

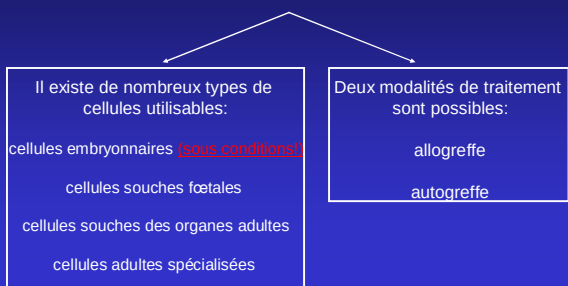
THERAPIE CELLULAIRE

Définition

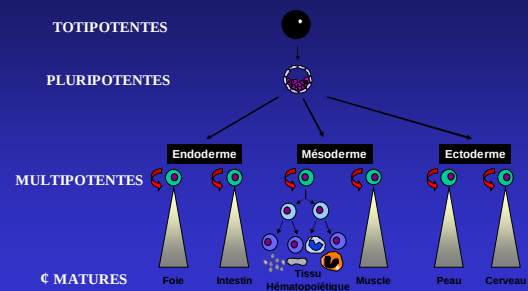
La thérapie cellulaire est l'utilisation de cellules vivantes manipulées ou modifiées à des fins thérapeutiques.

Des dispositions réglementaires fixent les modalités d'organisation de la thérapie cellulaire en France.

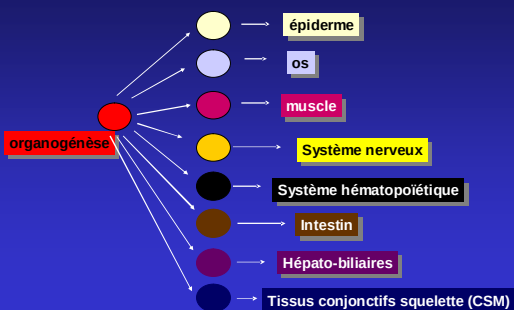
Deux notions sont essentielles à la compréhension du champ d'application de la thérapie cellulaire:



Différents types de Cellules Souches



Différents types de cellules souches par organes ou tissus

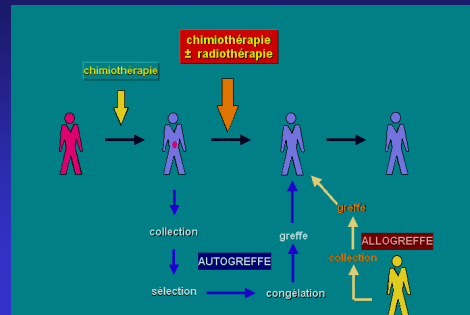


THERAPIE CELLULAIRE ET CELLULES SOUCHES HEMATOPOIETIQUES

HISTORIQUE

- 1957 - 1959: 1^{ère} greffes de moelle osseuse
 - Reconstitution de l'hématopoïèse allogreffes après irradiation accidentelle (Mathé)
 - Traitement anticancéreux en phase de progression allogreffes (Thomas), autogreffes (Dameshek)
- 1975 - 1980: amélioration des techniques
 - Conditionnements pré greffe, greffes en période de rémission
- 1980 - 1985: purge des greffons autologues
- 1986 - 1990: greffes de cellules souches sanguines
- 1988: 1^{ère} greffe de sang de cordon (Gluckman)
- 1991: greffes de cellules CD34+
- 1995: greffes de cellules amplifiées

PRINCIPE



Les cellules souches hématopoïétiques (CSH)

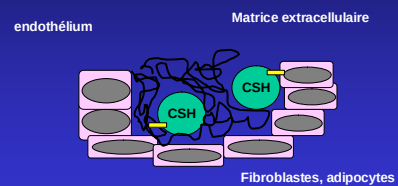
Source des CSH:

La moelle osseuse

Le sang périphérique

Le sang de cordon ombilical

Les cellules souches hématopoïétiques (CSH)



Prélèvement médullaire



Prélèvement médullaire



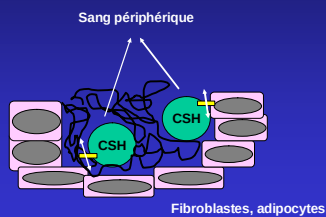
Prélèvement médullaire



Prélèvement de cellules souches périphériques



Les cellules souches hématopoïétiques (CSH)



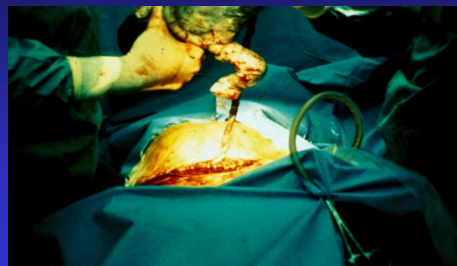
Prélèvement de cellules souches périphériques



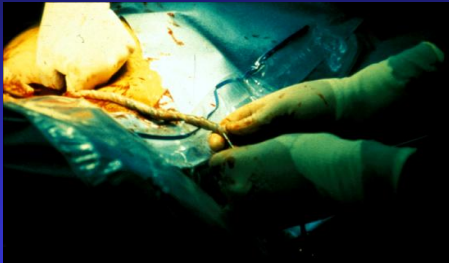
cellules souches périphériques

- Faible nombre à l'état basal
- Augmentation après chimiothérapie aplasante et/ou FDC
 - Techniques de mobilisation
 - Chimiothérapie seule
 - FDC seul (G-CSF)
 - Chimiothérapie + FDC (G-CSF ou GM-CSF)
- Avantages
 - Collection facilitée (par cytophérèse, pas d'AG)
 - Récupération hématopoïétique plus rapide/MO durée d'hospitalisation plus courte, diminution du nombre de transfusions
 - Contamination du greffon moins importante?

Prélèvement de sang placentaire



Prélèvement de sang placentaire



Prélèvement de sang placentaire



CSH et sang placentaire

- greffes allogéniques à partir de banques ou de la fratrie
- Avantages
 - Immaturité des cellules immunocompétentes
 - moins de GVH
 - HLA +/- compatible
 - Très grand nombre potentiel de donneur
 - Capacités prolifératives des CS plus importante
 - prise de greffe avec peu de cellules
- Inconvénients
 - Quantité limitée
 - concerne les greffes pédiatriques en priorité
 - possibilité chez l'adulte (intérêt expansion +++, plusieurs cordons)

Autogreffe de CSH

Partie intégrante du traitement de certaines hémopathies malignes ou de certains cancers.

- prélèvement du greffon (+/- facteurs de croissances)
- chimiothérapies fortes doses
- restauration de la moelle osseuse aplasique

Diagnostic et autogreffe de CSH

Hémopathies (n=1856)	%	Tumeurs solides (n=411)	%
Lymphomes non hodgkiniens	38,7	Sein	35
Myélome	32,2	Neuroblastome	12,6
Hodgkin	8,6	Testicule	11,5
Leucémie aiguë myéloïde	6,1	Système nerveux	11,3
Leucémie myéloïde chronique	6,1	Os	10,5
Leucémie aiguë lymphoblastique	3,4	Ovaire	5,1
Leucémie lymphoïde chronique	1,9	Sarcomes	3,6
Myélodysplasie	0,7	Autres	10,6
Autres	2,3		

Allogreffe de CSH

Réservée à certaines hémopathies particulièrement graves.

La reconstitution hématopoïétique s'accompagne d'un conflit entre donneur et receveur: intérêt $\rightarrow$ effet GVL
problème $\rightarrow$ effet GVH

Nécessité du groupage et de la compatibilité HLA

Allogreffes géno-identiques ou phéno-identiques

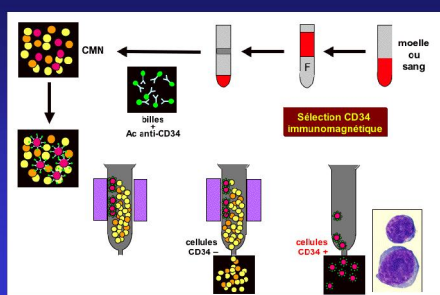
Diagnostic et allogreffe de CSH

	%		%
Leucémie aiguë myéloïde	24,7	Myélome	2,6
Leucémie aiguë lymphoblastique	23	Leucémie lymphoïde chronique	1,5
Leucémie myéloïde chronique	18,4	Hémoglobinopathies	0,8
Lymphomes non hodgkiniens	8,6	Hodgkin	0,5
Myélodysplasie	5,8	Autres	3,7
Aplasie	4,9		

Méthodes de sélection du greffon

- Méthodes chimiques
 - Agents chimiothérapeutiques actifs in vitro
ex: dérivés du cyclophosphamide (Asta Z)
 - Intérêt: traitement antitumoral greffons autologues surtout dans les pathologies myéloïdes (LAM)
 - Inconvénients: toxicité hématopoïétique → ↑ durée d'aplasie
- Méthodes immunologiques (billes magnétiques)
 - sélection positive des cellules CD34+ greffons allogéniques → déplétion T (↓ GVH)
 - greffons autologues → traitement antitumoral si cellules malignes CD34- (ex: myélome)

Sélection des cellules CD34+

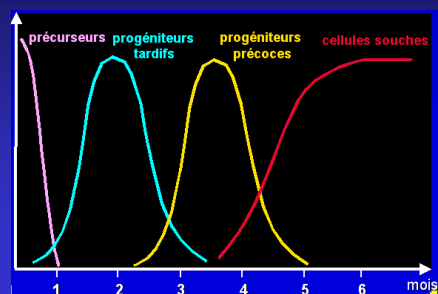


Le contrôle des greffons

- numération et viabilité des cellules nucléées (compteurs)
- étude phénotypique des cellules souches et quantification
 - Numération des cellules CD34+ (cytométrie de flux)
notion de seuil pour « autoriser » la greffe
 - Étude des sous populations CD34+/CD38-
cellules souches primitives
- étude phénotypique des cellules matures et quantification
 - Numération des cellules CD3+ et CD19+ (cytométrie de flux)
- étude fonctionnelle des cellules souches
 - cultures clonogéniques → progéniteurs
 - cultures à long terme (LTC-IC)
cellules souches primitives

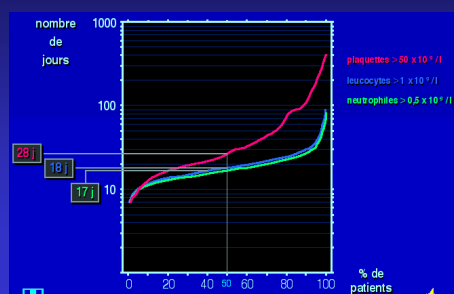
Reconstitution de l'hématopoïèse post-greffe

Différentes populations cellulaires participent à la reconstitution



Reconstitution de l'hématopoïèse post-greffe

Sortie d'aplasie après greffe



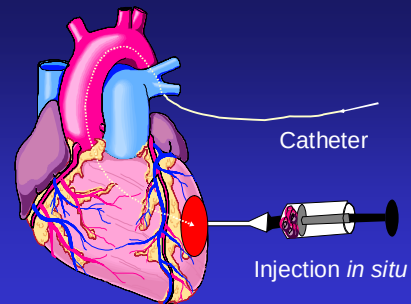
Thérapie cellulaire de l'insuffisance cardiaque

Traitement de l'insuffisance cardiaque sévère

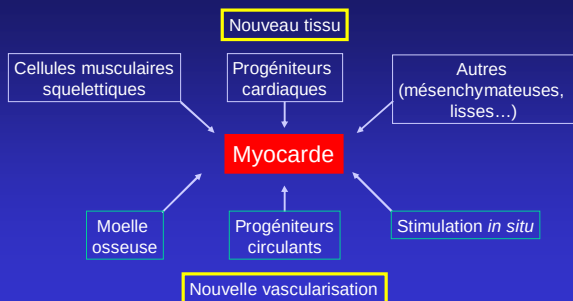
- 500 000 patients, 120.000 nouveaux/an (France)
- Transplantation cardiaque
- Traitements médicamenteux (ICE, β -bloquants)
- Cardiomyoplastie
- Ventriculectomie gauche
- -> **transplantation cellulaire ?**
-> type cellulaire ?

Buts

- Remplacer le tissu infarcté par des cellules vivantes
- Redévelopper les phénomènes contractiles
- Créer une nouvelle vascularisation
- » En utilisant la voie d'injection appropriée
- » Sans induire de réaction immunitaire



Différentes options



Cellules cardiaques/Progéniteurs cardiaques: où les trouver

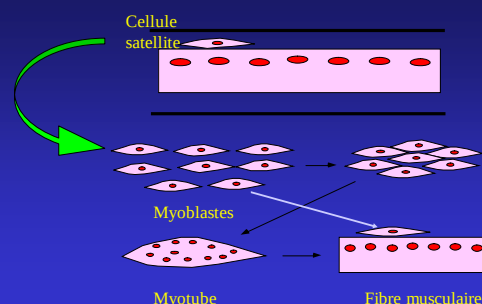
- | | |
|--|-----------------|
| • Cellules ES | oui |
| • Tissus foetaux | pas utilisables |
| • Réserve de cellules souches cardiaques | à confirmer |
| • Progéniteurs circulants | à confirmer |
| • Progéniteurs médullaires | oui |
| • Progéniteurs musculaires | ? |
| • Manipulations cellulaires | ? |

Cellules musculaires squelettiques

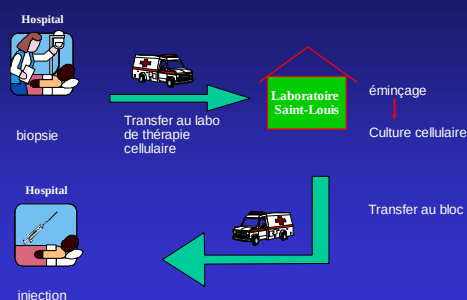
- Faciles à obtenir (biopsies, jeunes ou sujets âgés)
- Origine autologue ou hétérologue
- Capacité d'auto-renouvellement (plus de 20 divisions chez l'adulte)
- Conditions de culture connues
- Statut de cellules différenciées

→ essai clinique

Régénération du muscle squelettique



Protocole



Essai clinique (Phase I) (June 2000 - November 2001)

Critères d'inclusion:

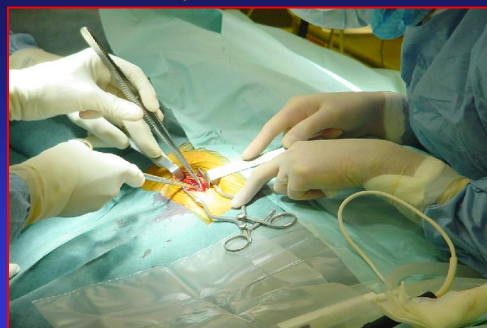
- Infarctus du myocarde, FEV < 35%
- Insuffisance cardiaque congestive sévère
- Zone akinétique et non viable
- Indication de pontage

Essai clinique (Phase I) (June 2000 - November 2001)

Caractéristiques (10 patients)

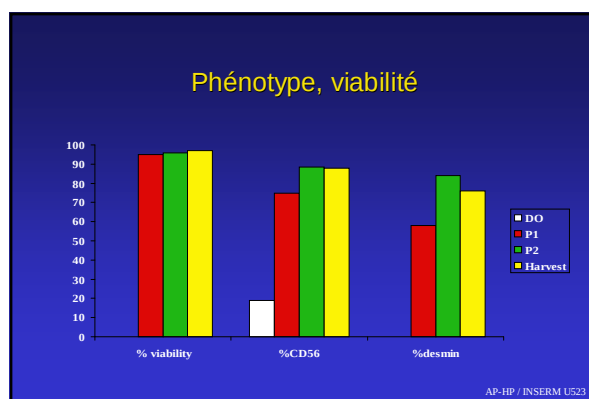
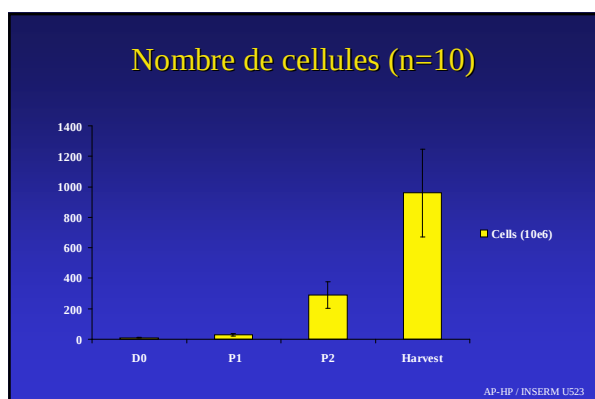
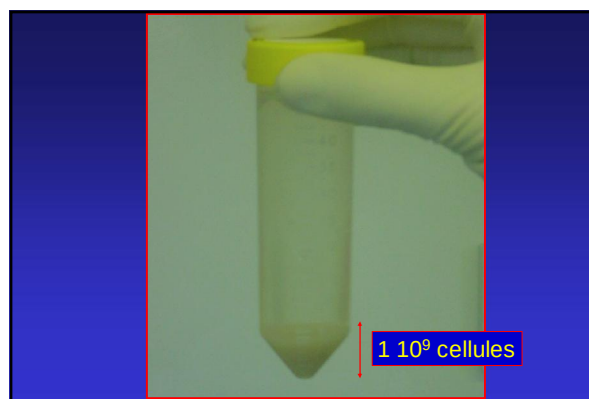
- 10 hommes
- Age médian : 60.3 (38-73)
- NYHA II/III/IV : 4/4/2
- Localisation de l'infarctus : antérieur (6), postérieur (3), postéro-lateral (1)
- Temps depuis l'infarctus : 6.2 yr (3 mois-19 ans)
- FEV moyenne (%) : 24 ± 1 (18-31)

Biopsie musculaire



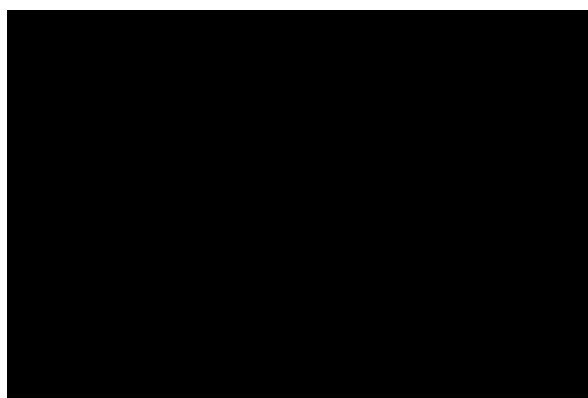
AP/HP - INSERM - AFM

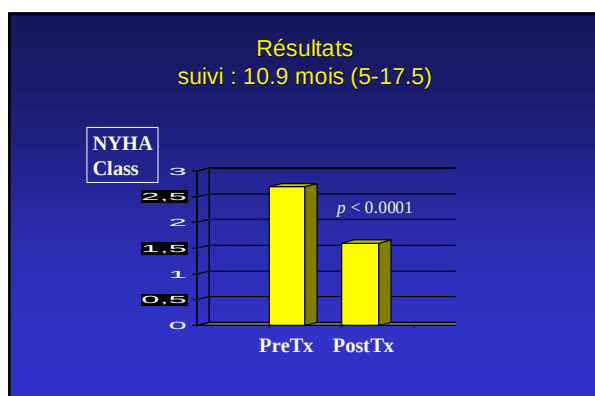
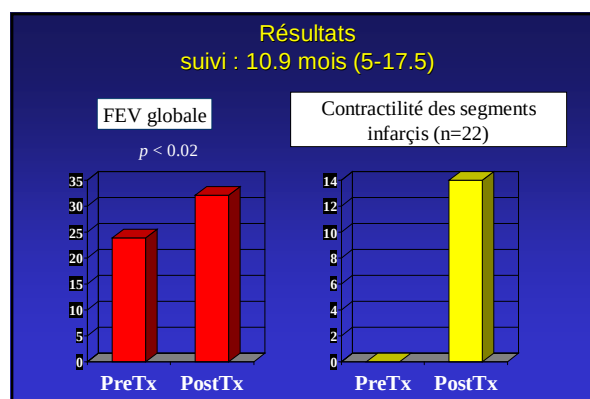
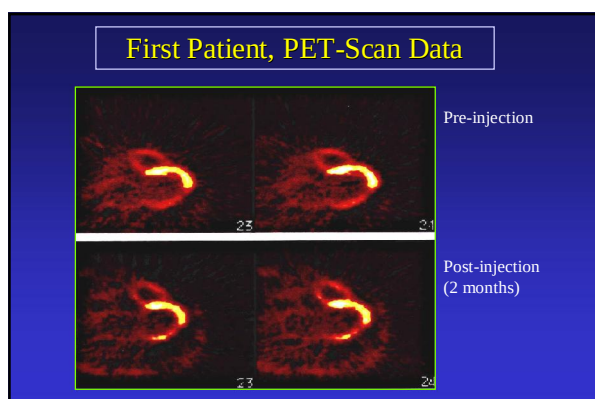
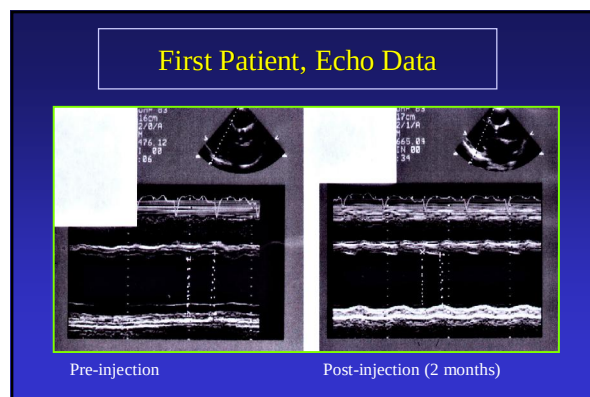




RESULTATS

- Nombre de cellules produites (x 10⁶) : 953 (530-1,215)
- Nombre de cellules injectées (x 10⁶) : 871 (500-1,150)
- % de myoblastes (CD56 +) : 87 (67-97)
- % de cellules viables (PI +) : 95 (86-99)
- Temps de culture (jours) : 16 (14-20)



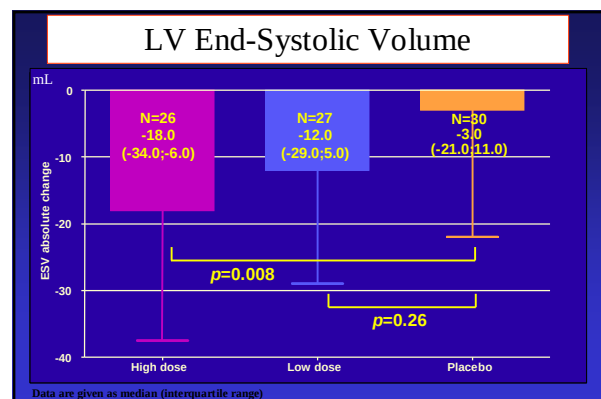
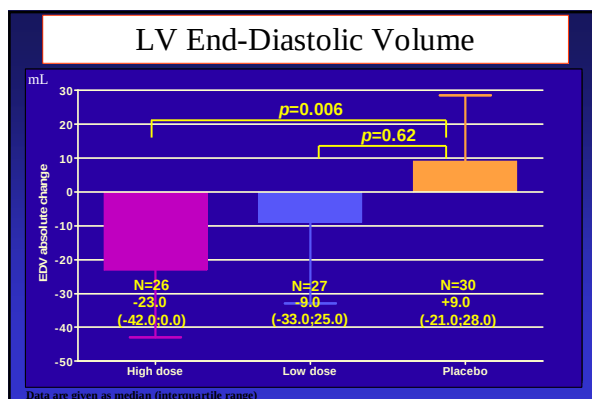
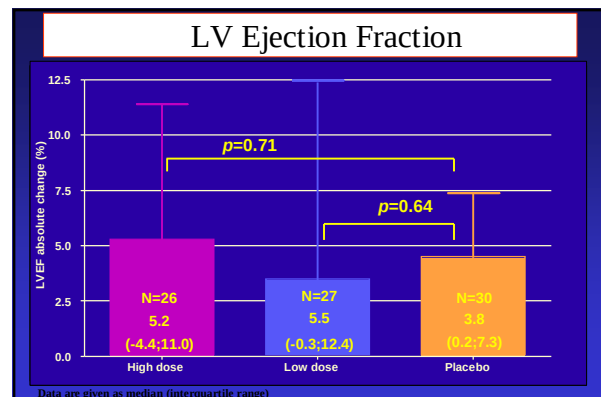
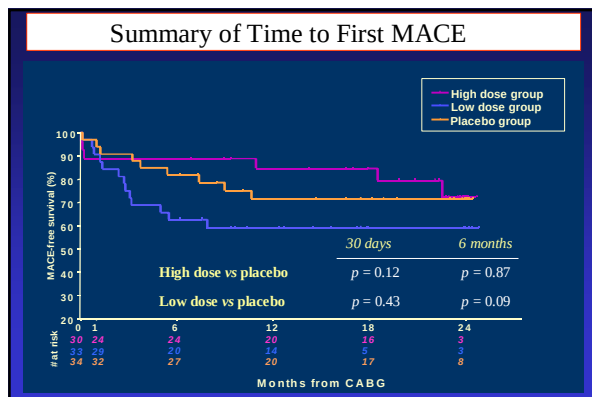


Protocole M A G I C en quelques mots

(Myoblast Autologous Grafting In Ischemic Cardiopathy)

- Randomisé, double aveugle, Placébo contre contrôle
- Addition au pontage
- 300 patients (100 en France, 100 pour le reste de l'Europe, 100 en Amérique du Nord)
- 2 laboratoires de culture cellulaire (France, USA)
- Co-sponsoring (AP-HP, Genzyme Biosurgery)
- 3 groupes de doses (faible, élevée, placebo)
- 30 injections intramyocardiques
- Analyses
 - 1) Contractilité des segments injectés (écho)
 - 2) EACM, fonction VG, qualité de vie, effet-dose
- Début avril 2003

AP-HP - INSERM - AFM



The MAGIC Trial

Major Outcomes

- Demonstrated feasibility despite difficulties inherent in multicenter trials
- Absence of statistically increased risk of ventricular arrhythmias to be cautiously interpreted in view of the small sample size
- Absence of significant improvement of regional (cell-transplanted segments) or global (echo-measured LVEF) contractility
- Evidence for reversal of remodeling

Cellules souches mésenchymateuses (CSM)

Indications cliniques

(1) Pathologies Osseuse

Orthopédie (pertes osseuses)

CSM + corail
(Petite et al., Nat Biotech 2000)

Modèle mouton

Cellules souches mésenchymateuses (CSM)

Indications cliniques (2) CSM et greffe de CSH

CSH autologues: (Koc et al., 2000)

15 patientes avec cancer du sein

CD34+ injectées: $> 2 \times 10^6/\text{kg}$

CSM injectées: $1 \text{ à } > 2 \times 10^6/\text{kg}$

Résultats:

neutrophiles $> 500/\mu\text{l}$: 8 jours

plaquettes $> 20\,000/\mu\text{l}$: 8.5 jours

→ les CSM peuvent améliorer la reconstitution hématopoïétique

Cellules souches mésenchymateuses (CSM)

Indications cliniques (2) CSM et greffe de CSH

CSH allogéniques:

(Lazarus et al., 2000; Frasson et al., 2002; Le Blanc et al., 2006)

8 patients aGVHD digestive grade III-IV cortico-résistante

3 LAL, 2 LAM, 1 myélome, 1 Krein, 1 Kprostate

CSM injectées: $0.7 \text{ à } 9 \times 10^6/\text{kg}$

Résultats:

tolérance OK

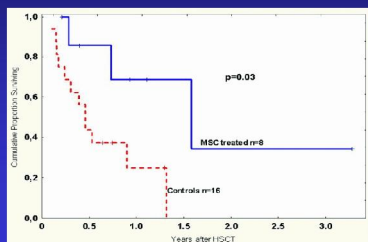
réponse complète chez 6/8 patients

comparaison groupe contrôle 16 patients aGVHD digestive grade III-IV cortico-résistante matchés sauf pour la dose de CD34+

Cellules souches mésenchymateuses (CSM)

Indications cliniques (2) CSM et greffe de CSH

CSH allogéniques: (Le Blanc et al., 2006)



Réglementation de la thérapie cellulaire et génique

Aspects réglementaires

Textes réglementaires

- **Décret n°2001-909 du 1er octobre 2001** : fixe les conditions d'autorisation des établissements, organismes, procédés, produits et protocoles d'essais cliniques (arrêtés fev 2003)
- **Arrêté du 16 décembre 1998** : BP relatives au prélèvement, au transport, à la transformation, y compris à la conservation des CSH issues du corps humain et des cellules mononucléées sanguines utilisées à des fins thérapeutiques.

Aspects réglementaires

Décret n°2003-1206 du 12 décembre 2003 : porte organisation de la biovigilance

Arrêté du 2 novembre 1994 : GBEA Labo CQ

Loi du 28 mai 1996 : Diverses mesures d'ordre sanitaire, sociale et statutaire (définition des produits de thérapie cellulaire)

Arrêté de la loi de bioéthique de Juillet 1994 définissant les bonnes pratiques en thérapie cellulaire

Aspects réglementaires

Contraintes actuelles

I.2.1. Locaux et matériel

- Séparation des laboratoires CQ et Production
- Etalonnage et suivi du matériel
- Principe de la marche en avant
 - ↳ Pas de confusion
 - Pas de contamination



Décret n°2001-909 du 1er octobre 2001

Ce décret fixe les conditions d'autorisation:

- des établissements et/ou organismes exerçant les activités de préparation, de transformation, de conservation, de distribution et de cession des cellules du corps humain qui ne sont pas destinées à la thérapeutique, et des produits de thérapie génique et cellulaire d'origine humaine ou animale utilisés à des fins thérapeutiques chez l'homme.
- Des procédés de préparations, conservations et de transformations des cellules et des produits de thérapies cellulaires ou géniques.
- Des recherches et les modalités de mise en œuvre des protocoles d'essai concernant les cellules issues du corps humain et les produits de thérapie génique et cellulaires

AFSSAPS: Guichet unique

- L'Agence se charge de consulter les différentes instances impliquées dans la procédure d'autorisation
- Arrêtés en attente pour fixer la nature et le contenu des différents dossiers techniques appuyant les demandes d'autorisation.

