

Médecine régénérative et cytothérapie *L'exemple des mésoangioblastes dans un modèle canin de myopathie dégénérative*

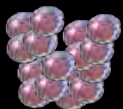


Laboratoire de Neurobiologie
Ecole Vétérinaire d'Alfort, Maisons-Alfort, France

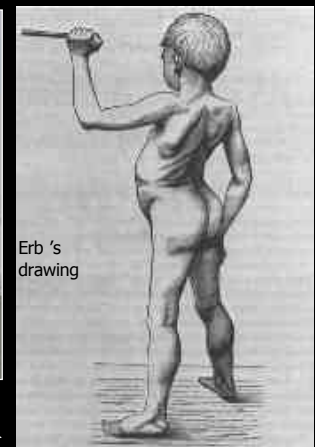
Biothérapies et Myopathies Canines

*Myopathie dystrophique
du Golden Retriever (GRMD)*

Myopathie de Duchenne



MDX



'guérir le chien pour guérir l'homme'

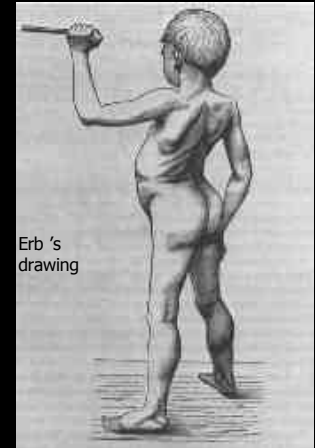
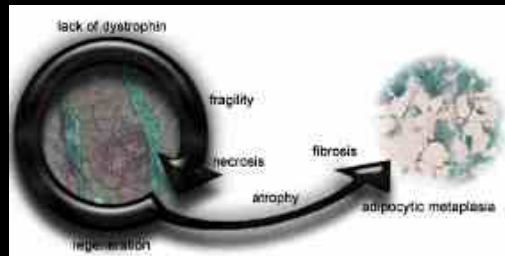
Myopathie de Duchenne

La maladie:

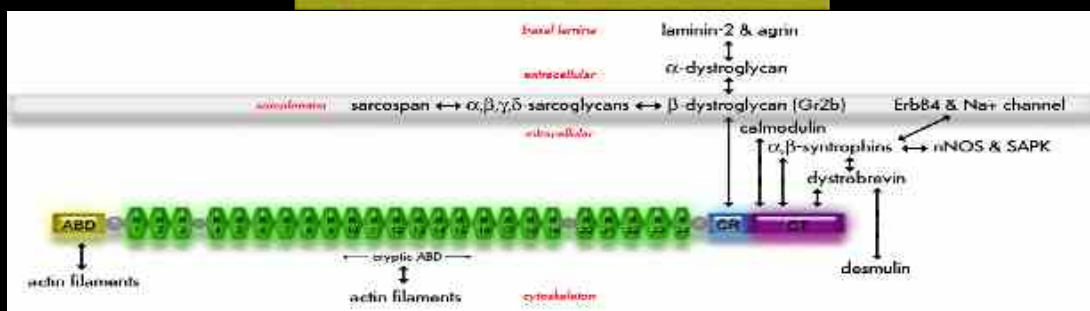
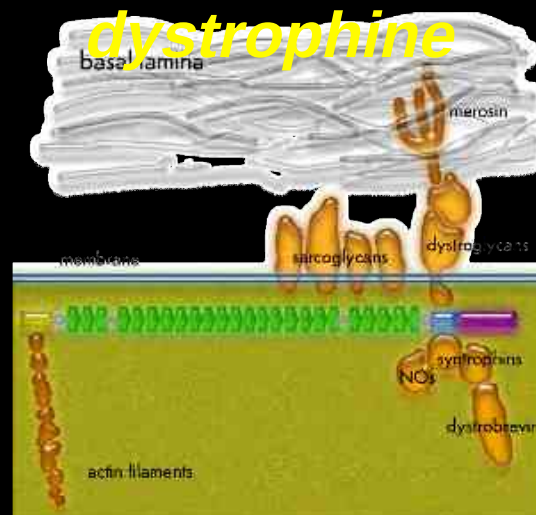
- Maladie génétique liée à l'**X** = déficit en dystrophine
- Myopathie très invalidante: espérance de vie 25 ans
- 1 garçon sur 3500

Mécanisme:

- Cycles de **nécroses/régénération**
- **Sénilité prématurée des cellules précurseurs musculaires**
- **Réparation imparfaite : fibrose, métaplasie adipeuse**

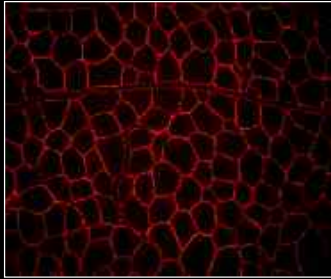


Localisation et fonction de la dystrophine



Histologie et immunohistologie

Dystrophin, *Dys2*, x 20



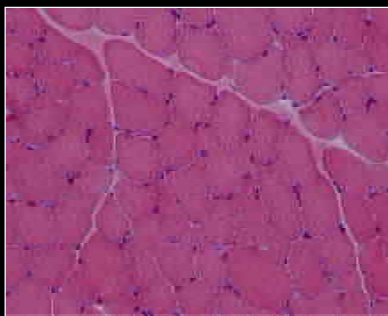
Sain



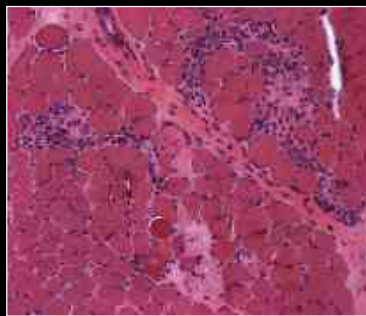
Malade

* Revertant fibers ~ 0,2%

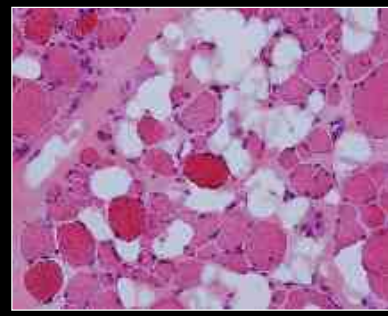
HE, x 20



Sain



Jeune malade



Malade adulte

Myopathie dystrophique du Golden Retriever (GRMD)



Objectifs des biothérapies pour DMD

- Cibler le muscle squelettique, le cœur et le diaphragme
- Passage aux cellules, muscle, membres, corps entier
- Age d'administration (prévenir, arrêter, récupérer)
- Degré important de correction (20-25% myofibers)
- Eviter la réponse immune

Faisabilité
Biosécurité
Toxicité
Relevance clinique



Les mésoangioblastes (MABs)

FACS:
CD44+
CD13+
CD34-
CD45-
CD117-

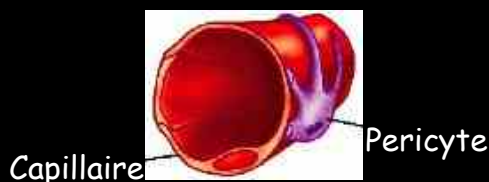
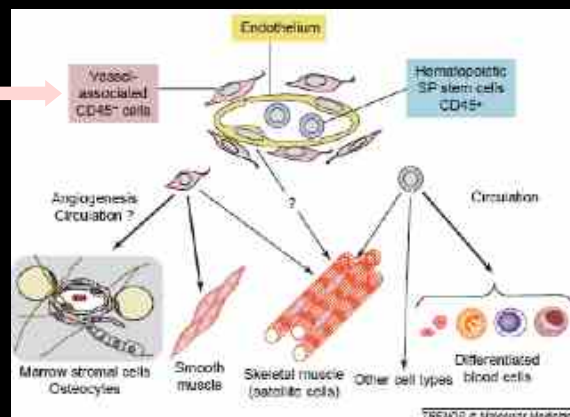


Table 1. The phenotype of different stem cells and their potential to contribute to muscle regeneration in dystrophic muscle

Stem cell	Source	Growth <i>in vitro</i>	Homolog to diseased muscle?	Myogenic differentiation induced by:	Effect in primary myopathy	Refs
Hematopoietic stem cells (SP)	Bone marrow	Limited	Yes	Co-culture with myogenic cells; Wnts; 5'-Aza-cytidine	Modest (<1%)	[27,29-32]
Multipotent adult progenitors	Bone marrow	Yes	Unknown		Unknown	[36]
Mesangioblasts	Small vessels	Yes	Yes	Co-culture with myogenic cells	Good (~30% of muscles downstream injected artery)	[37]
Endothelial myogenic progenitors	Muscle vessels	Limited	Unknown	Co-culture with myogenic cells	Unknown	[38]
Muscle-derived stem cells	Skeletal muscle	Yes	Yes	Low serum; standard myogenic culture	Good (>90% in injected area)	[36]
Synovial muscle stem cells	Synovial membranes	Yes	Yes	5'-Aza-cytidine	Modest (<1%)	[40]

L'utilisation des mésoangioblastes en thérapie cellulaire

Objectif

Evaluer la capacité des MABs canins à stopper ou faire régresser l'évolution de la dystrophie musculaire chez des jeunes GRMD, par injection intra-artérielle de cellules saines ou malades génétiquement modifiées.

Mesoangioblast stem cells ameliorate muscle function in dystrophic dogs

Maurilio Sampaolesi^{1,2,3,4}, Stéphane Blot^{1,2}, Giuseppe D'Antona¹, Nicolas Granger¹, Rossana Tonlorenzi¹, Anna Innocenzi¹, Paolo Mogno¹, Jean-Laurent Thibaud³, Beatriz G. Galvez¹, Ines Barthélemy³, Laura Porani¹, Sara Mantero¹, Maria Guttinger², Orietta Pansarasa², Chiara Rinaldi¹, M. Gabriella Cusella De Angelis², Yvan Torrente⁵, Claudia Bordignon¹, Roberto Bottinelli⁶ & Giulio Cossu^{1,2,7}

Nature, Vol 444, Nov 2006

L'origine des MABs canins

Group A : Greffe **allogène** de cellules saines (n=6)

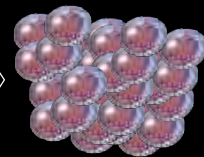
Golden Retrievers sains
âgés de 2 semaines



Biopsie du biceps fémoral

Mise en culture

MABs



FACS = CD44⁺/13⁺/45⁻



GRMD, 3-5 mois

~ 50 millions MABs, 5x IA injections (femoral/subclavian arteries)

Group B : Greffe **autologue** de MABs modifiés génétiquement (n=4)

GRMD âgé de 2
semaines

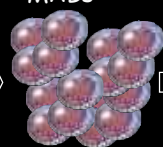


Biopsie du biceps fémoral



Mise en culture

MABs



FACS = CD44⁺/13⁺/45⁻

lentiviral vector
+ canine μ dystrophin

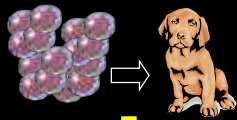


GRMD, 3-5 mois

Protocole d'administration

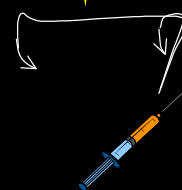
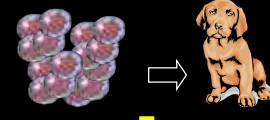
immunosuppression (cyclosporine ou rapamycine, corticoides)

5 Injections (1 fois par mois)



Artère fémorale, n=8

5 Injections (1 fois par mois)

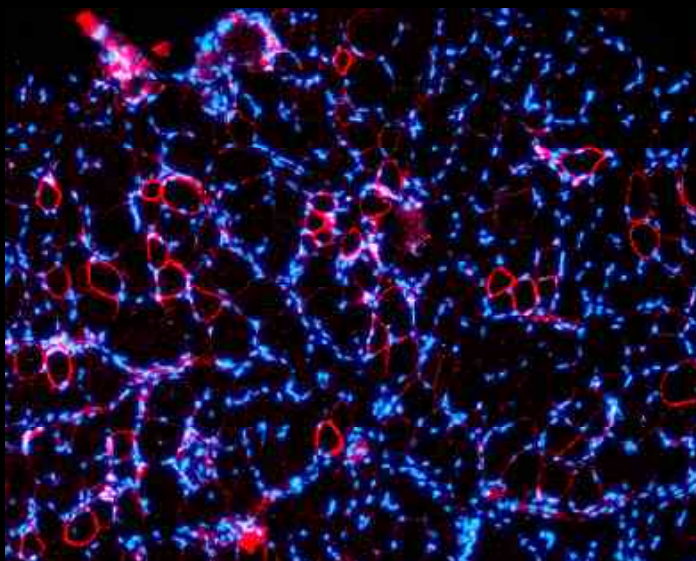


Artères fémorale + sub-clavian, n=2



MABs, histologie et étude fonctionnelle

Biopsies et force musculaire 1 mois
après la dernière injection



Muscle TC, greffe allogène, dystrophine (dys2™)

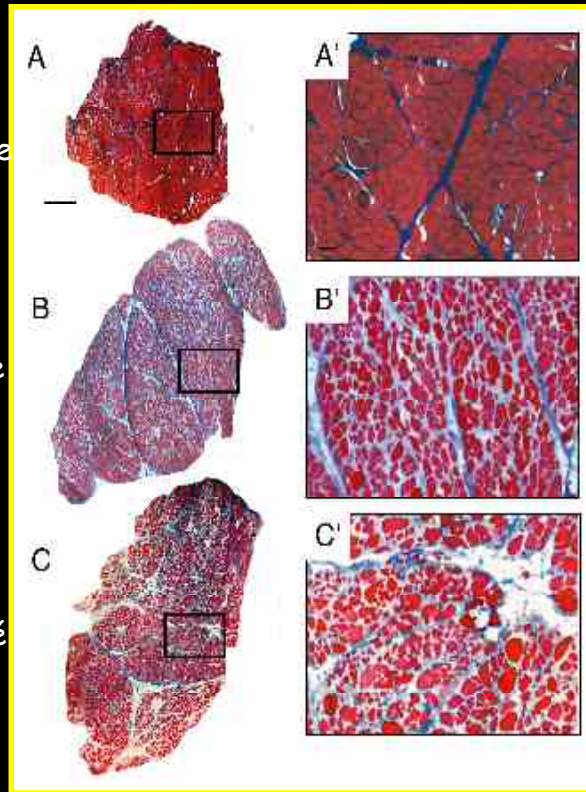


Evaluation histologique

Hétérologue
'Valgus'

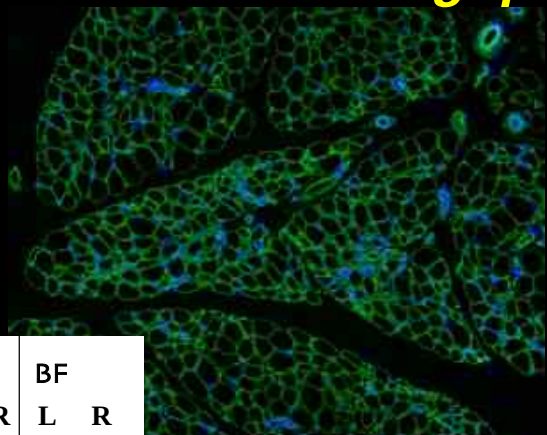
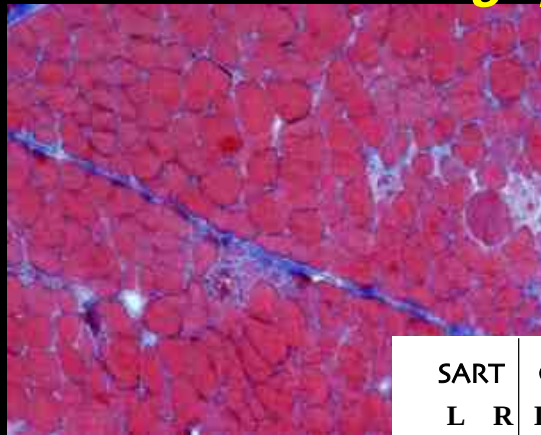
Autologue
'Vampire'

GRMD non traité



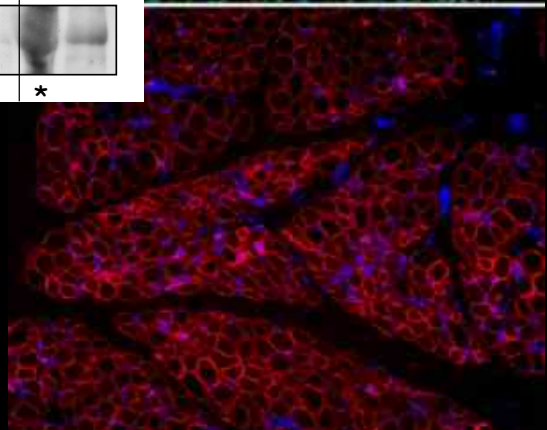
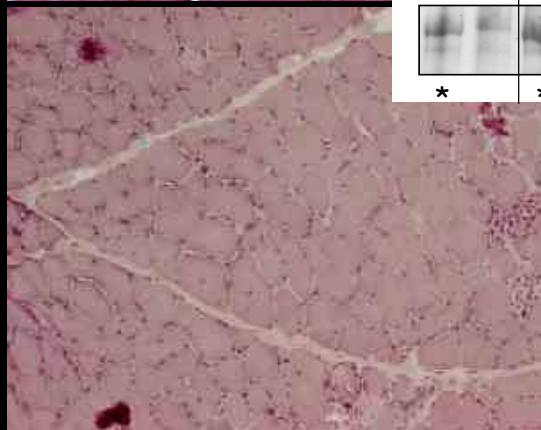
Modified Azan Mallory staining of TA

Résultats histologiques et immunohistologiques

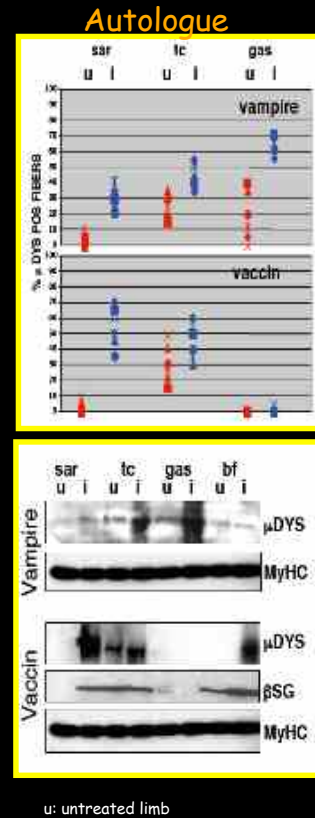
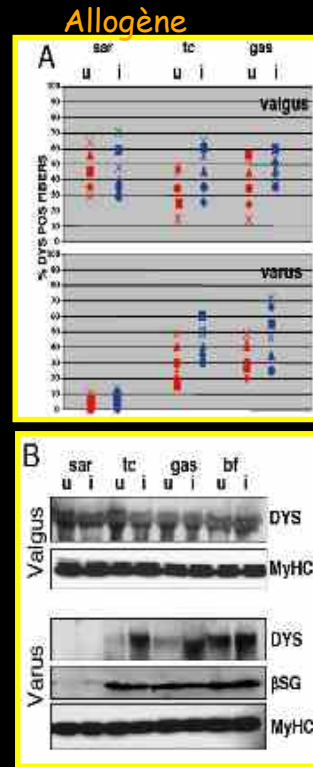
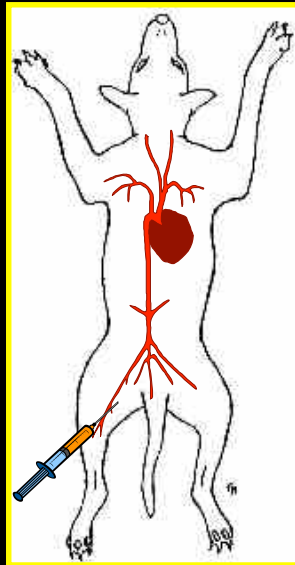


SART	GAS	TA	BF
L	L	L	L
R	R	R	R
*	*	*	*

Valgus
MABs
Allogènes

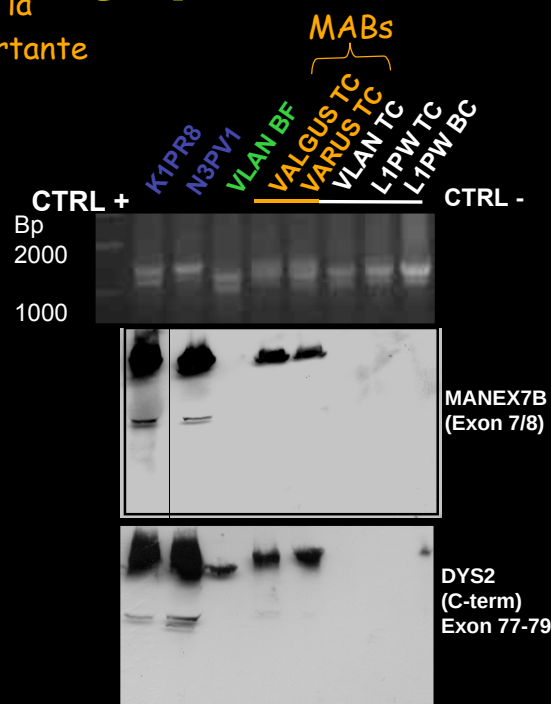
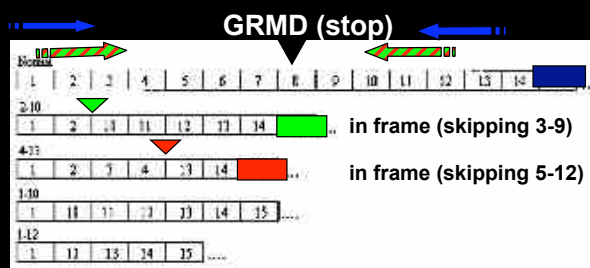


MABs, analyse immunohistologic



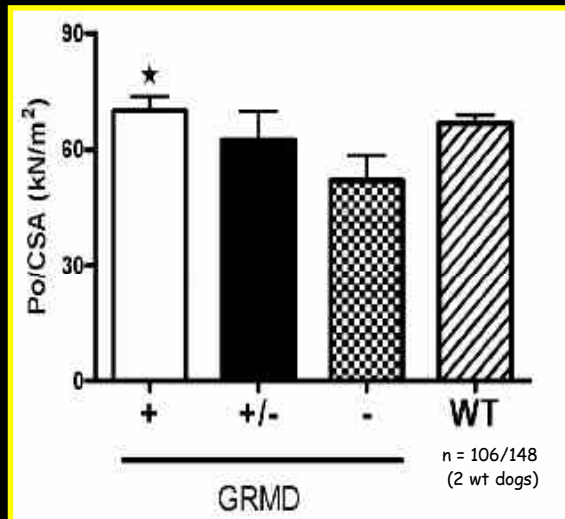
MABs, analyse immunohistologique

Utilisation d'un Ac spécifique pour distinguer la dystrophine complète de la dystrophine révertante

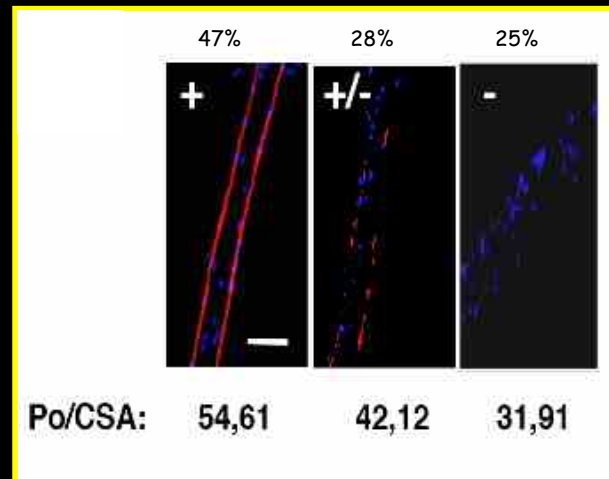


MABs, évaluation fonctionnelle : force sur fibre isolée

Analyse de force des fibres de type II



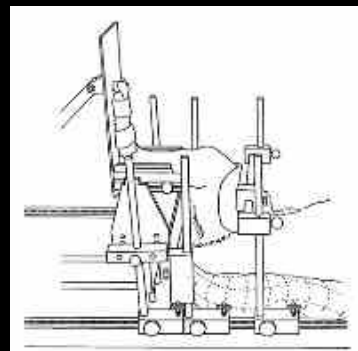
n = 71/199
(Valgus, Varus)



Valgus, TA droit

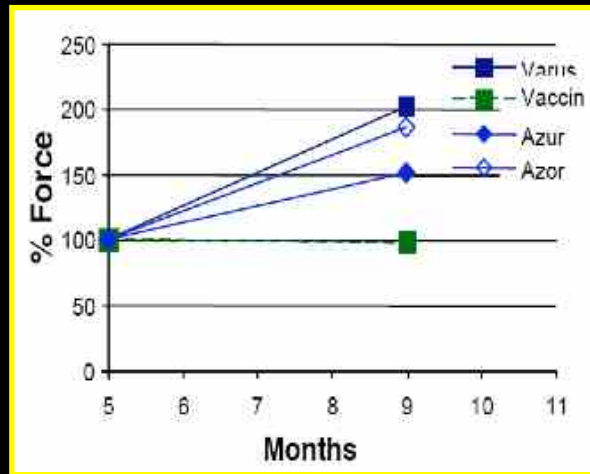
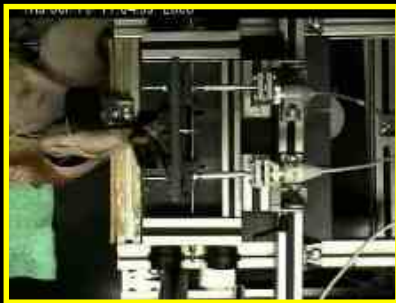
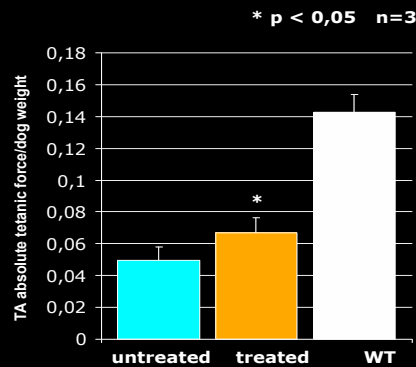
From Roberto Botinelli, Guiseppe D'Antona

MABs, évaluation fonctionnelle



by Paolo Mogno

MABs, évaluation fonctionnelle



Heterologous cells
Autologous cells
Heterologous cells
Heterologous cells

Incrément de la force musculaire du compartiment du tibial cranial du membre injecté versus non injecté.

From 'Mesoangioblast stem cells ameliorate muscle function in dystrophic dogs'. Nature 2006.

Les resultats cliniques des MABs



Azur (allogeneic transplantation) 10 mo of age (inset 4.5 mo, before treatment)

Mesoangioblast stem cells ameliorate muscle function in dystrophic dogs. Nat. 2006.

L'utilisation des mésoangioblastes en thérapie cellulaire

• Avantages

- Obtention et administration facile
- Innocuité
- Migration des cellules dans le site d'injection mais aussi dans d'autres muscles
- Efficacité et fonctionnalité

• Limites

- Variabilité inter-individuelle dans les résultats obtenus
- Nécessité d'une immunosuppression (sauf greffes autologues)
- Migration dans d'autres organes que le muscle : innocuité à long terme ?

L'utilisation des mesoangioblastes dans la thérapie cellulaire

Perspectives

- Augmenter le nombre de cellules injectées et le nombre de sites d'injections
- Potentialiser la migration des cellules dans le muscle. Outil scintigraphie.
- S'affranchir d'une immunosuppression en utilisant des MABs autologues corrigés ex vivo par saut d'exon thérapeutique



Collaborative network on canine myopathies



■ Transgene SA

Serge Braun (now AFM) plasmid
Thierry Huss
Christine Thioudellet
Nathalie Accart

■ Madison University

Jon Wolff (pathway^{IV})
Julia Hegge
Hans Herweijer



■ Institut Cochin



Jean-Claude Kaplan
France Leturcq
(LRMD)

■ EMI 00-11



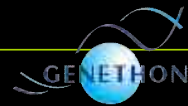
Romain Ghérardi
Patrick Dreyfus
(CNM)

■ U640 Inserm-UMR 8151 CNRS

Daniel Scherman
(Electrotransfert/plasmid)

Neurobiology laboratory

Inès Barthélémy
Ane Uriarte
Jean-Laurent Thibaud
Nicolas Granger
Carolina Carlos
Xavier Cauchois
Aurore Brindejont
Angélique Gouffier
Ingrid Gruyer
Emilie Monnet
Olivier Borie
Dimitrios Dazios
Isabelle Valchera
Stéphane Blot/Pierre Moissonnier
CCV, Maisons-Alfort
(MRI, CT-scan, scintigraphy)
Patrick Devauchelle
Pauline de Fornel-Thibaud
UMR INRA-ENVA Molecular Biol.
Laurent Tiret
Manuel Pelé
Jean-Jacques Panthier (CNM)
INSERM UMR 660 cardio.pharm.
(cardiomyopathie)
Luc Hittinger
Valérie Chetboul Jean-Louis Pouchelon
Alain Berdeaux



■ Généthon

Adeline Vulin
Aurélié Goyenvallé
Luis García (exon skipping)
Olivier Danos

■ Stem Cell Research Institut

Giulio Cossu (mesoangioblastes)
Maurilio Sampaolesi
A. Innocenzi
R. Tonlorenzi
Guiseppe D'Antona
Roberto Bottinelli

■ Institut de Myologie (AFM-CEA RMN)

Pierre Carlier

Supported by

