

Utilisation rationnelle et scientifique des cellules stromales mésenchymateuses chez le cheval

Séverine Boullier, Jean-Luc Cadoré, Paule Carnat-Gautier

▶ **To cite this version:**

Séverine Boullier, Jean-Luc Cadoré, Paule Carnat-Gautier. Utilisation rationnelle et scientifique des cellules stromales mésenchymateuses chez le cheval. La Dépêche Technique, 2020, 180, pp.6-9. anses-03017123

HAL Id: anses-03017123

https://anses.hal.science/anses-03017123

Submitted on 6 Jul 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Les CSM en tant que thérapies innovantes en médecine vétérinaire révèlent des intérêts thérapeutiques dans le traitement des affections dégénératives ostéo-articulaires chez le cheval et d'autres encore à découvrir. Des médicaments vétérinaires à base de CSM ont obtenu des AMM par procédure centralisée pour des traitements allogéniques ; les vétérinaires réalisent également des traitements autologues. Cependant, du fait de l'absence de procédure universelle de préparation, l'utilisation autologue de CSM sans AMM requiert de la part des vétérinaires une production impliquant un établissement tiers spécialisé. Le Comité de suivi des médicaments vétérinaires a travaillé sur cette thématique émergente en proposant aux vétérinaires des recommandations pour la préparation et l'usage de ces traitements.

L'article est disponible dans la version des auteurs ci-dessous ou dans le supplément technique de La Dépêche Vétérinaire n° 180 d'octobre 2020.

UTILISATION RATIONNELLE ET SCIENTIFIQUE DES CELLULES STROMALES MÉSENCHYMATEUSES chez le cheval

Séverine Boullier, Jean-Luc Cadoré et Paule Carnat-Gautier

Les cellules stromales mésenchymateuses (CSM) font partie des thérapies dites innovantes.
Ces thérapies comprennent, selon la définition de l'article 4(43) du règlement (UE) n°2019/6 du Parlement européen et du Conseil relatif aux médicaments vétérinaires :
• un médicament vétérinaire spécifiquement conçu pour la thérapie génique, la médecine régénérative, l'ingénierie des tissus, la thérapie par les produits sanguins ou par les phages ;
• un médicament vétérinaire issu des nanotechnologies ou
• toute autre thérapie considérée comme un domaine émergent en médecine vétérinaire.
Elles sont actuellement en plein essor en médecine vétérinaire. L'obtention récente d'une Autorisation de mise sur le marché (AMM) pour deux médicaments utilisant des CSM chez le cheval est l'occasion de refaire un point sur ce qui est connu actuellement sur les CSM et sur les pratiques d'utilisation.

DÉFINITION

Les cellules stromales mésenchymateuses sont définies par la société internationale de thérapie cellulaire (ISCT) comme des cellules adhérentes au plastique, exprimant un ensemble particulier d'antigènes de surface et capables de se différencier *in vitro* en lignées ostéogènes, chondrogènes ou adipogènes [1].
Cette définition peu précise aboutit à une hétérogénéité très importante des CSM produites et étudiées.
Cette hétérogénéité est liée à de nombreux facteurs, dont les principaux sont listés ci-dessous [2].
1- Les cellules sont souvent issues de tissus différents. Initialement, les CSM étaient obtenues à partir de la moelle osseuse hématopoïétique. On peut maintenant produire des CSM à partir de nombreux tissus, dont le sang périphérique, le sang de cordon, le placenta, le tissu adipeux ou la pulpe dentaire. La nature et les activités biologiques de ces CSM diffèrent selon leur origine.
2- Les donneurs représentent un autre facteur de variation important. Les différences intrinsèques entre chaque donneur (génétique/ épigénétique), l'état physiologique et sanitaire

ainsi que l'âge du donneur au moment du prélèvement participent à la variabilité des CSM obtenues.

3- Les techniques utilisées pour produire les CSM *in vitro* sont également un élément clef dans la variabilité. Les milieux de culture, les facteurs de croissance et les temps de culture influent considérablement sur la nature des cellules produites. En fonction de la façon dont les cellules sont cultivées, le phénotype des cellules peut changer. On peut, par exemple, avoir des modifications de certains facteurs de transcription, ce qui a un impact sur les activités biologiques des cellules obtenues. Il n'y a pas, pour l'instant, de procédure « universelle » de production des CSM. Cette étape d'amplification *in vitro* est cependant indispensable à la production de CSM en quantité suffisante pour une utilisation thérapeutique. Lors de ces phases d'amplification, il reste d'autres types cellulaires dans les préparations et le niveau de pureté peut être différent d'une préparation à une autre. L'impact de ces contaminations cellulaires sur l'activité biologique observée n'est pas connu. A l'heure actuelle, il n'est pas possible d'assurer une reproductibilité parfaite des lots de production.

PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES ET MODE D'ACTION

Cette très grande variabilité complique l'étude des activités biologiques des CSM.

Cependant, toutes les études récentes convergent pour montrer que, contrairement aux premières hypothèses émises, les CSM injectées ne se différencient pas localement en cellules permettant de remplacer les tissus lésés [3]. On sait maintenant que les CSM injectées ne persistent pas dans l'organisme au-delà de quelques semaines et que leur mode d'action passe par une activité paracrine, *via* la sécrétion de facteurs trophiques. On a donc assisté à un changement de nomenclature de ces cellules, qui de cellules « souches » mésenchymateuses sont devenues des cellules « stromales » mésenchymateuses c'est-à-dire des cellules spécialisées.

Globalement, il est établi que les CSM agissent grâce à leurs propriétés immunomodulatrices, angiogéniques et hématopoïétiques [4].

Il est donc très difficile, voire impossible, pour l'instant de définir les propriétés biologiques exactes et les effets thérapeutiques associés des CSM. Ils sont dépendants de trop nombreux facteurs liés à la variabilité.

CONDITIONS D'UTILISATION

D'autres facteurs que ceux cités ci-dessus conditionnent les activités thérapeutiques des CSM [5].

En premier lieu, bien sûr, les indications d'utilisation sont à prendre en compte. La plupart des études initiales réalisées chez le cheval ont porté sur les affections ostéo-articulaires, en particulier l'arthrose. Il existe très peu de données scientifiques pour d'autres indications [6,7].

Le mode d'injection et la quantité de cellules injectées jouent aussi un rôle. La voie loco-régionale semble être la voie à privilégier pour obtenir une quantité suffisante de cellules effectrices dans la zone lésée. En effet, après injection intra-veineuse, les études montrent que très peu de cellules parviennent jusqu'au tissu cible.

La quantité de cellules à administrer est plus difficile à définir. L'effet biologique sera dépendant de la nature et de la pureté des CSM obtenues, deux paramètres très variables. Pour les

affections dégénératives articulaires, la majorité des études cliniques réalisées chez l'homme et chez le cheval ont utilisé entre 2 et 20 millions de cellules par injection.
Il est bien sûr indispensable que les cellules soient injectées vivantes pour obtenir une activité biologique. Les conditions de stockage et de préparation juste avant l'injection doivent être parfaitement respectées.

UTILISATION AUTOLOGUE OU ALLOGÉNIQUE

Il est possible de générer des CSM à partir de l'animal à traiter (utilisation autologue) ou à partir de donneurs sélectionnés (utilisation allogénique).
Depuis 2019, deux médicaments à base de CSM allogéniques ont obtenu une AMM au niveau centralisé chez le cheval, dans le cadre des affections ostéo-articulaires dégénératives (Horstem®)* ou inflammatoires (Arti-Cell Forte®)**. Conformément aux dispositions de l'article L. 5143-4 du code de la santé publique dit « cascade thérapeutique », dans le cas d'une utilisation allogénique et pour les indications citées, seuls ces deux médicaments pourront être utilisés. Les règles de la « cascade thérapeutiques » sont transposées des articles 10 et 11 de la directive 2001/82/CE et sont donc les mêmes dans tous les états membres de l'Union Européenne.
En dehors des deux médicaments vétérinaires cités ci-dessus, il n'existe pas d'autre produit à base de CSM avec AMM pour d'autres espèces animales ou d'autres indications. En l'absence de produits avec AMM, le recours à des produits autologues sans AMM est envisageable mais, dans ce cas, les conditions de préparation doivent être réalisées auprès d'établissements bénéficiant des moyens et de la technicité appropriée. Ces produits ne peuvent relever de la catégorie de préparations extemporanées, dans la mesure où ils subissent un procédé de transformation industrielle ne pouvant être réalisé que par un établissement tiers spécialisé.
La préparation d'un produit autologue est soumise aux mêmes contraintes techniques que celles qui s'appliquent aux produits allogéniques, notamment en matière de prélèvement, de sélection, caractérisation et amplification des cellules d'intérêt, de conditions de préparation et de contrôle qualité. La seule différence entre un produit autologue et un produit allogénique est liée à l'importance de l'amplification. Pour le reste, et en particulier en termes d'exigences garantissant la qualité et l'innocuité du produit, il n'existe pas de différence dans les conditions de préparation.
Pour toutes les raisons citées précédemment, il est très difficile de comparer les études d'efficacité réalisées avec des CSM allogéniques ou autologues les unes par rapport aux autres. Concernant les risques, ils sont liés à la nature des cellules et aux conditions de préparation et d'administration.

** https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/horstem-epar-product-information_fr.pdf*

*** : https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/_arti-cell-forte-epar-product-information_fr.pdf*

RISQUES ASSOCIÉS À L'UTILISATION DES CSM

Comme tout médicament, l'utilisation des CSM peut entraîner des effets secondaires à court et à long terme[5].

Parmi les effets secondaires possibles, on peut noter le risque d'induction de réactions inflammatoires plus ou moins fortes. Ces réactions peuvent être liées à la synthèse de facteurs trophiques par les CSM (dont des facteurs angiogéniques), mais aussi à la présence de cellules étrangères au tissu ciblé. On a longtemps pensé que les CSM, par leurs propriétés particulières, étaient invisibles au système immunitaire et ne généraient pas de réponse contre elles-mêmes. On sait maintenant que ces cellules sont reconnues et éliminées, les cellules allogéniques étant reconnues et éliminées plus rapidement. L'élimination des CSM pourrait participer à l'induction, voire à l'entretien, de la réponse inflammatoire. Cet argument est en faveur d'une spécificité d'espèce, il semble donc difficile d'utiliser des CSM de cheval dans une autre espèce. Il faut noter que pour les deux médicaments avec AMM, les réactions inflammatoires locales sont notées comme très fréquentes suite à une administration intra-articulaire.
A plus long terme, le risque néoplasique a été évoqué. Le risque que les cellules injectées deviennent des cellules tumorales est maintenant considéré comme très faible, depuis qu'il a été établi que ces cellules disparaissent en quelques semaines.
En revanche, il est possible que les CSM injectées favorisent le développement de cellules pré-tumorales déjà présentes, en créant un environnement immunologique favorable à la croissance tumorale (immuno-modulation) associé à la synthèse de facteurs angiogéniques. Pour l'instant, ce risque reste théorique
et n'a pas été confirmé.
Le risque de formation de tissu ectopique a également été évoqué. Il a cependant été très rarement décrit chez l'homme [8].
Le risque d'induire une réaction auto-immune est également à envisager. Le niveau de différenciation des CSM injectées pourrait contribuer à une réponse immunitaire non désirable et délétère. Des études complémentaires ainsi qu'une surveillance post-AMM permettront d'écarter ou de confirmer cette hypothèse.
Le dernier risque à prendre en compte est le risque infectieux. Il correspond à l'injection d'agents pathogènes présents dans la préparation injectée. On ne parle pas ici d'un problème d'asepsie au moment des injections, même si toutes les bonnes pratiques d'administration par voie parentérale doivent être parfaitement respectées.
- La contamination peut provenir du donneur lui-même. Même si les donneurs sont testés pour un certain nombre d'agents pathogènes majeurs, l'utilisation de CSM allogéniques augmente le risque de contamination par des agents infectieux dont le receveur est indemne.
- La contamination peut aussi avoir lieu *a posteriori* pendant le procédé de fabrication, qui doit se faire dans des conditions de stérilité parfaite. Ces conditions sont vérifiées et validées pour les produits avec AMM, mais elles ne le sont pas forcément pour les préparations de CSM autologues.
Le prescripteur vétérinaire devra être très vigilant sur la nature et l'origine des prélèvements utilisés pour la mise en culture des CSM autologues, ainsi que les moyens de transport et de traçabilité que pourraient proposer des centres de recherche ou laboratoires sous couvert de protocoles scientifiques de recherche.
La responsabilité du praticien serait recherchée en cas d'évènement indésirable chez l'équidé concerné.
Dans tous les cas, le suivi des effets secondaires et les déclarations de pharmacovigilance qu'il s'agisse d'un médicament disposant d'une AMM ou non, sont indispensables.

DIFFÉRENCES AVEC LES AUTRES PRODUITS DÉRIVÉS DU SANG

D'autres produits de thérapie innovante avec des indications très proches de celles des CSM sont proposés chez le cheval. Il s'agit principalement de produits issus de dérivés sanguins, comme les IRAP (IL-1 Receptor Antagnonist Protein) et les PRP (Platelet Rich Plasma).
Les IRAP sont issus de préparations particulières de sérum, qui seraient enrichies en facteurs anti-inflammatoires. La composition et le mode d'action des IRAP ne sont pas encore complètement définis.
Les PRP correspondent à un enrichissement du plasma en plaquettes. Ces plaquettes auraient des propriétés de cicatrisation et de régénération tissulaire.
Comme pour les CSM, il n'y a pas de standardisation des procédés de fabrication des IRAP et des PRP. Il convient d'être très prudent quant à l'utilisation de kits de préparation au chevet du patient qui pourraient ne pas garantir la sécurité optimale de la préparation finalement injectée (en particulier concernant le risque infectieux). Il n'y a pour l'instant pas d'AMM pour ce type de produit chez le cheval. Des utilisations autologues ou allogéniques sont proposées [9].
Au vu des connaissances actuelles sur les CSM, on peut ainsi proposer avant leur utilisation chez le cheval de vérifier systématiquement un certain nombre de critères :
• présence d'une AMM ou non, conditions d'obtentions, chaîne de fabrication, critères de qualité infectiologique, mécanismes d'action ;
• nature : autologue ou allogénique, viabilité, quantité de cellules, voie(s) d'administration et doses
• indications et espèces cibles
• effets secondaires connus et/ou à surveiller
• praticité de l'approvisionnement, du stockage et conservation, du conditionnement, disponibilité du produit
• coût
• niveau de preuve d'efficacité (publications et/ou dossier d'AMM).

EN RÉSUMÉ

Les CSM en tant que thérapies innovantes révèlent des intérêts thérapeutiques avérés (traitement des affections dégénératives ostéo-articulaires) et d'autres encore à découvrir.
Les préparations par les vétérinaires ne peuvent être que des préparations autologues car pour les préparations allogéniques, il y a des médicaments avec AMM. En revanche, du fait de l'absence de procédure universelle de préparation, l'utilisation autologue de CSM sans AMM requiert, de la part des vétérinaires, une production impliquant un établissement tiers spécialisé puisqu'elles ne peuvent être considérées réglementairement comme préparation extemporanée. Cette règle est valable dans tous les états membres de l'Union Européenne.
Concernant les réactions possibles inflammatoires, infectieuses, auto-immunes voire néoplasiques, elles restent pour tous les cas à suivre, voire à rapporter *via* des déclarations de pharmacovigilance.
L'usage des CSM sans AMM chez d'autres espèces que le cheval est également devenu courant à ce jour. Les auteurs soulignent l'absence de données d'efficacité et d'innocuité dans les cas d'utilisation chez d'autres espèces que l'espèce ciblée dans les AMM dans le cadre de la cascade.

CONCLUSION

Les auteurs recommandent de privilégier chez le cheval l'utilisation allogénique des CSM avec l'un des deux médicaments possédant une AMM et rappellent que l'utilisation autologue de CSM sans AMM est envisageable uniquement en impliquant un établissement tiers spécialisé pour leur préparation afin de bénéficier des moyens et de la technicité appropriés pour garantir leur qualité et leur innocuité. La responsabilité du praticien pourrait être recherchée en cas d'apparition d'évènement indésirable chez l'équidé concerné, d'où la vigilance qu'il doit garder en particulier sur l'ensemble des acteurs impliqués.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy. (2006) 8:315–17. doi: 10.1080/14653240600 855905

2.Wilson A, Hodgson-Garms M, Frith JE and Genever P. Multiplicity of Mesenchymal Stromal Cells: Finding the Right Route to Therap. Front. Immunol., 2019 | https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01112

3. Von Bahr L, Batsis I, Moll G, Hägg M, Szakos A, Sundberg B, *et al.* Analysis of tissues fol- lowing mesenchymal stromal cell therapy in humans indicates limited long-term engraft- ment and no ectopic tissue formation. Stem Cells. 2012; 30:1575–8.

4. Noronha NC, Mizukami A, Caliári-Oliveira C, Gastaldi Cominal J, M. Rocha JL, Tadeu Covas D, Swiech K and C. R. Malmegrim K. Priming approaches to improve the efficacy of mesenchymal stromal cell-based therapies. Stem Cell Research
& Therapy (2019) 10:31. https://doi.org/10.1186/s13287-019-1224-y

5. Caplan H, D. Olson S, Kumar A, George M, Prabhakara KS, Wenzel P, Bedi S, Toledano-Furman NE, Triolo F, Kamhieh-Milz J, Moll G and Cox Jr CS. Mesenchymal Stromal Cell Therapeutic Delivery: Translational Challenges
to Clinical Application. Front. Immunol., 2019 https://doi.org/10.3389/ fimmu.2019.01645

6. Maddens S, Viguier E, Cadoré JL. Les cellules stromales
mésenchymateuses: 2001-2018. Etat des lieux d'une innovation thérapeutique en santé publique et point de vue de l'industriel. Bull Acad Vet France 2018. 171-3.

7. Cousty M, Actualités sur l'utilisation des cellules souches mésenchymateuses en thérapeutique articulaire chez le cheval. 2013. Prat Vet Equine 179

8. Bauer G, Elsallab M, Abou-El-Enein M. Concise review: a comprehensive analysis of reported adverse events in patients receiving unproven stem cell-based interventions. Stem Cells Transl Med. (2018) 7:676–85. doi: 10.1002/sctm.17-0282

9. Cousty M, Haelé C, Tessier C. Utilisation de sérum autologue conditionné