

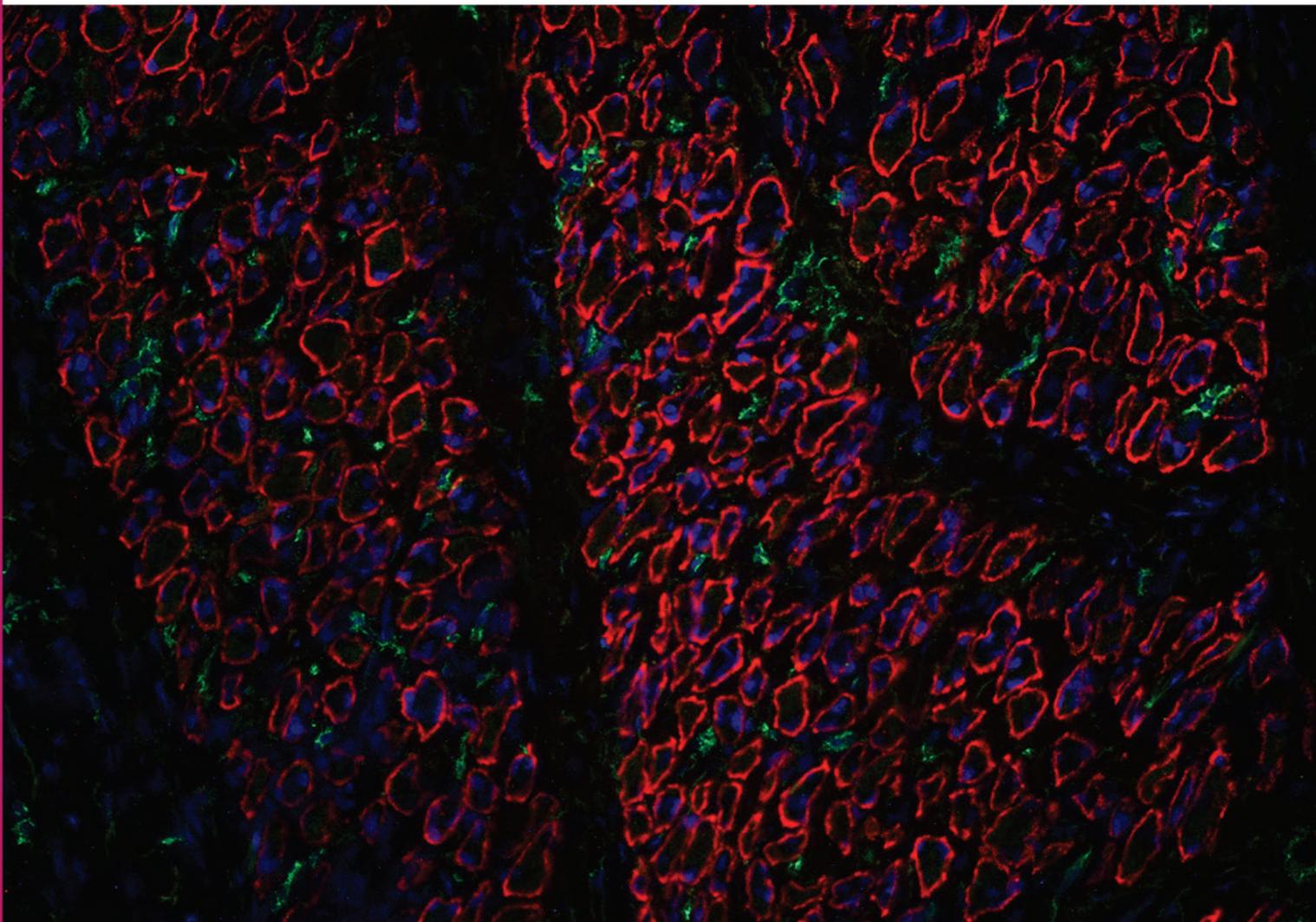
**IRSN**

INSTITUT  
DE RADIOPROTECTION  
ET DE SÛRETÉ NUCLÉAIRE

*Faire avancer la sûreté nucléaire*

# Traitement des brûlures radiologiques localisées par thérapie cellulaire

## Bilan des recherches et perspectives



# L'IRSN,

établissement public à caractère industriel et commercial (EPIC)

*– dont les missions sont désormais définies par la Loi n° 2015-992 du 17 août 2015 relative à la transition énergétique pour la croissance verte (TECV)*

*- est l'expert public national des risques nucléaires et radiologiques. L'IRSN concourt aux politiques publiques en matière de sûreté nucléaire et de protection de la santé et de l'environnement au regard des rayonnements ionisants. Organisme de recherche et d'expertise, il agit en concertation avec tous les acteurs concernés par ces politiques, tout en veillant à son indépendance de jugement.*

*L'IRSN est placé sous la tutelle conjointe des ministres chargés de l'Ecologie, de la Recherche, de l'Energie, de la Santé et de la Défense.*

L'Institut compte environ

## 1 800 collaborateurs

parmi lesquels de nombreux ingénieurs, médecins, agronomes, vétérinaires, techniciens, experts et chercheurs.

Pour mener à bien ses missions, l'IRSN dispose d'un

## budget d'environ 280 M€.

# Traitement des brûlures radiologiques localisées par thérapie cellulaire : bilan des recherches et perspectives

## Table des Matières

<b>RESUME.....</b>	<b>6</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>7</b>
<b>GLOSSAIRE .....</b>	<b>8</b>
<b>1 INTRODUCTION .....</b>	<b>10</b>
<b>2 CONTEXTE CLINIQUE.....</b>	<b>12</b>
2.1 Généralités .....	12
2.2 Cas cliniques.....	12
2.2.1 Cas clinique 1 : Accident de Lilo, Géorgie, 1997.....	13
2.2.2 Cas clinique 2 : Accident de Yanango, Pérou, 1999 .....	13
2.2.3 Cas clinique 3 : Accident de Lia, Géorgie, 2001.....	14
2.3 Principe du traitement conventionnel des brûlures radiologiques .....	15
<b>3 CONTEXTE SCIENTIFIQUE .....</b>	<b>15</b>
3.1 La radiopathologie de la brûlure radiologique .....	16
3.1.1. Radiopathologie du compartiment cutané .....	16
3.1.2 Radiopathologie du compartiment musculaire .....	17
3.2 La thérapie cellulaire .....	19
3.2.1 Les cellules stromales mésenchymateuses (CSM) .....	19
3.2.2 Régénération du tissu cutané sain par les CSM : synthèse de la littérature scientifique.....	20
3.2.3 Régénération du tissu cutané irradié par les CSM : Les premières études précliniques de l'IRSN.....	22
<b>4 OBJECTIF ET STRATEGIE EXPERIMENTALE.....</b>	<b>23</b>
<b>5 BILAN DES RECHERCHES PRECLINIQUES .....</b>	<b>24</b>
5.1 Caractérisation du produit de thérapie cellulaire.....	24
5.2 Résultats précliniques chez le petit animal .....	26
5.3 Résultats précliniques chez le gros animal .....	30
<b>6 RETOUR D'EXPERIENCE CLINIQUE .....</b>	<b>33</b>
6.1 Cas cliniques.....	33

6.1.1	Cas clinique 4 : Accident de Nueva Aldea, Chili, 2005 .....	33
6.1.2	Cas clinique 5 : Accident de Dakar, Sénégal, 2006 .....	36
6.1.3	Cas clinique 6 : Accident d'Orellana, Equateur, 2009.....	37
6.2	Retour d'expérience clinique : émergence d'un traitement innovant .....	39
<b>7</b>	<b>PERSPECTIVES DE RECHERCHE.....</b>	<b>41</b>
7.1	Prise en charge de la brûlure radiologique de type accidentel : une optimisation des traitements existants .....	42
7.1.1	Développement de banques de CSM .....	42
7.1.2	Produits dérivés des CSM : exosomes .....	42
7.2	Extension du champ d'application clinique du traitement par CSM .....	43
7.2.1	Prise en charge des Lésions Radiologiques Combinées (LRC).....	43
7.2.2	Prise en charge de la brûlure radiologique suite aux traitements de radiothérapie ou de radiologie interventionnelle .....	44
7.3	Vers un meilleur ciblage : Des cellules souches spécialisées pour de nouvelles cibles tissulaires.....	45
7.3.1	Cellules souches spécifiques pour de nouvelles cibles tissulaires particulières .....	45
7.3.2	Exploitation d'autres types de cellules souches.....	45
7.3.3	Développement d'approches par co-traitement et de potentialisation .....	46
<b>8</b>	<b>CONCLUSIONS .....</b>	<b>46</b>
8.1	Avancées scientifiques .....	46
8.2	Avancées médicales .....	47
8.3	Partage et diffusion du savoir-faire français dans la prise en charge médicale des brûlures radiologiques.....	48
	<b>LISTE DES REFERENCES.....</b>	<b>50</b>

## Table des illustrations

### Figures

Figure 1 : Distribution des secteurs impliqués dans les cas rapportés d'individus surexposés par région, 1980-2013 (1)

Figure 2 : Exemple d'accident d'irradiation localisée pris en charge en France par l'IRSN à l'HIA Percy : l'accident de Lilo (Géorgie) en 1997. La victime de cet accident a développé un syndrome cutané

Figure 3 : Exemple d'accident d'irradiation localisée pris en charge en France par l'IRSN à l'HIA Percy : l'accident de Yanango (Pérou) en 1999. La victime de cet accident a développé un syndrome cutané.

Figure 4 : Exemple d'accident d'irradiation localisée pris en charge en France par l'IRSN à l'HIA Percy : l'accident de Lia (Géorgie) en 2001. La victime de cet accident a développé un syndrome cutané.

Figure 5 : Histologie de la brûlure radiologique: photos représentatives des lésions cutanées (A-D: épidermolyse, inflammation, destruction du réseau microvasculaire, perte de la jonction dermo-épidermique: x20) et des lésions musculaires (E-H: rhabdomyolyse, inflammation, destruction du réseau microvasculaire: x60). Différents accidents d'irradiation sont présentés (B et F : accident de Géorgie-2001 ; C et G : accident du Chili-2006 et D et H : accident du Sénégal-2007) en comparaison d'un cas témoin (A et E).

Figure 6 : Représentation schématique du processus normal de cicatrisation cutanée. a.: phase inflammatoire, b : phase granulation et c : phase de remodelage matriciel [d'après (7)]

Figure 7 : Etude anatomopathologique du muscle irradié (accident de Dakar, Sénégal, 2007). (A) Marquage à l'hématoxylline et éosine révélant la structure tissulaire et au rouge Sirius révélant les territoires fibrotiques sur des sections musculaires de donneurs sains (control) et du patient. (B) Quantification du diamètre et de l'aire des fibres musculaires ( $P < 0.005$  control vs patient). (C-D) Immuno-marquage des cellules endothéliales (CD31), des cellules inflammatoires infiltrées (CD68) et des cellules musculaires (dystrophine, laminin) sur sections musculaires de donneurs sains (control) et du patient, mettant en évidence les dommages vasculaires et l'inflammation radio-induits.

Figure 8 : Les CSM favorisent la cicatrisation cutanée en agissant sur différents acteurs cellulaires clé du processus de cicatrisation (d'après référence (14)).

Figure 9 : Schéma de développement de contremesures médicales (CMM) pour la prise en charge des personnes irradiées. « Technical Readiness Level »: TRL (niveau de maturité technologique), « Proof of Concept » : POC (preuve de concept), « Investigational New Drugs » : IND (médicament de thérapie innovante). L'IRSN est pleinement positionné sur les actions de recherche amont (TRL 1-3) et de recherche préclinique (TRL 4-5). Afin d'assurer le transfert clinique de ses recherches, l'IRSN en association avec différents partenaires hospitaliers (HIA Percy, CHU Saint Antoine) ou la Pharmacie Centrale des Armées participe aux études cliniques (TRL 6-7) en tant qu'Institut associé.

Figure 10 : Production de CSM de grade clinique par l'unité de thérapie cellulaire du CTSA (ECELLFRANCE)

Figure 11 : Positionnement de l'animal lors de l'irradiation. La fenêtre lumineuse matérialise le faisceau d'irradiation

Figure 12 : (A) Phénotype extracellulaire des CSM porcines injectées (passage 1). (B-C) Capacité de différenciation des cellules vers la voie (B) ostéoblastique (coloration phosphatase alcaline (haut) et rouge alizarine (bas)), et (C) adipocytaire (coloration Oil Red O).

Figure 13 : Evolution de la lésion à long terme (1 an après traitement). Groupe irradié : série i ; groupe irradié + chirurgie : série ii ; groupe irradié + chirurgie + CSM : série iii. L'évolution d'un animal représentatif pour chaque série est représentée sur ce schéma. Chaque série inclut 4 animaux.

Figure 14 : Accident de Nueva Aldea, Chili, 2005. Lésions déclarées par le patient dans les jours suivant son exposition à une source d'Iridium

Figure 15 : Reconstruction dosimétrique par méthodes numériques. Cette reconstruction tient compte des caractéristiques anatomiques du patient. Elle a permis de guider l'excision chirurgicale des tissus irradiés (>25 Gy). La dose absorbée au contact de la peau au centre de la lésion est très élevée (2000 Gy) mais décroît très rapidement en surface et en profondeur en fonction du carré de la distance et de l'atténuation des tissus. Sur la base de cette reconstruction dosimétrique, une excision large des tissus à l'aspect sain a été pratiquée rapidement (jour 21 post-irradiation). (A) CT Scan du patient; (B) voxelisation du fantôme; (C) cartographie de la dose et (D) première excision chirurgicale (jour 21 post-irradiation sur un rayon de 5 cm (limite des tissus ayant reçu une dose > 25 Gy).

Figure 16 : Evolution de la lésion après injection des CSM.

Figure 17 : Lésion du muscle grand glutéal et son évolution après traitement par chirurgie guidée par la dosimétrie combinée à l'injection locale de CSM. (A) 15 mars 2006, deuxième excision, autogreffe d'épiderme et injection locale de CSM (168 million de MSC); (B) 109 jours post-irradiation; (C) 162 jours post-irradiation; (D) 204 jours post-irradiation

Figure 18 : Aspect de la lésion après traitement par chirurgie plastique combinée à la thérapie cellulaire par injection locale de CSM (accident de Dakar, Sénégal, 2006).

Figure 19 : Accident d'Orellana, Equateur, 2009). Lésions déclarées par le patient dans les jours suivant son exposition à une source d'Iridium

Figure 20 : Reconstruction dosimétrique par méthodes numériques (accident d'Orellana, Equateur, 2009). Cette reconstruction tient compte des caractéristiques anatomiques du patient. Elle a permis de guider l'excision chirurgicale des tissus irradiés (>25 Gy). La dose absorbée au contact de la peau au centre de la lésion est très élevée (1700 Gy) mais décroît très rapidement en surface et en profondeur en fonction du carré de la distance et de l'atténuation des tissus. Sur la base de cette reconstruction dosimétrique, une excision large des tissus à l'aspect sain a été pratiquée rapidement. (A) CT Scan du patient; (B) voxelisation du fantôme; (C) cartographie de la dose et (D) première excision chirurgicale (limite des tissus ayant reçue une dose > 25 Gy).

Figure 21 : Aspect de la lésion après traitement par chirurgie plastique combinée à la thérapie cellulaire par injection locale de CSM.

Figure 22 : Evolution de la lésion du patient de l'accident de Chilca, Pérou, 2012. (a, b) : Les lésions au niveau des mains se sont révélées d'emblée très évolutives et extrêmement algiques, imposant une décision thérapeutique urgente. (c) Compte tenu de l'impossibilité de réaliser une exérèse des tissus nécrosés au niveau de la main, il a été décidé d'avoir recours à la thérapie cellulaire par injection de CSM autologues combinée à une greffe autologue d'épiderme. Il a été procédé à une désarticulation de la phalange distale de l'index (main droite) compte tenu de la dose reçue (73 Gy à l'os et 32 Gy à l'ongle par estimation par RPE) (f). (d, e, g) Le suivi du patient à 60 mois a révélé le développement progressif d'ostéo-radionécrose des phalanges irradiées à très fortes doses (f).

Figure 23 : Etat d'avancement du plan de développement en 2017.

Figure 24 : Modèle de réponse intégrée de l'organisme aux lésions radiologiques combinées. Encadrées en jaune les réponses ou compartiments impactées conjointement par les stress radiologiques et thermiques [d'après (53)]

Figure 25 : Boucle d'activation de l'AIEA en situation d'accident radiologique.

Figure 26 : Accidents radiologiques répertoriés par l'AIEA en Amérique du Sud.

Figure 27 : Diffusion du savoir-faire français dans la prise en charge médicale des brûlures radiologiques sous l'égide de l'AIEA : exemple de l'accident de Callao, Pérou, 2014.

## Tableaux

Tableau 1 : Etude par micro-tomographie tridimensionnelle de biopsie osseuse (accident de Chilca, Pérou, 2012). BV/TV : Bone volume/tissue volume, « bone volume » exprimé en pourcentage de « tissue volume ». IRR : Irradiation. Cette étude montre une augmentation du volume osseux trabéculaire après irradiation par rapport à l'os sain.

Tableau 2 : Bilan partiel des patients ayant développé des brûlures radiologiques sévères et traités par chirurgie guidée par la dosimétrie combinée à une thérapie cellulaire par injection locale de CSM (mise à jour 2012).

## Résumé

Le traitement chirurgical associé à la greffe de peau a été longtemps considéré comme le traitement de référence des brûlures radiologiques. Le retour d'expérience clinique montre que cette prise en charge est complexe et nécessite pour les cas les plus sévères des actes chirurgicaux répétés et donc des temps d'hospitalisation long et un coût significatif. Les recherches menées par l'Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN) en partenariat avec le Service de Santé des Armées (SSA) ont pour objectif la mise en place d'un traitement innovant alliant une chirurgie guidée par la dosimétrie et une thérapie cellulaire, dans l'objectif d'assurer de meilleurs résultats cliniques dans la prise en charge des brûlures.

Une validation de cette approche innovante de traitement des brûlures radiologiques par injection de cellules stromales mésenchymateuses (CSM) autologues a été obtenue sur un modèle de petit animal (rongeur) et sur un modèle de gros animal («mini-pig»). Le protocole optimal fait appel à des injections localisées et répétées (4 à 6 injections) de CSM autologues. Les modes d'action des CSM issues de la moelle osseuse reposent sur la sécrétion de facteurs modulateurs de l'inflammation, ceux des CSM issues du tissu adipeux sur la capacité de ces cellules à se différencier en cellules endothéliales et à sécréter des facteurs pro-angiogéniques nécessaires à la cicatrisation des tissus irradiés.

La proximité des équipes de recherche (IRSN), de production des CSM (Centre de Transfusion des Armées, CTSA) et de chirurgiens (Hôpital d'Instruction des Armées, HIA-Percy) a facilité le transfert clinique de cette recherche et l'optimisation des protocoles cliniques. Depuis 2006, 9 patients ont pu bénéficier de ce nouveau traitement sous l'égide de l'AIEA. Ce traitement fait à ce jour l'objet d'une autorisation de l'ANSM en tant que Médicament de Thérapie Innovante produit ponctuellement (MTI-PP). Dans le respect du code de déontologie médicale, un partage des connaissances médicales au bénéfice du patient et pour les progrès des soins de santé a été entrepris ces dernières années, notamment avec les pays d'Amérique latine et d'Amérique du Sud. Cette action menée sous l'égide de l'AIEA contribue à la diffusion de l'excellence médicale et scientifique française dans ce domaine spécifique.

Fort de cette réussite, de nouvelles perspectives ont été identifiées sur les bases du retour d'expérience clinique. Elles ciblent (i) le développement de banques de CSM et de leurs produits dérivés, (ii) l'investigation de nouveaux champs d'application et en particulier la prise en charge médicale des lésions cutanées combinées et des séquelles des radiothérapies et actes de radiologie interventionnelle.

## Abstract

Surgery associated with skin graft has long been considered as the standard treatment for radiation burns. The feedback of the clinical experience shows that the protocol is complex and requires for the most severe cases multiple surgeries and a long hospitalization time. This research program aims to evaluate stem cell therapy as a complementary treatment to surgery, in order to ensure a better clinical outcome in the treatment of burns.

The validation of this innovative approach of radiation burn management by local injection of autologous mesenchymal stem cells (MSCs) was obtained on a small animal model (rodent) and a large animal model («mini-pig»). Two sources of MSCs isolated from bone marrow and adipose tissue were successfully tested. The optimal protocol is based on repeated local injections (4-6 injections) of autologous MSCs. The biological mechanisms of bone marrow MSCs are essentially related to secretion of factors modulating inflammation; those of adipose MSCs are related to both the ability of these cells to differentiate into endothelial cells and to secrete pro-angiogenic factors.

The proximity of the different groups (IRSN, CTSA and HIA-Percy) makes possible the direct clinical transfer of this innovative treatment. Since 2006, 9 patients were successfully treated by combined surgery and MSC injection. This treatment has been recently granted MTI-PP (occasionally produced innovative therapy medication) by the French Medical Safety Agency (ANSM). In the last few years, in accordance with medical ethics, sharing this medical knowledge for patient benefit and for health progress was undertaken with several countries from South America. This action, conducted under the aegis of IAEA, contributes to the diffusion of French medical and scientific excellence in this specific field.

Building on these successes, new perspectives have been identified based on clinical experience feedback. They aim to (i) the development of biobanks of MSCs and their derivatives, and (ii), the investigation of new application fields, especially in the management of combined cutaneous lesions and the deleterious consequences of radiotherapy and interventional procedures.

## Glossaire

<b>AIEA :</b>	Agence Internationale de l'Energie Atomique
<b>AMM :</b>	Autorisation de Mise sur le Marché
<b>ANR-ASTRID :</b>	Agence Nationale de Recherche - Accompagnement Spécifique des Travaux de Recherches et d'Innovation Défense
<b>ANSM :</b>	Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des Produits de Santé
<b>ASN :</b>	Autorité de Sûreté Nucléaire
<b>CMM :</b>	Contre Mesure Médicale
<b>CICERON :</b>	Etude de l'effet des cellules iPS sur la Cicatrisation CutanéE des brûlures Radiologiques : ConstitutiON d'une banque de CSM (projet DGA)
<b>CSM :</b>	Cellules Stromales Mésoenchymateuses
<b>CTSA :</b>	Centre de Transfusion Sanguine des Armées
<b>DARPA :</b>	Defense Advanced research Projects Agency
<b>DGA :</b>	Direction Générale de l'Armement
<b>EBMT :</b>	European Bone Marrow Transplantation
<b>EFS :</b>	Etablissement Français du Sang
<b>EMA :</b>	European Medicines Agency
<b>EXOCET :</b>	EXosomes des CELLules souches pour le Traitement des brûlures radiologiques (projet ANR)
<b>GTR :</b>	Groupe Thématique de Recherche
<b>GVHD :</b>	Graft Versus Host Disease
<b>Gy :</b>	Gray
<b>HIA-Percy :</b>	Hôpital d'Instruction des Armées-Percy
<b>INRA :</b>	Institut National de la Recherche Agronomique
<b>iPS :</b>	induced Pluripotent Stem cell
<b>IRSN :</b>	Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire
<b>I-Stem :</b>	Institute for Stem cell Therapy and Exploration of Monogenic diseases
<b>MEC :</b>	Matrice Extracellulaire

<b>METREPOL :</b>	Medical Management of Radiation Accidents
<b>MTI-PP :</b>	Médicaments de Thérapie Innovante - Préparé Ponctuellement
<b>NIH :</b>	National Institutes of Health
<b>NRBC :</b>	Nucléaire, Radiologique, Biologique, Chimique
<b>OMS :</b>	Organisation Mondiale de la Santé
<b>PEC :</b>	Cellule endothéliale progénitrice circulante
<b>RANET :</b>	Response and Assistance NETwork (AIEA)
<b>REMPAN :</b>	Radiation Emergency Medical Preparedness and Assistance Network (OMS)
<b>SGDSN :</b>	Secrétariat Général de la Défense et de la Sécurité Nationale
<b>SSA :</b>	Service de Santé des Armées
<b>TRL :</b>	Technology Readiness Level

## 1 INTRODUCTION

Les brûlures radiologiques résultent de différentes situations d'exposition à forte dose de la victime, principalement d'irradiation ou de contamination localisées lors d'accident radiologique ou nucléaire ou lors de pratiques médicales faisant appel aux rayonnements ionisants comme la radiothérapie ou la radiologie interventionnelle. Depuis les années 80, plusieurs centaines d'accidents de surexposition aux rayonnements ont été rapportés dans le monde (Figure 1) (1).

Parmi eux, la fréquence des accidents d'irradiation aiguë localisée a augmenté au cours des 20 dernières années, que ce soit en raison de perte de sources radioactives (Géorgie-1997 et -2001, Pérou-1999, Chili-2005, Sénégal-2006, Tunisie-2008, Equateur-2009, Vénézuéla-2010, Gabon-2010, Pérou-2012 et -2014) ou de surdosage lors de radiothérapie (Pologne-2001, France-2007). L'évolution du contexte géopolitique fait craindre, plus que jamais, la survenue d'un acte de malveillance mettant potentiellement en jeu une menace **NRBC**. Les derniers événements de Fukushima, comme ceux de Tchernobyl ou de Three Miles Island, à leurs époques, ont montré et rappellent que le risque zéro dans l'industrie électronucléaire n'existe pas.

A ce jour, le nombre de personnes atteintes est limité, mais la prise en charge clinique de la brûlure radiologique est particulièrement lourde et son évolution peut s'avérer catastrophique et engager le pronostic vital de la victime. Pour ce type d'accident, la France a acquis une compétence reconnue qui repose sur une prise en charge médicale très spécialisée. Un accord cadre de collaboration entre le Service de Santé des Armées (**SSA**) et l'Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (**IRSN**) définit les conditions de la prise en charge de ces patients irradiés. La compétence de la France pour la prise en charge des victimes d'irradiation s'appuie sur les programmes de recherche développés par l'IRSN. L'IRSN et l'Hôpital d'Instruction des Armées (**HIA**) de Percy (Clamart) font partie du réseau « Response and Assistance Network » (**RANET**) de l'Agence International de l'Energie Atomique (**AIEA**) et ont participé à ce titre à la prise en charge médicale de la quasi-totalité des accidents radiologiques survenus ces dix dernières années. Ils sont également identifiés, pour la France, comme « Collaborating Center » auprès de l'Organisation Mondiale de la Santé (**OMS**) au sein du réseau « Radiation Emergency Medical Preparedness and Assistance Network » (**REMPAN**).

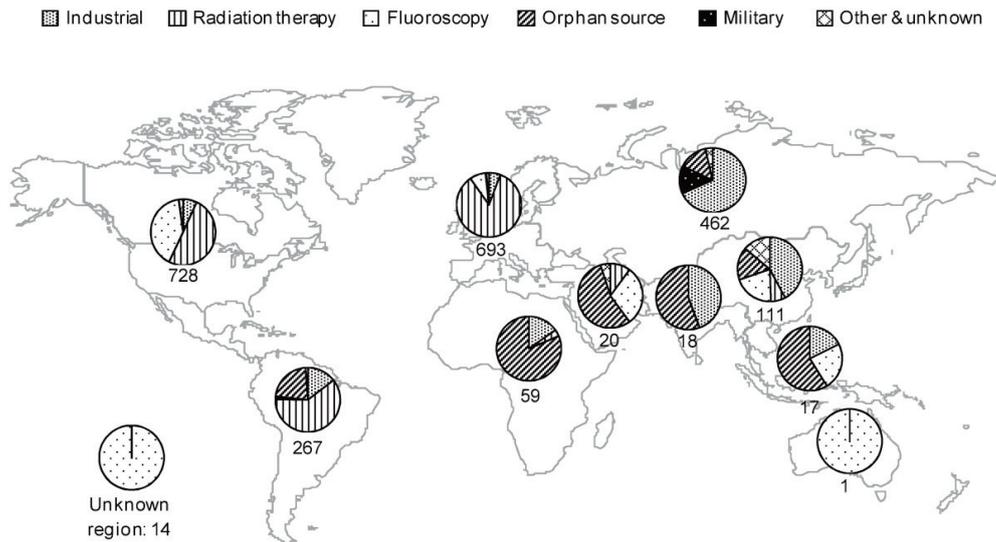


Figure 1 : Distribution des secteurs impliqués dans les cas rapportés d'individus surexposés par région, 1980-2013 (1)

La maîtrise des conséquences médicales ou sanitaires résultant d'accidents radiologiques, nucléaires ou d'actes de malveillance trouve, du fait des événements récents, un regain d'intérêt dans différents pays. Les Etats-Unis (NIH/NIAID) ont lancé depuis 10 ans un programme de développement de contremesures médicales (CMM) en cas d'attaque NRBC. Le Japon, suite à l'accident nucléaire de Fukushima a récemment lancé un consortium « triangulaire » regroupant les Universités de Fukushima, Nagasaki et Hiroshima dont l'un des trois objectifs de recherche est le développement de la prise en charge des victimes d'irradiation et de contamination interne. Enfin la Chine, dans la perspective de l'expansion de son programme électronucléaire, monte en puissance dans le domaine de la recherche pour la radioprotection et dans sa capacité de gestion médicale des accidents radiologiques et nucléaires. Enfin 2006, dans le cadre du Programme EURATOM de fission nucléaire, la Commission européenne a constitué un consortium d'experts (France, Allemagne, Grande-Bretagne et les Pays-Bas) afin de parvenir à un consensus sur la prise en charge médicale des irradiations accidentelles.

Dans ce contexte, une recherche permettant de développer et de renforcer la capacité de réponse biotechnologique face au risque de crise radiologique majeure, notamment en proposant des contremesures médicales efficaces dans le cas d'expositions externes est un enjeu majeur.

## 2 CONTEXTE CLINIQUE

### 2.1 Généralités

La brûlure radiologique localisée est spécifique et directement reliée à la dose absorbée. On distingue :

- La phase initiale, caractérisée par un érythème.
- La phase de latence clinique, pouvant durer plusieurs semaines, sans signe clinique associé en dehors de la persistance d'un œdème. Les signes fonctionnels sont dominés par un prurit et une sensation de douleur.
- La phase d'état, directement liée à la dose initialement reçue. La brûlure est un exemple des effets déterministes des rayonnements ionisants. Pour une dose initiale de 10 Gy, l'apparition d'une desquamation est caractéristique d'une radiodermite sèche. Pour une dose de 15 Gy, l'atteinte de la couche basale met à nu le derme qui laisse suinter du plasma. Cette ulcération est typique d'une radiodermite exsudative. Pour une dose de 25 Gy, à l'atteinte de la couche basale, s'ajoute celle des micro-vaisseaux du tissu cutané et sous-cutané avec ischémie et nécrose cutanée inéluctable. C'est la radionécrose. La lésion radique peut rapidement dépasser le seul plan cutané avec atteinte des tissus sous-jacents (musculaire et osseux). Ce phénomène peut apparaître d'emblée mais peut aussi évoluer par poussées inflammatoires et ischémiques successives, il est imprévisible dans le temps et dans l'espace.

La pathogénie des effets cutanés des rayonnements ionisants est bien décrite mais la réponse médicale face à ce type de pathologie reste une tâche extrêmement complexe et délicate. La gestion médicale des personnes irradiées fait appel à plusieurs actions thérapeutiques possibles; préventive, visant à prévenir l'apparition ou la propagation d'une pathologie ou curative, visant à traiter une pathologie installée.

L'exposition de la peau à des doses supérieures à 25 Gy constitue la situation la plus critique car le tissu cutané peut nécroser par vagues successives. Le retour d'expérience sur le traitement de ces brûlures radiologiques met en évidence d'une part, l'extrême difficulté à établir un pronostic fiable de l'évolution de la lésion et d'autre part les limites de l'arsenal thérapeutique disponible. La seule alternative médicale actuelle consiste en une exérèse des tissus nécrosés suivi d'une greffe de peau. Le retour d'expérience des cliniciens en charge de la gestion médicale de ces patients (HIA Percy) met en avant la nécessité de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

### 2.2 Cas cliniques

Les accidents d'exposition aux rayonnements ionisants sont rares mais spectaculaires par le caractère extensif et délabrant des lésions qu'ils entraînent. Celles-ci sont doses dépendantes et évoluent de l'épidermite sèche (8 Gy) vers l'épidermite exsudative (12 Gy) jusqu'à la nécrose (25 Gy). Elles caractérisent la brûlure radiologique qui évolue par

poussées pouvant entraîner des mutilations majeures mettant en jeu non seulement le pronostic fonctionnel mais aussi le pronostic vital. L'étiologie principale en France est l'iatrogénie médicale mais, dans le monde, les accidents industriels e représentent la cause principale. Ces accidents, bien que rares, témoignent d'une gravité potentielle compte tenu du nombre de sources radioactives de par le monde, de leur contrôle parfois insuffisant et de leur potentielle utilisation à des fins malveillantes.

### 2.2.1 Cas clinique 1 : Accident de Lilo, Géorgie, 1997

Le patient a été accidentellement exposé à une source radioactive d'Iridium-192 (source radioactive pour l'entraînement à la détection) à Lilo, Géorgie (1997) (2). Le patient a été transféré 25 jours après son exposition à l'HIA Percy sous l'égide de l'AIEA (Figure 2). Le patient présentait une nécrose profonde ayant nécessité une nécro-ectomie suivi de 2 autogreffes d'épiderme sur support dermique artificiel (Integra®). Le patient a quitté l'hôpital 58 jours après son admission. Le suivi médical post-opératoire du patient a révélé plusieurs séquences de récives nécrotiques 15 à 20 ans après son exposition initiale.

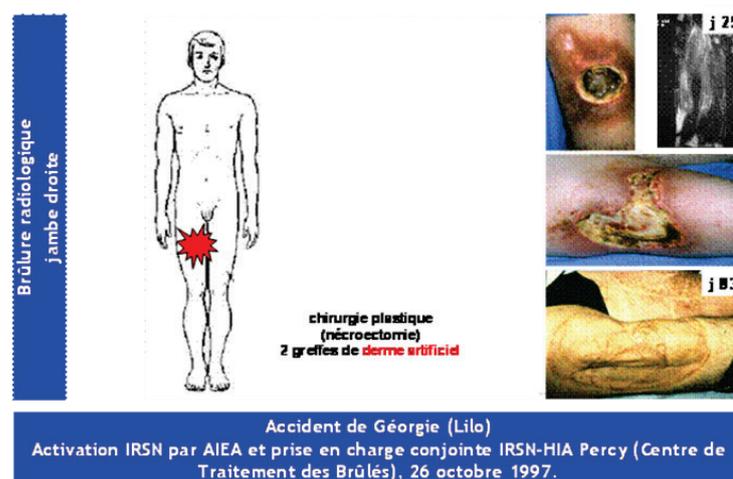


Figure 2 : Exemple d'accident d'irradiation localisée pris en charge en France par l'IRSN à l'HIA Percy : l'accident de Lilo (Géorgie) en 1997. La victime de cet accident a développé un syndrome cutané

### 2.2.2 Cas clinique 2 : Accident de Yanango, Pérou, 1999

Le patient a été accidentellement exposé à une source radioactive d'Iridium-192 (contrôle non destructif par radiographie) à Yanango, Pérou (1999) (3). Le patient a été transféré 101 jours après son exposition à l'HIA-Percy sous l'égide de l'AIEA (Figure 3). Le patient présentait une nécrose purulente profonde dont la seule option thérapeutique envisageable était la désarticulation du membre inférieur. Le patient a quitté l'hôpital 113 jours après son admission. Un suivi médical post-opératoire du patient a été mis en place par les autorités sanitaires locales.

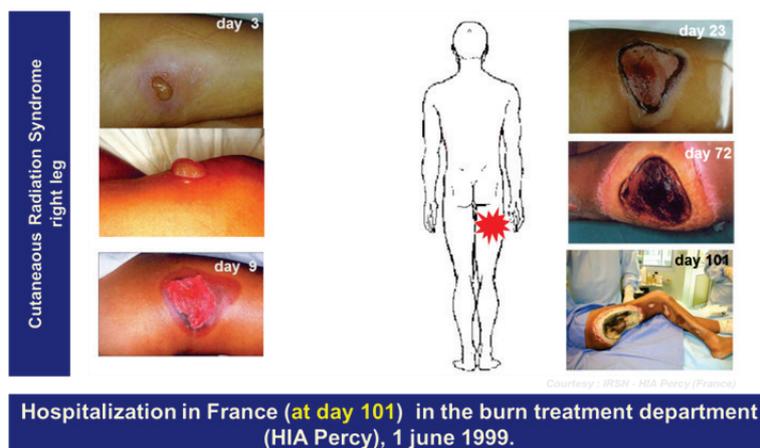


Figure 3 : Exemple d'accident d'irradiation localisée pris en charge en France par l'IRSN à l'HIA Percy : l'accident de Yanango (Pérou) en 1999. La victime de cet accident a développé un syndrome cutané.

### 2.2.3 Cas clinique 3 : Accident de Lia, Géorgie, 2001

Le patient a été accidentellement exposé à une source radioactive de strontium-90 (source radioactive pour générateur thermique) à Lia, Géorgie (2001) (4). Le patient a été transféré 88 jours après son exposition à l'HIA Percy sous l'égide de l'AIEA (Figure 4). Le patient présentait une nécrose sur 20% de surface corporelle ayant nécessité 4 parages successifs suivi de 5 autogreffes d'épiderme sur support dermique artificiel (Integra®). La lésion a pu être in fine stabilisée par une greffe de peau après mobilisation de l'omentum par tunnelisation sous-cutanée jusqu'au site lésionnel. Le patient a quitté l'hôpital 412 jours après son admission. Un suivi médical post-opératoire du patient a été mis en place par les autorités sanitaires locales.

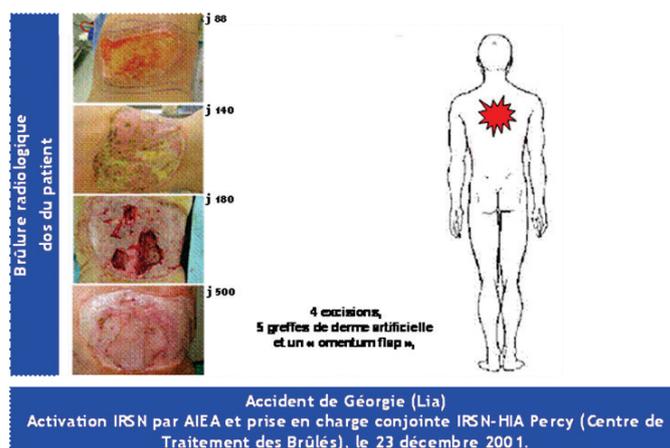


Figure 4 : Exemple d'accident d'irradiation localisée pris en charge en France par l'IRSN à l'HIA Percy : l'accident de Lia (Géorgie) en 2001. La victime de cet accident a développé un syndrome cutané.

### 2.3 Principe du traitement conventionnel des brûlures radiologiques

Le traitement est essentiellement chirurgical avec des résultats incertains et souvent décevants. Très inspirée des techniques issues de la prise en charge des brûlures thermiques, cette approche consiste en une chirurgie conservatrice avec excision limitée pour les lésions radiales superficielles des extrémités, une excision et couverture du lit cicatriciel avec une autogreffe de peau pour les nécroses radiales larges et profondes et une chirurgie plastique (ulcerectomie, necro-ectomie, lambeau par rotation, amputation...) pour les ulcérations et nécroses douloureuses. Le traitement chirurgical sur tissus irradiés est souvent répété et parfois à l'origine d'aggravation de l'état du patient. Cette couverture obéit aux principes de la chirurgie plastique où, de la qualité du sous-sol dépend le type de couverture. En effet, les tissus irradiés constituent un sous-sol insuffisamment vascularisé pour être couvert par une greffe dermo-épidermique, et le plus souvent il faut faire appel à un lambeau vascularisé. L'indication est formelle si le parage conduit à l'exposition des structures nobles (os, articulation, vaisseaux et nerfs). La vitalité des lambeaux locaux ou locorégionaux peut être compromise dans ce contexte d'irradiation nécessitant la réalisation de lambeaux libres avec les contraintes et les difficultés liées aux anastomoses vasculaires en terrain irradié.

Si les techniques modernes de chirurgie plastique offrent de nombreuses possibilités de couverture, l'expérience montre que le temps chirurgical du parage constitue le point critique du traitement. Il existe autour de la zone irradiée une zone de modification tissulaire mal connue et impossible à délimiter précisément. Cette incertitude est une des principales difficultés lors de la réalisation du parage avec un premier temps chirurgical souvent incomplet, compte tenu d'une exérèse insuffisante respectant les tissus voisins d'aspect sain mais cependant irradiés. Cette difficulté nécessite le plus souvent plusieurs reprises chirurgicales. Chaque temps chirurgical relance les phénomènes inflammatoires fibrosants et ischémiques propres à ces lésions par rayonnement. Ces parages répétés, bien que nécessaires, entraînent en fait une extension de la nécrose. Cette aggravation impose parfois l'amputation du membre atteint, le seul moyen de rompre ce cercle vicieux.

La prise en charge de ces patients irradiés par la chirurgie seule apparaît comme un véritable défi difficile à relever.

## 3 CONTEXTE SCIENTIFIQUE

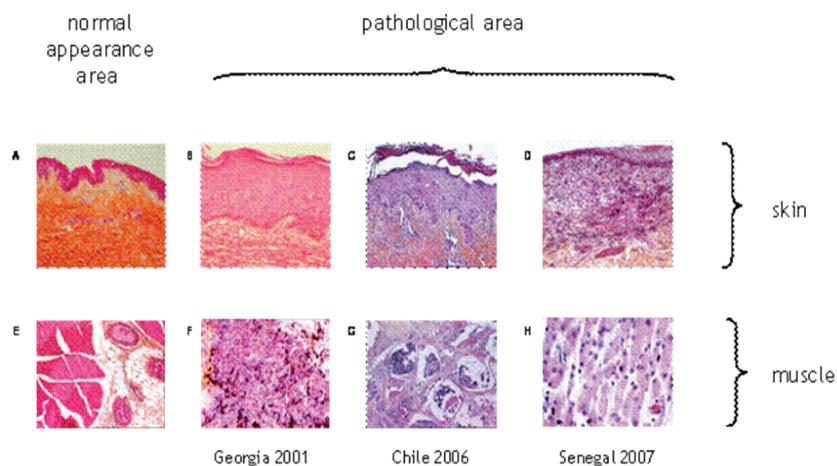
La brûlure radiologique est différente de la brûlure thermique, notamment en ce qui concerne la cinétique des signes cliniques mais également d'un point de vue physiopathologique. La brûlure radiologique sévère se caractérise essentiellement par le développement d'une nécrose tissulaire cutanée, musculaire et osseuse évoluant par poussées successives difficilement prévisibles (5).

### 3.1 La radiopathologie de la brûlure radiologique

#### 3.1.1. Radiopathologie du compartiment cutané

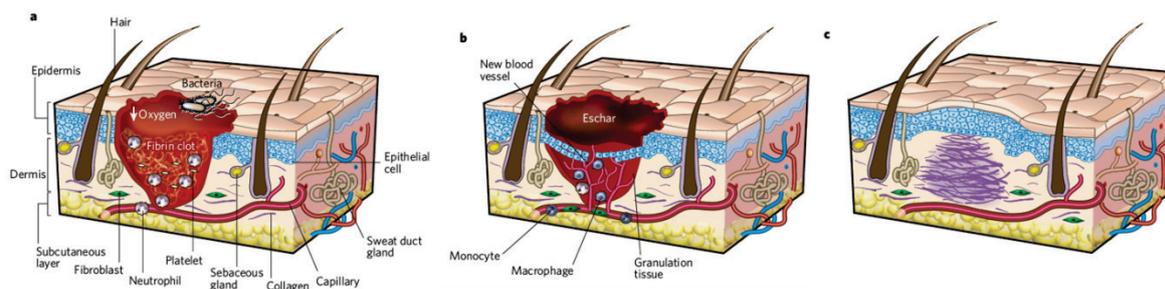
Dans une première phase, les lésions superficielles sont caractérisées par une destruction totale de l'épiderme avec la mort des kératinocytes en interphase, une rupture de la jonction dermo-épidermique, une destruction de la micro-vascularisation du derme papillaire et une occlusion progressive des plus gros vaisseaux (Figure 5 B à D). Les lésions vasculaires sont remarquables par leur polymorphisme, leur caractère focal, l'absence de systématisation et une infiltration inflammatoire péri-vasculaire qui devient rapidement importante.

La deuxième phase plus tardive apparaît après l'altération du réseau vasculaire situé en profondeur du muscle qui débouche sur une nécrose ischémique de la masse musculaire et une ulcération profonde (Figure 5 F à H). Une cicatrisation périphérique pénétrant dans les zones nécrosées peut être observée, elle résulte d'une cascade de réponses biologiques complexes qui conduisent à terme, suivant l'intensité du dommage initial et son étendue, soit à la réparation complète du tissu (cicatrisation) ; soit à une réparation tissulaire pathologique si la lésion évolue, à long terme, vers un processus de fibrose cutanée ; soit à l'absence de réparation tissulaire, alors une nécrose tissulaire se développe et nécessite un acte chirurgical pour limiter l'extension de la lésion.



**Figure 5** : Histologie de la brûlure radiologique: photos représentatives des lésions cutanées (A-D: épidermolyse, inflammation, destruction du réseau microvasculaire, perte de la jonction dermo-épidermique : x20) et des lésions musculaires (E-H: rhabdomyolyse, inflammation, destruction du réseau microvasculaire: x60). Différents accidents d'irradiation sont présentés (B et F : accident de Géorgie-2001 ; C et G : accident du Chili-2006 et D et H : accident du Sénégal-2007) en comparaison d'un cas témoin (A et E).

La réparation tissulaire résulte de l'intégration de la dynamique de nombreux processus biologiques, essentiellement inflammatoires et angiogéniques (Figure 6). Ces processus mettent en jeu à la fois la matrice extracellulaire du tissu lésé, des cytokines et des facteurs de croissance qui modulent les différents compartiments cellulaires, les cellules constitutives du tissu cutané et les cellules sanguines infiltrées. Ce système d'interactions et de rétrocontrôles cellule/cytokine/matrice est capital dans la mise en place de la réparation du tissu cutané, les processus de défaut de réparation ou de non réparation s'expliquent par un dérèglement des interactions biologiques (6).



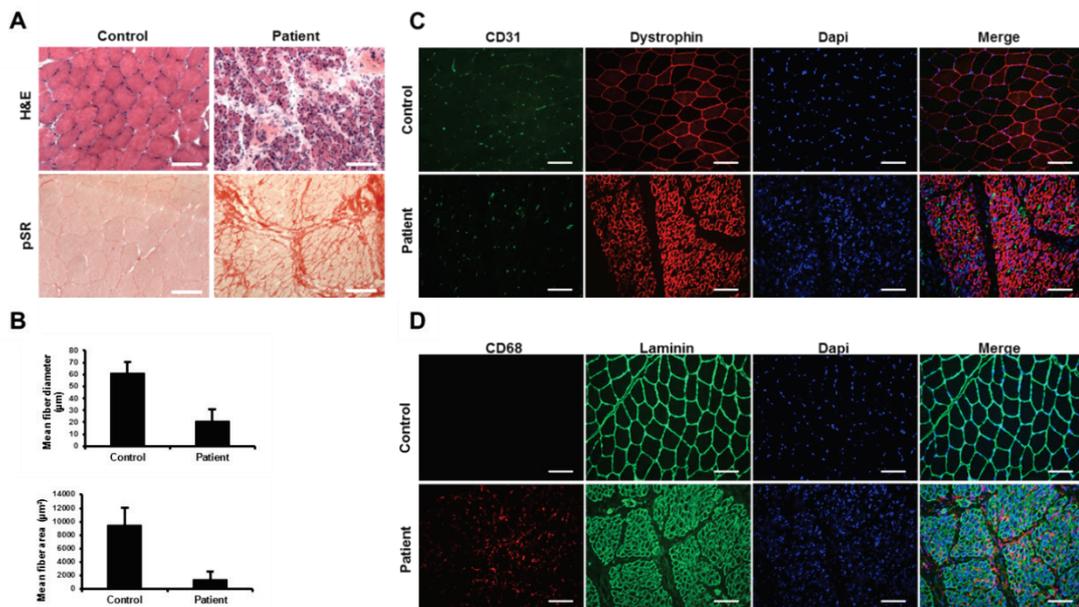
*Figure 6 : Représentation schématique du processus normal de cicatrisation cutanée. a.: phase inflammatoire, b : phase granulation et c : phase de remodelage matriciel [d'après (7)]*

Ces différents travaux sur l'identification des mécanismes biologiques de l'initiation et de la progression de la brûlure radiologique permettent de proposer la modulation de l'inflammation et la modulation du dysfonctionnement vasculaire comme deux cibles thérapeutiques pour le traitement des brûlures radiologiques.

### **3.1.2 Radiopathologie du compartiment musculaire**

Une dégénérescence musculaire peut-être observée après exposition du tissu musculaire à forte dose (accident de Lilo, Géorgie, 1997, ou accident de Dakar, Sénégal, 2007). L'analyse anatomo-pathologique de biopsies musculaires obtenues chez le patient de l'accident de Dakar est illustrée par la Figure 7. Les caractéristiques anatomo-pathologiques de la lésion sont associées à une réduction importante du diamètre des fibres musculaires (Figure 7B). De plus, la surface fibrotique est particulièrement élevée dans les aires musculaires irradiées (Figures 7A). Une perte importante de cytoplasme des myofibrilles est caractéristique, les noyaux cellulaires apparaissant à l'histologie très condensés. Enfin, un infiltrat inflammatoire, macrophages, lymphocytes T, est évident au niveau des zones irradiées (Figure 7D).

Les tissus irradiés sont également caractérisés par une atteinte focale de la microvascularisation. La densité micro-vasculaire est nettement diminuée, signant une exposition des tissus musculaires à une forte dose d'irradiation (Figure 7C).



**Figure 7 :** Etude anatomopathologique du muscle irradié (accident de Dakar, Sénégal, 2007). (A) Marquage à l'hématoxylline et éosine révélant la structure tissulaire et au rouge Sirius révélant les territoires fibrotiques sur des sections musculaires de donneurs sains (control) et du patient. (B) Quantification du diamètre et de l'aire des fibres musculaires ( $P < 0.005$  control vs patient). (C-D) Immuno-marquage des cellules endothéliales (CD31), des cellules inflammatoires infiltrées (CD68) et des cellules musculaires (dystrophine, laminin) sur sections musculaires de donneurs sains (control) et du patient, mettant en évidence les dommages vasculaires et l'inflammation radio-induits.

### 3.1.3 Radiopathologie du compartiment osseux

Le processus d'ostéo-radionécrose est décrit plusieurs mois ou années après une exposition à forte dose. Des biopsies osseuses d'un patient accidentellement irradié (accident de Chilca, Pérou, 2012 (8)) ont pu être exploitées par micro-tomographie tridimensionnelle (Tableau 1). Cette étude montre une augmentation du volume osseux trabéculaire après irradiation par rapport à l'os sain.

	Non Irradiated (Finger bone)	Irradiated (Finger bone)	Irradiated (Toe bone)
<b>BV/TV (%)</b>	<b>12.35</b>	<b>21.13</b>	<b>26.37</b>
<b>Dose received (Gy)</b>	-	<b>10</b>	<b>28</b>
<b>Time after IR (Years)</b>	-	<b>6</b>	<b>2</b>

**Tableau 1 :** Etude par micro-tomographie tridimensionnelle de biopsie osseuse (accident de Chilca, Pérou, 2012). BV/TV : Bone volume/tissue volume, « bone volume » exprimé en pourcentage de « tissue volume ». IRR : Irradiation. Cette étude montre une augmentation du volume osseux trabéculaire après irradiation par rapport à l'os sain.

## 3.2 La thérapie cellulaire

La thérapie cellulaire est basée sur l'isolement de cellules souches, leur amplification ex-vivo et leur réinjection dans un but thérapeutique. Les cellules souches se définissent par leur capacité d'auto-renouvellement et leur capacité de donner naissance à au moins une lignée cellulaire différenciée. Cette capacité à donner naissance à toutes les lignées cellulaires (totipotence), à la quasi-totalité des lignées cellulaires (pluri-potence), à plusieurs lignées cellulaires (multi-potence) ou à un petit nombre de lignées cellulaires (progéniteur) permet conceptuellement d'envisager de réparer, restaurer ou modifier le tissu et la fonction organique associée au tissu. Les cellules souches adultes sont des cellules souches multipotentes présentes dans les différents organes. La thérapie cellulaire est autologue s'il est possible de réinjecter après amplification des cellules du même patient. Cette approche présente l'avantage de contourner le rejet immunologique mais peut présenter l'inconvénient de conserver des gènes « morbides ». La thérapie cellulaire est hétérologue si les cellules du donneur ne sont pas accessibles. Cette approche présente l'avantage d'utiliser des cellules souches issus d'une banque biologique universelle mais pose des problèmes de sécurité virale et de risque de rejet.

### 3.2.1 Les cellules stromales mésenchymateuses (CSM)

Le choix des cellules souches adultes d'intérêt dépend de la pathologie ciblée mais aussi de l'accessibilité des cellules, de leur capacité à être mises en culture et de leur pouvoir thérapeutique. Historiquement, la moelle osseuse, par son accessibilité relativement aisée, constitua la première source de cellules souches adultes. Une catégorie de cellules souches adultes la plus facile à obtenir dans la moelle osseuse est constituée par les cellules stromales mésenchymateuses (CSM).

Les CSM initialement décrites par Fridenstein *et al.* (9) au sein de la fraction cellulaire adhérente de la moelle osseuse, possèdent les principales propriétés des cellules souches adultes à savoir l'autorenouvellement, la capacité prolifératrice et la multipotence. En 2006, la Société Internationale de Thérapie Cellulaire (ICST) a déterminé les critères minimaux pour définir les Cellules Stromales mésenchymateuses cultivées in vitro (10). Pour correspondre à la caractéristique d'une CSM, les cellules doivent adhérer au plastique dans les conditions standards de culture, présenter un phénotype membranaire (CD73, CD90 et CD105 positives à plus de 95 % et CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79α ou CD19 et HLA-DR négative à au moins 98%) (11), et être capables de se différencier in vitro en ostéoblastes, adipocytes et chondrocytes.

Ces cellules sont isolées à partir d'un échantillon de la moelle osseuse obtenu par ponction sternale ou de la crête iliaque. D'autres cellules souches d'intérêt pourraient être également envisagées, notamment les cellules souches adipocytaires. Ces cellules peuvent être isolées à partir d'un échantillon de tissu adipeux obtenu par liposuction. Le tissu adipeux est une source très importante de cellules multipotentes, il contient au moins 100 fois plus de cellules multipotentes que la moelle osseuse. Ces cellules ont des potentialités au moins équivalentes à leur contrepartie d'origine médullaire aussi bien sur le plan de la multipotentialité que sur le plan du pouvoir immunomodulateur.

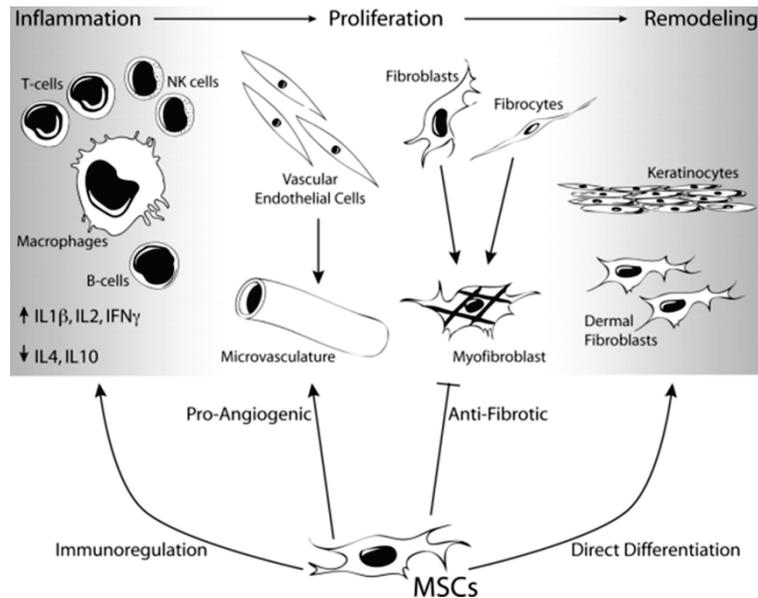
Cependant, un certain nombre de limites à l'utilisation des CSM de moelle osseuse dans le traitement des brûlures radiologiques ont été identifiées. Il s'agit principalement (i) de la durée du protocole de production des CSM de grade clinique nécessitant 15 jours de culture et donc autant de temps d'attente avant d'intervenir cliniquement sur la lésion, (ii) de l'accès des CSM par un prélèvement invasif et douloureux de moelle osseuse, (iii) de la possibilité de non qualification du greffon en fonction des résultats des contrôles qualités des cultures (présence d'anomalie caryotypique), de la situation de greffe autologue restrictive, notamment si la zone prélevée est comprise dans le champ d'irradiation et (iv) la perte de fonctionnalité des CSM et de la richesse du prélèvement de moelle osseuse en fonction de l'âge du donneur. Il émerge donc un intérêt dans l'identification de sources alternatives allogéniques de CSM.

### **3.2.2 Régénération du tissu cutané sain par les CSM : synthèse de la littérature scientifique**

Les CSM peuvent favoriser la régénération cutanée pendant plusieurs phases du processus de cicatrisation (Figure 8). L'intérêt de ces cellules réside essentiellement dans leur propriétés stromales, c'est-à-dire qu'elles peuvent produire et sécréter une multitude de facteurs de croissance, de cytokines et de molécules immunomodulatrices en réponse à leur micro-environnement.

Durant la phase inflammatoire induite lors d'une lésion cutanée, les médiateurs pro-inflammatoires (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) activent des fonctions anti-inflammatoires des CSM permettant de moduler la réponse immunitaire (inhibition du recrutement et de la prolifération des mastocytes, des lymphocytes T et des Natural Killers (12). Par ailleurs, il est intéressant de noter qu'elles expriment faiblement les molécules HLA de classe II ce qui leur confère une activité immunomodulatrice. Des études récentes ont montré que ces cellules pourraient avoir également un rôle anti-infectieux par un contrôle du système monocyte/macrophage (13).

Le changement en faveur de l'expression de cytokines anti-inflammatoires stimule les fibroblastes de la plaie à exprimer certaines protéines de la matrice extracellulaire (MEC). Ainsi, la régulation positive de l'expression des métalloprotéinases matricielles (MMP-1, 3 et 13) et négative par les inhibiteurs des MMP, les TIMP-1 et 2, ainsi que l'expression du TGF $\beta$ 1 et de SPARC, permettent de moduler le dépôt des différents types de collagène (Col1, Col3 et Col4).



*Figure 8 : Les CSM favorisent la cicatrisation cutanée en agissant sur différents acteurs cellulaires clé du processus de cicatrisation (d'après référence (14)).*

En réalité, la dégradation du collagène se fait par deux voies : intracellulaires et extracellulaires. La voie extracellulaire implique le clivage des fibres de collagène par les MMP. La voie intracellulaire, bien moins décrite, implique la liaison des fragments de collagène par les fibroblastes et la dégradation lysosomale par les macrophages. Dans la dernière phase de la cicatrisation normale, le nombre de macrophage de la plaie est diminué, ce qui se traduit par une moindre production de MEC. Ces changements, ainsi que la contraction de la plaie, se traduisent par une diminution de la taille de la plaie. Dans les conditions pathologiques, le nombre et la fonction des macrophages pourraient être modifiés et induire une cicatrice pathologique.

Dans la phase finale de la cicatrisation, les fibroblastes dermiques remodelent la MEC afin de générer un nouveau tissu dermique. En présence de TGF-β1 exprimé par les cellules mésenchymales et épithéliales, les fibroblastes se différencient en myofibroblastes et expriment rapidement des niveaux élevés de protéines de la MEC. Cette réponse de cicatrisation est suffisante pour rétablir l'intégrité des tissus. Mais les cellules myofibroblastiques en produisant des quantités excessives de MEC par rapport aux fibroblastes dermiques, peuvent produire un tissu cicatriciel avec une mauvaise régénération fonctionnelle. Dans la cicatrisation de la peau, à la fois les tensions internes (par les cellules générées) et externes induisent des contraintes mécaniques importantes pouvant affecter profondément la cicatrisation des plaies et la régénération des tissus. Autour de la marge de la plaie, les fibroblastes dermiques prolifèrent, se différencient en pro-myofibroblastes puis en myofibroblastes et provoquent la contraction de la plaie ; les petites plaies sont fermées de cette manière.

Dans les grandes plaies, les contraintes de traction externe pourraient contrebalancer la contraction de la plaie, mais également accélérer la cicatrisation et l'épithélialisation si elle est appliquée d'une manière contrôlée. Toutefois dans certaines conditions (brûlure

thermique ou large suture), un excès de la contrainte de traction peut induire une cicatrisation hypertrophique de la peau (15).

Certaines protéines de la MEC comme la tenascine-c (exprimée durant l'inflammation et la formation du tissu de granulation) sont absentes des cicatrices normales mais persistent dans les fibroblastes chéloïdiens et les cicatrices hypertrophiques. La tenascine-c est clairement associée à une reconstruction pathologique inflammatoire ou fibrotique. Les lésions fibrotiques sont issues de plusieurs étapes de la synthèse et de la dégradation des diverses protéines de la MEC. La tenascine-c est exprimée à un stade précoce de la cascade, précédant la formation de fibrilles de collagène (16). Les CSM inhibent la différenciation de ces fibroblastes en myofibroblastes favorisant ainsi la production d'une MEC ressemblant plus étroitement au tissu dermique natif (17).

L'angiogenèse est nécessaire à cette étape de cicatrisation afin d'alimenter en éléments nutritifs les fibroblastes responsables de la formation d'une matrice provisoire de granulation. Une micro-vascularisation insuffisante dans le lit de la plaie peut inhiber la fermeture de la plaie et conduire à une blessure non cicatricielle, comme cela se produit fréquemment chez les patients diabétiques. Les CSM secrètent une variété de cytokines et de facteurs de croissance qui ont des propriétés anti-fibrotiques telle que le HGF et la MMP-9, qui favorisent le renouvellement de la MEC, la prolifération des kératinocytes et l'inhibition de la différenciation des myofibroblastes. Les CSM contribuent ainsi à la génération d'un tissu de granulation de qualité et bien vascularisé. Par ailleurs, les CSM ont été décrites comme améliorant la ré-épithélialisation de la plaie et atténuant la formation de tissu cicatriciel fibrotique. Les CSM expriment plusieurs facteurs, comme le  $\beta$  FGF, le VEGF- $\alpha$ , qui favorisent la prolifération des cellules endothéliales de la micro-vascularisation, la stabilité vasculaire et le développement d'un réseau vasculaire fonctionnel de longue durée (18).

### **3.2.3 Régénération du tissu cutané irradié par les CSM : Les premières études précliniques de l'IRSN**

Les premiers résultats précliniques obtenus par l'IRSN en 2007 ont permis d'initier cette approche thérapeutique innovante. En effet, l'IRSN a démontré chez la souris immunotolérante que l'injection de CSM issues de moelle osseuse humaine (CSMh), limite les atteintes cutanées induites par une irradiation à forte dose et est associée à une cicatrisation plus rapide des lésions (19). Cette publication est la publication princeps à tout ce travail et à son aboutissement, quelques années plus tard, à une première médicale mondiale ; le premier patient souffrant de brûlures radiologiques traité par thérapie cellulaire combinée à une chirurgie guidée par reconstruction dosimétrique (voir ch. 6). L'injection de CSMh permettait de limiter la fonte musculaire et d'accélérer la récupération fonctionnelle du membre irradié (20). La détection de cellules humaines dans la peau en cours de cicatrisation montrait que les CSMh étaient capables de coloniser la peau endommagée par les rayonnements ionisants. Un rôle de ces cellules dans le processus de réparation tissulaire, en limitant les complications tissulaires radio-induites, était alors envisagé.

## 4 OBJECTIF ET STRATEGIE EXPERIMENTALE

« Quelles approches thérapeutiques innovantes proposer en réponse aux différentes pathologies associées à l'exposition aux fortes doses de rayonnement pour en améliorer la prise en charge ? », c'est une des questions scientifiques adressées par l'IRSN dans sa stratégie scientifique (21). En particulier, L'IRSN mène des recherches sur le traitement des brûlures radiologiques localisées par thérapie cellulaire.

Dans ce contexte, le développement de nouvelles contremesures médicales (CMM) nécessite au préalable une connaissance physiopathologique approfondie des effets des irradiations sur les tissus et organes. Le développement préclinique de telles contremesures s'inscrit dans un plan de développement classique selon le niveau de maturité technologique (TRL, Technical Readiness Level, 1 à 9), couvrant les étapes de recherche amont au transfert clinique (Figure 9). Notre domaine de développement est particulier puisqu'il est impossible de mettre en place des études cliniques de phase I à IV pour le développement des CMM pour les situations d'accident. En effet, le nombre d'individus, heureusement limité, et la spécificité des effets résultants des configurations d'exposition à chaque fois uniques rendent difficile la constitution de cohorte de patients pour la mise en place d'études cliniques. Ainsi, l'ANSM ou l'EMA accordent une importance particulière aux données issues des études précliniques (TLR3-5) pour délivrer leurs



TRL1	TRL2	TRL3	TRL4	TRL5	TRL6	TRL7	TRL8	TRL9
Recherche fondamentale		Recherche préclinique		Recherche préclinique avancée	Essai de Phase 1	Essai de phase 2	Essai de phase 3	Essai de phase 4
Recherche		Recherche translationnelle/développement				Commercialisation		

Engagement IRSN

autorisations.

*Figure 9 : Schéma de développement de contremesures médicales (CMM) pour la prise en charge des personnes irradiées. « Technical Readiness Level » : TRL (niveau de maturité technologique), « Proof of Concept » : POC (preuve de concept), « Investigational New Drugs » : IND (médicament de thérapie innovante). L'IRSN est pleinement positionné sur les actions de recherche amont (TRL 1-3) et de recherche préclinique (TRL 4-5). Afin d'assurer le transfert clinique de ses recherches, l'IRSN en association avec différents partenaires hospitaliers (HIA Percy, CHU Saint Antoine) ou la Pharmacie Centrale des Armées participe aux études cliniques (TRL 6-7) en tant qu'Institut associé.*

La stratégie scientifique de l'IRSN dans le domaine du développement des CMM est fondée sur l'analyse des acquis scientifiques, sur le retour d'expérience de son expertise en radioprotection et sur le retour d'expérience de la gestion médicale des patients à laquelle il participe en tant qu'appui technique. L'IRSN peut ainsi identifier les questions et les besoins opérationnels nécessaires au développement des CMM et proposer une stratégie expérimentale proportionnée aux enjeux médicaux et scientifiques. L'IRSN a développé une politique de collaboration ciblée avec différents partenaires académiques pour mener ses programmes de recherche.

Ainsi, l'IRSN en tant qu'opérateur de recherche de l'Etat développe une recherche ayant pour objectif l'émergence de traitements innovants pour la prise en charge des victimes irradiées.

## 5 BILAN DES RECHERCHES PRECLINIQUES

Plus de 300 essais cliniques de thérapie cellulaire par injection de CSM ont été lancés pour le traitement de pathologies aussi variées que l'infarctus du myocarde, la maladie de Crohn ou la réaction du greffon contre l'hôte (Graft Versus Host Disease - GVHD). Dans le même temps, la réglementation sur l'utilisation des produits de thérapie cellulaire a évolué. Le progrès des connaissances scientifiques et les choix éthiques liés à l'utilisation des cellules souches élargissent le domaine d'application clinique de la thérapie cellulaire. L'utilisation des cellules souches adultes (CSM, cellules progénitrices endothéliales circulantes (PEC)...) ou de leurs produits dérivés, est aujourd'hui envisageable en France pour des applications cliniques. L'utilisation des cellules souches pluripotentes embryonnaires (ES), ou induites (iPS) n'est pas encore autorisée en France par l'ANSM.

La période 2010-2016 a permis de consolider scientifiquement l'intérêt d'utiliser la thérapie cellulaire par injection de CSM pour le traitement du syndrome cutané radio-induit (TRL 4-6). Ces travaux ont contribué à l'obtention d'un MTI-PP, 9 patients ont pu être ainsi traités. Un certain nombre d'enseignements ont été tirés de cette expérience clinique et de nouveaux axes de progrès ont été investigués (TRL 4-6), (i) le traitement d'un grand nombre de victimes, (ii) le traitement des lésions musculaires et osseuses par thérapie cellulaire. L'analyse du REX tiré de l'expérience clinique et l'identification de nouveaux axes de progrès permettent de définir, étape par étape, une prise en charge globale du syndrome cutané radio-induit.

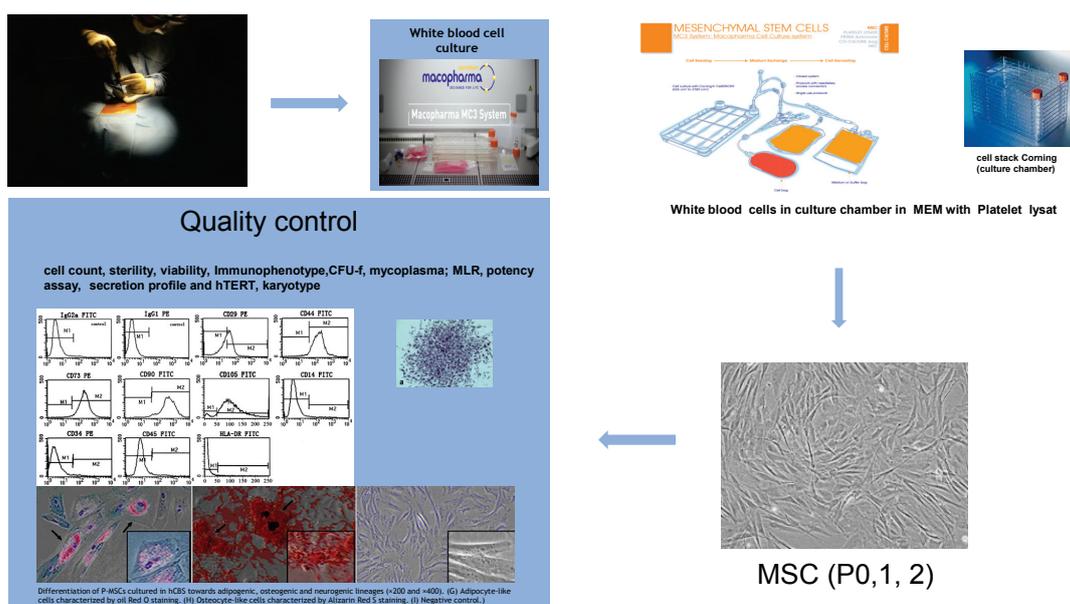
### 5.1 Caractérisation du produit de thérapie cellulaire

L'IRSN collabore avec le CTSA pour ses activités de recherche en thérapie cellulaire faisant appel à la production de CSM. ECELLFRANCE est une infrastructure de recherche nationale de thérapie cellulaire. Elle a pour mission le développement des thérapies cellulaires basées sur l'utilisation des CSM adultes. L'infrastructure rassemble les acteurs nationaux clefs dans une gouvernance intégrée avec l'objectif de permettre aux partenaires et aux équipes qui font appel à elle de devenir des leaders européens dans leur domaine de

compétence. Elle regroupe des plateformes de production de médicaments de thérapie innovant, des plateformes de tests fonctionnels et de sécurité des CSM et des équipes de recherche translationnelle en thérapie cellulaire. ECELLFRANCE regroupe les 5 sites nationaux de production de CSM de grade clinique dont le CTSA. Les lots cliniques de CSM répondent à la directive européenne sur les MTI.

Le produit est un médicament de thérapie innovante sous une forme de concentré de CSM obtenu par culture cellulaire à partir d'un prélèvement de moelle osseuse autologue ou allogénique d'un donneur adulte (Figure 10). Les cellules sont en suspension dans une solution d'albumine à 4% d'origine humaine diluée dans du chlorure de sodium 9% et conditionnée en poche EVA (Ethylène Acétate de Vinyle). Le recueil des cellules médullaires nucléées à partir desquelles seront isolées, par adhésion, les CSM se réalise au bloc opératoire par aspiration de moelle sur les crêtes iliaques du donneur sous anesthésie générale. Ce prélèvement est manipulé en salle propre de classe C et sous PSM. L'étape d'isolement et d'expansion des CSM est réalisée dans des unités de culture « Cell Stack » assurant une stérilité des manipulations. Ce procédé de culture des CSM est réalisé dans un milieu de MEM alpha additionné de lysat plaquettaire (5%) de grade clinique (22). Les Cell stacks sont ensuite placées dans un incubateur à 37°C pour une période de 2 semaines. Les critères de qualité libérateurs sont alors réalisés (caryotypage, numération, viabilité cellulaire) avant injection au patient. La production de CSM est contrôlée à chaque étape critique (ensemencement, nourrissage, récolte, repiquage, remise en suspension) par un certain nombre de tests biologiques permettant de s'assurer de la bonne qualité des cellules amplifiées (numération cellulaire, viabilité, test fonctionnel de clonogénicité, évaluation phénotypique par cytométrie de flux, contrôle de stérilité, caryotype et activité télomérase).

L'unité de thérapie cellulaire du CTSA a obtenu une autorisation de production de MTI-PP pour l'utilisation des CSM de grade clinique pour le traitement des brûlures radiologiques. Cette autorisation a été accordée notamment sur le corpus de résultats précliniques obtenus par l'IRSN.



*Figure 10 : Production de CSM de grade clinique par l'unité de thérapie cellulaire du CTSA (ECELLFRANCE)*

Si la production de CSM de grade clinique est incontournable pour le traitement des patients et requiert des conditions particulières de production par des unités habilitées, la recherche préclinique nécessite une production de CSM à partir de diverses origines (souris, rat, «mini-pig»...). L'IRSN a développé cette capacité de production de produits de thérapie cellulaire pour ses applications précliniques. Ces protocoles sont issus des protocoles de production clinique.

## 5.2 Résultats précliniques chez le petit animal

La démonstration de l'efficacité thérapeutique de l'injection de CSM dans le traitement des brûlures radiologiques nécessite une validation « préclinique » (TRL3-4) sur le petit animal. Différents modèles d'irradiation localisée chez la souris et le rat ont été développés dans le cadre très réglementé de l'expérimentation animale (numéro d'agrément de l'établissement IRSN : D92-032-01 en date 28/07/2016). Ces modèles expérimentaux ont permis d'adresser un certain nombre de questions à fort caractère applicatif.

### *Quelle est la bio-distribution des CSM après injection et peut-on s'affranchir de tout risque à long terme lié à l'injection de CSM ?*

La bio-distribution des CSM humaines a été évaluée après injections localisées ou systémiques sur un modèle de souris humanisée NOD-SCID irradiées localement à forte dose. Ces études ont permis de confirmer les résultats observés par ailleurs dans la littérature scientifique sur le tropisme « homing » des CSM pour les tissus fortement enflammés. Les CSM sont mobilisés rapidement (quelques heures à quelques jours) dans les tissus irradiés. Ce mécanisme pourrait impliquer des processus de chimiotactisme des tissus irradiés notamment médiés par Sdf1 (23,24) et d'interactions avec l'endothélium activé de ces mêmes tissus irradiés. La transmigration des CSM à travers la couverture endothéliale des vaisseaux a été décrite par le groupe de Teo en 2012 (25). Les CSM circulantes sont rapidement piégées dans les poumons et éliminées dans les organes d'épuration comme le foie et le rein (26).

L'absence de toxicité du traitement par CSM a été évaluée par un suivi sur le long terme des animaux injectés. Nous avons ainsi pu montrer que l'injection systémique de CSM humaines, 24 heures après irradiation corps entier sur un modèle de souris immunotolérante n'a engendré aucune anomalie histo-pathologique, après quatre mois, sur l'ensemble des organes explorés (26). Plus de 300 essais cliniques mettant en jeu des CSM ont permis de s'assurer de l'innocuité de CSM. Aucun effet indésirable, notamment tumorigène, n'a été décrit dans la littérature scientifique et médicale.

**Conclusion 1 : Les CSM injectées par voie systémique sont rapidement piégées dans les poumons et autres organes d'épuration biologique. Les CSM injectées localement sont éliminées in situ dans les tissus en quelques jours. Quel que soit le mode d'injection, peu de CSM s'implantent définitivement et à long terme dans les tissus irradiés. Le risque de toxicité à long terme liée à l'injection de CSM est négligeable.**

## *Quelle est l'efficacité thérapeutique des CSM dans le traitement des brûlures radiologiques ?*

Les premiers travaux précliniques réalisés à l'IRSN ont permis de démontrer, chez le rat et la souris, que l'injection de CSM permettait un certain niveau de cicatrisation des brûlures radiologiques (19,20,27). D'autres équipes ont depuis confirmé ces résultats (24,28). Les modalités d'injection (voie intraveineuse versus voie sous-cutanée), les quantités de cellules ( $2.10^3$  à  $2.10^7$  CSM), le délai optimal d'injection après irradiation (quelques heures à plusieurs semaines), l'origine des cellules (autologue versus allogénique) ont pu être étudiés. Ces résultats précliniques chez le petit animal ont permis progressivement aux cliniciens d'affiner les critères d'injection des CSM chez les patients. Une injection itérative de  $2.10^6$  CSM/Kg semble conduire à la meilleure efficacité thérapeutique. Une fréquence d'injection tous les 5 à 7 jours est optimale. Des injections à visée préventive au développement de la lésion ou à visée curative de la lésion ont montré leur efficacité. Si l'injection de cellule en condition allogénique est possible chez le rongeur, des injections autologues chez le patient sont recommandées.

**Conclusion 2 : L'efficacité thérapeutique des CSM pour le traitement des brûlures radiologiques est démontrée sur des modèles précliniques « rongeur ». Les modalités optimales d'injection des CSM ont pu être définies en termes de voie d'injection, de quantité de produit à injecter et de fréquence d'injection.**

## *Existe-t-il différentes sources tissulaires de CSM exploitables pour le traitement des brûlures radiologiques ?*

L'utilisation de CSM provenant de la moelle osseuse a démontré des bénéfices thérapeutiques sur la brûlure radiologique. La possibilité d'utiliser des CSM provenant de source tissulaire alternative a été explorée. Un prélèvement de moelle osseuse peut être considéré comme un acte traumatisant et est réalisé sous anesthésie locale ou générale. Certains tissus présentent une meilleure accessibilité, notamment les tissus adipeux et gingivaux.

Le tissu graisseux présente l'avantage d'un accès moins invasif pour les patients, et forme un réservoir de cellules souches important et à fort potentiel d'amplification in vitro, constituant ainsi une alternative au prélèvement médullaire pour l'isolement et la greffe de cellules souches autologues. Au cours d'un programme de recherche cofinancé par la DGA (2009-2011) il a été mis en évidence un effet bénéfique des cellules souches associées aux progéniteurs issus du tissu adipeux, (Adipose-Derived Stem Cells, ADSC), dans les modèles murins de brûlure radiologique par une stimulation de la vascularisation et de la ré-épithélisation (29). De plus, en collaboration avec l'équipe clinique de Percy (Pr E Bey, Service de chirurgie plastique), nous avons récemment réalisé une analyse comparative de l'effet thérapeutique de différentes préparations biologiques issues du tissu adipeux dans un modèle de lésion musculo-cutanée chez la souris. Nos travaux ont mis en évidence un effet

bénéfique de la graisse brute sans mise en culture, obtenue immédiatement après lipoaspiration, et des ADSC par rapport à la fraction vasculaire stromale obtenue après digestion enzymatique de la graisse brute. Un second programme cofinancé par la DGA (CICERON, 2012-2016) a conduit à la mise en place des protocoles de production des cellules souches de grade clinique à partir du tissu adipeux, et d'en valider le potentiel thérapeutique dans les modèles animaux.

Le tissu gingival possède un fort potentiel de cicatrisation et peut être obtenu de façon non invasive. Les fibroblastes issus de ce tissu ont les caractéristiques des cellules souches avec une capacité de prolifération plus importante que les CSM issues de moelle osseuse. Dans le cadre d'un projet ANR (ANR-09-EBIO-005, 2010-2012), nous avons testé l'effet des fibroblastes d'origine gingivale dans un modèle de lésion cutanée radio-induite chez la souris. Le traitement a conduit à une régénération de l'épiderme plus précoce qu'avec un traitement par CSM de moelle, marquée par la présence des appendices cutanés et de follicules pileux, un recrutement de macrophages de type 2 impliqués dans la réparation et une accélération du remodelage matriciel. Ces effets précoces sont attribués à l'expression spécifique de facteurs de croissance impliqués à la fois dans la persistance à long terme de ces cellules dans le tissu et dans la prolifération de cellules souches endogènes (30).

**Conclusion 3 : Les CSM isolées et produites à partir de la moelle osseuse, du tissu adipeux ou de biopsies gingivales présentent une activité thérapeutique pour le traitement des brûlures radiologiques. Ce constat est un atout dans leur utilisation autologue en situation accidentelle où, par définition, la localisation des tissus irradiés est aléatoire.**

### *Quels sont les mécanismes d'action des CSM sous-jacents à leur efficacité thérapeutique dans le traitement des brûlures radiologiques ?*

En condition physiologique, la cicatrisation cutanée se déroule selon plusieurs phases largement chevauchantes, impliquant l'inflammation, la migration et la prolifération cellulaires, la production de MEC et son remodelage. Ces processus reposent sur des interactions étroites entre kératinocytes, fibroblastes et cellules endothéliales, régulées par un réseau complexe de cytokines et de facteurs de croissance (7,31). L'irradiation affecte ces différentes phases, conduisant à une dérégulation de l'expression des facteurs solubles (TGF- $\beta$ , VEGF, IFN- $\gamma$ , IL-8), et le maintien d'une réponse inflammatoire assurée par la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-3, IL-5, IL-6, TNF- $\alpha$ ) (32,33). L'activation locale des éosinophiles et neutrophiles, et la destruction des kératinocytes par les rayonnements entretiennent la lésion. De plus, l'irradiation induit une altération de la composition de la MEC (diminution de l'expression de MMP-1, production aberrante de collagène) et une atteinte du réseau micro-vasculaire (augmentation de la perméabilité vasculaire, réduction de la perfusion tissulaire, hypoxie) (34,35). La production accrue de TGF- $\beta$  conduit à une activation anormale et permanente des fibroblastes dermiques, responsables de la production de MEC. La production élevée de PDGF et FGF altère le

système micro-vasculaire et participe à l'activation des fibroblastes. L'ensemble de ces dérèglements aboutit à la persistance d'une inflammation chronique et au développement du processus fibro-nécrotique, conduisant à l'installation d'une cicatrisation pathologique.

De nombreuses études précliniques et des premiers cas cliniques ont été publiés démontrant l'effet bénéfique des CSM pour le traitement des lésions chroniques de type ulcère diabétique, brûlures thermique et radiologique (36-38). L'intérêt de ces cellules réside essentiellement dans leur propriétés stromales, c'est-à-dire qu'elles peuvent produire et sécréter une multitude de facteurs solubles en réponse à leur microenvironnement. En effet, l'efficacité thérapeutique des CSM s'explique davantage par leur importante activité sécrétoire que par leur capacité de différenciation, dont la contribution est limitée du fait de leur faible taux de survie sur le site lésé (39). En particulier, les CSM produisent de nombreux facteurs de croissance et cytokines ayant un effet immunomodulateur, pro-angiogénique, et mitogénique, tels que VEGF, PDGF, bFGF, EGF, KGF, TGF- $\beta$  (40). Ces différents facteurs contribuent ainsi à réduire l'inflammation, accélèrent la ré-épithélisation, favorisent la formation du tissu de granulation, et stimulent l'angiogenèse (36).

Cependant les études publiées à ce jour montrant l'effet bénéfique des CSM sur la cicatrisation des lésions radio-induites sont essentiellement descriptives, et les mécanismes moléculaires mis en jeu par les CSM dans ce contexte restent à explorer. Toutefois, des études récentes ont montré l'effet du traitement par CSM sur la modulation de l'inflammation locale. Dans un modèle de lésion cutanée radio-induite chez la souris, l'injection de CSM conduit d'une part à une réduction de l'infiltrat des cellules pro-inflammatoires et de l'expression d'IL-1 $\beta$ , et d'autre part à l'augmentation des macrophages anti-inflammatoires et de l'expression d'IL-10 au site lésé (28). Un effet des CSM sur le remodelage matriciel était également observé, avec une réduction de l'épaisseur du derme et du dépôt de collagène. De même, dans un modèle de lésion cutanée radio-induite chez le rat, le traitement par CSM diminue l'inflammation, associée à une réduction de l'expression de TGF- $\beta$  et prostaglandine E2 dans le tissu, ainsi qu'une augmentation de SDF-1 (24). Des travaux complémentaires sont nécessaires pour mieux cerner les mécanismes mis en place par les CSM pour favoriser le processus pro-angiogénique observé dans certaines études, dont celles de l'IRSN. Une approche consisterait notamment à étudier la voie Wnt/ $\beta$ -catenin, récemment décrite comme activée par les CSM, via leurs exosomes, et favorisant la cicatrisation et l'angiogenèse dans un modèle de brûlure cutanée chez le rat (41,42).

**Conclusion 4 : Les lésions induites par une irradiation localisée à forte dose résultent de la mise en place d'une inflammation chronique et au développement d'un processus fibro-nécrotique. C'est un phénomène de cicatrisation anormal, pathologique.**

**Différentes études descriptives ont montré un effet des CSM sur la modulation locale de l'inflammation. L'interaction des CSM avec les macrophages paraît important dans le contrôle de cette modulation. Les mécanismes moléculaires mis en jeu par les CSM restent encore à explorer.**

Par ailleurs, l'effet des CSM s'explique par leur importante capacité sécrétoire. On parle de « cellule médicament ».

### 5.3 Résultats précliniques chez le gros animal

La démonstration de l'efficacité thérapeutique de l'injection de CSM dans le traitement des brûlures radiologiques nécessite une validation « préclinique avancée » (TRL5) sur le gros animal. Un modèle d'irradiation localisée chez le « mini-pig » a été développé dans le cadre très réglementé de l'expérimentation animale (numéro d'agrément de l'établissement INRA: A78-322-01 en date 15/10/2011). Notre choix s'est porté sur ce modèle car d'un point de vue anatomique (compartiment sub-tissulaire, organisation du réseau vasculaire et renouvellement cellulaire), la peau et les plans musculaires sous-jacents dans la zone anatomique sélectionnée sont proches de ceux de l'homme. Ce modèle expérimental permet de reproduire le schéma opératoire tel que mis en œuvre chez le patient. Il combine l'acte chirurgical à l'injection des CSM.

La configuration d'irradiation sélectionnée permet de reproduire chez le « mini-pig » des brûlures radiologiques sévères (grade IV échelle METREPOL) telles qu'observées chez l'homme (exemple de l'accident du Chili). Une dose de 100 Gy est délivrée localement par un seul faisceau et sur une surface de 5x5 cm (Figure 11). Les animaux sont irradiés à l'aide d'un accélérateur médical (Alphee, IRSN). Le volume cible a été positionné sur la partie postérieure et extérieure de la cuisse de l'animal. L'orientation du faisceau d'irradiation permet d'éviter les structures tissulaires à risque comme la cavité abdominale, la vessie, le rectum mais également le nerf sciatique et l'artère fémorale. Par ailleurs, la zone anatomique sélectionnée est positionnée dans une zone accessible à la chirurgie. La dosimétrie de cette configuration d'irradiation a été réalisée sur les coupes « scanner » des animaux.

Le modèle mis en place présente une évolution clinique très proche des observations établies chez les victimes d'irradiation accidentelle localisée. D'un point de vue anatomo-clinique, la chronologie des lésions évolue selon un schéma bien décrit allant de l'érythème à la desquamation sèche, humide vers la nécrose sans cicatrisation spontanée en fonction de la dose délivrée et du volume tissulaire irradié. Une des principales différences avec la brûlure radiologique chez l'homme est très certainement la durée de la phase de latence, plus longue chez le modèle « mini-pig » en comparaison avec les observations cliniques chez le patient.



Figure 11 : Positionnement de l'animal lors de l'irradiation. La fenêtre lumineuse matérialise le faisceau d'irradiation

Cette étude préclinique chez le gros animal a nécessité de mettre en place la production de CSM de «mini-pig». Les cellules médullaires prélevées au niveau de la tête humérale ont été cultivées (passage 0) en MEM $\alpha$  complété en ciprofloxacine et sérum de veau fœtal (20 %) pendant 18 jours en moyenne. Une partie des cellules récoltées à confluence a été injectée et le reste a été remis en culture (P1) pendant 7 jours, en vue d'une seconde injection. En tout, quatre injections ont été réalisées à partir de deux prélèvements de moelle osseuse.

Le produit de thérapie cellulaire a été caractérisé en termes d'expansion, de potentiel clonogénique, d'expression des marqueurs membranaires caractéristiques des CSM (Figure 12A) et de capacité de différenciation dans le lignage mésodermique (Figure 12B-C). Des contrôles bactériologiques et mycoplasmiques ont été réalisés sur les cellules. Les cellules ont été préparées selon les critères d'exigence en vigueur au sein de l'unité de thérapie cellulaire du CTSA.

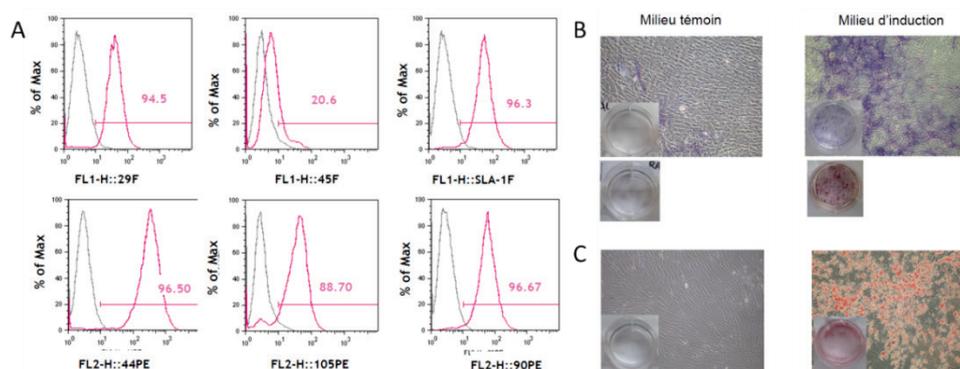
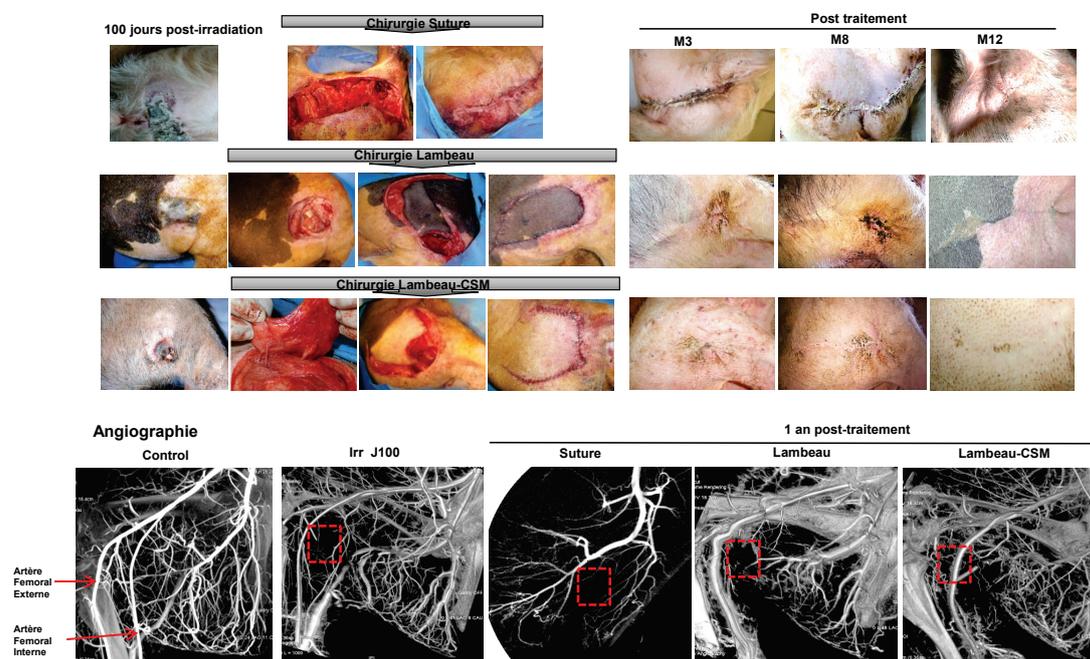


Figure 12 : (A) Phénotype extracellulaire des CSM porcines injectées (passage 1). (B-C) Capacité de différenciation des cellules vers la voie (B) ostéoblastique (coloration phosphatase alcaline (haut) et rouge alizarine (bas)), et (C) adipocytaire (coloration Oil Red O).

Trois séries expérimentales ont été définies. Elles correspondent à la validation de 3 stratégies thérapeutiques, (i) une brûlure induite par une irradiation localisée, (ii) une

chirurgie sur brûlure établie constituée par la résection et l'apport d'un lambeau cutané vascularisé, (iii) la combinaison d'une thérapie cellulaire à l'acte chirurgical sur la brûlure avérée. Douze animaux ont été intégrés dans cette étude, répartis en deux campagnes expérimentales (Figure 13). Pour les animaux ayant été traités chirurgicalement, une chirurgie par la technique de lambeau a été pratiquée au niveau de la zone irradiée en sortie du faisceau d'irradiation. Cette technique chirurgicale consiste à isoler un lambeau cutané irrigué par un gros vaisseau, à faire pivoter le lambeau et à greffer ce lambeau sur la zone irradiée. Les animaux ont reçu une injection de CSM autologues pour se rapprocher au plus des conditions cliniques. Quatre séries d'injection ont été pratiquées à raison d'une injection par semaine.

Les animaux ont reçu une injection de CSM autologues pour se rapprocher au plus près des conditions cliniques. Quatre séries d'injection ont été pratiquées à raison d'une injection par semaine.



**Figure 13** : Evolution de la lésion à long terme (1 an après traitement). Groupe irradié : série i ; groupe irradié + chirurgie : série ii ; groupe irradié + chirurgie + CSM : série iii. L'évolution d'un animal représentatif pour chaque série est représentée sur ce schéma. Chaque série inclut 4 animaux.

Les résultats obtenus dans cette étude sont cohérents par rapport à ceux décrits dans la littérature scientifique (43-45). Ils décrivent une efficacité thérapeutique significative des CSM dans le traitement des brûlures radiologiques localisées dans un contexte de greffe autologue. L'originalité de nos travaux réside dans la démonstration de cette efficacité selon un mode opératoire directement issu de la prise en charge des patients. Il combine une chirurgie (parage et greffe de lambeau musculo-cutané) à une thérapie cellulaire par injection locale et répétée de CSM. Ce protocole « préclinique » a permis de valider le mode opératoire clinique en termes de qualification du produit de thérapie cellulaire, de quantité de CSM injectées et de fréquence des injections. Des études descriptives (43,46) renforcent l'hypothèse d'un mécanisme d'action possible des CSM médiées par l'effet de ces cellules sur la modulation locale de l'inflammation.

**Conclusion 5 :** Cette étude préclinique chez le « mini-pig » a permis de :

- modéliser la brûlure radiologique telle qu'observée en clinique ;
- valider le protocole clinique du traitement des brûlures radiologiques faisant appel à la chirurgie (parage et lambeau) combinée à l'injection locale et répétée de CSM ;
- confirmer que l'acte chirurgical seul n'induit pas une cicatrisation stable et mature de la lésion ;
- confirmer l'avantage unique de l'utilisation des CSM en combinaison avec l'acte chirurgical dans ce protocole ;
- confirmer un mécanisme d'action possible des CSM par leur contrôle de l'inflammation radio-induite favorisant la cicatrisation cutanée et la régénération musculaire.

## 6 RETOUR D'EXPERIENCE CLINIQUE

### 6.1 Cas cliniques

En 2006 à l'HIA Percy, une première victime d'irradiation accidentelle (accident de Yanango, Chili-2005) a pu bénéficier à titre compassionnel, d'une thérapie cellulaire consistant en l'administration de CSM médullaires autologues produites *ex vivo* (47).

Cette première victime présentait des lésions radio-induites au niveau de la main et de la fesse gauche. Le diagnostic sur place au Chili, le transfert du patient et sa prise en charge ont été réalisés grâce aux expertises de l'IRSN et de l'HIA Percy. Pour chacune de ces localisations, le patient a été traité précocement (dans les 100 jours suivant l'irradiation) par une association de chirurgie (parage, autogreffe) et d'injections locales de CSM. Le geste chirurgical a été guidé par la reconstruction dosimétrique et tous les tissus ayant reçu plus de 20 Gy ont été retirés. Des injections de CSM autologues ont été réalisées par voie sous-cutanée et intramusculaire au niveau des lésions mais également dans les zones péri-lésionnelles. Chez ce premier patient, une cessation des douleurs a été observée dans les 48 heures suivant l'injection des CSM. De plus, très rapidement, l'évolution clinique est devenue favorable et la prise de greffe s'est avérée d'excellente qualité. Avec un recul de plus de 10 années, aucune récurrence de nécrose de la peau ou des muscles n'a été constatée chez ce patient.

#### 6.1.1 Cas clinique 4 : Accident de Nueva Aldea, Chili, 2005

Fin décembre 2005, un ouvrier chilien a été irradié accidentellement par une source d'iridium ( $^{192}\text{Ir}$ ) au niveau du visage, de la main gauche et du muscle grand glutéal gauche. (Figure 14) (48). Il a été rapidement pris en charge en France à l'HIA Percy. Une exploration dosimétrique et biologique a été réalisée précocement par l'IRSN lors de l'activation d'une mission d'assistance de l'AIEA au Chili (Figure 15). Des lésions du type mucite sont apparues précocement au niveau de la face interne des joues et ont fait poser l'indication d'un traitement par le Keratinocyte Growth Factor (Kepivance®) lequel a permis une régression rapide de la lésion. Les lésions au niveau des mains se sont révélées d'emblée très

évolutives et extrêmement algiques imposant une décision thérapeutique urgente. Compte tenu de l'impossibilité de réaliser une exérèse des tissus nécrosés au niveau de la main, il a été décidé d'avoir recours à la thérapie cellulaire par CSM autologues et de demander l'autorisation à l'ANSM, à titre compassionnel, pour mettre en œuvre cette thérapie non conventionnelle. Les CSM ont été isolées à partir de la moelle osseuse du patient lui-même et amplifiées en culture, à l'unité de thérapie cellulaire du CTSA, dans un milieu enrichi en facteur de croissance d'origine plaquettaire (22).



Figure 14 : Accident de Nueva Aldea, Chili, 2005. Lésions déclarées par le patient dans les jours suivant son exposition à une source d'Iridium

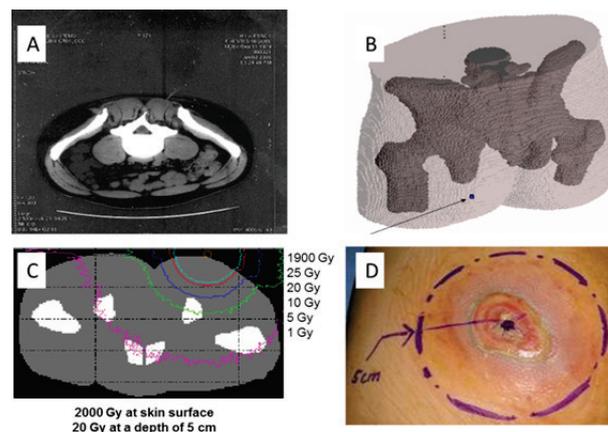


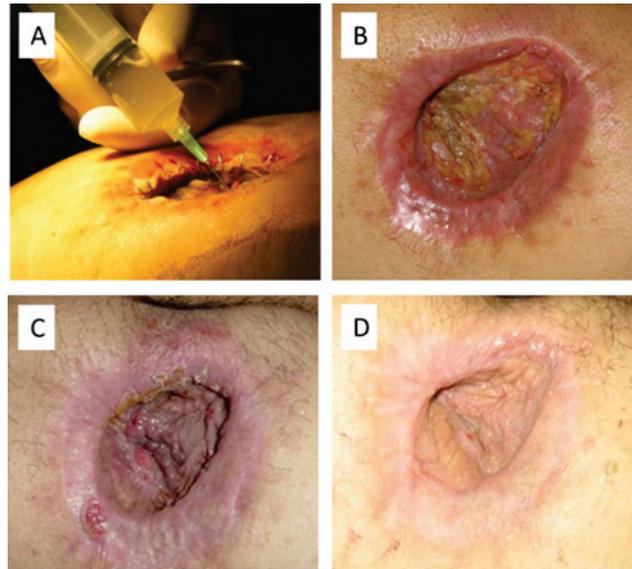
Figure 15 : Reconstruction dosimétrique par méthodes numériques. Cette reconstruction tient compte des caractéristiques anatomiques du patient. Elle a permis de guider l'excision chirurgicale des tissus irradiés (>25 Gy). La dose absorbée au contact de la peau au centre de la lésion est très élevée (2000 Gy) mais décroît très rapidement en surface et en profondeur en fonction du carré de la distance et de l'atténuation des tissus. Sur la base de cette reconstruction dosimétrique, une excision large des tissus à l'aspect sain a été pratiquée rapidement (jour 21 post-irradiation). (A) CT Scan du patient; (B) voxelisation du fantôme; (C) cartographie de la dose et (D) première excision chirurgicale (jour 21 post-irradiation sur un rayon de 5 cm (limite des tissus ayant reçu une dose > 25 Gy).

Les cellules ( $76.10^6$ ) ont été injectées localement en différents points au niveau des lésions des trois premiers doigts de la main et à la racine des doigts. Dans le même temps opératoire, une autogreffe d'épiderme a été mise en place. L'évolution a été très rapidement favorable avec cessation des douleurs au bout de quelques heures et une prise de greffe d'excellente qualité, tout à fait inhabituelle pour des lésions radio-induites (Figure 16).



*Figure 16 : Evolution de la lésion après injection des CSM.*

Une reconstruction dosimétrique par simulation numérique (Monte Carlo) a permis d'estimer avec précision la dose reçue au niveau de la fesse et de guider l'exérèse chirurgicale réalisée en combinaison avec une autogreffe d'épiderme. L'évolution clinique de cette lésion initialement traitée selon une procédure standard a été rapidement marquée par une reprise inflammatoire avec absence de prise de greffe cutanée et apparition d'une fibrose musculaire sous-jacente. Devant cette récurrence, il a été décidé d'avoir une nouvelle action thérapeutique chirurgicale d'exérèse associée à une administration locale de CSM et une autogreffe d'épiderme. Une production de CSM autologue a été mise en route et a permis deux semaines plus tard l'injection de  $168.10^6$  cellules issues d'une primo-culture et, une semaine après, une nouvelle injection de  $226.10^6$  cellules (P1). Après cette nouvelle thérapeutique, l'évolution clinique de la lésion a été marquée par une prise de greffe d'épiderme et l'apparition rapide de signes de cicatrisation (bourgeonnement du plancher de la lésion, disparition des signes inflammatoires et de la douleur, diminution progressive de la taille de la lésion) (Figure 17).



*Figure 17 : Lésion du muscle grand glutéal et son évolution après traitement par chirurgie guidée par la dosimétrie combinée à l'injection locale de CSM. (A) 15 mars 2006, deuxième excision, autogreffe d'épiderme et injection locale de CSM (168 million de MSC); (B) 109 jours post-irradiation; (C) 162 jours post-irradiation; (D) 204 jours post-irradiation*

### **6.1.2 Cas clinique 5 : Accident de Dakar, Sénégal, 2006**

En juillet 2006, un ouvrier sénégalais a été irradié accidentellement par une source d'iridium ( $^{192}\text{Ir}$ ) lors de l'entreposage, avant expédition, du flexible de l'appareil de gammagraphie, la source étant restée accidentellement bloquée dans ce flexible. La victime a été irradiée sur le bras gauche. Le diagnostic d'irradiation accidentelle n'a été porté que 2 mois plus tard. Il s'agit d'une association d'un syndrome aigu d'irradiation et d'une irradiation localisée à la région axillaire, à l'épaule et au bras gauche. Le patient présentait des lésions cutanées phlycténulaires au niveau du creux axillaire gauche ainsi qu'une alopecie temporo-pariétale gauche. Il a été pris en charge en France à l'HIA Percy.

Devant un bilan biologique et une dosimétrie biologique révélant une aplasie médullaire modérée, le patient a été admis en secteur stérile dans le service d'hématologie. Une stimulation de l'hématopoïèse par cytokines recombinantes a permis une sortie d'aplasie très rapide autorisant le transfert du patient dans le service de chirurgie plastique. L'évolution des lésions cutanées d'irradiation a été très défavorable au niveau de la face postérieure du bras gauche, où était décrit un tableau de radiodermite exsudative extensive de toute la face postérieure du bras. Un parage chirurgical suivi d'une couverture cutanée en deux temps par un derme artificiel (Integra®) puis une greffe de peau mince autologue ont été pratiqués.

La dose reçue à l'os et à la peau a été estimée par Résonance Paramagnétique Electronique (RPE) respectivement à 45 Gy et 70 Gy. Le schéma opératoire décliné était complexe et a fait appel à la chirurgie combinée à l'injection répétée de CSM. Les CSM ont été isolées à partir de la moelle osseuse du patient lui-même et amplifiées en culture, à l'unité de thérapie cellulaire du CTSA. Ce traitement complexe faisant appel à une

approche combinée de dosimétrie, de chirurgie plastique et de thérapie cellulaire a permis de sauvegarder le bras du patient (Figure 18).



*Figure 18 : Aspect de la lésion après traitement par chirurgie plastique combinée à la thérapie cellulaire par injection locale de CSM (accident de Dakar, Sénégal, 2006).*

### **6.1.3 Cas clinique 6 : Accident d'Orellana, Equateur, 2009**

En février 2009, un ouvrier chilien a été irradié accidentellement par une source d'iridium ( $^{192}\text{Ir}$ ) au niveau de la cuisse gauche (Figure 19). Il a été rapidement pris en charge en France à l'HIA Percy. Une exploration dosimétrique et biologique a été réalisée précocement par l'IRSN lors de l'activation d'une mission d'assistance de l'AIEA en Equateur.

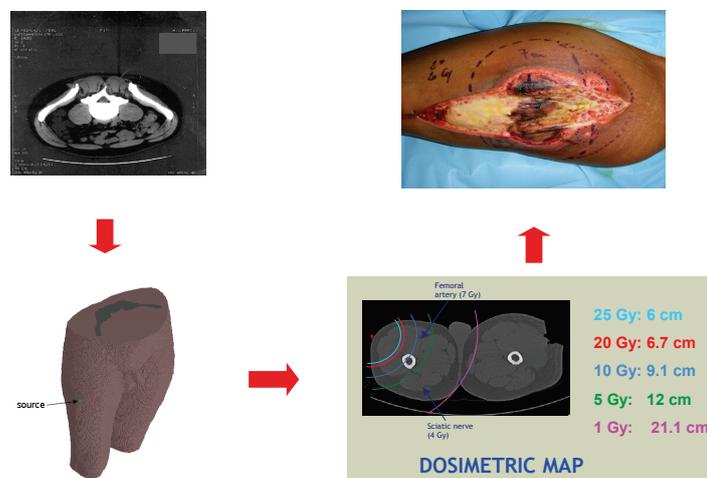


*Figure 19 : Accident d'Orellana, Equateur, 2009). Lésions déclarées par le patient dans les jours suivant son exposition à une source d'Iridium*

Les lésions se sont révélées d'emblée très évolutives et extrêmement algiques imposant une décision thérapeutique urgente. Il a été décidé après reconstruction dosimétrique (Figure 20) de proposer au patient une chirurgie reconstructive et d'avoir

recours à la thérapie cellulaire par CSM autologues. Une autorisation a été demandée à l'ANSM, à titre compassionnel, pour cette thérapie non conventionnelle. Les CSM ont été isolées à partir de la moelle osseuse du patient lui-même et amplifiées en culture, à l'unité de thérapie cellulaire du CTSA.

La radionécrose du patient a fait l'objet d'un traitement chirurgical par exérèse des tissus nécrosés guidé par la dosimétrie. Un lambeau musculaire dorsal libre a permis la couverture de la lésion. Une autogreffe d'épiderme a permis de reprendre les foyers nécrotiques. Au total, trois prélèvements de moelle osseuse et six administrations de CSM ont accompagné le protocole chirurgical. L'évolution de la cicatrisation à 80 jours post-irradiation était très favorable et a permis un retour du patient en Equateur (Figure 21).



**Figure 20 :** Reconstruction dosimétrique par méthodes numériques (accident d'Orellana, Equateur, 2009). Cette reconstruction tient compte des caractéristiques anatomiques du patient. Elle a permis de guider l'excision chirurgicale des tissus irradiés (>25 Gy). La dose absorbée au contact de la peau au centre de la lésion est très élevée (1700 Gy) mais décroît très rapidement en surface et en profondeur en fonction du carré de la distance et de l'atténuation des tissus. Sur la base de cette reconstruction dosimétrique, une excision large des tissus à l'aspect sain a été pratiquée rapidement. (A) CT Scan du patient; (B) voxelisation du fantôme; (C) cartographie de la dose et (D) première excision chirurgicale (limite des tissus ayant reçue une dose > 25 Gy).



Figure 21 : Aspect de la lésion après traitement par chirurgie plastique combinée à la thérapie cellulaire par injection locale de CSM.

## 6.2 Retour d'expérience clinique : émergence d'un traitement innovant

Depuis 2005, 9 patients ont pu bénéficier de ce traitement innovant faisant appel à la chirurgie guidée par la dosimétrie et la thérapie cellulaire par injection localisée de cellules stromales mésenchymateuses. Le retour d'expérience clinique permet aujourd'hui avec un recul de plus de 10 années de recommander une chirurgie si possible anticipative au développement de la radionécrose. Cette stratégie ne peut s'envisager que si une dosimétrie précise des territoires irradiés est possible. Cette dosimétrie est fondée sur la reconstruction numérique, type Monte Carlo, par la mesure par Résonance Paramagnétique Electronique de tissus biologiques tels que les os ou les ongles et par sur la dosimétrie biologique conventionnelle. Cette chirurgie est accompagnée d'injections locales de CSM. La quantité injectée et la répétition des injections dépendent des volumes tissulaires à traiter. Cette technique médicale fait désormais référence pour la prise en charge des brûlures radiologiques sévères (49, 50).

	Lesion characteristics					Clinical criterion of Mesenchymal Stem Cell therapy					
	localisation	severity Metrepol	surface > 20 - 25 Gy	dose (Gy)	route of injection	number of cell injected	MSC origin	number of injection	combined treatment		
Patient 1 (Chili 2005)		Left hand	IV	40 cm <sup>2</sup>	31 <sup>a</sup>	Local	76. 10 <sup>6</sup>	autologous	1	Skin autograft	
Patient 1 (Chili 2005)		Left buttock	IV	80 cm <sup>2</sup>	2000 <sup>c</sup>	Local	386. 10 <sup>6</sup>	autologous	2	Surgery	
Patient 2 (Sénégal 2007)		Left arm	IV	250 cm <sup>2</sup>	53.5 <sup>a</sup>	Local	761. 10 <sup>6</sup>	autologous	5	Surgery	
Patient 3 (Tunisie 2008)		Left hand	IV	100 cm <sup>2</sup>	38 <sup>a</sup>	Local	406. 10 <sup>6</sup>	autologous	2	Skin autograft	
Patient 4 (Equateur 2009)		Right leg	IV	400 cm <sup>2</sup>	4200 <sup>c</sup>	Local	1238. 10 <sup>6</sup>	autologous	6	Surgery	
Patient 5 (FJ) (Vénézuéla 2010)		Left and right hand	IV	100 cm <sup>2</sup>	40 <sup>a</sup>	Local	260. 10 <sup>6</sup>	autologous	5	Skin autograft	
Patient 6 (EB) (Gabon 2010)		Left hand	IV	30 cm <sup>2</sup>	35 <sup>b</sup>	Local	76. 10 <sup>6</sup>	autologous	2	Skin autograft	
Patient 7 (FR) (Chili 2011)		Right foot	IV	20 cm <sup>2</sup>	23 <sup>a</sup>	Local	18. 10 <sup>6</sup>	autologous	1	Surgery	

a: EPR dose evaluation (bone), b: EPR dose evaluation (nail), c: physical dose reconstruction (contact dose at the skin)

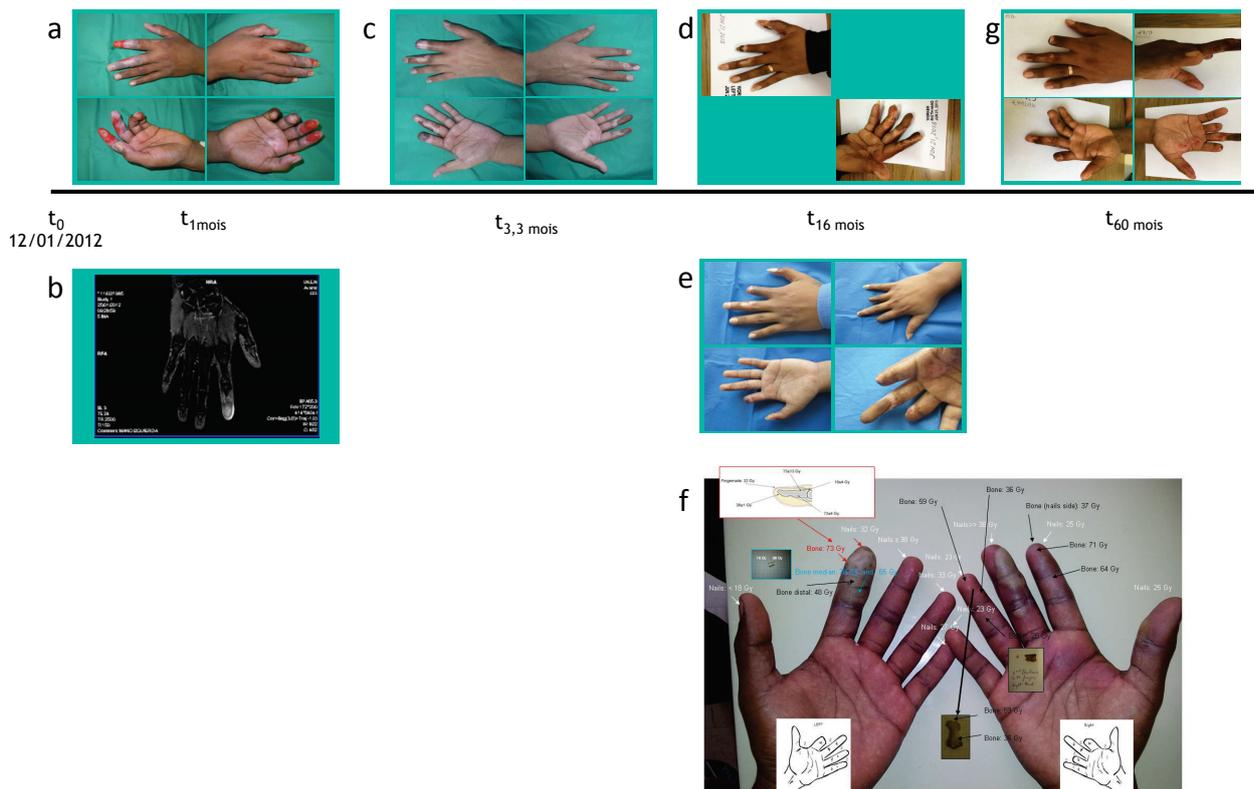
Tableau 2 : Bilan partiel des patients ayant développé des brûlures radiologiques sévères et traités par chirurgie guidée par la dosimétrie combinée à une thérapie cellulaire par injection locale de CSM (mise à jour 2012).

**Conclusion 6 :** Le suivi des patients permet de constater :

- L'absence de rejet des cellules injectées puisque le traitement par thérapie cellulaire est préconisé en situation autologue.

- L'absence de développement tumoral potentiellement lié à la manipulation des cellules souches avant leur injection (51). Les conditions de culture des CSM et leur injection en P0/P1 permet de contrôler ce risque. Le suivi des patients permet également de constater l'absence de récurrence suite à l'injection des CSM.

- Le traitement des lésions localisées aux extrémités (mains) par injection localisée de CSM n'est pas satisfaisant. Si ce traitement permet de préserver les tissus mous (peau, muscle), force est de constater que les patients développent souvent à long terme une ostéo-radionécrose des phalanges (Figure 22).



**Figure 22** : Evolution de la lésion du patient de l'accident de Chilca, Pérou, 2012. (a, b) : Les lésions au niveau des mains se sont révélées d'emblée très évolutives et extrêmement algiques, imposant une décision thérapeutique urgente. (c) Compte tenu de l'impossibilité de réaliser une exérèse des tissus nécrosés au niveau de la main, il a été décidé d'avoir recours à la thérapie cellulaire par injection de CSM autologues combinée à une greffe autologue d'épiderme. Il a été procédé à une désarticulation de la phalange distale de l'index (main droite) compte tenu de la dose reçue (73 Gy à l'os et 32 Gy à l'ongle par estimation par RPE) (f). (d, e, g) Le suivi du patient à 60 mois a révélé le développement progressif d'ostéo-radionécrose des phalanges irradiées à très fortes doses (f).

## 7 PERSPECTIVES DE RECHERCHE

La preuve de concept de l'utilisation de la thérapie cellulaire pour la prise en charge des lésions tissulaires sévères a été maintenant apportée pour le traitement des brûlures radiologiques (Figure 23). Cependant, ces traitements restent, à ce jour, lourds à mettre en œuvre. Ils nécessitent la réalisation de prélèvements de moelle osseuse chez le patient, ou à défaut, l'identification de donneurs compatibles, et des procédures longues et complexes de préparation des produits de thérapie cellulaire. Par ailleurs, ce traitement se heurte encore aux limites suivantes, notamment lorsque les dommages sont particulièrement importants (volume tissulaire concerné, sévérité de la lésion) : (i) la durée du protocole de production des CSM de grade clinique, (ii) l'existence d'une zone de moelle préservée de l'irradiation permettant un prélèvement, (iii) l'accès aux CSM par un prélèvement invasif et douloureux de moelle osseuse, (iv) la possibilité de non qualification du greffon en fonction des résultats des contrôles qualité des cultures, et (v) la perte de fonctionnalité des CSM et de la diminution de capacité proliférative des CSM en fonction de l'âge du donneur. De plus, certaines situations accidentelles peuvent engager un nombre important de victimes, ce qui pose également la question de la disponibilité de ces produits. Nous proposons au cours de ces 5 prochaines années d'optimiser la prise en charge des brûlures radiologiques par l'utilisation d'un traitement d'efficacité thérapeutique démontrée et stockable en grande quantité.

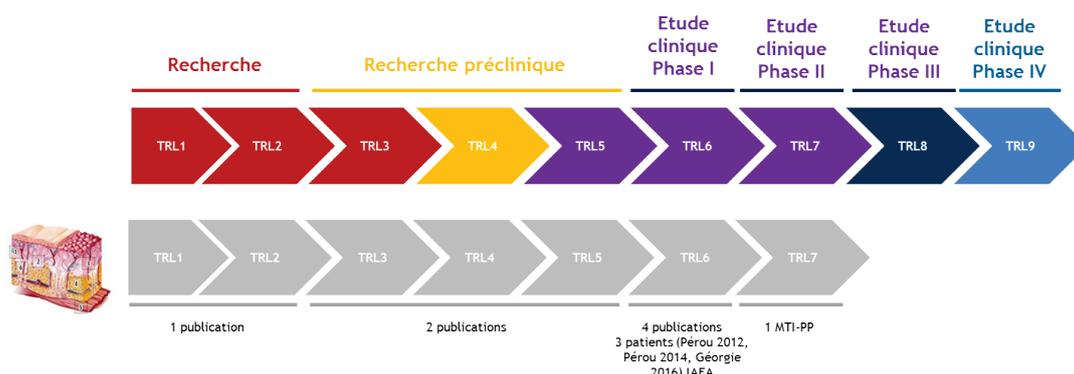


Figure 23 : Etat d'avancement du plan de développement en 2017.

Pour les cinq prochaines années, notre programme de recherche en thérapie de la brûlure radiologique a pour objectif de repousser les limites du traitement en potentialisant l'efficacité des cellules souches, mais aussi en identifiant les modalités optimales d'administration. Nos approches feront appel aux dernières avancées de la thérapie cellulaire et aux techniques de bio-ingénierie utilisées en médecine régénérative. L'IRSN a orienté son programme de recherche afin d'optimiser ce nouveau traitement en ciblant les points particuliers suivants :

- L'optimisation de l'utilisation des CSM ;
- La possibilité de créer des banques de CSM ou de leurs produits dérivés ;
- L'utilisation de cellules souches ou de produits de thérapie cellulaire alternatifs ;
- L'exploration de nouveaux champs d'application du traitement par CSM ;
- Le traitement de nouvelles cibles tissulaires (muscle, os).

Ces alternatives thérapeutiques visent à renforcer les acquis cliniques en cherchant à personnaliser le traitement, chaque situation d'exposition accidentelle étant particulière. D'ores et déjà un certain nombre de résultats prometteurs ont pu être obtenus.

## **7.1 Prise en charge de la brûlure radiologique de type accidentel : une optimisation des traitements existants**

### **7.1.1 Développement de banques de CSM**

De nombreux travaux ont mis en évidence la possibilité de dériver des CSM à partir de cellules souches pluripotentes embryonnaires (ES) humaines. Les CSM dérivées de cellules ES ou de cellules souches issues de cellules adultes reprogrammées (iPS) pourraient ainsi représenter une source illimitée de CSM. Cette approche ouvre potentiellement la voie vers l'établissement de banques universelles de cellules souches «médicament», ce qui permettrait d'augmenter radicalement les capacités de prise en charge et de traitement des victimes. Un programme de recherche cofinancé par la DGA (projet CICERON, 2012-2015) a eu pour objectif d'étudier le potentiel thérapeutique des CSM dérivées de cellules souches pluripotentes humaines pour le traitement des brûlures radiologiques. En collaboration avec l'équipe de Marc Peschanski (I-STEM, Evry), qui était chargée de la dérivation des iPS-CSM et ES-CSM humaines, nous avons pu mettre en évidence une efficacité thérapeutique de ces cellules similaire aux cellules souches du tissu adipeux dans un modèle murin de lésion cutanée radiologique. L'analyse des tissus régénérés après injection des cellules a révélé un effet des ES-CSM et iPS-CSM sur la ré-épithélisation, la promotion du remodelage matriciel, et la stimulation de la vascularisation dans le processus de cicatrisation radio-induite chez le rongeur, ainsi que chez le «mini-pig», sans entraîner d'effet toxique. Ces travaux apportent la preuve de principe d'une utilisation des cellules souches pluripotentes comme source de CSM pour le traitement des brûlures radiologiques. En revanche, dans l'objectif d'une application clinique des CSM dérivées de cellules iPS, subsiste à ce jour un risque lié à la méthode employée pour injecter les facteurs de reprogrammation aux cellules adultes, qui repose essentiellement sur l'utilisation de virus intégratifs, avec un risque d'activation ou d'inactivation involontaire de gènes. De nouveaux procédés permettant d'induire la reprogrammation sans faire appel au transfert intégratif de gènes sont actuellement en développement dans le monde.

### **7.1.2 Produits dérivés des CSM : exosomes**

De nombreuses études ont clairement établi que les exosomes produits par les CSM présentaient des propriétés fonctionnelles similaires aux cellules souches d'origine, leur conférant les mêmes effets bénéfiques que les CSM dans différents modèles précliniques. En outre, les propriétés physico-chimiques des exosomes offrent des perspectives de transport et de stockage (banque d'exosomes) compatibles avec une utilisation sur le terrain ou en situation d'urgence impliquant un grand nombre de victimes. Enfin, l'utilisation de ces vésicules comme outil thérapeutique présenterait l'avantage d'un transfert clinique plus simple, dû au risque fortement réduit de transformation maligne. Le projet « EXOsomeS des CELLules souches pour le Traitement des brûlures radiologiques » (EXOCET, ANR ASTRID 2017-2020) a été mis en place en collaboration avec l'UMR1197 (CTSA/Inserm), dans l'objectif de

proposer un produit de thérapie basé sur l'utilisation des exosomes pour le traitement des brûlures radiologiques consécutives à une exposition accidentelle aux rayonnements ionisants. Les exosomes produits par notre partenaire seront validés sur le plan fonctionnel au moyen de tests *in vitro* visant à évaluer leur potentiel pro-angiogénique, immunomodulateur et de ré-épithélisation. L'efficacité thérapeutique des exosomes sera évaluée à l'aide d'un modèle de lésion musculo-cutanée radio-induite chez la souris. Une analyse macroscopique de la lésion sera réalisée à intervalles réguliers après administration des exosomes afin d'en suivre l'évolution. L'analyse histologique, immunohistochimique et moléculaire de prélèvements de tissus obtenus à différents temps permettra d'établir l'effet des exosomes sur l'angiogenèse, la ré-épithélisation, et la modulation de l'inflammation. Ce projet permettra d'ouvrir des perspectives de transfert vers la clinique de l'utilisation des exosomes pour le traitement de la brûlure radiologique, moyennant la mise en place de procédures de production et de stockage d'exosomes de grade clinique. Cette démarche fera l'objet d'une demande de financement ANR dédiée (ASTRID Maturation). A terme, cela pourrait conduire les partenaires à déposer une demande d'extension de l'AMM obtenue par le CTSA pour la production de CSM de moelle osseuse pour le traitement du syndrome cutané d'irradiation.

## 7.2 Extension du champ d'application clinique du traitement par CSM

### 7.2.1 Prise en charge des Lésions Radiologiques Combinées (LRC)

Ainsi, la mise en œuvre malveillante d'un DNI (Dispositif Nucléaire Improvisé) pourrait provoquer plusieurs milliers de victimes susceptibles de développer des lésions radiologiques combinées (LRC). Le REX des conséquences sanitaires de l'explosion des bombes atomiques d'Hiroshima et Nagasaki montre que 60 à 70 % des victimes ont développé des LRC. Ces lésions se définissent comme les atteintes tissulaires ou organiques résultant de l'effet combiné d'une irradiation à une lésion mécanique, thermique ou chimique (52). L'AIEA propose la classification suivante :

- LRC - thermique : irradiation externe ou contamination et brûlure thermique ;
- LRC - mécanique : irradiation externe ou contamination et lésion ou fracture ou hémorragie ;
- LRC - chimique : irradiation externe ou contamination et brûlure chimique ou intoxication chimique.

De telles situations cliniques combinant des atteintes multiples aggravent le tableau clinique et impactent significativement le pronostic vital du patient. La physiopathologie des LRC est complexe et peu décrite. C'est un modèle de réponse intégrée de l'organisme à plusieurs stress où la réponse inflammatoire et vasculaire joue probablement un rôle central (Figure 24). La prise en charge médicale des lésions combinées accidentelles est particulièrement complexe et nécessite de nouvelles stratégies de thérapies combinées.

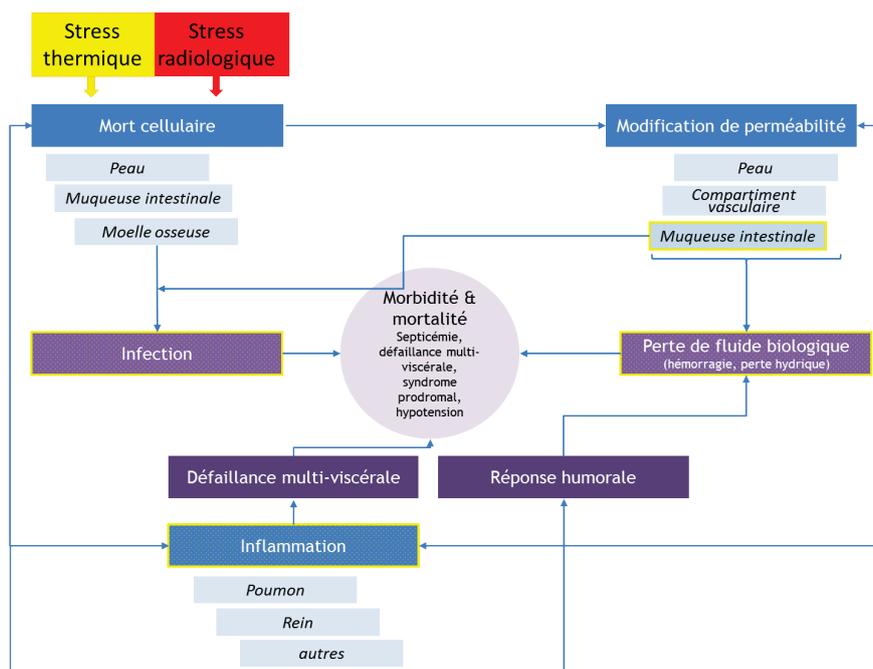


Figure 24 : Modèle de réponse intégrée de l'organisme aux lésions radiologiques combinées. Encadrées en jaune les réponses ou compartiments impactées conjointement par les stress radiologiques et thermiques [d'après (53)]

Différents modèles précliniques ont été validés pour le développement de méthodes de prise en charge et de traitements (54). Une approche par thérapie cellulaire faisant appel aux propriétés immunologiques et cicatrisantes des CSM mérite d'être investiguée. Des premières études (55) fournissent la preuve de concept d'une telle approche.

### 7.2.2 Prise en charge de la brûlure radiologique suite aux traitements de radiothérapie ou de radiologie interventionnelle

Plusieurs cas d'accidents de surexposition cutanée sévère faisant suite à une irradiation médicale (radiologie interventionnelle et radiothérapie) ont été rapportés ces dernières années aux niveaux national et international. En particulier, la radiologie interventionnelle (RI) concerne différentes spécialités médicales (cardiologie, neurologie, chirurgie vasculaire) et son utilisation est en augmentation constante. La plupart des lésions cutanées se présente, dans un délai de 2 mois à 3 ans, sous la forme de radiodermes chroniques. Des ulcérations ou nécroses, parfois très douloureuses, peuvent également survenir. Les procédures en cause sont habituellement répétées, complexes et parfois rapprochées : en moyenne 2 à 3 coronarographies et 2 à 3 angioplasties avec une durée moyenne de procédure longue (plus de 90 minutes de fluoroscopie).

Les doses reçues dépendent de différents paramètres, dont la longueur et la complexité de la procédure, la corpulence du malade, la répétitivité de l'irradiation d'une même zone cutanée, le diamètre du champ utilisé. Les lésions musculaires apparaissent après plusieurs années et se caractérisent par un œdème, une fibronécrose musculaire accompagné de douleurs. Enfin, des complications osseuses (ostéo-radionécrose, fractures spontanées) peuvent être observées 2 à 3 ans après l'acte. Une étude de faisabilité a été initiée par la mise en place d'un modèle préclinique de brûlure radiologique chez le rongeur à l'aide d'une plateforme d'irradiation du petit animal (SARRP), permettant d'établir des

lésions radio-induites reflétant les expositions des patients aux RI. Notre objectif est de caractériser les lésions tissulaires (peau, muscle, os) consécutives à une exposition aux rayons X de faible énergie, peu documentées pour ce type de rayonnement. Ce modèle sera exploité afin d'étendre l'application de la thérapie cellulaire aux complications cutanées des procédures de radiologie interventionnelle. Nous testerons ainsi l'effet de différents traitements par thérapie cellulaire à visée curative sur lésions établies. Par ailleurs, le retour d'expérience des expertises de l'IRSN dans le domaine de la prise en charge des patients par l'HIA Percy montre qu'une stratégie de traitement préventif à l'apparition de la nécrose est envisageable, ce qui sera testé à l'aide de ces modèles animaux. Cette approche pourrait s'envisager également pour améliorer la prise en charge des séquelles chroniques des radiothérapies (37,56).

### **7.3 Vers un meilleur ciblage : Des cellules souches spécialisées pour de nouvelles cibles tissulaires**

Les différents cas cliniques pris en charge par l'HIA Percy et l'IRSN ont confirmé que chaque situation accidentelle est unique, avec un scénario d'exposition spécifique et une atteinte lésionnelle différente dans son étendue et sa gravité. Cette situation nécessite d'adapter le traitement au type de lésion, ce qui conduit à optimiser le traitement, par l'utilisation et la combinaison de nouveaux produits de thérapie cellulaire, et le traitement de nouvelles cibles tissulaires.

#### **7.3.1 Cellules souches spécifiques pour de nouvelles cibles tissulaires particulières**

Le retour d'expérience associé à la prise en charge médicale des premiers patients traités par injection de CSM montre un effet bénéfique essentiellement sur le plan cutané. En revanche, l'irradiation à de fortes doses peut conduire à l'apparition, plusieurs années après l'accident, de lésions du muscle sous-jacent, avec perte tissulaire importante, et d'atteintes à l'os pouvant aller jusqu'à la nécrose. Récemment, des travaux de recherche ont été mis en place à l'IRSN afin de comprendre l'effet des rayonnements ionisants sur les tissus musculaires et osseux et de proposer des protocoles de traitement basés sur l'administration des cellules souches afin de prévenir le développement des lésions radio-induites dans ces compartiments.

#### **7.3.2 Exploitation d'autres types de cellules souches**

Dans l'objectif de cibler spécifiquement le réseau vasculaire, nous avons montré l'effet bénéfique des cellules PEC sur la cicatrisation et la stimulation du processus angiogénique (financement EDF 2009-2011). En particulier, la stimulation des PEC par le ligand ephrin B2, associée à un traitement antioxydant, potentialisait l'effet bénéfique des PEC. En outre la co-injection des PEC avec des cellules souches musculaires lisses stimulait la cicatrisation de manière plus importante que chaque type cellulaire individuellement (57). Cependant, l'extrapolation des données précliniques obtenues chez la souris a permis d'estimer qu'un transfert chez l'homme est difficilement réalisable. De même, afin de potentialiser l'efficacité thérapeutique des cellules mononucléées de moelle osseuse, nous

avons également démontré que l'administration de cellules de moelle invalidées pour le gène PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor-1) amplifiait leur potentiel thérapeutique dans un modèle de lésion cutanée. Cet effet implique la voie MMP9, responsable de la dégradation matricielle, favorisant ainsi la néo-vascularisation dans le processus de cicatrisation cutanée (58).

### **7.3.3 Développement d'approches par co-traitement et de potentialisation**

Dans le but de potentialiser le bénéfice thérapeutique des CSM, nous avons étudié l'effet de la co-injection des CSM avec le facteur pro-angiogénique BMP-2 (bone morphogenetic protein-2) sur la cicatrisation du tissu irradié chez le rat, en collaboration avec la faculté de médecine de Tours. Nous avons montré que la co-injection de BMP-2 et de CSM accélère la cicatrisation, en favorisant la réparation de l'endothélium, le renouvellement des structures tissulaires, aboutissant à la régénération de l'épiderme, des follicules pileux, des glandes sébacées, et augmentant la densité de fibres de collagène et des vaisseaux sanguins. Dans ce modèle, l'effet du BMP-2 était associé à une activation de la voie de signalisation HIF-1 $\alpha$ . Ces résultats suggèrent que de nouvelles stratégies thérapeutiques de potentialisation pharmacologique combinant des cytokines aux CSM pourraient être proposées aux cliniciens pour le traitement des brûlures radiologiques (27).

Ainsi dans un modèle murin d'irradiation à forte dose du muscle, caractérisée notamment par une atrophie sévère, une altération du réseau vasculaire et une fibrose musculaire, des îlots de régénération ont été identifiés 2 mois post-irradiation. En collaboration avec l'Institut de Myologie et l'Institut Pasteur, nous avons démontré que des cellules souches musculaires humaines (myoblastes) injectées localement une semaine après irradiation étaient détectées au sein de fibres musculaires matures après 1 et 2 mois post-irradiation, suggérant un effet bénéfique des myoblastes pour le traitement des lésions musculaires radio-induites. D'autre part, nous avons mis en évidence l'altération structurelle et fonctionnelle de l'os consécutive à une irradiation à forte dose, caractérisée notamment par une hyper-densification osseuse associée à une diminution du nombre d'ostéocytes et de la vascularisation osseuse, conduisant à une fragilité de l'os. Nos travaux indiquent un effet bénéfique de l'injection des CSM sur le nombre d'ostéocytes et la teneur en collagène matriciel, suggérant l'intérêt de ce traitement afin de prévenir les lésions osseuses radio-induites.

## **8 CONCLUSIONS**

### **8.1 Avancées scientifiques**

L'efficacité thérapeutique des CSM d'origine médullaire a été confirmée sur deux modèles expérimentaux de brûlure radiologique chez le rongeur et le «mini-pig». Ce dernier modèle a permis de se rapprocher au plus près de la configuration clinique en introduisant un protocole de chirurgie associé à l'injection répétée de CSM. L'efficacité thérapeutique des CSM issues de la moelle osseuse et du tissu adipeux a été démontrée sur notre modèle rongeur. Les CSM d'origine adipeuse présentent l'avantage d'être plus accessibles et de pouvoir être obtenues en grandes quantités. Les modes d'action des CSM d'origine médullaire font essentiellement appel à leur capacité à moduler l'inflammation par un effet

paracrine. Les modes d'action des CSM d'origine adipeuse font appel à leur potentiel pro-angiogénique, notamment leur capacité de différenciation en cellules endothéliales après implantation et la sécrétion de VEGF, principal facteur pro-angiogénique.

Cette recherche de transfert a permis de consolider les protocoles cliniques d'utilisation des CSM dans le traitement des brûlures radiologiques. Les recommandations sont les suivantes : l'injection de CSM autologues limite les problèmes de rejet de greffe ; pour ce type de lésion, l'injection locale des CSM est préférable à l'injection systémique ; les injections de CSM doivent être répétées, le protocole standard inclus maintenant 6 injections à raison d'une injection localisée tous les 7 à 10 jours ; elles doivent être pratiquées par voie sous-cutanée et intramusculaire autour du volume irradié ; la quantité totale de CSM à injecter dépend de la sévérité de la lésion et du volume de tissu irradié, ainsi que de la capacité d'expansion des MSC du patient. Notre expérience montre que 2.106 MSC/kg par injection semble une quantité raisonnable, le nombre d'injections étant conduit par la qualité et la rapidité de la cicatrisation.

Les perspectives scientifiques énoncées dans ce document illustrent la nécessité de garder en permanence une capacité d'anticipation scientifique et clinique dans ce domaine. Le maintien de la compétitivité dans ce domaine de pointe est d'autant plus important dans le contexte géopolitique actuel et le regain du risque NRBC.

## 8.2 Avancées médicales

En 2006 à l'HIA Percy, une première victime d'irradiation accidentelle (accident de Nueva Aldea, voir 6.1.1) a pu bénéficier, à titre compassionnel, d'une thérapie cellulaire consistant en l'administration de CSM médullaires autologues produites ex vivo (47). La prise en charge optimale des brûlures radiologique sévères a fait appel à la reconstruction physique de la dose délivrée localement et la définition de l'isodose 25 Gy, au-delà de laquelle les tissus nécrosent, à la chirurgie plastique et la greffe cutanée, et à la thérapie cellulaire par injection locale de CSM. Une diminution significative des douleurs était observée dans les 48 heures suivant l'injection des CSM. Très rapidement, l'évolution clinique est devenue favorable et la prise de greffe s'est avérée d'excellente qualité. La prise en charge médicale de ce patient constitue le fondement d'une doctrine clinique pour le management médical des brûlures radiologiques graves. Cette doctrine fait référence auprès de l'AIEA (49). Suite à ce premier succès thérapeutique, 9 patients ont été traités par des injections locales et répétées de CSM autologues. Les résultats obtenus ont été spectaculaires et ont permis à certains patients traités de retrouver l'usage de leurs membres, ce qui aurait été impossible avec une prise en charge conventionnelle (59). Le suivi de ces patients et le succès clinique obtenu montrent que la thérapie utilisant les cellules souches est de haute importance en clinique (60). L'obtention récente par le CTSA d'une AMM MTI-PP de l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament (ANSM) confirme l'apport essentiel de la thérapie cellulaire dans ce domaine (TRL 6-7).

Une conférence de consensus international, sous l'égide de l'AIEA et de l'OMS est maintenant nécessaire pour intégrer ce traitement innovant dans la prise en charge globale des brûlures radiologiques. L'IRSN pourrait prendre cette initiative.

### 8.3 Partage et diffusion du savoir-faire français dans la prise en charge médicale des brûlures radiologiques

La longue expérience acquise par la France dans le traitement des victimes d'irradiation accidentelle est reconnue internationalement. Dans ce domaine, le savoir-faire français jouit d'une image d'excellence scientifique et médicale. La France a construit une coopération avec l'AIEA depuis plus de 15 ans, faisant ainsi de l'IRSN et de l'HIA-Percy des centres référents dans le domaine. L'AIEA active régulièrement les experts de l'IRSN et de l'HIA Percy pour la prise en charge des victimes irradiées (Figure 25). Le Directeur Général de l'AIEA, Yukiya Amano est venu personnellement en 2015 remercier officiellement l'implication de la France dans ce domaine.

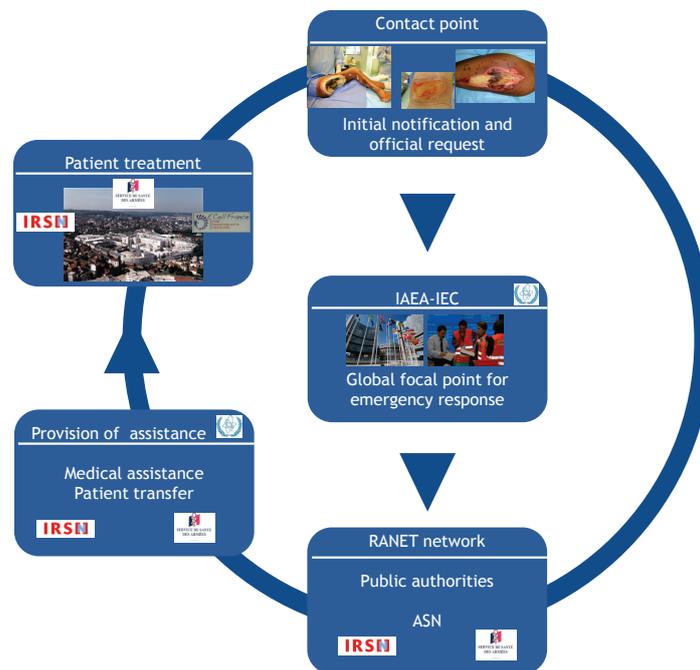


Figure 25 : Boucle d'activation de l'AIEA en situation d'accident radiologique.

Dans le respect du code de déontologie médicale, un partage des connaissances médicales au bénéfice du patient et pour les progrès des soins de santé a été entrepris ces dernières années, notamment avec les pays d'Amérique latine et d'Amérique du Sud. Force est de constater que les accidents radiologiques se sont essentiellement déroulés dans cette zone géographique ces 20 dernières années (Figure 26).



Figure 26 : Accidents radiologiques répertoriés par l’AIEA en Amérique du Sud.

Ainsi, sous l’égide de l’AIEA, les capacités médicales de différents pays de l’Amérique du Sud ont été évaluées et un centre référent identifié au Brésil. Les capacités de production de CSM ont notamment pu être implantées localement. Un premier patient accidentellement irradié (accident de Callao, Pérou, 2014) a pu être traité au Brésil et les équipes médicales formées (Figure 27). Cette action cadrée par le département de coopération technique de l’AIEA a impliqué des experts de l’IRSN, du CTSA et de l’HIA-Percy pour la partie française et l’INCA (Rio - Brésil), la Navy hospital, (Rio - Brésil), l’INEN, (Lima - Pérou), l’IPEN (Lima - Pérou) et l’AIEA-IEC. Les meilleurs soins ont pu être prodigués au patient à proximité du Pérou.

### Clinical symptoms

time of exposure : 35 min including presence of the radiation source in side pocket pants.  
 - localized irradiation suspected : left upper thigh.



2 IAEA Assistance Missions with support of 3 French experts: Medical assessment (April - May, 2014), Medical treatment (July - November, 2014)  
 Courtesy : IAEA-INEN

Figure 27 : Diffusion du savoir-faire français dans la prise en charge médicale des brûlures radiologiques sous l’égide de l’AIEA : exemple de l’accident de Callao, Pérou, 2014.

## LISTE DES REFERENCES

1. Coeytaux K, Bey E, Christensen D, Glassman ES, Murdock B, Doucet C. Reported radiation overexposure accidents worldwide, 1980-2013: a systematic review. *PloS one*. 2015;10(3):e0118709. Epub 2015/03/20.
2. IAEA. The radiological accident in Lilo. Vienna: International Atomic Energy Agency; 2000. 103 p.
3. IAEA. The radiological accident in Yanango. Vienna: International Atomic Energy Agency; 2000. 41 p.
4. IAEA. The radiological accident in Lia, Georgia. Vienna: International Atomic Energy Agency; 2014. 149 p.
5. Ryan JL. Ionizing radiation: the good, the bad, and the ugly. *The Journal of investigative dermatology*. 2012;132(3 Pt 2):985-93. Epub 2012/01/06.
6. Bey E, Doucet C, Duhamel P, Brachet M, Prat M, Bargues L, et al. [Radiation burn "innovating therapeutic approach"]. *Annales de chirurgie plastique et esthetique*. 2010;55(5):354-62. Epub 2010/09/28. Brulure par irradiation << approche therapeutique innovante >>.
7. Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. Wound repair and regeneration. *Nature*. 2008;453(7193):314-21. Epub 2008/05/16.
8. IAEA. The radiological accident in Chilca, Peru. Vienna: International Atomic Energy Agency; A paraître. 277 p.
9. Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik NV, Panasyuk AF, Keiliss-Borok IV. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation*. 1974;17(4):331-40. Epub 1974/04/01.
10. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7. Epub 2006/08/23.
11. Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2005;7(5):393-5. Epub 2005/10/21.
12. Rasmusson I, Ringden O, Sundberg B, Le Blanc K. Mesenchymal stem cells inhibit the formation of cytotoxic T lymphocytes, but not activated cytotoxic T lymphocytes or natural killer cells. *Transplantation*. 2003;76(8):1208-13. Epub 2003/10/28.
13. Nemeth K, Leelahavanichkul A, Yuen PS, Mayer B, Parmelee A, Doi K, et al. Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nature medicine*. 2009;15(1):42-9. Epub 2008/12/23.
14. Jackson WM, Nesti LJ, Tuan RS. Concise review: clinical translation of wound healing therapies based on mesenchymal stem cells. *Stem cells translational medicine*. 2012;1(1):44-50. Epub 2012/12/01.
15. Chiquet-Ehrismann R, Chiquet M. Tenascins: regulation and putative functions during pathological stress. *The Journal of pathology*. 2003;200(4):488-99. Epub 2003/07/08.
16. Blaauboer ME, Emson CL, Verschuren L, van Erk M, Turner SM, Everts V, et al. Novel combination of collagen dynamics analysis and transcriptional profiling reveals fibrosis-relevant genes and pathways. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*. 2013;32(7-8):424-31. Epub 2013/05/08.
17. Smith AN, Willis E, Chan VT, Muffley LA, Isik FF, Gibran NS, et al. Mesenchymal stem cells induce dermal fibroblast responses to injury. *Experimental cell research*. 2010;316(1):48-54. Epub 2009/08/12.

18. Gruber R, Kandler B, Holzmann P, Vogele-Kadletz M, Losert U, Fischer MB, et al. Bone marrow stromal cells can provide a local environment that favors migration and formation of tubular structures of endothelial cells. *Tissue engineering*. 2005;11(5-6):896-903. Epub 2005/07/07.
19. 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;24(4):1020-9. Epub 2005/12/13.
20. Francois 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. *Annals of hematology*. 2007;86(1):1-8. Epub 2006/10/18.
21. IRSN. La stratégie scientifique de l'IRSN. Fontenay-aux-Roses: Institut de Radioprotection et Sûreté Nucléaire, 2015.
22. 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. *Journal of cellular physiology*. 2005;205(2):228-36. Epub 2005/05/12.
23. Chen W, Li M, Cheng H, Yan Z, Cao J, Pan B, et al. Overexpression of the mesenchymal stem cell Cxcr4 gene in irradiated mice increases the homing capacity of these cells. *Cell biochemistry and biophysics*. 2013;67(3):1181-91. Epub 2013/05/29.
24. Zheng K, Wu W, Yang S, Huang L, Chen J, Gong C, et al. Bone marrow mesenchymal stem cell implantation for the treatment of radioactivity-induced acute skin damage in rats. *Molecular medicine reports*. 2015;12(5):7065-71. Epub 2015/09/02.
25. Teo GS, Ankrum JA, Martinelli R, Boetto SE, Simms K, Sciuto TE, et al. Mesenchymal stem cells transmigrate between and directly through tumor necrosis factor-alpha-activated endothelial cells via both leukocyte-like and novel mechanisms. *Stem Cells*. 2012;30(11):2472-86. Epub 2012/08/14.
26. Francois S, Usunier B, Douay L, Benderitter M, Chapel A. Long-Term Quantitative Biodistribution and Side Effects of Human Mesenchymal Stem Cells (hMSCs) Engraftment in NOD/SCID Mice following Irradiation. *Stem cells international*. 2014;2014:939275. Epub 2014/03/29.
27. Francois S, Eder VV, Belmokhtar K, Machet MC, Douay L, Gorin NC, et al. Synergistic effect of human Bone Morphogenetic Protein-2 and Mesenchymal Stromal Cells on chronic wounds through hypoxia-inducible factor-1 alpha induction. *Scientific reports*. 2017;7(1):4272. Epub 2017/06/29.
28. 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. Epub 2013/07/31.
29. Ebrahimian TG, Pouzoulet F, Squiban C, Buard V, Andre M, Cousin B, et al. Cell therapy based on adipose tissue-derived stromal cells promotes physiological and pathological wound healing. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2009;29(4):503-10. Epub 2009/02/10.
30. Linard C, Tisedre F, Busson E, Holler V, Leclerc T, Strup-Perrot C, et al. Therapeutic potential of gingival fibroblasts for cutaneous radiation syndrome: comparison to bone marrow-mesenchymal stem cell grafts. *Stem cells and development*. 2015;24(10):1182-93. Epub 2015/01/15.
31. Eming SA, Martin P, Tomic-Canic M. Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling, and translation. *Science translational medicine*. 2014;6(265):265sr6. Epub 2014/12/05.
32. Bray FN, Simmons BJ, Wolfson AH, Nouri K. Acute and Chronic Cutaneous Reactions to Ionizing Radiation Therapy. *Dermatology and therapy*. 2016;6(2):185-206. Epub 2016/06/03.

33. Peter RU. Diagnosis and treatment of cutaneous radiation injuries. In: Panizzon RG, Seegenschmiedt, M.H., editor. Radiation treatment and radiation reactions in dermatology, 2nd ed. Berlin: Springer; 2015. p. 185-8.
34. Jacobson LK, Johnson MB, Dedhia RD, Niknam-Bienia S, Wong AK. Impaired wound healing after radiation therapy: A systematic review of pathogenesis and treatment. *JPRAS Open*. 2017;13:92-105.
35. Kim JH, Kolozsvary AJ, Jenrow KA, Brown SL. Mechanisms of radiation-induced skin injury and implications for future clinical trials. *International journal of radiation biology*. 2013;89(5):311-8. Epub 2013/01/12.
36. Maxson S, Lopez EA, Yoo D, Danilkovitch-Miagkova A, Leroux MA. Concise review: role of mesenchymal stem cells in wound repair. *Stem cells translational medicine*. 2012;1(2):142-9. Epub 2012/12/01.
37. Nicolay NH, Lopez Perez R, Debus J, Huber PE. Mesenchymal stem cells - A new hope for radiotherapy-induced tissue damage? *Cancer letters*. 2015;366(2):133-40. Epub 2015/07/15.
38. Rodgers K, Jadhav SS. The application of mesenchymal stem cells to treat thermal and radiation burns. *Advanced drug delivery reviews*. 2018;123:75-81. Epub 2017/10/17.
39. Hocking AM, Gibran NS. Mesenchymal stem cells: paracrine signaling and differentiation during cutaneous wound repair. *Experimental cell research*. 2010;316(14):2213-9. Epub 2010/05/18.
40. Gnecci M, Zhang Z, Ni A, Dzau VJ. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circulation research*. 2008;103(11):1204-19. Epub 2008/11/26.
41. Zhang B, Wang M, Gong A, Zhang X, Wu X, Zhu Y, et al. HucMSC-Exosome Mediated-Wnt4 Signaling Is Required for Cutaneous Wound Healing. *Stem Cells*. 2015;33(7):2158-68. Epub 2014/06/26.
42. Zhang B, Wu X, Zhang X, Sun Y, Yan Y, Shi H, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cell exosomes enhance angiogenesis through the Wnt4/beta-catenin pathway. *Stem cells translational medicine*. 2015;4(5):513-22. Epub 2015/04/01.
43. Agay D, Scherthan H, Forcheron F, Grenier N, Herodin F, Meineke V, et al. Multipotent mesenchymal stem cell grafting to treat cutaneous radiation syndrome: development of a new minipig model. *Experimental hematology*. 2010;38(10):945-56. Epub 2010/07/06.
44. 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. Epub 2012/02/22.
45. Riccobono D, Agay D, Scherthan H, Forcheron F, Vivier M, Ballester B, et al. Application of adipocyte-derived stem cells in treatment of cutaneous radiation syndrome. *Health physics*. 2012;103(2):120-6. Epub 2012/09/07.
46. 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 translational medicine*. in press.
47. 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. *Regenerative medicine*. 2007;2(5):785-94. Epub 2007/10/03.
48. IAEA. The radiological accident in Nueva Aldea. Vienna: International Atomic Energy Agency; 2009. 88 p.
49. IAEA. Medical management of radiation injuries. Vienna: International Atomic Energy Agency; A paraître.
50. IAEA. Generic Procedures for Medical Response During a Nuclear or Radiological Emergency Vienna: International Atomic Energy Agency; A paraître.

51. Tarte K, Gaillard J, Lataillade JJ, Fouillard L, Becker M, Mossafa H, et al. Clinical-grade production of human mesenchymal stromal cells: occurrence of aneuploidy without transformation. *Blood*. 2010;115(8):1549-53. Epub 2009/12/25.
52. IAEA. *Diagnosis and treatment of radiation injuries*. Vienna: International Atomic Energy Agency; 1998.
53. Stricklin D, Pellmar T, Oldson D, Millage K. *Combined Injury Modeling: Radiation and Burn Workshop Report*. Arlington, VA: Defense Threat Reduction Agency, 2010.
54. Stricklin D, Pellmar T, Oldson D, Millage K. *Combined Injury Modeling: Radiation and Burn Workshop Report*. Defense Threat Reduction Agency, 2010.
55. Kiang JG, Gorbunov NV. Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Increase Survival after Ionizing Irradiation Combined with Wound Trauma: Characterization and Therapy. *J Cell Sci Ther*. 2014;5(6).
56. Benderitter M, Caviggioli F, Chapel A, Coppes RP, Guha C, Klinger M, et al. Stem cell therapies for the treatment of radiation-induced normal tissue side effects. *Antioxidants & redox signaling*. 2014;21(2):338-55. Epub 2013/10/24.
57. Foubert P, Squiban C, Holler V, Buard V, Dean C, Levy BI, et al. Strategies to Enhance the Efficiency of Endothelial Progenitor Cell Therapy by Ephrin B2 Pretreatment and Coadministration with Smooth Muscle Progenitor Cells on Vascular Function During the Wound-Healing Process in Irradiated or Nonirradiated Condition. *Cell transplantation*. 2015;24(7):1343-61. Epub 2013/09/28.
58. Ebrahimian TG, Squiban C, Roque T, Lugo-Martinez H, Hneino M, Buard V, et al. Plasminogen activator inhibitor-1 controls bone marrow-derived cells therapeutic effect through MMP9 signaling: role in physiological and pathological wound healing. *Stem Cells*. 2012;30(7):1436-46. Epub 2012/05/10.
59. 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 : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*. 2010;18(1):50-8. Epub 2010/01/20.
60. Tamarat R, Lataillade JJ, Bey E, Gourmelon P, Benderitter M. Stem cell therapy: from bench to bedside. *Radiation protection dosimetry*. 2012;151(4):633-9. Epub 2012/09/13.

Pour tout renseignement :

IRSN  
Pôle santé- environnement

31, avenue de la Division Leclerc  
92262 Fontenay-aux-Roses cedex

Téléphone : +33 (0)1 58 35 88 88

Mail : [contact@irsn.fr](mailto:contact@irsn.fr)

N° du rapport : PSE-SANTE/SERAMED/2017-00036

Tous droits réservés IRSN

Juin 2018



Siège social

31, avenue de la Division Leclerc  
92260 Fontenay-aux-Roses  
RCS Nanterre B440 546 018  
Téléphone : +33 (0)1 58 35 88 88

Courrier : BP 17 – 92262 Fontenay-aux-Roses Cedex

Site internet : [www.irsn.fr](http://www.irsn.fr)