Ingénierie cutanée et cellules souches pour le traitement des brûlures graves

J.-J. Lataillade[a-b], M. Trouillas[a-b], M. Alexaline[a-b], M. Brachet[c], T. Leclerc[d], L. Bargues[d], É. Bey[c], P. Duhamel[c]

a Centre de transfusion sanguine des armées, Département recherches et thérapies cellulaires, 101 avenue Henri Barbusse, CS 60058 – 92141 Clamart Cedex.
b Institut de recherche biomédicale des armées, Département soutien médico-chirurgical des forces, Unité de thérapie cellulaire et réparation tissulaire, BP73 – 91223 Brétigny sur Orge Cedex.
c Service de chirurgie plastique, HIA Percy, 101 avenue Henri Barbusse – 92140 Clamart.
d Centre de traitement des brûlés, BP 410 – 92141 Clamart Cedex.

Résumé

Les patients sévèrement brûlés ont besoin d'une couverture des plaies définitive et efficace. Les résultats thérapeutiques des brûlures massives ont été améliorés en utilisant des autogreffes d'épiderme de culture (CEA). En dépit de leur fragilité, des pourcentages de réussite de prise de greffe, du coût de ce traitement et la tendance à long terme à la contracture, cette technique chirurgicale a été développée dans quelques centres de traitement de brûlés. Les premières améliorations de cette technique ont été d'abord de combiner les CEA avec des substituts dermiques. Ces substituts de peau de culture permettent une couverture de la peau plus tôt et un résultat fonctionnel plus satisfaisant. Les secondes améliorations ont été de permettre la régénération de la peau en utilisant des cellules souches. Ces cellules souches ont la capacité, pour certaines de se différencier en kératinocytes et d'améliorer la réparation cutanée dans son ensemble. Les cellules souches mésenchymateuses peuvent elles aussi présenter un intérêt par leurs propriétés trophiques et ont été utilisées dans le traitement des brûlures graves radio-induites. La régénération de la peau et les techniques de l'ingénierie cutanée restent un défi complexe et offrent la possibilité de nouveaux traitements pour les patients sévèrement brûlés.

Mots-clés : Bio-ingénierie tissulaire. Brûlures cutanées. Brûlures radio-induites. Cellules stromales mésenchymateuses. Épidermes de culture. Thérapie cellulaire.

Abstract

SKIN BIOENGINEERING AND STEM CELLS FOR SEVERE BURN TREATMENT.

Severely burned patients need definitive and efficient wound coverage. The outcome of massive burns has improved with cultured epithelial autografts (CEA). In spite of its fragility, percentage of success, cost of treatment and long-term tendency to contracture, this surgical technique has been developed in some burn centres. The first improvements involved combining CEA and dermis-like substitutes. Cultured skin substitutes provide faster skin closure and satisfying functional results. These methods have been used successfully in massive burns. A second improvement was to enable skin regeneration by using epidermal stem cells. Stem cells can differentiate into keratinocytes, to promote wound repair and to regenerate skin appendages. Human mesenchymal stem cells foster wound healing and were used in cutaneous radiation syndrome. Skin regeneration and tissue engineering methods remain a complex challenge and offer the possibility of new treatment for injured and burned patients.

Keywords : Cell therapy. Cultures epidermis. Mesenchymal stromal cells. Radiation-induced burns. Skin burns. Tissue engineering.

J.-J. LATAILLADE, médecin en chef, professeur agrégé du Val-de-Grâce. M. TROUILLAS, M. ALEXALINE, M. BRACHET, médecin en chef, praticien certifié. T. LECLERC, médecin en chef, praticien certifié. L. BARGUES, médecin en chef, professeur agrégé du Val-de-Grâce. É. BEY médecin en chef, professeur agrégé du Val-de-Grâce. P. DUHAMEL, médecin en chef, professeur agrégé du Val-de-Grâce.

Correspondance : Monsieur le médecin en chef J.-J. LATAILLADE, Centre de transfusion sanguine des armées, Département recherches et thérapies cellulaires, 101 avenue Henri Barbusse, CS 60058 – 92141 Clamart Cedex.

Le traitement des brûlures cutanées aujourd'hui

La thérapie cellulaire a trouvé depuis plusieurs années chez le brûlé des applications cliniques et fait maintenant partie des moyens thérapeutiques disponibles pour prendre en charge les brûlés les plus graves. De nombreuses études rapportent l'expérience

et les difficultés rencontrées par les équipes utilisant ces techniques d'avant-garde, encore assez lourdes et coûteuses (1).

Les applications cliniques peuvent être classées en fonction de la localisation cutanée où sont appliquées ces cellules : l'épiderme, le derme, la peau totale à savoir à la fois l'épiderme et le derme.

Nous développerons ici les études cliniques disponibles dans la littérature où des cellules cutanées humaines ont été employées après brûlures.

L'épiderme

La thérapie cellulaire au niveau épidermique revient à employer des kératinocytes prélevés en peau saine et cultivés *in vitro*, afin de reconstituer l'architecture initiale de la couche superficielle de la peau (superposition de multiples couches de kératinocytes). Plusieurs techniques de culture en laboratoire et d'application *in situ* sont disponibles : Culture d'epithélium autologue (CEA) en couches, sur support de transfert ou en suspension.

CEA en couches multiples

Principes

En 1975, Green H. et al ont développé une technique permettant de cultiver des kératinocytes en grand nombre à partir d'une biopsie profonde de peau saine d'un patient (2). La technique consiste à isoler les kératinocytes humains des autres cellules par contact enzymatique avec la trypsine, de cultiver ces kératinocytes dans un milieu riche en facteurs de croissance et au contact de fibroblastes murins préalablement irradiés. Ces fibroblastes facilitent la croissance, la multiplication clonale puis la différentiation des kératinocytes. Par méthode enzymatique visant à dissoudre les protéines fixant les cellules au milieu de culture, les kératinocytes sont isolés et placés sur un tulle gras facilitant l'application in situ. Les kératinocytes confluents en couches superposées sont appliqués sur un tissu vivant vascularisé, préalablement préparé par excision des nécroses et brûlures profondes. Le délai nécessaire à la croissance in vitro des kératinocytes est d'environ trois à quatre semaines (3).

Applications cliniques

La possibilité de disposer de grandes surfaces de kératinocytes provenant du même patient (sans risque d'immunisation) a fait naître de grandes perspectives thérapeutiques chez les brûlés graves ne disposant pas de site donneur suffisamment étendu pour la réalisation des classiques auto-greffes.

La technique chirurgicale la plus employée est la pose de CEA sur un socle d'allogreffes provenant d'une banque de tissus humains (4). Des travaux ont montré la faisabilité de cette technique, en particulier sur des surfaces brûlées très étendues. On peut aussi appliquer des CEA non pas sur des allogreffes mais sur un socle d'autogreffes largement expansées (5).

La comparaison de patients bénéficiant de CEA avec des brûlures traitées de manière conventionnelle par autogreffes itératives reste d'interprétation difficile compte tenu des faibles effectifs.

Au total, les résultats cliniques de la couverture cutanée par CEA restent d'interprétation difficile. Dans une revue de la littérature, Wood FN, rapporte que l'emploi de CEA est devenu une technique disponible, utile et maîtrisée par de nombreux centres de brûlés pour traiter les patients les plus graves (6). L'auteur ne parvient cependant pas à établir, en raison d'études peu homogènes et de conceptions très différentes, un rapport coût – bénéfice ou à mettre en évidence un gain en termes de mortalité. Cette technique est utilisée par les équipes du Centre de traitement des brûlés (CTB) de l'HIA Percy depuis plusieurs dizaines d'années pour les cas où la surface de peau brûlée n'autorise pas d'autres alternatives. Cela ne concerne que quelques patients par an car ces cultures (Epicel®) sont réalisées par la société Genzyme aux USA et leur coût reste très élevé. En 2014, la société Genzyme a cessé son activité et très peu de sociétés concurrentes sont capables à ce jour de fournir un épiderme de culture d'une qualité équivalente à celle de Genzyme.

CEA sur support de transfert

Principes

La difficulté majeure lors de l'utilisation de CEA est l'application des feuillets de kératinocytes sur le socle vascularisé d'allogreffes ou d'autogreffes en raison de leur fragilité. Un dispositif maniable est alors nécessaire. Le but est de poser les feuillets de culture sans altérer les kératinocytes qu'ils contiennent et donc d'augmenter à distance le taux de prise de CEA. La technique de CEA en couches multiples utilise une compresse grasse pour transporter les kératinocytes confluents. Plusieurs méthodes ayant recours à des bio-matériaux pour transporter et déposer les cellules de culture sont disponibles (3). Le matériel employé peut être une colle de fibrine (7), une membrane imprégnée d'acide hyaluronique (8), un pansement à base de polyuréthane (9). Ainsi de très nombreux transporteurs de cellules épidermiques ont été développés en laboratoire.

Applications cliniques

Ces méthodes restent, à ce jour, expérimentales et ont fait l'objet de travaux *in vitro* ou au mieux d'applications sur l'animal. L'utilisation clinique chez le brûlé reste à évaluer. La perspective offerte par ces techniques est une meilleure adhérence des cellules et aussi une réduction des coûts. Les matériaux à base de polyuréthane par exemple sont infiniment moins coûteux que tous les dispositifs à base de fibrine (9).

Développement d'un CEA par le CTSA

Le laboratoire de recherche du CTSA développe depuis 2006, en partenariat avec le Centre de recherche de L'OREAL et le laboratoire de recherche sur la

kératinopoïèse du CEA, un procédé de culture d'épiderme original, basé sur la technique de Green (donc proche du procédé Genzyme) mais sans fibroblastes nourriciers de souris, sans utilisation d'enzymes et sur un support de transfert fabriqué à partir de plasma humain coagulé. Ce procédé original a d'ores et déjà montré d'excellents résultats *in vitro* et sur des modèles animaux, il reste à démontrer son innocuité et son efficacité chez l'homme dans le cadre d'un essai clinique qui devrait démarrer en 2016. Des partenariats industriels sont déjà envisagés pour valoriser ce nouveau produit dès lors qu'il aura montré son intérêt clinique.

CEA en suspension

Principes

Pour limiter les échecs de CEA liés à un défaut d'adhésion des kératinocytes confluents, une technique de pulvérisation de kératinocytes en suspension a vu le jour. Le principe est d'appliquer sur un socle vascularisé (derme excisé, autogreffes largement expansées, prises de greffe non cicatrisées) une suspension de kératinocytes pré confluents, à la phase précoce de la culture lorsque l'état de multiplication est intense. Après une phase courte (5 à 7 jours) de multiplication *in vitro* au laboratoire à partir d'une biopsie en peau saine, les kératinocytes pulvérisés vont proliférer, former secondairement *in vivo* des plages confluentes puis se différencier en un épithélium définitif (10).

Les kératinocytes peuvent aussi être délivrés en extemporané (dans les minutes qui suivent la biopsie au bloc opératoire). L'échantillon cutané est traité par une solution de trypsine afin d'isoler les cellules épidermiques qui sont délivrées en spray sur les plaies pour s'y multiplier et créer un néo épiderme (11). Cette technique de suspension de cellules cutanées a été utilisée pour d'autres pathologies que les brûlures afin de déposer des cellules différentes des kératinocytes comme les mélanocytes dans le traitement du vitiligo (12).

Applications cliniques

Cette technique est employée en pratique quotidienne depuis plusieurs années et les résultats publiés sont très encourageants.

Les brûlés les plus graves (brûlures > 60 % SCT) ont bénéficié de CEA en suspension après culture de kératinocytes (13). Wood FM et al. possèdent une longue expérience de cette technique qui est utilisée sur des brûlures étendues de profondeur différente.

Les CEA en suspension sont employés aussi sans phase préalable de culture de kératinocytes in vitro. Cette méthode est destinée aux brûlures limitées en surface mais difficiles à greffer sur le plan chirurgical. Hartmann B. et al. rapportent une série de 19 patients brûlés en profondeur sur la face et le cou, greffés avec succès par suspension de CEA (14).

Au total, l'utilisation de CEA en suspension, avec culture ou non de kératinocytes autologues au laboratoire, paraît adaptée à toutes les situations thérapeutiques difficiles chez le brûlé comme les retards de cicatrisation (prises de greffe, sujets âgés, brûlures de deuxième degré profond) ou les brûlures très étendues en association aux différentes techniques de couverture cutanée (larges autogreffes, allogreffes ou substituts cutanés). Les études récentes disponibles sont en mesure de valider l'utilité de cette technique.

Le derme

Principes

Plusieurs modèles de substituts dermiques ont été développés par l'industrie et certains d'entre eux sont employés de manière régulière en pratique clinique dans les centres de brûlés. Ces substituts dermiques participent à la reconstruction cutanée, soit comme couverture cutanée temporaire ou définitive (15).

On peut distinguer les substituts dermiques acellulaires et les substituts dermiques cellularisés.

Les substituts dermiques acellulaires (ne possédant aucune cellule cutanée humaine ou animale) se composent d'une matrice artificielle à base de collagène, reproduisant l'architecture du derme humain et colonisée par les cellules et les vaisseaux du receveur en quelques semaines. La reconstruction d'un néo-derme est complétée d'une autogreffe épidermique, immédiate (Matriderm®, Dr Suwelack skin and health, Billerbeck, Allemagne) (16) ou retardée de trois semaines (Intégra®, Intégra® lifesciences corporation, Plainsboro, USA) (17). La présence d'un néo derme améliore le pronostic fonctionnel des brûlures greffées et limite les phénomènes de rétraction.

Les substituts dermiques cellulaires se composent soit d'une matrice synthétique dermique colonisée par des fibroblastes humains allo géniques (Transcyte®, Dermagraft®), soit d'une matrice synthétique en nylon imprégnée de polypeptides de porc (Biobrane®) ou enfin d'un derme cadavérique d'origine humaine mais sans fibroblastes après traitement (Alloderm®) (18).

Applications cliniques

La plupart de ces techniques bénéficient d'un recul de plusieurs années d'expérience et sont employées dans diverses indications chez le brûlé. Leur diffusion commerciale peut cependant être limitée par la législation nationale ou européenne (limitation de diffusion de produits d'origine humaine en France comme le Transcyte®).

Les substituts dermiques acellulaires font partie de l'arsenal chirurgical chez le brûlé. Leur utilisation quotidienne est bien codifiée et les résultats cliniques satisfaisants (qualité des cicatrices, souplesse dermique en zone de flexion, limitation d'hypertrophie) (17). Ils sont employés à la phase aiguë dans les brûlures du troisième degré de préférence en zone fonctionnelle (mains, cou, creux poplité, coude, etc.) après excision chirurgicale de celles-ci. Ils sont aussi employés tardivement à la phase de reconstruction et correction des séquelles (19).

Les substituts dermiques cellulaires sont réservés à la phase aiguë et participent à la couverture cutanée définitive lors des cicatrisations dirigées ou lors des autogreffes cutanées.

Le Transcyte® est surtout employé pour faciliter la cicatrisation des brûlures du deuxième degré superficiel voir du deuxième degré profond après excision tangentielle (20).

Le Dermagraft® et l'Alloderm® sont utilisés après excision chirurgicale des brûlures profondes et servent de socle à l'autogreffe. Ces dermes, respectivement artificiels cellularisés et humains non cellularisés, posées sur le tissu de granulation peuvent recevoir des autogreffes « meshées » (indication identique aux allogreffes provenant de banque de peau).

La peau totale

Principes

Une fois la technique de Culture d'épithélium autologue (CEA) maîtrisée, les équipes travaillant dans le domaine de la thérapie cellulaire cutanée ont voulu appliquer ces kératinocytes de culture sur un socle différent de l'allo derme vascularisé décrit par Cuono C. et al. en 1986. Ce dernier socle n'offre pas assez de souplesse des tissus à distance de la greffe.

L'objectif clinique recherché avec le développement d'une peau totale artificielle était triple :

– apporter en même temps que les kératinocytes, des fibroblastes humains capables de favoriser la survie et la différenciation des kératinocytes et de faciliter leur croissance in vivo ;

– offrir un derme garantissant une élasticité et un résultat fonctionnel meilleur ;

– limiter le taux significatif d'échec de CEA en apportant un socle dermique plus propice à l'adhérence des kératinocytes.

Les premiers modèles de peau totale artificielle comprenaient une couche superficielle de kératinocytes (selon un modèle classique de culture selon Rheinwald JG. et Green H.) et une couche profonde dermique à base d'Intégra® sans cellule (21). Ce modèle a été amélioré par l'adjonction de fibroblastes humains qui complètent les kératinocytes et l'Intégra® (22). Sheridan RL et al. ont développé une peau totale composée de kératinocytes (Genzyme Tissue Repair Inc, Cambridge, USA) et de derme allo génique débarrassé de toutes les cellules dont les fibroblastes (23).

La peau totale comprenant un épiderme de culture et un derme artificiel cellularisé a été l'objet des travaux de Boyce ST. Son modèle contient une trame dermique à base de collagène et de glycosaminoglycanes, inoculée de fibroblastes et kératinocytes de culture. Les cellules se multiplient au laboratoire sur le derme présenté en plaques de 36 cm^2. Les plaques de peau totale sont posées chirurgicalement sur les sites brûlés excisés après quatre semaines de croissance cellulaire in vitro (24).

Un modèle différent de peau totale composée d'une matrice dermique en colle de fibrine, cellularisée avec des kératinocytes et des fibroblastes, offrirait l'avantage d'un temps de culture au laboratoire plus court (15 jours) (25).

Applications cliniques

Le modèle de Boyce ST. a été plus particulièrement évalué cliniquement (24, 26, 27). Une série compte 49 enfants (âgés de 7,5 ± 1 an) porteurs de brûlures très étendues (brûlures sur 75,8 ± 2 % de la SCT dont 73,4 ± 2 % de lésions au troisième degré) (28). Cette technique a été ici comparée de manière prospective aux autogreffes répétées. La fermeture cutanée définitive est obtenue beaucoup plus rapidement avec la peau totale artificielle et la survie est améliorée chez ces brûlés disposant de peu de site donneur. L'utilisation de ce substitut dermique cellularisé est standardisée et le passage à une phase de production plus élargie semble envisageable dans le futur.

Au total, l'utilisation de peau totale cellularisée présente des résultats cliniques très encourageants et semble trouver une place de choix dans la prise en charge des brûlés les plus graves. L'association de CEA et d'un derme colonisé par des fibroblastes autorise une couverture cutanée définitive rapide avec l'espoir d'un meilleur résultat fonctionnel.

Cellules souches et bio-ingénierie cutanée

Malgré la diversité des approches de transplantation allogénique et autologue, le pronostic des brûlures profondes et étendues n'est pas totalement satisfaisant du fait de l'existence de cicatrices pathologiques, d'une peau non totalement fonctionnelle, sans annexe et qui affecte de façon importante la qualité de vie des patients. Motivés par ces insuffisances, les cliniciens et chercheurs s'emploient à faire évoluer les techniques de traitement de ces brûlures ; ces dernières décades ont vu naître des progrès issus de l'ingénierie tissulaire et des nouvelles connaissances acquises sur la biologie des cellules souches.

Les cellules souches adultes

Il existe deux principales catégories de Cellules souches (CS) dans la moelle osseuse : les Cellules souches hématopoïétiques (CSH) et les Cellules souches/stomales mésenchymateuses (CSM). Les CSH donnent naissance à l'ensemble des lignées cellulaires sanguines (globules rouges, globules blancs et plaquettes) selon un processus finement régulé appelé hématopoïèse. Elles pourraient être également à l'origine de lignées cellulaires non sanguines comme les hépatocytes et les cellules endothéliales (29). Les CSM représentent une population cellulaire très rare de la moelle osseuse (0,001 à 0,01 % des cellules nucléées) qui ont des capacités d'auto-renouvellement et de différenciation vers différents types cellulaires et tissulaires (multipotence) (30, 31). Elles peuvent quitter leurs niches médullaires

où elles assurent le soutien stromal de l'hématopoïèse, migrer vers les tissus lésés et peuvent ainsi jouer un rôle important dans la régénération tissulaire. Leur facilité d'isolement, leur haut pouvoir de multiplication en culture, leur capacité de production d'une grande variété de facteurs de croissance et leur propriété immunosuppressive en font un outil attractif pour la thérapie cellulaire des brûlures cutanées (32, 33). Plusieurs études ont montré l'intérêt de telles cellules dans la reconstitution cutanée après brûlure mais leur utilisation clinique en routine reste encore contrainte à la résolution de certaines difficultés techniques et sécuritaires (34). Les CSM sont présentes dans la moelle osseuse mais également dans de nombreux autres tissus plus accessibles comme la graisse, le cordon ombilical, le derme et la muqueuse gingivale où elles participent au renouvellement et à l'homéostasie du tissu concerné. Un des challenges actuels est de définir la source optimale, qui sera la plus riche en cellules souches et à partir de laquelle leur isolement sera le plus facile à mettre en œuvre.

Des études de greffe chez l'animal ont montré que les CSM étaient capables de réparer des lésions tissulaires diverses provoquées par des maladies ou des traumatismes (28, 35, 36). Non seulement elles peuvent participer à la reconstruction de tissus d'origine mésenchymateuse (disques intervertébraux, os, myocarde, cartilage) mais aussi de tissus d'origine embryonnaire différente comme la peau (36) et le poumon (37). Ces travaux démontrent à la fois la plasticité et l'efficacité des CSM dans les réparations complexes de tissus et ainsi tout leur intérêt pour la thérapie cellulaire. D'autre part, qu'elles soient d'origine allogénique ou autologue, aucune réaction immunitaire n'a été rapportée après administration locale ou systémique de CSM (38, 39).

Les CSM de moelle osseuse ont déjà été utilisées dans de nombreuses applications cliniques chez l'homme, en hématologie pour améliorer la greffe des cellules souches hématopoïétiques, traiter ou prévenir la maladie du greffon contre l'hôte (GVH) et en orthopédie pour réparer des fractures osseuses graves en combinaison avec des biomatériaux et du Plasma riche en plaquettes (40-42). Ainsi, non seulement leur efficacité thérapeutique mais surtout leur innocuité ont été démontrées chez l'homme.

Utilisation des CSM dans le traitement des brûlures graves

L'utilisation des CSM chez l'homme dans la prise en charge thérapeutique des brûlures graves a été envisagée pour la première fois par le groupe russe de Rasulov (43). Une patiente présentant des lésions de brûlure grave de degré IIIB touchant 40 % de la surface corporelle a été traitée par autogreffe de peau combinée à des injections locales de CSM médullaires d'origine allogénique. Cette thérapie cellulaire a permis d'améliorer la prise de greffe et de réduire le temps d'hospitalisation avec une action marquée sur la néovascularisation locale. Cette thérapie cellulaire combinée a ensuite été appliquée par notre groupe pour la première fois sur des lésions de brûlure radio-induites en 2005 (33). La fréquence des accidents d'irradiation aiguë à de fortes doses, a augmenté ces dernières années (Georgie (1998), Turquie (1999), Pérou (2000), Panama (2001), Pologne (2001), Géorgie (2002), Chili (2005), Sénégal (2007), France (2006-2007), Tunisie (2008), Équateur (2009), Venezuela (2010), Gabon (2010), Chili (2011), Pérou (2012)) en raison notamment de la mauvaise utilisation de sources radioactives dans le milieu industriel et médical. Si le phénomène est généralement limité quant au nombre de personnes atteintes, il n'en est pas moins catastrophique sur le plan humain et particulièrement lourd sur le plan de la prise en charge.

L'Hôpital d'instruction des armées Percy possède depuis plus de dix ans une expertise dans la prise en charge thérapeutique de ces patients irradiés. Bien que chaque accident soit unique, de par les circonstances de survenue, la nature de la source radioactive, ou la dose d'exposition, l'évolution des lésions traitées par une exérèse chirurgicale conventionnelle a malheureusement toujours été défavorable. L'ablation chirurgicale de ces zones nécrotiques se traduit *in fine* par une nécrose secondaire plus étendue. L'impression est que le traumatisme chirurgical de ces tissus irradiés favorise l'apparition de nouvelles poussées de nécrose probablement liées à l'existence de vagues inflammatoires. La figure 1 montre un patient victime d'un accident d'irradiation localisé (Lima, Pérou, 1999) dont les lésions ont évolué, malgré la mise en œuvre d'un traitement chirurgical conventionnel (exérèse et recouvrement cutané), vers une nécrose extensive incontrôlable qui a conduit à une désarticulation de la hanche puis au décès du patient.

Une des caractéristiques de la réponse cutanée aux irradiations localisées à forte dose est le développement d'une nécrose tissulaire apparaissant après une phase cliniquement silencieuse et évoluant par poussées successives difficilement prévisibles (44, 45). Cette nécrose est à relier à un processus inflammatoire local intense et caractérisé par sa récurrence. La réparation tissulaire implique l'intégration de nombreux processus dynamiques mettant en jeu à la fois la matrice extra-cellulaire du tissu lésé, des cytokines et facteurs de croissance qui modulent la réponse des différents compartiments cellulaires ainsi que les cellules constitutives du tissu cutané et les cellules sanguines infiltrées. L'évolution redoutée des lésions de radionécrose, sous tendue par les expériences rapportées dans la littérature (46), et par les données très précises de dosimétrie dont on peut disposer aujourd'hui, permet d'envisager la mise en œuvre d'une nouvelle thérapie combinant les mesures conservatoires symptomatiques déjà mises en œuvre à une thérapie cellulaire locale par cellules souches mésenchymateuses. Des expériences pré-cliniques chez l'animal montrant un intérêt potentiel des CSM pour favoriser la réparation des lésions nous ont conduits à envisager l'utilisation des CSM comme traitement complémentaire au traitement chirurgical en





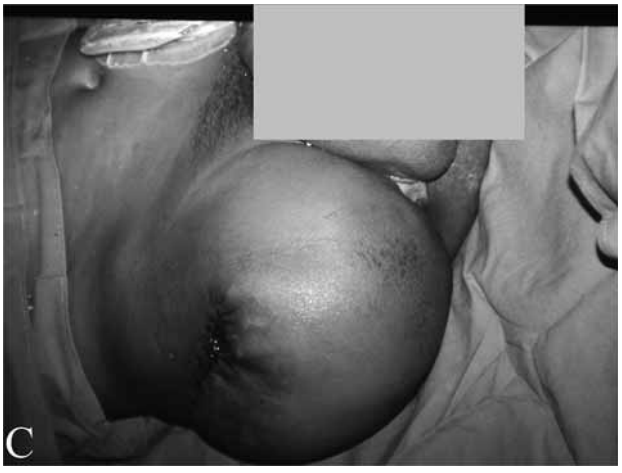


Figure 1. Évolution d'une brûlure de la cuisse traitée chirurgicalement chez un patient victime d'un accident localisé d'irradiation (Lima, Pérou, 1999).
A. 6 jours après l'accident, aspect typique de desquamation exsudative d'une brûlure radio-induite.
B. Aspect d'une ulcération nécrotique extensive de la lésion après une première chirurgie d'exérèse (J 130 après l'accident).
C. A J 190 après l'accident, amputation du membre du fait de l'extension non contrôlée de la lésion.

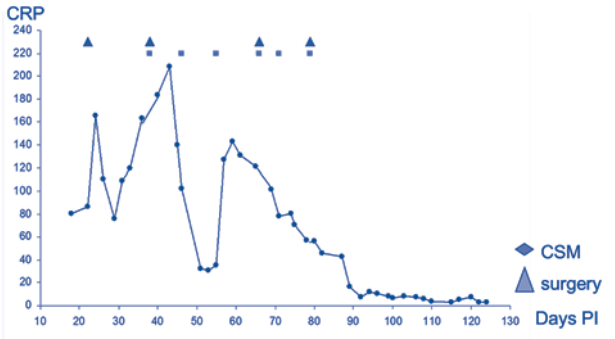
raison de leur potentiel immunomodulateur et surtout anti-inflammatoire.

Ainsi, les CSM trouvent leur place dans cette thérapie non pas du fait de leur propriété de multipotence mais plutôt du fait de leur rôle trophique. En effet, elles produisent certaines cytokines et facteurs de croissance qui auraient un rôle bénéfique dans le contrôle des manifestations inflammatoires locales qui caractérisent la brûlure radiologique (47). Des essais cliniques de phase I et II ont démontré l'innocuité de l'administration systémique de CSM amplifiées *ex vivo* et ont permis d'appréhender le bénéfice potentiel de leur utilisation chez l'homme. Ces données associées à des prérequis expérimentaux sur des modèles animaux (48, 49) ont permis de soumettre à l'Agence nationale de sécurité des médicaments (ANSM) une demande d'autorisation, à titre compassionnel, d'administration locale de CSM autologues chez des patients victimes d'accidents cutanés d'irradiation. Ces dix dernières années, huit patients ont pu bénéficier de cette thérapie cellulaire en association avec un traitement chirurgical d'exérèse de nécrose et d'autogreffe d'épiderme. Pour chacun d'eux, il s'agissait de brûlures radio-induites sévères et très localisées (mains, bras, fesse) avec un risque important d'évolution vers une chirurgie radicale d'amputation. Les CSM ont été obtenues à partir de prélèvements de moelle osseuse autologue après une expansion *in vitro* de 15 à 17 jours. Les cultures de CSM ont été réalisées dans un milieu de culture sans protéine d'origine animale, additionné de 8 % de Lysat de Plaquettes humaines (32). L'ensemble des contrôles de qualité réalisés, en particuliers les caryotypes, ont été tous normaux autorisant l'administration des cellules produites. On note que150 à 180.10^6 de cellules par injection ont été administrées localement au niveau des lésions après exérèse chirurgicale des tissus nécrosés en complément d'une autogreffe d'épiderme (fig. 2 et 3 : exemple d'un patient). En fonction de la gravité et de la rapidité d'évolution de chaque patient, 2 à 5 administrations ont été réalisées au total. Un effet spectaculaire sur la douleur a été constaté chez tous les patients dès le lendemain des administrations de cellules. Cet effet antalgique était fugace et disparaissait en quelques jours incitant à la réalisation d'injections supplémentaires. Un effet sur la rapidité et la qualité de la prise de greffe épidermique est également apparu très significatif aux chirurgiens. Aucune récidive de nécrose n'est survenue chez ces patients après un recul de neuf ans pour le premier d'entre eux. Nous pensons que les CSM ont participé au contrôle local de l'inflammation, permettant une meilleure prise de greffe et une meilleure cicatrisation globale des lésions. Un suivi de la Protéine C Réactive systémique a montré une diminution significative de son taux après le traitement (fig. 3). Des expériences sont en cours chez l'animal pour confirmer le rôle anti-inflammatoire et promoteur de la prise de greffe des CSM administrées localement au niveau des lésions.



Figure 2. Traitement d'une brûlure de la cuisse par chirurgie combinée à une thérapie cellulaire locale autologue chez un patient victime d'un accident localisé d'irradiation (Équateur, 2009). A. 20 jours après l'accident, aspect typique d'une ulcération nécrotique radio-induite. B. Hypersignal inflammatoire à l'IRM des tissus cutanés et musculaires. C-E. Réalisation d'un lambeau libre musculaire du grand dorsal combiné à l'injection locale de cellules stromales mésenchymateuses autologues de moelle osseuse et d'une couverture par autogreffe de peau mince.





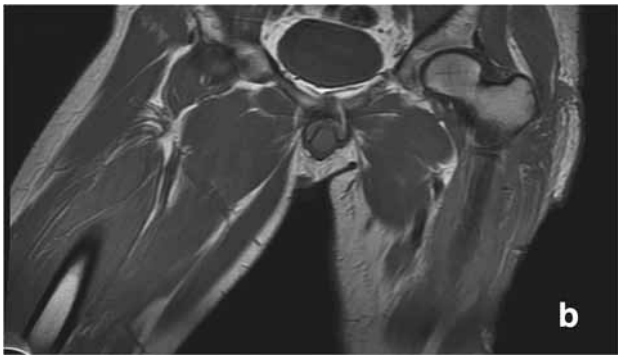




Figure 3. Évolution d'une brûlure de la cuisse traitée par chirurgie combinée à une thérapie cellulaire locale autologue chez un patient victime d'un accident localisé d'irradiation (Équateur, 2009).
A. 80 jours après l'accident, excellentes prise de greffe et cicatrisation cutanée
B. Disparition de l'hypersignal inflammatoire à l'IRM (J 80)
C. Diminution des taux de CRP systémique après traitement
D. Aspect de la lésion 300 jours après l'accident sans signe clinique d'inflammation locale.

Conclusion

L'avenir thérapeutique des brûlures graves va très certainement bénéficier de ces avancées de la bio-ingénierie cellulaire et tissulaire, intégrant aux modèles de peau totale, des cellules souches multipotentes de type CSM, qui joueraient un rôle de promotion de la survie et de la prolifération des cellules spécialisées épidermiques et dermiques. Des expériences *in vitro* associant des épidermes de culture, des éléments de la matrice extracellulaire, des fibroblastes dermiques et des CSM sont en cours dans notre laboratoire. Les résultats obtenus sur des modèles animaux devront confirmer le bénéfice apporté par les CSM à la fois sur l'inflammation loco-régionale et la qualité de la prise de greffe mais également sur la maturité de la jonction dermo-épidermique.

Les auteurs ne déclarent pas de conflit d'intérêt concernant les données présentées dans cet article.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Sheridan RL, Tompkins RG. Skin substitutes in burns. Burns, 1999 ; 25 : 97-103.
2. Rheinwald JG, Green H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes : the formation of keratinizing colonies from single cells. Cell, 1975 ; 6 : 331-43.
3. Chester DL, Balderson DS, Phil D, Papini RPG. A review of keratinocyte delivery to the wound bed. J Burn Care Rehabil, 2004 ; 25 : 266-75.
4. Cuono C, Langdon R, McGuire J. Use of cultured epidermal autografts and dermal allografts as skin replacement after burn injury. Lancet, 1986 ; 1: 1123-4.
5. Braye F, Oddou L, Bertin-Maghit M, et al. Widely meshed autograft associated with cultured autologous epithelium for the treatment of major burns in children : report of 12 cases. Eur J Pediatr Surg, 2000 ; 10:35-40.
6. Wood FM, Kolybaba ML, Allen P. The use of cultured epithelial autografts in the treatment of major burn injuries : a critical review of the literature. Burns, 2006 ; 32 : 395-401.
7. Ronfard V, Broly H, Mitchell V, Galizia JP, Hochart D, Chambon E, et al. Use of human keratinocytes cultured on fibrin glue in the treatment of burn wounds. Burns, 1991 ; 3 : 181-4.
8. Myers SR, Grady J, Soranzo C, Sanders R, Green C, et al. A hyaluronic acid membrane delivery system for cultured keratinocytes : clinical take rates in the porcine kerato-dermal model. J Burn Care Rehabil, 1997 ; 3 : 214-22.
9. Chua AWC, Ma DR, Song IC, Phan TT, Lee ST, Song C. In vitro evaluation of fibrin mat and Tegaderm® wound dressing for the delivery of keratinocytes – implications of their use to treat burns. Burns, 2008 ; 34 : 175-8.
10. James SE, Booth S, Dheansa B, Mann DJ, Reid MJ, Shevchenko RV, et al. Sprayed cultured autologous keratinocytes used alone or in combination with meshed autografts to accelerate wound in difficult-to-heal burns patients. Burns, 2010 May ; 36 (3) : e10-20.
11. Gravante G, Di Fede MC, Araco A, Grimaldi M, De Angelis B, Arpino A, et al. A randomized trial comparing Recell® system of epidermal cells delivery versus classic skin grafts for the treatment of deep partial thickness burns. Burns, 2007 ; 33 : 966-72.
12. Back C, Dearman B, Li A, Neild T, Greenwood JE. Noncultured keratinocytes/melanocytecosuspension : effects on reepithelialization and repigmentation- A randomized, placebo-controlled study. J Burn Care Res, 2009 May-Jun ; 30 (3) : 408-16.
13. Wood FM, Kolybaba ML, Allen P. The use of cultured epithelial autograft in the treatment of major burn wounds : eleven years of clinical experience. Burns, 2006 ; 32 : 538-44.
14. Hartman B, Ekkernkamp A, Johnen C, Gerlach JC, Belfekroun C, Küntscher MV. Sprayed cultured epithelial autografts for deep dermal burns of the face and neck. Ann Plast Surg, 2007 ; 58 : 70-3.
15. Lawton G, Dheansa B. The management of major burns- a surgical perspective. Current anaesthesia and critical care, 2008 ; 19 : 275-81.
16. Heimbach DM, Warden GD, Luterman A, Jordan MH, Ozobia N, Ryan CM, et al. Multicenter postapproval clinical trial of Intégra® dermal regeneration template for burn treatment. J Burn Care Rehabil, 2003 ; 24 : 42-8.
17. Ryssel H, Gazyakan E, Germann G, Ohlbauer M. The use of Matriderm® in early excision and simultaneous autologous skin grafting in burns- a pilot study. Burns, 2008 ; 34 : 93-7.
18. Braye F, Hautier A, Bouez C, Damour O. Les substituts cutanés reconstruits en laboratoire : application au traitement des brûlés. Pathol Biol, 2005 ; 10:613-7.
19. Moiemem NS, Vlachou E, Staiano JJ, Thawy YI, Frame JD. Reconstructive surgery with integra dermal regeneration template : histologic study, clinical evaluation and current practice. Plast reconstr Surg, 2006 ; 117, 160 S – 174 S.
20. Amani H, Dougherty WR, Blome-Eberwein S. Use of Transcyte® and dermabrasion to treat burns reduces lenght of stay in burns of all size and etiology. Burns, 2006 ; 32 : 828-32.
21. Pandya AN, Woodward B, Parkhouse ND., The use of cultured autologous keratinocytes with intergra in the resurfacing of acute burns. Plast Reconstr Surg, 1998 ; 3 : 825-8.
22. Wisser D, Steffes J. Skin replacement with collagen based dermis substitute, autologous keratinocytes and fibroblasts in burn trauma. Burns, 2003 ; 29 : 378-80.
23. Sheridan RL, Morgan JR, Cusick JL, Petras LM, Lydon MM, Tompkins RG. Initial experience with a composite autologous skin substitute. Burns, 2001 ; 27 : 421-4.
24. Boyce ST, Kagan RJ, Meyer NA, Yakuboff KP, Warden GD. The 1999 clinical research award. Cultured skin substitutes combined with Integra artifical skin to replace native autograft and allograft for closure of excised full-thickness burns. J Burn Care Rehabil, 1999 ; 20 : 453-61.
25. Kamolz LP, Luegmair M, Wick N, Eisenbock B, Burjak S, Koller R, et al. The Viennese culture method : cultured human epithelium obtained on a dermal matrix based on fibroblast containing fibrin glue gels. Burns, 2005 ; 31 : 25-9.
26. Boyce ST, Kagan RJ, Greenhalgh DG, Warner P, Yakuboff KP, Palmieri T, et al. Cultured skin substitutes reduce requirements for harvesting of skin autograft for closure of excised, full-thickness burns. J Trauma, 2006 ; 60 : 821-9.
27. Boyce ST, Kagan RJ, Yakuboff KP, Meyer NA, Rieman MT, Greenhalgh DG, et al. Cultured skin substitutes reduce donor skin harvesting for closure of excised full-thickness burns. Ann Surg, 2002 ; 2 : 269-79.
28. Baksh D, Song L, Tuan RS. Adult mesenchymal stem cells : characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. J Cell Mol Med. 2004 ; 8 : 301-16.
29. Lagasse E, Connors H, Al Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, et al. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. Nat Med 2000 ; 6 : 1229-34.
30. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science 1999 ; 284 : 143-7.
31. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. Nature 2001 ; 410 : 701-5.
32. Doucet C, Ernou I, Zhang Y, Llense JR, Begot L, Holy X, et al. Platelet lysates promote mesenchymal stem cell expansion : a safety substitute for animal serum in cell-based therapy applications. J Cell Physiol 2005 ; 205 (2) : 228-36.
33. Lataillade JJ, Doucet C, Bey E, Carsin H, Huet C, Clairand I, et al. New approach to radiation burn treatment by dosimetry-guided surgery combined with autologous mesenchymal stem cell therapy. Regen Med, 2007 ; 2 : 785-94.
34. Laleh Khodadadi, Saeed Shafieyan, Nasser Aghdami, Hossein Baharvand. Cell Therapy in Burn Repair. Yakhteh Medical Journal, 2008 ; Vol 10, No 3 : 167-78.
35. Yoshikawa T, Mitsuno H, Nonaka I, Sen Y, Kawanishi K, Inada Y, et al. Wound therapy by marrow mesenchymal cell transplantation. Plast Reconstr Surg. 2008 ; 121 : 860-77.
36. Sasaki M, Abe R, Fujita Y, Ando S, Inokuma D, Shimizu H. Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type. J Immunol. 2008 ; 180 : 2581-7.
37. Ortiz LA, Gambelli F, McBride C, Gaupp D, Baddoo M, Kaminski N, et al. Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. Proc Natl Acad Sci USA. 2003 ; 100 : 8407-11.
38. Mansilla E, Marin GH, Sturla M, Drago HE, Gil MA, Salas E, et al. Human mesenchymal stem cells are tolerized by mice and improve skin and spinal cord injuries. Transplant Proc. 2005 ; 37 : 292-4.
39. Liu H, Kemeny DM, Heng BC, Ouyang HW, Melendez AJ, Cao T. The immunogenicity and immunomodulatory function of osteogenic cells differentiated from mesenchymal stem cells. J Immunol. 2006 ; 176 : 2864-71.
40. Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, Koo WW, Gordon PL, Neel M, et al. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. Nat Med 1999 ; 5 : 309-13.
41. Koc ON, Day J, Nieder M, Gerson SL, Lazarus HM, Krivit

W. Allogeneic mesenchymal stem cell infusion for treatment of metachromatic leukodystrophy (MLD) and Hurler syndrome (MPS-IH). Bone Marrow Transplant. 2002 ; 30 : 215-22.
42. Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, Gotherstrom C, Hassan M, Uzunel M, et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. Lancet. 2004 ; 363 : 1439-41.
43. Rasulov MF, Vasil'chenkov AV, Onishchenko NA, Krasheninnikov ME, Kravchenko VI, Gorshenin TL, et al. First Experience in the Use of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells for the Treatment of a Patient with Deep Skin Burns. Cell Technologies in Biology and Medicine. 2005 ; No.1 : 141-4.
44. Gottlober P, Bezold G, Weber L, Gourmelon P, Cosset JM, Bahren W, et al. The radiation accident in Georgia : clinical appearance and diagnosis of cutaneous radiation syndrome. J Am Acad Dermatol. 2000 Mar ; 42 (3) : 453-8.
45. Peter RU, Gottlober P. Management of cutaneous radiation injuries : diagnostic and therapeutic principles of the cutaneous radiation syndrome. Mil Med. 2002 Feb ; 167 (2 Suppl) : 110-2.
46. Peter RU. Cutaneous radiation syndrome in multi-organ failure. BJR Suppl. 2005 ; 27 : 180-4.
47. Chen L, Tredget EE, Wu PY, Wu Y. Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. PLoS ONE. 2008 ; 3 (4) : e1886.
48. Francois S, Bensidhoum M, Mouiseddine M, Mazurier C, Allenet B, Semont A, et al. Local irradiation not only induces homing of human mesenchymal stem cells at exposed sites but promotes their widespread engraftment to multiple organs : a study of their quantitative distribution after irradiation damage. Stem Cells. 2006 Apr ; 24 (4) : 1020-9.
49. Chapel A, Bertho JM, Bensidhoum M, Fouillard L, Young RG, Frick J, et al. Mesenchymal stem cells home to injured tissues when co-infused with hematopoietic cells to treat a radiation-induced multi-organ failure syndrome. J Gene Med. 2003 Dec ; 5 (12) : 1028-38.