter, prediction of druggable pocket on some specific targets, docking the different molecules and scoring. The best molecules selected *in silico* are then tested *in vitro* and/or *in vivo*. Such computer tools help the drug discovery process and reduce the number of experiments to do (*in vitro* or *in vivo* on animals).

Several drugs have been developed using this approach and more are coming.

Figure 1 - Le criblage in silico



molécules chimiques avec nos protéines cibles. C'est ce qu'on désigne en Anglais par le terme « *docking* » ou arrimage moléculaire.

Admettons que nous disposions d'une protéine impliquée dans une pathologie dont nous voulons cibler le site actif. Nous cherchons une petite molécule chimique (futur médicament) dans nos banques qui puisse entrer dans ce site actif et le bloquer. C'est le principe du criblage à haut débit expérimental. Ce qu'on fait dans des tubes à essai, nous cherchons à le reproduire sur nos ordinateurs, d'où le nom de criblage *in silico*.

L'énorme avantage du criblage informatique, dès lors qu'on possède une structure 3 D de la protéine cible, c'est qu'on va pouvoir y faire passer plusieurs millions de composés par jour, alors que le criblage expérimental est bien plus long et plus coûteux.

Gagner du temps

On considère, communément, qu'actuellement, la mise sur le marché d'une molécule nouvelle prend 15 ans et coûte 500 millions d'Euros. C'est évidemment dû à la complexité du processus de R & D, au temps nécessaire à l'identification et à la caractérisation des cibles, à l'identification des molécules, puis aux échecs au niveau de l'expérimentation animale, et de l'expérimentation clinique.

On devrait pouvoir réduire la longueur et les risques de ce processus grâce à certains outils informatiques prédictifs et se donner ainsi plus de chances de succès et surtout éviter de repartir à zéro, après 10 ans de travail.

C'est là que peut intervenir la bioinformatique et, tout spécialement, la bioinformatique structurale.

Il faut d'abord essayer de caractériser la cible. Par exemple une protéine impliquée dans une pathologie doit être caractérisée au niveau biochimique. Si l'on peut prédire sa structure, cela va grandement faciliter la suite des travaux. Ensuite si l'on peut faire du criblage *in silico* et ne faire qu'ensuite la partie expérimentale, on va encore gagner du temps et limiter le nombre d'expériences.

Enfin, pour l'optimisation des « *leads* » la contribution de la bioinformatique structurale va être déterminante.

Quand on considère les évolutions intervenues au cours des dernières années, il est clair que les molécules découvertes, l'ont été un peu au hasard ou parce que l'on connaissait plus ou moins les substrats qui devaient se fixer dans le site actif, on se faisait donc une idée approximative de ce qu'il fallait synthétiser.

Dans les années 80 on a mis beaucoup d'espoir dans le drug design basé sur la structure 3D des cibles, essentiellement des protéines. On est passé ensuite au criblage haut débit ou moyen débit expérimental en oubliant les informations structurales. Aujourd'hui de nombreux chercheurs se concentrent sur une approche combinée : criblage *in silico* et criblage *in vitro*.

De la théorie à la pratique

En pratique, si l'on part d'une protéine particulière, on a besoin de sa structure 3D. Cette structure 3D est obtenue soit par diffraction des rayons X, soit par résonance magnétique nucléaire, soit par méthode bioinformatique.

On passe ensuite aux étapes de criblage *in silico* (voir Figure 1).

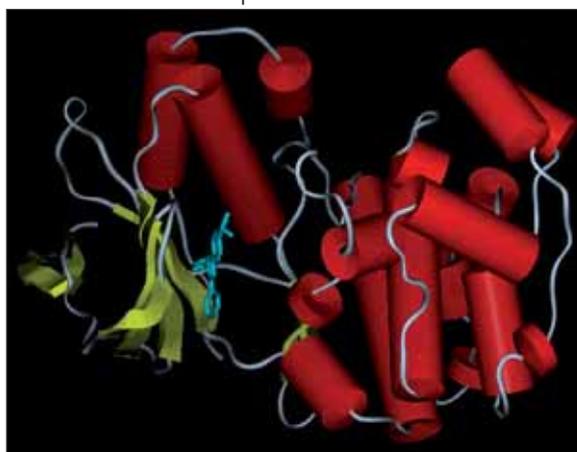
On a donc un site à peu près caractérisé (une poche) dans lequel on va positionner, sur ordinateur, une première petite molécule chimique présente dans notre banque ou chimiothèque. Si elle s'adapte, on la conserve. Dans le cas contraire, on la rejette. On en prend une autre, et ainsi de suite.

On teste *in vitro* les meilleurs composés sélectionnés par informatique et graphiquement par le modélisateur.

Puis on en vient à une deuxième phase de tests biochimiques qui vont consister à optimiser ce « candidat médicament » à travers une série d'alternances entre chimie, modélisation moléculaire et autres méthodes biophysiques. Ce n'est qu'après la réalisation de ces cycles successifs que l'on envisagera d'aller plus loin chez l'animal.

Prenons l'exemple concret d'une protéine impliquée dans un cancer et qu'on va visualiser sur l'écran (Figure 2). Les structures secondaires

Figure 2 - Une protéine avec une petite molécule dans une poche.



(des hélices) apparaissent sous forme de cylindres. Les feuilletts beta apparaissent sous forme de petites flèches. C'est un médicament (petite molécule chimique non-peptidique), qui est localisé dans la poche, dans le site actif. Cette molécule inhibe la protéine. Avec ce type d'information, on peut réaliser un projet de criblage *in silico* et essayer de trouver d'autres petites molécules qui pourraient se fixer dans cette poche.

Mais le problème est que, la plupart du temps, on met en évidence la structure des protéines, mais sans ligand à l'intérieur. Or, il faut trouver un moyen de prédire les endroits où les petites molécules vont pouvoir se fixer. Pour y parvenir on peut placer notre protéine au centre d'une grille. On prend alors un petit cube ou un petit cylindre virtuel que l'on approche de la protéine, dans toutes les directions. Il y a des endroits où notre gomme ne va pas pouvoir entrer. Ces points sont des points potentiels de fixation d'un ligand, c'est une façon assez simple et assez efficace de définir les poches susceptibles d'être des points potentiels de fixation des ligands.

Ces poches ont des propriétés que l'on peut définir et représenter de façon mathématique.

A l'heure actuelle (en 2005), environ 50 millions de composés ont été synthétisés. Toutes ces molécules sont répertoriées dans des fichiers informatiques, généralement en une/deux dimension.

Mais sur ces 50 millions de molécules, très peu peuvent prétendre avoir des propriétés permettant d'obtenir un médicament.

Certains sont trop grands ou trop petits, ont des atomes et des groupements toxiques... etc. Pour toutes ces molécules qui, a priori, présentent un risque, on tente de définir une série de règles de traitement informatique sur la base de données expérimentales. A partir de leur structure, on va calculer et éliminer toutes celles qui n'ont aucune chance de devenir des médicaments. On va donc travailler seulement sur une banque biaisée.

Ainsi, à partir d'une banque d'1 million de composés après filtrage sur ordinateur, on va reconnaître des propriétés *drug-like* à 250000 composés. C'est pour ces composés, situés dans des fichiers en 1 dimension, que nous allons générer des structures en 3 D de façon plus ou moins automatique.

Parvenus à ce stade, nous avons bien notre protéine et nos ligands, sur des fichiers informatiques et en 3 dimensions. Ce dont nous avons besoin, maintenant, ce sont des outils pour tenter de prédire comment la molécule va venir se positionner dans le site actif.

On va rechercher deux types de complémentarités. Une complémentarité géométrique, et une complémentarité énergétique. A l'intérieur de la poche d'un site actif, on va dessiner un certain nombre de sphères virtuelles, au centre desquelles on va superposer les atomes de nos petites molécules. Si plusieurs atomes du ligand peuvent se superposer sur plusieurs centres de ces sphères, cela suggère que cette molécule est un ligand potentiel. Sinon, on la rejette. C'est un premier criblage, une complémentarité géométrique.

Ensuite, il va falloir caractériser ces interactions, calculer l'énergie d'interaction.

La façon la plus simple consiste à positionner une protéine sur une grille puis de pré-calculer les énergies dues à cette protéine sur les points de la grille. On calcule une énergie d'interaction entre les atomes du ligand et les points de la grille.

On calcule, par exemple, les interactions électrostatiques de Coulomb et les interactions de Van der Waals.

Evidemment, les experts savent bien que ce type de score ne suffit pas et qu'il faut introduire d'autres paramètres beaucoup plus complexes.

Vers des médicaments très novateurs au prix de moins d'expériences *in vitro* et *in vivo*

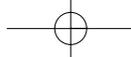
On part d'une banque d'un million de composés déjà synthétisés, on la filtre. On obtient

250000 composés qui ont le potentiel d'être un médicament. On fait une première série de calculs avec de l'arrimage rigide et une fonction d'énergie (de score) d'interaction assez simple. On sélectionne environ 50 000 composés plus appropriés. On applique une nouvelle série de calculs plus sophistiqués où les énergies d'interaction vont être beaucoup plus complexes et demander plus de temps de calculs, environ 3 minutes par composés.

Cela ne paraît pas énorme, mais lorsqu'on travaille sur des millions de molécules, cela demande une puissance informatique considérable.

In fine, c'est une centaine de composés qui, après avoir passé tous ces tests *in silico*, vont être testés *in vitro*.

Après quoi, seuls quelques composés feront l'objet d'une ultime série d'étapes informatiques qui seront optimisées puis testées sur animal.



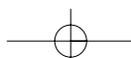
Il est clair que ce processus permet de réduire considérablement le nombre d'expériences à effectuer *in vitro* et *in vivo*.

On peut penser que, compte tenu des projets de Génomiques Structurales existants, on pourra obtenir la structure 3D de la quasi-totalité des protéines qui nous intéressent chez l'homme et dans d'autres espèces.

Pour les molécules chimiques, on possède déjà des banques satisfaisantes, dont on va pouvoir

accroître les capacités de façon virtuelle ; c'est-à-dire créer des banques de molécules virtuelles dont certaines pourront être synthétisées et devenir des médicaments très novateurs.

Il reste bien entendu encore des problèmes à résoudre, notamment en matière de filtrage ADME/Tox et de docking/scoring, mais on a toutes les raisons de penser, compte tenu des logiciels déjà existants, que des solutions seront trouvées.



L'expérimentation virtuelle en recherche pharmaceutique

André MICHEL

AUREUS Pharma

AUREUS Pharma, leader dans le domaine de la " e-Discovery ", propose un ensemble intégré de technologies, alliant systèmes informatisés de connaissances et méthodes expérimentales afin d'accélérer la découverte de nouveaux médicaments.

Le système d'AUREUS est le seul à intégrer bases de données et systèmes de connaissances traitant de l'expérimentation biologique et pharmacochimique décrite dans la littérature. Ce système intègre non seulement les données concernant la pharmacopée actuelle ou les produits faisant l'objet de projets en recherche clinique, mais aussi toutes les autres molécules ayant donné lieu à la publication de données de recherche en pharmacochimie tant les produits d'origine naturelle que les produits de synthèse. A terme, la société couvrira l'ensemble des cibles connues à ce jour.

L'application du savoir-faire d'AUREUS permet dès lors de :

- Focaliser l'expérimentation biologique et la synthèse chimique en choisissant les structures moléculaires les plus à même d'obtenir une réponse positive, diminuant non seulement l'investissement en synthèse de produits mais également en réduisant le recours au matériel biologique.
- Prévoir pour des produits donnés de nouvelles applications thérapeutiques par l'interrogation de la base propriétaire d'AUREUS en tenant compte des similitudes moléculaires et fonctionnelles pour un grand nombre de composés publiés : apprendre des expériences antérieures permet d'éviter de reproduire des expériences déjà réalisées.
- Prévoir le risque d'apparition d'effets indésirables en bénéficiant des similitudes moléculaires et fonctionnelles pour un grand nombre de composés et de cibles publiés : les tests de sécurité sont extrêmement " consommateurs " d'animaux d'expérience. Notre approche a pour objectif de limiter ces expériences en évitant les redondances.
- Produire, par l'interrogation de la base propriétaire d'AUREUS, des hypothèses sur les comportements pharmacocinétiques de nouveaux ligands : une meilleure connaissance des propriétés ADME (Administration, Dispersion, Métabolisme) en vue des essais chez l'homme.