



Inserm



Effets de l'injection de cellules souches mésenchymateuses sur la microcirculation cérébrale après ischémie expérimentale

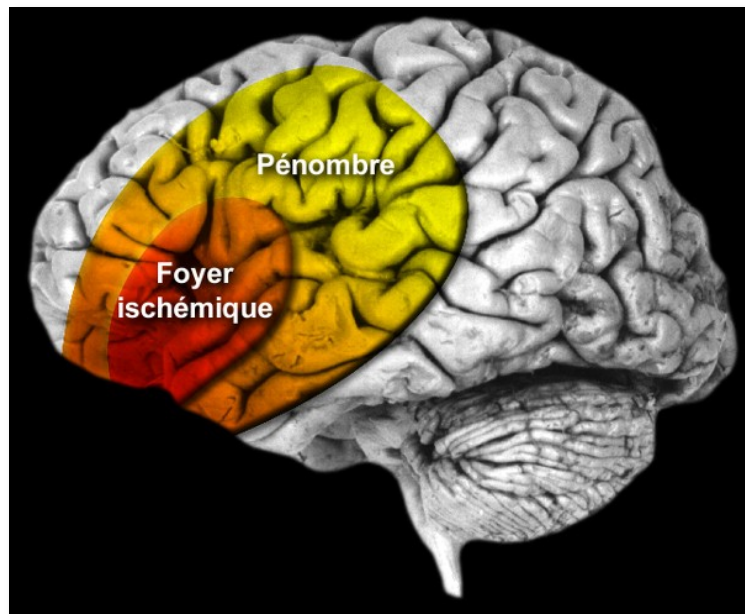
FAVRE I; MOISAN A; ROME C ; NAEGELE B; BARBIER E ; REMY C; DE FRAIPONT
F; RICHARD MJ, DETANTE O

Inserm U836, Grenoble Institut des Neurosciences/UJF
Unité mixte de Thérapie Cellulaire, CHU de Grenoble / EFS
Rhône Alpes
Unité Neurovasculaire, CHU de Grenoble

Inserm U823, Institut Albert Bonniot/UJF
UM Biochimie des Cancers et Biothérapie, CHU de
Grenoble

Accident vasculaire cérébral

- **Unité Neuro-Vasculaire** et mesures générales :
>>> 14 patients pour éviter 1 décès ou dépendance
- **Thrombolyse** IV (voire IA) : « *time is brain* »



- Neuroprotection décevante > **thérapie cellulaire**

Thérapie cellulaire et AVC

- **Amélioration de la récupération fonctionnelle chez l'animal** *Zhao et al., 2002 ; Zhang et al., 2004*
- **7 essais publiés chez l'homme** *Kondziolka et al., 2000, 2005; Savitz et al., 2005; Bang et al., 2005; Lee et al., 2010; Honmou et al., 2011; Savitz et al., 2011*
- **15 essais cliniques en cours** *clinicaltrials, 15/11/11*

Mécanismes d'action?

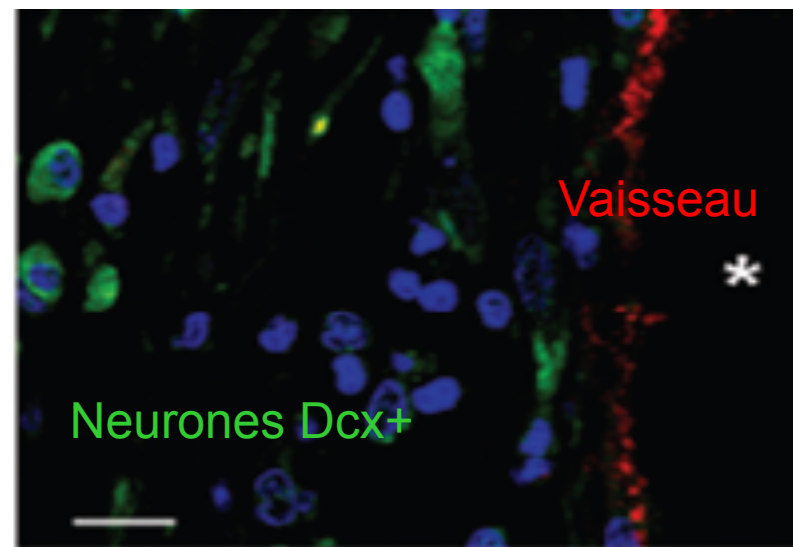
AVC, plasticité et thérapie cellulaire

- Processus cellulaires de plasticité cérébrale après un AVC
 - Angiogenèse, neurogenèse et synaptogenèse

Nudo *et al.*, *Science* 96 Jin *et al.*, *PNAS* 06

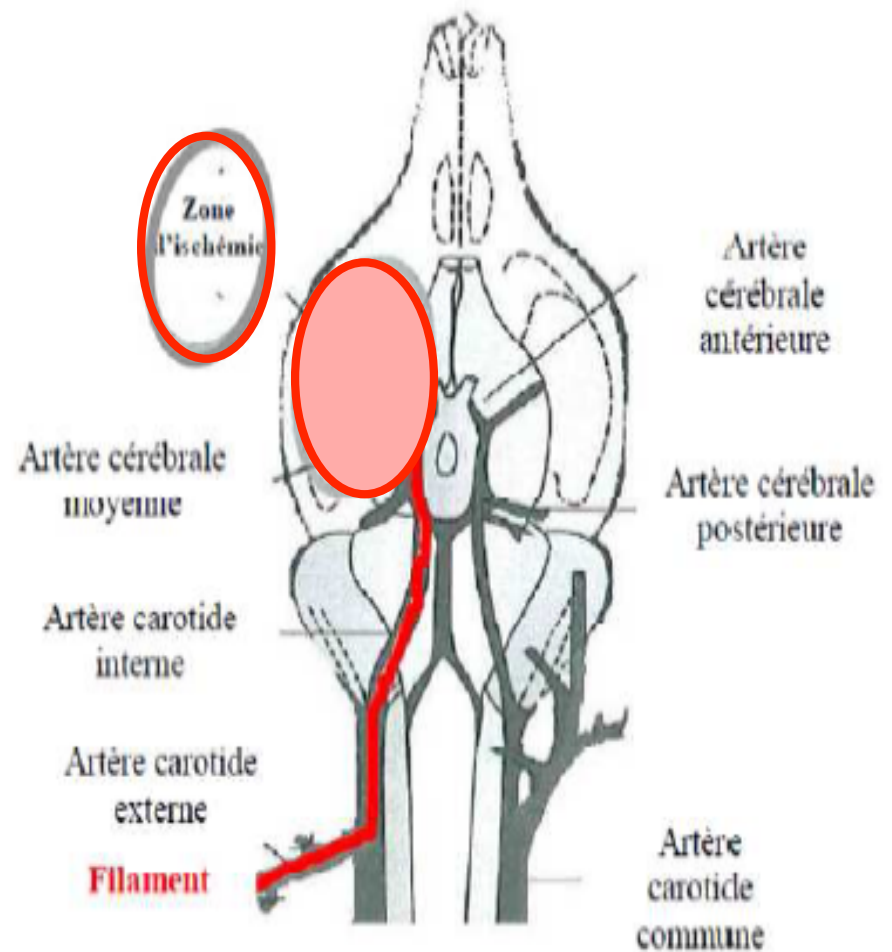
- Amplification de ces processus endogènes par la thérapie cellulaire
 - Effet neurotrophique
 - Pro-angiogénique

Borlongan *et al.*, *Pneurobio* 2011



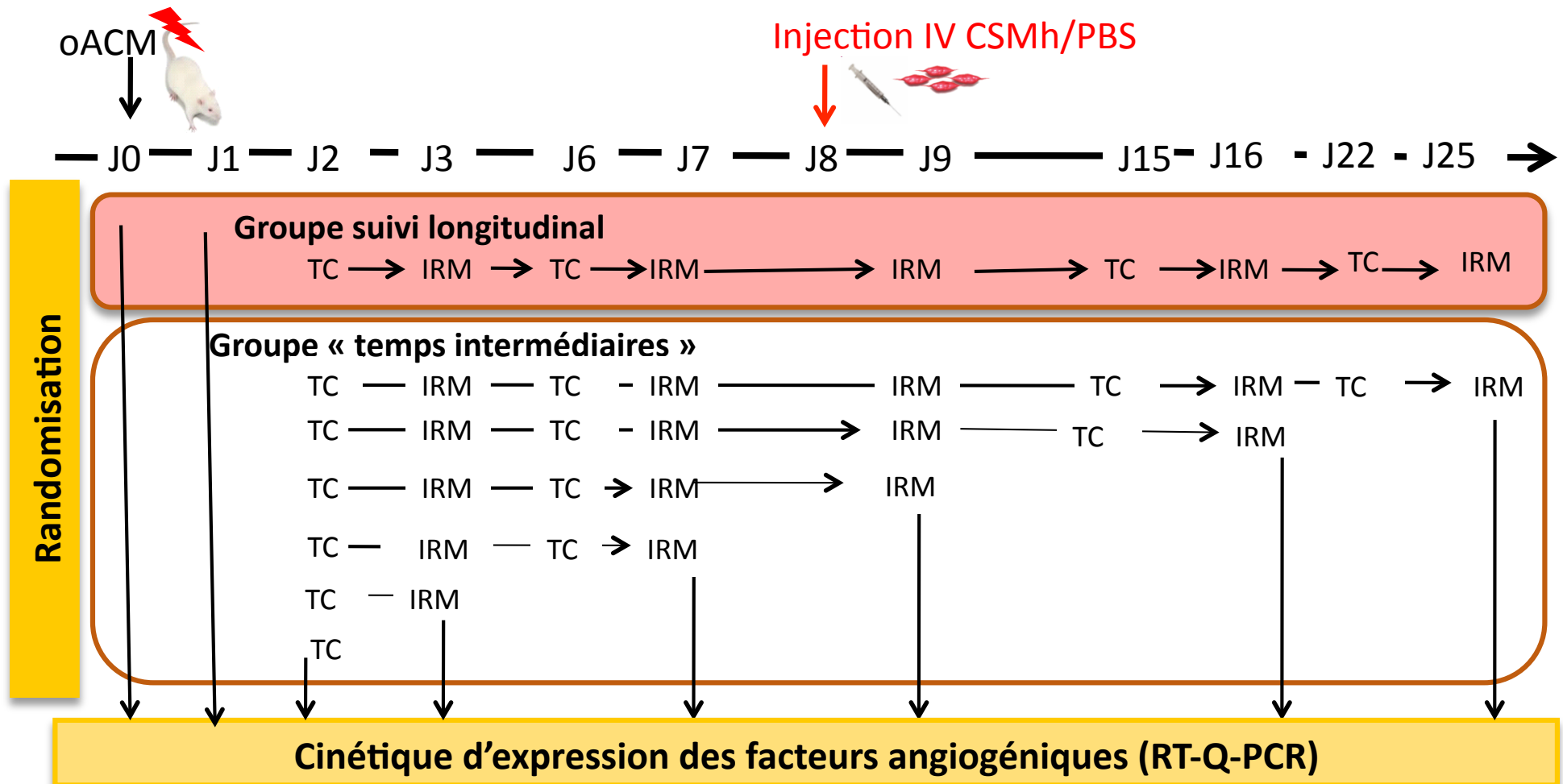
Matériels et méthode

- **Objectif**
 - Effet de l'administration **IV** de **CSMh en phase subaiguë (J8)** sur la **microcirculation cérébrale**
 - Modèle animal (rat) **d'ischémie cérébrale focale transitoire** (oACM 90 minutes)
- **4 groupes expérimentaux**
 - oACM CSMh (n=9)
 - Sham CSMh (n =5)
 - oACM PBS (n=8)
 - Sham PBS (n=5)



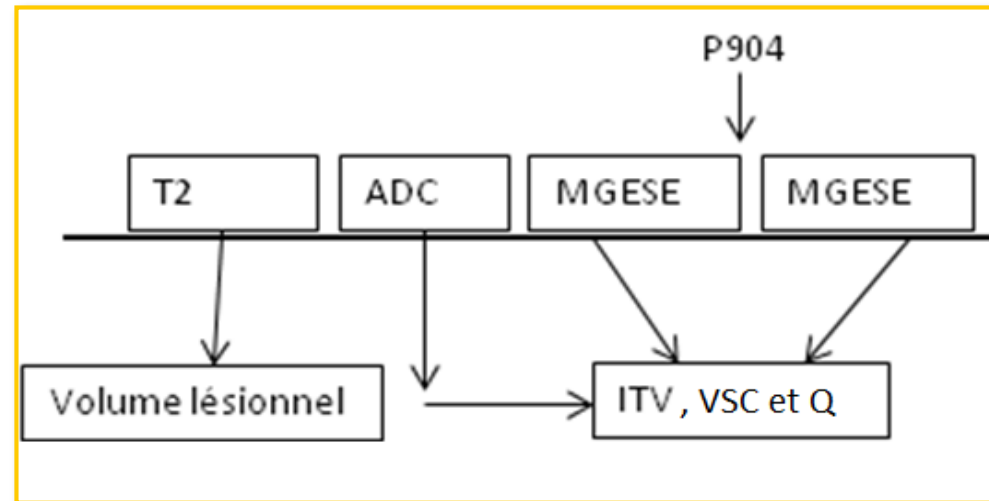
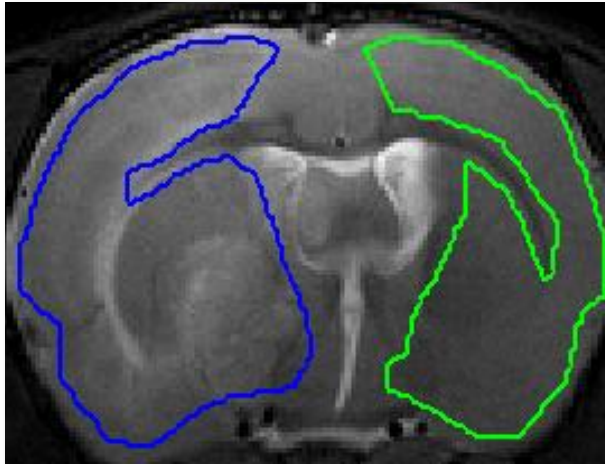
Longa *et al.*, 1989

Protocole expérimental : suivi 25 jours



TC = Tests comportementaux

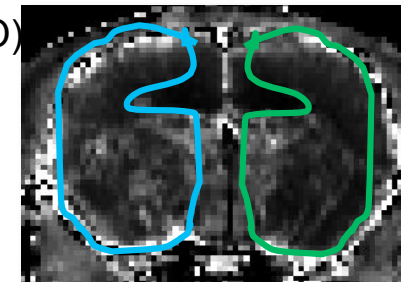
« steady state » IRM



$$\Delta R2^* = 1/T2^*_{\text{post injection USPIO}} - 1/T2^*_{\text{pré injection USPIO}}$$

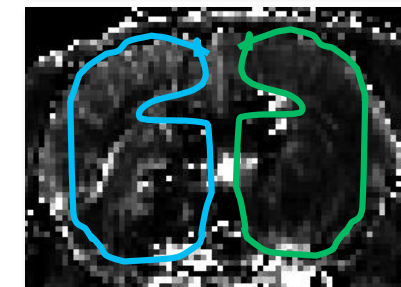
$$\Delta R2 = -1/TE \ln (\text{Signal post injection USPIO} / \text{Signal pré injection USPIO})$$

$$\text{VSC (\%)} = \frac{3}{4} (\pi) \Delta R2^* / (\gamma \Delta \chi B0)$$



VSC
Volume Sanguin
Cérébral total

$$\text{ITV (\mu m)} = 0.424 (D / \gamma \Delta \chi B0)^{1/2} (\Delta R2^* / \Delta R2)^{3/2}$$

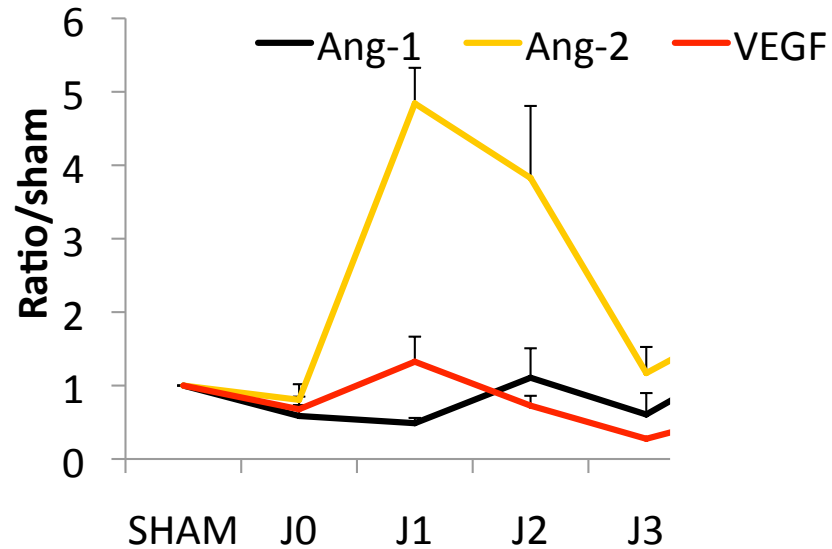


ITV
Index Taille de
Vaisseaux

$$\text{Densité vasculaire Q} = (\Delta R2 / \Delta R2^*)^{2/3}$$

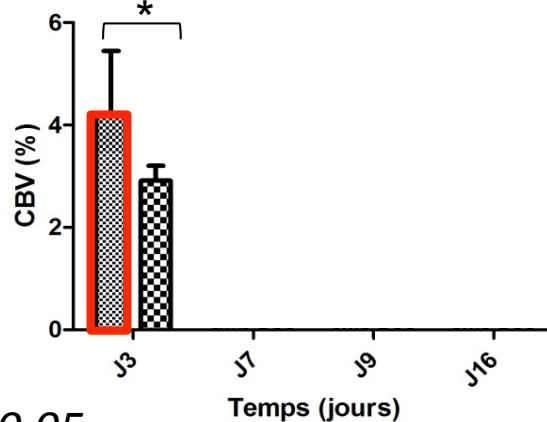
Evolution naturelle de l'ischémie cérébrale

RT-Q-PCR hémisphère ipsilatéral, n=3

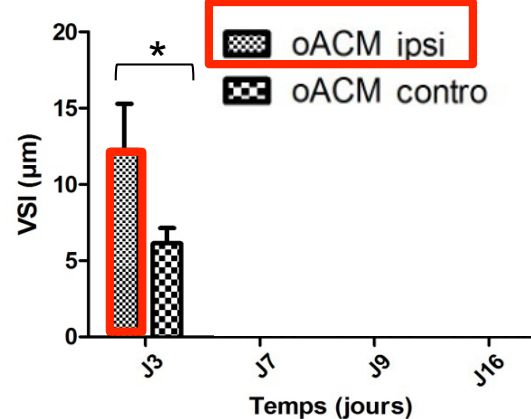


IRM de la microvascularisation, n=4

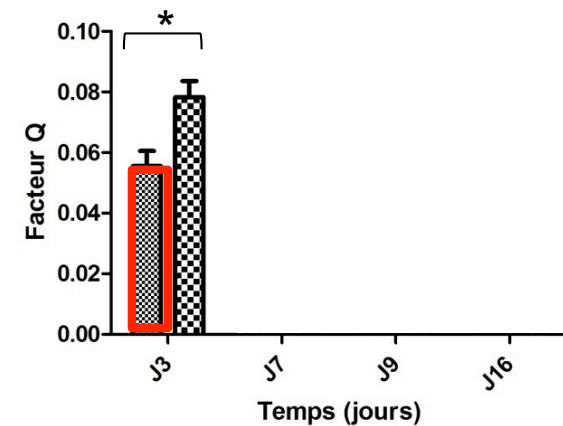
Volume sanguin cérébral



Diamètre des vaisseaux



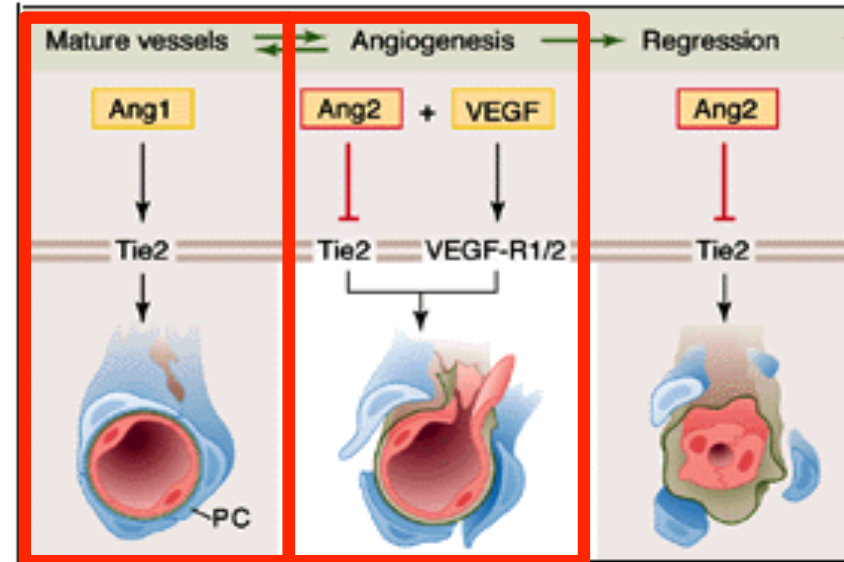
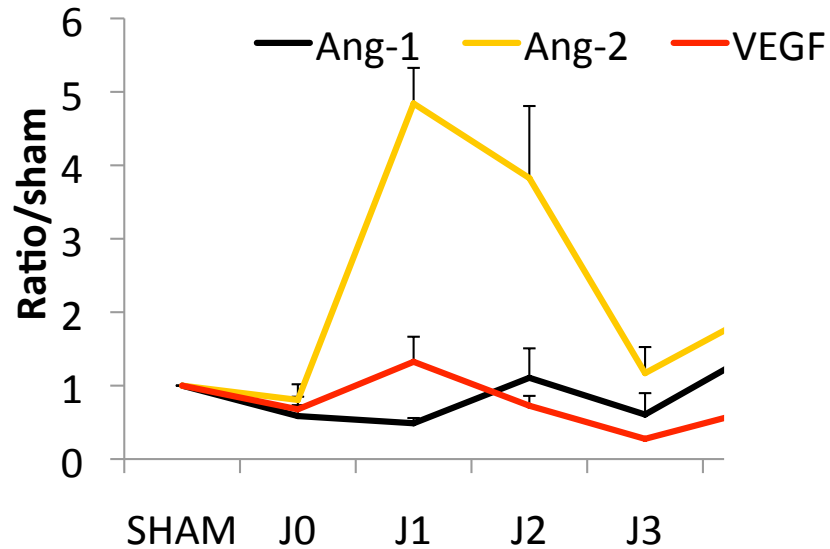
Densité vasculaire



* $P < 0.05$

Evolution naturelle de l'ischémie cérébrale

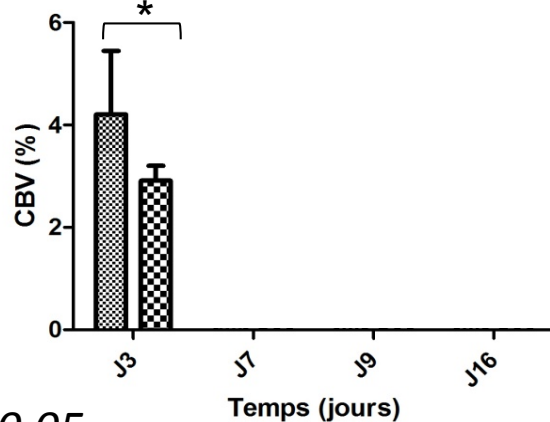
RT-Q-PCR hémisphère ipsilatéral, n=3



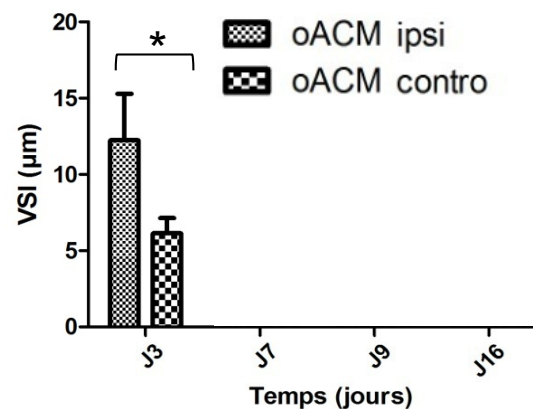
D'après Hanahan et al, Science, 1997

IRM de la microvascularisation, n=4

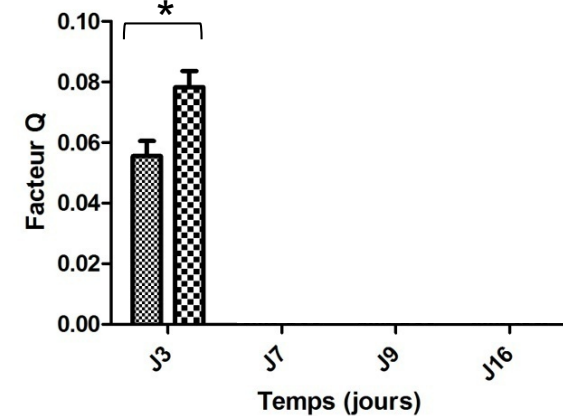
Volume sanguin cérébral



Diamètre des vaisseaux



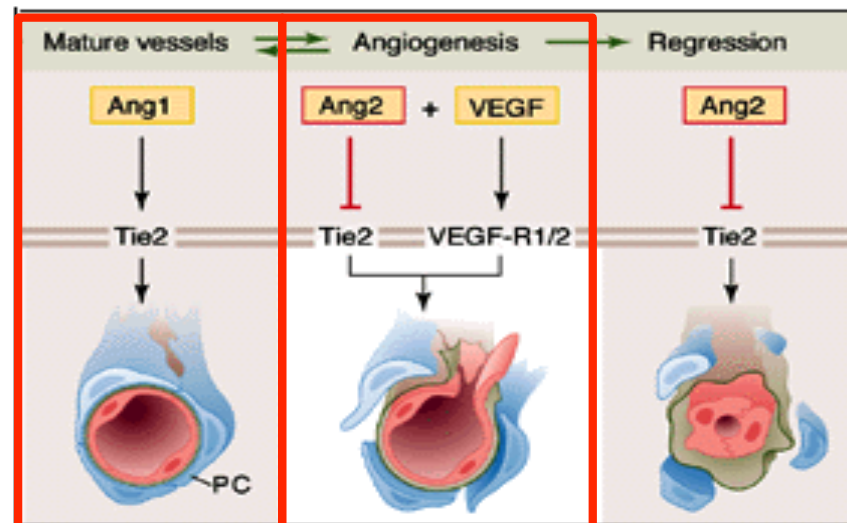
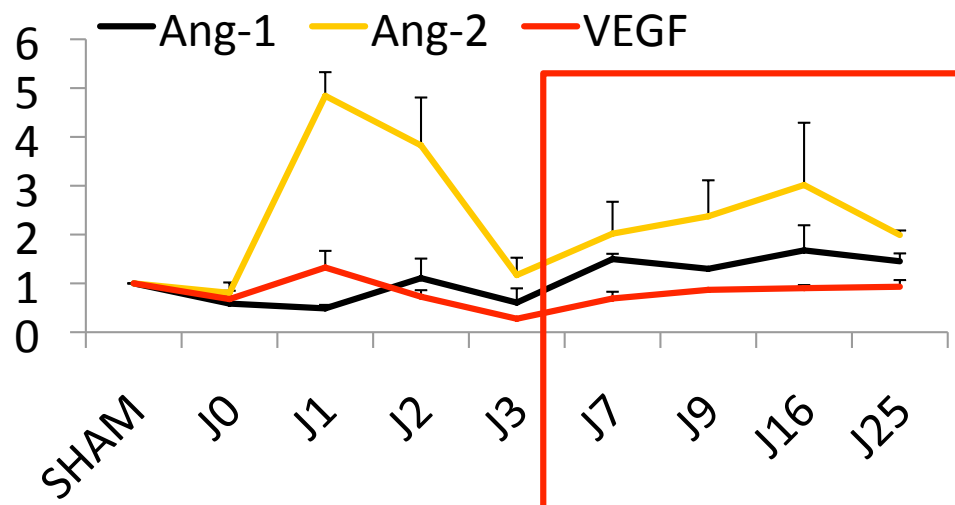
Densité vasculaire



* $P < 0.05$

Evolution naturelle de l'ischémie cérébrale

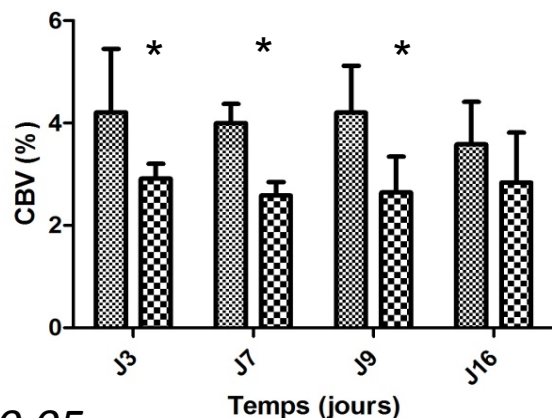
RT-Q-PCR, hémisphère ipsilatéral, n=3



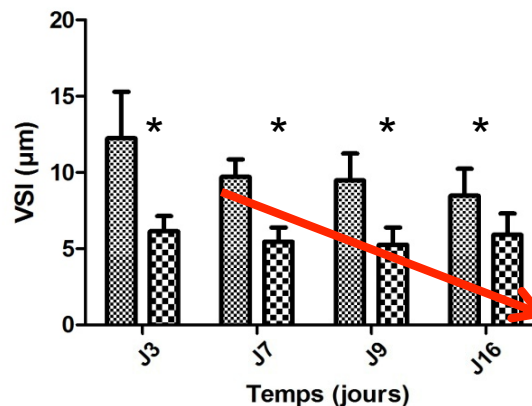
D'après Hanahan et al, Science, 1997

IRM de la microvascularisation, n=4

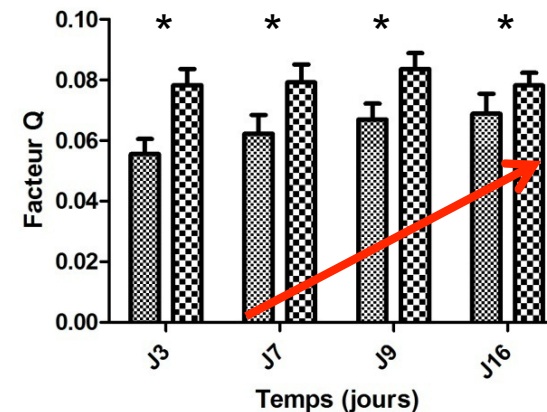
Volume sanguin cérébral



Diamètre vaisseaux



Densité vasculaire

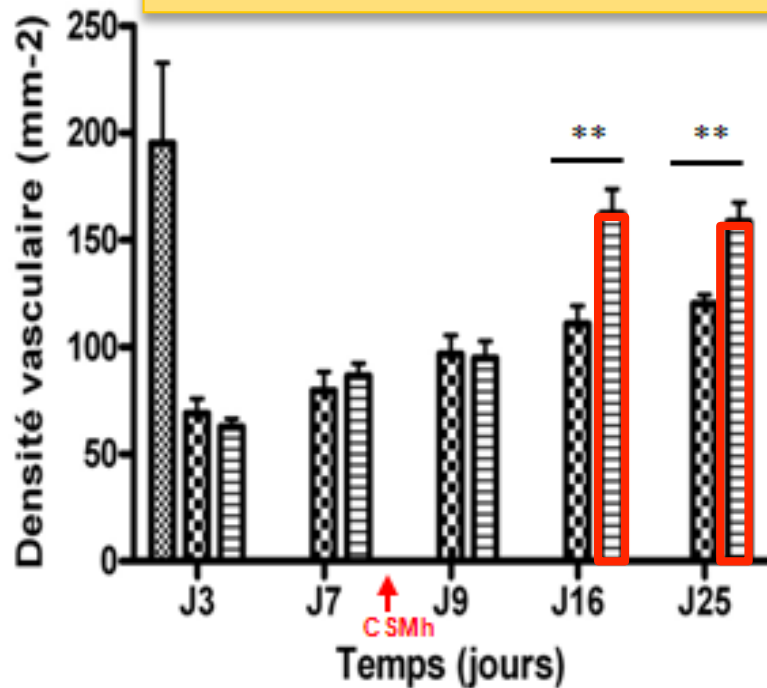


*P<0.05

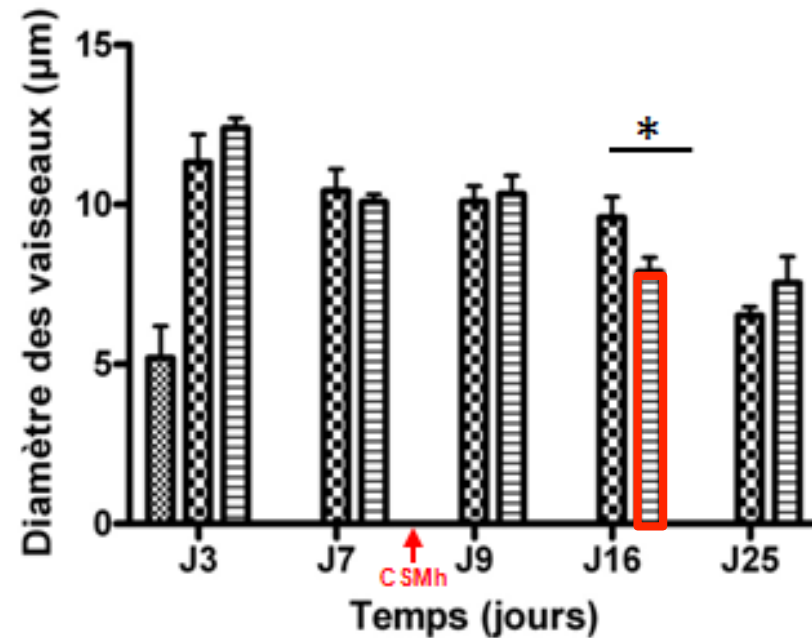
Après injection de CSMh...

Sham (n=5) oACM-PBS (n=8) oACM-CSM (n=9)

Densité microvasculaire



Diamètre des vaisseaux



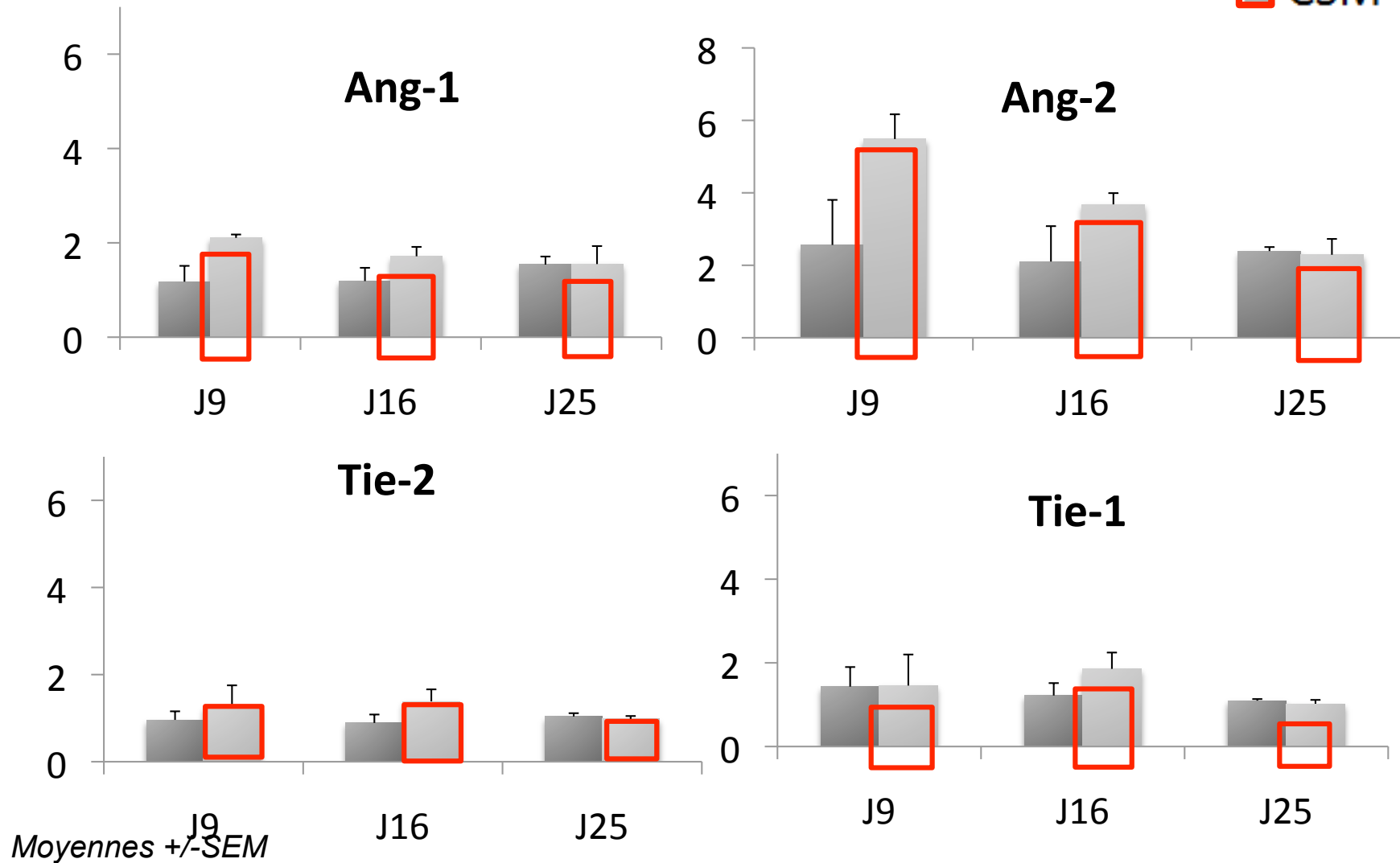
Stimulation de la micro-angiogenèse endogène

Moyenne +/- sD, * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ - T test

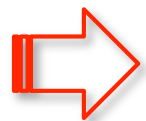
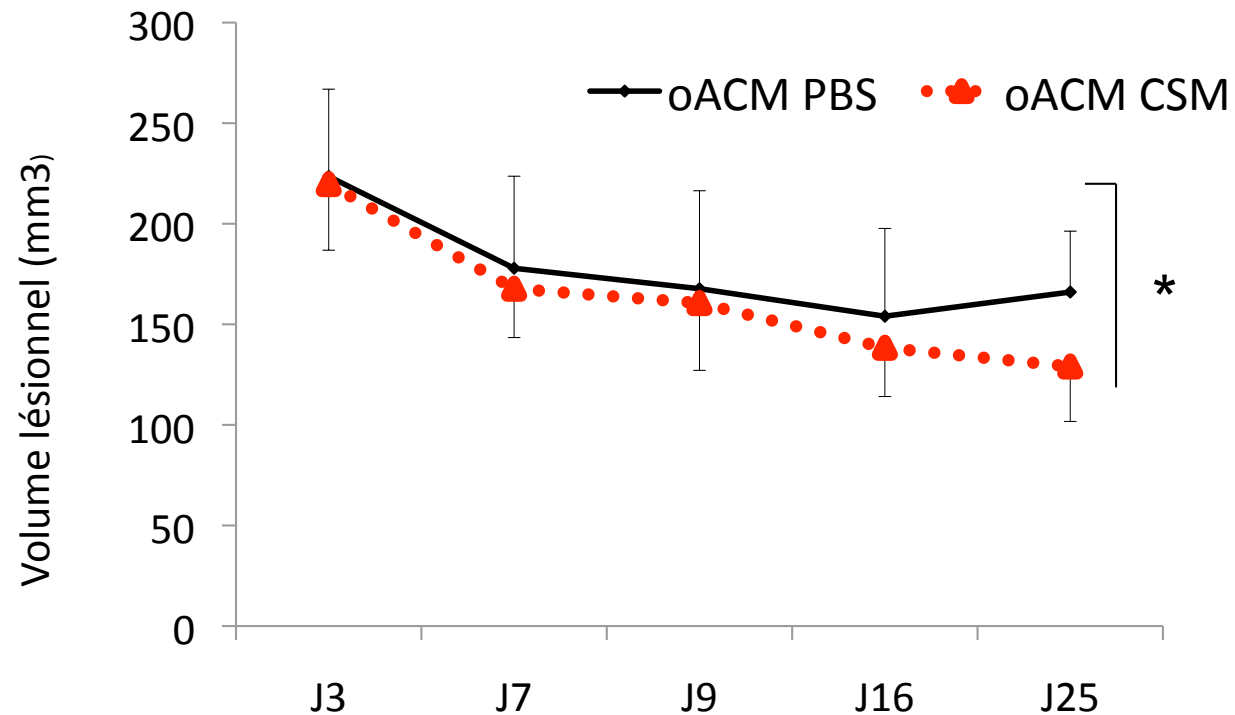
Après injection de CSMh...

RT-Q-PCR, hémisphère ipsilatéral, n=3

■ PBS
□ CSM



Evolution du volume lésionnel

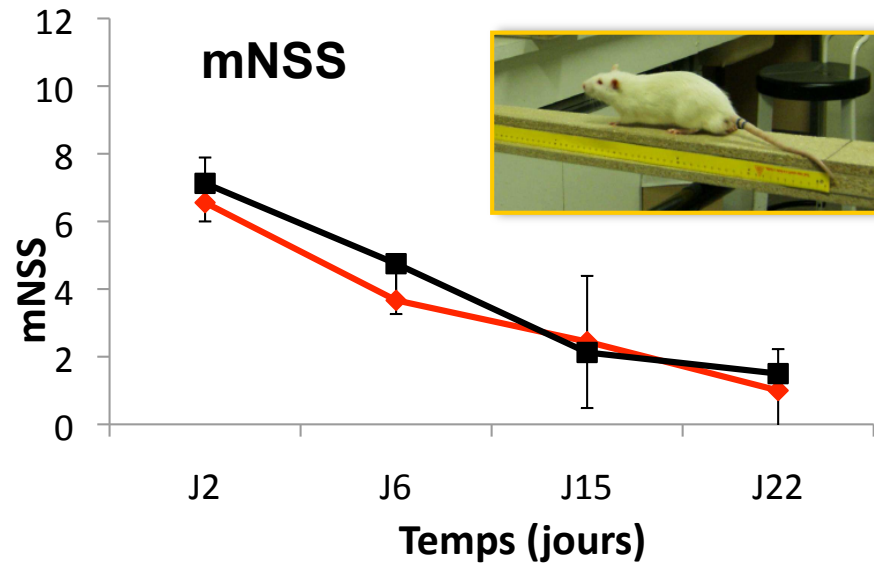


Réduction du volume lésionnel

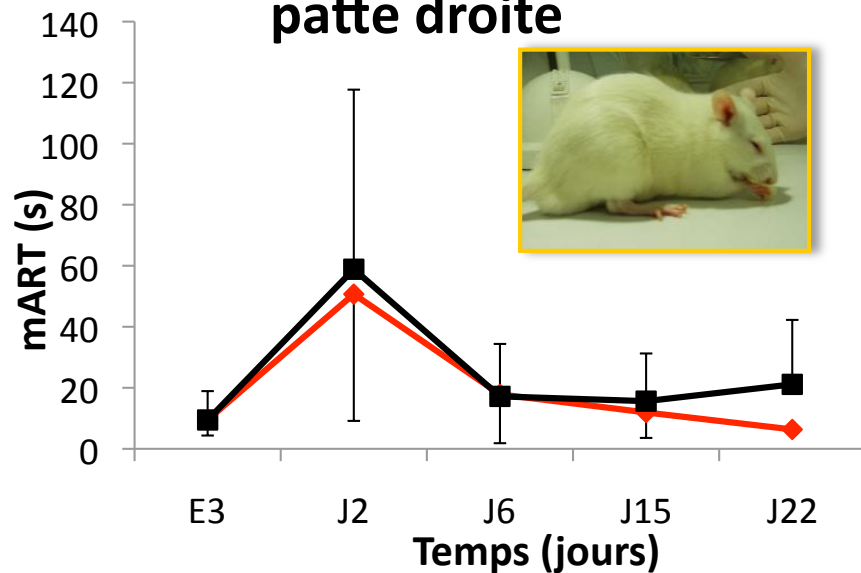
Récupération fonctionnelle

- Absence d'effet aggravant
- Peu d'effet fonctionnel **sur la durée du suivi**

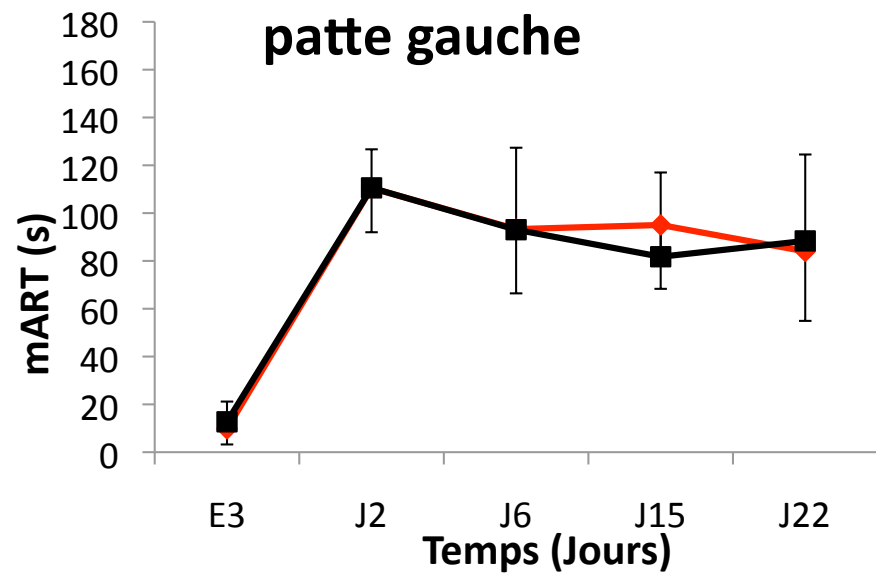
◊ oACM CSM
■ oACM PBS



Test de retrait d'adhésif patte droite



Test de retrait d'adhésif patte gauche



En conclusion...

Après injection de CSMh en phase subaigüe de l'ischémie cérébrale

- Surexpression des Angiopoïétines et de leurs récepteurs
- Stimulation de l'angiogenèse endogène
 - Restauration d'une microcirculation fonctionnelle
- Réduction du volume lésionnel

Stimulation de l'angiogenèse = Source potentielle d'optimisation de la thérapie cellulaire



MERCI!

GIN U 836 Equipe 5 et plateforme IRM préclinique

A. Moisan, B. Naegele, O. Detante, E. Grillon
C. Rémy , E.L. Barbier, M Barbieux, N Coquery

Unité Mixte de Thérapie Cellulaire et Tissulaire / UM BCB

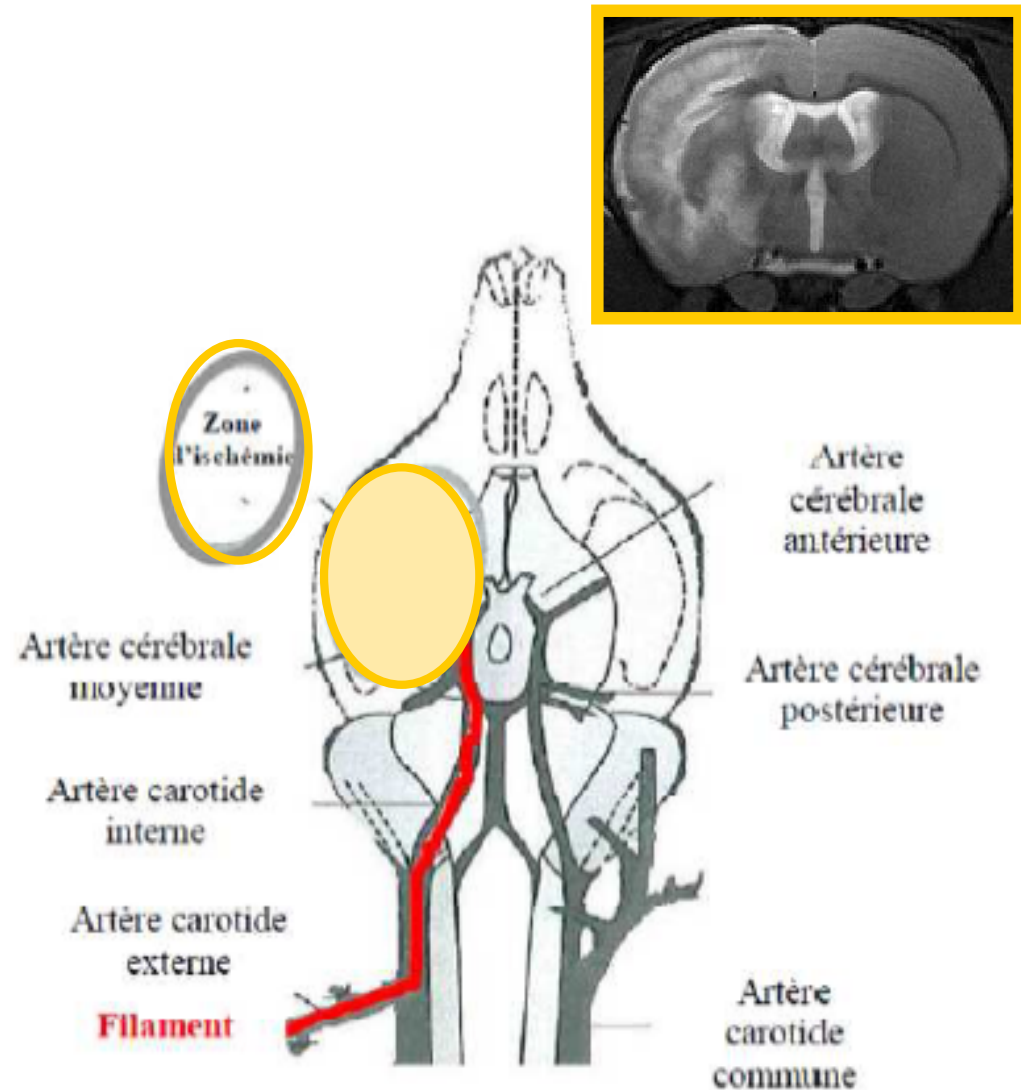
MJ. Richard, F. De Fraipont, C. Lucas, V Persoons,
H Egelhofer

Institut Albert Bonniot U823

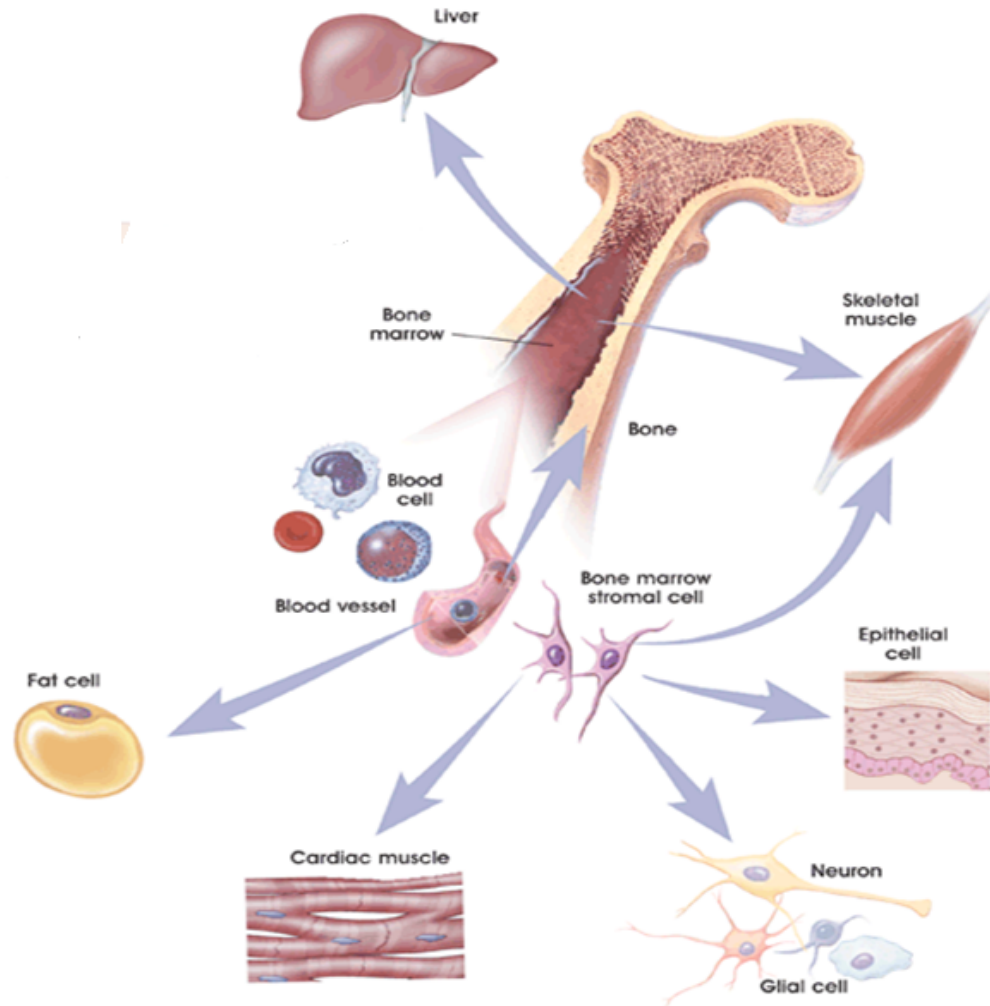
C. Rome, M. Keramidas, A. Karageorgis

Modèle animal

- Ischémie cérébrale focale
- Transitoire (90 min)
- Occlusion intravasculaire de l'ACM droite par monofilament



Cellules souches adultes

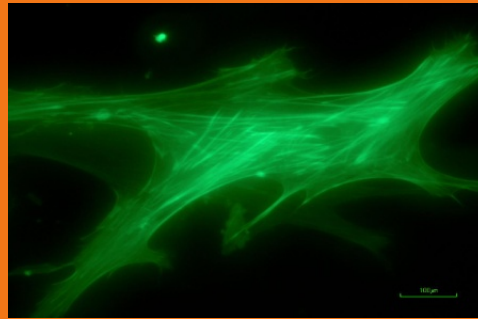


Multipotentes
Division asymétrique
Autorenouvellement

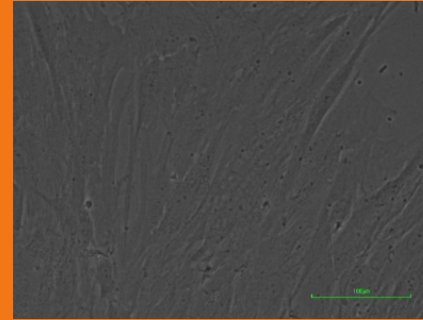
- Cellules souches hématopoïétiques
- Cellules souches neurales
- Cellules souches épithéliales
- Cellules souches cutanées

- Cellules souches mésenchymateuses (CSM)

Temps de doublement

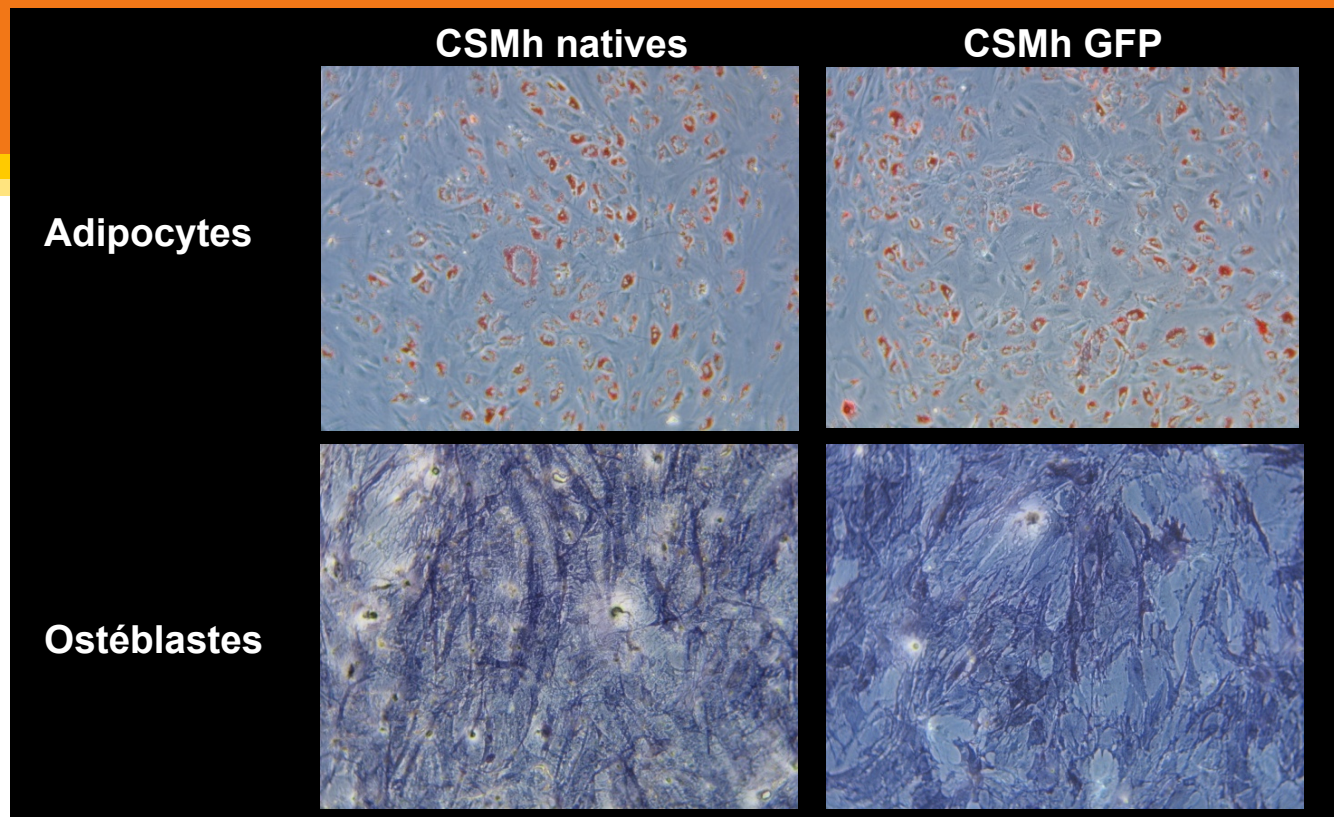


25,7 heures



27,5 heures

Capacités de différenciation



Phénotypage des CSMh

- CD14-, CD45- (<5%)
- CD90+, CD105+, CD73+ (>90%)

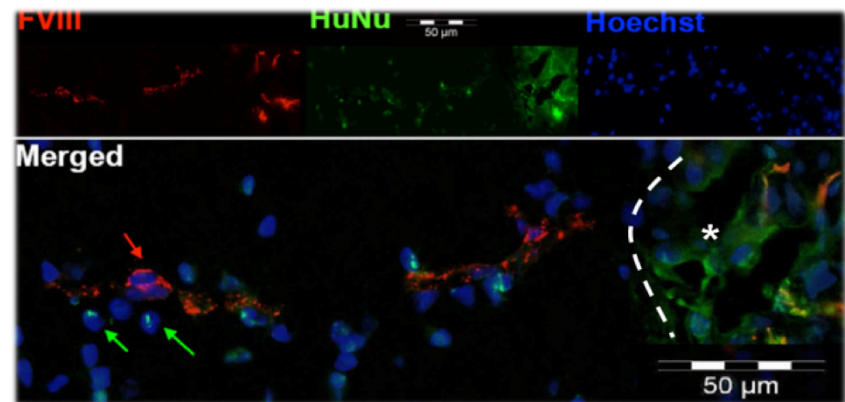
Ischémie expérimentale et thérapie cellulaire

- Propriétés d'auto-renouvellement et de différenciation des cellules souches mésenchymateuses humaines (CSMh) selon leur microenvironnement (*Chen et al., 2001 ; Chen et al., 2003*)
- Migration vers la zone lésée (*Detante et al., 2009*)
- Récupération fonctionnelle meilleure et réduction de la taille de l'infarctus cérébral (*Zhao et al., 2002 ; Zhang et al., 2004*)
- Mécanismes d'action?

Thérapie cellulaire et angiogenèse

- Couplage angiogenèse / neurogenèse
 - « niches » neurovasculaires (*Ohab et al., 2006*)

- Amélioration fonctionnelle et promotion de l'angiogenèse après administration (H6) de CSMh surexprimant Ang -1 +/- VEGF (*Onda et al., 2008 ; Toyama et al., 2009*)

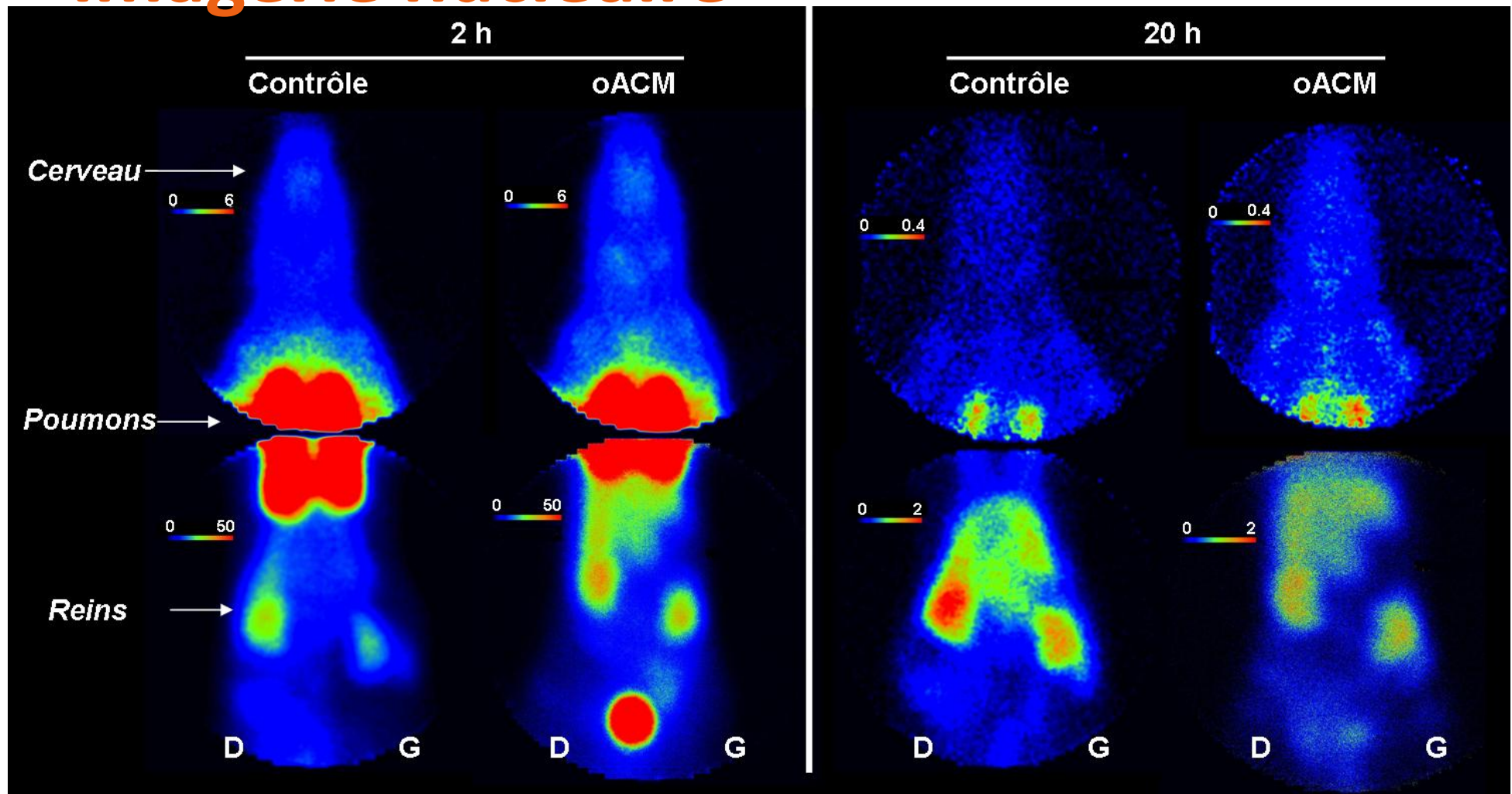


Moisan et al., soumis

- Formation de néo vaisseaux in vitro après cocultures CSMh et cellules endothéliales de souris (*Zacharek et al., 2007*)

Ang-1 = Angiopoïétine 1 ; VEGF = Vascular Growth Factor

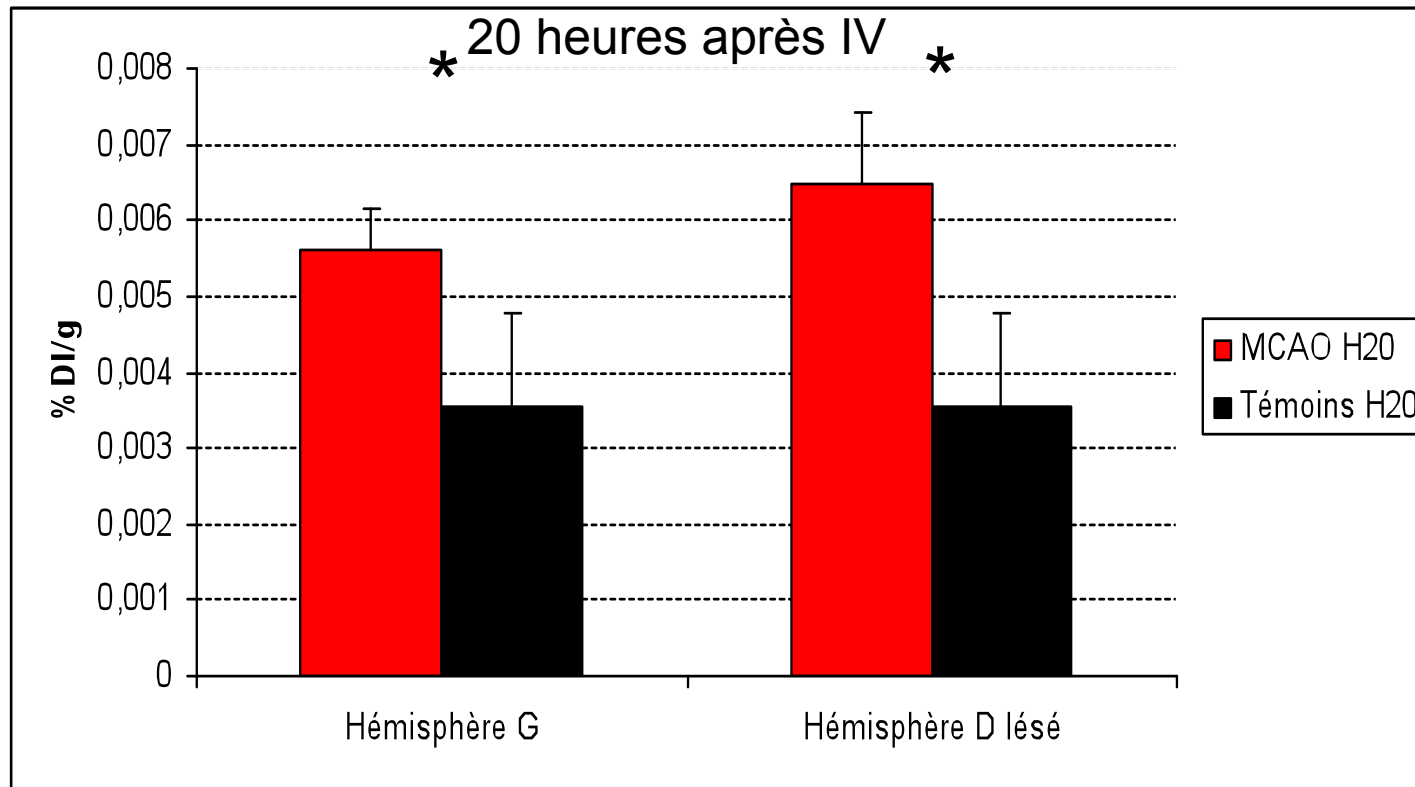
Imagerie nucléaire



>> Piégeage pulmonaire transitoire / Élimination rénale

>> Sensibilité insuffisante pour cerveau

Comptage sur organes isolés



- >> Colonisation de la lésion après IV
- >> Faible quantité : 1/10 000 CSMh injectées
- >> Élimination rénale
- >> Accumulation splénique

* : $p < 0,05$

T-test

Application clinique

REFERENCE	SUJETS	DELAIS AVC/ GREFFE	SOURCE CELLULE	VOIE	RESULTATS
Kondziolka et al, 2000	12 AVC1 (61 ans)	0.5 – 6 ans	Neurones hNT	IC	-Faisabilité - Bonne tolérance
Kondziolka et al, 2005	6AVCi / 8 AVCh (58 ans) VS contrôles: 3 AVCi / 1 AVCh (46 ans)	1 – 6 ans	Neurones hNT	IC	Bénéfice NS
Savitz et al, 2005	5 AVCi (25 – 52 ans)	1.3 – 10 ans	C fœtales porcines (LGE)	IC	-EI - Arrêt de l'étude
Bang et al, 2005	5 AVCi (63 ans) VS contrôles: 25 AVCi (59 ans)	5 et 7 semaines	CSMh	IV	-Bonne tolérance - Bénéfice NS - Réduction volume lésion NS
Mendoça et al, 2006	1 AVC1 (34 ans)	4 jours	CM moelle osseuse	IA	-Faisabilité - Bonne tolérance
Lee et al, 2010	16 AVCi VS 36 témoins	7 semaines	CSMh	IV	-Bonne tolérance - Amélioration fonctionnelle - Réduction mortalité (NS)
Honmou et al, 2011	12 AVCi (ouvert)	36-133j	CSMh	IV	-Réduction taille infarctus - Amélioration fonctionnelle

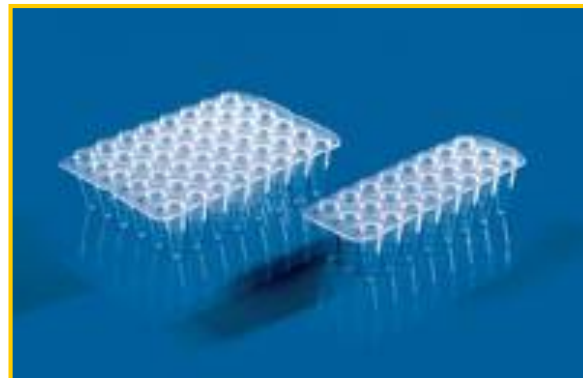
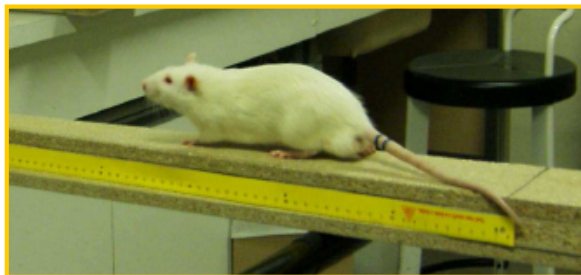
Thérapie cellulaire et angiogenèse

REFERENCE	MODELE ISCHEMIE	TYPE DE CELLULES	DELAI AVC / GREFFE	VOIE	RESULTAT
Zacharek et al, 2007	Transitoire (ACM) (120 min)	CSMh	24 heures	IV	-Promotion angiogenèse -Surexpression Ang1, VEGF - diminution perméabilité BHE
Onda et al, 2008	Permanent (ACM)	CSMh – Ang1 / CSMh	6 heures	IV	-Promotion angiogenèse -Augmentation CBF en périphérie de l'Infarctus - Amélioration felle / CSMh(NS) - Réduction taille de l'infarctus / CSMh (NS)
Omori et al, 2008	Permanent (ACM)	-CSMh (1.10^6) (Gp2) - CSMh (3.10^6) (Gp5, Gp3, Gp4)	-H6 (Gp2, Gp5) - H6, H24, H48 (Gp3) -H6, H24, 1 semaine (Gp4)	IV	-Promotion angiogenèse - Amélioration felle (effet dose et temps) / Gp5 - Réduction taille de l'infarctus (effet dose et temps) / Gp5
Toyama et al, 2009	Permanent (ACM)	-CSMh / - CSMh – VEGF – Ang1 / - CSMh – VEGF / -CSMh – Ang1	6 heures	IV	-Promotion angiogenèse - Réduction taille infarctus (sauf CSMh VEGG, aggravation) - Amélioration felle (sauf CSMh VEGF, aggravation)

Matériels et méthodes

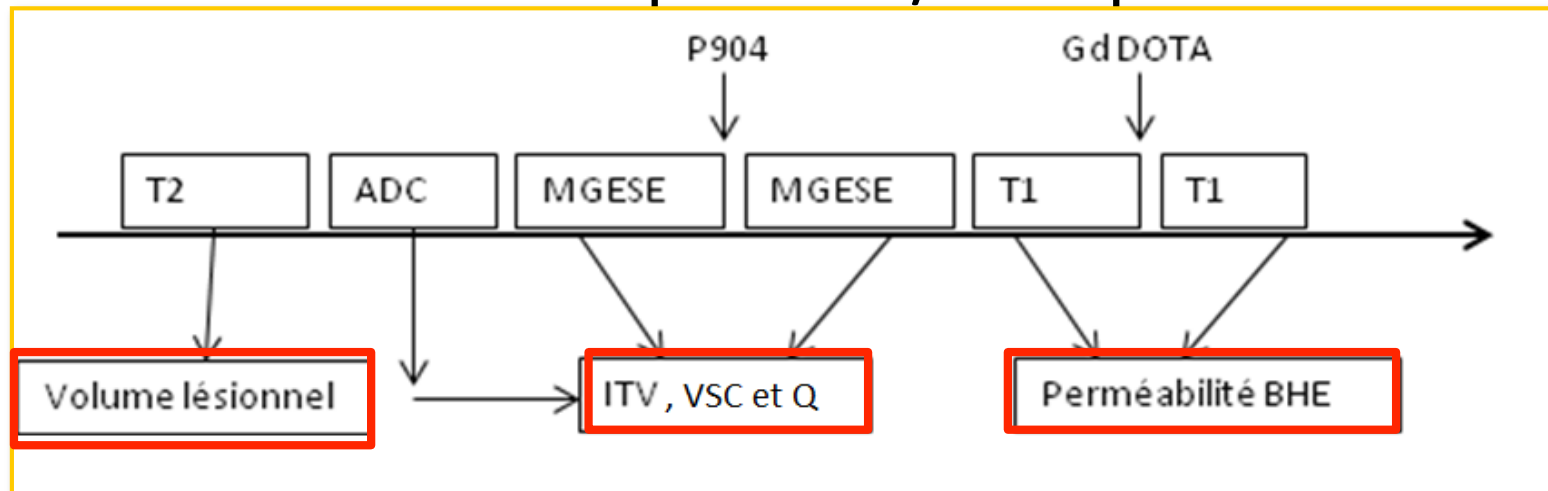
- **Etude multiparamétrique**

- Evaluation fonctionnelle: tests comportementaux (NSS, retrait d'adhésif)
- Evaluation morphologique: mesure de la densité vasculaire et du diamètre des vaisseaux en IRM *in vivo*
- Expression des facteurs angiogéniques en PCR quantitative (*ex vivo*)



Matériels et méthodes

- IRM cérébrale (7T) *in vivo*
 - 35 minutes d'acquisition / 6 séquences

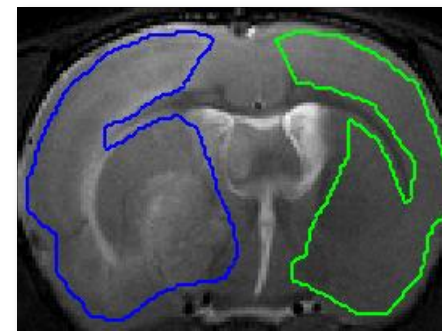


Index de Taille des Vaisseaux (ITV- μm): Diamètre moyen des vaisseaux

Densité microvasculaire (facteur Q)

Volume sanguin cérébral (VSC - %)

- Dessin des régions d'intérêt



Matériels et méthodes

- Biologie moléculaire
 - Etude en PCR quantitative des **facteurs angiogéniques** :
Angiopoïétine-1, Angiopoïétine-2 et VEGF, Tie 1 et 2,
VEGF R1 et 2, TGF B, FGF et eNOS

Extraction
des ARN

- Prélèvement des cerveaux
- Extraction au Trizol

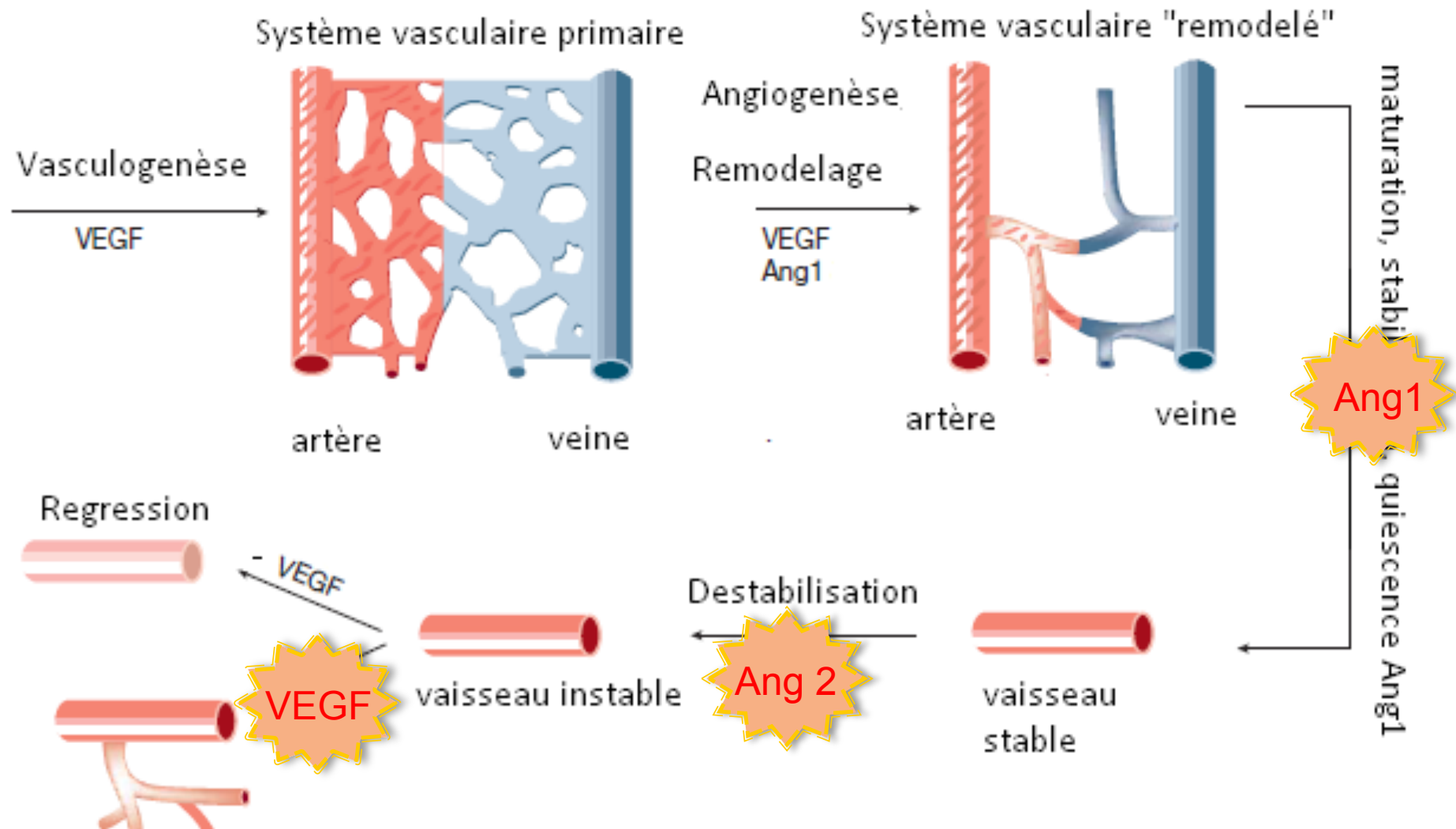
Reverse
Transcription

- Quantification des ARN obtenus
- Reverse Transcription

Q-PCR

- Amplification des ADNc obtenus par PCR quantitative

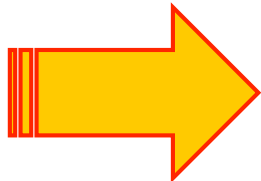
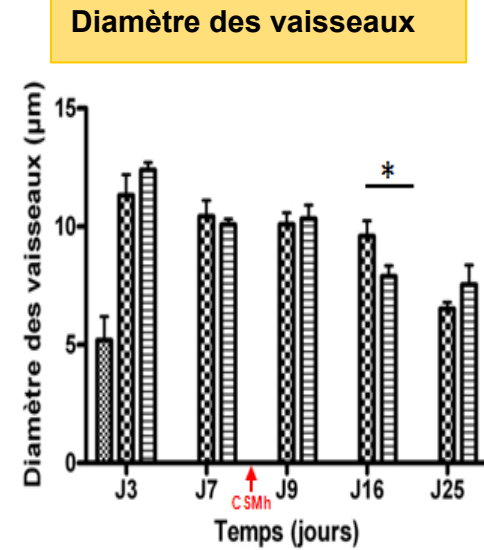
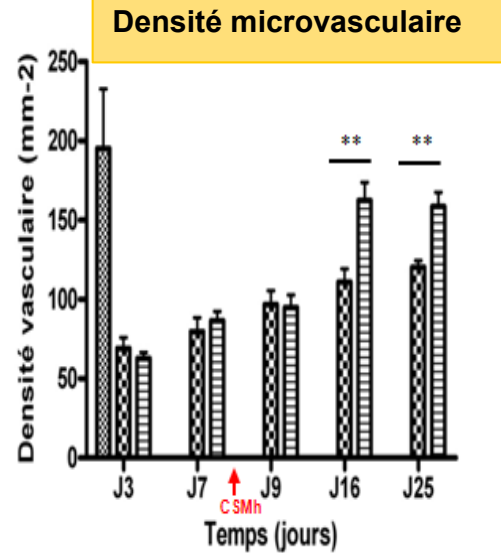
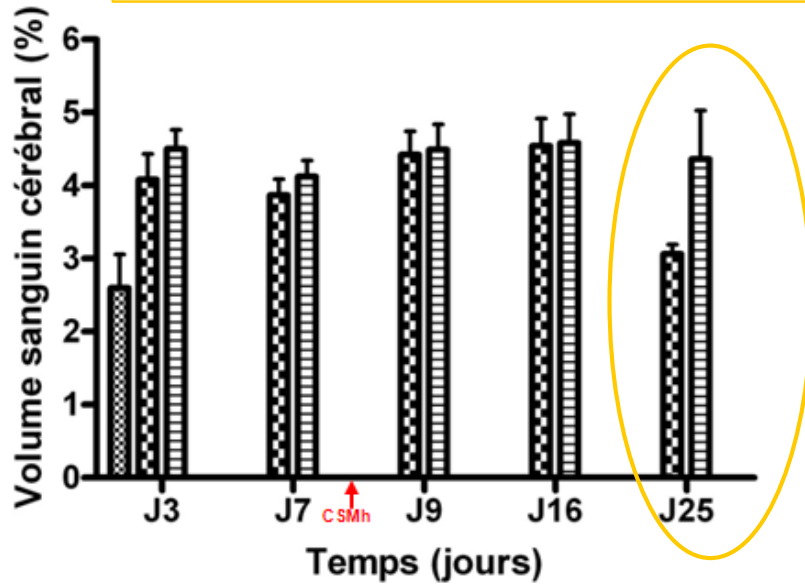
Rôle des facteurs angiogéniques



Evaluation de la microcirculation en IRM

Sham (n=5) oACM-PBS (n=8) oACM-CSM (n=9)

Volume sanguin cérébral



Augmentation de la densité vasculaire et maintien du VSC après injection de CSMh

Moyenne +/- sD, * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ - T test

