



HAL
open science

Faisabilité et sécurité de l'injection de cellules souches mésenchymateuses autologues après un accident vasculaire cérébral ischémique dans le cadre d'une étude clinique pilote

Morgane Duparc

► To cite this version:

Morgane Duparc. Faisabilité et sécurité de l'injection de cellules souches mésenchymateuses autologues après un accident vasculaire cérébral ischémique dans le cadre d'une étude clinique pilote. Sciences pharmaceutiques. 2015. dumas-01341696

HAL Id: dumas-01341696

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01341696>

Submitted on 4 Jul 2016

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.

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact au SICD1 de Grenoble : **thesebum@ujf-grenoble.fr**

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

<http://www.cfcopies.com/juridique/droit-auteur>

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

**UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER
FACULTÉ DE PHARMACIE DE GRENOBLE**

Année : 2015

N°

**FAISABILITÉ ET SÉCURITÉ DE L'INJECTION DE CELLULES SOUCHES
MÉSENCHYMATEUSES AUTOLOGUES APRÈS UN ACCIDENT VASCULAIRE
CÉRÉBRAL ISCHÉMIQUE DANS LE CADRE D'UNE ÉTUDE CLINIQUE PILOTE**

**THÈSE
PRESENTÉE POUR L'OBTENTION DU TITRE DE DOCTEUR EN PHARMACIE
DIPLOME D'ÉTAT**

Morgane DUPARC

[Données à caractère personnel]

**THÈSE SOUTENUE PUBLIQUEMENT À LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE
GRENOBLE***

Le 17 novembre 2015

DEVANT LE JURY COMPOSÉ DE

Président du jury :

Monsieur le Professeur Jean-Luc LENORMAND

Membres :

Madame le Docteur Edith SCHIR

Monsieur le Docteur Olivier DETANTE

Madame le Docteur Anaïck MOISAN

**La Faculté de Pharmacie de Grenoble n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.*

Doyen de la Faculté : **M. le Pr. Christophe RIBUOT**

Vice-doyen et Directrice des Etudes : **Mme Delphine ALDEBERT**

Année 2014-2015

ENSEIGNANTS A L'UFR DE PHARMACIE

STATUT	NOM	PRENOM	DEPARTEMENT**	LABORATOIRE
MCU	ALDEBERT	Delphine	D4	LAPM_UMR SNRS 5163
PU-PH	ALLENET	Benoit	D5	THEMAS TIMC-IMAG (UMR CNRS 5525)
PU	BAKRI	Aziz	D5	TIMC-IMAG
MCU	BATANDIER	Cécile	D1	LBFA, Inserm U1055
MCU-PH	BEDOUCH	Pierrick	D5	THEMAS TIMC-IMAG (UMR CNRS 5525)
MCU	BELAIDI-CORSAT	Elise	D5	HP2-Inserm U1042
PAST	BELLET	Béatrice	D5	-
PU	BOUMENDJEL	Ahcène	D3	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	BOURGOIN	Sandrine	D1	CRI Inserm/UJF U823, équipe 5
MCU	BRETON	Jean	D1	L.C.I.B. - UMR E3 CEA/UJF
MCU	BRIANCON-MARJOLLET	Anne	D5	HP2-Inserm U1042
MCU	BUDAYOVA SPANO	Monika	D4	IBS
PU	BURMEISTER	Wim	D4	UVHCI, UMI 3265 UJF-EMBL-CNRS
MCU-PH	BUSSER	Benoit	D1	CRI Inserm/UJF U823, équipe 5
Professeur Emérite	CALOP	Jean	D5	-
MCU	CAVAILLES	Pierre	D1	LAPM
MCU	CHOISNARD	Luc	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
PU-PH	CORNET	Murielle	D4	THEREX, TIMC-IMAG
PU-PH	DANEL	Vincent	D5	SMUR SAMU
PU	DECOUT	Jean-Luc	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	DELETRAZ-DELPORTE	Martine	D5	Equipe SIS « Santé, Individu, Société »-EAM 4128) UCB

UFR de Pharmacie de Grenoble

DOMAINE DE LA MERCI
38706 LA TRONCHE CEDEX – France
TEL : +33 (0)4 76 63 71 72
FAX : +33 (0)4 76 63 71 70

Affaire suivie par Lantou FAURE NEUHAUSER Lanto.Faure@ujf-grenoble.fr



MCU	DEMEILLIERS	Christine	D1	LBFA, Inserm U1055
PU	DROUET	Christian	D4	AGIM - CNRS 3405
PU	DROUET	Emmanuel	D4	UVHCI, UMI 3265 UJF-EMBL-CNRS
MCU	DURMORT-MEUNIER	Claire	D1	I.B.S
PU-PH	FAURE	Patrice	D1	HP2-Inserm U1042
PRCE	FITE	Andrée	D6	-
PRAG	GAUCHARD	Pierre-Alexis	D3	-
MCU-PH	GERMI	Raphaëlle	D4	UVHCI, UMI 3265 UJF-EMBL-CNRS
MCU	GEZE	Annabelle	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	GILLY	Catherine	D3	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
PU	GODIN-RIBUOT	Diane	D5	HP2-Inserm U1042
PRCE	GOUBIER MATHYS	Laurence	D6	-
Professeure Emérite	GRILLOT	Renée	D4	-
MCU	GROSSET	Catherine	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	GUIEU	Valérie	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	HININGER-FAVIER	Isabelle	D1	LBFA, Inserm U1055
MCU	JOYEUX-FAURE	Marie	D5	HP2-Inserm U1042
MCU	KHALEF	Nawel	D5	TIMC-IMAG
MCU	KRIVOBOK	Serge	D3	IRTSV
PU	LENORMAND	Jean Luc	D1	THEREX, TIMC-IMAG
PU	MARTIN	Donald	D1	TIMC-IMAG, UMR 5525 UJF-CNRS
MCU	MELO DE LIMA	Christelle	D4	L.E.C.A
PU-PH	MOSSUZ	Pascal	D4	THEREX, TIMC-IMAG
MCU	MOUHAMADOU	Bello	D3	L.E.C.A
MCU	NICOLLE	Edwige	D3	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	OUKACINE	Farid	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	PERES	Basile	D3	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	PEUCHMAUR	Marine	D3	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
PU	PEYRIN	Éric	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	RACHIDI	Walid	D1	L.C.I.B - UMR E3 CEA/UJF

Mise à jour le 17 novembre 2014 par Lantou FAURE NEUHAUSER

UFR de Pharmacie de Grenoble

DOMAINE DE LA MERCI
38706 LA TRONCHE CEDEX – France
TEL : +33 (0)4 76 63 71 72
FAX : +33 (0)4 76 63 71 70

Affaire suivie par Lantou FAURE NEUHAUSER Lanto.Faure@ujf-grenoble.fr



MCU	RAVELET	Corinne	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
PU	RIBUOT	Christophe	D5	HP2-Inserm U1042
PAST	RIEU	Isabelle	D5	-
Professeure Emérite	ROUSSEL	Anne -Marie	D1	-
PU-PH	SEVE	Michel	D1	CR INSERM / UJF U823 Institut Albert Bonniot
MCU	SOUARD	Florence	D3	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	TARBOURIECH	Nicolas	D4	UVHCI, UMI 3265 UJF-EMBL- CNRS
PAST	TROUILLER	Patrice	D5	-
MCU	VANHAVERBEKE	Cécile	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
PU	WOUESSIDJEWE	Denis	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063

**** D1 : Département « Mécanismes Biologiques des Maladies et des Traitements (DMBMT) »**

D2 : Département « Bases Physicochimiques du Médicament »

D3 : Département « Origine, Obtention et Optimisation des Principes Actifs des Médicaments » (O3-PAM)

D4 : Département « Bases immunologiques, Hématologiques et Infectieuses des Maladies et Médicaments associés »

D5 : Département « Médicaments et Produits de Santé »

D6 : Département « Anglais »

ATER : Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherches
CHU : Centre Hospitalier Universitaire
CIB : Centre d'Innovation en Biologie
CRI : Centre de Recherche Institut
CNRS : Centre National de Recherche Scientifique
DCE : Doctorants Contractuels
DPM : Département de Pharmacochimie Moléculaire et de Cognition et Ontogénèse »
HP2 : Hypoxie Physiopathologie Respiratoire et Cardiovasculaire
IAB : Institut Albert Bonniot, Centre de Recherche « Oncogénèse
IPB :
IBS : Institut de Biologie Structurale
JR : Jean Roget
LAPM : Laboratoire Adaptation et Pathogénèse des Microorganismes
LBFA : Laboratoire Bioénergétique Fondamentale et Appliquée

LCBM : Laboratoire Chimie et Biologie des Métaux
LCIB : Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologie
LECA : Laboratoire d'Ecologie Alpine
LR : Laboratoire des Radio pharmaceutiques
LR : Laboratoire des Radio pharmaceutiques
MCU : Maîtres de Conférences des Universités
MCU-PH : Maîtres de Conférences des Universités et Praticiens Hospitaliers
PAST : Professeur Associé à Temps Partiel
PRAG : Professeur Agrégé
PRCE : Professeur certifié affecté dans l'enseignement
PU : Professeurs des Universités
PU-PH : Professeurs des Universités et Praticiens Hospitaliers
TIMC-IMAG : Laboratoire Technique de l'Imagerie, de la Modélisation
UMR : Unité Mixte de Recherche
UVHCI : Unit of Virus Host Cell Interactions

Mise à jour le 17 novembre 2014 par Lantou FAURE NEUHAUSER

Remerciements

A Monsieur le Professeur Jean-Luc LENORMAND,

Pour me faire l'honneur de présider mon jury de thèse, et pour m'avoir transmis tout au long de mes études votre passion pour les biotechnologies et vos connaissances dans ce domaine.

A Madame le Docteur Edith SCHIR,

Pour avoir accepté sans hésiter d'encadrer ce travail de thèse, malgré ton emploi du temps que je sais plus que chargé. Merci pour ta disponibilité et tes conseils ! J'espère que tu garderas un bon souvenir de ta première externe en Pharmacie !

A Monsieur le Docteur Olivier DETANTE,

Pour m'avoir permis de travailler sur l'essai clinique ISIS dont vous êtes l'investigateur. C'est un honneur de vous compter aujourd'hui parmi mon jury.

A Madame le Docteur Anaïck MOISAN,

Pour avoir accepté que je travaille sur l'aspect production et faisabilité de cet essai clinique, pour m'avoir ouvert les portes de l'Unité de Thérapie Cellulaire de Saint Ismier, ainsi que pour les explications concernant la production des cellules souches.

A Madame le Docteur Marylaure GAVARD,

Pour les explications et relectures de mes données statistiques.

A mes amies de longue date, Pao, Olivia, Marion, ainsi qu'à toute la petite bande d'Annecy, Maxime, Lonni, Thomas, Nitro...

Pour tous les bons moments partagés depuis les années lycée, voire bien avant pour certaines...!

A toutes les personnes rencontrées en Pharma, et plus particulièrement Laura, Jojo, Paul, Maëlle, Fred, Marguerite...

Pour tous les bons et moins bons moments partagés à la fac. Ah, les comptes-rendus de TP et autres projets médicaments...! Et bien sûr pour tous les bons moments partagés en dehors, que j'espère être encore nombreux maintenant que chacun va suivre son chemin.

A Alexis,

Pour m'avoir toujours soutenu pendant ces longues années d'études et m'avoir supporté pendant les grands moments de stress, et je sais que ça n'a pas dû être toujours facile...! Tu m'as toujours encouragé à faire ce que je voulais même si cela a plusieurs fois impliqué des périodes de relation à distance, et je ne te remercierai jamais assez pour ça.

A mon frère,

Pour tes nombreux encouragements pendant les révisions : "Tiens, encore en train de regarder des films sur ton ordi ?", "11h, ah ça fait du bien les grasses mat' pendant les vacances !"

A mes parents et grands-parents,

Pour tout ce que vous avez toujours fait et ce que vous continuez à faire pour moi, mon sale caractère et moi-même ne vous disons pas assez souvent à quel point nous vous en sommes reconnaissants !

A mon arrière grand-mère,

Que j'aurais souhaité avoir à mes côtés aujourd'hui.

Table des Matières

Liste des tableaux et figures	10
Liste des abréviations	11
Glossaire	13
Première partie : Introduction générale	15
1. Introduction et contexte	15
1.1. L'accident vasculaire cérébral (AVC)	15
1.1.1. Définition	15
1.1.2. Epidémiologie de l'AVC	15
1.1.3. Impact économique de l'AVC	17
1.1.4. Physiopathologie de l'AVC et de la récupération post-AVC	17
1.1.4.1. Mécanismes conduisant aux dommages liés à l'AVC	17
1.1.4.2. Neuroprotection endogène post-AVC	18
1.1.4.3. Plasticité et réparation neurale post-AVC	19
1.2. Les traitements de l'AVC	20
1.2.1. Les traitements actuels	20
1.2.1.1. Les traitements de la phase aiguë	20
1.2.1.2. Les traitements en post-AVC	22
1.2.2. Les traitements en développement	23
1.2.2.1. Les neuroprotecteurs	25
1.2.2.2. Les facteurs de croissance	25
1.2.2.3. La thérapie cellulaire par cellules souches	26
2. L'essai clinique ISIS	31
2.1. Conception et organisation de l'étude	31
2.1.1. Données générales de l'étude	31
2.1.2. Organisation de l'étude	32
2.2. Traitement étudié	32
2.2.1. Caractéristiques du traitement	32
2.2.2. Statut réglementaire	33
2.2.3. Procédé de production	33
2.3. Recueil et analyse des évènements indésirables	34

2.3.1. Principe de la vigilance des essais cliniques dans l'étude ISIS	34
2.3.2. Evènements / Effets indésirables à surveiller dans l'étude ISIS.....	36
2.4. Chronologie de l'étude	36
Deuxième partie : Article.....	38
Abstract.....	38
1. Introduction.....	40
2. Materials and Methods.....	43
2.1. Design of the study	43
2.1.1. Study characteristics.....	43
2.1.2. Study objectives and endpoints.....	43
2.1.3. Study conception.....	43
2.1.4. Patient recruitment	44
2.1.5. Study organization	45
2.1.6. Adverse events collection and evaluation	47
2.2. Investigational cell therapy product	48
2.2.1. Treatment characteristics	48
2.2.2. Production process	48
2.2.3. Quality controls and batch release	49
2.3. Clinical trial data analysis.....	52
2.3.1. Feasibility assessment.....	52
2.3.2. Tolerance and safety assessment.....	52
2.3.3. Statistical analysis	52
3. Results	53
3.1. Study execution	53
3.1.1. Flow diagram	53
3.1.2. Summary of patients characteristics	54
3.2. Feasibility assessment.....	56
3.2.1. Inclusion and follow-up of thirty patients.....	56
3.2.2. Achievement of the BM collection for each treated patient	56
3.2.3. Production in adequate quantity and conform to specifications	59
3.2.4. Achievement of the MSCs injections.....	60
3.2.5. Influence of the patient's age	61
3.2.6. Influence of the patient's gender.....	62

3.3. Tolerance and safety assessment	63
3.3.1. Global analysis	63
3.3.2. Immediate adverse events	64
3.3.3. Occurrence of a second stroke	64
3.3.4. Epilepsy.....	65
3.3.5. Infections.....	66
3.3.6. Cancer	67
3.3.7. Mortality.....	67
4. Discussion and Perspectives	68
5. Conclusion	72
Troisième partie : Discussion générale.....	73
1. Résultats de l'essai clinique ISIS	73
1.1. Résumé et discussion des résultats obtenus.....	73
1.1.1. Faisabilité du protocole de thérapie cellulaire	73
1.1.2. Tolérance et sécurité des cellules souches mésenchymateuses.....	75
1.2. Comparaison aux données publiées dans la littérature	76
1.3. Avantages et limites de l'étude	78
1.4. Impact des résultats obtenus	80
1.5. Publication des résultats	81
2. « L'Après ISIS » : Mise en place de l'essai clinique RESSTORE	82
2.1. Conception de l'étude.....	82
2.2. Traitement évalué	83
2.2.1. Caractéristiques du traitement.....	83
2.2.2. Statut réglementaire	83
2.2.3. Procédé de production.....	84
Conclusion.....	85
Bibliographie.....	87
Annexes	95

Liste des tableaux et figures

Figures

Figure 1 : Les dix principales causes de mortalité dans le monde (2012) d'après l'OMS ⁽⁴⁾	16
Figure 2 : Physiopathologie de la récupération post-AVC	18
Figure 3 : Prise en charge lors d'une suspicion d'AVC, d'après Vidal Recos ⁽²⁸⁾	22
Figure 4 : Place des traitements existants et en développement dans le processus de récupération post-AVC	24
Figure 5 : Recueil et analyse des évènements indésirables dans l'étude ISIS	35
Figure 6 : Chronologie de l'étude ISIS	37
Figure 7 : Clinical trial organization summary	46
Figure 8 : Production process summary	50
Figure 9 : Flow diagram of the study	53
Figure 10 : Distribution of serious adverse events (classified in System Organ Class).....	64

Tableaux

Tableau I : Récapitulatif des essais cliniques de thérapie cellulaire dans l'AVC.....	28
Tableau II : Récapitulatif des essais cliniques utilisant des cellules souches mésenchymateuses dans l'AVC	30
Table III : Quality controls, analytical techniques and corresponding specifications.....	51
Table IV : Patients characteristics	55
Table V : Patient's age distribution	56
Table VI : Patient's gender distribution.....	56
Table VII : Evaluation of feasibility criteria	58
Table VIII : Influence of the patient's age on the MSCs proliferative capacity	61
Table IX : Influence of the patient's age on the development of chromosomal abnormalities during production	62
Table X : Influence of the patient's gender on the MSC proliferative capacity	62
Table XI : Influence of the patient's gender on the development of chromosomal.....	63
Table XII : Occurrence of a second stroke in the study population	65
Table XIII : Epilepsy cases in the study population.....	66
Table XIV : Occurrence of infections in the study population	67
Tableau XV : Données de tolérance publiées suite à de précédents essais cliniques	77

Liste des abréviations

ACD	A cid C itrate D extrose
AE	A dverse E vent
AMM	A utorisation de M ise sur le M arché
ANSM	A gence N ationale de S écurité du M édicament et des produits de santé
ATP	A dénosine T riphosphate
AVC	A ccident V asculaire C érébral
BCL	B C ell L ymphoma (protéine de lymphome à cellules B)
BDNF	B rain- D erived N eurotrophic F actor (facteur neurotrophique issu du cerveau)
BM	B one M arrow
BPCO	B roncho- P neumopathie C hronique O bstructive
CD	C luster de D ifférentiation / C luster of D ifferentiation
CFU	C olony- F orming U nit
CHU	C entre H ospitalier U niversitaire
CPP	C omité de P rotection des P ersonnes
CRF	C ase R eport F orm
CSM / MSC	C ellule S ouche M esenchymateuse / M esenchymal S tem C ell
DRCI	D irection de la R echerche C linique et de l' I nnovation
DSMB	D ata S afety M onitoring B oard
EFS	E tablishement F rançais du S ang
EMA	E uropean M edicines A gency (Agence Européenne des Médicaments)
EPO	Erythropoïétine
FBS	F etal B ovine S erum
FGF	F ibroblast G rowth F actor (facteur de croissance des fibroblastes)
GABA	Acide γ -aminobutyrique
GCSF	G ranulocyte- C olony S timulating F actor (facteur stimulant les colonies de granulocytes)
GDNF	G lial cell line- D erived N eurotrophic F actor (facteur neurotrophe dérivé de la glie)
GMP	G ood M anufacturing P ractices
HBPM	H éparine de B as P oids M oléculaire
HBV	H epatitis B V irus (virus de l'hépatite B)

HCV	H epatitis C V irus (virus de l'hépatite C)
HIF	H ypoxia I nducible F actor (facteur induit par l'hypoxie)
HLA	H uman L eukocyte A ntigen (antigènes des leucocytes humains)
HSP	H eat S hock P rotein (protéine de choc thermique)
HTA	H ypertension A rtérielle
hTERT	h uman T elomerase R everse T ranscriptase
HTLV	H uman T - L ymphotropic V irus (virus T-lymphotropique humain)
IC	I nfarctus C érébral
IC / CI	I ntervalle de C onfiance / C onfidence I nterval
IL	I nterleukine / I nterleukin
IRM / MRI	I magerie par R ésonance M agnétique / M agnetic R esonance I maging
IV	I ntraveineuse / I ntravenous
MCB	M aster C ell B ank
MHC	M ajor H istocompatibility C omplex
MTI	M édicament de T hérapie I nnovante
NIHSS	N ational I nstitute of H ealth S troke S core
NOS	N itric O xide S ynthase (oxyde nitrique synthase)
OMS / WHO	O rganisation M ondiale de la S anté / W orld H ealth O rganization
PCR	P olymerase C hain R eaction
RAS	R apport A nnuel de S écurité
rtPA	r ecombinant t issue P lasminogen A ctivator
SAE	S erious A dverse E vent
SCF	S tem C ell F actor (facteur de croissance des cellules souches)
SDF	S tromal cell- D erived F actor
SOC	S ystem O rgan C lass
SUSAR	S uspected U nexpected S erious A dverse R eaction
TDM	Tomodensitométrie
TGFβ	T ransforming G rowth F actor β (facteur de croissance transformant β)
UNV	U nité N eurovasculaire
VEGF	V ascular E ndothelial G rowth F actor (facteur de croissance de l'endothélium vasculaire)
VIH / HIV	V irus de l' I mmunodéficience H umaine / H uman I mmunodeficiency V irus
WCB	W orking C ell B ank

Glossaire

Anévrisme : dilatation d'un vaisseau sanguin liée à une faiblesse de la paroi vasculaire.

Angiogenèse : processus de croissance de nouveaux vaisseaux sanguins (néovascularisation) à partir des vaisseaux existants.

Apoptose : aussi appelée mort cellulaire programmée, processus normal d'autodestruction d'une cellule en réponse à un signal interne.

Athérome : association de remaniement de l'intima des artères de gros et moyen calibre consistant en une accumulation focale de lipides, glucides complexes, de sang et de dépôts calcaire, avec remaniements de la média.

Cellules gliales ou glie : cellules qui forment l'environnement des neurones. On en distingue quatre principaux types : les astrocytes, les oligodendrocytes, les cellules de Schwann et la microglie.

Comité de surveillance indépendant (en anglais DSMB pour Data Safety Monitoring Board) : groupe indépendant d'experts chargé de surveiller les données d'un essai clinique concernant la sécurité des patients et l'efficacité du traitement.

Ectoderme : feuillet embryonnaire externe qui forme les couches externes (épiderme, muqueuses, dents) et une partie du système nerveux et sensoriel (oreille interne, cristallin de l'œil).

Excitotoxicité : phénomène de mort cellulaire induite par des acides aminés excitateurs, principalement le glutamate.

Facteur de transcription : protéine qui régule l'expression des gènes, soit en activant, soit en inhibant la transcription.

Fibrine : protéine contenue dans le plasma sanguin qui est responsable de la coagulation, formée par l'action de la thrombine sur le fibrinogène.

Fibroblaste : Cellule du tissu conjonctif qui sécrète les composés de la matrice extracellulaire (laminine, fibronectine, collagène...) et les protéines du tissu conjonctif.

Grefe allogénique : donneur et receveur génétiquement différents mais appartenant à la même espèce.

Grefe autologue : donneur identique au receveur.

Grefe xénogénique : donneur et receveur n'appartenant pas à la même espèce.

Kinase : enzyme du groupe des transférases catalysant les réactions de phosphorylation par l'ajout d'un ion phosphate à une molécule cible à partir de l'ATP.

Mésoderme : feuillet embryonnaire intermédiaire, les cellules qui en dérivent forment en tout ou partie les organes internes à l'exception du système nerveux et des organes des systèmes digestif et respiratoire.

Neurogénèse : processus de création de neurones fonctionnels à partir de cellules souches neurales.

Neurotransmetteur : substance chimique produite par l'organisme, et permettant aux neurones de transmettre l'influx nerveux entre eux ou entre un neurone et une autre variété de cellules de l'organisme (muscles, glandes).

Paracrine : mode de signalisation cellulaire impliquant des messagers chimiques qui agissent dans le voisinage de la cellule qui les a synthétisés.

Plasmine : peptidase catalysant l'hydrolyse des liaisons peptidiques situées préférentiellement après un résidu de lysine ou un résidu d'arginine. Cette enzyme intervient en lysant la fibrine dans le processus de fibrinolyse, étape indispensable de la coagulation sanguine.

Score NIHSS (National Institute of Health Stroke Score) : échelle décrite par T. Brott en 1989 pour évaluer les patients ayant un accident ischémique cérébral en phase aiguë. Ce score prend en compte différents critères : le niveau de conscience, l'oculomotricité, la vision, la paralysie faciale, la motricité et l'ataxie des membres, la sensibilité, le langage... et permet d'évaluer le volume de tissu cérébral infarci et de prédire le handicap résiduel.

Synaptogénèse : processus de création de synapses entre des neurones.

Vasculogénèse : migration, différenciation et association des cellules progénitrices vasculaires pour former des vaisseaux sanguins primitifs.

Première partie : Introduction générale

1. Introduction et contexte

1.1. L'accident vasculaire cérébral (AVC)

1.1.1. Définition

Un accident vasculaire cérébral ou AVC, est une perte soudaine de la fonction cérébrale, provoquée par un arrêt brutal de la circulation sanguine dans une zone cérébrale plus ou moins importante. L'interruption de la circulation du sang ne permet plus un apport suffisant en oxygène et en éléments nutritifs, ce qui entraîne, lorsque l'arrêt se prolonge, la mort des cellules cérébrales au niveau de la zone touchée. La gravité de l'accident vasculaire cérébral dépend de la localisation ainsi que de l'étendue des zones cérébrales atteintes, mais aussi de la rapidité de la prise en charge qui va impacter la durée de l'interruption de la circulation ⁽¹⁾.

On peut distinguer deux types principaux d'accidents vasculaires cérébraux. Les plus fréquents sont les AVC ischémiques, qui représentent 80% des AVC. Dans ce cas, l'interruption de la circulation du sang est due à la présence d'une plaque d'athérome ou d'un caillot de sang qui vient boucher une artère à destination du cerveau. On parlera alors respectivement de thrombose cérébrale ou d'embolie cérébrale, selon la cause de l'ischémie. Le deuxième type d'AVC est l'AVC hémorragique. Ces derniers sont plus rares (20% des AVC) et sont causés par la rupture d'un vaisseau sanguin au niveau cérébral ou méningé. Les causes principales de ces AVC sont la rupture d'anévrisme et l'hypertension artérielle ⁽²⁾.

1.1.2. Epidémiologie de l'AVC

Au niveau mondial, on recense environ 17 millions de cas d'AVC chaque année, ce qui représente une incidence de 1 à 4/1000 par an. S'il s'agit principalement d'une pathologie du sujet âgé, on dénombre tout de même 31% des cas qui surviennent avant l'âge de 64 ans ⁽³⁾. En termes de mortalité, l'OMS estime que l'AVC représente la seconde cause de mortalité à travers le monde, avec 6.7 millions de décès en 2012, juste derrière les cardiopathies ischémiques, qui représentaient 7.4 millions de décès (Figure 1) ⁽⁴⁾. Mais la mortalité importante n'est pas la seule conséquence, puisque l'accident vasculaire cérébral est

également la première cause de handicap et d'incapacité sévère de l'adulte. On estime en effet que 60 à 70% des patients survivants à un AVC présentent une invalidité résiduelle.

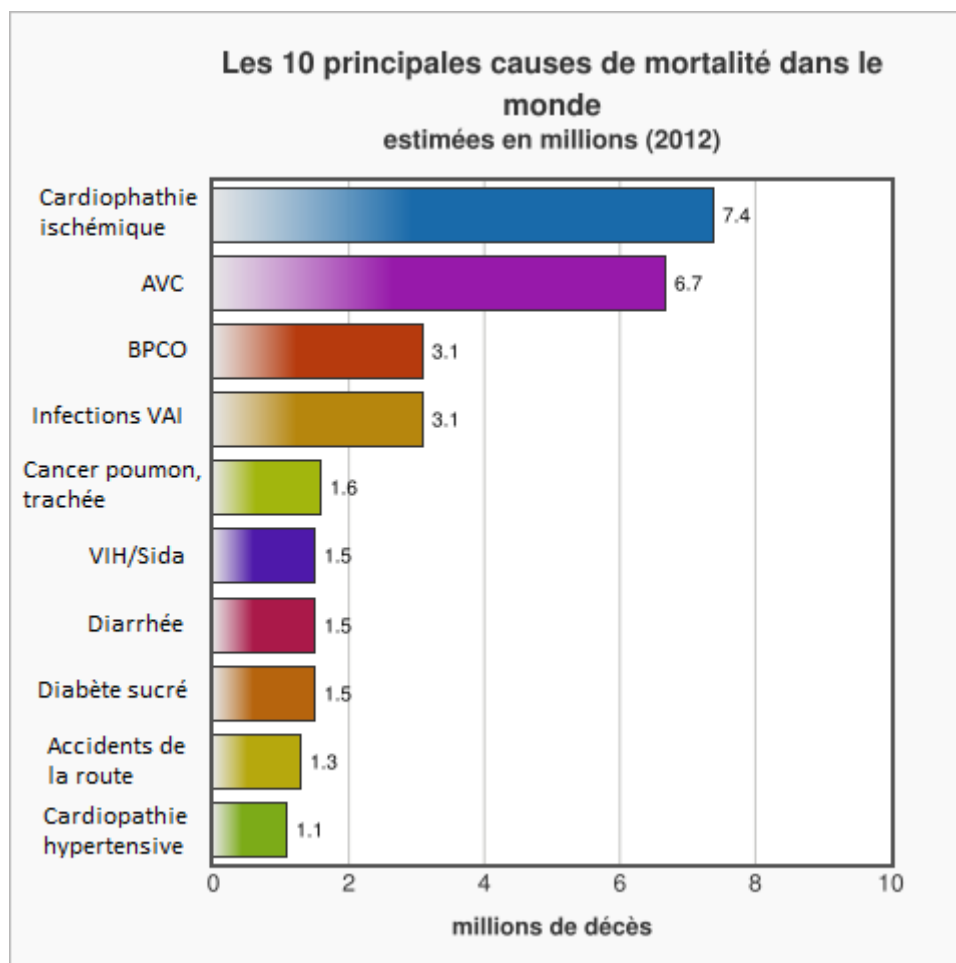


Figure 1 : Les dix principales causes de mortalité dans le monde (2012) d'après l'OMS ⁽⁴⁾

BPCO : broncho-pneumopathie chronique obstructive; VAI : voies aériennes inférieures, VIH : virus de l'immunodéficience humaine

Au niveau national, des données épidémiologiques ont été publiées en 2013 par le Ministère de la Santé ⁽⁵⁾. Concernant l'incidence de la pathologie, il y a eu en 2010 en France un peu plus de 110 000 hospitalisations pour AVC. L'âge moyen de survenue a été estimé à 73 ans (70 ans pour les hommes et 76 ans pour les femmes), avec le quart des AVC concernant des personnes de moins de 65 ans.

Si l'on compare les chiffres de 2010 à ceux de 2002, le nombre de personnes hospitalisées pour AVC a augmenté de 16,5% mais le taux standardisé sur l'âge a globalement diminué de 6,9%, ce qui indique que cette augmentation est essentiellement liée au vieillissement de la population. Par contre, il est important de noter une augmentation du taux d'AVC avant 65 ans (+14,0%), concernant plus les femmes (+17,7%) que les hommes (+12,2%), à mettre en parallèle avec une diminution de l'espérance de vie en bonne santé (sans incapacité).

Concernant la mortalité, l'AVC représente la troisième cause de mortalité pour les hommes (après les cancers et les cardiopathies ischémiques) et la première pour les femmes. En termes de handicap, l'AVC est souvent responsable de séquelles qui peuvent être motrices, sensibles, sensorielles et cognitives, et qui affectent la qualité de vie des patients. Ainsi, on estime que près de 60% des personnes ayant survécu à un AVC présentent des symptômes un mois après l'épisode. Ceci correspond à 505 000 personnes présentant des séquelles sur les 771 000 personnes avec antécédent d'AVC sur le territoire national. Les séquelles les plus fréquemment déclarées par les patients sont, dans l'ordre : des troubles de l'équilibre, de la mémoire, des paralysies ou parésies d'un ou plusieurs membres, et des troubles du langage.

1.1.3. Impact économique de l'AVC

La persistance d'un handicap chez plus de la moitié des patients a d'importantes répercussions en termes d'économie de la santé. En effet, afin d'évaluer l'impact économique de l'AVC, le calcul doit prendre en compte les coûts de l'hospitalisation initiale, ainsi que tous les coûts liés aux soins de suite pour les patients survivants (rééducation, traitements de prévention secondaire, soins infirmiers, visites médicales,...). Mais il faut aussi prendre en considération les coûts indirects liés à la maladie (perte de productivité pour les patients actifs, temps consacré par les aidants familiaux,...). En tenant compte de ces différents critères, le coût des AVC en France a été estimé à 5.3 milliards d'euros en 2007, ce qui représentait 3% des dépenses totales de santé ⁽⁶⁾. Ce coût représente une charge très importante pour la sécurité sociale. A titre de comparaison, le coût des AVC aux Etats-Unis a été estimé à 34 milliards de dollars par an ⁽⁷⁾ (soit environ 30 milliards d'euros), et celui des AVC au Royaume Uni à 8.9 milliards de livres par an ⁽⁸⁾ (soit environ 12 milliards d'euros).

1.1.4. Physiopathologie de l'AVC et de la récupération post-AVC

1.1.4.1. Mécanismes conduisant aux dommages liés à l'AVC

Dès les premières minutes suivant l'AVC, divers phénomènes ont lieu, notamment des dépolarisations neuronales, une augmentation de divers(es) molécules et neurotransmetteurs (calcium, potassium, glutamate,...), des phénomènes d'excitotoxicité et une augmentation des radicaux libres. Ces phénomènes sont responsables de processus d'apoptose, d'inflammation et de nécrose, qui aboutissent à la mort des cellules cérébrales et aux dommages consécutifs.

L'ensemble de ces phénomènes est contrebalancé par des mécanismes de protection et d'adaptation qui se mettent en place rapidement et spontanément afin de limiter les conséquences de l'AVC. On peut ainsi définir dans un premier temps des mécanismes de neuroprotection endogène, puis des phénomènes de plasticité et de réparation neurale.

Ces mécanismes sont résumés dans la figure suivante (Figure 2) ⁽⁹⁾, la partie du haut représentant les mécanismes conduisant aux dommages de l'AVC, et la partie du bas les mécanismes de protection et de réparation mis en place par l'organisme.

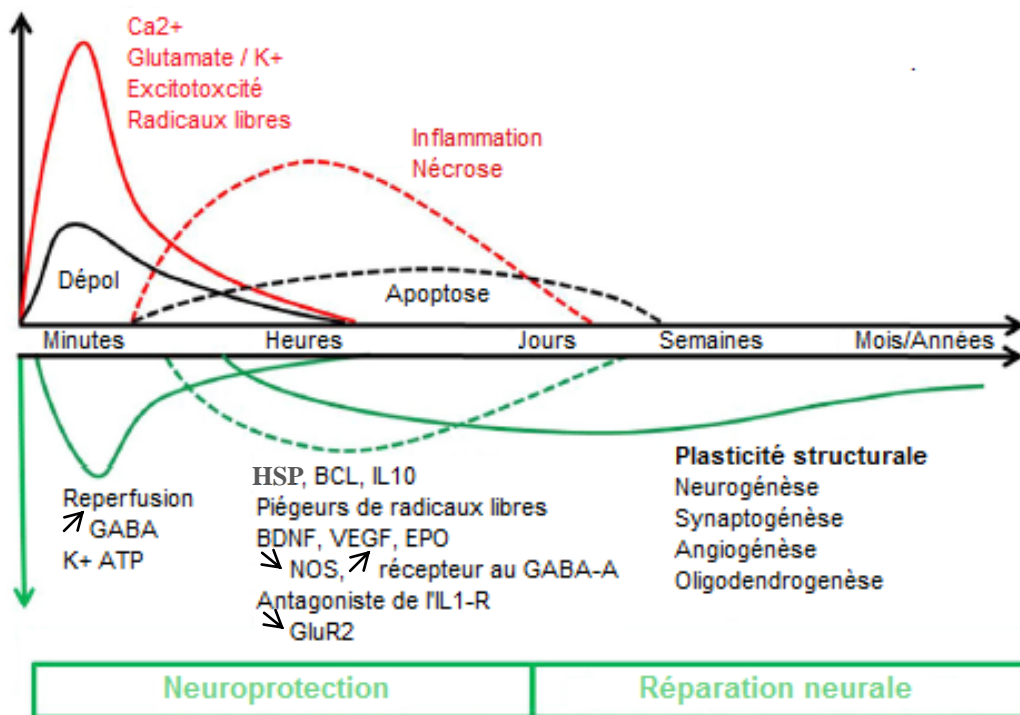


Figure 2 : Physiopathologie de la récupération post-AVC

ATP : adénosine triphosphate ; BCL : protéine de lymphome à cellules B (B Cell Lymphoma) ; BDNF : facteur neurotrophique issu du cerveau (Brain-Derived Neurotrophic Factor) ; Ca^{2+} : calcium ; EPO : érythropoïétine ; GABA : acide γ -aminobutyrique ; GluR2 : récepteur au glutamate ; HSP : protéine de choc thermique (Heat Shock Protein) ; IL : interleukine ; K^+ : potassium ; NOS : oxyde nitrique synthase ; VEGF : Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (Vascular Endothelial Growth Factor)

1.1.4.2. Neuroprotection endogène post-AVC

Dans les heures, voire les minutes suivant un AVC, plusieurs mécanismes protecteurs endogènes se mettent en place spontanément ⁽¹⁰⁾. On peut tout d'abord définir une phase aigüe, au cours de laquelle il se produit une activation de canaux, récepteurs et régulateurs dits « anti-excitotoxiques » dans le but de contrebalancer les phénomènes d'excitotoxicité. Il s'agit notamment de l'acide γ -aminobutyrique (GABA) et des récepteurs au potassium. Dans un deuxième temps se met en place une phase de transduction, qui correspond à l'amplification de kinases, de facteurs de transcription et de facteurs de croissance (facteur stimulant les

colonies de granulocytes (GCSF), facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF), facteur neurotrophique issu du cerveau (BDNF),...). Pour finir, il se produit une augmentation de molécules anti-apoptotiques (HSP70, BCL2, HIF1,...), anti-inflammatoires (IL10, TGFβ1) et anti-oxydatives (α -tocophérol, vitamine C), qui vont stimuler les processus de réparation neurale ⁽¹¹⁾.

1.1.4.3. Plasticité et réparation neurale post-AVC

Lors de la récupération à la suite d'un AVC, le cerveau fait preuve d'une importante plasticité structurale ^{(12) (13)}, les tissus survivants étant capables de participer à la réorganisation des réseaux endommagés, ainsi qu'à la neuro-synaptogénèse, avec des phénomènes de pousse axonale pouvant persister pendant plusieurs mois ^{(14) (15)}. L'AVC entraîne également une augmentation de la neurogénèse à partir des cellules souches neurales, qui génèrent des neuroblastes capables de migrer vers la lésion et de se transformer en neurones matures ⁽¹⁶⁾.

Ces phénomènes de neurogénèse sont intimement liés à l'angio-vasculogénèse. Tout d'abord, les cellules endothéliales sont capables de libérer des facteurs qui stimulent l'auto-renouveau des cellules souches neurales et augmentent la production de neurones ⁽¹⁷⁾. Ensuite, après un AVC, les micro-vaisseaux changent de taille et de densité, ce qui stimule la plasticité neuronale ⁽¹⁸⁾. Ainsi, les neuroblastes migrent préférentiellement au niveau des vaisseaux présentant un remodelage vasculaire ⁽¹⁹⁾. A l'inverse, les neuroblastes augmentent l'angiogénèse via la libération de VEGF ⁽²⁰⁾, ce qui démontre une relation bidirectionnelle entre les remodelages vasculaire et neuronal.

Un autre aspect est le rôle clé joué par les cellules gliales. D'une part, les astrocytes sont capables d'éliminer les molécules et neurotransmetteurs impliqués dans les phénomènes d'excitotoxicité, mais également de moduler la synaptogénèse en augmentant la formation de synapses fonctionnelles ⁽²¹⁾. D'autre part, les progéniteurs oligodendrocytaires se différencient en oligodendrocytes matures ce qui permet la remyélinisation des axones ⁽²²⁾. Finalement, la microglie joue également un rôle important, en diminuant les phénomènes inflammatoires ainsi qu'en libérant des facteurs trophiques (notamment le BDNF) qui favorisent la synaptogénèse ⁽²³⁾.

Ces mécanismes sont cependant complexes, et la neurogénèse post-AVC reste relativement faible, d'autant plus que beaucoup de ces neurones nouvellement formés ne survivent pas. Le résultat est une récupération incomplète, responsable des séquelles de l'AVC.

Le développement de thérapies permettant d'améliorer cette récupération est donc nécessaire, mais impose une compréhension fine des mécanismes impliqués dans le remodelage cérébral post-AVC.

1.2. Les traitements de l'AVC

1.2.1. Les traitements actuels

1.2.1.1. Les traitements de la phase aigüe

Lors de la suspicion d'un AVC chez un patient, ce dernier doit être dirigé sans délai vers l'Unité Neurovasculaire (UNV) la plus proche, ou à défaut vers un établissement ayant structuré une filière de prise en charge des patients suspects d'AVC en coordination avec une UNV ⁽²⁴⁾. Dans ce type de structure, le patient pourra avoir accès aux dispositifs de diagnostic et de traitement adaptés.

A l'arrivée du patient, la première étape consiste à confirmer le diagnostic d'AVC et à préciser s'il s'agit d'un AVC ischémique ou hémorragique, afin d'orienter la prise en charge qui est complètement différente. Cette étape de diagnostic est réalisée par imagerie ⁽²⁵⁾. L'IRM est utilisée de façon privilégiée, car il s'agit de l'examen le plus performant pour montrer précocement des signes d'ischémie récente, et il permet également de visualiser les hémorragies intracrâniennes. En cas d'impossibilité d'accéder en urgence à l'IRM, un scanner cérébral peut aussi être réalisé. Cet examen ne montre qu'inconstamment des signes d'ischémie récente, mais permet de visualiser une hémorragie intracrânienne ⁽²⁴⁾.

S'il s'agit d'un AVC hémorragique, la prise en charge consiste à évacuer l'hématome formé et à drainer le liquide céphalo-rachidien afin de diminuer la pression intracrânienne. En cas d'anévrisme, le chirurgien peut également avoir recours au clippage ou à l'embolisation.

Concernant les AVC ischémiques, le traitement de référence en urgence est la thrombolyse, qui consiste en l'administration par voie veineuse d'une molécule nommée rtPA (pour « recombinant tissue plasminogen activator » ou « activateur tissulaire du plasminogène recombinant ») ou altéplase, capable de dissoudre le caillot sanguin obstruant l'artère. Il s'agit d'une glycoprotéine qui active la biotransformation du plasminogène en plasmine. Après administration intraveineuse, l'altéplase circulante reste relativement inactive. Elle n'est activée qu'après liaison à la fibrine et induit alors la conversion du plasminogène en plasmine, entraînant ainsi la dissolution du caillot de fibrine ⁽²⁶⁾. L'utilisation de cette molécule est

cependant limitée, d'une part parce qu'elle n'a montré son efficacité que lors d'une administration très précoce. Ainsi, on considère que son utilisation est limitée aux AVC ayant eu lieu moins de 4h30 avant l'initiation du traitement, l'AMM stipulant d'ailleurs dans les contre-indications « *symptômes d'accident vasculaire cérébral ischémique apparus plus de 4h30 avant l'initiation du traitement ou dont l'heure d'apparition est inconnue et pourrait potentiellement être supérieure à 4h30* ». D'autre part, les contre-indications à ce traitement sont très nombreuses, et notamment tout risque hémorragique élevé contre-indique la thrombolyse ⁽²⁴⁾. Au final, très peu de patients (2 à 4%) peuvent recevoir ce traitement en temps opportun ⁽²⁷⁾. En dehors de cette option thérapeutique, peu d'alternatives existent et la prise en charge d'un AVC ischémique est ainsi souvent limitée à une surveillance des paramètres vitaux et aux soins d'urgence classiques ainsi qu'à quelques traitements non spécifiques (traitement antithrombotique par aspirine, prévention des complications thromboemboliques veineuses par héparines de bas poids moléculaire).

Ce schéma de prise en charge de l'AVC en phase aigüe doit être systématiquement appliqué dans le cadre d'une suspicion d'AVC, et apparaît dans les recommandations de bonnes pratiques pour les professionnels de santé (Figure 3) ⁽²⁸⁾.

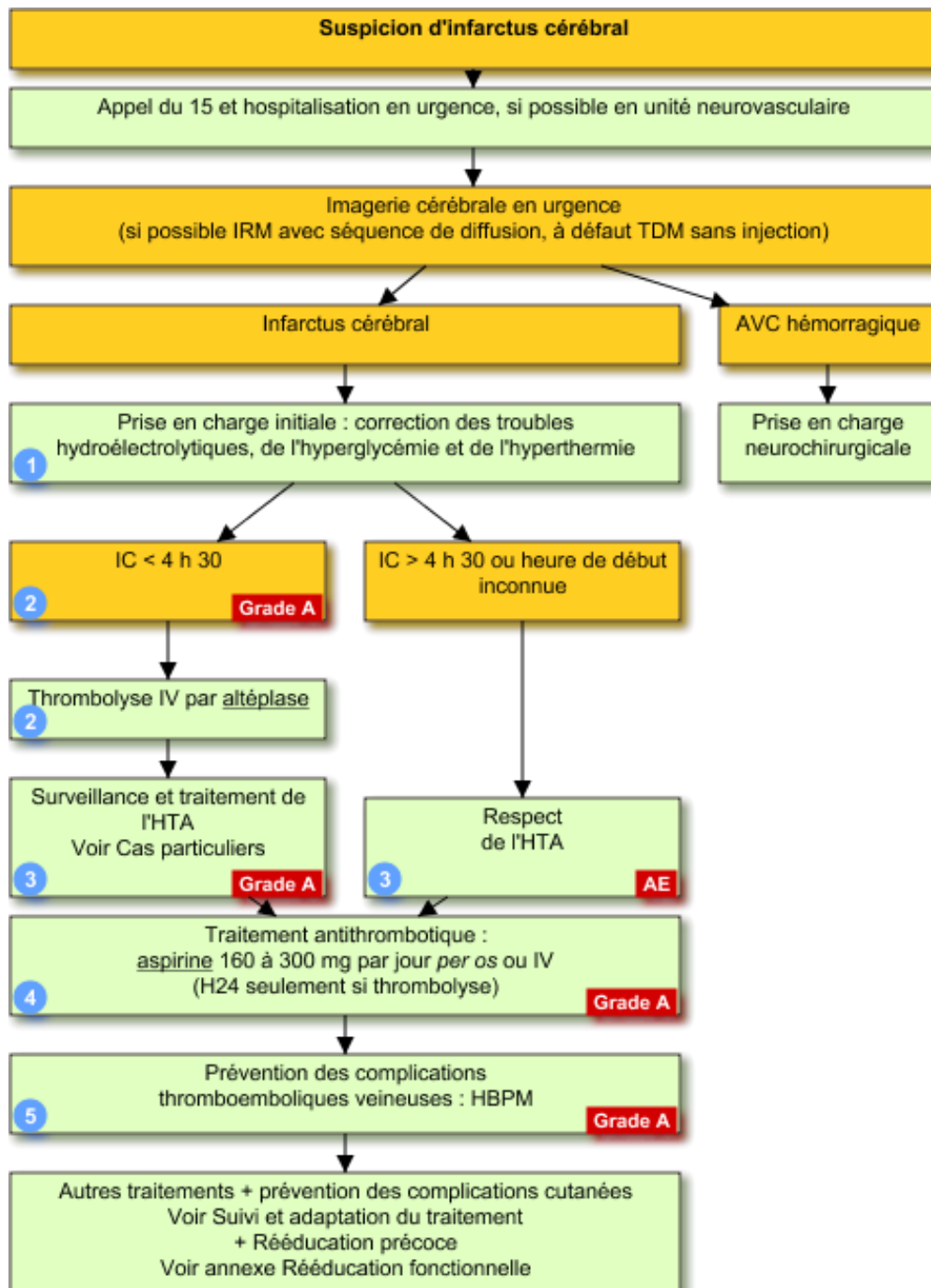


Figure 3 : Prise en charge lors d'une suspicion d'AVC, d'après Vidal Recos ⁽²⁸⁾

HBPM : Héparine de Bas Poids Moléculaire ; HTA : hypertension artérielle ; IC : Infarctus Cérébral ; IRM : Imagerie par Résonance Magnétique ; IV : intraveineuse ; TDM : tomodensitométrie

1.2.1.2. Les traitements en post-AVC

Le principal « traitement » en post-AVC est non médicamenteux, puisqu'il s'agit de la rééducation. Elle a pour objectif de permettre au patient de regagner le maximum d'autonomie, et doit commencer le plus rapidement possible, dès que l'état de santé le permet. Elle débute à l'hôpital, puis se poursuit à domicile ou en centre spécialisé, selon les cas. La

rééducation a trois objectifs principaux. Le premier objectif consiste à éviter l'apparition de complications supplémentaires. En effet, sans la rééducation, un raidissement progressif des membres chez une personne paralysée peut survenir. Une sorte de tic de la parole, avec répétition automatique de mots chez une personne aphasique, peut également apparaître dès les premiers jours suivant l'accident vasculaire cérébral. Ces complications aggravent le handicap. Elles peuvent être évitées par une rééducation précoce. Le second objectif est la récupération maximale des différentes fonctions : marche, usage de la main, langage... Enfin, le troisième objectif est d'apprendre à la personne, quel que soit son degré de récupération, à utiliser au mieux ses fonctions restantes dans les situations de la vie quotidienne (toilette, habillage, préparation des repas, conduite de la voiture...) ⁽¹⁾.

La rééducation intervient en favorisant et en renforçant le processus de plasticité et de réparation neurale expliqué précédemment (cf. 1.1.3.3. Plasticité et réparation neurale post-AVC) ^{(29) (30)}. Si les bénéfices de ces exercices sont très importants, des séquelles persistent chez de nombreux patients malgré la rééducation.

Le deuxième aspect des traitements en post-AVC concerne la prévention secondaire. Le but est d'éviter la survenue d'un second accident vasculaire. Ainsi, la plupart des patients ayant présenté un AVC ischémique se verront prescrire un antiagrégant plaquettaire, voire un anticoagulant (uniquement en cas de fibrillation auriculaire). De plus, la prévention secondaire comprend également tous les moyens de correction des facteurs de risque cardiovasculaires, qu'ils soient médicamenteux (traitement du diabète, de l'hypertension artérielle, du cholestérol), ou non médicamenteux (perte de poids, sevrage tabagique, diminution de la consommation d'alcool) ⁽¹⁾.

1.2.2. Les traitements en développement

Il ressort donc qu'à l'exception de la thrombolyse précoce, des soins intensifs et de la rééducation, il n'existe actuellement aucun traitement pour améliorer efficacement la récupération en post-AVC. Par conséquent, le développement de nouvelles thérapies permettant d'améliorer le remodelage cérébral est crucial. Le développement de ce type de traitement doit permettre d'améliorer les processus endogènes expliqués précédemment, que ce soit la neuroprotection endogène post-AVC et/ou la plasticité et la réparation neurale post-AVC. Idéalement, ces traitements doivent agir sur tous les processus impliqués et non sur un processus ou un dommage précis.

Ainsi, de nombreuses équipes de recherche se sont lancées dans la découverte et le développement de molécules susceptibles d'améliorer la récupération post-AVC. Dans ce cadre, trois thérapies sont actuellement très étudiées : les neuroprotecteurs, les facteurs de croissance et la thérapie cellulaire ⁽⁹⁾. Chacun de ces traitements intervient à un moment donné du processus endogène de réparation et de récupération, comme illustré sur la Figure 4 ⁽⁹⁾. Les neuroprotecteurs interviennent ainsi de manière plus précoce en venant en aide aux mécanismes endogènes de protection, alors que les facteurs de croissance et la thérapie cellulaire vont plutôt aider à la réparation neurale, plus tardive.

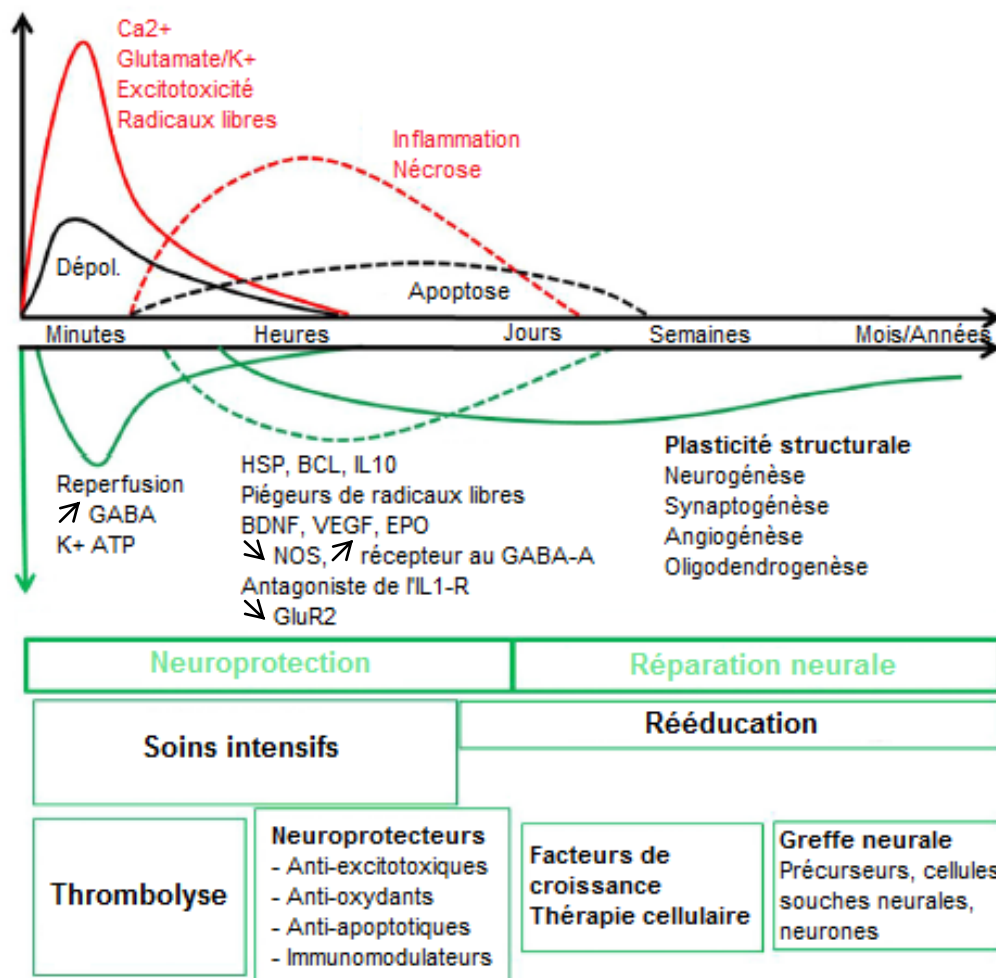


Figure 4 : Place des traitements existants et en développement dans le processus de récupération post-AVC

ATP : adénosine triphosphate ; BCL : protéine de lymphome à cellules B (B Cell Lymphoma) ; BDNF : facteur neurotrophique issu du cerveau (Brain-Derived Neurotrophic Factor) ; Ca²⁺ : calcium ; EPO : érythropoïétine ; GABA : acide γ -aminobutyrique ; GluR2 : récepteur au glutamate ; HSP : protéine de choc septique (Heat Shock Protein) ; IL : interleukine ; K⁺ : potassium ; NOS : oxyde nitrique synthase ; VEGF : Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (Vascular Endothelial Growth Factor)

1.2.2.1. Les neuroprotecteurs

La plupart des processus impliqués dans les dommages consécutifs à l'AVC ont été ciblés par des molécules neuroprotectrices. Ces molécules peuvent être classées en différents types : les molécules anti-excitotoxiques ciblant la toxicité liée au glutamate ⁽³¹⁾, les molécules bloquant le calcium ⁽³²⁾, les molécules anti-oxydantes ^{(33) (34)}, les molécules anti-apoptotiques ⁽³⁵⁾, les inhibiteurs des récepteurs à l'angiotensine, les antagonistes des récepteurs aux prostaglandines ^{(36) (37)}, les anti-inflammatoires et les immunomodulateurs ⁽³⁸⁾, notamment la cyclosporine A ⁽³⁹⁾, les molécules stimulantes (amphétamines). D'autres molécules ont démontré des effets neuroprotecteurs par des mécanismes peu clairs. C'est le cas notamment de l'albumine ⁽⁴⁰⁾, du magnésium ⁽⁴¹⁾, du cilostazol ⁽⁴²⁾, des statines ⁽⁴³⁾, de la citicoline ⁽⁴⁴⁾ et du sildénafil ⁽⁴⁵⁾. Toutes ces molécules ont démontré des effets très positifs chez l'animal, mais la plupart d'entre elles ont été très décevantes lors des essais cliniques. Cela souligne qu'il est très important de cibler un ensemble de processus pour obtenir des molécules efficaces.

Cependant, de nombreux travaux sont encore dédiés à la découverte de molécules neuroprotectrices, et des résultats encourageants ont été démontrés en clinique pour la fluoxétine, un inhibiteur de la recapture de la sérotonine ⁽⁴⁶⁾, pour l'édaravone, un piègeur de radicaux libres ⁽⁴⁷⁾, et pour la minocycline, un antibiotique de la famille des cyclines ⁽⁴⁸⁾.

1.2.2.2. Les facteurs de croissance

Les facteurs de croissance n'ont pas d'effets neuroprotecteurs. Par contre, ils sont capables de favoriser le remodelage cérébral, soit en mobilisant des cellules souches ou des cellules progénitrices endogènes, soit à travers des effets trophiques directs. Ils sont donc intéressants à utiliser dans la phase de réparation neurale.

On distingue dans un premier temps les facteurs stimulant les colonies. Dans cette catégorie, il a été démontré que l'érythropoïétine est capable de favoriser la survie neuronale, l'angiogénèse, la pousse axonale et l'oligodendrogliogénèse ^{(49) (50) (51)}. Cependant, une augmentation de la mortalité a été mise en évidence lors des essais cliniques ⁽⁵²⁾. Quant au GCSF (Granulocyte Colony Stimulating Factor), ses effets restent controversés, car il pourrait augmenter l'infiltration des macrophages au niveau des régions ischémiques ⁽⁵³⁾. L'association du GCSF avec le facteur de croissance des cellules souches (Stem Cell Factor – SCF), pourrait favoriser l'angiogénèse et la survie neuronale ⁽⁵⁴⁾. Par contre, le GCSF seul n'a pas démontré de bénéfices significatifs.

Le deuxième type de facteurs de croissance correspond aux facteurs de croissance dits neurotrophiques. On retrouve le SDF1 (stromal cell-derived factor 1), le BDNF (facteur neurotrophique issu du cerveau), le GDNF (facteur neurotrophique dérivé de la glie), l'angiopoïétine, le VEGF, le FGF (facteur de croissance des fibroblastes) et le facteur de croissance des hépatocytes. Toutes ces molécules, malgré des effets très prometteurs chez l'animal, n'ont pas encore été évaluées en clinique.

Les facteurs de croissance sont donc des éléments prometteurs pour améliorer la récupération post-AVC, mais doivent faire l'objet d'études plus poussées. L'intérêt de ces molécules serait notamment de les administrer en association à une stratégie de thérapie cellulaire.

1.2.2.3. La thérapie cellulaire par cellules souches

1.2.2.3.1. Généralités

La thérapie cellulaire consiste à greffer des cellules afin de restaurer la fonction d'un tissu ou d'un organe. Elle est basée la plupart du temps sur l'utilisation de cellules souches.

Les cellules souches sont des cellules indifférenciées possédant deux propriétés : celle de s'autorenouveler indéfiniment, offrant un stock illimité de matériel, et celle de pouvoir donner naissance à plusieurs types cellulaires⁽⁵⁵⁾. Ceci est possible grâce à un mécanisme de division asymétrique, au cours duquel la cellule souche mère se divise en une cellule souche qui va maintenir le pool de cellules souches et un progéniteur qui entame une différenciation en cellules spécialisées. On distingue deux principaux types de cellules souches : les cellules souches pluripotentes et les cellules souches multipotentes.

Les cellules souches pluripotentes sont capables de se différencier en tous les types cellulaires de l'organisme. Elles sont principalement d'origine embryonnaire mais il peut également s'agir de cellules souches pluripotentes induites (Induced Pluripotent Stem cells ou IPS), qui sont des cellules adultes reprogrammées en cellules pluripotentes par génie génétique. Ces cellules souches pluripotentes ne peuvent pas être utilisées directement de part leur haut potentiel tumorigène, et doivent être différenciées *in vitro* avant d'être utilisées en thérapie.

Les cellules souches multipotentes sont quant à elles capables de se différencier en un nombre limité de types cellulaires. Il en existe de nombreux types que l'on retrouve dans des tissus adultes, mais aussi fœtaux (sang de cordon ombilical notamment). Il est dans ce cas envisageable de greffer directement des cellules souches multipotentes, ou bien de greffer des cellules différenciées obtenues à partir de ces cellules souches.

1.2.2.3.2. La thérapie cellulaire dans l'AVC

La thérapie cellulaire est une possibilité de traitement très étudiée dans l'AVC. Le principal avantage de la thérapie cellulaire concerne la capacité des cellules transplantées à agir sur de multiples processus de réparation en post-AVC, le mécanisme d'action variant cependant en fonction du type de cellules transplantées. Il a au départ été suggéré que les cellules pourraient venir remplacer directement les neurones endommagés, notamment dans les thérapies cellulaires utilisant des cellules souches ou des cellules progénitrices neurales. Cependant, des études ont montré que la différenciation en neurones ainsi que leur survie à long terme est relativement pauvre. Par conséquent, il paraît plus probable que les cellules transplantées agissent comme un support trophique paracrine, via la sécrétion de facteurs de croissance ⁽⁵⁶⁾ ⁽⁵⁷⁾ et le recrutement de progéniteurs endogènes ⁽⁵⁸⁾ ⁽⁵⁹⁾. Les bénéfices de la thérapie cellulaire en post-AVC seraient aussi liés à des effets sur la vasculogénèse et l'angiogénèse ⁽⁶⁰⁾ ⁽⁶¹⁾, ainsi que sur le remodelage glial et la remyélinisation axonale ⁽⁶²⁾ ⁽⁶³⁾. Enfin, la thérapie cellulaire serait également capable de limiter la mort cellulaire à travers des mécanismes anti-apoptotiques ⁽⁶⁴⁾ et immunomodulateurs ⁽⁶⁵⁾ ⁽⁶⁶⁾ ⁽⁶⁷⁾ ⁽⁶⁸⁾.

Ainsi, une grande variété d'approches de thérapies cellulaires en post-AVC a été développée. Ces approches se différencient d'une part par la source cellulaire. Il peut en effet s'agir de cellules ayant pour origine un tissu adulte, fœtal, ou encore une culture cellulaire *in vitro*. Le produit de thérapie cellulaire lui-même est d'autre part très variable. On distingue ainsi des cellules dérivées du mésoderme comme les cellules souches mésenchymateuses, des cellules dérivées de l'ectoderme comme les cellules souches neurales ou des cellules hématopoïétiques ou endothéliales. Ces produits peuvent être utilisés comme traitement xénogénique, allogénique ou autologue. Certains paramètres entourant la greffe restent encore très débattus, comme la dose, la voie d'administration ou encore la fenêtre thérapeutique. Là encore, le choix de ces paramètres est lié au type de cellules transplantées et au mode d'action envisagé.

La sécurité ainsi que l'efficacité de nombreuses combinaisons de ces différents paramètres ont été démontrées dans des modèles animaux d'AVC ⁽⁶⁹⁾ ⁽⁷⁰⁾. En conséquence, les premiers essais cliniques évaluant la sécurité et la faisabilité de la thérapie cellulaire dans l'AVC ont été initiés, avec les premiers résultats publiés il y a une quinzaine d'années. Ces premiers résultats positifs ont permis à d'autres essais de voir le jour, également pour évaluer la sécurité et la faisabilité, mais aussi, de plus en plus, pour tester l'efficacité de ce type de thérapie.

Actuellement, on dénombre vingt-cinq essais cliniques terminés et ayant des résultats publiés ⁽⁷¹⁾ ainsi que dix-sept essais actifs (dont douze en cours de recrutement) et trois essais dont le recrutement n'a pas encore débuté ⁽⁷²⁾ (Tableau I, détail en Annexe 1).

Essais cliniques terminés - Résultats publiés	25
Essais cliniques terminés - Pas de résultats publiés	2
Essais cliniques actifs - Recrutement terminé	5
Essais cliniques actifs - En cours de recrutement	12
Essais cliniques enregistrés - Recrutement non débuté	3
Essais cliniques enregistrés - Evolution inconnue	6

Tableau I : Récapitulatif des essais cliniques de thérapie cellulaire dans l'AVC

Les produits de thérapie cellulaire les plus utilisés lors de ces essais étaient les cellules souches mésenchymateuses et les cellules mononucléées. Dans les deux cas, il s'agit principalement de cellules obtenues à partir de la moelle osseuse du patient, ce qui constitue donc un traitement autologue. Mais les essais évaluant des cellules souches mésenchymateuses en traitement allogénique sont également de plus en plus nombreux.

1.2.2.3.3. Les cellules souches mésenchymateuses (CSM)

Les cellules souches mésenchymateuses sont un exemple de cellules souches adultes multipotentes. On en retrouve principalement dans la moelle osseuse et dans le tissu adipeux. Elles sont capables de se différencier en différents types cellulaires spécialisés présents dans le tissu squelettique : chondrocytes, ostéoblastes, adipocytes. Décrites pour la première fois en 1974 ⁽⁷³⁾, elles sont actuellement très étudiées pour leur potentiel effet thérapeutique dans différentes applications cliniques, principalement via un mécanisme de support trophique paracrine et une capacité immunomodulatrice. Elles ont ainsi montré leur sécurité d'emploi et leur efficacité dans des modèles animaux d'AVC ⁽⁷⁴⁾ ⁽⁷⁵⁾, mais aussi de choc septique ⁽⁷⁶⁾ et d'infarctus aigu du myocarde ⁽⁷⁷⁾, et sont de plus en plus transférées en clinique.

Le principal avantage de ces cellules souches est leur facilité d'obtention à partir de tissus adultes autologues ou allogéniques, ce qui permet de s'affranchir des problèmes éthiques liés à l'utilisation de cellules souches embryonnaires. De plus, grâce à leurs propriétés immunomodulatrices, il est possible d'envisager des transplantations allogéniques sans avoir besoin de recourir à des médicaments immunosuppresseurs ⁽⁷⁸⁾. Leur principal désavantage est

leur présence en faible quantité dans les tissus. Leur fréquence dans la moelle osseuse a ainsi été estimée à 1 pour 3.4×10^4 cellules ⁽⁷⁹⁾. Ainsi, une amplification *in vitro* est essentielle pour envisager un traitement des patients, ce qui suggère des problèmes de faisabilité.

Dans le cadre des essais cliniques, les préoccupations concernant la sécurité d'emploi représentent le principal frein à l'utilisation d'une nouvelle thérapeutique. Les cellules souches sont particulièrement exposées aux questions concernant leur sécurité, et les cellules souches mésenchymateuses ne font pas exception. Les principales craintes constituent ainsi leur potentiel tumorigène lié à leurs capacités de prolifération, la susceptibilité aux infections qui pourraient être engendrée par leurs propriétés immunomodulatrices, ou encore la potentielle induction d'une immunogénicité aigüe ou chronique ⁽⁸⁰⁾.

Jusqu'ici, huit essais cliniques avec des résultats publiés ont été conduits avec des cellules souches mésenchymateuses dans le cadre d'un traitement en post-AVC (Tableau II). Cinq d'entre eux rapportent l'utilisation de CSM provenant de la moelle osseuse du patient et les trois autres font état de l'utilisation de cellules souches provenant de cordons ombilicaux. Tous ont permis de conclure à la faisabilité et à la sécurité d'emploi de cette thérapie.

De plus, une méta-analyse réalisée par Lalu et al. ⁽⁸⁹⁾ analysant trente-six essais cliniques utilisant des cellules souches mésenchymateuses en intravasculaire dans divers contextes cliniques a également permis de conclure à la sécurité d'emploi de ce type de cellules. En effet, aucune association n'a pu être démontrée entre l'injection de CSM et l'apparition de phénomènes de toxicité aigüe, d'atteintes d'organes, d'infections, de cancers ou encore de mortalité. Seule une association significative entre l'injection de CSM et l'apparition d'une fièvre transitoire a été identifiée. Les auteurs suggèrent cependant la nécessité de réaliser des essais cliniques contrôlés à plus grande échelle et avec une étude rigoureuse de la survenue d'évènements indésirables afin de mieux définir le profil de sécurité de ces cellules souches.

Malgré ces données de sécurité encourageantes, certaines publications dont les résultats sont très débattus suggèrent encore une possible association entre les cellules souches mésenchymateuses et la formation de tumeurs. Par exemple, un article de Ben-David et al. ⁽⁹⁰⁾ indique que les cellules souches mésenchymateuses en culture acquièrent des aberrations chromosomiques caractéristiques, dont certaines sont fréquemment retrouvées dans des formations tumorales touchant spécifiquement les tissus mésenchymateux.

Référence	Location	Patients	Source cellulaire	Dose	Délai AVC / traitement	Voie d'administration	Resultats
Bang et al., 2005 ⁽⁸¹⁾	Suwon, Corée du Sud	5 traités 25 contrôles	Moelle osseuse autologue	50 millions x 2	4 - 5 semaines puis 7 - 9 semaines	Intraveineuse	Protocole faisable Bonne tolérance
Lee et al., 2010 ⁽⁸²⁾	Suwon, Corée du Sud	16 traités 36 contrôles	Moelle osseuse autologue	50 millions x 2	2.5 - 5 semaines puis 5 - 9 semaines	Intraveineuse	Protocole faisable Bonne tolérance
Honmou et al., 2011 ⁽⁸³⁾	Sapporo, Japon	12 traités	Moelle osseuse autologue	110 millions (60 - 160 millions)	10 semaines (5 - 19 semaines)	Intraveineuse	Protocole faisable Bonne tolérance
Bhasin et al., 2011 ⁽⁸⁴⁾	New Delhi, Inde	6 traités 6 contrôles	Moelle osseuse autologue	50 - 60 millions	9 mois (7 - 12 mois)	Intraveineuse	Protocole faisable Bonne tolérance
Bhasin et al., 2013 ⁽⁸⁵⁾	New Delhi, Inde	20 traités dont 6 avec des CSM (mêmes patients que l'essai précédent) 20 contrôles	Moelle osseuse autologue	50 - 60 millions	10 mois (3 mois - 2 ans)	Intraveineuse	Protocole faisable Bonne tolérance
Chen et al., 2013 ⁽⁸⁶⁾	Pékin, Chine	10 traités dont 2 avec des CSM	Cordon ombilical	10 - 23 millions	0.5 - 5 ans	Intraveineuse	Protocole faisable Bonne tolérance
Jiang et al., 2013 ⁽⁸⁷⁾	Nanjing, Chine	4 traités	Cordon ombilical	20 millions	11 - 50 jours	Injection au niveau de l'artère cérébrale moyenne	Protocole faisable Bonne tolérance
Qiao et al., 2014 ⁽⁸⁸⁾	Pékin, Chine	6 traités (2 x traitement 1 - 4 x traitement 2)	Cordon ombilical	Traitement 1 : 4 x 0.5 millions CSM / kg Traitement 2 : 1 x 0.5 millions CSM / kg puis 3 x 5 millions CSM et 3 x 6 millions cellules souches/ progénitrices neurales	1 semaine - 2 ans	Intraveineuse	Protocole faisable Bonne tolérance

Tableau II : Récapitulatif des essais cliniques utilisant des cellules souches mésenchymateuses dans l'AVC

2. L'essai clinique ISIS

2.1. Conception et organisation de l'étude

2.1.1. Données générales de l'étude

L'essai clinique s'intitule "Thérapie cellulaire par injection intraveineuse de cellules souches mésenchymateuses autologues après accident vasculaire cérébral" et a pour titre court ISIS (Injection de cellules Souches après Infarctus cérébral). Le promoteur de cet essai est le CHU de Grenoble, et l'investigateur principal est le Dr Olivier Detante, responsable du service de neurologie vasculaire. Le résumé de l'étude issu du protocole est disponible en Annexe 2.

Il s'agit d'un essai thérapeutique pilote de phase IIa, monocentrique, contrôlé, ouvert (aveugle sur le critère de jugement) et randomisé.

L'objectif principal de l'étude est d'évaluer la **faisabilité** et la **tolérance** de l'injection intraveineuse de cellules souches mésenchymateuses autologues chez des patients ayant présenté un AVC ischémique récent (moins de six semaines avant la greffe).

La faisabilité de la procédure de thérapie cellulaire est évaluée par :

- l'inclusion et le suivi de trente patients au sein de l'UNV du CHU de Grenoble;
- la réalisation du prélèvement de moelle osseuse pour chaque patient traité;
- la production de CSM en quantité suffisante et conformes aux spécifications par l'Unité Mixte de Thérapie Cellulaire et Tissulaire (EFS Rhône Alpes, Saint Ismier);
- la réalisation de l'injection intraveineuse des CSM autologues dans l'UNV.

La tolérance de la procédure de thérapie cellulaire est évaluée par :

- le nombre de complications liées au prélèvement de moelle;
- les données de l'examen clinique général au cours du suivi de chaque patient;
- l'aggravation du déficit neurologique lié à l'AVC initial;
- la survenue d'un nouvel AVC;
- le nombre de complications neurologiques non-vasculaires (inflammation, tumeur, épilepsie) et de complications non neurologiques (tumeur, inflammation secondaire);
- la mortalité.

Les objectifs secondaires sont d'évaluer l'efficacité de la thérapie cellulaire, de définir la dose de CSM efficace, de définir les meilleurs critères intermédiaires de jugement d'efficacité et la meilleure population cible pour une future étude de phase IIb ou III.

2.1.2. Organisation de l'étude

L'étude a été conçue pour trente patients, avec un groupe traité composé de vingt patients et un groupe contrôle comprenant dix patients. Parmi les vingt patients constituant le groupe traité, les dix premiers reçoivent une dose "faible" de cellules souches mésenchymateuses (100×10^6 cellules) et les dix suivants reçoivent une dose "forte" de ces cellules (300×10^6 cellules). Les patients du groupe contrôle ne reçoivent quant à eux aucune injection.

Plus précisément, les trente patients sont inclus dans l'étude par les investigateurs lors de leur hospitalisation à l'UNV du CHU de Grenoble (Visite V1a) et sont randomisés dans l'un des deux groupes. Lors d'une seconde visite (V1b), les patients randomisés dans le groupe traité subissent un prélèvement de moelle osseuse. Ils reçoivent ensuite l'injection de cellules souches au cours de leur troisième visite (V2). Pour des raisons éthiques, les patients du groupe contrôle ne subissent ni le prélèvement de moelle, ni l'injection d'un placebo.

Les patients de chacun des groupes sont suivis pendant deux ans à partir de ce moment, et il s'ensuit alors une série de visites de suivi : V3 (quinze jours post-injection), V4 (deux mois post-injection), V5 (quatre mois post-injection), V6 (six mois post-injection), V7 (un an post-injection), V8 (deux ans post-injection). Les visites V6 et V8 ont la particularité d'être réalisées en aveugle, par un médecin ignorant le groupe du patient.

2.2. Traitement étudié

2.2.1. Caractéristiques du traitement

Le traitement étudié consiste en des cellules souches mésenchymateuses autologues, issues de la moelle osseuse des patients et amplifiées *in vitro* avant leur réinjection aux patients par voie intraveineuse.

Les principales caractéristiques de ces cellules sont les suivantes :

- absence de marqueurs de surface hématopoïétiques (CD14, CD45, CD34);
- expression de marqueurs de surface spécifiques des CSM (CD90, CD73, CD105);
- capacité à former des colonies lorsqu'elles sont cultivées à faible densité;
- capacité à se différencier sous l'action d'inducteurs spécifiques en ostéoblastes, en chondrocytes et en adipocytes (multipotentialité).

2.2.2. Statut réglementaire

Au moment de l'autorisation de l'essai clinique ISIS en 2009, ce traitement à base de cellules souches mésenchymateuses autologues a obtenu le statut de **produit de thérapie cellulaire**. Or ce statut ne serait plus le même aujourd'hui. En effet, le règlement européen (CE) n°1394/2007 ⁽⁹¹⁾, entré en vigueur le 30 décembre 2008, définit deux types de produits cellulaires ou tissulaires : les médicaments de thérapie innovante (MTI) et les préparations. Un produit est considéré comme un MTI si le procédé de fabrication induit des modifications substantielles des cellules ou tissus et/ou si les cellules ou tissus ne sont pas destinés à être utilisés pour la (les) même(s) fonction(s) essentielle(s) chez le receveur et chez le donneur. Dans les autres cas, il s'agira d'une préparation.

Dans l'étude ISIS, l'expansion de cellules constitue une modification substantielle des cellules, et le produit obtenu est utilisé pour une indication différente chez le receveur (augmentation de la plasticité cérébrale pour le receveur versus soutien de moelle osseuse pour le donneur). Les cellules souches mésenchymateuses utilisées seraient donc aujourd'hui un **médicament de thérapie innovante**. Les implications de ce statut tant sur le plan de la production des lots de cellules souches mésenchymateuses que sur le circuit de vigilance feront l'objet d'une discussion plus loin dans ce manuscrit.

2.2.3. Procédé de production

Le prélèvement de moelle osseuse est réalisé au CHU de Grenoble sous anesthésie locale, et envoyé à l'Unité Mixte de Thérapie Cellulaire et Tissulaire située à Saint Ismier. La culture cellulaire destinée à amplifier les cellules souches adhérentes est réalisée dans ces locaux, en conditions GMP. Deux phases de culture sont réalisées (Passage 0 - P0 et Passage 1 - P1), puis les cellules sont lavées et formulées dans les excipients appropriés pour obtenir le produit de thérapie cellulaire final. Après la libération du lot, le produit de thérapie cellulaire est renvoyé au CHU pour être réinjecté au patient.

Des contrôles qualité sont réalisés tout au long du processus : sur un échantillon de sang du patient, sur l'échantillon de moelle osseuse initial, à la fin de l'étape P0 et sur le produit final (fin de P1). L'échantillon de sang sert à réaliser une sérologie virale. La quantité (numération), la viabilité et la contamination microbiologique sont contrôlées sur le prélèvement de moelle osseuse initial. En fin de P0 et de P1, la quantité (numération), la viabilité, mais aussi le phénotype, la fonctionnalité, la contamination microbiologique, la tumorigénicité et le caryotype des cellules souches obtenues sont évalués. Les résultats permettent au Pharmacien

responsable de libérer ou non le lot. En effet, certains contrôles qualité ont un caractère libératoire. Il s'agit parfois des contrôles réalisés sur le produit final, mais aussi dans certains cas des contrôles réalisés en fin de P0, lorsque les résultats finaux ne sont pas disponibles.

2.3. Recueil et analyse des évènements indésirables

2.3.1. Principe de la vigilance des essais cliniques dans l'étude ISIS

Un évènement indésirable correspond à toute manifestation nocive survenant chez une personne qui se prête à une recherche biomédicale, qu'elle soit liée ou non à la recherche ou au produit sur lequel porte cette recherche. Tout évènement indésirable, peu importe sa gravité et son lien avec le produit de thérapie cellulaire, qui survient chez un patient à partir du moment de son inclusion et jusqu'à la fin de sa période de suivi de deux ans, doit être rapporté par l'investigateur dans le Cahier d'Observation (CRF) du patient.

Un évènement indésirable grave correspond à un évènement indésirable qui provoque le décès, met en jeu le pronostic vital, est lié à une hospitalisation ou à une prolongation d'hospitalisation, entraîne une incapacité ou un handicap important ou durable, a pour conséquence une anomalie ou une malformation congénitale, ou à tout autre évènement indésirable jugé médicalement significatif. Tout évènement indésirable grave, peu importe son éventuel lien avec le produit de thérapie cellulaire, qui survient chez un patient à partir du moment de son inclusion et jusqu'à la fin de sa période de suivi de deux ans, doit être rapporté au promoteur, c'est-à-dire au CHU de Grenoble, représenté par la Direction de la Recherche Clinique et de l'Innovation (DRCI), à travers une fiche de déclaration d'évènement indésirable. Ces déclarations sont adressées aux Pharmaciens en charge de la Vigilance des essais cliniques au sein de la DRCI. Durant l'étude ISIS, tous les évènements indésirables ont été déclarés et enregistrés dans une base de Vigilance des essais cliniques (Safety-Easy), plus précisément dans le module BioVigilance de cette base, et documentés jusqu'à ce que le patient recouvre son état de santé initial. Afin de surveiller de manière plus adéquate cette étude de phase IIa et de ne pas passer à côté d'un fait nouveau de sécurité, même les évènements indésirables non graves ont été déclarés par l'équipe médicale aux Pharmaciens en charge de la Vigilance des essais cliniques.

L'investigateur et le promoteur doivent, pour chaque évènement indésirable grave, se prononcer sur l'existence ou non d'un lien de causalité entre cet évènement et le produit de thérapie cellulaire (imputabilité). Le promoteur doit également définir le caractère attendu ou

inattendu de l'évènement en se référant à la Brochure Investigateur ou document de référence du produit de thérapie cellulaire. S'il est considéré que cet évènement est lié au produit de la recherche, alors il devient un effet indésirable grave. Lorsqu'un effet indésirable grave est inattendu, celui-ci devient un SUSAR (Suspected Unexpected Serious Adverse Reaction) et doit alors faire l'objet d'une déclaration sans délai à l'ANSM, au CPP et aux investigateurs.

Pour tous les autres cas, une déclaration immédiate aux autorités n'est pas nécessaire. L'ensemble des évènements et effets indésirables font l'objet d'une déclaration annuelle sous la forme d'un Rapport Annuel de Sécurité (RAS), transmis à l'ANSM, au CPP et à l'investigateur principal de l'étude. Cette organisation est résumée dans la Figure 5.

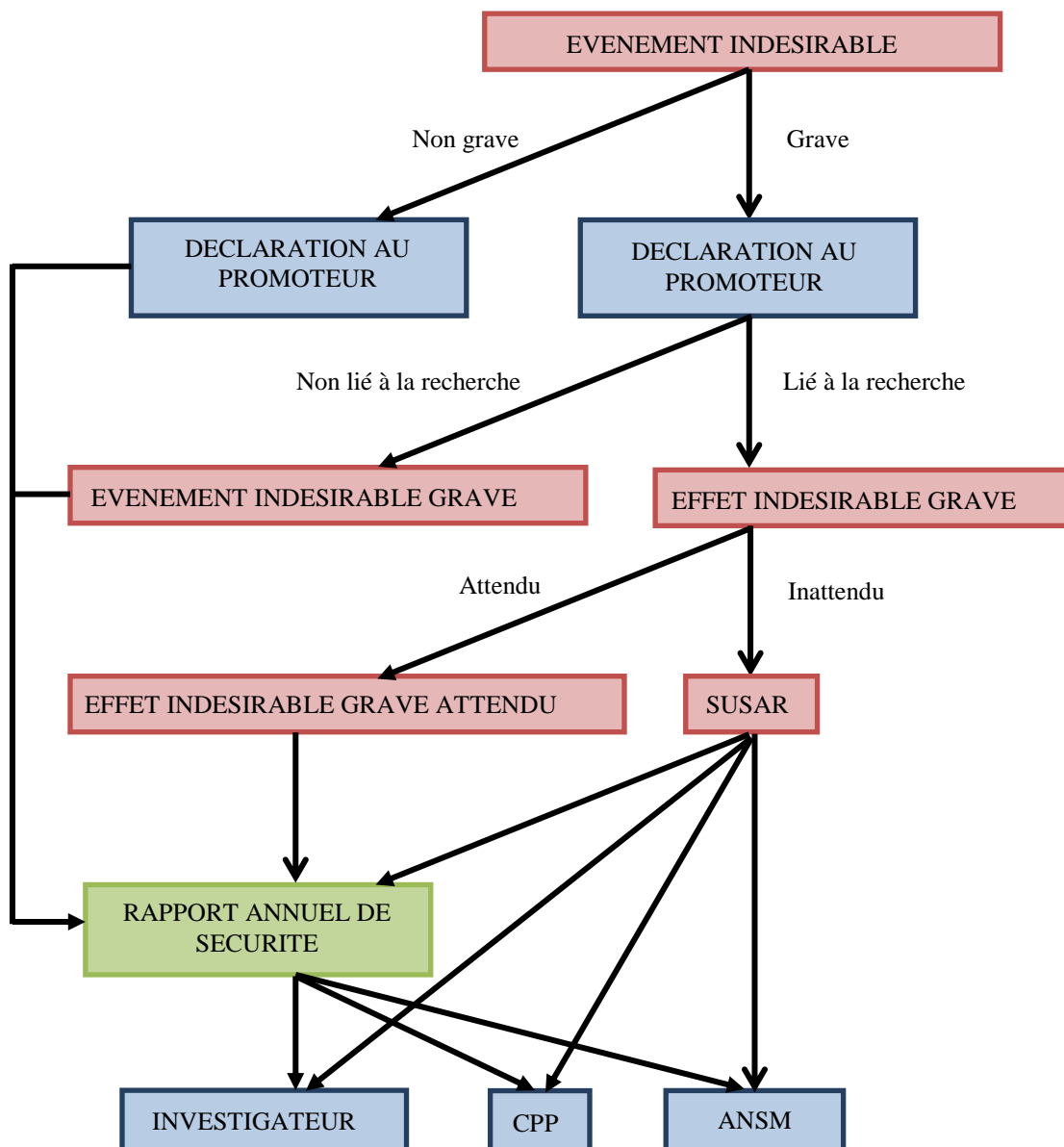


Figure 5 : Recueil et analyse des évènements indésirables dans l'étude ISIS

La transmission des données de sécurité à l'Agence Européenne des Médicaments (EMA) n'est pas exigée du fait du statut du produit expérimental (produit de thérapie cellulaire).

2.3.2. Evènements / Effets indésirables à surveiller dans l'étude ISIS

Dans le cadre du protocole de thérapie cellulaire, on peut s'attendre à des effets indésirables immédiats liés à la procédure de prélèvement et de greffe (hématome au point de ponction ou d'injection, allergie au produit d'anesthésie, toxicité locale aiguë liée à l'injection, fièvre).

De plus, suite à un premier AVC, il est fréquent que les patients subissent un second AVC, ou qu'ils deviennent sujets à des crises d'épilepsie. Ces évènements indésirables neurologiques sont donc à attendre, chez les patients traités comme chez les patients contrôles.

Mais il est également important d'analyser l'impact éventuel - positif ou négatif - de la thérapie cellulaire sur ces évènements indésirables neurologiques, en comparant leur survenue dans les deux groupes de patients.

Enfin, concernant les cellules souches mésenchymateuses en elles-mêmes, la survenue d'infections est à contrôler et à comparer entre les deux groupes. En effet, de part leurs propriétés immunomodulatrices, il a été suggéré que les cellules souches mésenchymateuses pourraient favoriser un processus infectieux. De même, le développement d'une pathologie tumorale est à surveiller, étant donné les capacités de prolifération des CSM.

2.4. Chronologie de l'étude

L'étude a été approuvée par l'ANSM en septembre 2009 et par le CPP Sud Est V en octobre de la même année. L'essai a réellement débuté le 23 août 2010 avec l'inclusion du premier patient. La dernière inclusion a été réalisée le 11 juillet 2014, et par conséquent, le suivi des patients s'étale jusqu'en juillet 2016. Cette chronologie est résumée dans la Figure 6.

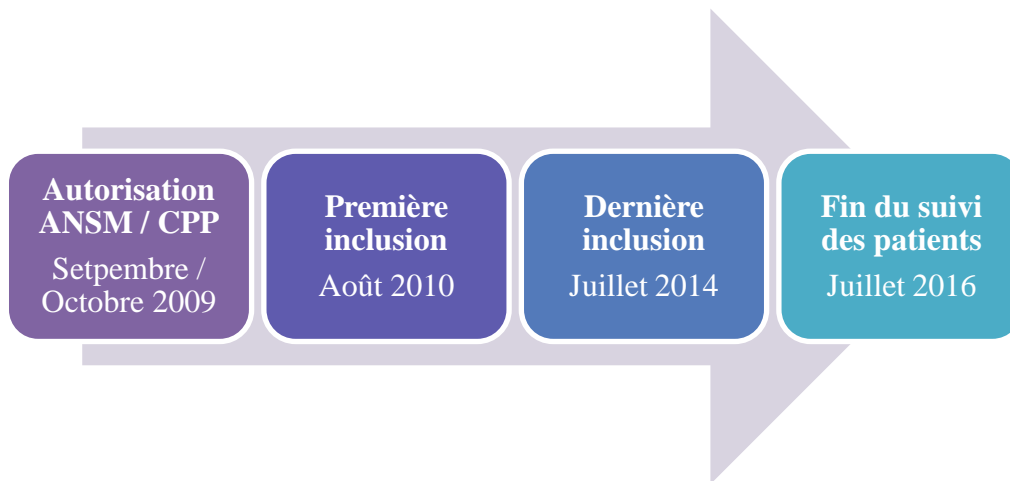


Figure 6 : Chronologie de l'étude ISIS

A ce stade de l'essai clinique, les données de faisabilité sont disponibles étant donné que toutes les productions et injections de cellules ont été réalisées, et les données de sécurité sont suffisantes (au minimum un an de suivi pour tous les patients) pour envisager l'analyse et la publication des résultats. L'objectif actuel est donc d'analyser les données obtenues et de publier les résultats dans une revue scientifique.

Deuxième partie : Article

Feasibility and safety of the intravenous injection of autologous mesenchymal stem cells after stroke : a controlled, randomized trial

Abstract

Mesenchymal stem cells (MSCs) are multipotent stem cells that can be isolated from many adult tissues especially from bone marrow and adipose tissue. They have recently received attention in a lot of clinical fields for their potential therapeutic effects, mainly through immunomodulatory and paracrine mechanisms.

The present article reports the results of a phase IIa, monocentric, controlled, parallel, open-label (blinded on the primary study endpoint) and randomized clinical trial, assessing the feasibility and tolerance of the intravenous injection of autologous mesenchymal stem cells in post-stroke patients.

Thirty-one patients (twenty treated and eleven control) were included in this study. Patients of the treated group underwent a bone marrow collection, then mesenchymal stem cells were expanded *in vitro* and reinjected to the patients.

Feasibility data permitted to identify three non-compliance causes: the production of stem cells in inadequate quantity (five patients), the development of karyotype abnormalities (two patients) or cell senescence (one patient) during the culture, and the contamination of the culture by bacterial strains (one patient). As a result, 45% of the stem cells batches were out of specifications, and 20% of them (four batches) were rejected and consequently not injected to the patients.

Regarding tolerance and safety, thirty-four serious adverse events (without causal link with the cell therapy) were reported over a five-year period (from 2010-08-23 to 2015-08-25). Nervous systems disorders, mainly epileptic seizures and recurrent cerebral infarctions, were the most prevalent type of adverse events (41.2% of all adverse events). No immediate adverse events due to the bone marrow collection or the injection were reported. No statistical association was identified between the stem cells injection and the occurrence of a second stroke, epileptic seizures or infections and no solid cancers or hematologic malignancies were diagnosed among the study population.

Those encouraging safety data led to the implementation of a phase IIb clinical trial with more patients, with the objective to assess the efficacy of this cell therapy. To overcome the feasibility issues, a new protocol was built with the use of allogeneic adipose-derived mesenchymal stem cells.

Key words: cell therapy, clinical trial, feasibility, mesenchymal stem cells, safety, stem cell, stroke, tolerance.

1. Introduction

A stroke, or cerebrovascular accident, is caused by the interruption of the blood supply to the brain, which usually occurs because a blood vessel is blocked by a clot (ischemic stroke, 80% of all cases) or bursts (hemorrhagic stroke). This cuts off the supply of oxygen and nutrients, causing damage to the brain tissue. The effects will depend on which part of the brain is injured and how severely it is affected, but a severe stroke can lead to death.

According to the WHO ⁽⁴⁾, stroke is the second cause of death worldwide, with an estimated number of 6.7 million deaths in 2012, just behind ischemic heart diseases (7.4 million deaths). Its incidence is estimated from 1 to 4/1000/year, and although stroke is often considered as a disease occurring in elderly people, 31% of people experiencing stroke are under 64 ⁽³⁾. Moreover, 60-70% of stroke survivors show disabilities, so that stroke is the most common source of severe disability in adults.

Existing treatments for stroke can be divided in acute stroke treatments and long-term ones. Acute stroke treatments consist in admission to a stroke unit for intensive care, and if indicated, in early thrombolysis by alteplase, a plasminogen activator. But its use is limited to ischemic strokes, and its efficacy decreases over time, so that thrombolysis is only indicated if the stroke occurred less than 4.5 hours before alteplase administration. Therefore, only a minority of patients (2% to 4%) can receive timely therapy ⁽²⁷⁾. Long-term stroke treatments mostly refer to rehabilitation ⁽³⁰⁾. Although it permits to reinforce the cerebral plasticity that occurs after stroke ⁽²⁹⁾, rehabilitation often remains insufficient to induce a complete functional recovery. Consequently, no treatment currently exists to efficiently enhance recovery after stroke.

The development of new therapies able to enhance brain remodeling processes is therefore crucial. The goal is to find a treatment to promote one or both of the physiological processes occurring after stroke: endogenous neural protection and post-stroke plasticity and neural repair ⁽⁹⁾.

Among all the therapeutic strategies currently in development, cell therapy could be an effective way to enhance recovery after stroke. The crucial advantage of transplanted cells is their ability to act on multiple endogenous repair processes after stroke, in function of the transplanted cell type. Direct neuronal replacement has been suggested especially for neural stem or progenitor cells but it has been shown that the survival of those grafted cells is

relatively poor. Consequently, transplanted cells would preferably act as a paracrine trophic support, by the secretion of growth factors ⁽⁵⁶⁾ ⁽⁵⁷⁾ and the recruitment of endogenous progenitors ⁽⁵⁸⁾ ⁽⁵⁹⁾. Benefits of cell therapy after stroke could also probably be linked to its effects on vasculogenesis and angiogenesis ⁽⁶⁰⁾ ⁽⁶¹⁾, as well as on glial remodeling and axonal remyelination ⁽⁶²⁾ ⁽⁶³⁾. Finally, cell therapy could limit cell death through anti-apoptotic ⁽⁶⁴⁾ and immunomodulatory mechanisms ⁽⁶⁵⁾ ⁽⁶⁶⁾ ⁽⁶⁷⁾ ⁽⁶⁸⁾.

So far, a wide variety of post-stroke cell therapies has been developed in terms of ⁽⁹⁾:

- cell sources (adult, fetal or *in vitro* cell-culture origin);
- cell therapy products (mesoderm-derived cells such as mesenchymal stem cells, ectoderm-derived cells such as neural stem cells or hematopoietic/endothelial cells used in xenogenic, allogenic or autologous treatments);
- delivery route (intravenous, intra-arterial or intracerebral delivery);
- therapeutic time-window.

Safety and also efficacy of various combinations of those parameters have been demonstrated in animal models of stroke, so that clinical trials have been approved with the first results published 10-15 years ago. So far, twenty-five clinical trials have published results on PubMed ⁽⁷¹⁾ and as a result of their encouraging data in terms of safety and feasibility, even more trials are currently on-going to assess safety, feasibility but also efficacy of cell therapy in stroke.

Mesenchymal stem cells (MSCs) are multipotent stem cells that can be isolated from many adult tissues especially from bone marrow and adipose tissue. Described for the first time in 1974 ⁽⁷³⁾, they have recently received attention in several clinical fields for their potential therapeutic effects, mainly through immunomodulatory and paracrine mechanisms. They have shown safety and efficacy in various preclinical models including stroke ⁽⁷⁴⁾ ⁽⁷⁵⁾, but also acute lung injury ⁽⁹²⁾, septic shock ⁽⁷⁶⁾ and acute myocardial infarction ⁽⁷⁷⁾, and are more and more translated to clinical trials.

Advantages of those cells include their easy obtention from either autologous or allogenic adult tissues, avoiding the ethical problems raised by the use of embryonic stem cells. Their immunomodulatory properties also permit to consider allogenic transplantations without using immunosuppressive drugs ⁽⁷⁸⁾. Their main disadvantage is their relatively low frequency in tissues. Indeed, Wexler et al reported a 1 in 3.4×10^4 frequency for MSC in bone marrow ⁽⁷⁹⁾. Thus, an *in vitro* expansion of those cells is essential prior to inject them to patients.

In the context of clinical trials, safety concerns represent a significant barrier to the use of a new therapeutic drug. Stem cells are particularly exposed to safety concerns, and MSCs aren't an exception. These include for example neoplastic potential due to their proliferative capacity, susceptibility to infection because of their immunomodulatory properties, and acute or chronic immunogenicity of the cells themselves⁽⁸⁰⁾.

This present article aims at reporting and analyzing feasibility and safety data of a phase IIa clinical trial entitled Cell Therapy by Intravenous Injection of Mesenchymal Stem Cells After Stroke (Short title: ISIS). Sponsored and conducted by the Grenoble University Hospital, France, this study, which included thirty-one patients, is a monocentric, controlled, parallel, randomized and open-label (blinded on the primary study endpoint) clinical trial assessing the feasibility and tolerance of the intravenous injection of autologous mesenchymal stem cells in patients with ischemic stroke.

2. Materials and Methods

2.1. Design of the study

The following protocol was approved by the French National Agency for Medicines and Health Products Safety (ANSM) and the local Ethics Committee in September and October 2009, respectively.

2.1.1. Study characteristics

This study is a phase IIa, monocentric, controlled, parallel, open-label (blinded on the primary study endpoint) and randomized clinical trial.

2.1.2. Study objectives and endpoints

The primary objective of the ISIS study is to assess the feasibility and tolerance of the intravenous injection of autologous mesenchymal stem cells in patients with recent (less than six weeks before injection) ischemic stroke.

Primary endpoints regarding feasibility include: inclusion and follow-up of thirty patients, achievement of the bone marrow collection for each treated patient, production of MSCs in adequate quantity and conform to specifications, achievement of the MSCs injections.

Primary endpoints regarding tolerance and safety include: complications due to bone marrow collection, clinical data during follow-up, worsening of the initial neurological deficit or occurrence of a second stroke, nonvascular neurological complications (inflammation, tumour, epilepsy), non-neurological complications (inflammation, tumour) and mortality.

The secondary objectives of the study are to evaluate the cell therapy efficacy, to define the most effective dose of injected cells, to define the best efficacy criteria and the best target population for a future national or European clinical trial.

2.1.3. Study conception

The study was designed with thirty patients, knowing that in this pilot study, it was not possible to perform a calculation to determine the sample size.

The thirty patients were spread in two groups: one control group of ten patients receiving no stem cells injection, and one treated group of twenty patients, with the first ten patients receiving a dose of 100×10^6 mesenchymal stem cells (low dose), and the ten others receiving

a dose of 300×10^6 mesenchymal stem cells (high dose). At the moment of their recruitment, patients were randomly allocated in the control or in the treated group, using a minimization method.

A Data Safety Monitoring Board (DSMB) was informed throughout the study of each inclusion and all the serious adverse events. This Board was also requested for the analysis of the safety data obtained for the patients treated with the low MSCs dose to validate the pursuit of the study with the high dose.

2.1.4. Patient recruitment

The thirty expected patients were enrolled by the investigators during their hospitalization in the stroke unit of the Grenoble Hospital. Written informed consent from patients, or, if unable to give it, from their families was obtained before their enrolment.

Inclusion criteria included the following: age between 18 and 65, right or left carotid ischemic stroke in the fourteen previous days and confirmed by MRI, moderate to severe neurological deficit (NIHSS > 11), optimal medical treatment, general state compatible with a rehabilitation program.

As the patient recruitment was very low with those inclusion criteria, some were modified as follows: age between 18 and 70, NIHSS \geq 7. This substantial modification was approved by the ANSM and the local Ethics Committee in July 2013.

Exclusion criteria included the following: severe extensive life threatening stroke, severe persistent neurological deficit (NIHSS > 24), medical history of neurological pathology with a remaining deficit, serious psychiatric disease, myocardial infarction less than three months ago, thromboembolic disease less than six months ago, organ transplantation, medical history of infection (HIV, HTLV, HBV, HCV), current immunosuppressive/immunomodulating treatment, medical history of cancer, medical history of chemotherapy, chronic kidney failure, hepatic failure, obesity precluding the bone marrow collection, any life threatening pathology, patient refusing to participate, pregnant, parturient or breastfeeding woman, woman of childbearing age if unable to receive an effective contraception, patient participating to another therapeutic clinical trial or in period of exclusion of a therapeutic clinical study, patient in detention by judicial or administrative decision, legally protected patient, patient not affiliated to social insurance.

After patient recruitment, a two-year follow up was organized at the Grenoble University Hospital.

2.1.5. Study organization

Patients were included in the study during their hospitalization in the stroke unit of the Grenoble Hospital, and were randomized in the control or in the treated group (V1a visit).

During the second visit (V1b), patients randomized in the treated group underwent the bone marrow collection. Then, during the next visit (V2), patients randomized in the treated group received the MSCs injection. Patients of the control group did not receive any injection, not even a placebo one, due to ethical reasons.

Subsequent visits consist in follow-up visits, with V3 (fifteen days post-injection), V4 (two months post-injection), V5 (four months post-injection), V6 (six months post-injection), V7 (one year post-injection) and V8 (two years post-injection). V3, V4, V5 and V7 are classical visits performed by unblinded practitioners, whereas V6 and V8 are performed by blinded practitioners who do not know the patient's group.

This organization is summarized in Figure 7.

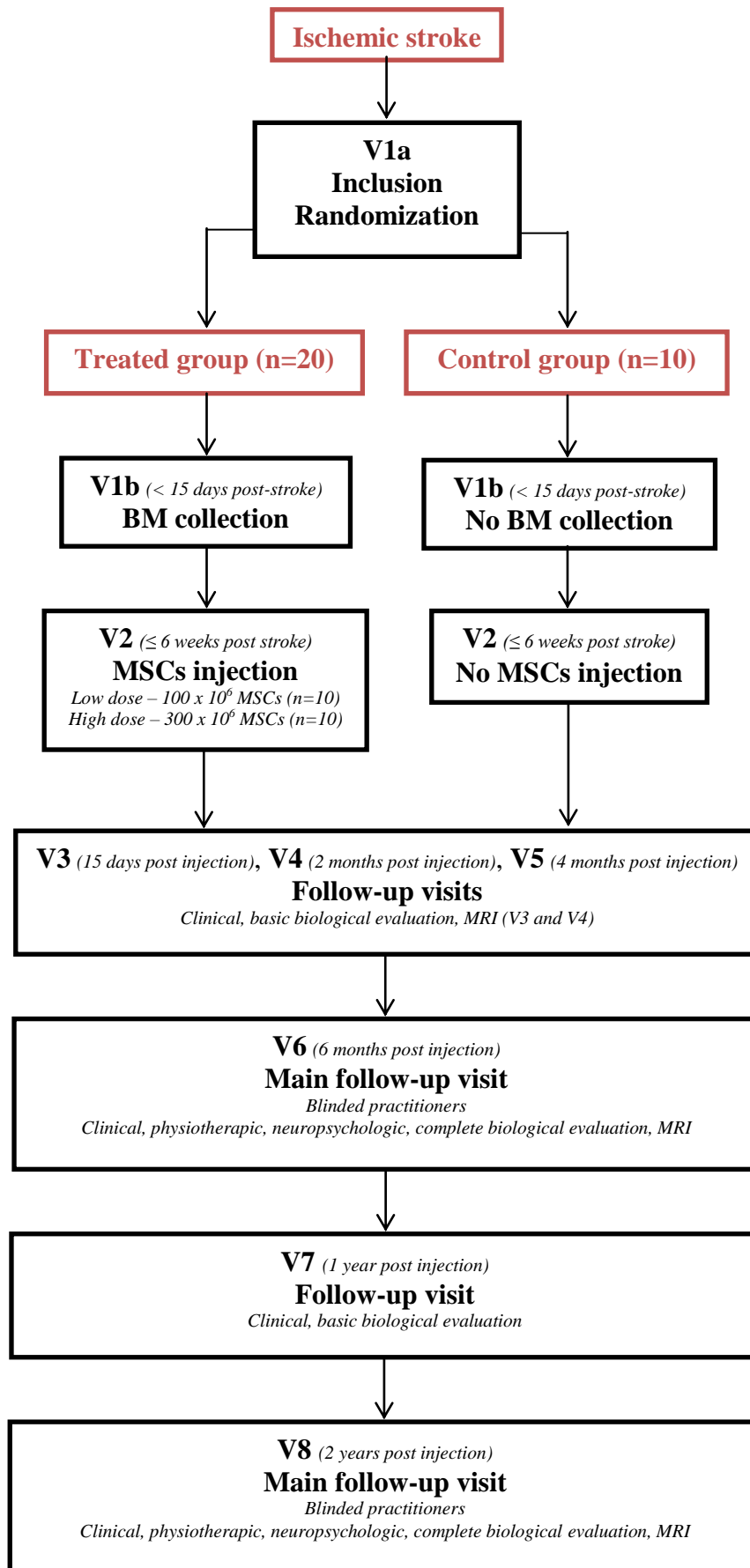


Figure 7 : Clinical trial organization summary

BM: bone marrow; MRI: Magnetic Resonance Imaging; MSCs: mesenchymal stem cells

2.1.6. Adverse events collection and evaluation

An adverse event (AE) corresponds to any untoward medical occurrence affecting a patient that received a pharmaceutical product (or in this study a cell therapy product) and which does not necessarily have any causal relationship with this product. An adverse event can therefore be any unfavorable and unintended sign (including an abnormal laboratory finding for example), symptom, or disease temporally associated with the use of a medicinal product, whether or not considered related to this medicinal product.

A serious adverse event (SAE) is defined by any untoward medical occurrence that at any dose : results in death / is life-threatening / requires the patient hospitalization or the prolongation of an existing hospitalization / results in a persistent or significant disability or incapacity / leads to a congenital anomaly or birth defect / is considered as a medically significant event.

All the adverse events (AEs), regardless of their seriousness or relationship with the investigational cell therapy product, that occur from the date of the patient's informed consent up to the end of their two-year follow up have to be reported by the study investigators in the Case Report Form (CRF). All the serious adverse events (SAEs), regardless of their relationship with the investigational cell therapy product, that occur from the date of the patient's informed consent up to the end of their two-year follow up have to be recorded by the study investigators on a dedicated serious adverse event template and sent to the Safety Desk of the study sponsor.

During the ISIS study, all the adverse events (serious and not) are sent to the Safety Desk of the study sponsor. They are collected in a safety database (Safety-Easy), coded in MedDRA terminology, classified by System Organ Class (SOC) and analyzed individually. All those adverse events are documented and their outcomes are followed up until the return to normal or consolidation of the patient's condition.

The relationship between the investigational cell therapy product and each serious adverse event is evaluated and the expectedness of each serious adverse event is determined by the sponsor according to the Investigator's Brochure. All the SAEs that are both unexpected and at least reasonably related to the investigational cell therapy product are qualified as SUSARs (Suspected Unexpected Serious Adverse Reactions) and have to be reported by the sponsor to the ANSM, the local Ethics Committee and the study investigators.

Moreover, all the safety data obtained are reported by the sponsor to the ANSM and the local Ethics Committee in annual safety reports.

2.2. Investigational cell therapy product

2.2.1. Treatment characteristics

The evaluated treatment is a cell therapy product. It consists in autologous bone-marrow derived mesenchymal stem cells, expanded *in vitro* before their systemic reinjection to the patient (IV route).

Their main characteristics include: absence of hematopoietic surface markers (CD14, CD45, CD34), expression of MSC-specific surface markers (CD90, CD73, CD105), ability to form colonies (CFU-F) when cultured at low density, ability to differentiate in osteoblasts, chondrocytes and adipocytes when cultured with specific inducers (multipotentiality).

Two doses were tested in the clinical trial : 100×10^6 and 300×10^6 cells.

2.2.2. Production process

The bone marrow collection was performed by a qualified practitioner of the Grenoble Hospital under local anesthesia and rigorous aseptic conditions. It consisted in an aspiration through a trocar, using 20 mL heparinized syringes, in the posterior iliac spine. The bone marrows were collected in bags containing 4 mL ACD (Acid Citrate Dextrose), with final sample volumes of 20 mL. The samples were then labelled, and immediately sent to the Cell Therapy Unit (EFS Rhône Alpes, Saint Ismier, France), where they were processed. Each sample was accompanied by an identification document and stored at room temperature for a maximum of six hours before processing.

Cell expansion was performed in the Cell Therapy Unit, in a semi-closed system, in compliance with Good Manufacturing Practices.

Medullary nucleated cells were seeded at a density of 5×10^4 living cells / cm^2 in culture media composed of α -modified minimum essential medium (α MEM) without nucleotides and with L-glutamine (Macopharma, France), 10% clinical grade fetal bovine serum (Hyclone, USA), 1 ng/mL fibroblast growth factor 2 (FGF2 - R&D, USA) and 1 mg/mL ciprofloxacin (Fresenius Kabi). Cells were seeded in CellSTACK® Culture Chambers (Corning, USA).

This first culture step was called Passage 0 (P0). Cell culture media were exchanged twice a week until reaching at least 80% of cell confluence. At this point, adherent cells corresponding to mesenchymal stem cells were dissociated from the culture containers by trypsinization (Trypsin, Hyclone, USA). Then, they were seeded in a higher number of CellSTACK® Culture Chambers at a density of 1×10^3 cells / cm² in the same culture media as in P0. This culture step was called Passage 1 (P1). During P1, cell culture media were exchanged twice a week until reaching at least 80% of cell confluence. Adherent cells were finally dissociated from the culture containers using the same trypsinization protocol, pooled, washed, formulated in excipients made of human serum albumin (LFB, France) and Phosphate Buffer Saline (Macopharma, France) and packaged in a bag for infusion.

If the batch release was validated by the qualified person, the final cellular product was sent back to the Grenoble Hospital and reinjected to the patient, within six hours after the end of the production process.

This production process is summarized in Figure 8.

2.2.3. Quality controls and batch release

Quality controls were performed on the bone marrow donor (blood sample), on the raw material at reception (bone marrow), on the intermediate product (MSCs obtained at the end of P0) and on the final product before injection (investigational cell therapy product = fresh MSCs obtained at the end of P1).

Quality controls and their corresponding analytical methods and specifications are summarized in Table III. Among those quality controls, only some of them were mandatory for batch release (see Table III). Knowing that some results regarding the quality controls performed on the final product were not available at the moment of injection (see Table III), the batch release was decided using the results obtained at the end of P0 for those tests.

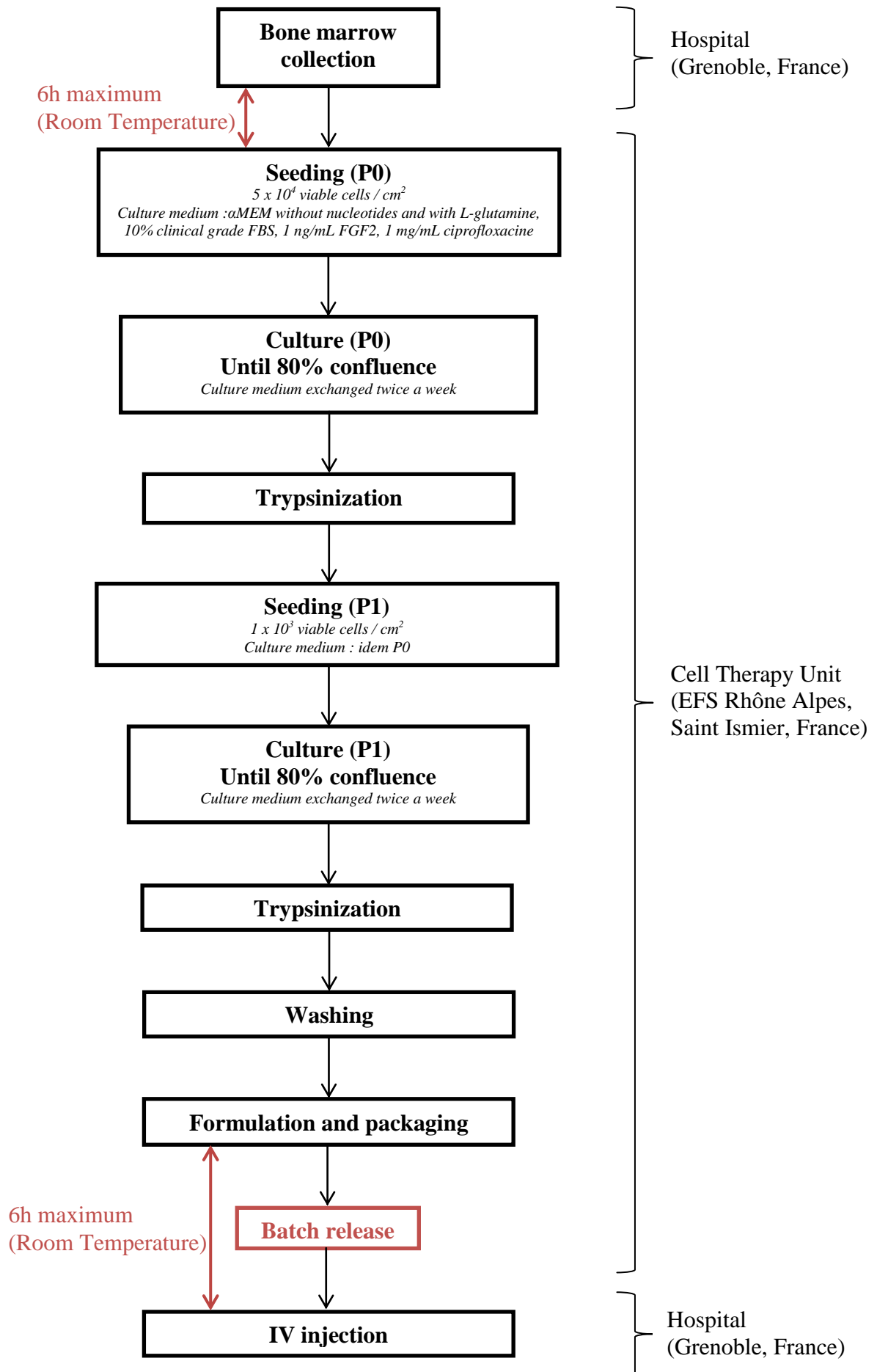


Figure 8 : Production process summary

α MEM: α -modified minimum essential medium; FBS: fetal bovine serum; FGF2: fibroblast growth factor 2

Quality control	Viral serology (HBV, HCV, HIV, HTLV, syphilis)	Cell count	Viability	Immunophenotype	Functionality	Microbiology	Telomerase activity	Tumorigenicity	Karyotype	
Analytical method	Immunoassays	- Hematology analyzer - Hemacytometer: manual numeration	- Hemacytometer: trypan blue dye assay - Flow cytometry: 7-AAD staining (initial product) or trypan blue dye (end of P0 and P1)	Flow cytometry	CFU-F assay	BACTEC™ (EP 2.6.27)	hTERT expression evaluation (RT-PCR)	Soft agar assay	Cytogenetic analysis	
Specifications	Bone marrow donor	Negative	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
	Raw material: bone marrow	N/A	Total medullary nucleated cells > 64 x 10 ⁶	>80%	N/A	>5 / 10 ⁶ nucleated cells	Absence of germs	N/A	N/A	
	Intermediate product: MSCs obtained at the end of P0	N/A	N/A	≥ 75%	CD14, CD45 < 1% CD73, CD90, CD105 > 90%	≥ 10%	Absence of germs	No telomerase activity	No tumorigenicity	No clonal chromosomal abnormality
	Final product for injection: MSCs obtained at the end of P1	N/A	MSCs ≥ 100 x 10 ⁶ or ≥ 300 x 10 ⁶	≥ 75%	CD14, CD45 < 1% CD73, CD90, CD105 > 90%	≥ 10%*	Absence of germs*	No telomerase activity*	No tumorigenicity*	No clonal chromosomal abnormality*

Mandatory for batch release

* Results unavailable at the moment of injection

Table III : Quality controls, analytical techniques and corresponding specifications

7-AAD: 7-Aminoactinomycin D; CD: cluster of differentiation; CFU-F: colony-forming unit - fibroblast; HBV: Hepatitis B virus; HCV: Hepatitis C virus; HIV: human immunodeficiency virus; hTERT: human telomerase reverse transcriptase; HTLV: Human T-lymphotropic virus; MSCs: mesenchymal stem cells; N/A: not applicable; RT-PCR: Reverse transcription polymerase chain reaction

2.3. Clinical trial data analysis

The clinical trial data analysis was performed using feasibility, tolerance and safety data obtained from 2010-08-23 (date of first inclusion) to 2015-08-25 (date of data analysis). We thus benefit from a five-year analysis period.

2.3.1. Feasibility assessment

Four criteria were analyzed as feasibility criteria: inclusion and follow-up of thirty patients, achievement of the BM collection for each treated patient, production of MSCs in adequate quantity and conform to specifications, achievement of the MSCs injections. The first criterion was evaluated for both control and treated patients, whereas the three others criteria were evaluated only for treated patients, as neither the bone marrow collection nor the injection were performed for control patients.

The influence of patient's characteristics on the feasibility results, such as the patient's age and gender, was also assessed.

2.3.2. Tolerance and safety assessment

Tolerance and safety of the MSCs treatment were assessed through the analysis of the adverse events that were reported from 2010-08-23 to 2015-08-25. A global analysis of the reported adverse events was performed. Then the occurrence of immediate adverse events (hematoma at the puncture or the injection site, allergy to the anesthesia product, local acute infusional toxicity, fever) was searched among the patients who underwent the bone marrow collection and the MSCs injection. The occurrence of the following adverse events was compared between control and treated patients: occurrence of a second stroke, epilepsy, infection, cancer and mortality.

2.3.3. Statistical analysis

Statistical analysis were performed using R software (version 3.2.1). Depending on the variable type (quantitative or qualitative), independent groups of patients were compared using the Student's *t*-test or the Fisher's exact test. According to the protocol, an intention-to-treat analysis was performed.

3. Results

3.1. Study execution

3.1.1. Flow diagram

A flow diagram (Figure 9) was constructed according to the CONSORT 2010 guideline.

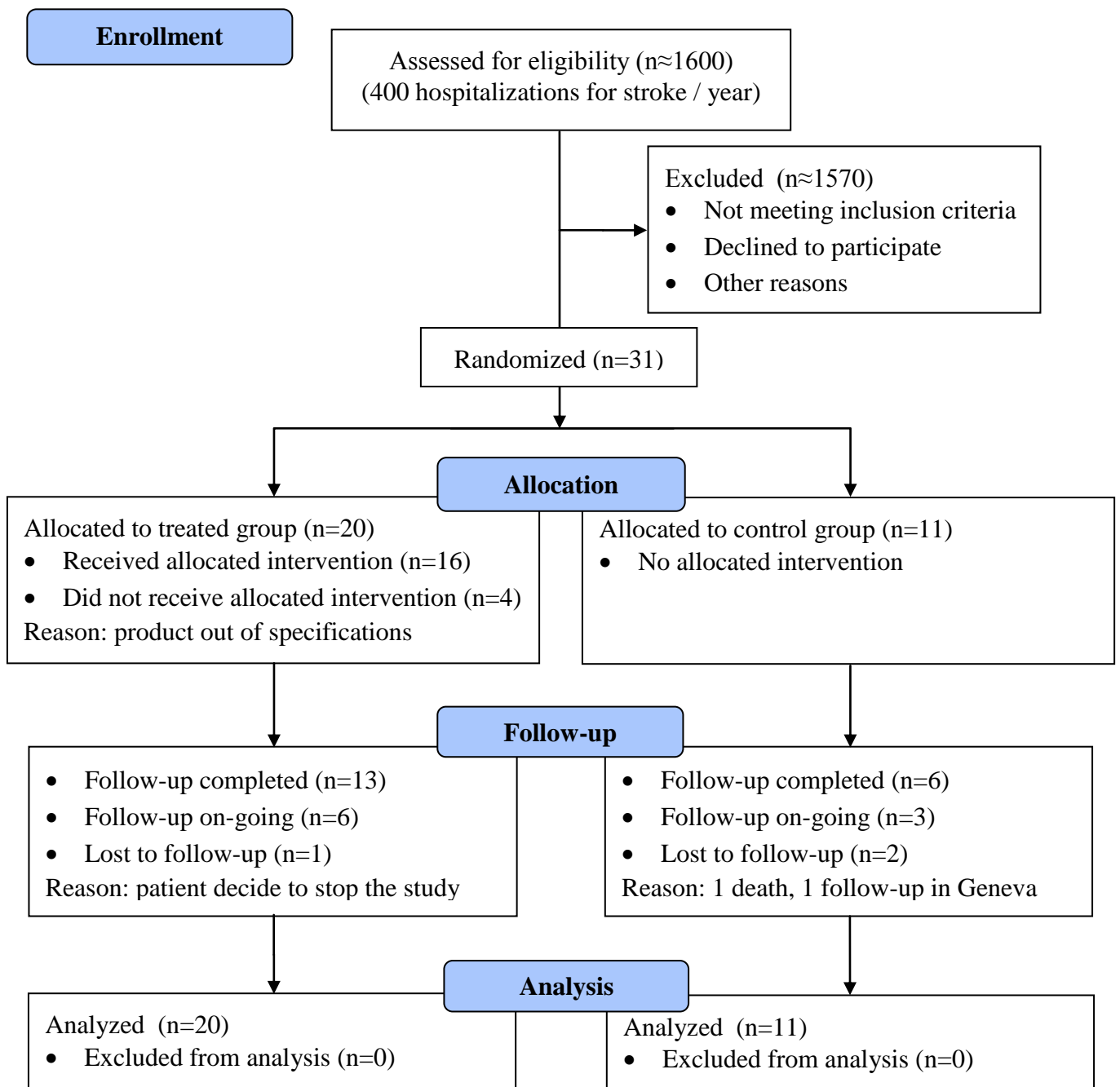


Figure 9 : Flow diagram of the study

A total of thirty-one patients were included from 2010-08-23 (first inclusion) to 2014-07-11 (last inclusion), as an eleventh patient was randomized in the control group instead of the ten patients planned. This mistake was due to the randomization system. An additional patient was therefore included to obtain twenty treated patients, as expected. This was authorized by the local Ethics Committee in April 2014.

Four patients did not receive the MSCs injection as the cell therapy product was out of specifications (see details after).

Three patients were lost to follow-up, one due to an accidental death and two because they decided not to pursue the follow-up. Moreover, nine were still in the follow-up process on 2015-08-25.

Nevertheless, data obtained for all patients were analyzed in terms of feasibility and tolerance.

3.1.2. Summary of patients characteristics

Patients characteristics are summarized in Table IV.

Patient's age (at the moment of their inclusion) ranged from 27 to 67, with an average age of 51.6 ± 10.3 . The average age was 52.4 ± 10.7 in the control group and 51.2 ± 10.8 in the treated group (Table V-A). No statistically significant difference between the two groups was highlighted ($t(29) = -0.303$, $p\text{-value} = 0.764$, Table V-B).

Among the thirty-one patients, twenty-two were male, which represented 71.0% of this population. Eight patients were male in the control group (72.7% of this population), while fourteen patients were male in the treated group (70.0% of this population) (Table VI). This distribution did not show any statistically significant difference ($p\text{-value} = 1.000$, Table VI).

A

Patient number	Sex	Age (inclusion)
01	Male	46
03	Female	38
06	Male	50
07	Female	60
08	Female	48
09	Male	59
10	Male	47
12	Male	31
14	Male	64
15	Female	41
16	Male	52
18	Male	58
19	Male	27
22	Male	59
23	Female	53
25	Male	57
26	Female	46
29	Male	57
30	Male	67
31	Male	63

B

Patient number	Sex	Age (inclusion)
02	Male	51
04	Male	53
05	Male	48
11	Male	32
13	Male	45
17	Female	59
20	Female	42
21	Female	65
24	Male	65
27	Male	53
28	Male	63

Table IV : Patients characteristics

A: treated group; B: control group

A

	N	Mean age	Standard deviation	Standard error
Treated	20	51.2	10.8	2.4
Control	11	52.4	10.7	3.1
Total	31	51.6	10.3	1.9

B

	Normality test (Shapiro-Wilk test)		F-test for equality of variances		T-test for equality of means				
	W	p-value	F	p-value	t	df	p-value	CI 95%	
								Inferior	Superior
Treated	0.947	0.324	1.090	0.925	-0.303	29	0.764	-9.402	6.975
Control	0.946	0.598							

Table V : Patient's age distribution

A: descriptive statistics; B: inferential statistics

	Male	Female	p-value (Fisher's exact test)
Treated	14 (70.0%)	6 (30.0%)	1.000
Control	8 (72.7%)	3 (27.3%)	

Table VI : Patient's gender distribution

3.2. Feasibility assessment

The evaluation of the four feasibility criteria is summarized in Table VII.

3.2.1. Inclusion and follow-up of thirty patients

The thirty patients expected for the study were successfully included. The two-year follow-up is currently completed for patients 1 to 22. Among them, three did not complete the study. Those three patients were either in the control group or were in the treated group but did not undergo the MSCs injection. For the last eight patients (from patient 23), the two-year follow-up is still on-going.

3.2.2. Achievement of the BM collection for each treated patient

All the patients included in the treated group underwent the bone marrow collection. During this collection, no major feasibility problems were reported. There was only one poor quality bone marrow sample, which was reflected by the out of specifications result obtained for the CFU-F assay (Table VII, patient 14).

Patient number	Group	Inclusion and follow-up of 30 patients	BM collection for each treated patient	Production of MSC in adequate quantity and conform to specifications	MSC injections
1	Treated	Yes	Yes	Inadequate quantity (60 million cells instead of 100 million)	Yes
2	Control	Accidental death			
3	Treated	Yes	Yes	Yes	Yes
4	Control	Yes			
5	Control	Yes			
6	Treated	Withdrawn from study	Yes	Presence of non clonal chromosomal abnormalities at the end of P0 (2 trisomy 8)	No injection
7	Treated	Yes	Yes	Yes	Yes
8	Treated	Yes	Yes	Presence of non clonal chromosomal abnormalities, different at the end of P0 (1 trisomy 7, 1 trisomy 18 et 1 trisomy 19) and at the end of P1 (monosomy X and trisomy X)	Yes
9	Treated	Yes	Yes	Yes	Yes
10	Treated	Yes	Yes	Yes	Yes
11	Control	Withdrawn from study			
12	Treated	Yes	Yes	Yes	Yes
13	Control	Yes			
14	Treated	Yes	Yes, but poor quality bone marrow sample	- CFU-F of the bone marrow < 5/10 ⁶ nucleated cells - Presence of non clonal chromosomal abnormalities at the end of P0 (4 trisomy 10, 2 monosomy 22, 1 trisomy 9) and at the end of P1 (1 trisomy 10, 8 monosomy X)	No injection
15	Treated	Yes	Yes	- CFU-F of the intermediate product < 10% - Interruption of proliferation and cellular senescence	No injection
16	Treated	Yes	Yes	Yes	Yes

17	Control	Yes			
18	Treated	Yes	Yes	Yes	Yes
19	Treated	Yes	Yes	- BM infected with a <i>Staphylococcus capitis</i> strain sensitive to antibiotics - No contamination at the end of P0 and P1	Yes
20	Control	Yes			
21	Control	Yes			
22	Treated	Yes	Yes	Inadequate quantity (240 million cells instead of 300 million)	Yes
23	Treated	Yes	Yes	Inadequate quantity (136 million cells instead of 300 million)	Yes
24	Control	Yes			
25	Treated	Yes	Yes	- BM infected with a <i>Staphylococcus caprae</i> strain sensitive to antibiotics - No contamination at the end of P0 and P1	Yes
26	Treated	Yes	Yes	Inadequate quantity (253 million cells instead of 300 million)	Yes
27	Control	Yes			
28	Control	Yes			
29	Treated	Yes	Yes	Inadequate quantity (255 million cells instead of 300 million)	Yes
30	Treated	Yes	Yes	Yes	Yes
31	Treated	Yes	Yes	- Contamination by a multi-resistant <i>Staphylococcus hominis</i> strain at the end of P0 - Production process stopped at the end of P0	No injection

Table VII : Evaluation of feasibility criteria

BM: bone marrow, MSCs: mesenchymal stem cells

3.2.3. Production in adequate quantity and conform to specifications

The production process has been completed for all the patients, except for patient 31, for which the production process was stopped at the end of P0 (see details after). The entire MSC expansion process took 25.5 ± 3.3 days, which was divided in 13.8 ± 1.8 days and 11.7 ± 2.2 days for P0 and P1, respectively.

Three recurring types of problems have been reported during the MSCs production process.

The first one was the production of MSCs in inadequate quantity. For five treated patients (patient 1, 22, 23, 26, 29), corresponding to 25% of all treated patients, the production process resulted in an insufficient quantity of MSCs. Among those five patients, the first one was supposed to receive 100 million cells whereas only 60 million were produced and the four others had to receive 300 million cells whereas 240, 136, 253 and 255 million were produced, respectively. This under-dosage has caused no considerable consequence to date.

The second type of problem was the occurrence of chromosomal abnormalities during the production process, which affected three cell cultures, i.e. 15% of them.

For patient 6, a trisomy 8 was found on two mitoses at the end of P0 but was not found at the end of P1. This type of chromosomal abnormality was described in a publication suggesting that mesenchymal stem cells submitted to long-term culture processes can spontaneously acquire chromosomal abnormalities, which could result in tumor formation in mice⁽⁹³⁾. Based on the precautionary principle and in agreement with clinicians and cytogeneticists of the Grenoble Hospital, it was decided not to inject this production to the patient.

For patient 8, non clonal chromosomal abnormalities were detected at the end of P0 (one trisomy 7, one trisomy 18 et one trisomy 19) and other abnormalities were found at the end of P1. In this case, cytogenetic abnormalities probably came from culture-acquired and transitory abnormalities. In agreement with clinicians, cytogeneticists and cell therapy experts, the MSCs injection was performed.

For patient 14, numerous non clonal chromosomal abnormalities were detected in the primoculture P0 (in particular a trisomy 10 on four mitoses) and at the end of P1 (one trisomy 10, eight monosomy X). They were most probably resulting from the bad quality of the collected bone marrow and from a difficulty for MSCs to proliferate in their culture environment. In that case, the injection was cancelled.

Finally, there were also some cases of contaminations, which also impacted three cells batches, corresponding to 15% of them.

For patients 19 and 25, the collected bone marrow was infected with a *Staphylococcus capitis* strain and a *Staphylococcus caprae* strain, respectively, both of them sensitive to antibiotics. Sterility was confirmed on the intermediate (end of P0) and the final product (end of P1), and MCSs were thus injected.

For patient 31, a contamination by a multi-resistant *Staphylococcus hominis* strain was detected at seeding and at the end of P0. In this case, the MSCs injection was cancelled and the production process was stopped at the end of P0. A careful analysis of this case showed that the most likely source of contamination would be a contamination of the collection bag during the BM collection.

Another isolated problem was also detected for patient 15. For this patient, cells entered in senescence during P1 and stopped their proliferation (Table VII, patient 15). MSCs were consequently not delivered to this patient.

Feasibility issues were consequently identified for twelve patients. As the final product was finally conform to specifications for three of those twelve patients (patient 8, 19 and 25), the manufacturing process led to nine out of specifications final products. MSCs were consequently produced in adequate quantity and conform to specifications for eleven patients, which represented 55% of the patients of the treated group.

3.2.4. Achievement of the MSCs injections

In agreement with the sponsor and the clinicians, the MSCs injection was only authorized for products whose out of specifications results were regarding the cell dose, i.e. for five patients.

Consequently, four patients, corresponding to 20% of all treated patients, did not undergo the MSCs injection because the cell product did not comply with the specifications: patient 6 and 14 due to the presence of karyotype abnormalities, patient 31 because of a contamination by a multi-resistant *Staphylococcus hominis* strain and patient 15 as the cell product showed an interruption of proliferation during P1.

The sixteen others injections were successfully performed.

3.2.5. Influence of the patient's age

First, the influence of the patient's age on the MSCs proliferative capacity was evaluated. According to Table VIII-A, the mean age of patients whose MSCs were produced in adequate quantity (N=15) was 50.8 ± 12.2 , whereas the mean age of patients whose MSCs were produced in inadequate quantity (N=5) was 52.2 ± 6.1 . This difference was not statistically significant ($t(18) = -0.244$, $p\text{-value} = 0.810$, Table VIII-B).

It was also assessed whether the patient's age had an influence on the development of chromosomal abnormalities during production. The mean age of patients whose MSCs were produced without development of chromosomal abnormalities (N=17) was 50.6 ± 11.3 , whereas the mean age of patients whose MSCs were produced with development of chromosomal abnormalities (N=3) was 54.0 ± 8.7 (Table IX-A). This difference was not statistically significant ($t(18) = -0.485$, $p\text{-value} = 0.634$, Table IX-B).

A

	N	Mean age	Standard deviation	Standard error
Adequate quantity	15	50.8	12.2	3.1
Inadequate quantity	5	52.2	6.1	2.7

B

	Normality test (Shapiro-Wilk test)		F-test for equality of variances		T-test for equality of means				
	W	p-value	F	p-value	t	df	p-value	CI 95%	
								Inferior	Superior
Adequate quantity	0.940	0.387	4.030	0.188	-0.244	18	0.810	-13.441	10.641
Inadequate quantity	0.869	0.263							

Table VIII : Influence of the patient's age on the MSCs proliferative capacity

A: descriptive statistics; B: inferential statistics

A		N	Mean age	Standard deviation	Standard error
	No abnormalities	17	50.6	11.3	2.7
	Abnormalities	3	54.0	8.7	5.0

B	Normality test (Shapiro-Wilk test)		F-test for equality of variances		T-test for equality of means				
	W	p-value	F	p-value	t	df	p-value	CI 95%	
								Inferior	Superior
No abnormalities	0.936	0.270	1.681	0.873	-0.485	18	0.634	-17.884	11.178
Abnormalities	0.842	0.220							

Table IX : Influence of the patient's age on the development of chromosomal abnormalities during production

A: descriptive statistics; B: inferential statistics

3.2.6. Influence of the patient's gender

The influence of the patient's gender on the MSCs proliferative capacity was also evaluated. Among the patients whose MSCs were produced in adequate quantity (N=15), eleven (73.3%) were male and four (26.7%) were female, while among the patients whose MSCs were produced in inadequate quantity (N=5), only three (60.0%) were male and two (40.0%) were female (Table X). This distribution based on the patient's gender did not show any statistically significant difference (p-value = 0.613, Table X).

Then it was assessed whether the patient's gender had an influence on the development of chromosomal abnormalities during production. Among the patients whose MSCs were produced without development of chromosomal abnormalities (N=17), twelve (70.6%) were male and five (29.4%) were female, while among the patients whose MSCs were produced with development of chromosomal abnormalities (N=3), two (66.7%) were male and one (33.3%) was female (Table XI). No statistically significant difference was shown in this distribution (p-value = 1.000, Table XI).

	Male	Female	p-value (Fisher's exact test)
Adequate quantity	11 (73.3%)	4 (26.7%)	0.613
Inadequate quantity	3 (60.0%)	2 (40.0%)	

Table X : Influence of the patient's gender on the MSC proliferative capacity

	Male	Female	p-value (Fisher's exact test)
No abnormalities	12 (70.6%)	5 (29.4%)	1.000
Abnormalities	2 (66.7%)	1 (33.3%)	

Table XI : Influence of the patient's gender on the development of chromosomal abnormalities during production

3.3. Tolerance and safety assessment

3.3.1. Global analysis

For this analysis, the injection of an inadequate quantity of mesenchymal stem cells (five patients) or the absence of injection (four patients) were not considered as adverse effects but analyzed as feasibility issues.

From 2010-08-23 to 2015-08-25, thirty-six notifications corresponding to forty-two adverse events were reported and recorded in the Safety-Easy database. Among those forty-two events, eight were non serious adverse events and thirty-four were serious adverse events.

Non serious adverse events corresponded to four cases of minor infections, one case of anxiodepressive syndrom, one case of facial spasm, one case of algodystrophy and one case of sprained ankle. Those non serious adverse events will not be analyzed hereafter.

The thirty-four others adverse events were considered as serious adverse events (results in death / is life-threatening / requires the patient hospitalization or the prolongation of an existing hospitalization / results in a persistent or significant disability/incapacity / leads to a congenital anomaly or birth defect / is considered as a medically significant event). None of them were related to the investigational cell therapy product (MSCs).

According to Figure 10, nervous systems disorders were the most prevalent type of serious adverse events (41.2% of all adverse events), mainly corresponding to epileptic seizures and recurrent cerebral infarctions. The second most prevalent types of serious adverse events were the infections and infestations (17.7% of all adverse events) and the injury, poisoning and procedural complications (17.7% of all adverse events), mainly corresponding to fractures. The other types of serious adverse events had a lower frequency.

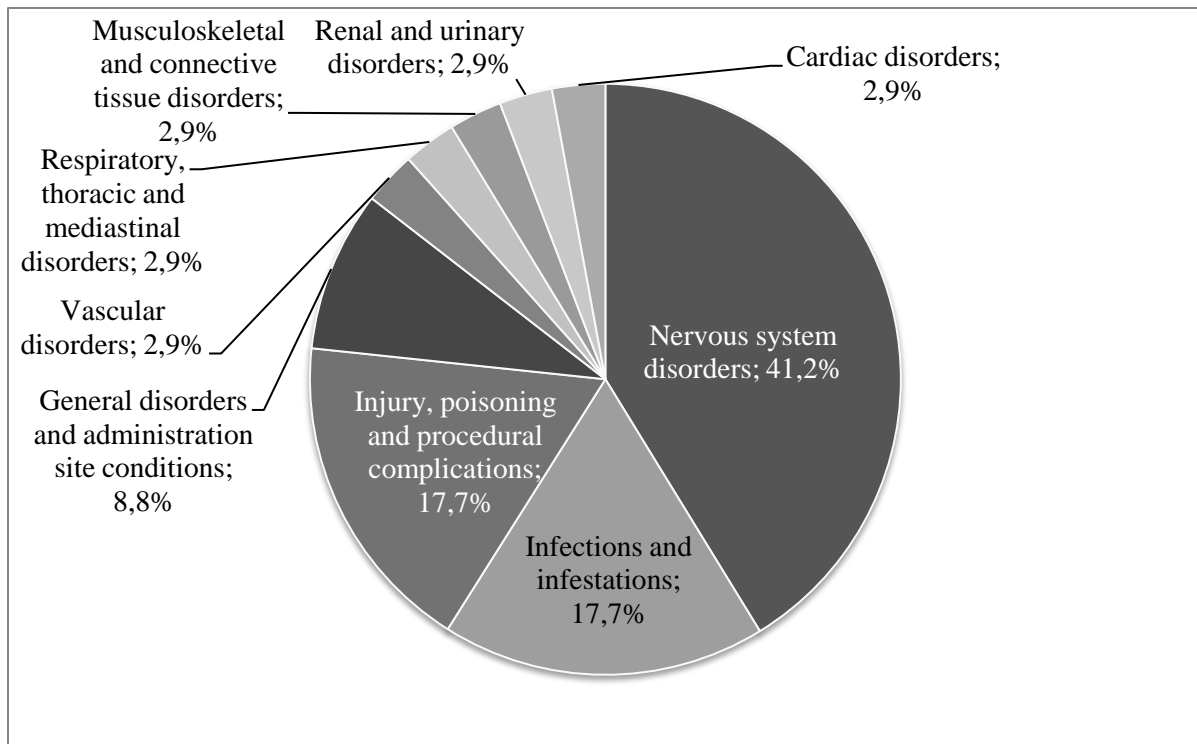


Figure 10 : Distribution of serious adverse events (classified in System Organ Class)

3.3.2. Immediate adverse events

During the bone marrow collection and the MSCs injection, a close surveillance of the patients was performed by the clinical team. In particular, the general state of the patients as well as their temperature were monitored. None of the potentially expected immediate adverse events (hematoma at the puncture or the injection site, allergy to the anesthesia product, acute infusional toxicity or fever) were reported.

3.3.3. Occurrence of a second stroke

In the context of stroke, it is commonly admitted that 5% of stroke cases lead to a recurrence each year. The occurrence of a second stroke was therefore assessed in the study population. Among the thirty-one patients, it was reported that two suffered from a second stroke (Table XII-A), corresponding to 6.5% of the study population. Those two patients were in the control group. No statistically significant difference was highlighted between the two groups of patients (p-value = 0.118, Table XII-B).

A

Patient number	Inclusion date	Group	Date of MSCs injection	Reaction/event in MedDRA terminology (LLT)	Date of start of reaction/event	Onset since inclusion	Onset since MSCs injection
02	2010-09-07	Control	NA	Recurrent cerebral infarction	2010-10-18	1 month	NA
04	2010-12-08	Control	NA	Recurrent cerebral infarction	2010-12-15	1 week	NA

B

	Second stroke	No second stroke	p-value (Fisher's exact test)
Treated	0 (0.0%)	20 (100.0%)	0.118
Control	2 (18.2%)	9 (81.8%)	

Table XII : Occurrence of a second stroke in the study population

A: summary of reported cases; B: statistical analysis

3.3.4. Epilepsy

Stroke is associated with an increased risk of subsequent seizures and epilepsy. The frequency of seizures in stroke victims varies from 5 to 20%, but only a minority will develop a real epilepsy over the long term⁽⁹⁴⁾. The point was to assess whether the MSCs injection could promote or decrease seizures and epilepsy in post-stroke patients.

Among the thirty-one patients of the study, it was reported that nine experienced one or more epileptic seizure(s) during their follow-up, all types of epileptic seizures considered (Table XIII-A). None of them had a medical history of epilepsy. For patient 7, the convulsive seizure occurred in a context of suicide attempt with an important medication intake (paracetamol), so this case was not included in the analysis. Consequently, it was considered that eight patients experienced one or more epileptic seizure(s) linked to their stroke, i.e. 25.8% of the patients.

Six patients were in the treated group (30.0% of this group), whereas two were in the control group (18.2% of this group) (Table XIII-B). The odds ratio of this distribution was 1.890 (95% CI, 0.257 - 23.193), which suggests that the treatment is associated with a higher risk of epilepsy. Nevertheless, no statistically significant difference in epilepsy occurrence was identified between the two groups of patients (p-value = 0.676, Table XIII-B).

Finally, the mean delay between the patient's inclusion and the occurrence of the first epileptic seizure was not different between the treated and the control group, as it was 10.5 ± 4.5 months and 11.0 ± 8.5 months, respectively (Table XIII-C).

A

Patient number	Inclusion date	Group	Date of MSCs injection	Reaction/event in MedDRA terminology (LLT)	Date of start of reaction/event	Onset since inclusion	Onset since MSCs injection
07	2011-03-31	Treated	2011-04-20	Convulsive seizure	2012-09-18	18 months	17 months
08	2011-09-06	Treated	2011-09-26	Partial seizures, complex	2012-11-29	14 months	14 months
15	2012-05-09	Treated	NA	Generalized convulsive epilepsy	2013-08-09	15 months	NA
14	2012-05-03	Treated	NA	Generalised epileptic seizure	2012-12-10	7 months	NA
11	2012-01-06	Control	NA	Generalized convulsive epilepsy	2013-06-04	17 months	NA
21	2013-06-12	Control	NA	Generalised epileptic seizure	2013-11-06	5 months	NA
16	2012-10-05	Treated	2012-11-08	Generalized convulsive epilepsy	2013-12-06	14 months	13 months
15	2012-05-09	Treated	NA	Partial epilepsy	2014-05-19	24 months	NA
30	2014-03-03	Treated	2014-04-03	Partial epilepsy	2014-07-26	4 months	3 months
29	2014-02-25	Treated	2014-04-02	Partial seizures	2014-11-23	9 months	7 months
29	2014-02-25	Treated	2014-04-02	Partial seizures	2015-02-08	12 months	10 months

B

	Epilepsy	No epilepsy	OR	p-value (Fisher's exact test)
Treated	6 (30.0%)	14 (70.0%)	1.890	0.676
Control	2 (18.2%)	9 (81.8%)	(95% CI, 0.257 - 23.193)	

C

	N	Mean delay between inclusion and first epileptic seizure (months)	Standard deviation	Standard error
Treated	6	10.5	4.5	1.8
Control	2	11.0	8.5	6.0

Table XIII : Epilepsy cases in the study population

A: summary of reported cases; B: statistical analysis; C: Delay between inclusion and first epileptic seizure

3.3.5. Infections

The objective was to evaluate whether the injection of mesenchymal stem cells could induce a greater susceptibility to infections because of their immunomodulatory properties. A total of six serious infections cases were reported (Table XIV-A), corresponding to four different patients, i.e. 12.9% of the study population. Those four patients who developed one or more

infection(s) were all in the treated group (Table XIV-B), suggesting a higher susceptibility to infections due to the treatment. Despite this pattern, no statistically significant increase in the occurrence of infections was identified in the treated group, compared to the control group (p-value = 0.269, Table XIV-B).

A

Patient number	Inclusion date	Group	Date of MSCs injection	Reaction/event in MedDRA terminology (LLT)	Date of start of reaction/ event	Onset since inclusion	Onset since MSCs injection
10	2011-12-27	Treated	2012-01-24	<i>Klebsiella pneumoniae</i> infection	2013-06-05	18 months	17 months
10	2011-12-27	Treated	2012-01-24	Urinary infection	2012-12-08	12 months	11 months
14	2012-05-03	Treated	NA	Infectious pneumonitis	2013-03-22	10 months	NA
18	2013-01-15	Treated	2013-02-12	Pneumopathy	2013-02-19	1 month	1 week
31	2014-07-11	Treated	NA	1. Prostatitis <i>Escherichia coli</i> 2. Septic shock	1. 2014-08-01 2. 2014-08-01	1 month	NA

B

	Infection	No infection	p-value (Fisher's exact test - Alternative="greater")
Treated	4 (20.0%)	16 (80.0%)	0.269
Control	0 (0.0%)	11 (100.0%)	

Table XIV : Occurrence of infections in the study population

A: summary of reported cases; B: statistical analysis

3.3.6. Cancer

To evaluate the neoplastic potential of MSCs due to their proliferative capacity, the occurrence of solid cancers and hematologic malignancies was monitored in the study population. No solid cancers or hematologic malignancies were diagnosed, neither among patients of the control group, nor among patients of the treated group.

3.3.7. Mortality

One patient of the control group died during the study. This case was an accidental death from drowning, that had no link with the study.

4. Discussion and Perspectives

In this present study, the feasibility and tolerance of the injection of mesenchymal stem cells in post-stroke patients were assessed. We benefited from a two-year follow-up for the first twenty-two patients and from more than one year for the last nine patients.

First, the feasibility of this cell therapy protocol was assessed with the objective to set the basis for a future trial with more patients. This analysis led to the identification of several feasibility issues, as 45% of the stem cells batches were out of specifications. Three non-compliance causes were identified: the production of stem cells in inadequate quantity, the development of karyotype abnormalities and cell senescence during the culture and the contamination of the cells by bacterial strains. Stem cells batches that were out of specifications because of an insufficient number of cells were accepted by way of derogation and cells were injected to the patients so that only 20% of stem cells batches were rejected. Nevertheless, five patients were injected with a cells dose that was lower than expected, especially above patients that should have received the high stem cells dose (300×10^6 cells). These difficulties to produce this high stem cells dose of 300 million cells highlight the unsuitability of the manufacturing process to produce such a dose of autologous cells. The implementation of a production process using bioreactors has thus to be considered to solve this problem.

Another problem raised by the use of *in vitro* expanded autologous cells is the necessity to use the results of the quality controls performed on the intermediate product for batch release instead of those performed on the final product as they are not available at the moment of the release for injection. The consequence is the risk of rejecting a batch because the intermediate product was out of specifications, whereas the final product was not and would have been injected if the final results were known. This is especially the case for chromosomal abnormalities that usually disappear at P1. The opposite problem can also occur, leading to the release of an out of specifications batch according to positive intermediate controls.

All those problems could be overcome by developing a well-characterized allogenic cell therapy product that would guarantee a treatment with the sufficient dose and immediately after stroke. The best option would be to use qualified frozen cells, injected to the patients immediately after the thawing process, without any additional culture step. However, more studies need to be performed in order to be sure that the functionality of thawed MSCs is maintained in comparison to fresh MSCs⁽⁹⁵⁾. Consequently, this is still preferable to perform an additional culture step after the thawing process and before the injection.

In terms of safety, none of the potentially expected immediate adverse events (hematoma at the puncture or injection site, allergy to the anesthesia product, acute infusional toxicity or fever) were reported. 6.5% of the study population experienced a second stroke (two patients who were both in the control group) and 25.8% suffered from at least one epileptic seizure. Those data are slightly higher than in the general post-stroke population, where it is commonly admitted that 5% of stroke cases lead to a recurrence each year and that 5 to 20% of stroke victims are subject to epileptic seizures⁽⁹⁴⁾. Those high results can be due to the fact that only patients with moderate to severe strokes were included in the study (NIHSS ≥ 7 and even NIHSS > 11 at the beginning of the study). Nevertheless, no difference was shown between the control and the treated group in terms of second stroke and epilepsy occurrence.

The occurrence of infections was also evaluated, as one of the major concerns with mesenchymal stem cells is the potential susceptibility to infection linked to their immunomodulatory properties. 12.9% of the study population experienced at least one episode of infection (four patients of the treated group). Despite this difference, the analysis did not show an increase in the occurrence of infections in the treated group, compared to the control group. Those infections were mainly pulmonary and urinary infections, which is expected in this type of population. This observation highlights the high importance to monitor the immune response of patients receiving autologous or allogenic MSCs by implementing an immunomonitoring in future clinical trials.

As a comparison, a meta-analysis including fourteen studies with stem cell therapies in patients with stroke⁽⁹⁶⁾ estimated that the pooled incidence rates of seizures and infections were 15% (95% CI, 8-25%), and 15% (95% CI, 8-23%), respectively.

The last point was to assess the neoplastic potential of mesenchymal stem cells that could be induced by their proliferative capacity, by monitoring the occurrence of cancers. So far, nor solid cancers, neither hematologic malignancies were diagnosed in the study population, but a longer follow-up period would be necessary to confirm those data.

We therefore did not identify any safety issue linked to the injection of autologous mesenchymal stem cells in post-stroke patients, which tends to demonstrate that this cell therapy is well-tolerated.

So far, five clinical trials with published results have been conducted with autologous mesenchymal stem cells as a post-stroke cell therapy^{(81) (82) (83) (84) (85)}. All of them were evaluating the feasibility and tolerance of the injection of autologous mesenchymal stem cells collected from the patient's bone marrow, using stem cells doses ranging from 50 to 160 x 10⁶

cells. Those five studies concluded that the injection of mesenchymal stem cells was safe and despite very close cell production processes, no feasibility issues were identified. Three others publications reporting the use of mesenchymal stem cells in post-stroke patients were identified ^{(86) (87) (88)}. Those trials assessed umbilical cord mesenchymal stem cells and also demonstrated the safety and the feasibility of this cell therapy.

Moreover, a meta-analysis performed by Lalu et al. ⁽⁸⁹⁾, analyzing thirty-six clinical trials that used intravascular (intravenous or intra-arterial) delivery of mesenchymal stem cells in various clinical contexts, concluded that this cell therapy appears to be safe. No association between MSCs injection and acute infusional toxicity, organ system complications, infections, death or malignancy was detected and only a significant association between MSCs injection and transient fever was shown.

The results obtained in the present study therefore confirm the data reported from previous trials in terms of tolerance and safety. Nevertheless, no association between stem cells injection and fever was detected despite a close monitoring of the patients temperature following the MSCs injection. This is also the first time that feasibility issues seem to be identified using this kind of cell culture protocol. After a careful review of the five similar study protocols ^{(81) (82) (83) (84) (85)}, this difference seems to be linked to more extensive quality controls in the present study compared to the five other studies. Indeed, the stem cells batches have always been tested for sterility but this is the first time that a cytogenetic analysis is included as part of the quality controls for batch release. This type of analysis was imposed by the ANSM after the publication of papers suggesting that mesenchymal stem cells could induce a tumor formation in mice, which was linked to a spontaneous acquisition of karyotype abnormalities ⁽⁹³⁾. The production of stem cells in inadequate quantity could have been raised by the higher dose that was expected in the present study compared to previous trials. Indeed, the highest dose that was injected before was 160×10^6 cells, and cells doses were more frequently between 50 and 100×10^6 cells. Those stem cells batches were usually produced within a culture period that was very close to the one performed in the present study. It was for example 20.3 ± 7.1 days for Honmou et al. ⁽⁸³⁾ and 23 ± 3 days for Bhasin et al. ⁽⁸⁴⁾.

The results obtained in the present study have to be balanced with some study limitations. First of all, the study was performed on a small number of patients, which makes it difficult to identify any statistical association between the treatment and some adverse events, despite the use of statistical tests dedicated to the study of small samples. A study with a larger population would be useful to confirm those data. Moreover, the study population was not

completely representative of the population usually experiencing stroke. Indeed, 69% of people experiencing strokes are above 64, whereas the mean age of the study population was 51.6. In terms of gender distribution, this parameter is highly variable and varies considerably between countries, due to demographic factors reflecting gender ratio in the general population, gender-specific stroke incidence rates, and also sociocultural peculiarities ⁽⁹⁷⁾. In France, the gender distribution seems well-balanced, with 49.8% men hospitalized for a stroke in 2008 and 50.2% women ⁽⁹⁸⁾. This is a second difference with the study population, where 71.0% of the population was male. Once again, a study with a larger sample size could be more representative in terms of patient's age and gender distribution.

Finally, only patients with moderate to severe strokes were included in the study, which creates a selection bias.

Those very encouraging data regarding the tolerance and safety of the injection of mesenchymal stem cells as a post-stroke therapy permit to consider a second clinical trial with more patients, to confirm the safety data on a larger population, while assessing the efficacy of this cell therapy. The main point will be to deal with the feasibility issues raised by the present study. As stated before, the best way to overcome the feasibility problems would be to develop a well-characterized allogenic cell therapy product. This type of allogenic transplantation can be considered without using immunosuppressive drugs thanks to the immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells ⁽⁷⁸⁾. With this kind of cell therapy product, the culture process would be shortened by using banked cells, and the stem cells would be completely characterized at the moment of the injection, allowing a treatment with the sufficient dose and shortly after stroke. This would also have the advantage to reduce the cost of the treatment. Considering all those advantages, a second clinical trial was constructed on this model. This trial entitled Regenerative Stem Cell Therapy for Stroke in Europe (short title: RESSTORE) is a phase IIb, multicentric, controlled, parallel, randomized and double-blind European trial that will assess the efficacy of an intravenous cell therapy using allogenic adipose-derived mesenchymal stem cells to improve recovery and/or compensation after ischemic stroke. Starting in 2016, it will include four hundred patients in twenty-four specialized stroke units of five countries (Czech Republic, Finland, France, Spain, UK/Scotland). The investigational cell therapy product will consist in allogenic adipose-derived mesenchymal stem cells obtained from five donors, that will be stored in Working Cell Banks and prepared just before the injection. The efficacy of this treatment will be assessed compared to a placebo injection.

5. Conclusion

The present study permits to conclude that the injection of mesenchymal stem cells in post-stroke patients is safe, in accordance with the data obtained in previous trials. Feasibility issues identified during the present study were carefully studied and gave the opportunity to modify the cell therapy protocol by using an allogenic cell therapy product for the next clinical phase with more patients. But as the number of patients was very low in the present study, a close monitoring of the adverse events will be necessary during the next clinical phase to confirm the safety profile of this therapy.

Troisième partie : Discussion générale

1. Résultats de l'essai clinique ISIS

1.1. Résumé et discussion des résultats obtenus

1.1.1. Faisabilité du protocole de thérapie cellulaire

Dans un premier temps, la faisabilité de ce protocole de thérapie cellulaire a été évaluée, en prenant en compte quatre critères de faisabilité :

- l'inclusion et le suivi de trente patients;
- la réalisation du prélèvement de moelle osseuse pour chaque patient traité;
- la production de CSM en quantité suffisante et conformes aux spécifications;
- la réalisation de l'injection intraveineuse des CSM autologues.

L'inclusion des trente patients a pu être réalisée et leur suivi, bien que non terminé pour tous les patients, est pour le moment satisfaisant.

Les prélèvements de moelle osseuse ont quant à eux été réalisés sans que ne soient mis en évidence des problèmes de faisabilité.

Concernant la production des cellules souches mésenchymateuses, trois causes de non-conformité ont été mises en évidence : la production de cellules souches en quantité insuffisante (cinq patients), le développement d'anomalies caryotypiques (deux patients) ou l'apparition d'une sénescence cellulaire (un patient) et la contamination par des souches bactériennes (un patient). Au total, 45% des productions étaient ainsi non conformes aux spécifications établies. Dans les cas où le produit final était non conforme à cause d'une quantité insuffisante de cellules, les lots ont été acceptés par dérogation, si bien qu'au final, seuls quatre lots, soit 20% d'entre eux, ont été rejetés et n'ont donc pas été injectés aux patients. Cependant, cinq patients ont dû être injectés avec des quantités de cellules souches en deçà de la quantité initialement prévue, et notamment quatre patients qui étaient supposés recevoir la forte dose de cellules. Les conséquences de ce « sous-dosage » en cellules ne sont pas quantifiables ou appréhendables à ce jour, car on parle de millions de cellules et non de microgrammes ou de milligrammes comme pour les médicaments « classiques ».

Concernant la réalisation de l'injection, aucun problème n'a été identifié lors de l'injection intraveineuse des cellules souches mésenchymateuses aux patients.

Seuls des problèmes de faisabilité non négligeables essentiellement liés à la production des cellules souches mésenchymateuses ont donc été mis en évidence.

Il a été suggéré que le sexe, mais aussi et surtout l'âge des patients, pourraient avoir un lien avec la quantité de cellules obtenues et la qualité des cellules souches produites, notamment en ce qui concerne le développement d'anomalies caryotypiques. En effet, plus le patient est âgé et plus les capacités de prolifération et la stabilité de ses cellules souches sont limitées. Cependant, aucun lien statistique entre le sexe et l'âge des patients et la production de cellules souches en quantité insuffisante ou le développement d'anomalies caryotypiques n'a été mis en évidence dans le cadre de l'étude ISIS.

Les difficultés à produire la forte dose de 300 millions de cellules souches mésenchymateuses traduisent l'incapacité du procédé de production à assurer la production d'une telle dose de cellules souches autologues. Pour produire de plus fortes doses de cellules, une solution consisterait à réaliser un troisième passage des cellules. Cela permettrait d'obtenir une quantité de cellules supérieure mais aurait l'inconvénient d'augmenter le délai entre l'AVC et le traitement, alors que l'objectif est plutôt de le diminuer. Pour éviter cet inconvénient, la mise en place d'un procédé de production utilisant des bioréacteurs pourrait être envisagée.

De plus, l'autre problème soulevé par ce protocole d'expansion *in vitro* de cellules souches autologues concerne le fait de libérer les lots de cellules en utilisant dans certains cas les résultats des contrôles qualité réalisés sur le produit intermédiaire. Le risque est en effet de rejeter un lot sur la base de la non-conformité du produit intermédiaire, alors que les contrôles finaux auraient été satisfaisants et que le produit aurait pu être injecté. Cela concerne notamment le développement d'anomalies caryotypiques, qui bien souvent ne persistent pas après plusieurs divisions cellulaires. Le problème inverse aurait également pu se poser, c'est-à-dire l'acceptation d'un lot non conforme sur la base de résultats intermédiaires satisfaisants.

Pour pallier ces différents problèmes, une solution évidente consisterait à remplacer les cellules souches mésenchymateuses autologues par un traitement allogénique, utilisant des cellules souches mésenchymateuses issues d'un ou de plusieurs donneurs, qui seraient ainsi complètement caractérisées au moment de l'injection et permettraient un traitement immédiat en post-AVC avec la bonne quantité de cellules.

1.1.2. Tolérance et sécurité des cellules souches mésenchymateuses

Entre le 23 août 2010 (première inclusion) et le 25 août 2015 (date de l'analyse), trente-six notifications correspondant à quarante-deux évènements indésirables ont été rapportées, enregistrées dans la base de données Safety-Easy, et analysées. Parmi ces quarante-deux évènements indésirables, trente-quatre correspondaient à des évènements indésirables graves, avec principalement des troubles du système nerveux (41.2%) tels que des épisodes d'épilepsie, des infections (17.7%) et des blessures ou complications principalement en lien avec la pathologie sous-jacente (17.7%). Aucun de ces évènements indésirables graves n'a été considéré comme lié au produit ou au protocole de thérapie cellulaire.

Outre cette analyse globale, la survenue d'évènements indésirables immédiats suite au prélèvement ou à l'injection a été recherchée, et la survenue des évènements suivants a été comparée entre les patients du groupe traité et du groupe contrôle : la survenue d'un second AVC, le développement d'une ou plusieurs crise(s) d'épilepsie, la survenue d'infections, le développement d'une pathologie tumorale et la mortalité.

Tout d'abord, aucun des évènements indésirables immédiats potentiellement attendus dans le cadre du prélèvement de moelle osseuse et de l'injection de cellules souches (hématome au point de ponction ou d'injection, allergie au produit d'anesthésie, toxicité aiguë liée à la perfusion, fièvre) n'a été détecté.

De plus, deux patients du groupe contrôle (6.5% de la population) ont souffert d'un second AVC, et 25.8% de cette même population a présenté au moins une crise d'épilepsie dans les suites de l'AVC. Ces chiffres sont légèrement plus élevés que dans la population générale, où il est communément admis que 5% des AVC conduisent à une récurrence chaque année et que 5 à 20% des victimes d'AVC présentent des crises d'épilepsie à la suite de leur AVC ⁽⁹⁴⁾. Ces chiffres peuvent être liés au fait que seuls des patients ayant présenté des AVC modérés à sévères ont été inclus dans l'étude. Malgré une tendance à l'augmentation de la survenue de crises d'épilepsie chez les patients traités par rapport aux patients contrôles, aucune différence statistiquement significative n'a été mise en évidence entre les deux groupes, que ce soit en termes de survenue d'un second AVC ou de crises d'épilepsie.

Concernant la survenue d'infections, 12.9% de la population, correspondant à quatre patients du groupe traité, a présenté au moins un épisode infectieux. Malgré cette différence, les analyses n'ont pas montré d'augmentation significative des infections dans le groupe traité

comparé au groupe contrôle. De plus, il s'agissait principalement d'infections pulmonaires et urinaires, infections attendues dans ce type de population fragilisée.

Cela souligne l'importance de mettre en place un suivi de paramètres immunologiques (immunomonitoring) chez les patients ayant reçu des cellules souches mésenchymateuses, qu'elles soient d'origine autologue ou allogénique, dans le cadre de futurs essais cliniques.

Enfin, aucun cancer solide ni hémopathie maligne n'a été pour le moment recensé dans la population d'étude et le seul décès notifié correspond à un décès accidentel par noyade, sans aucun lien avec le traitement étudié.

Aucun signal de sécurité n'a donc été mis en évidence au cours de cette étude, ce qui est en faveur d'une bonne tolérance des cellules souches mésenchymateuses injectées par voie intraveineuse en post-AVC. Mais il est important de garder en mémoire que l'effectif de l'étude est restreint : vingt patients dans le groupe traité, dont seize ayant réellement reçu l'injection, et onze patients dans le groupe contrôle.

1.2. Comparaison aux données publiées dans la littérature

Pour rappel, huit essais cliniques avec des résultats publiés ont été conduits avec des cellules souches mésenchymateuses dans le cadre d'un traitement en post-AVC (voir Tableau II, page 29). Cinq d'entre eux rapportent l'utilisation de CSM provenant de la moelle osseuse du patient ^{(81) (82) (83) (84) (85)} et les trois autres font état de l'utilisation de cellules souches issues de cordons ombilicaux ^{(86) (87) (88)}.

Le profil de sécurité obtenu au cours de ces huit essais, regroupant au total cinquante-et-un patients traités avec des cellules souches mésenchymateuses est présenté dans le Tableau XV. Certains essais ont permis de mettre en évidence des effets indésirables immédiats mineurs, telle qu'une fièvre transitoire, des vertiges, ou encore un prurit. Dans tous les cas, aucun effet indésirable grave directement lié au traitement expérimental par cellules souches mésenchymateuses n'a été détecté. Les essais cliniques contrôlés ayant réalisé un suivi poussé de la survenue d'évènements indésirables dans les deux groupes ^{(81) (82)} n'ont de plus pas permis de mettre en évidence de différences dans le profil de tolérance entre les groupes traités et contrôles, notamment en termes de récurrences d'AVC, de survenue d'infections et de cancers. Ces huit essais ont donc conclu que la sécurité d'emploi de cette thérapie cellulaire utilisant des cellules souches mésenchymateuses en post-AVC était satisfaisante.

Les résultats de l'étude ISIS vont donc dans le même sens et tendent à fournir une preuve supplémentaire de l'innocuité des cellules souches mésenchymateuses pour les seize patients ayant bénéficié de l'injection de cellules souches mésenchymateuses. Plus globalement, les résultats confirment également les données de la méta-analyse de Lalu et al. ⁽⁸⁹⁾, qui reprend les données de tolérance de trente-six essais cliniques utilisant des cellules souches mésenchymateuses en intravasculaire dans divers contextes cliniques.

Les essais cliniques étudiés ainsi que la méta-analyse font cependant ressortir un risque de fièvre transitoire en post-injection de CSM, risque non retrouvé dans l'étude ISIS, malgré une surveillance étroite de la température en post-injection.

Référence	Patients	Suivi	Données de tolérance
Bang et al., 2005 ⁽⁸¹⁾	5 traités 25 contrôles	1 an	Effets indésirables immédiats : 0/5 Récidive d'AVC, infections, cancers, décès : 0/5 et 0/25
Lee et al., 2010 ⁽⁸²⁾	16 traités 36 contrôles	5 ans	Effets indésirables immédiats : fièvre (1/16) Récidives d'AVC : 2/16 et 1/36 Epilepsie : 3/16 et 5/36 Infections : 3/16 et 9/36 Cancers : 0/16 et 1/36 Décès : 4/16 et 21/36 Pas de différence entre les groupes
Honmou et al., 2011 ⁽⁸³⁾	12 traités	1 an	Effets indésirables immédiats : prurit (2/12), fièvre et nausées (1/12), perte d'appétit (1/12), douleur au site de ponction (1/12) Infections, cancers, décès : 0/12
Bhasin et al., 2011 ⁽⁸⁴⁾ , 2013 ⁽⁸⁵⁾	6 traités 20 contrôles	24 semaines	Pas d'effets indésirables immédiats ou retardés
Chen et al., 2013 ⁽⁸⁶⁾	2 traités	6 mois - 1 an	Pas d'évènements indésirables observés pendant la procédure d'injection et le suivi
Jiang et al., 2013 ⁽⁸⁷⁾	4 traités	6 mois	Pas de complications fatales (décès, récurrence d'AVC) Pas d'accidents ischémiques transitoires Pas de fièvre ou de rash
Qiao et al., 2014 ⁽⁸⁸⁾	6 traités	2 ans	Effets indésirables immédiats : fièvre (4/6), vertiges (1/6)
Total	51 traités		

Tableau XV : Données de tolérance publiées suite à de précédents essais cliniques

Les cinq essais cliniques rapportant l'utilisation de cellules souches issues de la moelle osseuse du patient ^{(81) (82) (83) (84) (85)} présentent des protocoles très similaires à celui de l'étude ISIS. Les cellules souches sont obtenues lors d'un prélèvement de moelle chez le patient en post-AVC puis sont amplifiées *in vitro* avant d'être réinjectées au même patient. La durée de culture semble également très proche de celle réalisée dans l'étude ISIS, la phase de culture ne dépassant jamais quatre semaines. Elle a par exemple été de 20.3 ± 7.1 jours dans l'étude d'Honmou et al. ⁽⁸³⁾ et de 23 ± 3 jours dans l'étude de Bhasin et al. ⁽⁸⁴⁾. Cependant, malgré des protocoles très similaires, aucun de ces essais n'a fait état de problèmes de faisabilité.

Deux raisons semblent expliquer ces différences. Tout d'abord, les doses de cellules injectées étaient plus faibles lors des précédents essais. En effet, la dose maximale injectée chez un patient a été de 160×10^6 cellules, mais les doses étaient en général plutôt comprises entre 50 et 100×10^6 cellules. Il n'a donc jamais été démontré que la production de 300×10^6 cellules soit possible en utilisant ce procédé de production. De plus, en étudiant les procédures de contrôle qualité appliquées aux lots de cellules souches, il apparaît que les contrôles qualité implémentés dans l'étude ISIS sont beaucoup plus stricts et « importants » que dans les précédentes études. En effet, si des contrôles microbiologiques sont systématiquement réalisés lors de l'expansion des cellules souches, c'est la première fois qu'une analyse caryotypique fait partie des contrôles qualité nécessaires à la libération des lots de cellules. Ce contrôle supplémentaire a d'ailleurs été imposé par l'ANSM au moment de l'approbation du protocole en 2009, suite à des publications suggérant que les cellules souches mésenchymateuses pourraient induire l'apparition de tumeurs chez la souris, via le développement spontané d'anomalies caryotypiques ⁽⁹³⁾. Il est pour l'instant difficile d'extrapoler les conséquences de ces anomalies caryotypiques en cas d'injection chez les patients, c'est pourquoi il a été jugé que le principe de précaution devait être appliqué. Cela explique que des lots aient été rejetés par mesure de précaution dans l'étude ISIS, à cause de la mise en évidence d'anomalies caryotypiques, alors que cela n'avait pas été rapporté dans de précédentes études.

1.3. Avantages et limites de l'étude

Tout d'abord, cette étude a l'avantage d'être contrôlée et randomisée. Bien que les patients et les médecins qui les suivent ne soient pas en aveugle, certaines visites médicales sont réalisées par des praticiens ignorant le groupe des patients, et l'étude a été construite de façon à ce que l'investigateur principal soit en aveugle pour l'interprétation des résultats. Ce n'est pas le cas de la plupart des études réalisées jusqu'alors et il s'agit de critères positifs pour une

étude pilote. La présence d'un groupe contrôle permet en effet de disposer d'un groupe de référence pour l'analyse des résultats, et la réalisation de certaines visites de suivi ainsi que l'interprétation des résultats en aveugle donne une meilleure objectivité à l'étude.

De plus, la faisabilité et la tolérance sont évaluées en tenant compte de critères précis, préétablis sur la base d'une analyse préalable à l'étude.

Le suivi des évènements indésirables est également réalisé de manière très stricte, avec la déclaration de tous les évènements indésirables, graves et non graves, au moyen d'une proximité importante avec le service de vigilance des essais cliniques du CHU de Grenoble, ainsi que la transmission de toutes les données de sécurité au Comité de surveillance indépendant de l'étude. L'analyse au fil de l'eau des évènements indésirables a permis l'évaluation en continu de la balance bénéfice-risque de l'étude et aurait ainsi permis l'interruption ou la mise en place de mesures de sécurité immédiatement en cas d'alerte.

Cette étude présente cependant plusieurs limites. La première concerne le faible effectif de patients, une limite toutefois commune à toutes les études pilotes. En effet, le nombre limité de patients permet difficilement de mettre en évidence un lien statistique entre l'injection de cellules souches mésenchymateuses et la survenue d'un évènement indésirable, même en utilisant des tests statistiques dédiés à l'analyse de faibles effectifs. Bien que les résultats obtenus permettent d'aborder plus sereinement un essai sur un effectif supérieur de patients, la sécurité d'emploi de cette thérapie ne pourra être validée qu'après analyse du profil de tolérance obtenu lors d'un essai incluant beaucoup plus de patients, en tenant compte des mêmes critères : risque infectieux, survenue d'épilepsie, cancers secondaires...

La seconde limite concerne la durée de suivi des patients, qui n'est que de deux ans dans l'étude ISIS. A part dans l'étude de Lee et al. ⁽⁸²⁾, où le suivi était de cinq ans, le suivi mis en place dans les précédentes études était inférieur ou égal à deux ans (Tableau XV). Cela ne permet d'étudier que partiellement le risque de développement tumoral, certains cancers pouvant se manifester bien plus tardivement. Cependant, la plupart des patients inclus dans l'étude ISIS sont suivis par le même neurologue une fois par an, même après la période de suivi imposée par l'étude. Les éventuels cas de carcinogénèse pourront donc être détectés et notifiés à l'unité de vigilance au-delà des deux ans de suivi.

De plus, la population de l'étude n'est pas pleinement représentative de la population générale habituellement sujette aux AVC. D'une part, la population de l'étude était beaucoup plus

jeune. Si dans la population générale, 69% des personnes qui subissent des AVC ont plus de 64 ans, la moyenne d'âge de la population de l'étude ISIS était de 51,6 ans. La population de l'étude était d'autre part beaucoup plus masculine, avec 71,0% d'hommes. Il est plus difficile d'estimer la répartition hommes-femmes dans la population victime d'AVC. Ce paramètre varie en effet énormément en fonction des pays du fait notamment de variations de la répartition hommes-femmes dans la population générale, du taux d'incidence des AVC en fonction du sexe et de différentes particularités socioculturelles ⁽⁹⁷⁾. En France, on retrouve une distribution très équilibrée : il a été estimé qu'en 2008, 49.8% de la population hospitalisée pour AVC étaient des hommes et 50.2% étaient des femmes ⁽⁹⁸⁾.

La population de l'étude comprend donc beaucoup d'hommes relativement jeunes, en comparaison à la population générale victime d'AVC, beaucoup plus âgée et plus équilibrée en termes de répartition hommes-femmes. Là encore, une étude avec plus de patients serait sans aucun doute plus représentative de la population générale.

Enfin, seuls des patients ayant présenté un AVC modéré à sévère ont été inclus dans l'étude (NIHSS > 11 puis NIHSS ≥ 7), ce qui a exclu une partie des patients victimes d'AVC, créant ainsi un biais de sélection.

1.4. Impact des résultats obtenus

Les résultats obtenus en termes de tolérance et de sécurité d'emploi confirment les résultats obtenus jusqu'alors lors de l'utilisation de cellules souches mésenchymateuses dans l'AVC et plus largement comme thérapie cellulaire dans divers contextes cliniques, à savoir qu'aucun signal de sécurité particulier ne permet de mettre en doute la sécurité d'emploi de ces cellules souches. Malgré le faible effectif de l'étude, il s'agit d'un essai solidement construit, et les résultats positifs combinés aux résultats obtenus lors de précédents essais permettent d'envisager sereinement un essai de phase IIb sur un plus grand effectif. Cet essai aura pour but d'évaluer l'efficacité, mais aussi de confirmer la tolérance de cette thérapie cellulaire.

Les résultats de faisabilité sont quant à eux nettement plus contrastés. La présence de non-conformités pour 45% des lots de cellules souches indique que le procédé de production n'est pas optimal et impose donc de revoir ce protocole avant d'envisager un essai de phase IIb. Comme indiqué précédemment, la solution serait d'utiliser un traitement allogénique au lieu d'un traitement autologue. Cela permettrait ainsi de préparer un traitement à l'avance à partir d'un prélèvement issu potentiellement d'un seul donneur et de l'injecter aux différents patients en post-AVC. Non seulement le délai entre l'AVC et le traitement serait réduit, mais le

traitement serait également complètement caractérisé au moment de l'injection. Un tel traitement représenterait également une réduction du temps de travail considérable au sein de l'Unité de Thérapie Cellulaire et donc une réduction des coûts non négligeable. Enfin, un traitement allogénique n'aurait a priori aucun inconvénient par rapport à un traitement autologue, puisque dans le cadre de cellules souches mésenchymateuses, les propriétés immunomodulatrices de ces cellules permettent d'envisager une greffe allogénique sans avoir recours à des immunosuppresseurs ⁽⁷⁸⁾. Des cellules souches mésenchymateuses humaines ont d'ailleurs été à de nombreuses reprises transplantées dans des modèles animaux sans nécessité d'immunosuppresseurs ⁽⁹⁹⁾. Ce type de traitement allogénique représenterait donc la possibilité de traiter les patients avec la bonne quantité de cellules complètement caractérisées et quasiment immédiatement après leur AVC.

L'idéal serait de pouvoir utiliser des cellules allogéniques congelées, qui seraient injectées au patient immédiatement après le processus de décongélation. Cependant, il n'a pour l'instant pas été prouvé que la fonctionnalité de cellules souches mésenchymateuses décongelées soit équivalente à celle de cellules souches mésenchymateuses fraîches ⁽⁹⁵⁾. En attendant d'autres études, il reste préférable de réaliser une étape de culture supplémentaire des cellules souches décongelées avant de les injecter aux patients.

Au vu de ces nombreux avantages, l'équipe investigatrice a décidé de revoir le protocole de thérapie cellulaire et de mettre en place un essai de phase IIb, l'essai RESSTORE, évaluant l'efficacité de l'injection de cellules souches mésenchymateuses en post-AVC en utilisant cette fois-ci un traitement allogénique, provenant de tissus adipeux de cinq patients donneurs.

1.5. Publication des résultats

La publication des résultats concernant la faisabilité et la sécurité d'emploi de cette thérapie cellulaire interviendra en complément de la publication des résultats de l'essai par l'équipe clinique investigatrice du CHU de Grenoble. La publication se fera donc peu après le premier article, qui devrait être publié en milieu d'année 2016. Cela permettra ainsi d'intégrer à l'analyse l'ensemble des données de tolérance correspondant aux deux ans de suivi pour chaque patient.

Concernant la revue, étant donné la place importante allouée aux données de faisabilité et aux problématiques liées au procédé de production des cellules souches, l'objectif serait plutôt de

soumettre cet article dans des revues spécialisées dans la thérapie cellulaire. La publication dans une revue de neurologie paraît en effet moins adaptée dans le cas présent.

Certains résultats de précédents essais cliniques discutés plus haut ont par exemple été publiés dans les revues *Stem Cells* et *Cell Transplantation*. Ce type de revue pourrait être envisageable pour la publication des résultats de ce travail de thèse.

2. « L'Après ISIS » : Mise en place de l'essai clinique RESSTORE

2.1. Conception de l'étude

L'essai clinique s'intitule RESSTORE, pour "Regenerative Stem Cell Therapy for Stroke in Europe". Le promoteur de cet essai est le CHU de Grenoble, et l'investigateur principal est le Dr Olivier Detante, responsable du service de neurologie vasculaire. Le résumé de l'étude issu du protocole est disponible en Annexe 3.

Il s'agit d'un essai thérapeutique de phase IIb, multicentrique, européen, contrôlé (contre placebo), en deux groupes parallèles, en double aveugle et randomisé. Il a été financé par l'appel d'offre européen Horizon 2020.

L'objectif principal est l'évaluation de l'efficacité de la thérapie cellulaire par injection intraveineuse de cellules souches mésenchymateuses allogéniques pour améliorer la récupération post-AVC. Pour cela, le critère de jugement principal sera la différence intergroupe du score NIHSS trois mois après la randomisation.

Les objectifs secondaires sont l'évaluation de l'efficacité de la thérapie sur la récupération post-AVC durant deux ans, l'évaluation de l'efficacité en utilisant des biomarqueurs innovants, la réalisation d'une étude médico-économique de la thérapie cellulaire par cellules souches mésenchymateuses, et l'évaluation de la sécurité et de la tolérance de l'injection intraveineuse de CSM allogéniques en post-AVC.

L'étude a été conçue pour 400 patients, avec un groupe traité composé de 200 patients, qui recevra une dose de 1×10^6 cellules souches / kg et un groupe contrôle composé également de 200 patients qui recevra une injection de placebo contenant uniquement les excipients utilisés dans la préparation du produit de thérapie cellulaire. L'injection aura lieu dans les deux semaines suivant l'AVC. Les 400 patients seront inclus dans vingt-quatre UNV de cinq pays différents (Espagne, Finlande, France, République Tchèque, Royaume-Uni). Cinq unités de thérapie cellulaire seront impliquées dans la production des lots de cellules souches. Le début

des inclusions était initialement prévu pour janvier 2016, mais les demandes d'autorisations de la part des autorités compétentes des pays concernés ne sont pas encore déposées et validées.

2.2. Traitement évalué

2.2.1. Caractéristiques du traitement

Le traitement étudié consiste en des cellules souches mésenchymateuses allogéniques issues de tissus adipeux et amplifiées *in vitro* avant leur injection aux patients par voie intraveineuse.

2.2.2. Statut réglementaire

Dans le cadre de l'essai RESSTORE, contrairement à l'essai ISIS, le statut réglementaire des cellules souches mésenchymateuses allogéniques utilisées est défini par le règlement européen (CE) n°1394/2007 ⁽⁹¹⁾ qui est entré en vigueur le 30 décembre 2008.

Pour rappel, ce règlement définit deux types de produits cellulaires ou tissulaires : les médicaments de thérapie innovante (MTI) et les préparations. Un produit est considéré comme un MTI si le procédé de fabrication induit des modifications substantielles des cellules ou tissus et/ou si les cellules ou tissus ne sont pas destinés à être utilisés pour la (les) même(s) fonction(s) essentielle(s) chez le receveur et chez le donneur. Dans les autres cas, il s'agira d'une préparation.

Dans l'étude RESSTORE, l'expansion des cellules *in vitro* constitue une modification substantielle des cellules. De plus, le produit obtenu est utilisé pour une indication différente chez le receveur. Il est en effet utilisé pour augmenter la plasticité cérébrale chez le receveur alors qu'il a un rôle de soutien de moelle osseuse chez le donneur. Les cellules souches mésenchymateuses utilisées ont donc le statut de **médicament de thérapie innovante**.

La principale différence avec le produit de thérapie cellulaire de l'essai ISIS est que le produit est considéré comme un médicament. Il doit donc être fabriqué conformément à la directive 2003/94/CE ⁽¹⁰⁰⁾ sur les bonnes pratiques de fabrication applicables aux médicaments à usage humain et aux guidelines qui en découlent, dans un établissement autorisé par l'ANSM pour la fabrication de ce type de produit. La plateforme de production de médicaments de thérapie innovante de l'Unité Mixte de Thérapie Cellulaire et Tissulaire de Saint Ismier a ainsi obtenu cette autorisation le 1^{er} septembre 2015.

Une autre conséquence de cette classification en médicament de thérapie innovante concerne l'organisation de la vigilance de l'essai clinique. Dans ce cas, la déclaration d'un SUSAR

devra passer par le portail EudraVigilance de l'Agence Européenne des Médicaments (EMA). De plus, le MTI devra être créé dans la base européenne des médicaments.

2.2.3. Procédé de production

Le tissu adipeux de départ est obtenu par lipoaspiration sur cinq donneurs. Il s'ensuit pour chaque échantillon une digestion enzymatique pour ne conserver que la fraction stromale vasculaire. Les cinq fractions sont alors mises en culture, pour obtenir cinq Master Cell Bank (MCB), après deux passages et récolte des cellules adhérentes correspondant aux cellules souches mésenchymateuses. Les ampoules constituant les MCB sont conservées à -80°C, tandis que chaque unité de thérapie cellulaire reçoit deux ampoules de deux MCB différentes pour fabriquer deux Working Cell Bank (WCB), par mise en culture de la fraction de MCB et réalisation de deux passages. Les WCB sont ensuite stockées à -80°C en plusieurs unités. A chaque inclusion de patient, une unité de WCB est décongelée et remise en culture pendant une semaine, avant d'être formulée dans les différents excipients (albumine humaine, glucose, Ringer Lactate) et envoyée à l'UNV pour être injectée au patient. Des poches similaires ne contenant que les excipients seront envoyées pour les injections de placebo aux patients du groupe contrôle.

Conclusion

THESE SOUTENUE PAR : Morgane DUPARC

TITRE :

**FAISABILITÉ ET SÉCURITÉ DE L'INJECTION DE CELLULES SOUCHES
MÉSENCHYMATEUSES AUTOLOGUES APRÈS UN ACCIDENT VASCULAIRE
CÉRÉBRAL ISCHÉMIQUE DANS LE CADRE D'UNE ÉTUDE CLINIQUE PILOTE**

CONCLUSION :

La thérapie cellulaire, utilisant notamment des cellules souches mésenchymateuses, pourrait être une solution thérapeutique efficace pour améliorer la récupération des patients en post-AVC. Mais avant de prouver son efficacité, cette nouvelle thérapeutique doit faire ses preuves en termes de sécurité d'emploi et de faisabilité technique. Partant de ce principe, l'étude ISIS, une étude clinique pilote de phase IIa contrôlée et randomisée, a été mise en place et autorisée dans le but d'évaluer la faisabilité et la tolérance de l'injection intraveineuse de cellules souches mésenchymateuses autologues issues de la moelle osseuse chez trente patients ayant subi un AVC, avec pour objectif ultime de poser les bases pour une future étude d'efficacité de plus grande envergure. L'objectif de ce travail de thèse a consisté à analyser les données de faisabilité et de tolérance obtenues dans cet essai clinique, à les comparer aux données de la littérature et à rédiger un article scientifique.

Concernant les données de sécurité et de tolérance, l'analyse n'a mis en évidence aucun évènement indésirable imputable directement au protocole ou au produit de thérapie cellulaire. La comparaison entre le groupe traité et le groupe contrôle n'a détecté aucune différence entre les deux groupes concernant la récurrence d'AVC, la survenue de crises d'épilepsie, le développement d'infections ou de tumeurs ou encore la mortalité. Malgré le faible effectif de l'étude, ces données sont donc rassurantes et vont dans le même sens que les données déjà disponibles dans la littérature et issues de précédents essais cliniques.

Les données de faisabilité ont quant à elles mis en évidence des problèmes non négligeables de faisabilité concernant principalement le procédé de production. En effet, pour près de la moitié des lots, des non-conformités ont été détectées entraînant dans certains cas la non-injection du lot de cellules. Trois causes de non-conformité ont ainsi pu être identifiées : la

production de cellules en quantité insuffisante, le développement d'anomalies caryotypiques au cours du processus de culture et la contamination par des souches bactériennes. Après analyse de ces résultats, il apparaît que le procédé de production n'est pas adapté à la production des doses nécessaires de cellules souches mésenchymateuses autologues et que les cellules souches autologues ne peuvent pas être complètement caractérisées avant leur injection, du fait du délai limité à six semaines entre l'AVC et l'injection des cellules.

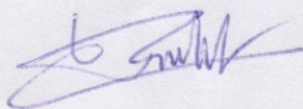
La mise en place d'un essai clinique sur un plus grand effectif de patients semble donc tout à fait envisageable compte tenu des résultats de tolérance, mais impose de trouver au préalable une solution pour améliorer la faisabilité. Le passage à un traitement par cellules souches mésenchymateuses allogéniques préparées en amont de l'inclusion des patients apparaît tout à fait adapté, d'autant plus qu'il n'implique aucun inconvénient par rapport à un traitement autologue. Cette solution a été choisie pour le développement d'un essai clinique à l'échelle européenne, l'essai RESSTORE, qui est actuellement en attente d'autorisation et devrait débiter courant 2016.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Grenoble, le :

28/10/15

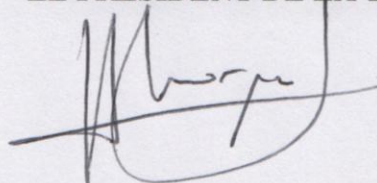
LE DOYEN



Pr. Christophe RIBUOT

Pr. Christophe RIBUOT
Directeur UFR Pharmacie
Université Joseph Fourier

LE PRESIDENT DE LA THESE



Pr. Jean-Luc LENORMAND

Bibliographie

- ⁽¹⁾ L'Assurance Maladie - L'accident vasculaire cérébral (AVC) [Internet]. [Consulté le 22 février 2015]. Disponible en ligne : <http://www.ameli-sante.fr/accident-vasculaire-cerebral-avc/definition-avc.html>
- ⁽²⁾ Ministère des Affaires Sociales, de la Santé et des Droits des femmes – Qu'est-ce qu'un AVC ? [Internet]. [Consulté le 22 février 2015]. Disponible en ligne : <http://www.sante.gouv.fr/qu-est-ce-qu-un-avc.html>
- ⁽³⁾ Feigin VL, Forouzanfar MH, Krishnamurthi R, Mensah GA, Connor M, Bennett DA, et al. Global and regional burden of stroke during 1990-2010: findings from the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* 2014;383(9913):245–54.
- ⁽⁴⁾ World Health Organization - The top 10 causes of death [Internet]. [Consulté le 22 février 2015]. Disponible en ligne : <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>
- ⁽⁵⁾ Ministère des Affaires Sociales, de la Santé et des Droits des femmes – Les chiffres clés de l'AVC [Internet]. [Consulté le 22 février 2015]. Disponible en ligne : <http://www.sante.gouv.fr/les-chiffres-cles-de-l-avc.html>
- ⁽⁶⁾ Chevreur K, Durand-Zaleski I, Gouépo A, Fery-Lemonnier E, Hommel M, Woimant F. Cost of stroke in France. *Eur J Neurol* 2013;20(7):1094–100.
- ⁽⁷⁾ Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, et al. Heart disease and stroke statistics - 2015 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 2015;131(4):e29–322.
- ⁽⁸⁾ Saka O, McGuire A, Wolfe C. Cost of stroke in the United Kingdom. *Age Ageing* 2009;38(1):27–32.
- ⁽⁹⁾ Detante O, Jaillard A, Moisan A, Barbieux M, Favre IM, Garambois K, Hommel M, Remy C. Biotherapies in stroke. *Rev Neurol* 2014;170(12):779–98.
- ⁽¹⁰⁾ Dirnagl U, Simon RP, Hallenbeck JM. Ischemic tolerance and endogenous neuroprotection. *Trends Neurosci* 2003;26(5):248–54.
- ⁽¹¹⁾ Lo EH. A new penumbra: transitioning from injury into repair after stroke. *Nat Med* 2008;14(5):497–500.
- ⁽¹²⁾ Murphy TH, Corbett D. Plasticity during stroke recovery: from synapse to behaviour. *Nat Rev Neurosci* 2009;10(12):861–72.
- ⁽¹³⁾ Carmichael ST. Cellular and molecular mechanisms of neural repair after stroke: making waves. *Ann Neurol* 2006;59(5):735–42.

- (14) Arvidsson A, Collin T, Kirik D, Kokaia Z, Lindvall O. Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat Med* 2002;8(9):963–70.
- (15) Thored P, Arvidsson A, Cacci E, Ahlenius H, Kallur T, Darsalia V, et al. Persistent production of neurons from adult brain stem cells during recovery after stroke. *Stem Cells* 2006;24(3):739–47.
- (16) Parent JM, Vexler ZS, Gong C, Derugin N, Ferriero DM. Rat forebrain neurogenesis and striatal neuron replacement after focal stroke. *Ann Neurol* 2002;52(6):802–13.
- (17) Shen Q, Goderie SK, Jin L, Karanth N, Sun Y, Abramova N, et al. Endothelial cells stimulate self-renewal and expand neurogenesis of neural stem cells. *Science* 2004;304(5675):1338–40.
- (18) Ergul A, Alhusban A, Fagan SC. Angiogenesis: a harmonized target for recovery after stroke. *Stroke* 2012;43(8):2270–4.
- (19) Thored P, Wood J, Arvidsson A, Cammenga J, Kokaia Z, Lindvall O. Long-term neuroblast migration along blood vessels in an area with transient angiogenesis and increased vascularization after stroke. *Stroke* 2007;38(11):3032–9.
- (20) Teng H, Zhang ZG, Wang L, Zhang RL, Zhang L, Morris D, et al. Coupling of angiogenesis and neurogenesis in cultured endothelial cells and neural progenitor cells after stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 2008;28(4):764–71.
- (21) Pannasch U, Vargova L, Reingruber J, Ezan P, Holcman D, Giaume C, et al. Astroglial networks scale synaptic activity and plasticity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108(20):8467–72.
- (22) Zhang R, Chopp M, Zhang ZG. Oligodendrogenesis after cerebral ischemia. *Front Cell Neurosci* 2013;7:201.
- (23) Madinier A, Bertrand N, Mossiat C, Prigent-Tessier A, Beley A, Marie C, et al. Microglial involvement in neuroplastic changes following focal brain ischemia in rats. *PLoS One* 2009;4(12):e8101.
- (24) Haute Autorité de santé (HAS) - Synthèse des recommandations de bonne pratique - Accident vasculaire cérébral : prise en charge précoce - Mai 2009 [Internet]. [Consulté le 29 mars 2015]. Disponible en ligne : http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2009-07/avc_prise_en_charge_precoce_-_synthese_des_recommandations.pdf
- (25) INSERM – AVC - Accident vasculaire cérébral [Internet]. [Consulté le 29 mars 2015]. Disponible en ligne : <http://www.inserm.fr/thematiques/neurosciences-sciences-cognitives-neurologie-psychiatrie/dossiers-d-information/avc-accident-vasculaire-cerebral>

- (26) Vidal [Internet]. [Consulté le 29 mars 2015]. Disponible en ligne : <https://www.vidal.fr/>
- (27) Molina CA. Reperfusion therapies for acute ischemic stroke: current pharmacological and mechanical approaches. *Stroke* 2011;42(1 Suppl.):S16–19.
- (28) Vidal Recos - Infarctus Cérébral - Prise en charge [Internet]. [Consulté le 30 septembre 2015]. Disponible en ligne : http://vidal-app.univadis.fr/recommandations/1714/infarctus_cerebral/prise_en_charge/
- (29) Pekna M, Pekny M, Nilsson M. Modulation of neural plasticity as a basis for stroke rehabilitation. *Stroke* 2012;43(10):2819–28.
- (30) Langhorne P, Bernhardt J, Kwakkel G. Stroke rehabilitation. *Lancet* 2011;377(9778):1693–702.
- (31) Villmann C, Becker CM. On the hypes and falls in neuroprotection: targeting the NMDA receptor. *Neuroscientist* 2007;13(6):594–615.
- (32) Xiong ZG, Zhu XM, Chu XP, Minami M, Hey J, Wei WL, et al. Neuroprotection in ischemia: blocking calcium-permeable acid-sensing ion channels. *Cell* 2004;118(6):687–98.
- (33) Shuaib A, Lees KR, Lyden P, Grotta J, Davalos A, Davis SM, et al. NXY-059 for the treatment of acute ischemic stroke. *N Engl J Med* 2007;357(6):562–71.
- (34) Nakase T, Yoshioka S, Suzuki A. Free radical scavenger, edaravone, reduces the lesion size of lacunar infarction in human brain ischemic stroke. *BMC Neurol* 2011;11:39.
- (35) Yuan J. Neuroprotective strategies targeting apoptotic and necrotic cell death for stroke. *Apoptosis* 2009;14(4):469–77.
- (36) Abe T, Kunz A, Shimamura M, Zhou P, Anrather J, Iadecola C. The neuroprotective effect of prostaglandin E2 EP1 receptor inhibition has a wide therapeutic window, is sustained in time and is not sexually dimorphic. *J Cereb Blood Flow Metab* 2009;29(1):66–72.
- (37) Kawano T, Anrather J, Zhou P, Park L, Wang G, Fry KA, et al. Prostaglandin E2 EP1 receptors: downstream effectors of COX-2 neurotoxicity. *Nat Med* 2006;12(2): 225–9.
- (38) Macrez R, Ali C, Toutirais O, Le Mauff B, Defer G, Dirnagl U, et al. Stroke and the immune system: from pathophysiology to new therapeutic strategies. *Lancet Neurol* 2011;10(5):471–80.
- (39) Yu G, Hess DC, Borlongan CV. Combined cyclosporine-A and methylprednisolone treatment exerts partial and transient neuroprotection against ischemic stroke. *Brain Res* 2004;1018(1):32–7.
- (40) Ginsberg MD, Palesch YY, Hill MD, Martin RH, Moy CS, Barsan WG, et al. High-dose albumin treatment for acute ischaemic stroke (ALIAS) part 2: a randomised, double-blind, phase 3, placebo-controlled trial. *Lancet Neurol* 2013;12(11):1049–58.

- (41) Saver JL, Kidwell C, Eckstein M, Starkman S. Prehospital neuroprotective therapy for acute stroke: results of the Field Administration of Stroke Therapy-Magnesium (FAST-MAG) pilot trial. *Stroke* 2004;35(5):e106–8.
- (42) Miyamoto N, Tanaka R, Shimura H, Watanabe T, Mori H, Onodera M, et al. Phosphodiesterase III inhibition promotes differentiation and survival of oligodendrocyte progenitors and enhances regeneration of ischemic white matter lesions in the adult mammalian brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 2010;30(2):299–310.
- (43) Chen J, Zhang ZG, Li Y, Wang Y, Wang L, Jiang H, et al. Statins induce angiogenesis, neurogenesis, and synaptogenesis after stroke. *Ann Neurol* 2003;53(6):743–51.
- (44) Davalos A, Alvarez-Sabin J, Castillo J, Diez-Tejedor E, Ferro J, Martinez-Vila E, et al. Citicoline in the treatment of acute ischaemic stroke: an international, randomised, multicentre, placebo-controlled study (ICTUS trial). *Lancet* 2012;380(9839):349–57.
- (45) Zhang RL, Chopp M, Roberts C, Wei M, Wang X, Liu X, et al. Sildenafil enhances neurogenesis and oligodendrogenesis in ischemic brain of middle-aged mouse. *PLoS One* 2012;7(10):e48141.
- (46) Chollet F, Tardy J, Albucher JF, Thalamas C, Berard E, Lamy C, et al. Fluoxetine for motor recovery after acute ischaemic stroke (FLAME): a randomised placebo-controlled trial. *Lancet Neurol* 2011;10(2):123–30.
- (47) Kimura K, Aoki J, Sakamoto Y, Kobayashi K, Sakai K, Inoue T, et al. Administration of edaravone, a free radical scavenger, during t-PA infusion can enhance early recanalization in acute stroke patients – a preliminary study. *J Neurol Sci* 2012;313(1–2):132–6.
- (48) Fagan SC, Waller JL, Nichols FT, Edwards DJ, Pettigrew LC, Clark WM, et al. Minocycline to improve neurologic outcome in stroke (MINOS): a dose-finding study. *Stroke* 2010;41(10):2283–7.
- (49) Minnerup J, Heidrich J, Rogalewski A, Schabitz WR, Wellmann J. The efficacy of erythropoietin and its analogues in animal stroke models: a meta-analysis. *Stroke* 2009;40(9):3113–20.
- (50) Reitmeir R, Kilic E, Kilic U, Bacigaluppi M, Elali A, Salani G, et al. Post-acute delivery of erythropoietin induces stroke recovery by promoting perilesional tissue remodelling and contralesional pyramidal tract plasticity. *Brain* 2011;134(Pt 1):84–99.
- (51) Zhang L, Chopp M, Zhang RL, Wang L, Zhang J, Wang Y, et al. Erythropoietin amplifies stroke-induced oligodendrogenesis in the rat. *PLoS One* 2010;5(6):e11016.

- ⁽⁵²⁾ Bath PM, Sprigg N, England T. Colony stimulating factors (including erythropoietin, granulocyte colony stimulating factor and analogues) for stroke. *Cochrane Database Syst Rev* 2013;6(CD005207).
- ⁽⁵³⁾ Wagner DC, Posel C, Schulz I, Schicht G, Boltze J, Lange F, et al. Allometric dose retranslation unveiled substantial immunological side effects of granulocyte colony-stimulating factor after stroke. *Stroke* 2014;45(2):623–6.
- ⁽⁵⁴⁾ Toth ZE, Leker RR, Shahar T, Pastorino S, Szalayova I, Asemenew B, et al. The combination of granulocyte colony-stimulating factor and stem cell factor significantly increases the number of bone marrow-derived endothelial cells in brains of mice following cerebral ischemia. *Blood* 2008;111(12):5544–52.
- ⁽⁵⁵⁾ INSERM – Cellules souches et thérapie cellulaire [Internet]. [Consulté le 21 septembre 2015]. Disponible en ligne : <http://www.inserm.fr/thematiques/immunologie-inflammation-infectiologie-et-microbiologie/dossiers-d-information/cellules-souches-et-therapie-cellulaire>
- ⁽⁵⁶⁾ Teixeira FG, Carvalho MM, Sousa N, Salgado AJ. Mesenchymal stem cells secretome: a new paradigm for central nervous system regeneration? *Cell Mol Life Sci* 2013;70(20):3871–82.
- ⁽⁵⁷⁾ Hsieh JY, Wang HW, Chang SJ, Liao KH, Lee IH, Lin WS, et al. Mesenchymal stem cells from human umbilical cord express preferentially secreted factors related to neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis. *PLoS One* 2013;8(8):e72604.
- ⁽⁵⁸⁾ Song M, Mohamad O, Gu X, Wei L, Yu SP. Restoration of intracortical and thalamocortical circuits after transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells into the ischemic brain of mice. *Cell Transplant* 2013;22(11):2001–15.
- ⁽⁵⁹⁾ Ding X, Li Y, Liu Z, Zhang J, Cui Y, Chen X, et al. The sonic hedgehog pathway mediates brain plasticity and subsequent functional recovery after bone marrow stromal cell treatment of stroke in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 2013;33(7):1015–24.
- ⁽⁶⁰⁾ Moisan A, Pannetier N, Grillon E, Richard MJ, De Fraipont F, Remy C, et al. Intracerebral injection of human mesenchymal stem cells impacts cerebral microvasculature after experimental stroke: MRI study. *NMR Biomed* 2012;25(12):1340–8.
- ⁽⁶¹⁾ Chen J, Zhang ZG, Li Y, Wang L, Xu YX, Gautam SC, et al. Intravenous administration of human bone marrow stromal cells induces angiogenesis in the ischemic boundary zone after stroke in rats. *Circ Res* 2003;92(6): 692–9.
- ⁽⁶²⁾ Li Y, Liu Z, Xin H, Chopp M. The role of astrocytes in mediating exogenous cell-based restorative therapy for stroke. *Glia* 2014;62(1):1–16.

- ⁽⁶³⁾ Li Y, Mcintosh K, Chen J, Zhang C, Gao Q, Borneman J, et al. Allogeneic bone marrow stromal cells promote glial-axonal remodeling without immunologic sensitization after stroke in rats. *ExpNeurol* 2006;198(2):313–25.
- ⁽⁶⁴⁾ Chen J, Li Y, Katakowski M, Chen X, Wang L, Lu D, et al. Intravenous bone marrow stromal cell therapy reduces apoptosis and promotes endogenous cell proliferation after stroke in female rat. *J Neurosci Res* 2003;73(6):778–86.
- ⁽⁶⁵⁾ Sheikh AM, Nagai A, Wakabayashi K, Narantuya D, Kobayashi S, Yamaguchi S, et al. Mesenchymal stem cell transplantation modulates neuroinflammation in focal cerebral ischemia: contribution of fractalkine and IL-5. *Neurobiol Dis* 2010;41(3):717–24.
- ⁽⁶⁶⁾ Ohtaki H, Ylostalo JH, Foraker JE, Robinson AP, Reger RL, Shioda S, et al. Stem/progenitor cells from bone marrow decrease neuronal death in global ischemia by modulation of inflammatory/immune responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105(38):14638–43.
- ⁽⁶⁷⁾ Vendrame M, Gemma C, De Mesquita D, Collier L, Bickford PC, Sanberg CD, et al. Anti-inflammatory effects of human cord blood cells in a rat model of stroke. *Stem Cells Dev* 2005;14(5):595–604.
- ⁽⁶⁸⁾ Ben-Hur T. Immunomodulation by neural stem cells. *J Neurol Sci* 2008;265(1–2):102–4.
- ⁽⁶⁹⁾ Lees JS, Sena ES, Egan KJ, Antonic A, Koblar SA, Howells DW, et al. Stem cell-based therapy for experimental stroke: a systematic review and meta-analysis. *Int J Stroke* 2012;7(7):582–8.
- ⁽⁷⁰⁾ Bliss T, Guzman R, Daadi M, Steinberg GK. Cell transplantation therapy for stroke. *Stroke* 2007;38(2):817–26.
- ⁽⁷¹⁾ PubMed [Internet]. [Consulté le 25 Septembre 2015]. Disponible en ligne : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>
- ⁽⁷²⁾ ClinicalTrials.gov [Internet]. [Consulté le 25 Septembre 2015]. Disponible en ligne : <https://clinicaltrials.gov/>
- ⁽⁷³⁾ Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik NV, Panasyuk AF, Keiliss-Borok IV. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation* 1974;17(4):331–40.
- ⁽⁷⁴⁾ Chen J, Li Y, Wang L, Lu M, Zhang X, Chopp M. Therapeutic benefit of intracerebral transplantation of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. *J Neurol Sci* 2001;189:49–57.
- ⁽⁷⁵⁾ Li Y, Chen J, Chen XG, Wang L, Gautam SC, Xu YX, et al. Human marrow stromal cell therapy for stroke in rat: neurotrophins and functional recovery. *Neurology* 2002;59:514–23.

- (76) Mei SHJ, Haitsma JJ, Dos Santos CC, Deng Y, Lai PFH, et al. Mesenchymal stem cells reduce inflammation while enhancing bacterial clearance and improving survival in sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 2010;182(8):1047–57.
- (77) Boyle AJ, McNiece IK, Hare JM. Mesenchymal stem cell therapy for cardiac repair. *Methods Mol Biol* 2010;660:65–84.
- (78) Le Blanc K, Tammik C, Rosendahl K, Zetterberg E, Ringden O. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp Hematol* 2003;31(10):890–6.
- (79) Wexler SA, Donaldson C, Denning-Kendall P, Rice C, Bradley B, Hows JM. Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal 'stem' cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not. *Br J Haematol* 2003;121(2):368–74.
- (80) Prockop DJ, Brenner M, Fibbe WE, Horwitz E, Le Blanc K, et al. Defining the risks of mesenchymal stromal cell therapy. *Cytotherapy* 2010;12(5):576–8.
- (81) Bang OY, Lee JS, Lee PH, Lee G. Autologous mesenchymal stem cell transplantation in stroke patients. *Ann Neurol* 2005;57(6):874–82.
- (82) Lee JS, Hong JM, Moon GJ, Lee PH, Ahn YH, Bang OY. A long-term follow-up study of intravenous autologous mesenchymal stem cell transplantation in patients with ischemic stroke. *Stem Cells* 2010;28(6):1099–106.
- (83) Honmou O, Houkin K, Matsunaga T, Niitsu Y, Ishiai S, Onodera R, et al. Intravenous administration of auto serum-expanded autologous mesenchymal stem cells in stroke. *Brain* 2011;134(Pt 6):1790–807.
- (84) Bhasin A, Srivastava MV, Kumaran SS, Mohanty S, Bhatia R, Bose S, et al. Autologous mesenchymal stem cells in chronic stroke. *Cerebrovasc Dis Extra* 2011;1(1):93–104.
- (85) Bhasin A, Srivastava MV, Mohanty S, Bhatia R, Kumaran SS, Bose S. Stem cell therapy: a clinical trial of stroke. *Clin Neurol Neurosurg* 2013;115(7):1003–8.
- (86) Chen L, Xi H, Huang H, Zhang F, Liu Y, Chen D, Xiao J. Multiple cell transplantation based on an intraparenchymal approach for patients with chronic phase stroke. *Cell Transplant* 2013;22(Suppl. 1):S83–91.
- (87) Jiang Y, Zhu W, Zhu J, Wu L, Xu G, Liu X. Feasibility of delivering mesenchymal stem cells via catheter to the proximal end of the lesion artery in patients with stroke in the territory of the middle cerebral artery. *Cell Transplant* 2013;22(12):2291–8.
- (88) Qiao LY, Huang FJ, Zhao M, Xie JH, Shi J, Wang J, Lin XZ, Zuo H, Wang YL, Geng TC. A two-year follow-up study of cotransplantation with neural stem/progenitor cells and

mesenchymal stromal cells in ischemic stroke patients. *Cell Transplant* 2014;23(Suppl. 1):S65–72.

⁽⁸⁹⁾ Lalu MM, McIntyre L, Pugliese C, Fergusson D, Winston BW, Marshall JC, et al. Safety of cell therapy with mesenchymal stromal cells (SafeCell): a systematic review and meta-analysis of clinical trials. *PLoS One* 2012;7(10):e47559.

⁽⁹⁰⁾ Ben-David U, Mayshar Y, Benvenisty N. Large-Scale Analysis Reveals Acquisition of Lineage Specific Chromosomal Aberrations in Human Adult Stem Cells. *Cell Stem Cell* 2011;9(2):97–102.

⁽⁹¹⁾ RÈGLEMENT (CE) No 1394/2007 DU PARLEMENT EUROPÉEN ET DU CONSEIL du 13 novembre 2007 concernant les médicaments de thérapie innovante et modifiant la directive 2001/83/CE ainsi que le règlement (CE) no 726/2004.

⁽⁹²⁾ Matthay MA, Goolaerts A, Howard JP, Lee JW. Mesenchymal stem cells for acute lung injury: preclinical evidence. *Crit Care Med* 2010;38(10 Suppl.):S569–73.

⁽⁹³⁾ Rubio D, Garcia-Castro J, Martín MC, de la Fuente R, Cigudosa JC, Lloyd AC, et al. Spontaneous Human Adult Stem Cell Transformation. *Cancer Res* 2005;65(8):3035–9.

⁽⁹⁴⁾ Lamy C. Epilepsy and stroke. *Rev Neurol* 2008;164(10):841–5.

⁽⁹⁵⁾ Moll G, Alm JJ, Davies LC, von Bahr L, Heldring N, Stenbeck-Funke L, Hamad OA, Hinsch R, Ignatowicz L, Locke M, Lönnies H, Lambris JD, Teramura Y, Nilsson-Ekdahl K, Nilsson B, Le Blanc K. Do cryopreserved mesenchymal stromal cells display impaired immunomodulatory and therapeutic properties? *Stem Cells* 2014;32(9):2430–42.

⁽⁹⁶⁾ Jeong H, Yim HW, Cho Y, Kim Y, Jeong SN, Kim H, Oh I. Efficacy and safety of stem cell therapies for patients with stroke: a systematic review and single arm meta-analysis. *Int J Stem Cells* 2014;7(2):63–69.

⁽⁹⁷⁾ Foerch D, Ghandehari K, Xu G, and Kaul S. Exploring gender distribution in patients with acute stroke: A multi-national approach. *J Res Med Sci.* 2013;18(1):10–16.

⁽⁹⁸⁾ De Peretti C, Chin F, Tuppin P, Béjot Y, Giroud M, Schnitzler A, Woimant F. Personnes hospitalisées pour accident vasculaire cérébral en France : tendances 2002-2008. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire.* InVS 6 mars 2012.

⁽⁹⁹⁾ Vu Q, Xie K, Eckert M, Zhao W, Cramer SC. Meta-analysis of preclinical studies of mesenchymal stromal cells for ischemic stroke. *Neurology.* 2014;82(14):1277–86.

⁽¹⁰⁰⁾ DIRECTIVE 2003/94/CE DE LA COMMISSION du 8 octobre 2003 établissant les principes et lignes directrices de bonnes pratiques de fabrication concernant les médicaments à usage humain et les médicaments expérimentaux à usage humain.

Annexes

Annexe 1 : Essais cliniques de thérapie cellulaire dans l'AVC

Référence	Origine	Type d'essai	Source cellulaire	Types de cellules
Essais cliniques terminés - Résultats publiés (N=25)				
Kondziolka et al, 2000	Pittsburgh, USA	Phase I	Allogénique - Lignée cellulaire dérivée de carcinomes embryonnaires humains	Cellules neuronales (LBS-neurons - Layton BioScience)
Kondziolka et al, 2005	Pittsburgh, Stanford, USA	Phase II, contrôlé, randomisé	Allogénique - Lignée cellulaire dérivée de carcinomes embryonnaires humains	Cellules neuronales (LBS-neurons - Layton BioScience)
Savitz et al, 2005	Boston, USA	Etude préliminaire de tolérance et de faisabilité	Xénogénique - Striatum de porc	Cellules porcines foetales (LGE cells - Genvec)
Rabinovitch et al, 2005	Novosibirsk, Russie		Allogénique - Tissus nerveux et hématopoïétiques immatures	Cellules issues de tissus nerveux et hématopoïétiques immatures
Bang et al, 2005	Suwon, Corée du Sud	Contrôlé, randomisé	Autologue - Moelle osseuse	Cellules souches mésenchymateuses
Lee et al, 2010	Suwon, Corée du Sud	Contrôlé, randomisé	Autologue - Moelle osseuse	Cellules souches mésenchymateuses
Mendonça et al, 2006	Rio de Janeiro, Brésil		Autologue - Moelle osseuse	Cellules mononucléées
Suarez-Monteagudo et al, 2009	Habana, Cuba	Etude préliminaire de tolérance et de faisabilité	Autologue - Moelle osseuse	Cellules mononucléées
Battistella et al, 2011 - Barbosa et al, 2010	Rio de Janeiro, Brésil	Phase I	Autologue - Moelle osseuse	Cellules mononucléées
Savitz et al, 2011	Houston, USA	Etude préliminaire de tolérance et de faisabilité	Autologue - Moelle osseuse	Cellules mononucléées
Honmou et al, 2011	Sapporo, Japon	Phase I	Autologue - Moelle osseuse	Cellules souches mésenchymateuses
Bhasin et al, 2011	New Delhi, Inde	Etude préliminaire de tolérance et de faisabilité, contrôlée	Autologue - Moelle osseuse	Cellules souches mésenchymateuses

Bhasin et al, 2012	New Delhi, Inde	Etude préliminaire de tolérance et de faisabilité, contrôlée	Autologue - Moelle osseuse	Cellules mononucléées
Prasad et al, 2012	New Delhi, Inde	Phase I	Autologue - Moelle osseuse	Cellules mononucléées
Moniche et al, 2012	Séville, Espagne	Phase I/II, contrôlée	Autologue - Moelle osseuse	Cellules mononucléées
Friedrich et al, 2012	Porto Alegre, Brésil	Etude préliminaire de tolérance et de faisabilité	Autologue - Moelle osseuse	Cellules mononucléées
Bhasin et al, 2013	New Delhi, Inde	Essai contrôlé	Autologue - Moelle osseuse	Cellules souches mésenchymateuses Cellules mononucléées
Li et al, 2013	Shandong, Chine	Essai contrôlé	Autologue - Moelle osseuse	Cellules mononucléées
Chen et al, 2013	Pékin, Chine	Etude pilote	Allogénique (1) Bulbe olfactif fœtal humain (2) Nerf sciatique fœtal (3) Cerveau fœtal (4) Cordon ombilical	(1) Cellules olfactives engainantes (2) Cellules de Schwann (3) Cellules progénitrices neurales (4) Cellules souches mésenchymateuses
Jiang et al, 2013	Nanjing, Chine	Etude préliminaire de faisabilité	Allogénique - Cordon ombilical	Cellules souches mésenchymateuses
Prasad et al, 2014	New Delhi, Inde	Phase II, contrôlé, randomisé	Autologue - Moelle osseuse	Cellules mononucléées
Sharma et al, 2014	Inde		Autologue - Moelle osseuse	Cellules mononucléées
Chen et al, 2014	Taichung, Taiwan	Phase II, contrôlé, randomisé	Autologue - Leucaphérèse	Cellules souches sanguines périphériques CD34+
Banerjee et al, 2014	Londres, Royaume-Uni	Phase I	Autologue - Moelle osseuse	Cellules souches CD34+
Qiao et al, 2014	Pékin, Chine	Etude pilote	Allogénique (1) Cerveau fœtal (2) Cordon ombilical	(1) Cellules souches et cellules progénitrices neurales (2) Cellules souches mésenchymateuses

Taguchi et al, 2015	Japon	Phase I/IIa	Autologue - Moelle osseuse	Cellules mononucléées
Essais cliniques terminés - Pas de résultats publiés (N=2)				
NCT00473057 (Andre et al)	Rio de Janeiro, Brésil	Phase I	Autologue - Moelle osseuse	Cellules mononucléées
NCT01310114 (Assad A)	Chattanooga, USA	Phase IIa, contrôlé, randomisé	Allogénique - Tissu placentaire humain	Cellules dérivées du placenta (PDA001 - Celgene)
Essais cliniques actifs - Recrutement terminé (N=5)				
NCT00875654 (ISIS) (Detante et al)	Grenoble, France	Phase IIa, contrôlé, randomisé	Autologue - Moelle osseuse	Cellules souches mésenchymateuses
NCT02283879 (Chen PJ)	Guangzhou, Chine	Phase I	Allogénique - Cordon ombilical	Cellules souches mésenchymateuses
NCT01151124	Glasgow, Royaume-Uni	Phase I	Allogénique - Cellules dérivées de cellules souches somatiques humaines	Cellules souches neurales (CTX0E03 - ReNeuron)
NCT01273337 (Hinson JM)	USA	Phase II, contrôlé, randomisé	Autologue - Moelle osseuse	Cellules de la moelle osseuse sélectionnées par une technologie propriétaire (ALD-401 - Aldagen)
NCT01436487 (Mays RW)	USA, Royaume- Uni	Phase II, contrôlé, randomisé	Allogénique - Moelle osseuse adulte	Cellules souches, composition non précisé (MultiStem - Athersys)
Essais cliniques actifs - En cours de recrutement (N=12)				
NCT02245698 (Sharma AK)	Inde	Phase I	Autologue - Moelle osseuse	Cellules mononucléées
NCT02117635 (Muir KW)	Royaume-Uni	Phase II	Allogénique - Cellules dérivées de cellules souches somatiques humaines	Cellules souches neurales (CTX0E03 - ReNeuron)
NCT01678534 (Diez-Tejedor E)	Madrid, Espagne	Phase II, contrôlé, randomisé	Allogénique - Tissu adipeux	Cellules souches mésenchymateuses
NCT01468064 (Chen ZZ)	Guangzhou, Chine	Phase I/II, contrôlé, randomisé	Autologue - Moelle osseuse	Cellules souches mésenchymateuses Cellules progénitrices endothéliales
NCT01714167 (Jin K)	Wenzhou, Chine	Phase I, contrôlé	Autologue - Moelle osseuse	Cellules souches mésenchymateuses
NCT01716481 (Bang OY)	Séoul, Corée du	Phase III, contrôlé,	Autologue - Moelle osseuse	Cellules souches mésenchymateuses

	Sud	randomisé		
NCT01832428 (Bagul AE)	Pune, Inde	Phase I/II	Autologue - Moelle osseuse	Cellules mononucléées
NCT01461720 (Ibrahim NM)	Kuala Lumpur, Malaisie	Phase II, contrôlé	Autologue - Moelle osseuse	Cellules souches mésenchymateuses
NCT01297413 (Verkh L)	USA	Phase I/II	Allogénique - Moelle osseuse	Cellules souches mésenchymateuses
NCT02378974	Seongnam, Corée du Sud	Phase I/IIa, contrôlé, randomisé	Allogénique - Cordon ombilical	Cellules souches mésenchymateuses (Cordstem-ST)
NCT02433509 (Lin SZ)	Beigang, Taiwan	Phase I	Allogénique - Sang de cordon ombilical	Monocytes
NCT02397018 (Kurtzberg J)	Durham, USA	Phase I	Allogénique - Sang de cordon ombilical	Sang de cordon ombilical
Essais cliniques enregistrés - Recrutement non débuté (N=3)				
NCT01849887 (Cramer S)	Orange, USA	Phase I/II, contrôlé, randomisé	Allogénique - Moelle osseuse	Cellules souches mésenchymateuses
NCT02448641 (Steinberg G)	USA	Phase IIb, contrôlé, randomisé	Allogénique	Cellules souches modifiées (SB623 - SanBio)
NCT01922908 (Savitz S)	Houston, USA	Phase I/II, contrôlé, randomisé	Allogénique - Moelle osseuse	Cellules souches mésenchymateuses
Essais cliniques enregistrés - Evolution inconnue (N=6)				
NCT01518231 (Li Y, Zhou Y)	Zhejiang, Chine	Phase I, contrôlé, randomisé	Autologue	Cellules souches sanguines périphériques CD34+
NCT01327768 (Shyu WC)	Taichung, Taiwan	Phase I	Autologue - Muqueuse olfactive	Cellules olfactives engainantes
NCT01091701 (Abdullah AS et al)	Malaisie	Phase I/II, contrôlé, randomisé	Allogénique - Tissu adulte	Cellules souches mésenchymateuses
NCT01453829 (Morales VD, Zuniga C)	Tijuana, Mexique	Phase I/II	Autologue - Tissu adipeux	Cellules souches dérivées du tissu adipeux
NCT01438593 (Lin SZ)	Taichung, Taiwan	Phase I	Allogénique - Sang de cordon ombilical	Cellules souches CD34+
NCT01287936 (Steinberg et al)	USA	Phase I/IIa	Allogénique	Cellules souches modifiées (SB623 - SanBio)

Annexe 2 : Résumé du protocole de l'essai ISIS

<p style="text-align: center;">Titre :</p> <p style="text-align: center;">Thérapie cellulaire par injection intraveineuse de cellules souches mésenchymateuses autologues après accident vasculaire cérébral</p> <p style="text-align: center;">Titre court :</p> <p style="text-align: center;"><i>Etude ISIS (Injection de cellules Souches après Infarctus cérébral)</i></p>
<p>Méthodologie : <i>Essai thérapeutique en groupes parallèles, contrôlé, randomisé, ouvert</i></p>
<p>Etude thérapeutique de Phase IIa</p>
<p>Produit à l'étude : <i>Cellules souches mésenchymateuses autologues</i></p>
<p>Investigateur coordonnateur autorisé à signer le protocole : Dr Olivier DETANTE : <i>Unité Neuro-Vasculaire, Neurologie, CHU de Grenoble</i></p>
<p>Investigateurs : Dr Assia JAILLARD : <i>Neuroradiologie / IRM, CHU de Grenoble</i> Pr Marc HOMMEL : <i>Unité Neuro-Vasculaire, Neurologie, CHU de Grenoble</i> Dr Katia GARAMBOIS : <i>Unité Neuro-Vasculaire, Neurologie, CHU de Grenoble</i> Dr Isabelle FAVRE : <i>Unité Neuro-Vasculaire, Neurologie, CHU de Grenoble</i> Dr Marianne BARBIEUX : <i>Unité Neuro-Vasculaire, Neurologie, CHU de Grenoble</i> Pr Jean-François LE BAS : <i>Neuroradiologie / IRM, CHU de Grenoble</i> Dr Sylvie GRAND : <i>Neuroradiologie / IRM, CHU de Grenoble</i></p>
<p>Promoteur : <i>C.H.U. de Grenoble</i> Représentant du promoteur autorisé à signer le protocole : Mme Hélène SABBAH-GUILLAUME <i>Direction de la Recherche Clinique, CHU de Grenoble, 38043 Grenoble Cedex 09</i> <i>Tel : 04 76 76 84 56 Fax : 04 76 76 52 21</i></p>
<p>Centre coordonnateur de l'étude : <i>Centre d'Investigation Clinique – Inserm 003</i> <i>CHU de Grenoble, 38043 Grenoble Cedex 09</i> <i>Tel : 04 76 76 92 60 Fax : 04 76 76 92 62</i></p>

PROTOCOLE – RESUME

Etude thérapeutique de Phase 2

Centre d'étude : C.H.U. de Grenoble

Investigateur coordonnateur :

Dr Olivier DETANTE : Unité Neuro-Vasculaire, Neurologie, CHU de Grenoble

Investigateurs :

Dr Assia JAILLARD : Neuroradiologie / IRM, CHU de Grenoble
Pr Marc HOMMEL : Unité Neuro-Vasculaire, Neurologie, CHU de Grenoble
Dr Katia GARAMBOIS : Unité Neuro-Vasculaire, Neurologie, CHU de Grenoble
Dr Isabelle FAVRE : Unité Neuro-Vasculaire, Neurologie, CHU de Grenoble
Dr Marianne BARBIEUX : Unité Neuro-Vasculaire, Neurologie, CHU de Grenoble
Pr Jean-François LE BAS : Neuroradiologie / IRM, CHU de Grenoble
Dr Sylvie GRAND : Neuroradiologie / IRM, CHU de Grenoble

Intervenants :

Marie-Jeanne RICHARD : Unité Mixte de Thérapie Cellulaire (UMTC), CHU de Grenoble
Anaïck MOISAN : Unité Mixte de Thérapie Cellulaire (UMTC), CHU de Grenoble
Florence DE FRAIPONT : UMTC, CHU de Grenoble
Pr Marie-Christine FAVROT : UMTCT, CHU de Grenoble
Dr Julien GERE : Unité Neuro-Vasculaire, Neurologie, CH de Chambéry
Dr Sébastien MARCEL : Unité Neuro-Vasculaire, Neurologie, CH de Chambéry
Dr Wilfried VADOT : Unité Neuro-Vasculaire, Neurologie, CH d'Annecy
Dr Karine BLANC-LASSERRE : Unité Neuro-Vasculaire, Neurologie, CH de Valence
Dr Pierre GARNIER : Unité Neuro-Vasculaire, Neurologie, CHU de Saint Etienne
Dr Gilles RODIER : Unité Neuro-Vasculaire, Neurologie, CH d'Annecy
Pr Jean-Yves CAHN : Oncologie-Hématologie, CHU de Grenoble
Dr Claude-Eric BULABOIS : Oncologie-Hématologie, CHU de Grenoble
Pr Dominic PERENNOU : Médecine Physique et Rééducation Neurologique, CHU de Grenoble
Dr Anne CHRISPIN : Médecine Physique et Rééducation Neurologique, CHU de Grenoble
Dr Patrice DAVOINE : Médecine Physique et Rééducation Neurologique, CHU de Grenoble
Adeline PARIS : Centre d'Investigation Clinique, CHU de Grenoble
Nicolas GONNET : Centre d'Investigation Clinique, CHU de Grenoble
Bernadette NAEGELE : Unité Neuro-Vasculaire, Neurologie, CHU de Grenoble
Sandra TRABUCCO-MIGUEL : Unité Neuro-Vasculaire, Neurologie, CHU de Grenoble
Patrick ANTOINE : Unité Neuro-Vasculaire, Neurologie, CHU de Grenoble
Pr Alexandre KRAINIK : Neuroradiologie / IRM, CHU de Grenoble
Chantal REMY : U836 INSERM-UJF-CEA, Grenoble
Emmanuel BARBIER : U836 INSERM-UJF-CEA, Grenoble
Christoph SEGEBARTH : U836 INSERM-UJF-CEA, Grenoble
Laurent LAMALLE : IR 1. Unité d'IRM - IFR-1 – CHU Grenoble
Irène TROPRES : IR 1. Unité d'IRM - IFR-1 – CHU Grenoble
Dr Thomas ZEFFIRO : Martinos Center, Massachussets General Hospital ; HARVARD University ; BOSTON
Pr Leeanne CAREY : Division of Neurorehabilitation and Recovery National Stroke Research Institute. MELBOURNE. Australie
Chantal DELON-MARTIN : INSERM U836 (Equipe 5) GIN. CHU Grenoble
Sophie ACHARD : GIPSA-lab, CNRS UMR(5216). Grenoble

Promoteur : C.H.U. de Grenoble

Méthodologie :

Essai thérapeutique en groupes parallèles, contrôlé, randomisé, ouvert (aveugle sur le critère de jugement)

Objectif principal :

Faisabilité et tolérance de l'injection intraveineuse de cellules souches mésenchymateuses humaines (CSMh) autologues chez des patients ayant présenté un accident vasculaire cérébral (AVC) ischémique carotidien.

Critère de jugement principal :

La faisabilité de la procédure de thérapie cellulaire sera évaluée par :

- l'inclusion et le suivi de 31 patients (20 greffés vs 11 contrôles) au sein de l'Unité Neuro-Vasculaire

<p>(UNV) (CHU de Grenoble)</p> <ul style="list-style-type: none"> - la réalisation du prélèvement de moelle osseuse en crête iliaque pour chaque patient traité - la production de CSMh conformes aux spécifications et en quantité suffisante au sein de l'Unité Mixte de Thérapie Cellulaire et Tissulaire (CHU de Grenoble) - la réalisation de l'injection intraveineuse des CSMh autologues dans l'UNV <p>La tolérance de la procédure de thérapie cellulaire sera évaluée par :</p> <ul style="list-style-type: none"> - le nombre de complications liées au prélèvement de moelle (hématome au point de ponction, allergie à l'anesthésie locale...) - les données de l'examen clinique général au cours du suivi de chaque patient - l'aggravation du déficit neurologique lié à l'AVC initial - la survenue d'un nouvel AVC - le nombre de complications neurologiques non-vasculaires évaluées par le suivi clinique et par IRM (inflammation, tumeur, épilepsie) - le nombre de complications non neurologiques notamment les pathologies tumorales ou inflammatoires secondaires - la mortalité.
<p>Objectifs secondaires :</p> <ul style="list-style-type: none"> - évaluer l'efficacité de la thérapie cellulaire : amélioration du déficit et du handicap secondaire à l'AVC - définir la dose de CSMh efficace - définir les meilleurs critères intermédiaires de jugement d'efficacité pour un futur essai clinique clinique et radiologique (IRM multimodale étude ancillaire HERMES PHRC 2010- Dr Assia Jaillard) - définir la meilleure population cible notamment l'âge des patients à inclure dans un futur essai puisque les capacités de prolifération des CSMh diminuent probablement avec l'âge du donneur et que les capacités de récupération liée à la plasticité cérébrale sont très différentes selon l'âge du patient. <p>Critères de jugement secondaires :</p> <p>L'efficacité de la thérapie cellulaire sera estimée par :</p> <ul style="list-style-type: none"> - les scores neurologiques évaluant la sévérité du déficit (NIHSS, National Institute of Health Stroke Scale, aphasie rapide test), le handicap (score de Rankin modifié, aphasie handicap score), et l'autonomie (index de Barthel) - l'échelle d'anxiété et de dépression HAD - le score de Fugl-Meyer coté par un kinésithérapeute expérimenté - une évaluation neuropsychologique - le volume lésionnel mesuré par IRM (HERMES) - IRM fonctionnelle, de vasoréactivité et de connectivité pour évaluer la récupération motrice et cognitive (HERMES).
<p>Critères d'inclusion principaux :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Patients âgés de 18 à 70 ans - Infarctus dans le territoire carotidien dans les 14 jours précédents - Déficit neurologique persistant (NIHSS \geq 7) - Traitement médical optimal (anti-thrombotiques, anti-hypertenseurs, statines) - Etat général compatible avec le suivi d'un programme de rééducation fonctionnelle.
<p>Produit testé : Cellules souches mésenchymateuses autologues</p>
<p>Nombre total de sujets : 71 31 patients AVC + 40 volontaires sains</p>
<p>Durée totale de l'étude : 6 ans</p>
<p>Durée de l'étude par sujet : 2 ans</p>
<p>Critères de sécurité :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Production des CSMh conformes aux spécifications attendues - Recueil clinique des événements indésirables

Annexe 3 : Résumé du protocole de l'essai RESSTORE

Titre	<i>Regenerative Stem Cell Therapy for Stroke in Europe</i> <i>(Thérapie cellulaire régénérative après accident vasculaire cérébral)</i>
Titre court	RESSTORE
Coordination	Dr Olivier DETANTE Grenoble Alpes Université (Joseph Fourier, UJF), France
Promoteur	CHU de Grenoble
	Ms. Hélène SABBAH-GUILLAUME Direction de la Recherche Clinique CHU Grenoble, 38043 Grenoble, France Tel : +33 (0)4 76 76 56 09 Fax : +33 (0)4 76 76 52 21
Investigateurs	<p>Unités Neuro-Vasculaires, Neurologie (24 centres d'inclusion, 5 pays européens)</p> <ul style="list-style-type: none"> - République Tchèque : Brno (R. Mikulik, Giancarlo Forte giancarlo.forte@fnusa.cz) - Finlande : Kuopio (Pr Pekka Jäkälä, pekka.jakala@kuh.fi), Tampere - France : Besançon (Pr T. Moulin), Bordeaux (Pr I. Sibon), Caen (Pr E. Touzé), Grenoble (Dr O. Detante, Pr M. Hommel, Dr A. Jaillard, Dr I. Favre-Wiki), Paris-Bichat (Pr P. Amarenco), Paris-Lariboisière (Pr M. Mazighi), Paris-Salpêtrière (Pr Y. Samson, Dr C. Rosso), Paris-Ste Anne (Pr JL. Mas, Dr D. Calvet), Toulouse (Pr F. Chollet, Dr M. Barbieux-Guillot). - Espagne : La Paz University Hospital, Madrid (Pr E. Diez-Tejedor, Dr B. Fuentes) ; Virgen del Rocío University Hospital, Sevilla (Dr F. Moniche), Ramón y Cajal University Hospital, Madrid (Dr. J Masjuan) ; Gregorio Marañón University Hospital, Madrid (Dr. A Gil-Nuñez) ; Santa Creu i Sant Pau Hospital, Barcelona (Dr. J Martí); University Hospital of Santiago de Compostela, Santiago de Compostela (Pr J. Castillo, Dr M. Blanco), Malaga Regional University Hospital (Dr JA. Tamayo, Pr O. Fernandez), Girona (Dr J. Serena), Valladolid Hospital (Dr Arenillas), Albacete Hospital (Dr T. Segura). - United Kingdom : Glasgow (Pr K. Muir). <p>Unités de Thérapie Cellulaire :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Finlande: Regea Cell and Tissue Center BioMediTech, University of Tampere (Susanna Miettinen, susanna.miettinen@uta.fi, Bettina Mannerstrom, Bettina.mannerstrom@uta.fi) - France: plateforme E-Cell France (Montpellier 1 University, Pr C. Jorgensen / EFS, Pr L. Sensébé) (2 units: Grenoble-St Ismier, Toulouse) Anaick.Moisan@efs.sante.fr, Sandrine.fleury@efs.sante.fr A. Legendre (Anne.Legendre@efs.sante.fr), Pr L. Sensébé (luc.sensebe@efs.sante.fr) Pr C. Jorgensen (E-Cell, christian.jorgensen@inserm.fr) - Espagne : - Andalusian Initiative for Advanced Therapies (IATA) (Exe. Dir.: Dr N. Cuende Melero, natividad.cuende.sspa@juntadeandalucia.es)/ Cell therapy unit of Malaga Regional Hospital, Institute of Biomedicine of Málaga-IBIMA (Dr. Laura Leyva, leyvafer@gmail.com) - HISTOCELL (Bizkaia, Spain): Eva Gonzalez, egonzalez@histocell.com <p>Laboratoires expérimentaux :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Finlande : Kuopio (Pr J. Jolkkonen) - France : Grenoble Institute of Neurosciences (E. Barbier, emmanuel.barbier@ujf-grenoble.fr), Paris-Lariboisière (N. Kubis, nathalie.kubis@lrb.aphp.fr; T. Merkoulouva, tatiana.merkoulouva@inserm.fr) - Espagne : Neuroscience and Cerebrovascular Research Laboratory, Madrid, La Paz (M. Gutierrez-Fernandez, mgutierrezfernandez@salud.madrid.org); Barcelona Val d'Hebron (Pr J. Montaner)
Investigateurs principaux	Pr Exuperio DIEZ TEJEDOR (Madrid, Spain) Dr Olivier DETANTE (Grenoble, France)
Methodologie	2 groupes parallèles (n = 400) Multicentrique, randomisée, contrôlée (versus placebo), double aveugle
Objectif principal	Evaluation de l'efficacité de la thérapie cellulaire par injection intraveineuse

	de cellules souches mésenchymateuses (CSM) allogéniques pour améliorer la récupération post-AVC (accident vasculaire cérébral)
Critère de jugement	Différence inter-groupe du score NIHSS (National Institute of Health Stroke Scale), 3 mois après l'accident vasculaire cérébral
Objectifs secondaires	<ul style="list-style-type: none"> • Evaluer l'effet des CSM sur la récupération post-AVC durant 2 ans. • Evaluer les effets de la thérapie cellulaire et la sécurité en utilisant des biomarqueurs innovants: IRM multimodale, biomarqueurs sériques • Etude médico-économique de la thérapie cellulaire par CSM après AVC • Evaluation de la sécurité et de la tolérance de l'injection IV de CSM allogéniques après AVC
Critères de jugement secondaires	<ul style="list-style-type: none"> - Suivi clinique durant 2 ans : NIHSS, modified Rankin scale, Aphasia Rapid Test, Aphasia Handicap Score, MoCA (Montreal Cognitive Assessment), HAD (Hospital Anxiety and Depression scale), WSAS (Work and Social Adjustment Scale), Barthel index, EuroQol EQ5 - Score de Fugl-Meyer et Postural Assessment for Stroke Scale (PASS) évalué par un kinésithérapeute: < 2 semaines (baseline), à 3 mois et 1 an. - Option : évaluation orthophonique (BDAE) < 2 semaines (baseline), à 3 mois et 1 an. - Option : évaluation neuropsychologique à 3 mois et 1 an. - Données IRM et biomarqueurs sériques avant et après thérapie cellulaire. <p>La durée du protocole d'IRM est de 1h, incluant les séquences suivantes :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Séquences morphologiques: T₁ et FLAIR haute-résolution (volume de lésion, délimitation), T₂* (transformation hémorragique), et FGATIR pour la segmentation anatomique. - Diffusion pour évaluer le coefficient apparent de diffusion (ADC) et l'imagerie du tenseur de diffusion (DTI) - IRMf de repos ("Resting state") pour la mesure de la connectivité fonctionnelle cérébrale - Arterial Spin Labeling (ASL) pour évaluer la perfusion cérébrale - Angio-MR pour visualiser l'occlusion (et/ou recanalisation) artérielle. - <i>Option: IRM fonctionnelle avec tâche motrice</i> - <i>Optional: vasoréactivité au CO₂ inhalé</i> <ul style="list-style-type: none"> - Modèle medico-économique - Rapport des événements indésirables
Critères d'inclusion	<ul style="list-style-type: none"> - ≥ 18 ans - Infarctus cérébral hémisphérique (> 1,5 cm sur 2 coupes d'imagerie), admis en Unité Neuro-Vasculaire dans les 24 premières heures après l'accident vasculaire cérébral - Inclusion de 1 à 4 jours après l'AVC - NIHSS ≥ 7 - Pas de craniectomie décompressive - Patient capable de suivre un programme de rééducation - Modified Rankin scale = 0 avant l'AVC
Traitement	Cellules souches mésenchymateuses allogéniques issues de tissu adipeux
Traitement de référence	Placebo (milieu de suspension cellulaire)
Nombre de sujets	400 patients + 45 volontaires sains (pour calibrage IRM)
Durée de traitement	Injection intraveineuse unique de CSM ou placebo
Durée totale de l'étude	5 ans
Durée par patient	2 ans
Evaluation de la sécurité	<ul style="list-style-type: none"> - Contrôles qualité des CSM - Rapport de la mortalité et des événements indésirables (à la pharmacovigilance et au comité de surveillance indépendant)

*Faculté de Pharmacie,
Université Joseph Fourier Grenoble I.*



Serment de Galien



« Je jure en présence des Maîtres de la Faculté, des Conseillers de l'Ordre des Pharmaciens et de mes condisciples :



D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.



D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.



De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.



Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque ».



Morgane DUPARC

**FAISABILITÉ ET SÉCURITÉ DE L'INJECTION DE CELLULES SOUCHES
MÉSENCHYMATEUSES AUTOLOGUES APRÈS UN ACCIDENT VASCULAIRE
CÉRÉBRAL ISCHÉMIQUE DANS LE CADRE D'UNE ÉTUDE CLINIQUE PILOTE**

RÉSUMÉ :

L'accident vasculaire cérébral représente non seulement la deuxième cause de mortalité à travers le monde, mais également la première cause de handicap et d'incapacité sévère de l'adulte, avec plus de la moitié des patients survivants présentant une invalidité résiduelle, malgré les programmes de rééducation actuels. Parmi les stratégies thérapeutiques en développement, la thérapie cellulaire pourrait avoir un effet bénéfique sur la récupération des patients en post-AVC en venant en aide aux mécanismes physiologiques de neuroprotection et de plasticité post-AVC. Les cellules souches mésenchymateuses, de part leurs nombreux avantages, sont particulièrement étudiées comme thérapie cellulaire dans l'AVC mais aussi dans d'autres contextes cliniques. C'est le cas notamment dans l'essai clinique ISIS, un essai pilote de phase IIa, contrôlé et randomisé, qui vise à évaluer la faisabilité et la tolérance de l'injection intraveineuse de cellules souches mésenchymateuses autologues en post-AVC. Ce document reprend et analyse les données de faisabilité et de sécurité obtenues au cours de cette étude. Les résultats obtenus sont très encourageants en termes de tolérance, puisqu'aucun signal de sécurité n'a été détecté, mais ils indiquent également des problèmes non négligeables de faisabilité liés au procédé de production des cellules souches. L'analyse approfondie des données a permis de mettre en cause le caractère autologue du traitement comme principale raison aux problèmes de faisabilité identifiés, permettant ainsi d'envisager le passage à un protocole de thérapie cellulaire utilisant des cellules souches allogéniques lors d'un futur essai thérapeutique de dimension européenne.

MOTS CLEFS :

Accident vasculaire cérébral, cellules souches, cellules souches mésenchymateuses, faisabilité, sécurité, thérapie cellulaire, tolérance

ADRESSE : *[Données à caractère personnel]*

FILIERE : Industrie