

Thérapies cellulaires en urologie

Incontinence urinaire & dysfonction érectile

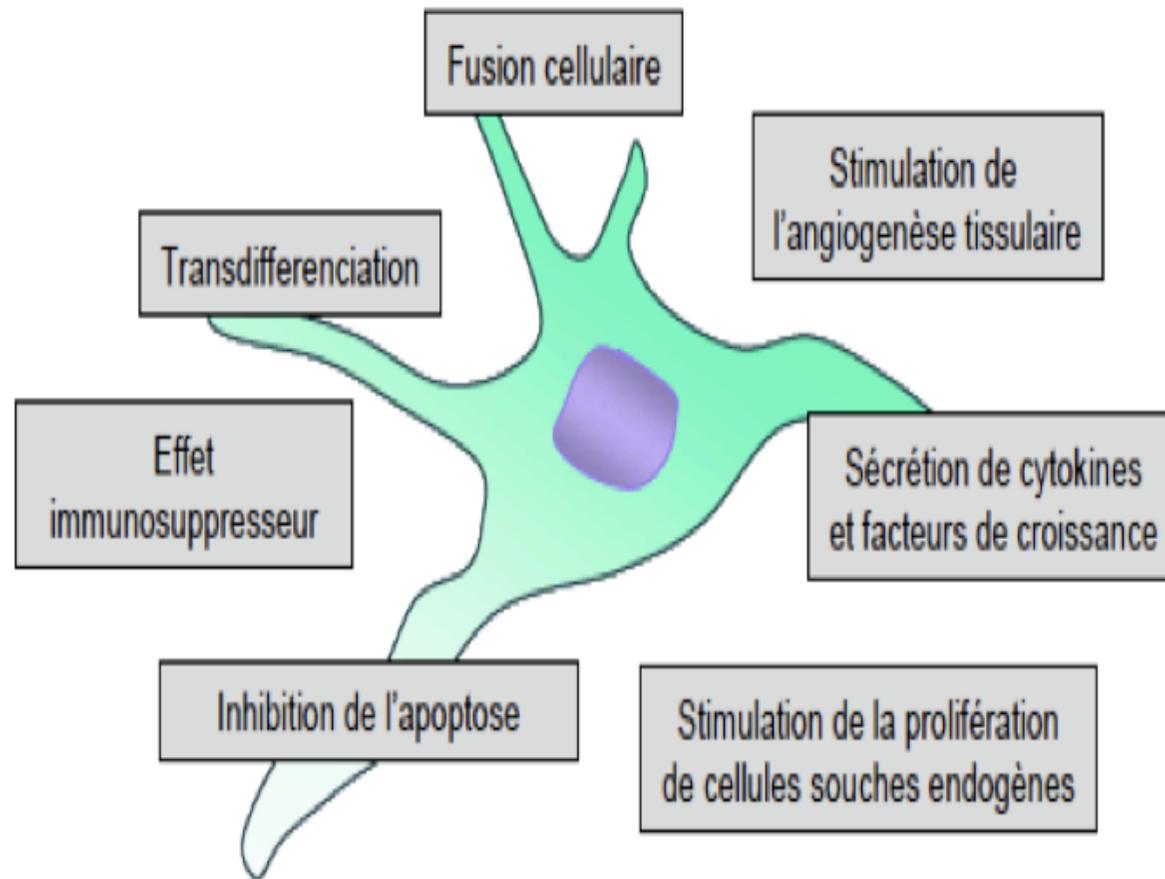
Pr. René Yiou

Service d'Urologie

CHU Henri Mondor, Créteil

rene.yiou@hmn.aphp.fr

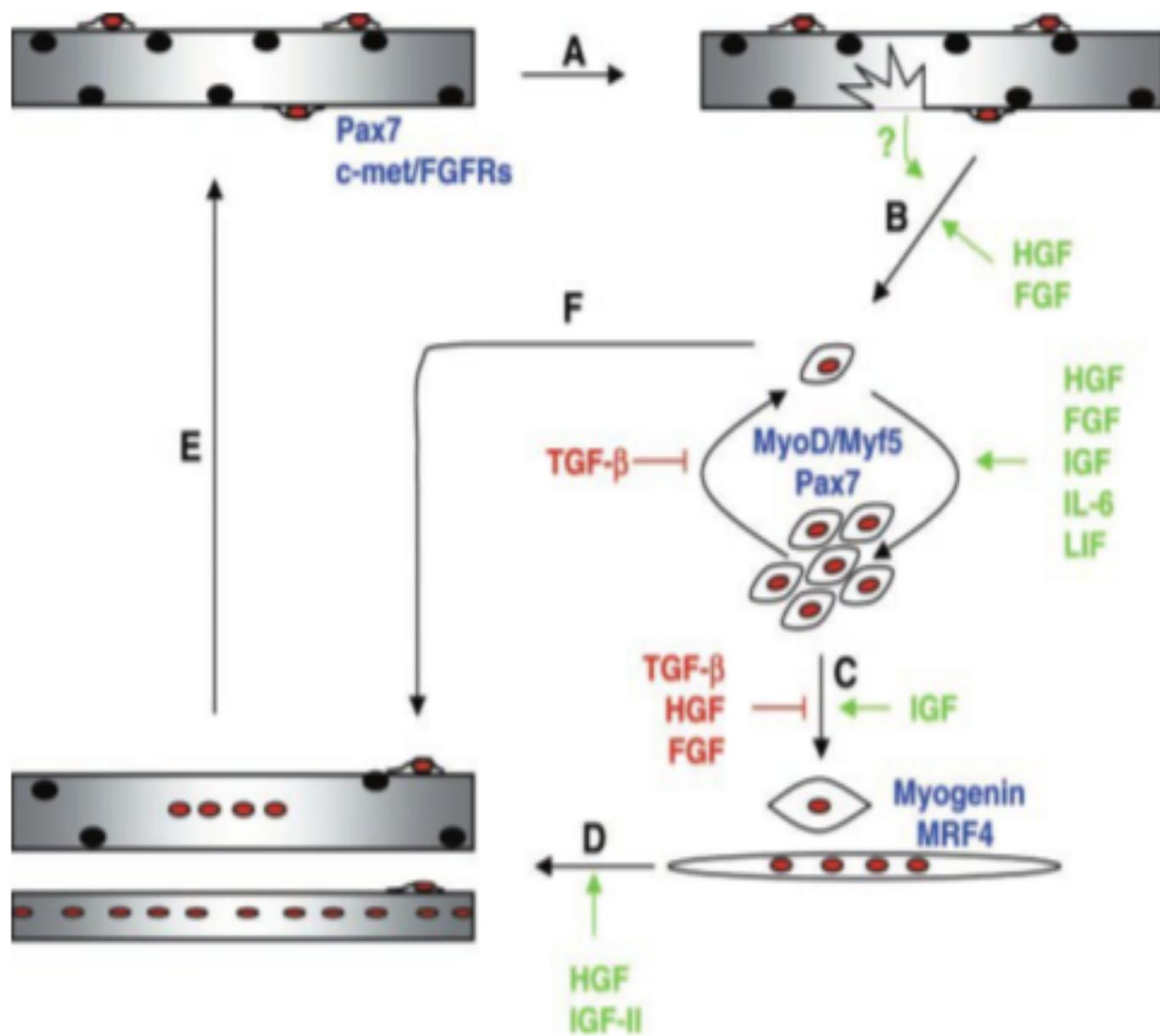
Mécanismes de régénération médiés par les cellules souches

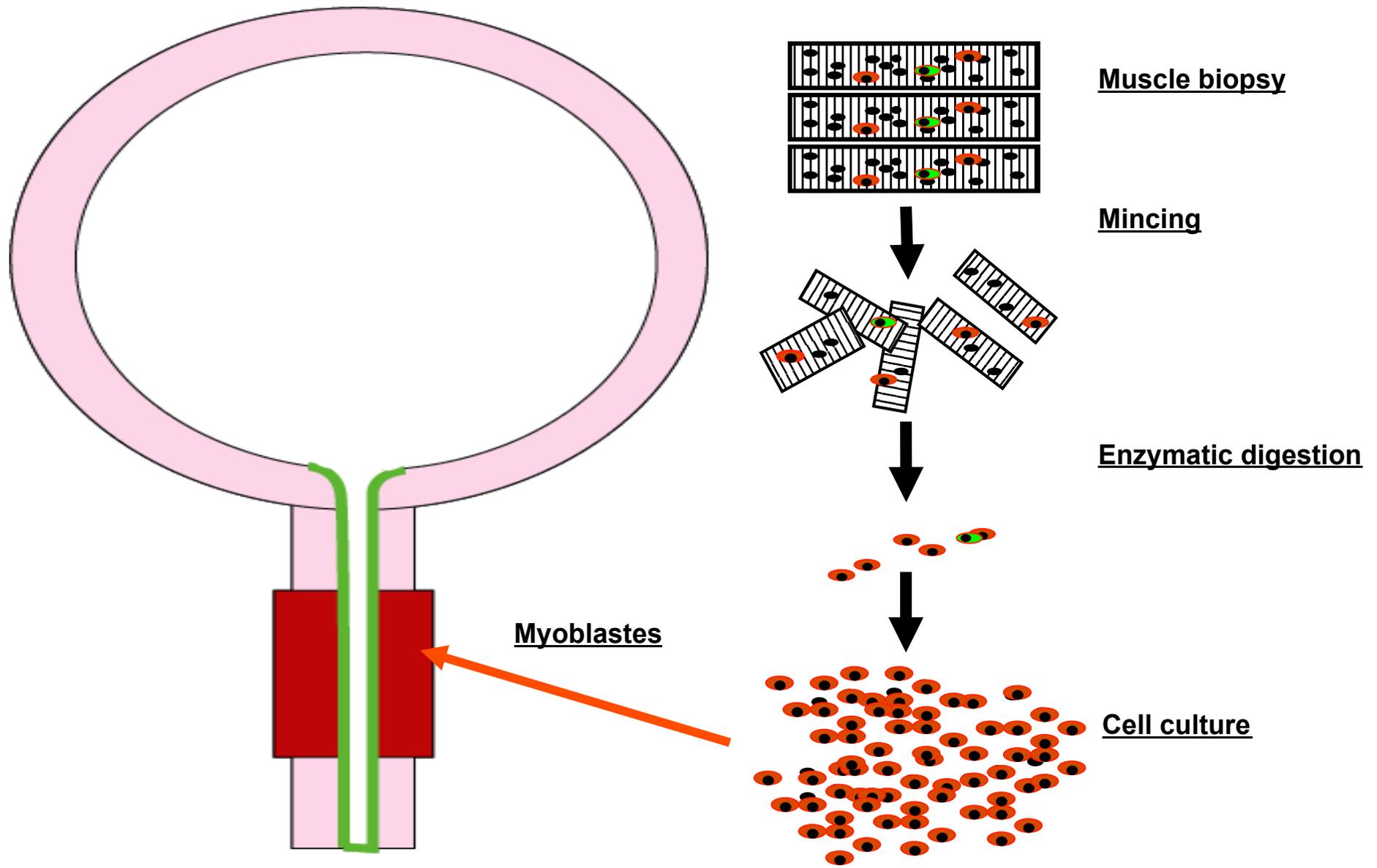


Principales sources de cellules souches utilisées en urologie

- **Cellules précurseurs de muscle strié (incontinence U)**
 - Cellules satellites + fibres musculaires
 - Myoblastes
 - Cellules souches musculaires
- **Cellules souches médullaires**
 - Cellules souches mésenchymateuses
 - Cellules souches hématopoïétiques
 - Cellules progénitrices endothéliales
- **Cellules souches adipeuses et cellules hMADS**
- **(Cellules souches embryonnaires, amniotiques)**

Les cellules précurseurs de muscle strié





Thérapie cellulaire selon un procédé "classique"

Résultats de la greffe de myoblastes pour les pathologies musculaires chez l'homme

La thérapie cellulaire pour les maladies musculaires a été conçue il y a plus de 20 ans

- Partridge, Nature, 1989: *Conversion of mdx myofibres from dystrophin-negative to -positive by injection of normal myoblasts*

L'injection de myoblastes n'augmente pas (ou très peu) la force contractile d'un muscle dystrophique:

- Mendell, New England J Med 1995: Myoblast transfer in the treatment of duchenne's muscular dystrophy
« *There was no significant difference in muscle strength between arms injected with myoblasts (110 million cells) and sham-injected arms.* »
- Menasche C R Biol, 2007
« *The potential benefits of cardiac cell therapy are mediated by alternate mechanisms such as limitation of left ventricular remodelling or paracrine activation of signalling pathways involved in angiogenesis.* »

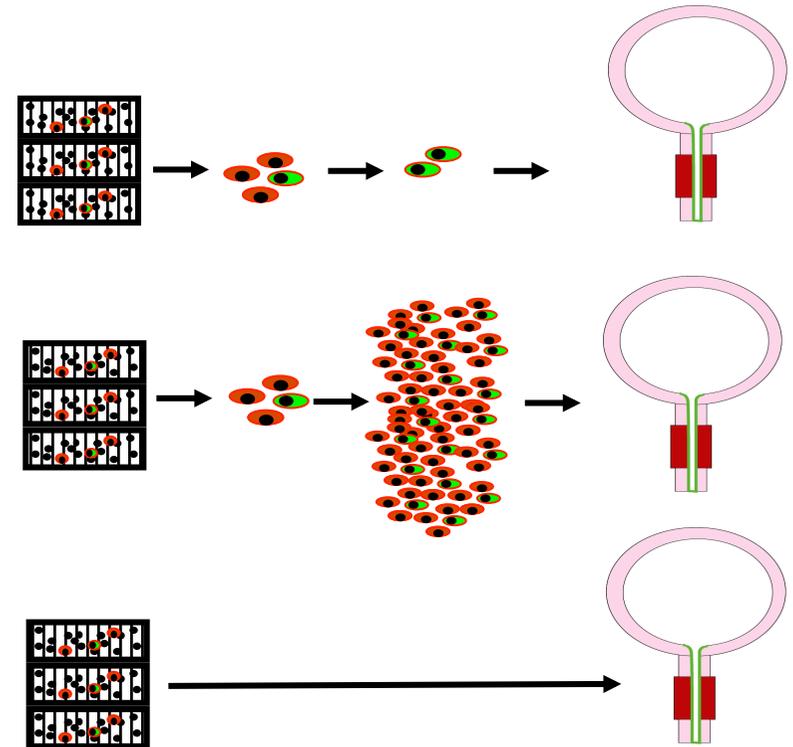
Les raisons de l'échec de la greffe de myoblastes

- Forte mortalité cellulaire++++
 - >97% 1 heure après injection (1)
- Faible migration
- (Réaction immunitaire)

1. Beauchamps JR. Dynamics of myoblast transplantation reveal a discrete minority of precursors with stem cell-like properties as the myogenic source. J Cell Biol. 1999

Approches du problème de la survie cellulaire dans les essais cliniques

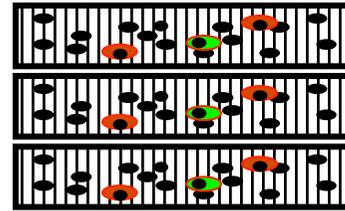
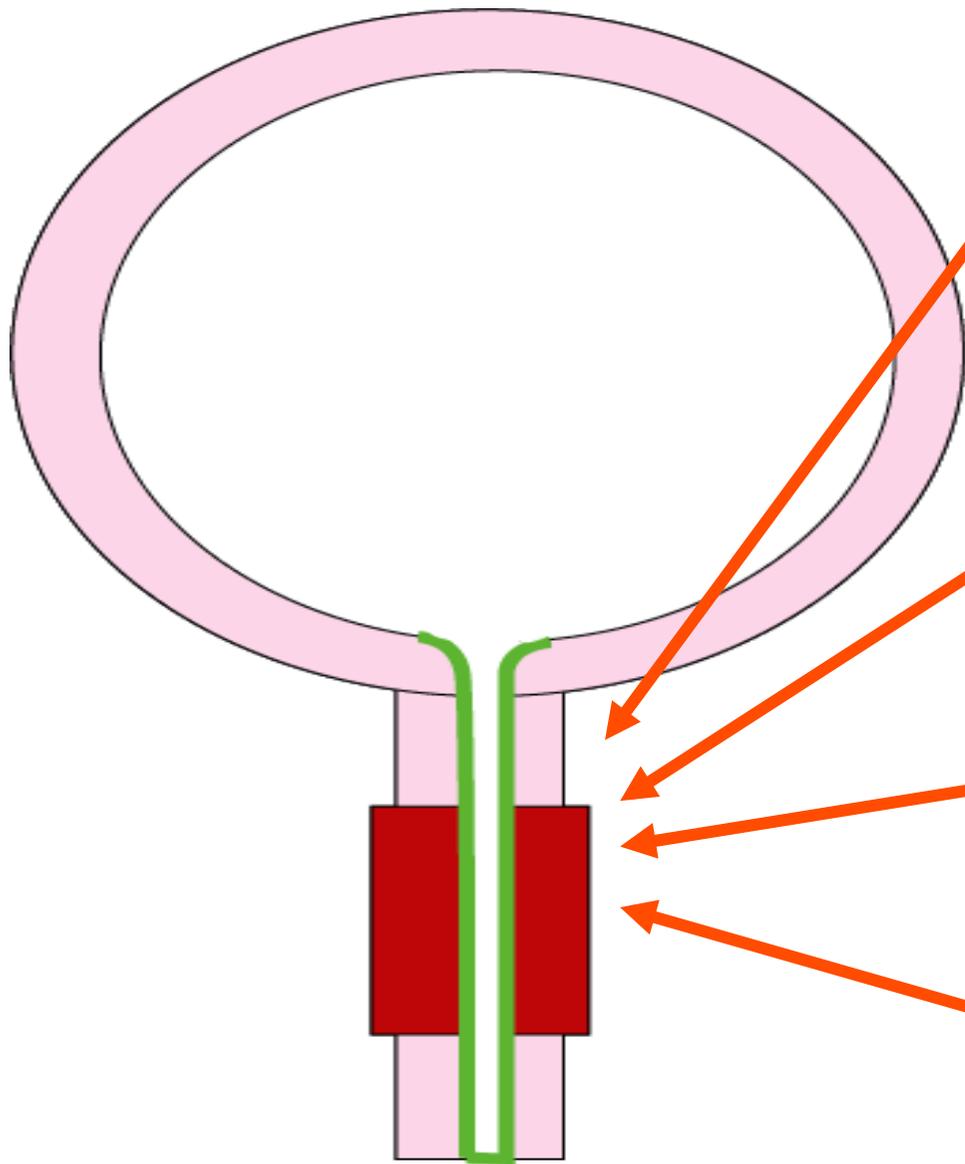
- Injection de myoblastes avec caractéristiques de **cellules souches** (1)
- **Augmentation** du nb de myoblastes injectés (effet-dose?) (2)
- **Suppression des phases de préparation cellulaire altérant le potentiel myogénique** : implantation de **cellules satellites**(3)



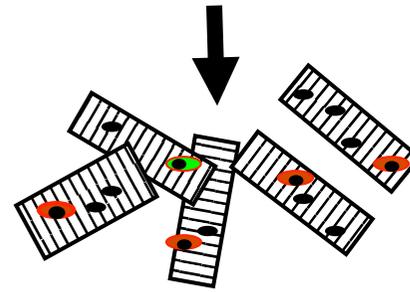
1. Beauchamps JR. Dynamics of myoblast transplantation reveal a discrete minority of precursors with stem cell-like properties as the myogenic source. *J Cell Biol.* 1999
2. Mitterberger et al. *Europ Urol* 2007, [Strasser et al. Lancet](#) 2007
3. Smythe et al.; *Cell Transplant*, 2000. Exposure to tissue culture conditions can adversely affect myoblast behavior in vivo in whole muscle grafts: implications for myoblast transfer therapy
Collins et al. *Cell* 2005

- **Montarras et al., Science, September 2005**

« *The culture of muscle progenitor cells prior to grafting markedly reduces their regenerative efficiency, such that the culture expansion itself is an “**empty**” process, yielding the same amount of muscle as the number of cells from which the culture was initiated.* »



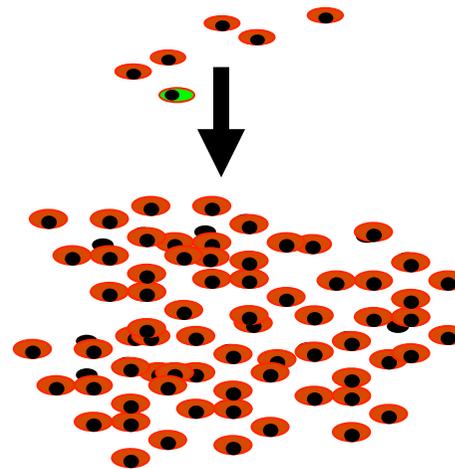
Muscle biopsy



Mincing

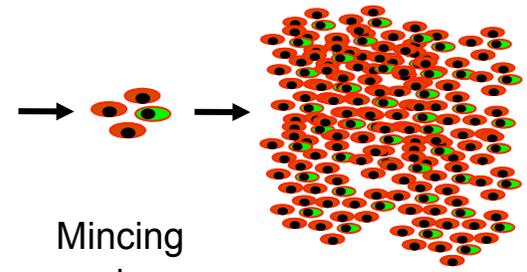
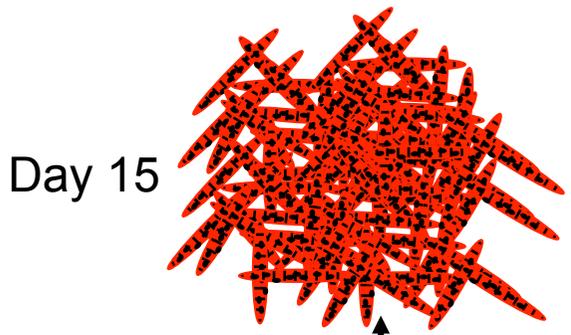
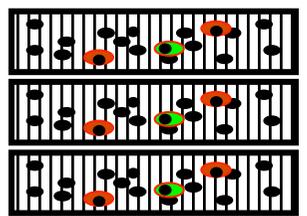


Enzymatic digestion



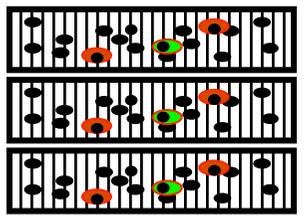
Cell culture

Classical method of mpc transfer

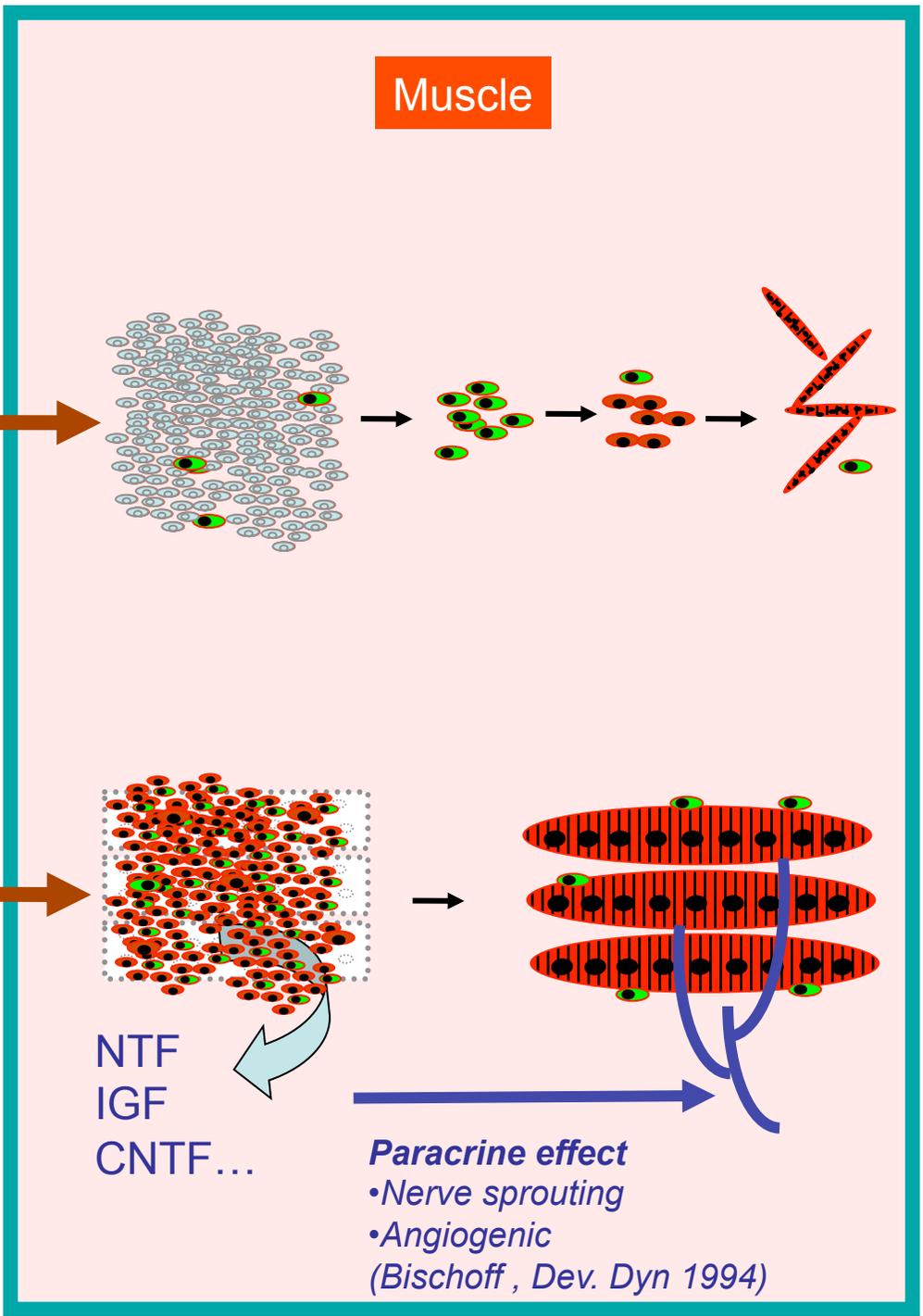


Mincing +
Enzymatic digestion

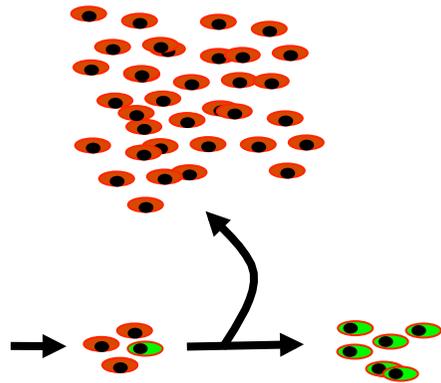
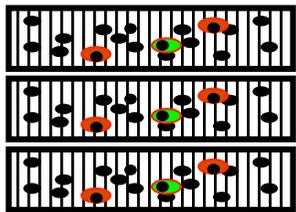
Culture



The myofiber implantation procedure

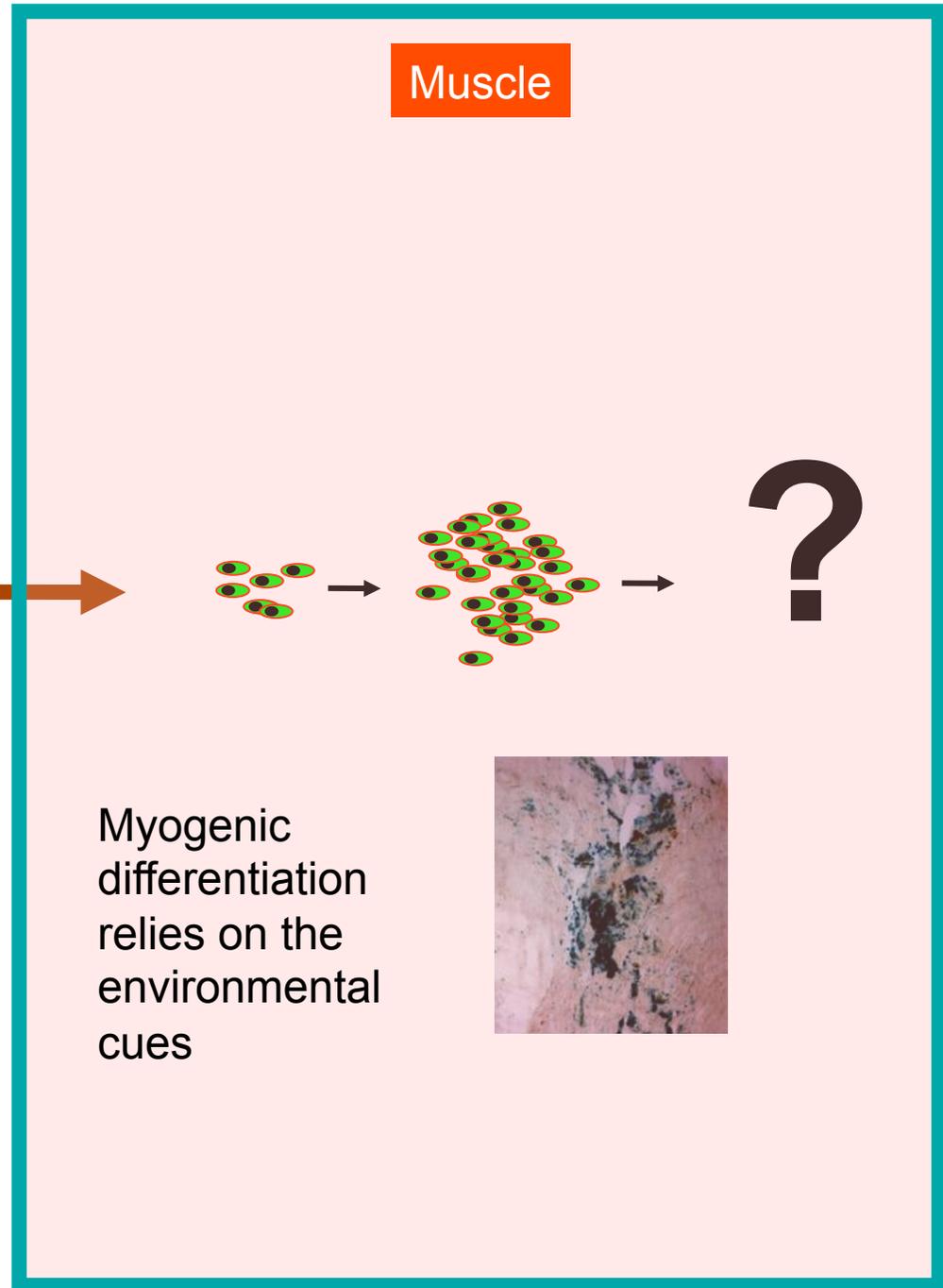


Muscle
derived
stem cells



Mincing
+
Enzymatic
Digestion
+
Preplating
or FACS

Culture
with
**specific
growth factors**
(Deasy, Stem
Cells 2002)



Muscle



Myogenic
differentiation
relies on the
environmental
cues



Table 2 Study characteristics

References	Stem cells	Quality score (0–20)	Primary endpoint	Study design	<i>N</i>	Population	Follow-up (<i>M</i>)
Blaganje et al. [22]	Autologous MDSC	12.5	Urinary incontinence episodes, number of voids, patient satisfaction, and QoL.	Prospective intervention study. Injection into urethral sphincter with electrical stimulation.	38	Women, mean age 52 years, parity 2, BMI 26.6.	1.5
Surcel et al. [23]	Autologous MDSC	2	Not stated	Prospective intervention study. Injection of stem cells into mid-urethral sphincter.	8	SUI, mean age 54.9 years	12
Sèbe et al. [27]	Autologous MDSC	11.5	Presence of dysuria. Safety at 3 months (flow rate, post-void residual and urine culture)	Randomized prospective intervention study. 3 doses MDSCs.	12	SUI due to ISD, mean age 58, mean BMI 27.6. Female. Failed surgical treatment.	3
Lee et al. [28]	UCSC	10.5	Patients' voiding diaries, and satisfaction	Prospective intervention study. Injection of fibroblast and myoblast into rhabdosphincter and submucosa.	39	SUI; all failed conservative, 1 failed surgical treatment; mean age 51.5 years; para 2.3	Mean 13
Carr et al. [29]	Autologous MDSC	4.5	Voiding diary, pad test, QoL.	Prospective intervention study. Myoblast and fibroblast injection.	8	SUI, mean age 54 years, BMI <30, failed conservative treatment.	Med. 17
Mitterberger et al. [30]	Autologous MDSC	9.5	Incontinence score (voiding diary, pad test, self-report)	Prospective intervention study. Injection of fibroblast and myoblast into rhabdosphincter and submucosa.	63	Men, post-prostatectomy, mean age 68 years	12
Mitterberger et al. [31]	Autologous MDSC	11.5	Incontinence score (voiding diary, pad test, self-report)	Prospective intervention study. Injection of fibroblast and myoblast into rhabdosphincter and submucosa.	20	Women with intrinsic sphincter insufficiency, mean age 49.8	24
Mitterberger et al. [32]	Autologous MDSC	11	Incontinence score (voiding diary, pad test, self-report)	Prospective case series. Injection of fibroblast and myoblast into rhabdosphincter	123	All SUI, failed PFE, 68 previous surgery	12

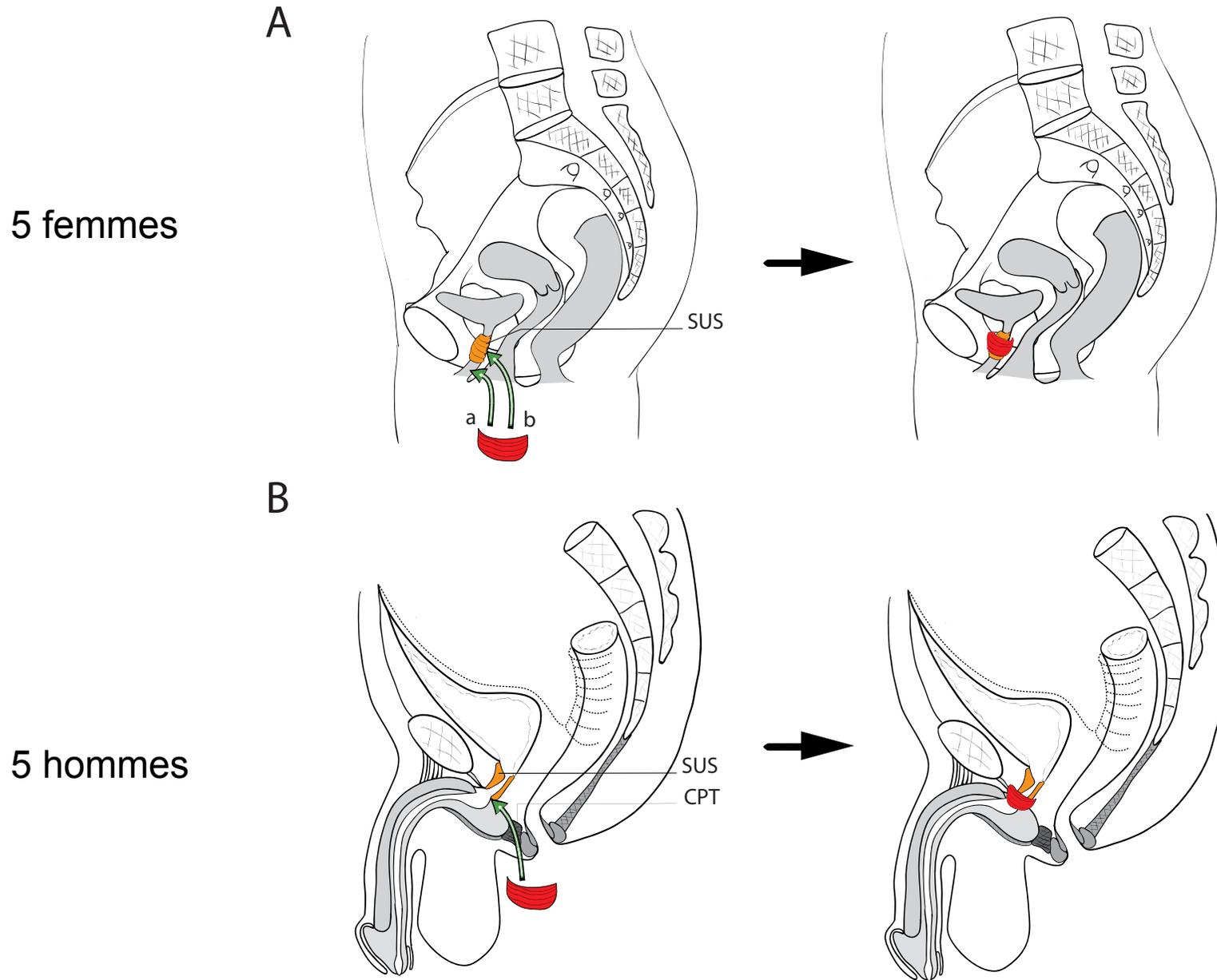
QoL Quality of life

Prospective evaluation of intrasphincteric injections of autologous muscular cells in patients with stress urinary incontinence following radical prostatectomy

Cornu et al. Prog Urol 2011_

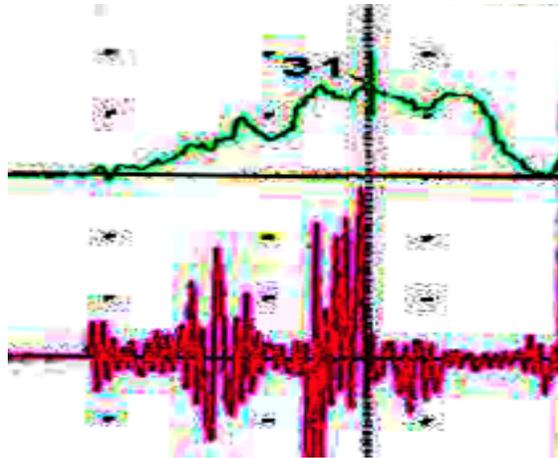
- 12 patients IU post PR. Myoblastes cultivés (Deltoïde)
 - Q(max) variation
 - Effets secondaires
 - Pad test, catalogue mictionnel
 - Qualité de vie
- RESULTATS
 - Pas de complications
 - Résultats fonctionnels hétérogènes:
 - 4/12 patients diminution du nb de fuite
 - **1/12 patient augmentation de la pression de clôture**
 - 8/12 patients amélioration du pad-test.

ESSAI CLINIQUE BTH05006: implantation directe de myofibres+cellules souches sans phase de culture

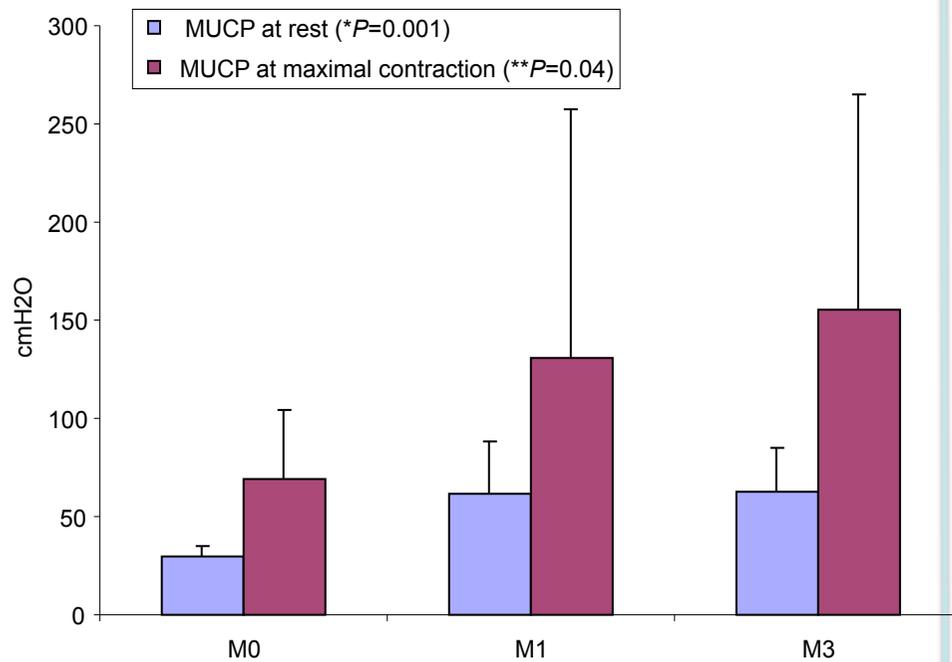


AVANT INTERVENTION

Pression urétrale

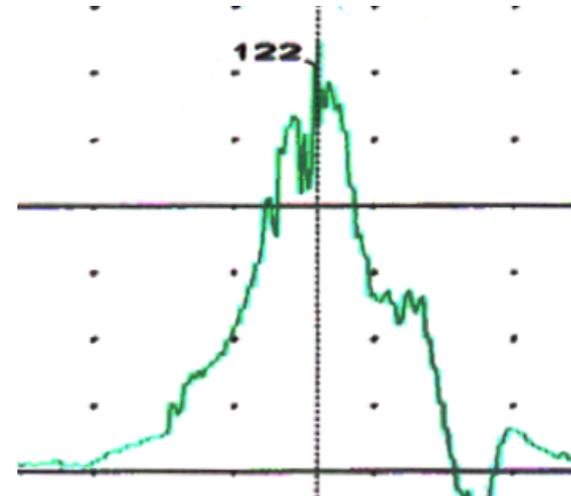


Activité électrique

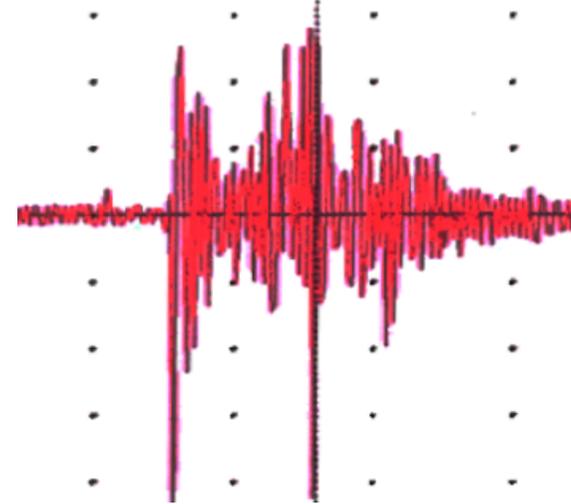


APRÈS INTERVENTION

Pression urétrale

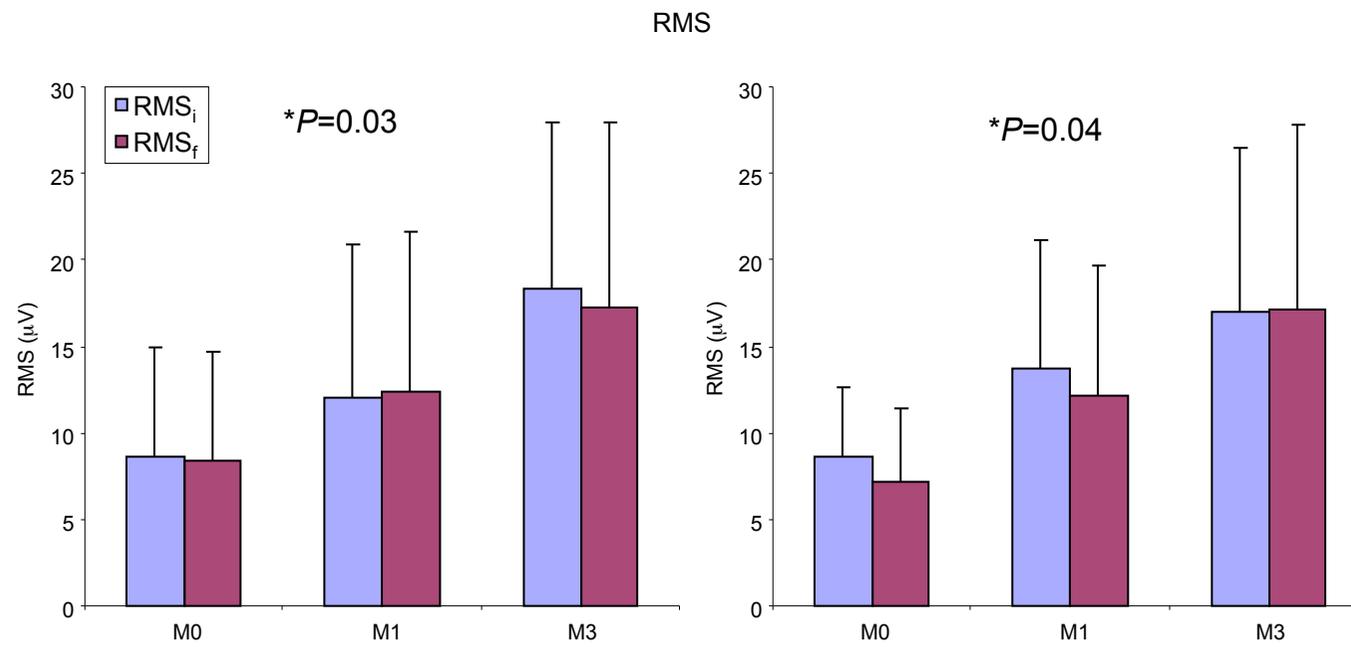


Activité électrique



Sustained contraction at 100 ml

Sustained contraction at 200 ml



Patient # (gender)	Overall population N=10	Women N=5	Men N=5
24-hour pad test (g)			
<ul style="list-style-type: none"> • Preoperative • M1 • M3 • M12 <i>P</i> value rm-ANOVA	217±160 94±71 (**) 111±92 (*) -	140±58 74±66 (**) 56±82 (***) [27±49]	294±199 114±78 167±70 -
	<u>0.0071</u>	<u>0.0004</u>	<u>0.0867</u>
ICIQ score			
<ul style="list-style-type: none"> • Preoperative • M1 • M3 • M12 <i>P</i> value rm-ANOVA	17.5±2.7 11.7±4.9 (**) 13.4±6.9 (*)	17.0±3.9 8.6±4.6 (*) <u>9.2±7.6 (*)</u> [9.6±7.8]	18.0±2.2 14.8±3.1 <u>17.6±2.1</u> -
	<u>0.0033</u>	<u>0.0102</u>	<u>0.0462</u>
Contilife score (daily activities)			
<ul style="list-style-type: none"> • Preoperative • M1 • M3 <i>P</i> value rm-ANOVA	-	21.6±7.3 11.6±4.8 (**) 13.6±7.7 (*)	-
		<u>0.0071</u>	
Urinary bother (UCLA-PCI)			
<ul style="list-style-type: none"> • Preoperative • M1 • M3 <i>P</i> value rm-ANOVA	-	-	1.0±0.0 2.2±1.1 (*) 1.4±0.5
			<u>0.0375</u>

1-year follow-up of autologous muscle-derived stem cell injection pilot study to treat stress urinary incontinence.

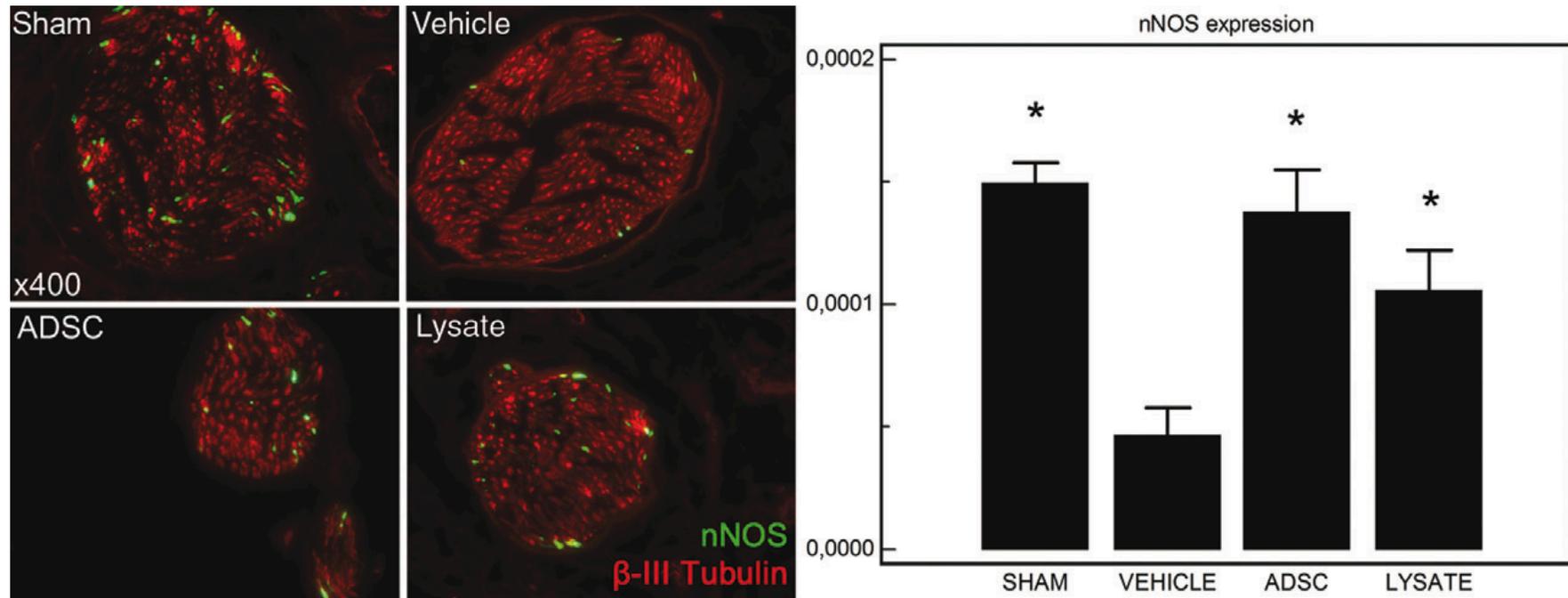
Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct. 2008 Jun;19(6):881-3

Chancellor M et al.

- Injection de cellules souches musculaires
- Amélioration 5/8 femmes dont une guérison
- Début de l'amélioration: **5-8 months** après l'injection

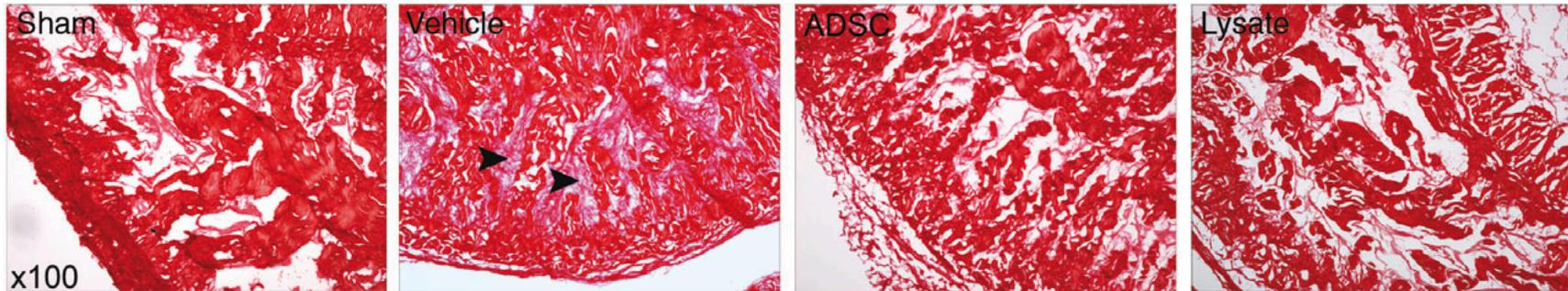
Les cellules souches issues du tissu adipeux

Les cellules souches issues du tissu adipeux produisent des facteurs neurotrophiques

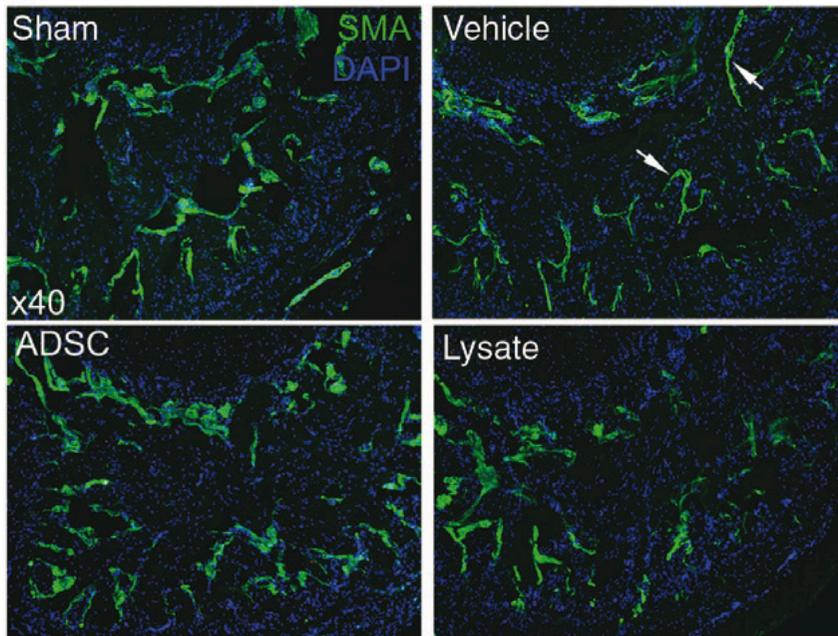


L'injection de cellules souches adipeuses peut faire régresser la fibrose

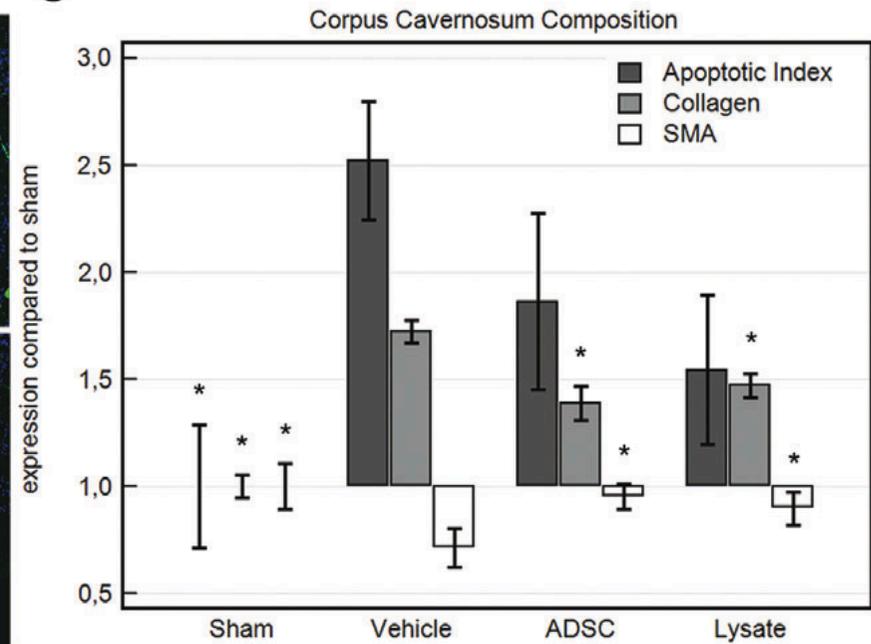
A



B



C



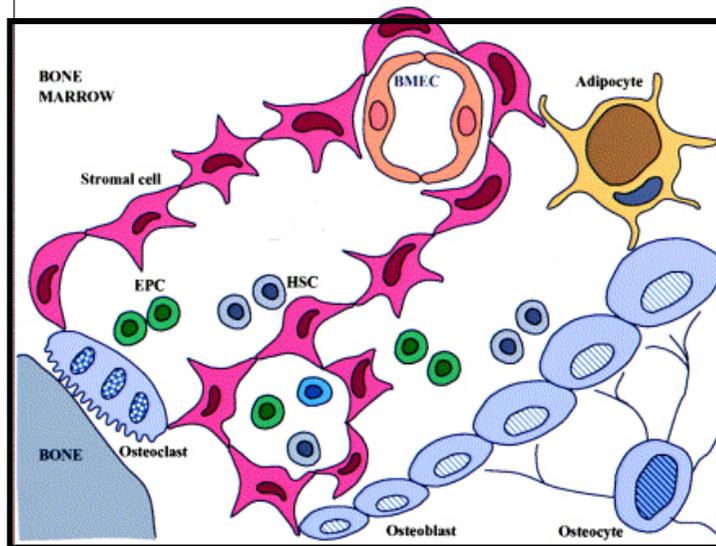
Conclusions

- Mécanismes d'action cellulaire multiples → redéfinir indications, tissu cible, TC en traitement associé/adjuvant?
- Facteurs déterminants:
 - méthode de préparation cellulaire (→ coût/efficacité)
 - autologue ou hétérologue
- Thérapie cellulaire pour l'IU : Niveau de preuve faible mais essais cliniques encourageants

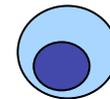


**Mise au point de la thérapie cellulaire pour
la dysfonction érectile après prostatectomie
radicale**

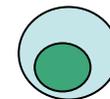
Les cellules souches médullaires



Non adhérente

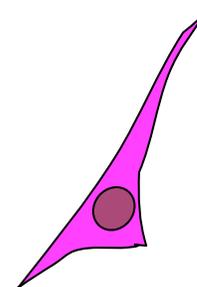


cellules souches
hématopoïétiques

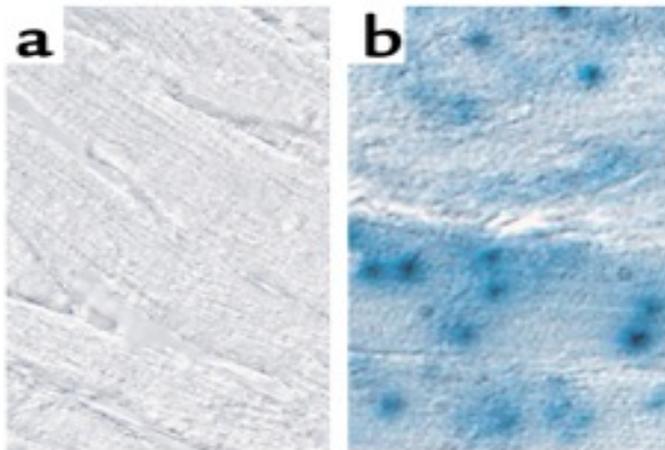
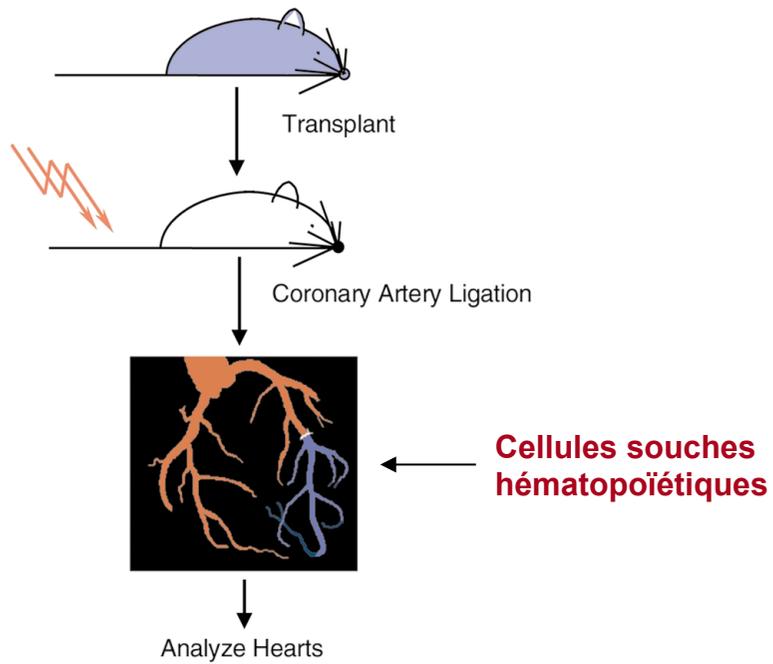


cellules progénitrices
endothéliales (EPC)

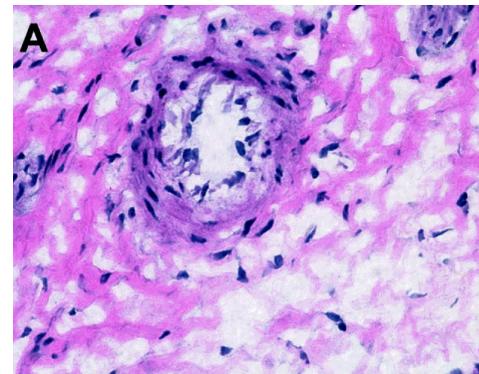
Adhérente



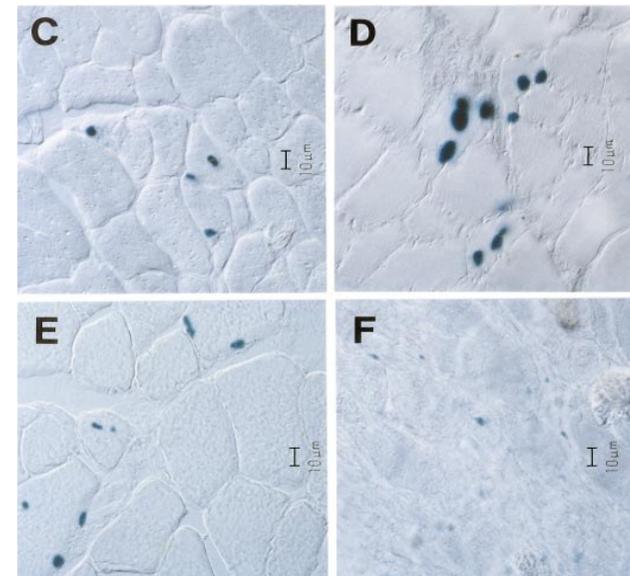
cellules soches
mésenchymateuses



Jackson et al. J Clin Invest 2001

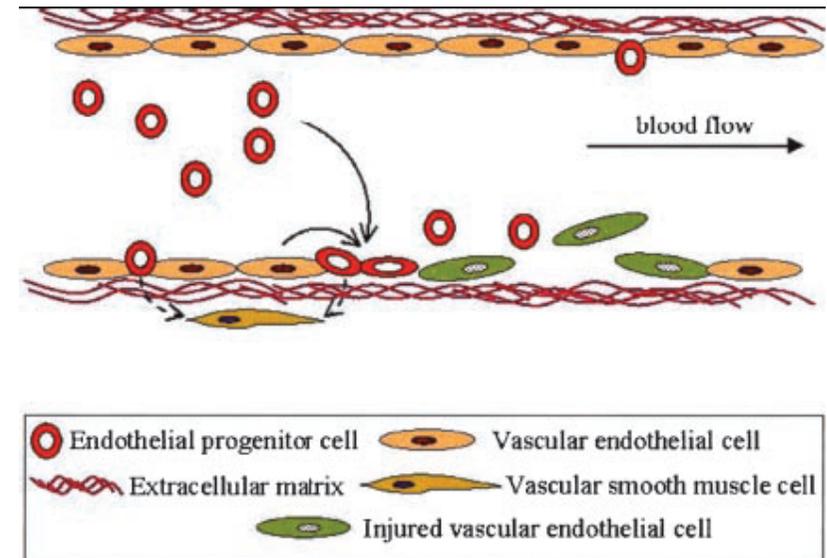
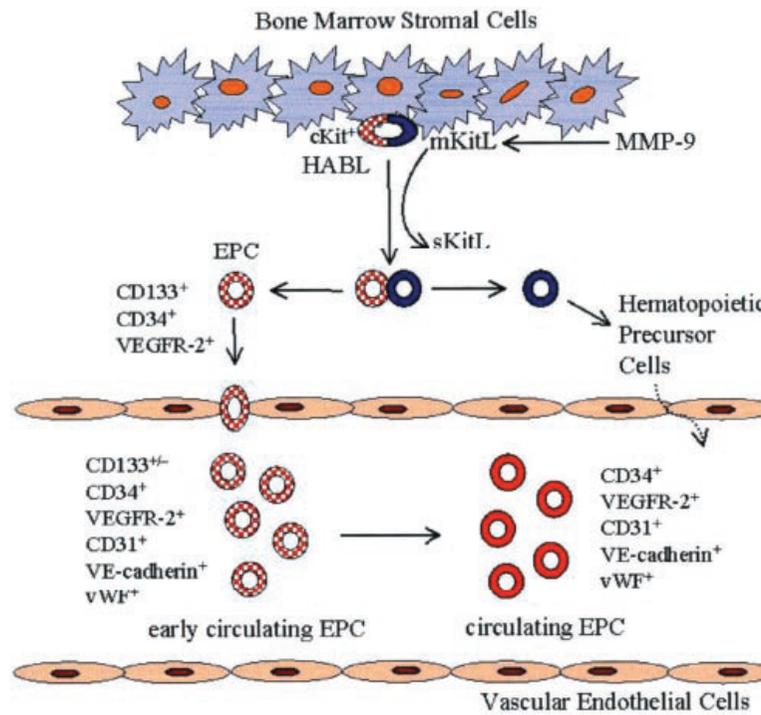


Modèle porc
8 semaines après inj
endocardique **CSM**
dans une région de
nécrose
CSM marquée au DAPI
Association avec la
paroi vasculaire
(Pittenger *Circ Res* 2004;95:9)



Modèle de lésion musculaire chronique
Moelle non fractionnée
Ferrari et al. Science 2001

Cellules progénitrices endothéliales



Diminution du nombre de progéniteurs endothéliaux circulants chez les patients ne récupérant pas une fonction érectile après PR?

Baumhakil M, Werner N, Bohm M, Nickenig G. Circulating endothelial progenitor cells correlate with erectile function in patients with coronary heart disease. Eur Heart J. 2006 Aug 22

- Dysfonction Erectile post Prostatectomie
 - perte de CML
 - cellules conjonctives
 - altération endothélium
 - Insuffisance veineuse et artérielle
 - Déficit NOSe NOSn
 - Ischémie chronique, fibrose
 - Insuffisance de cellules prog. endoth. circulantes (1)

- Cellules médullaires mononuclées:
 - cellules souches hématopoïétiques
 - cellules progénitrices endothéliales
 - cellules stromales



- Multipotentialié (2):
 - CML
 - cellules conjonctives
 - cellules endothéliales

- Secrétions de facteurs pro-angiogéniques neurotrophique (3)

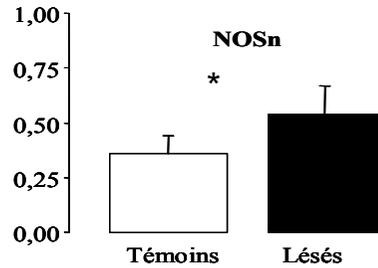
(1) Baumhakel. Circulating endothelial progenitor cells correlate with erectile function in patients with coronary heart disease. Eur Heart J. 2006

(2) Jackson et al. J Clin Invest, 2001

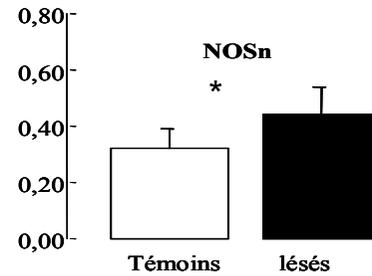
(3) Kinnaird Circ Res 2004

Effets de l'injection intracaverneuse de CMM dans le modèle de dysfonction érectile post-prostatectomie chez le rat

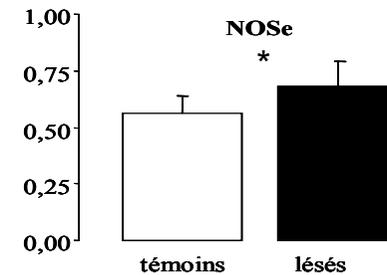
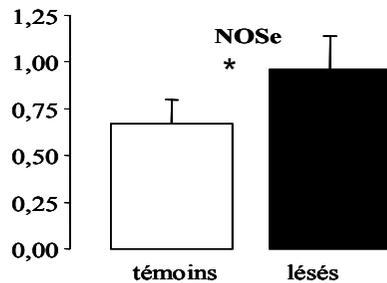
Rats greffés à 3 semaines



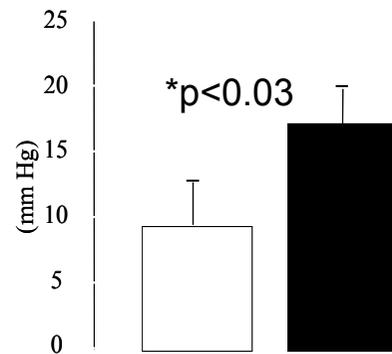
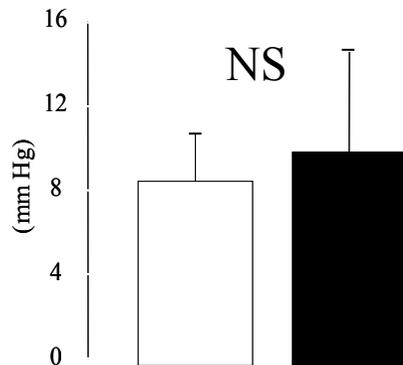
Rats greffés à 5 semaines



Western blot. Histogrammes représentant l'expression relative de la NOSn et de la NOSe à 3 semaines (a,b,c) et à 5 semaines (d,e,f) chez les rats greffés.
• $p < 0,05$ Lésés greffés vs Témoins greffés



L'injection intra caverneuse de CMM entraîne une augmentation significative de la NOS d'origine endothéliale et d'origine nerveuse



Récupération de la fonction érectile après injection de CMM



BT06-07

**« Evaluation de la tolérance et de l'efficacité de
l'injection intra-caverneuse de cellules médullaires
mononuclées autologues pour le traitement de la
dysfonction érectile après prostatectomie radicale »**

INSTIN

« Intracavernous STem-cell INjection for post prostatectomy erectile dysfunction »

Hôpital Henri Mondor – Créteil

**Investigateur Coordonnateur: Pr René Yiou
Responsable scientifique: Dr Hélène Rouard
Promoteur : Inserm – ISP - PRC
N° Clinical trial: NCT01089387**

OBJECTIF PRINCIPAL

Tester la **faisabilité et la tolérance** de l'injection de cellules médullaires mononuclées dans les corps caverneux pour le traitement de la dysfonction érectile (DE) chez des patients opérés de prostatectomie radicale (PR) pour cancer de prostate localisé

OBJECTIFS SECONDAIRES

- **La récupération de la fonction érectile** évaluée à l'aide de questionnaires validés (scores IIEF15, EHS, ULCA-PCI et ISL) remplis avant et après l'injection cellulaire
- **L'amélioration des critères écho-doppler péniens** (20 μ Edex) : PSV basale, 20 min, EDV, RI, *Penile Nitric Oxide Release Test (PNORT)*.
 - Insuffisance artérielle: PSV <25 cm/sec
 - Dysfonction caverno-veineuse:
 - PSV >25 cm/sec
 - EDV>5cm/sec s'accompagnant d'une rapide détumescence
 - RI<0,75

PLAN EXPERIMENTAL (1/2)

Phase	Sélection	Hospitalisation (5 jours) et intervention (injection CMM)	Période d'observation dans l'essai INSTIN		
			M1 : Mois 1	M 3 : Mois 3	M6 : Mois 6
Consentement informé	•				
Critères d'inclusion	•				
Critères d'exclusion	•				
Questionnaires (Scores IIEF15, ISL, UCLA- PCI)*	•		•	•	•
Echo-doppler pénien avec injection de 10µg de PGE1**	•		•	•	•
Reprise des injections intracaverneuses ou IPDE5 si absence d'érection suffisante pour un rapport			•		

La réglementation

- Préparation de thérapie cellulaire
- MTI
- MTI-PP
- (intervention chirurgicale simple)

- **PTC vs MTI : Critères fondamentaux:**
 1. Pas de modification substantielle
 2. Usage homologue/non homologue
 3. Association avec un DM

- **Manipulations non substantielles**

(liste non exhaustive)

- Découpage
- Broyage
- Centrifugation
- Séparation, concentration
- Irradiation
- Filtration
- Lyophilisation
- Congélation
- Cryoconservation
- vitrification

- **Manipulations considérées comme substantielles**

- Culture
- Transfert de gènes
- Modification du génome
- Altération du phénotype

Organismes impliqués



- **URC**: méthodologie
- **CIC biothérapie**: monitoring
- **Promoteur et financement**: INSERM- COSSEC
- **ANSM afssaps**: déclaration des EIG et EI
- **EFS**: préparation des cellules