Article original

Les vésicules extracellulaires dans le traitement de la brûlure radiologique

M. DE TADDEO[(1)], G. VALADE[(2)], S. BANZET[(3)], M. TROUILLAS[(4)], J. PELTZER[(5)]

(1,2,3,4,5) Institut de Recherche Biomédicale des Armées, Unité Thérapie Cellulaire et Tissulaire, UMR-MD-1197, Clamart
(3) Centre de Transfusion Sanguine des Armées, Clamart

M. DE TADDEO et G. VALADE ont contribué à parts égales dans la rédaction de ce manuscrit.

Auteur correspondant : juliette.peltzer@inserm.fr

Open access DOI
10.17184/eac.8642

Reçu
le 9 janvier 2023

Accepté
le 20 décembre 2023

Publié
le 5 juin 2024

Conflit d'intérêt
Les auteurs ne déclarent pas de conflit d'intérêt.

Résumé :
La brûlure radiologique est le plus souvent accidentelle, quelquefois iatrogénique, mais pourrait aussi résulter d'actes terroristes. Ces lésions sont profondes, de gravité variable et parfois difficiles à prédire, avec une évolution possiblement dramatique nécessitant une amputation ou menant au décès du patient. Le traitement combiné chirurgie reconstructrice et thérapie cellulaire développé par le Service de santé des armées (SSA) a été une avancée majeure dans le traitement de cette affection. Il est cependant très lourd et coûteux, car la production des cellules stromales mésenchymateuses autologues utilisées dans cette indication est soumise à une réglementation complexe. Il est actuellement impossible de faire face à un afflux important de patients ou de délivrer un traitement loin des unités de thérapie cellulaire. Une nouvelle approche thérapeutique est à l'étude, elle vise non plus à administrer des cellules mais ce qu'elles sécrètent, vésicules extracellulaires et facteur solubles. Ces produits sont plus stables et pourraient être disponibles sur étagère. Dans cet article nous décrivons ces nouveaux produits, leur intérêt et tous les enjeux scientifiques techniques ou réglementaires qui émergent pour leur développement.

Mots-clés : Brûlure radiologique. Cellules stromales mésenchymateuses. Vésicules extracellulaires. Médecine d'armée.

Abstract:
EXTRACELLULAR VESICLES IN THE TREATMENT OF RADIATION BURNS
Radiation burns are most often accidental, sometimes iatrogenic, but could also result from terrorist acts. These severe

injuries are sometimes difficult to predict, with a potentially dramatic evolution requiring amputation or leading to the death of the patient. The combined treatment of reconstructive surgery and cell therapy developed by the French Military Health Service -Service de Santé des Armées – SSA –has been a major step forward in the management of this condition. However, the treatment is very difficult and expensive because the production of autologous mesenchymal stromal cells used in this indication is subject to complex regulation. It is currently impossible to cope with a large influx of patients or to deliver treatment far from the cell therapy units. A new therapeutic approach is being studied, which does not aim to administer the cells themselves, but what they secrete: extracellular vesicles and soluble factors. These products are more stable and could be available off the shelf. In this article we describe these new products, their potential and all the scientific, technical and regulatory issues that are emerging for their development.

Keywords: Radiation burn. Mesenchymal stromal cells. Extracellular vesicles. Military medicine.

1 La brûlure radiologique et les traitements actuels

1.1 La brûlure radiologique

Les accidents d'irradiation aiguë à forte dose décrits ces dernières années résultaient de la manipulation de sources radioactives perdues (Chili-2005, Sénégal-2006, Équateur-2009, Pérou-2014, par exemple) ou de surdosage lors de radiothérapies (comme en Pologne-2001 ou en France-2006-2007) (1). Le risque d'un acte terroriste avec une source dissimulée dans une zone très fréquentée est également considéré depuis plusieurs années. Enfin, l'imagerie interventionnelle guidée par fluoroscopie (rayon X) s'est considérablement développée et a augmenté le risque de dermatite mais aussi de graves brûlures radio-induites chez des patients recevant des doses trop importantes (2).

La réponse cutanée aux rayonnements ionisants dépend de la dose et du volume de tissu irradié ainsi que de la radiosensibilité du patient. Les brûlures cutanées par irradiation sont caractérisées par :

- un tableau clinique dépendant de la dose absorbée ;
- une douleur paroxystique et chronique résistante aux opiacés ;
- la survenue de vagues inflammatoires successives pouvant survenir dans les semaines, mois, voire années après irradiation, provoquant des reprises de nécrose et rendant difficile la délimitation des tissus lésés et non lésés (3).

Les caractéristiques de ce type de brûlure sont liées aux rayonnements. L'ionisation des tissus vivants provoque de façon directe ou indirecte, par production de radicaux libres, des lésions irréversibles de l'ADN nucléaire et mitochondrial qui peuvent inhiber

Published in : SERVICE DE SANTÉ DES ARMÉES, - (dir.), *Médecine et Armées Vol.50 No.2. Menace nucleaire et radiologique*, Editions des archives contemporaines, ISBN : 9782813005427, doi : 10.17184/eac.9782813005427

l'activité mitotique des kératinocytes basaux, mélanocytes ou des cellules souches du follicule pileux (4). Les radicaux libres induisent également une production excessive d'espèces réactives de l'oxygène et de cytokines/chimiokines pro-inflammatoires, conduisant à une activation continue des kératinocytes, cellules endothéliales et fibroblastes (5,6). Les effets des rayonnements peuvent être divisés en effets aigus (jours à semaines) et différés (mois à années) avec des phases de latence intermédiaires.
La réponse la plus précoce est un érythème et un œdème transitoire, provoqués par une dilatation capillaire. Pour des doses entre 12 et 15 Gy, la phase d'érythème peut être suivie d'une épidermite sèche, caractérisée par un prurit, une desquamation et une augmentation de la pigmentation de la couche basale. Dans les deux mois, l'exsudat inflammatoire et l'œdème diminuent, laissant une zone de pigmentation brune.
Pour de plus fortes doses (entre 15 et 20 Gy), il y a desquamation humide causée par la déplétion des cellules souches épidermiques. L'évolution peut être favorable en quelques semaines sans dommage structurel secondaire du derme, par la prolifération des cellules survivantes dans la région irradiée ou par la migration des cellules épidermiques des tissus sains adjacents. L'épiderme peut rester mince, sec et hypopigmenté, avec des télangiectasies. Les follicules pileux et les glandes sébacées sont généralement absents. Une grande partie du collagène et du tissu adipeux sous-cutané sont remplacés par des fibroblastes atypiques et du tissu fibreux dense pouvant provoquer une induration de la peau et limiter les mouvements. Lorsque les doses sont très élevées (supérieures à 25-30 Gy), les lésions à desquamation humide évoluent avec destruction complète de l'épiderme liée aux dommages des kératinocytes basaux, mais également des cellules souches du follicule pileux, une rupture de la jonction dermo-épidermique et une destruction de la micro-vascularisation du derme puis une occlusion progressive des plus gros vaisseaux. Une seconde phase, plus tardive, liée à l'altération du réseau vasculaire des tissus profonds, induit une nécrose ischémique du muscle et une ulcération pouvant entraîner une fibrose et ultérieurement une ostéoradionécrose (5).

Les stratégies thérapeutiques sont de différents types selon le niveau de gravité de la brûlure. Pour de faibles niveaux d'atteintes de stade I ou II sur l'échelle METREPOL, il est possible d'administrer localement ou d'appliquer des pansements/crèmes/gels pour protéger des risques d'infection, limiter l'inflammation, diminuer l'érythème, les démangeaisons, la douleur, exercer un effet anti-oxydant ou de favoriser la revascularisation et la réparation cutanée. D'autres approches thérapeutiques ont été envisagées pour limiter les dermatites par oxygénothérapie hyperbare ou photothérapie. Enfin, des traitements systémiques à visée anti-inflammatoire ou anti-oxydante peuvent être administrés pour améliorer la réparation cutanée *via* l'activation de la prolifération cellulaire, en favorisant la microcirculation ou, plus tardivement, en limitant la fibrose (4).

Cependant, les traitements médicaux des lésions sévères (stade III ou IV METREPOL) étant peu, voire pas efficaces, la reconstruction chirurgicale reste le traitement conventionnel. Elle associe une exérèse des tissus lésés guidée par la dosimétrie à de la chirurgie reconstructrice par greffe de peau ou de lambeaux musculo-cutanés.

Chaque geste opératoire favorise des récidives inflammatoires et aggrave les processus ischémiques et fibrosants. Ainsi, dans de nombreux cas, la chirurgie ne permet pas d'empêcher une extension imprévisible et incontrôlée du processus nécrotique, pouvant conduire à l'amputation, voire au décès du patient (3). La prise en charge clinique des

Published in : SERVICE DE SANTÉ DES ARMÉES, - (dir.), *Médecine et Armées Vol.50 No.2. Menace nucleaire et radiologique*, Editions des archives contemporaines, ISBN : 9782813005427, doi : 10.17184/eac.9782813005427

brûlures radiologiques est lourde et son évolution peut s'avérer dramatique. Il est donc nécessaire de développer des contre-mesures médicales. Une nouvelle stratégie thérapeutique associant chirurgie plastique et administration de produits de thérapie cellulaire a été développée afin d'améliorer la prise de greffe et limiter l'extension de la radionécrose tissulaire.

1.2 La thérapie cellulaire par cellules stromales mésenchymateuses pour la brûlure radiologique

Les Cellules stromales mésenchymateuses (CSM) suscitent un véritable engouement dans le domaine de la thérapie cellulaire, car elles favorisent la réparation des tissus lésés. Ces cellules d'allure fibroblastique, présentes dans un grand nombre de tissus adultes, peuvent être isolées et amplifiées *in vitro*. Elles sont caractérisées par : leur capacité d'adhésion au plastique ; l'expression d'une combinaison de marqueurs spécifiques à leur surface et leur potentiel de différenciation en ostéoblastes, chondroblastes et adipocytes. Elles exercent leur activité biologique *via* des contacts cellulaires (interactions récepteurs ligands), des jonctions cellulaires permettant le transfert de mitochondries, mais aussi la sécrétion de molécules bioactives solubles comme des cytokines, des facteurs de croissance, des protéines et des microARN pouvant être encapsulés au sein de Vésicules extracellulaires (VE). Leurs propriétés immunomodulatrices, anti-apoptotiques, pro-angiogéniques, antifibrotiques, et chimio-attractives en font un outil de choix pour la réparation cutanée. De plus, leur forte sensibilité à l'environnement permet d'optimiser leur potentiel thérapeutique en modifiant leurs conditions de culture (avec des cytokines, facteurs de croissance, hypoxie, stress mécanique, culture en 3D, etc.) (7). L'IL-1β est décrit dans la physiopathologie des lésions traumatiques. L'utilisation de l'IL-1β en tant que pré-conditionnement, permet d'améliorer les propriétés d'immunomodulation des CSM *in vitro* et *in vivo* dans un modèle de brûlure thermique (8).

Des études précliniques sur différents modèles d'irradiation cutanée et musculo-cutanée chez la souris, le rat et le cochon ont permis d'évaluer l'efficacité thérapeutique des CSM administrées par voie locale ou systémique, avec des effets majeurs pro-angiogéniques, anti-inflammatoires et anti-fibrosants. En effet, dans un modèle murin, les CSM favorisent la cicatrisation du site irradié (9). Dans ce type de modèle, le traitement permet de diminuer l'expression de cytokines inflammatoires. De plus, les CSM orientent le phénotype des macrophages présents sur le site de la lésion vers un profil pro-cicatrisant en favorisant la production d'IL-10 dépendante de la voie de signalisation du TFNR2 (10). Des études chez la souris et le cochon ont montré un effet bénéfique de l'administration des CSM sur la prise de greffe, la reperfusion cutanée, la restauration du réseau vasculaire et une augmentation de l'expression de VEGF (*Vascular endothelial growth factor*) sur le site irradié (11,12). Le traitement par CSM permet de limiter la fibrose tissulaire en restaurant la balance de collagène de types I et III et en favorisant le remodelage tissulaire (11). Enfin, ces études ont permis de montrer l'absence de toxicité des CSM, de caractériser leur biodistribution après injection en intraveineux et de définir les voies d'injection et les doses optimales.

Grâce à ces données précliniques et à la collaboration de diverses équipes du SSA et de l'IRSN (Institut de radioprotection et de sûreté nucléaire), dès 2006, des patients ont pu bénéficier à titre compassionnel d'un traitement utilisant des CSM de moelle

Published in : SERVICE DE SANTÉ DES ARMÉES, - (dir.), *Médecine et Armées Vol.50 No.2. Menace nucleaire et radiologique*, Editions des archives contemporaines, ISBN : 9782813005427, doi : 10.17184/eac.9782813005427

osseuse autologue, en adjuvant de la chirurgie d'exérèse puis greffe de peau et/ou de lambeau musculaire, guidée par la reconstruction physique de la dose délivrée localement. Le Centre de transfusion sanguine des armées (CTSA) a pu obtenir en 2015 une autorisation de l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM) pour ce traitement en tant que Médicaments de thérapie innovante préparés ponctuellement (MTI-PP). L'indication porte sur le syndrome d'irradiation aiguë localisée grave de stade III ou IV sur l'échelle METREPOL, ne cicatrisant pas spontanément, avec une dose reçue supérieure à 25 Gy. Au total, une dizaine de patients ont bénéficié à ce jour de cette prise en charge avec des administrations uniques ou répétées de CSM en fonction de l'étendue de la zone lésée et de l'évolution de la lésion. Suite aux injections, des résultats cliniques très satisfaisants ont été observés avec une bonne prise de greffe et une cicatrisation complète des zones lésées, une diminution très significative des douleurs dans les 48 heures suivant l'injection des CSM, une normalisation de la CRP ainsi qu'une récupération fonctionnelle du membre lésé (5). Il semble que l'administration de CSM soit insuffisante pour le traitement des extrémités où l'os est atteint, comme en témoigne le développement à distance d'ostéo-radionécroses et d'amputation des phalanges chez des patients irradiés aux mains. Par contre, il a été constaté avec un recul de plus d'une quinzaine d'années, une absence de récidive des tissus mous traités par CSM.

Ces résultats cliniques sont très encourageants, ils permettent le plus souvent à ces patients d'éviter l'amputation et de retrouver un usage fonctionnel. Ce qui aurait été impossible avec une prise en charge conventionnelle. Ainsi, ce traitement nécessitant une coopération hautement pluridisciplinaire associant l'Agence internationale de l'énergie atomique (AIEA), des radiobiologistes (de l'IRSN et du SPRA), des équipes de chirurgie (HIA Percy) et d'une unité de production de produits de thérapie cellulaire (CTSA), fait référence dans le monde pour la prise en charge de ces brûlures radiologiques localisées (1).

1.3 Contraintes de la thérapie cellulaire

Les CSM relèvent d'une classe réglementaire appelée « médicaments de thérapie innovante » (MTI) (*advanced therapy medicinal products* en anglais) qui recouvre les médicaments de thérapie cellulaire somatique (comme les CSM), de thérapie génique, ou d'ingénierie tissulaire, parfois combinés à des dispositifs médicaux. Le traitement par CSM n'est pas un « produit de thérapie cellulaire » (comme la greffe de moelle), car les cellules sont amplifiées en masse lors de la production du lot clinique (ce qui constitue une « modification substantielle ») et qu'une fois injectées, il est attendu qu'elles exercent un rôle biologique (ou « fonction essentielle ») qui est différent de celui qu'elles jouent physiologiquement au sein des tissus. Les MTI ont bien le statut de médicaments et font l'objet d'une réglementation européenne avec dépôt de demandes d'autorisation de mise sur le marché à l'agence européenne du médicament (EMA).

Cependant, la réglementation européenne prévoit la possibilité de produire des MTI sous statut *hospital exemption* pour des utilisations non-routinières, dans des indications pour lesquelles il n'y a aucun MTI possédant d'Autorisation de mise sur le marché (AMM). En pratique, il s'agit d'indications pour des pathologies rares, graves et/ou en échec thérapeutique. Dans ce cas, les autorisations sont délivrées non pas

Published in : SERVICE DE SANTÉ DES ARMÉES, - (dir.), *Médecine et Armées Vol.50 No.2. Menace nucleaire et radiologique*, Editions des archives contemporaines, ISBN : 9782813005427, doi : 10.17184/eac.9782813005427

par l'EMA, mais par les agences réglementaires des pays membres et ne sont valables que dans un pays donné. C'est donc l'ANSM en France qui délivre ces autorisations MTI « préparé ponctuellement » (MTI-PP). Un MTI-PP est spécialement fabriqué pour un patient, sur prescription, pour une utilisation dans un hôpital français. C'est sous ce statut MTI-PP que le CTSA produit des lots cliniques de CSM pour le traitement des brûlures radiologiques, en adjuvant de la chirurgie. Le chirurgien est le prescripteur. Si le cadre réglementaire est différent des MTI à AMM européenne, les exigences, en termes notamment de qualité et de sécurité, sont les mêmes pour la fabrication des produits.

Les MTI sont produits dans des conditions pharmaco-techniques très strictes, avec du personnel qualifié, dans des infrastructures dédiées avec notamment des zones à atmosphère contrôlé de niveau élevé. Ces infrastructures lourdes et coûteuses sont disponibles dans peu d'hôpitaux, ce qui limite la capacité de produire et donc d'utiliser ces médicaments. La fabrication d'un premier lot de CSM à partir d'un prélèvement de moelle nécessite deux semaines incompressibles. Une autre contrainte importante est la stabilité réduite des lots cliniques de CSM : les cellules voient leur activité biologique décroître rapidement et doivent être utilisées dans les heures suivant la libération du lot. Aussi, les patients doivent être admis dans l'hôpital où sont fabriqués les lots ou dans un rayon proche. Ce qui pose problème pour des étrangers habitant parfois à plusieurs milliers de kilomètres et qui doivent être traités obligatoirement en France. Certains patients n'ont pas été traités faute de solution financière pour assurer leur voyage et la prise en charge hospitalière. Enfin, il est interdit de manipuler des cellules de deux ou plus de patients au même moment dans une salle de production. Ainsi, il n'est possible de produire des CSM que pour un nombre très limité de patients simultanément.

Si la thérapie cellulaire par CSM autologue des lésions radiologiques est incontestablement une avancée thérapeutique majeure qui a permis d'améliorer la prise en charge des irradiés, les capacités thérapeutiques restent limitées en nombre de patients traitables dans un temps restreint.

2 L'évolution vers une biothérapie non-cellulaire

2.1 Alléger les contraintes avec des traitements acellulaires

Face à ces contraintes, un nouvel axe de recherche a émergé, s'appuyant sur l'utilisation des produits de sécrétion des CSM (ou sécrétome) qui sont obtenus à partir du milieu de culture des cellules. En effet, l'activité des CSM est en large partie attribuée à la sécrétion de molécules bioactives libres et de Vésicules extracellulaires (VE) (13). Contrairement aux cellules, les produits de secrétion sont plus faciles à stocker, à transporter et à utiliser. Leur nature acellulaire leur confère davantage de stabilité et permet une logistique simplifiée. Ainsi, les produits de sécrétion peuvent être préparés en amont et délivrés à la demande. Ce « produit sur étagère » permettrait de traiter de nombreux patients atteints de brûlures radiologiques, y compris lors d'un afflux saturant de blessés. Ce sécrétome a ainsi émergé comme une alternative thérapeutique face aux contraintes de production et d'utilisation des CSM.

Published in : SERVICE DE SANTÉ DES ARMÉES, - (dir.), *Médecine et Armées Vol.50 No.2. Menace nucleaire et radiologique*, Editions des archives contemporaines, ISBN : 9782813005427, doi : 10.17184/eac.9782813005427

2.2 Les produits de sécrétion : facteurs solubles et vésicules extracellulaires

Le sécrétome des CSM contient des facteurs de croissance, chimiokines, cytokines, mais également lipides ou petits ARN (acide ribonucléique) qui lui confèrent des capacités immunomodulatrices (*via* l'IL-8, IL-10, IDO, PGE2, miR-146a…) ; pro-angiogéniques (*via* VEGF, MCP-1, HGF, bFGF, etc.) ; de support trophique ou anti-apoptotique (*via* IGF, SCF, SDF-1, M-CSF, TGF-β) qui collectivement favorisent la réparation cutanée (figure 1).

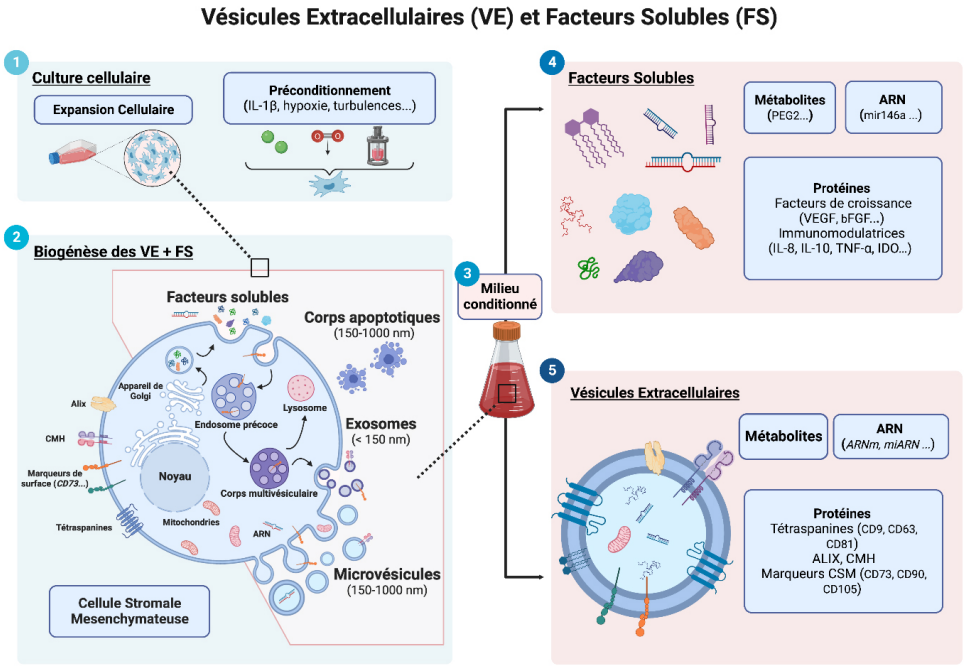


FIG. 1 : Vésicules extracellulaire (VE) et Facteurs solubles (FS)
(1) La phase d'expansion cellulaire permet d'obtenir un nombre satisfaisant de Cellules stromales mésenchymateuses (CSM) qui sont ensuite pré-conditionnées.
(2) Pendant la phase de sécrétion, les CSM libèrent des produits de sécrétion ou sécrétome dans le milieu de culture, constitué de Facteurs solubles (FS) et de différents types de Vésicules extracellulaires (VE) : exosomes provenant du système endosomal, microvésicules formées par bourgeonnement membranaire, ou corps apoptotiques. Les caractéristiques de la CSM (marqueurs phénotypiques, expression génique, etc.) et de son pré-conditionnement préalable, influencent directement celles des VE et des FS.
(3) Le « milieu conditionné », composé du sécrétome dilué dans le milieu de culture des CSM, est récolté à l'issue de la phase de sécrétion.
Ce milieu est composé notamment de : (4) FS (métabolites, acides nucléiques, protéines) et de : (5) VE encapsulant des protéines, ARN, lipides et portant à leur membrane des tétraspanines, des marqueurs du CMH ou des CSM.
©Unité de Thérapie Cellulaire et Tissulaire / IRBA / *Created with BioRender.com*

Les VE sont définies comme toute particule sécrétée par une cellule, possédant une bicouche lipidique et dépourvue de capacité de réplication. Leur taille varie de 40 à 1 000 nm (en moyenne 100 nm). Les VE jouent un rôle dans l'épuration de déchets cellulaires, la communication intercellulaire et l'homéostasie. Elles contiennent un large panel de molécules « cargo » : protéines, lipides, métabolites, acides nucléiques.

Elles exercent une activité fonctionnelle sur les cellules cibles *via* le transport de ces molécules, mais également d'organites comme des mitochondries. De plus, elles expriment différentes molécules sur leur membrane (enzymes, tétraspanines, molécules du Complexe majeur d'histocompatibilité [CMH], Cluster de différenciation [CD], etc.) impliquées dans l'adressage cellulaire ou la fusion membranaire.
La composition protéique membranaire est également liée au type cellulaire les ayant produites. Ainsi, des marqueurs typiques de CSM (CD73, CD90 et CD105) sont identifiés sur leurs VE (14). Il est admis que les marqueurs de surface les plus représentés sont les tétraspanines CD9, CD63, CD81 et ALIX (figure 1). Des molécules solubles peuvent également se lier autour des VE de manière non covalente en formant une couronne qui peut elle-même participer aux effets biologiques des VE (15).

Les VE peuvent être plus précisément décrites, d'une part, *via* leurs propriétés physicochimiques (taille, densité…) ou biochimiques (composition lipidique, marqueur membranaire…) (16) et, d'autre part, *via* leur mécanisme de biogénèse. Le terme de VE recouvre notamment ceux d'exosomes et de microvésicules. L'exosome est une vésicule de petit diamètre (< 150 nm), provenant du système endosomal. La microvésicule est de taille intermédiaire (50-1 000 nm) et se forme par bourgeonnement membranaire, secondairement libérée dans le milieu extracellulaire. Elle est également nommée ectosome ou microparticule. La biogénèse des VE est imparfaitement décrite. Néanmoins, elle varie avec l'état physiologique de la cellule (stress immunologique, maintenance, différenciation) (figure 1). Il est ainsi possible de moduler l'environnement cellulaire à travers un pré-conditionnement (voir chapitre 1.2) entraînant une modification de l'état physiologique de la cellule et les caractéristiques de VE produites. Contrairement aux liposomes et à d'autres supports de nanoparticules de médicaments synthétiques, les VE possèdent des protéines membranaires qui améliorent l'endocytose, favorisant ainsi la délivrance de leur contenu interne.

Dans un modèle de cicatrisation *in vivo*, des VE ou des facteurs solubles purifiés permettent une cicatrisation de plaie similaire. Cependant, l'utilisation de VE stimule plus l'angiogenèse (15). La part de chacune des fractions du sécrétome dans la l'homéostasie cutanée et la cicatrisation reste encore à élucider. Les techniques de préparation de VE ou de facteurs solubles ne permettent pas d'obtenir des fractions totalement pures. Les produits préparés sont plus ou moins enrichis en VE et facteurs solubles, selon les techniques (chapitre 3.1). Dans les paragraphes suivants, il sera donc question de sécrétome de CSM humaines comprenant VE et Facteurs solubles noté VE+FS.

2.3 Intérêt des produits de sécrétion de CSM dans des modèles pré-cliniques

Des études précliniques ont mis en évidence l'effet bénéfique des VE de différents types cellulaires dans des pathologies cardiaques, rénales, hépatiques, métaboliques, mais également pour la cicatrisation cutanée. La cicatrisation est un processus complexe se déroulant en trois phases : hémostase/inflammation, prolifération avec une forte activité angiogénique et remodelage du tissu cutané. Des travaux font état de la capacité des VE à contrôler l'inflammation, à réguler la prolifération des kératinocytes et fibroblastes ainsi que l'angiogenèse. Ces VE peuvent également participer au remodelage et à la réorganisation de la matrice extracellulaire cutanée et sa réinnervation (17).

Published in : SERVICE DE SANTÉ DES ARMÉES, - (dir.), *Médecine et Armées Vol.50 No.2. Menace nucleaire et radiologique*, Editions des archives contemporaines, ISBN : 9782813005427, doi : 10.17184/eac.9782813005427

Des résultats précliniques ainsi que des données obtenues par le SSA et l'IRSN montrent un effet de l'administration de VE dans des tests de migration *in vitro* et en préclinique sur le score lésionnel et la fermeture de plaies post-irradiation (18).

L'angiogenèse est un processus de la phase de prolifération nécessaire à la restauration du réseau vasculaire. Le sécrétome des CSM peut favoriser l'angiogenèse par l'apport de facteurs de croissance comme VEGF, EGF, bFGF et de peptides tels que l'angiotensine 1 et 2 après irradiation cutanée (18). Dans un modèle d'irradiation du membre postérieur chez la souris, l'injection intramusculaire de VE de CSM humaines permet d'augmenter la production de facteurs proangiogéniques et le recrutement de progéniteurs endothéliaux, améliorant ainsi la néovascularisation et la réparation de tissus irradiés (19).

3 Les défis du développement des thérapies par vésicules extracellulaires

3.1 Développement de procédés de production/isolement de grade clinique

Les données précliniques sont capitales, car elles permettent de déterminer les critères d'efficacité, de sécurité et les mécanismes d'action du sécrétome. Outre les doses, délais et voies d'administration (discutés dans le chapitre 3.2) qui influent sur l'efficacité du produit, les modalités de production des VE+FS ont un impact majeur sur la qualité et la fonctionnalité du produit fini. Ainsi, différents choix doivent être réalisés précocement dans le développement du produit, en fonction de l'application thérapeutique ciblée. Ils concernent : la source tissulaire de CSM, la compatibilité immunologique, le pré-conditionnement, la méthode de purification/concentration et les modalités de conservation (figure 2). Dans le contexte de recherche translationnelle, les procédés de production du produit doivent être compatibles avec les Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF). S'imposer cette contrainte très tôt permet de gagner du temps pour amener le produit thérapeutique plus rapidement au lit du patient.

Le choix de la source de ces CSM est donc un premier enjeu. Les critères de jugement pour déterminer la « meilleure source » dépendent de la pathologie ciblée, du mécanisme d'action, mais aussi de considérations techniques comme la quantité de cellules disponibles, la difficulté d'accès et les caractéristiques de l'individu donneur. Les trois sources principales de CSM, utilisées lors d'essais cliniques, sont actuellement : la moelle osseuse, le tissu adipeux et les tissus périnataux (cordon ombilical et membranes amniotiques). Pour chacune de ces sources la composition des VE+FS produits diffère. Ainsi, une source sera plus ou moins adaptée à une indication donnée. Il n'existe pas d'étude de comparaison de sources dans le cas de la brûlure radiologique et donc aucun consensus sur la meilleure source de CSM (figure 2).
Enfin, pour améliorer la reproductibilité inter-lot il est envisagé d'utiliser des CSM immortalisées permettant d'obtenir une source stable et abondante de VE+FS.
Il reste cependant à bien maîtriser et sécuriser les méthodes d'immortalisation pour une utilisation clinique (20).

Published in : SERVICE DE SANTÉ DES ARMÉES, - (dir.), *Médecine et Armées Vol.50 No.2. Menace nucleaire et radiologique*, Editions des archives contemporaines, ISBN : 9782813005427, doi : 10.17184/eac.9782813005427

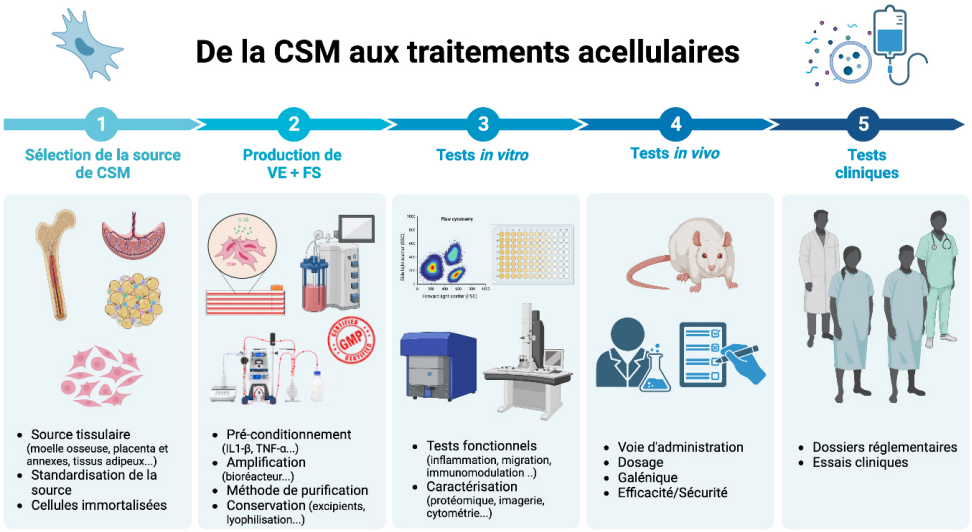


Fig. 2 : De la Cellule stromale mésenchymateuse (CSM) aux traitements acellulaires

©Unité de Thérapie Cellulaire et Tissulaire / IRBA / *Created with BioRender.com*

Les étapes de production déterminent la qualité du produit acellulaire final, d'un point de vue fonctionnel mais aussi réglementaire. Elles doivent être compatibles avec les BPF.

Détail des phases :

(1) sélection de la source de CSM ;

(2) production de Vésicules Extracellulaires (VE) et Facteurs solubles (FS) ;

(3) caractérisation du produit et évaluation *in vitro* de sa fonctionnalité ;

(4) évaluation des moyens d'administration, de l'efficacité et de la sécurité du produit dans des modèles non-cliniques ;

(5) et, enfin, élaboration des dossiers réglementaires et premiers tests cliniques.
Chacune de ces phases est pensée en amont et en articulation avec les autres, afin d'anticiper d'éventuels verrous : d'approvisionnement (source de CSM, matériels), technologiques (production, conservation, purification), ou encore réglementaires (exigences de production et de contrôle).

Pour la plupart des productions de VE+FS utilisées dans des études pré-cliniques ou essais cliniques, les cellules sont placées dans un milieu dépourvu d'additifs (sérum ou lysat plaquettaire) pendant la phase de sécrétion car ces derniers sont riches en VE qui ne peuvent pas être séparées des VE de CSM dans le produit final. Certains types cellulaires ne peuvent pas survivre dans ces conditions et ceux qui le peuvent ont une mortalité qui augmente, limitant la quantité de VE récoltée. Une alternative a été développée dans notre laboratoire, consistant à dépléter le sérum ou lysat plaquettaire en VE afin de les utiliser dans les phases de sécrétion, de maintenir l'apport en facteurs de croissance et donc d'augmenter le nombre de cellules sécrétrices et la richesse en VE+FS (21).

Published in : SERVICE DE SANTÉ DES ARMÉES, - (dir.), *Médecine et Armées Vol.50 No.2. Menace nucleaire et radiologique*, Editions des archives contemporaines, ISBN : 9782813005427, doi : 10.17184/eac.9782813005427

La majorité des productions de VE+FS sont réalisées avec des systèmes de culture de CSM en 2D (flasques de culture). Cependant, la culture en 2D est très limitée en nombre de cellules cultivées et donc en VE produites. L'utilisation de bioréacteurs peut permettre de réaliser des cultures de CSM dans de grands volumes (> 50L) et donc des productions de VE+FS en masse. De plus, les productions réalisées en bioréacteurs permettraient de réduire les manipulations en zone à atmosphère contrôlée très coûteuses en temps opérateur et en matériel (figure 2).

Différentes techniques existent pour concentrer et/ou purifier le produit tel que l'ultracentrifugation, la précipitation au polyéthylène glycol, la filtration, les chromatographies par échange d'anions, affinité ou encore par exclusion de taille. Ces techniques sont parfois très chronophages, limitées dans les volumes qui peuvent être traités ou incompatibles avec une production de grade clinique (22). Dans notre laboratoire nous avons développé un enrichissement par Filtration à flux tangentiel (TFF), qui contrairement à la filtration classique, permet de limiter le colmatage du filtre et la baisse du débit de filtration (figure 2). Cette technique, compatible avec les BPF est déjà employée dans l'industrie pour la production de vaccin par exemple. Le milieu de culture passe dans un filtre à fibres creuses, dont le diamètre des pores peut être choisi. Les produits solubles inférieurs à la taille des pores sont éliminés. Ainsi, des pores de 500 KDa permettent d'isoler très majoritairement les VE et des pores de 10 KDa permettent d'isoler à la fois VE et FS.

Une autre question soulevée par ce type de produit est son mode de conservation.
Du fait de leur nature et de leur composition, les VE peuvent subir des modifications de taille, de morphologie, de contenu et de fonction lors de leur stockage.
La formation de cristaux de glace et les variations de pH, lors d'un stockage prolongé à basse température et de cycle de congélation/décongélation, peuvent être responsables d'altérations mécaniques avec une perte d'intégrité de la membrane, une fuite de contenu et la perte de molécules de surface. Pour l'heure, les VE sont stables pendant six mois à -80° C (23). Il faudrait cependant optimiser leur mode de conservation, afin d'allonger les temps de stockage du produit ou de le faire à des températures moins contraignantes pour la logistique. Les VE seraient ainsi disponibles vers des lieux difficiles d'accès ou éloignés des structures hospitalières et directement utilisables dans les situations d'urgence. L'ajout d'agent cryoprotecteur comme le tréhalose, possiblement en association avec de l'albumine permettent d'améliorer la conservation (23). Le tréhalose est un sucre disaccharide non réducteur cryoprotecteur qui ne pénètre pas les VE et peut former des liaisons hydrogènes avec l'eau. Il limite les dégradations causées par les cristaux de glace et stabilise les phospholipides et les protéines.
La cryoconservation avec ajout de tréhalose lors de la production est actuellement étudiée par nos équipes afin de conserver ces VE+FS à différentes températures (- 80° C, -20° C, +4° C) (24). Ce composant est déjà approuvé comme excipient par la FDA et l'EMA (figure 2).

Dans une démarche d'obtention d'un produit final compatible avec les contraintes opérationnelles, d'autres solutions sont à l'étude. C'est le cas de la lyophilisation, technique permettant de déshydrater un produit, qui permettrait de réduire les problèmes logistiques liés à la chaîne du froid. Cette technique est déjà mise en œuvre au sein du Centre de Transfusion Sanguine des Armées pour la production du plasma lyophilisé et que l'on peut conserver deux ans.

Published in : SERVICE DE SANTÉ DES ARMÉES, - (dir.), *Médecine et Armées Vol.50 No.2. Menace nucleaire et radiologique*,
Editions des archives contemporaines, ISBN : 9782813005427, doi : 10.17184/eac.9782813005427

3.2 Questions de doses d'administration /galénique

Chez l'Homme, quelques études cliniques sont en cours dans des pathologies infectieuses ou inflammatoires, aucune dans la brûlure radiologique. Pour un usage thérapeutique, il faut s'assurer de la sécurité du produit en termes de toxicité, biodistribution et tumorigénicité (figure 2). Les quelques études de toxicité ont montré que l'administration de produits de sécrétion n'induit pas d'événement indésirable majeur, aussi bien dans les études pré-cliniques que cliniques (25,26). Par ailleurs, contrairement aux nanoparticules lipidiques synthétiques, les VE, en raison de leur origine endogène et de leur biocompatibilité élevée, sont plus épargnées par le système immunitaire (27). Les liposomes synthétiques déclenchent généralement l'activation du complément ainsi que leur dégradation et leur clairance. Ces processus sont réduits avec les VE dérivées de cellules présentatrices d'antigène qui expriment les régulateurs du complément liés à la membrane. Cette caractéristique pourrait offrir de réels avantages pour les VE qui sont exposées à des environnements difficiles et inflammatoires.

Il faudra ensuite faire le choix de la voie d'administration, de la dose, et de la galénique pour ce type d'indication.

L'administration peut être envisagée selon les besoins, par voie systémique ou locale. Cependant, l'administration locale est la méthode la plus utilisée dans des modèles précliniques d'irradiation locale (19). Un traitement itératif semble une stratégie prometteuse comme cela a été démontré avec les CSM dans des études précliniques et cliniques d'irradiation locale (3) ou dans un modèle de cicatrisation avec une administration itérative de VE+FS (28).

Il n'existe pas de consensus sur la façon la plus adaptée de quantifier les VE+FS et les doses expérimentales peuvent varier dans les modèles *in vivo* de réparation cutanée. Certaines équipes définissent la dose en quantité de protéines, d'autres en nombre de particules (VE), enfin d'autres raisonnent en nombre de cellules sécrétrices équivalentes pour avoir une approche plus neutre vis-à-vis de ce type de produit et pour tenir compte des limitations techniques des méthodes de quantification des VE.

Des galéniques particulières sont envisagées pour assurer une diffusion lente des produits sur une zone déterminée. Parmi les supports les plus utilisés, on compte les hydrogels. Ce sont des matériaux associant un réseau tridimensionnel de polymères hydrophiles et d'eau. Ils présentent de multiples applications pour la réparation tissulaire.
Ils sont dits chargés ou complexés lorsqu'ils sont associés à une substance active. Dans un modèle préclinique de fistule chez le porc, l'utilisation d'un hydrogel en combinaison à des VE permet une cicatrisation complète de la fistule et une réduction de l'inflammation et de la fibrose (29). Il existe aujourd'hui une très grande variété de supports d'origine naturelle (chitine, soie, etc.) ou synthétique (PEG, etc.), laissant envisager de nombreuses applications (réparations ostéo-articulaire, cutanée, etc.), il reste cependant à bien maîtriser la reproductibilité de charge et de libération de ces VE+FS par les biomatériaux utilisés.

Published in : SERVICE DE SANTÉ DES ARMÉES, - (dir.), *Médecine et Armées Vol.50 No.2. Menace nuclaire et radiologique*, Editions des archives contemporaines, ISBN : 9782813005427, doi : 10.17184/eac.9782813005427

3.3 Aspects réglementaires

Les applications concrètes au profit du malade sont directement liées aux données pré-cliniques, aux axes d'innovation, mais aussi à la classification réglementaire de ces sécrétomes enrichis.

La classification réglementaire d'un produit est très importante, car il en découle des exigences plus ou moins contraignantes pour la fabrication, les infrastructures de production et les établissements autorisés à produire. Pour les applications envisagées ici, les VE+FS sont bien des médicaments, définis comme « substance ou combinaison de substances présentées comme traitant ou prévenant l'apparition de maladie humaine, ou bien qui peuvent être administrées à l'Homme pour réaliser un diagnostic, restaurer, corriger, ou modifier une fonction physiologique ». La substance active étant issue d'une source biologique, en l'occurrence de cellules vivantes, elles appartiennent à la classe des médicaments biologiques (30). Les VE contiennent de nombreuses protéines, glucides, lipides, acides nucléiques, et il apparaît illusoire d'affirmer que leur activité thérapeutique est liée à une molécule en particulier. Les effets attendus sur l'inflammation, la prolifération cellulaire ou l'angiogenèse reposent bien sur un ensemble de molécules présentes, et comme pour la thérapie cellulaire, leur mécanisme d'action est difficile à décrire de manière exhaustive. Bien qu'issues de cellules déjà utilisées en clinique en tant que MTI, les VE de CSM ne sont pas des MTI, il n'en serait pas de même pour des VE de cellules modifiées pour surexprimer des ARN (ARNm ou miARN) dans les VE et dont le mode d'action principal reposerait sur ces ARN. Dans ce cas, le *Comittee for advanced therapy* de l'EMA a recommandé la classification en produit de thérapie génique, donc MTI.

Quel que soit le statut du produit final, le procédé de fabrication doit être reproductible, conforme aux BPF et associé à des contrôles qualité au cours et la fin du processus de fabrication. Les produits doivent également avoir été validés fonctionnellement. Le travail des autorités de santé est actuellement en cours pour réglementer au plus juste cette nouvelle classe de produits biologiques médicaux.

Conclusion

Le sécrétome enrichi en VE et FS suscite depuis quelques années un intérêt majeur dans la communauté scientifique. La transposition de la recherche vers la clinique nécessite un énorme travail consistant à démontrer la qualité, la sécurité et l'efficacité de ces nouveaux produits thérapeutiques, comme l'exige tout médicament.
Pour engager cette démarche, l'ISEV (*International Society for Extracellular Vesicles*) ainsi que de l'ISCT (*International Society For Cellular Therapy*) ont constitué un réseau de ressources d'experts pour les organismes de réglementation.
En complément de ces initiatives, en 2020, nous avons constitué un nouveau groupe de travail « Extracellular Vesicle translatiOn to clinicaL perspectiVEs – EVOLVE France » sur les questions réglementaires et l'utilisation clinique des produits thérapeutiques à base de VE. Grâce à des expertises scientifiques, techniques et médicales complémentaires, un document a été rédigé (30), fournissant des recommandations spécifiques aux VE concernant la fabrication, le contrôle qualité, l'analyse, le développement non clinique et les essais cliniques, conformément à la législation européenne en vigueur. Le contenu principal du dossier du médicament expérimental,

Published in : SERVICE DE SANTÉ DES ARMÉES, - (dir.), *Médecine et Armées Vol.50 No.2. Menace nucleaire et radiologique*, Editions des archives contemporaines, ISBN : 9782813005427, doi : 10.17184/eac.9782813005427

les demandes d'autorisation de mise sur le marché et les informations essentielles sur les lignes directrices sont décrites pour la transition de la recherche au développement clinique et à l'autorisation finale de mise sur le marché.

Grace à ces avancées, nous espérons à terme développer des médicaments biologiques et des modalités de stockage innovants pour pouvoir apporter des solutions thérapeutiques applicables à des patients atteints de brûlure radiologique, y compris en cas d'afflux important et sur des sites possiblement éloignés des unités de production de thérapie cellulaire.

Remerciements

Nous tenons à remercier l'infrastructure de recherche nationale de thérapie cellulaire ECELLFrance grâce à laquelle nous développons nos capacités de production de grade clinique et d'enrichir notre activité de recherche translationnelle. Nous souhaitons remercier l'ANR, la DGA et l'AID pour leur soutien financier de projets et de plusieurs bourses de thèses. Nous remercions nos partenaires de l'IRSN pour notre collaboration dans le cadre du projet ANR EXOCET. Nous souhaitons également remercier les équipes du SPRA pour nos échanges et l'équipe de chirurgie plastique de l'Hôpital d'instruction des armées Percy avec laquelle nous collaborons depuis de nombreuses années.

Remerciements à la linguiste relectrice : France Lepez.

Financements

Notre travail bénéficie de financements BIOMEDEF (SAN-1-0218, SAN-1-0225 & SAN-1-2320), AID ANR ASTRID EXOCET (ANR-16-ASTR-0024).

Contributions des auteurs

Conception du plan de l'article : SB, MT et JP. Rédaction : M deT, GV, SB, MT et JP. Relecture et correction : SB, MT et JP.

Références bibliographiques

1. Medical management of radiation injuries. Vienna : International Atomic Energy Agency ; 2020.
2. Archer BR. Radiation management and credentialing of fluoroscopy users. Pediatr Radiol. 2006 ;36 (Suppl 2) :182-4.
3. Bey E, Prat M, Duhamel P, Benderitter M, Brachet M, Trompier F, *et al.* Emerging therapy for improving wound repair of severe radiation burns using local bone marrow-derived stem cell administrations. Wound Repair and Regeneration. 2010 ;18(1) :50-8.
4. Ojha H, Choudhary V, Sharma D, Nair A, Sharma N, Pathak M, *et al.* Medical management of ionizing radiation-induced skin injury. Radiation Protection and Environment. 2022 ;45(1) :2.
5. Lataillade J, 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. Regenerative Medicine. 2007 ;2(5) :785-94.
6. Kim JH, Jenrow KA, Brown SL. Mechanisms of radiation-induced normal tissue toxicity and implications for future clinical trials. Radiat Oncol J. 2014 ;32(3) :103-15.
7. Noronha N de C, Mizukami A, Caliári-Oliveira C, Cominal JG, Rocha JLM, Covas DT, *et al.* Priming approaches to improve the efficacy of mesenchymal stromal cell-based therapies. Stem Cell Res Ther. 2019 ;10(1) :1-21.

Published in : SERVICE DE SANTÉ DES ARMÉES, - (dir.), *Médecine et Armées Vol.50 No.2. Menace nucleaire et radiologique*, Editions des archives contemporaines, ISBN : 9782813005427, doi : 10.17184/eac.9782813005427

8. Magne B, Dedier M, Nivet M, Coulomb B, Banzet S, Lataillade JJ, *et al.* IL-1 -Primed Mesenchymal Stromal Cells Improve Epidermal Substitute Engraftment and Wound Healing *via* Matrix Metalloproteinases and Transforming Growth Factor-β1. J Invest Dermatol. 2020 ;140(3) :688-98.e21.
9. François S, Mouiseddine M, Mathieu N, Semont A, Monti P, Dudoignon N, *et al.* Human mesenchymal stem cells favour healing of the cutaneous radiation syndrome in a xenogenic transplant model. Ann Hematol. 2007 ;86(1) :1-8.
10. Horton JA, Hudak KE, Chung EJ, White AO, Scroggins BT, Burkeen JF, *et al.* Mesenchymal stem cells inhibit cutaneous radiation-induced fibrosis by suppressing chronic inflammation. Stem Cells. 2013 ;31(10) :2231-41.
11. Linard C, Brachet M, Strup-Perrot C, L'homme B, Busson E, Squiban C, *et al.* Autologous Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Improve the Quality and Stability of Vascularized Flap Surgery of Irradiated Skin in Pigs. Stem Cells Transl Med. 2018 ;7(8) :569-82.
12. Forcheron F, Agay D, Scherthan H, Riccobono D, Herodin F, Meineke V, *et al.* Autologous adipocyte derived stem cells favour healing in a minipig model of cutaneous radiation syndrome. PLoS One. 2012 ;7(2) :e31694.
13. Phinney DG, Pittenger MF. Concise Review : MSC-Derived Exosomes for Cell-Free Therapy. Stem Cells. 2017 ;35(4) :851-8.
14. Peltzer J, Lund K, Goriot ME, Grosbot M, Lataillade JJ, Mauduit P, *et al.* Interferon- and Hypoxia Priming Have Limited Effect on the miRNA Landscape of Human Mesenchymal Stromal Cells-Derived Extracellular Vesicles. Front Cell Dev Biol. 2020 ;8 :581436.
15. Wolf M, Poupardin RW, Ebner-Peking P, Andrade AC, Blöchl C, Obermayer A, *et al.* A functional corona around extracellular vesicles enhances angiogenesis, skin regeneration and immunomodulation. Journal of Extracellular Vesicles. 2022 ;11(4) :e12207.
16. Théry C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, *et al.* Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018) : a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. Journal of Extracellular Vesicles. 2018 ;7(1) :1535750.
17. Hu P, Yang Q, Wang Q, Shi C, Wang D, Armato U, *et al.* Mesenchymal stromal cells-exosomes : a promising cell-free therapeutic tool for wound healing and cutaneous regeneration. Burns Trauma. 2019 ;7 :38.
18. Rong X, Li J, Yang Y, Shi L, Jiang T. Human fetal skin-derived stem cell secretome enhances radiation-induced skin injury therapeutic effects by promoting angiogenesis. Stem Cell Res Ther. 2019 ;10(1) :1-11.
19. Loinard C, Ribault A, Lhomme B, Benderitter M, Flamant S, Paul S, *et al.* HuMSC-EV induce monocyte/macrophage mobilization to orchestrate neovascularization in wound healing process following radiation injury. Cell Death Discov. 2023 ;9(1) :1-13.
20. Balducci L, Blasi A, Saldarelli M, Soleti A, Pessina A, Bonomi A, *et al.* Immortalization of human adipose-derived stromal cells : production of cell lines with high growth rate, mesenchymal marker expression and capability to secrete high levels of angiogenic factors. Stem Cell Res Ther. 2014 ;5(3) :1-15.
21. Lorenzini B, Peltzer J, Goulinet S, Rival B, Lataillade JJ, Uzan G, *et al.* Producing vesicle-free cell culture additive for human cells extracellular vesicles manufacturing. Journal of Controlled Release. 2023 ;355 :501-14.
22. Staubach S, Bauer FN, Tertel T, Börger V, Stambouli O, Salzig D, *et al.* Scaled preparation of extracellular vesicles from conditioned media. Advanced Drug Delivery Reviews. 2021 ;177 :113940.
23. Görgens A, Corso G, Hagey DW, Jawad Wiklander R, Gustafsson MO, Felldin U, *et al.* Identification of storage conditions stabilizing extracellular vesicles preparations. Journal of Extracellular Vesicles. 2022 ;11(6) :e12238.
24. Bosch S, de Beaurepaire L, Allard M, Mosser M, Heichette C, Chrétien D, *et al.* Trehalose prevents aggregation of exosomes and cryodamage. Sci Rep. 2016 ;6(1) :36162.
25. Driedonks T, Jiang L, Carlson B, Han Z, Liu G, Queen SE, *et al.* Pharmacokinetics and biodistribution of extracellular vesicles administered intravenously and intranasally to Macaca nemestrina. J Extracell Biol. 2022 ;1(10) :e59.
26. Wiklander OPB, Brennan MÁ, Lötvall J, Breakefield XO, Andaloussi SE. Advances in therapeutic applications of extracellular vesicles. Sci Transl Med. 2019 ;11(492) :eaav8521.
27. Meng W, He C, Hao Y, Wang L, Li L, Zhu G. Prospects and challenges of extracellular vesicle-based drug delivery system : considering cell source. Drug Delivery. 2020 ;27(1) :585-98.
28. Zhou Y, Zhao B, Zhang XL, Lu Y jun, Lu ST, Cheng J, *et al.* Combined topical and systemic administration with human adipose-derived mesenchymal stem cells (hADSC) and hADSC-derived exosomes markedly promoted cutaneous wound healing and regeneration. Stem Cell Res Ther. 2021 ;12(1) :1-12.

Published in : SERVICE DE SANTÉ DES ARMÉES, - (dir.), *Médecine et Armées Vol.50 No.2. Menace nucleaire et radiologique*, Editions des archives contemporaines, ISBN : 9782813005427, doi : 10.17184/eac.9782813005427

29. Silva AKA, Perretta S, Perrod G, Pidial L, Lindner V, Carn F, *et al.* Thermoresponsive Gel Embedded with Adipose Stem-Cell-Derived Extracellular Vesicles Promotes Esophageal Fistula Healing in a Thermo-Actuated Delivery Strategy. ACS Nano. 2018 ;12(10) :9800-14.

30. Silva AKA, Morille M, Piffoux M, Arumugam S, Mauduit P, Larghero J, *et al.* Development of extracellular vesicle-based medicinal products : A position paper of the group "Extracellular Vesicle translation to clinicaL perspectives – EVOLVE France." Advanced Drug Delivery Reviews. 2021 ;179 :114001.

Published in : SERVICE DE SANTÉ DES ARMÉES, - (dir.), *Médecine et Armées Vol.50 No.2. Menace nuclaire et radiologique*, Editions des archives contemporaines, ISBN : 9782813005427, doi : 10.17184/eac.9782813005427