

Cours n°10
Professeur :Mr LARGHERO
Par Sandrine Meghira

THERAPIE CELLULAIRE

Introduction

I) Thérapie cellulaire et cellules souches hématopoïétiques

- a) Historique
- b) Principe
- c) Sources des CSH
- d) Méthodes de sélection du greffon
- e) Contrôle du greffon

II) Thérapie cellulaire et insuffisance cardiaque

- a) Cellules musculaires squelettiques
- b) Cellules souches mésenchymateuses

III) Réglementations de la thérapie cellulaire et de la thérapie génique

- a) Textes réglementaires
- b) AFSSAPS

Je ne peu pas insérer les diapos a ce jour (23decembre) car le prof ne les a pas mise sur le site et je n'ai pas le matériel pour les mettre Même si il me les a file mais si je peux trouver quelqu'un d'équipe pendant les vacances j'enverrai une nouvelle version avec les schémas mais ne vous inquiétez pas les images du cours servent pas a grand chose

Introduction

Définition (très important)

La thérapie cellulaire est l'utilisation de cellules vivantes manipulées ou modifiées à des fins thérapeutiques (*différent de thérapie génique qui manipule le génome*).

Des réglementations fixent les modalités d'organisation de la thérapie cellulaire.

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

1. nombreux types de cellules utilisables

on peut utiliser des :

cellules embryonnaires différenciées (sous conditions réglementaires)

cellules fœtales

cellules souches des organes adultes

cellules adultes spécialisées

2. seulement 2 modalités de traitement possibles :

soit l'**allogreffe** = cellules injectées proviennent d'une autre personne , donneur et receveur sont différents

soit l'**autogreffe** = on est son propre donneur, le patient est son propre donneur

Rappels

Les cellules totipotentes (comme la cellule embryonnaire) sont capables de redonner naissance à l'ensemble des feuilletts donc de donner des cellules pluripotentes ou unipotentes selon les organes puis des cellules multipotentes qui donneront des cellules matures dans les différents organes.

On peut trouver différentes cellules souches par organe ou par tissus :

Il est probable que chaque cellule souche d'un organe adulte donné redonne naissance aux cellules de cet organe et donc participe à la régénération de l'organe auquel elle appartient.

I) Thérapie cellulaire et cellules souches hématopoïétiques (CSH)

a) Historique (pas à connaître évidemment)

1957-1959= 1eres greffes de moelle osseuses

Reconstitution de l'hématopoïèse par allogreffes après irradiation accidentelle (Mathé)
 Traitement anticancéreux en phase de progression par allogreffes (Thomas) et 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

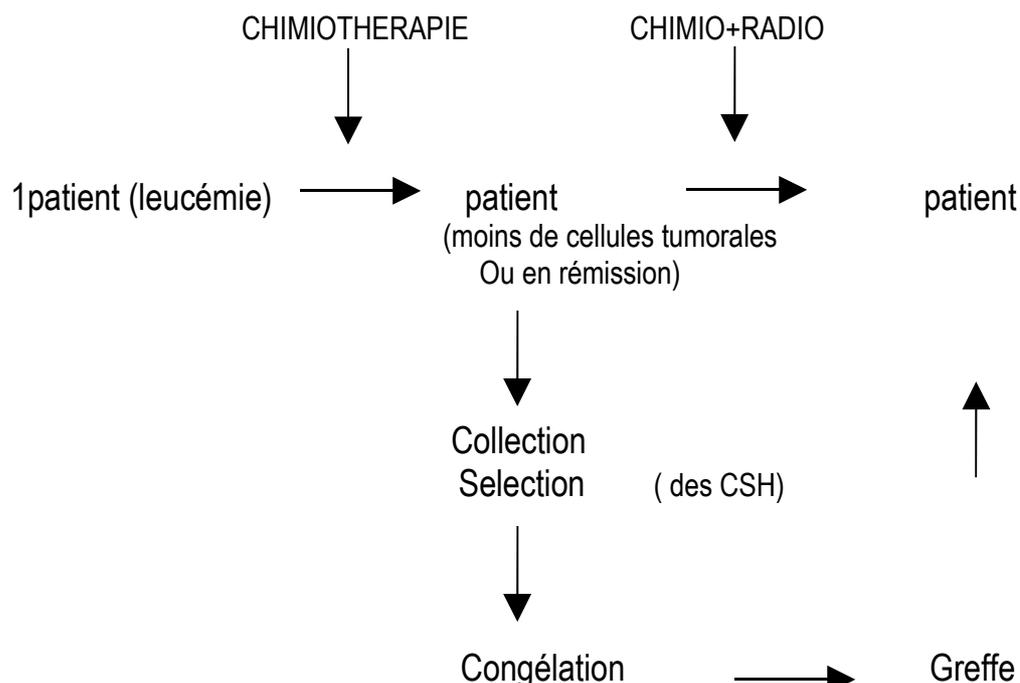
1988= 1ere greffe de sang de cordon (Gluckman)

1991= greffes de cellules CD34+

1995= greffes de cellules amplifiées

b) Principe

AUTOGREFFE



(permet de continuer de
Traiter le patient pendant ce temps)

- L'autogreffe des CSH dans le traitement des hémopathies malignes ou de certains cancers.
- Prélèvement du greffon surtout par cytophérèse
- Intérêt : on peut proposer des chimiothérapies à fortes doses car même si ces chimio détruisent une partie des CSH (état d'aplasie=hématopoïèse affaiblie) et rend le patient vulnérable aux infections ; le fait de leur redonner leur propres CSH (autogreffe) parfaitement normales dans le cas de cancers solides, permet de les faire sortir de l'état d'aplasie (après la chimio à forte dose ayant détruit les cellules tumorales). Ainsi après avoir détruit les cellules tumorales et provoqué l'état d'aplasie on restaure la moelle osseuse aplasique .

Dans les tumeurs solides le bénéfice est surtout la protection de l'hématopoïèse.

- En hématologie (tumeur atteint la moelle comme dans les myélomes) il y a un intérêt supplémentaire: le greffon contient les CSH qui permettent de sortir de l'aplasie, mais aussi de ses propres lymphocytes pouvant détruire les quelques cellules tumorales résiduelles.

Dans les hémopathies il ya donc un double intérêt.

ALLOGREFFE

Il n'y a pas de congélation : on prélève le donneur et on greffe sur le patient ayant suivi un traitement de radiothérapie et de chimiothérapie.

- Réserve aux hémopathies malignes (pas les cancers solides)
- Intérêt : l'effet **GVL**(greffe contre leucémie) grâce aux CSH et lymphocytes.
- Problème : d'effet GVH= dans la reconstitution hématopoïétique il y a un conflit permanent entre donneur et receveur, conflit immunologique
- Nécessite du groupage et de la compatibilité HLA (d'abord rechercher dans la famille)

c) sources des CSH

• **Moelle osseuse (dans les os plats)**

Dans la moelle les CSH sont logées dans la niche hématopoïétique (collées aux cellules stromales, fibroblastes, adipocytes) et à l'état basale n'ont aucune raison de sortir de cette niche.

Le prélèvement médullaire se fait sous anesthésie générale à travers les os iliaques.

Il faut faire 150 prélèvements différents sur chaque crête iliaque et l'on obtient 1L à 1.5L de moelle osseuse.

- **Sang périphérique**

A l'état basal les CSH ne circulent pas dans le sang il faut donc les faire sortir de leur niche pour ensuite les prélever dans le sang= technique de **cytaphérèse**

2 techniques

- Utilisation de facteur de croissance chez donneur sain pendant 5jours qui va cliver les liaisons des CSH avec le stroma et de les faire sortir dans le sang (allogreffe)
- Utilisation de facteur de croissance + chimio dans le cas d'une autogreffe

Avantages du prélèvement sanguin :

- ❖ Collection facilitée par cytaphérèse , pas d'anesthésie générale
- ❖ Récupération hématopoïétique + rapide, durée d'hospitalisation +courte, moins de transfusions
- ❖ Seulement 300ml mais concentration de CSH et globules blancs très forte

- **Sang de cordon ombilical**

Après l'accouchement !

Traite de cordon ombilical(presser le cordon) dans les 2minutes .

Avantages :

- ❖ Banques de sang de cordon, grand nombre de donneurs potentiels
 - ❖ Cellules immatures donc capacité de prolifération + importante (meme si moins de volume et moins de cellules au départ)
 - ❖ Immaturité des cellules immunocompétentes(lymphocytes du cordon) donc moins de problème de compatibilité HLA , moins de **GVH**(greffe versus hôte)
- Note= le GVH est la réaction immunitaire (suite a la greffe de moelle qui contient des globules blancs)par les lymphocytes du donneur qui attaquent les cellules du receveur.

Dans le cas de l'allogreffe de moelle ou de cellules périphériques il faut des donneurs parfaitement HLA compatibles . Avec le sang de cordon on peut descendre plus bas dans la compatibilité HLA.

Inconvénients :

- ❖ Quantité limitée=100ml
- Concerne d'abord les greffes pédiatriques mais possibilité chez l'adulte .

d) Méthodes de sélection du greffon

- Technique immunologique
- On fait une incubation du greffon avec un anticorps spécifiquement dirigé contre le marqueur CD34 couple à une microbille magnetique.on place le tout sur une

colonne aimantée qui attire seulement les cellules avec les anticorps, ne retient que les cellules CD34+ .

Ainsi on obtient CSH ultra pures(moins d'effet GVH car pas de lymphocytes mais rechute plus importante car pas d'effet GVL non plus)

➤ Technique chimique

Incubation des CSH avec des agents chimiothérapeutiques ! (réservé à des protocoles d'autogreffes spécifiques)

But : détruire ex-vivo dans des poches de culture, les quelques cellules tumorales résiduelles qui auraient pu entraîner une rechute si on les avaient injectées telles quelles.

Puis on réinjecte.

e) **Contrôle du greffon**

➤ Contrôle par numération classique des cellules

➤ Contrôle la viabilité des cellules

➤ Etude phénotypique des cellules souches et quantification

Par numération des cellules CD34+ (cytométrie de flux)

➤ Etude fonctionnelle des cellules souches (leur capacité à se différencier in vivo)

A partir de cultures clonogéniques in vitro

Réapparition de globules blancs et plaquettes en post greffe a partir de J25-J30

II) Thérapie cellulaire et insuffisance cardiaque

L'insuffisance cardiaque sévère concerne beaucoup plus de patient que les hémopathies malignes !

500000 patients et 1200000 nouveaux cas par an en France

Les options thérapeutiques sont La transplantation cardiaque (probleme HLA et liste d'attente)

Les traitements médicamenteux (bêta bloquants)

Thérapie cellulaire avec pour buts de remplacer le tissu nécrotique par des cellules vivantes, redévelopper les phénomènes contractiles, créer une nouvelle vascularisation

2voies d'injection : cathéter ou injection in situ(thoracotomie)

Différentes options de cellules :

Pour créer un nouveau tissu on pourrait prélever des cellules musculaires squelettiques qui sont contractiles, des progéniteurs cardiaques (qu'on ne connaît pas...) ou d'autres cellules comme les CSH qui synthétisent beaucoup de facteurs de croissance et participent la vascularisation mais ne donnent pas de nouveaux cardiomyocytes.

a) cellules musculaires squelettiques(CMS)

Elles sont faciles à obtenir par biopsie.

But : injecter les progéniteurs =les myoblastes(1 milliard au bout de 2-3 semaines) pouvant redonner des cellules musculaires normales au fur à mesure.

On n'injecte pas des cellules musculaires matures de 3cm de long !

Protocole :on réalise une biopsie musculaire dans la cuisse puis découpage, éminçage(99 % de cellules éliminées), expansion des myoblastes(1%) et réinjection dans la zone nécrosée sans que les myoblastes se soient transformées en cellules différenciées.

Essai clinique de phase I : concerne les patients souffrant d'insuffisance cardiaque sévère avec une fraction d'éjection inférieure à 35%,avec une indication de pontage dans la zone revascularisable par pontage.(injection de cellules dans la zone non revascularisable par pontage)

suit une petite animation sans importance sur le déroulement de la biopsie.

Les cellules injectées ne migrent pas il faut donc faire une trentaine d'injections .
Le taux de mortalité des cellules injectées est très important seulement 10% pourront se différencier.

Echo : en pré-injection on observe un muscle qui n'est plus contractile, d'une finesse pathologique. Après injection on observe une reprise de la contractilité du muscle dans la zone d'injection des cellules.

Radio(PET-SCAN) : même conclusion, avant injection il n'ya plus de flash et après 2mois le flash réapparaît dans la zone d'injection.

Résultats= difficiles à interpréter car on ne sait pas quelle est la part de réussite de la thérapie cellulaire sachant qu'un pontage (grande efficacité) a été fait.

D'où la mise en place d'un protocole MAGIC :

- Inclusion d'un plus grand nombre de patients=300
- 3groupes de doses(1faible dose,1forte dose de cellule et 1placebo)
- Pas plus d'effets indésirables que l'autre protocole

Résultats : Pas d'amélioration de la fraction d'éjection ventriculaire=pas d'amélioration fonctionnelle cardiaque

Amélioration nette significative du volume ventriculaire

b) cellules souches mésenchymateuses(CSM)

- Situées dans la niche hématopoïétique= rôle majeur dans l'hématopoïèse
- Rôle majeur dans la régulation de la masse osseuse
- Capacité de différenciation importante in vitro (on pourra faire des cellules osseuses, cartilagineuses, musculaires à partir de ces cellules)

Essai clinique :dans l' **orthopédie** dans le cas de grandes pertes osseuses.

On observe que dans un traitement classique par du corail, le corail s'élimine au fil du temps ainsi il n'y a pas de recolonisation osseuse. Si on place les CSM dans le corail avant la greffe, on observe une différenciation en cellules osseuses et donc une reconstitution presque complète des pertes osseuses.

Dans les **greffes de CSH** : on coinjecte des CSH et CSM afin d'améliorer la vitesse de sortie d'aplasie. Pas encore d'essais concluants. Une application est possible dans le cas des allogreffes en greffant les CSH et les CSM ou les CSM pourraient inhiber les lymphocytes du donneur et diminuerai le problème de GVH .On observe une amélioration de la survie des patients.

III) Réglementation de la thérapie cellulaire et génique

a) Textes réglementaires

- **Décret 2001** : Fixe les conditions d'autorisation des établissements, organismes ,procédés et protocoles d'essais cliniques. Réglemente l'ensemble des activités de thérapie cellulaire et génique. Intéret du décret est la mise en place d'un guichet unique : l'**AFSSAPS** qui organise le protocole d'autorisation.
- **Décret 1998** : Prélèvement, transport, transformation, conservation des CSH et des cellules mononuclées sanguines utilisées à des fins thérapeutiques.
- **Décret 2003** : Fixe les conditions de la biovigilance

b) L' AFSSAPS

Se charge de consulter les différentes instances impliquées dans la procédure d'autorisation

Schéma bilan

