

Article original

Greffe de fibroblastes cutanés au sein de la membrane synoviale chez le primate non-humain : étude à court-terme

Engraftment of cutaneous fibroblasts within synovial membrane in a nonhuman primate: short-term results [◇]

Natacha Bessis^{a,b,c,*}, Delphine Lemeiter^{a,b,c}, Liliane Laroche^{b,c}, Catherine Fournier^d,
Tom Huizinga^e, Herbert Brok^f, Bert 't Hart^f, Marie-Christophe Boissier^{b,c}

^a Inserm, ERI-18, 93017 Bobigny, France

^b Université Paris-XIII, 93017 Bobigny, France

^c Avicenne Hospital Rheumatology Department, APHP, Bobigny, France

^d Inserm U-567, Paris France

^e Leiden School of Medicine, Pays-Bas

^f Immunology Department, BPRC, Rijswijk, Pays-Bas

Reçu le 8 juin 2005 ; accepté le 17 septembre 2006

Disponible sur internet le 14 novembre 2006

Résumé

Objectifs. – La thérapie génique par vecteurs cellulaires autorisant la sécrétion de protéines thérapeutiques est prometteuse dans le traitement des maladies chroniques. Nous avons déjà montré, dans l'arthrite au collagène (AEC) chez la souris, modèle de polyarthrite rhumatoïde (PR), qu'il était possible de traiter la maladie par thérapie cellulaire avec des cellules xénogéniques sécrétant des cytokines anti-inflammatoires (IL-4, IL-13 ou récepteur leurre de l'IL-1). De même, des cellules syngéniques transfectées par des gènes de cytokines anti-inflammatoires étaient aussi efficaces dans ce modèle. Dans l'ensemble des expériences, les cellules étaient greffées dans le tissu sous-cutané du dos, soit un traitement par voie systémique et non locale. Dans le but d'évaluer la possibilité d'une thérapie cellulaire intra-articulaire, nous avons réalisé des injections de cellules autologues au sein de l'articulation chez des singes rhésus développant une AEC, modèle ressemblant à la PR humaine.

Méthodes. – Nous avons réalisé des cultures ex vivo de fibroblastes de peau de singes rhésus, et les avons transfecté par un plasmide codant le gène lacZ. Ces cellules ont ensuite été injectées dans les métacarpophalangiennes, les métatarsophalangiennes, et les interphalangiennes.

Résultats. – L'évaluation de la cinétique d'expression de lacZ (marquage avec X-gal des fibroblastes cutanés présents dans la membrane synoviale) révélait une présence de la protéine transgénique jusqu'à six jours après l'injection intra-articulaire. Des fibroblastes xénogéniques (d'ovaires de Hamster chinois) injectés dans l'articulation étaient aussi détectés dans les synoviales, mais le marquage était moins intense qu'avec les cellules autologues.

Conclusion. – Notre travail met en évidence la faisabilité d'une greffe autologue hétérotopique de fibroblastes cutanés dans la synoviale dans le traitement local de l'AEC chez le singe.

© 2007 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Mots clés : Thérapie génique ; Membrane synoviale ; Primate non-humain ; Arthrite au collagène ; Polyarthrite rhumatoïde

Keywords: Gene therapy; Synovial membrane; Nonhuman primates; Collagen-induced arthritis; Rheumatoid arthritis

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : n.bessis@smbh.univ-paris13.fr (N. Bessis).

◇ Pour citer cet article, utiliser ce titre en anglais et sa référence dans le même volume de *Joint Bone Spine*.

1. Introduction

La polyarthrite rhumatoïde (PR) est une maladie inflammatoire chronique sévère ayant une prévalence de 0,5 % dans la population adulte. Elle progresse par poussées impliquant souvent plusieurs articulations, et résulte en une destruction articulaire. Aucune articulation n'est épargnée, les mains étant les plus atteintes, plus particulièrement les métacarpophalangiennes (MCP) et les interphalangiennes proximales (IPP). Les méthodes thérapeutiques reposant sur le réseau des cytokines ont récemment prouvé leur efficacité dans le traitement de la PR, malgré certains effets secondaires ou des résistances [1,2]. L'arthrite expérimentale au collagène (AEC) est un modèle fiable pour l'étude de la PR. Elle a été développée chez la souris [3] et chez le rat [4]. Le collagène de type II (CII) xénogénique ou homologue, utilisé pour immuniser les animaux, induit une polyarthrite subchronique avec une destruction articulaire dans les quatre membres. Ce modèle a été utilisé en développement préclinique pour presque tous les récents traitements de la PR [5]. L'AEC peut aussi être induite chez le singe rhésus [6], espèce dans laquelle la maladie est plus proche de la PR humaine [7–9]. Un paramètre essentiel à prendre en compte dans le développement de nouvelles biothérapies est la possibilité d'accéder à des modèles animaux ayant permis d'obtenir des résultats précis, fiables et efficaces [10].

Dans la PR, la thérapie génique a d'abord été expérimentée chez l'animal, bien qu'une étude de faisabilité ait été menée chez l'homme avec des fibroblastes synoviaux transduits par un rétrovirus [11]. La plupart des protocoles de thérapie génique réalisés dans les modèles expérimentaux utilisait des vecteurs dérivés de différents virus [12,13]. Les méthodes non-virales sont prometteuses car elles paraissent être sûres et peu immunogènes [14]. Des travaux antérieurs dans notre laboratoire avaient permis de montrer que la greffe de fibroblastes transfectés par des plasmides codant des gènes de cytokines anti-inflammatoires (IL-4, IL-13, récepteur leurre de l'IL-1) était efficace pour traiter l'AEC chez la souris. Des fibroblastes xénogéniques (d'ovaires de hamster chinois, CHO) avaient d'abord été utilisés [15], puis des fibroblastes autologues de souris DBA/1 [16]. Dans ces expériences, les cellules étaient injectées dans le tissu sous-cutané du dos, donc par voie systémique. La validation de cette thérapie génique cellulaire nécessite des expériences chez de plus gros animaux. Moins de cellules sont nécessaires dans la voie locale (i.e., intra-articulaire) que dans la voie systémique pour obtenir les mêmes concentrations de cytokines dans le liquide synovial ou dans la membrane synoviale. De plus, l'administration intra-articulaire pourrait permettre d'éviter les effets nocifs de l'administration systémique de cytokines. L'objectif de cette étude a été d'évaluer, chez le singe, l'effet d'une greffe articulaire autologue de cellules d'origine cutanée, en évaluant la survie dans l'environnement synovial. Les injections intra-articulaires ont été rendues possible par l'induction d'une AEC chez l'animal. Nous montrons ici que des cellules transfectées de peau peuvent survivre dans la synoviale.

2. Méthodes

2.1. Singe

Des singes rhésus (*Macaca mulatta*) étaient élevés dans le centre biomédical de recherche en primatologie (Ryswick, Pays-Bas). Ils étaient génotypés pour les antigènes de classes I (Manu-A et B) et II (Manu DR), comme décrit précédemment [17]. Les singes susceptibles à l'AEC étaient identifiés par l'absence de l'allèle Manu-26 du MHCI, marqueur dominant de la résistance à l'AEC chez le singe rhésus [18]. L'un de ces singes était sélectionné pour cette étude. Il était nourri avec une nourriture standard solide (Hope Farms) additionnée de riz et de fruit ou de légumes, et l'eau était donnée ad libitum. Les changements de comportement, la prise de nourriture et l'apparence générale de l'animal étaient examinés quotidiennement. Lors des manipulations, une sédation avec 0,1 mg/kg de kétamine était réalisée (10 mg/ml, AST Farma, Oudewater, Pays-Bas). Ce protocole d'étude a été revu et approuvé par les comités d'expérimentation animale du BPRC (Pays-Bas).

2.2. Cellules

Les fibroblastes de peau étaient isolés à partir de biopsies cutanées de la région interscapulaire du dos de l'animal. Les échantillons étaient conservés dans du milieu RPMI contenant 10 % de sérum de veau fœtal (SVF), de la pénicilline (2 %), de la streptomycine (2 %) et de la fungizone (1 %). La graisse était éliminée et la peau était coupée en petits morceaux à l'aide d'un scalpel, puis elle était placée dans une boîte de pétri contenant de la collagénase–dispase (1 mg/ml) (Boehringer) dans 10 ml de PBS. Après une heure de digestion sous agitation dans un incubateur à 37 °C et 5 % de CO₂, les cellules étaient lavées puis mises en culture dans une flasque de 75 cm² avec du milieu RPMI contenant 10 % de sérum de veau fœtal (SVF), de la pénicilline (2 %), de la streptomycine (2 %) et de la fungizone (1 %). Le jour suivant, le milieu était changé et lorsque les cellules avaient poussé jusque confluence, elles étaient décollées avec de la trypsine et replacées dans une flasque de culture plus grande.

Les fibroblastes étaient transfectés après deux ou trois passages en culture. Ils étaient déposés dans des boîtes 6-puits à raison de 3 × 10⁵ cellules par puits. Le jour suivant, une transfection était réalisée avec de la Lipofectamine (Gibco) (rapport ADN/lipofectamine, 3 µg/12 µl) et le plasmide pCH110-lacZ (Pharmacia) codant le gène de la β-galactosidase (β-gal) sous contrôle du promoteur de SV40. Les cellules CHO transfectées par le gène lacZ étaient utilisées comme témoins. Elles étaient cultivées dans du milieu RPMI contenant 7 % de SVF et 1 % de pénicilline/streptomycine [19].

2.3. Arthrite expérimentale au collagène et greffe de cellules transfectées

L'AEC était induite par immunisation avec 3 mg de collagène de type II bovin natif (CII). Il était dissous dans de l'acide

Download English Version:

<https://daneshyari.com/en/article/3388995>

Download Persian Version:

<https://daneshyari.com/article/3388995>

[Daneshyari.com](https://daneshyari.com)