



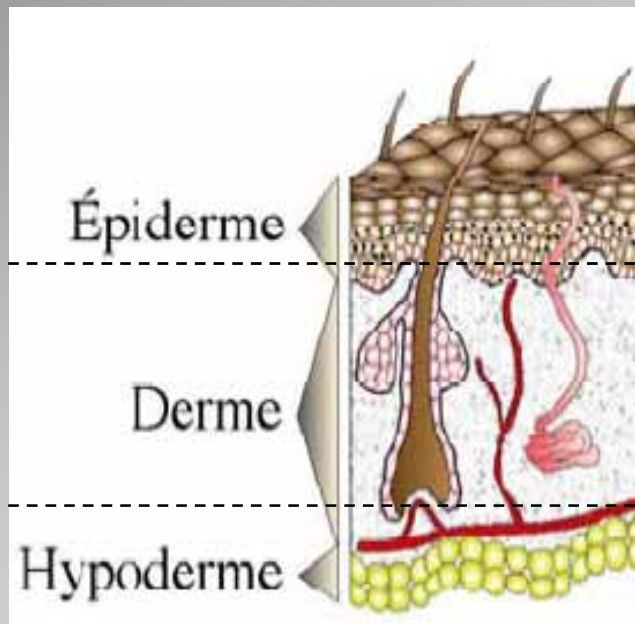
Congrès CREUF/CARUM 28-30 Nov. 2007



THERAPIE CELLULAIRE DES BRÛLURES GRAVES

*Médecin en Chef LATAILLADE J-J
- Laboratoire de Recherche et de Thérapie Cellulaire -
Centre de Transfusion Sanguine des Armées
Clamart*

La PEAU: un réservoir à cellules souches !

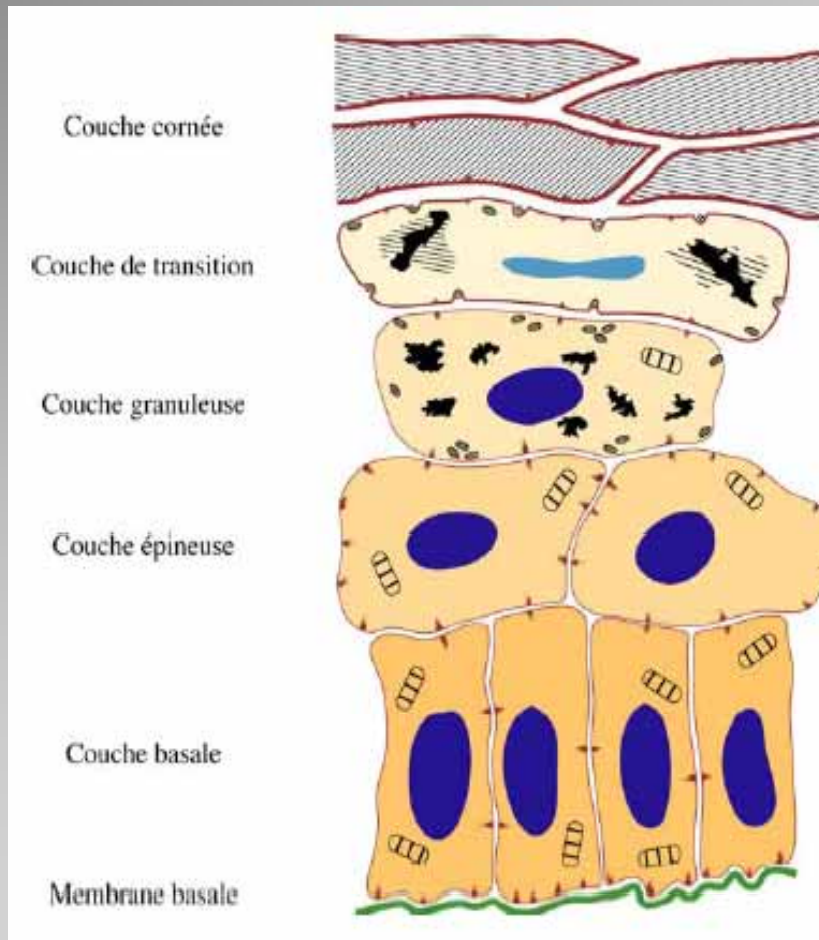


Cellules Souches Epidermiques
(Kératinocytes)

Cellules Souches Fibroblastiques
Cellules Souches du Follicule Pileux

Cellules Souches Mésenchymateuses
du
Tissu Adipeux

L'Epiderme est renouvelé tout au long de la Vie



Kératinocytes différenciés

Progéniteurs Epidermiques

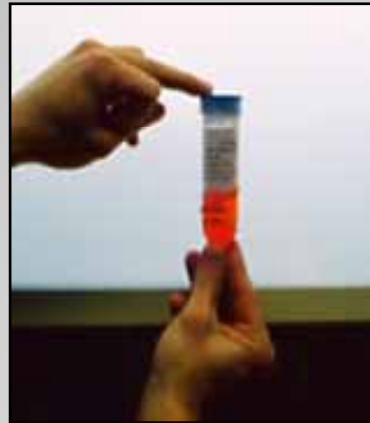
Cellules Souches Epidermiques

Stratégie d'isolement des Cellules Souches Epidermiques



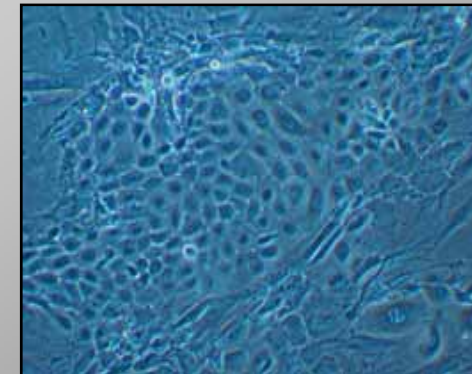
Biopsie de Peau

Digestion
→
Enzymatique



Suspension Cellulaire
Totale

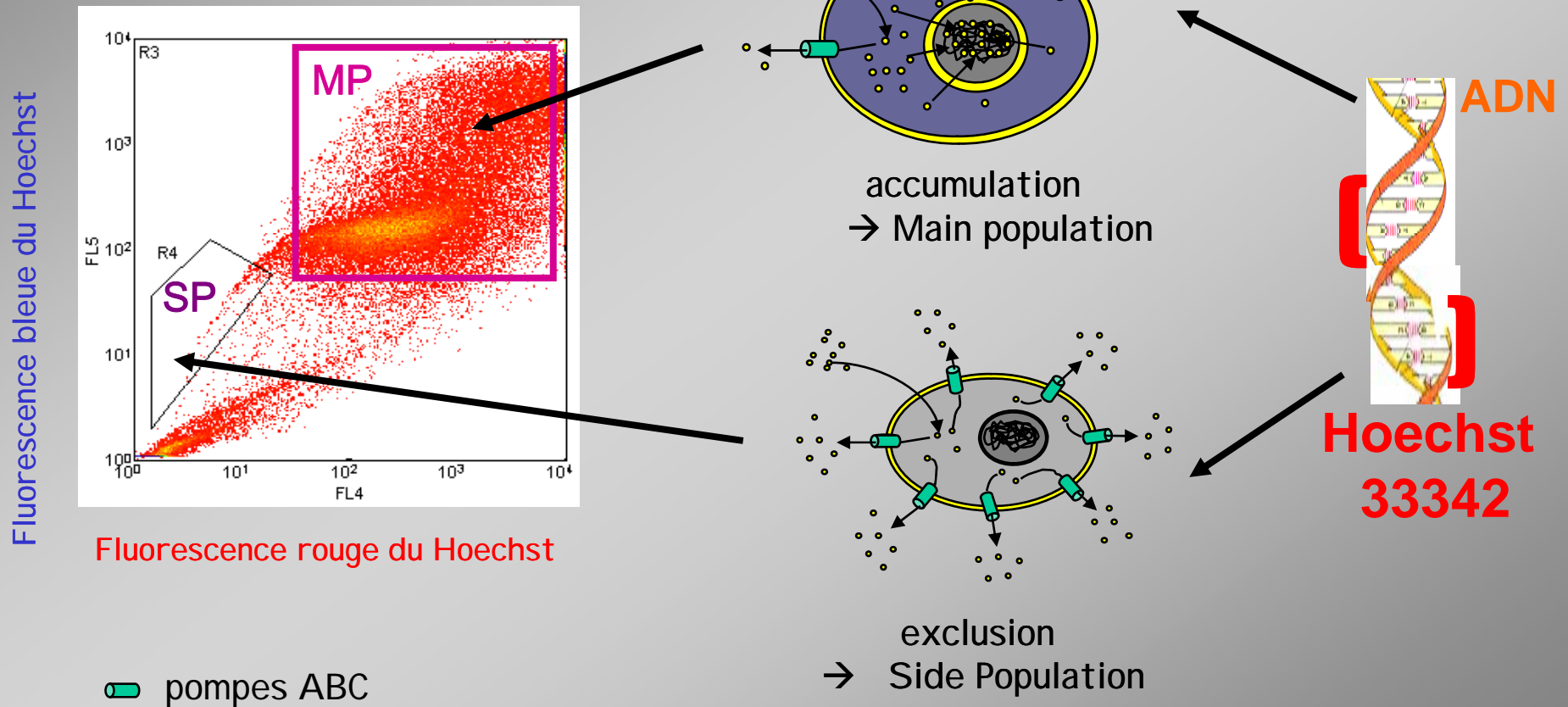
Culture
→
sur 3T3



Kératinocytes

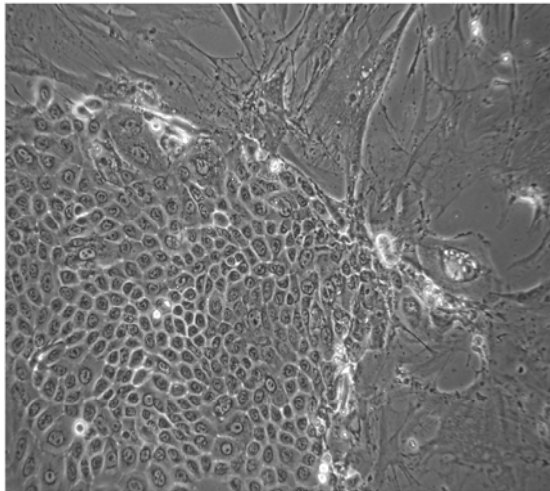
Technique de Green (1975)

Des Cellules Souches qui excluent les drogues : cellules SP

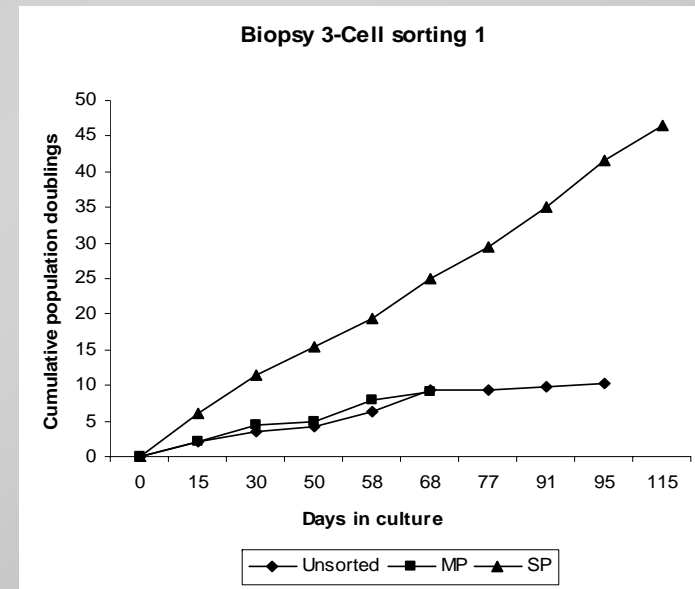


SP Kératinocytes: un haut pouvoir prolifératif

(B) SP keratinocytes at passage 11 after cell sorting



Formation de colonies prolifératives après tri



cultures à long terme

Thérapie Cellulaire du Grand Brûlé: Cultures d'Epiderme Autologues



excision

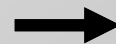
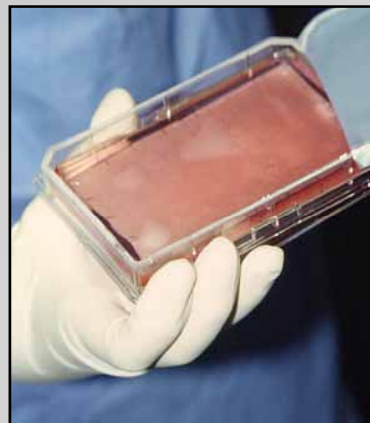


Culture Primaire
Kératinocytes (8-10j)



Culture Secondaires
Kératinocytes (16-24j)

Greffon
Epiderme

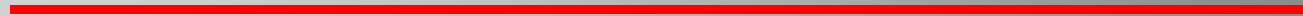


Pose des
greffons



Epidermes Autologues de Culture: 20 ans après?

- . Qualité de la cicatrisation: bulles, rétractions...
- . Immaturité du derme: mauvaise jonction dermo-épidermique
- . Pas d'annexe épidermique
- . Qualité des greffons: population totale de kératinocytes. Pas de test prédictif de prise ou non de la greffe.
- . Pas ou peu d'évolution du Procédé : 3T3 murines, très artisanal, non clos...



L'OREAL/SSA: un Partenariat Tourné vers le Grand Brûlé

Objectifs:

Créer une Unité de Thérapie Cellulaire Cutanée
Améliorer les greffes d'épiderme autologue cultivé



- *Enrichir le greffon en cellules souches épithéliales*
 - *Traiter le Derme*
 - *Adapter le Process aux Normes Européennes de Thérapie Cellulaire*
 - *Ajouter d'autres types de cellules souches: intérêt des CSM*
-

Cellule Souche Mésoenchymateuse: pluripotente



Prolifération



Différenciation



Ostéocytes



Chondrocytes



Myotubes



Stroma



Fibroblastes



Cellule Endo

Maturation



Cartilage



Os



Muscle



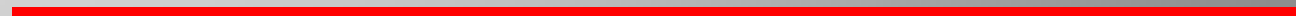
Moelle



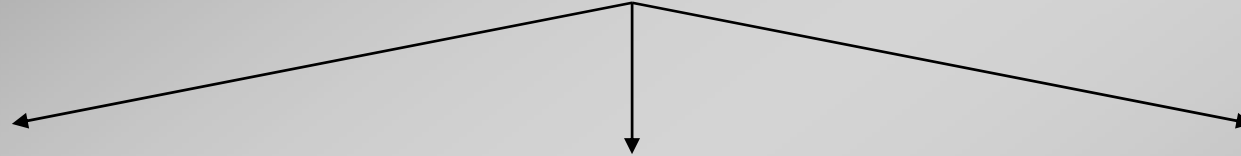
Tendon



Endothélium



Cellule Souche Mésenchymateuse: Cellule Médicament?



Immunomodulateur:

*Prévention et traitement
de la GVH (Inhibition de la
prolif des LyT: rôle de TGF
beta HGF et IDO)*

Anti-inflammatoire

Anti-fibrosant:

*Modèles animaux / schémie
/Reperfusion Rénale, cardiaque
(modulation de cytokines pro- et
anti-inflammatoires, rôle
antagoniste IL1R)*

Trophique:

*Production de nombreux
facteurs de croissance et
chimiokines*

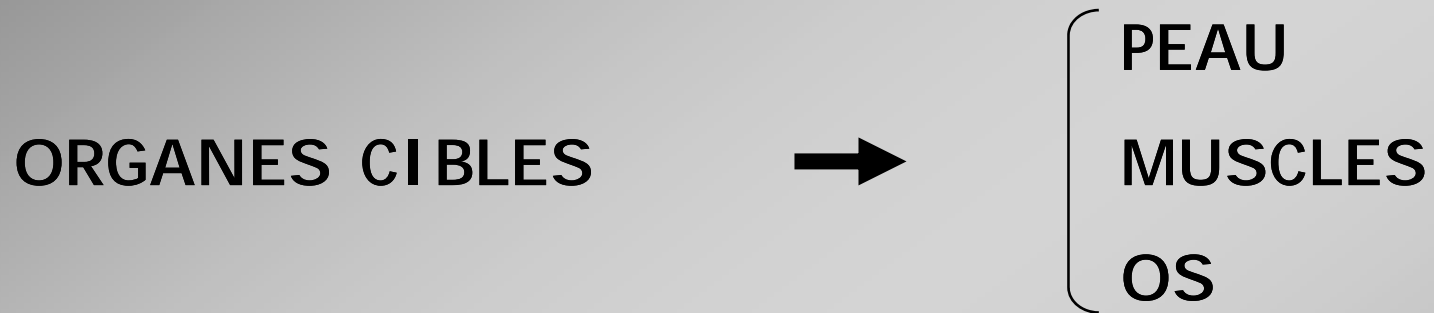
Intérêt dans le traitement de la brûlure ?

La Brûlure Radiologique

Dose Unique, Débit de Dose Elevé

- 4 - 5 Gy : DEPI LATION TRANSITOIRE
 - 6 - 12 GY : ERYTHÈME , PUIS PI GMENTATI ON
 - 12 - 15 GY : DESQUAMATI ON SÈCHE, AVEC ÉRYTHÈME
 - 15 - 25 GY : DESQUAMATI ON EXSUDATI VE
 - > 25 GY : RADI ONÉCROSE
-

La Brûlure Radiologique



- Mort Mitotique des Kératinocytes et des Fibroblastes
- Désordres chroniques des Communications Intercellulaires
- Cascades auto-entretenues de Cytokines Pro-inflammatoires

= SYNDROME CUTANE d'IRRADIATION

« INTERNATIONAL CONFERENCE OF CONSENSUS »
CLASSICAL TREATMENT OF
CUTANEOUS RADIOLOGIC SYNDROME

1/ Conservative treatment for superficial lesions of distal extremities

2/ Surgery for painful deep ulcerations and necrosis

* *Ulcerectomy*

* *Necrectomy*

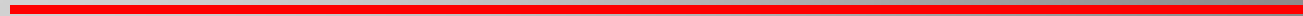
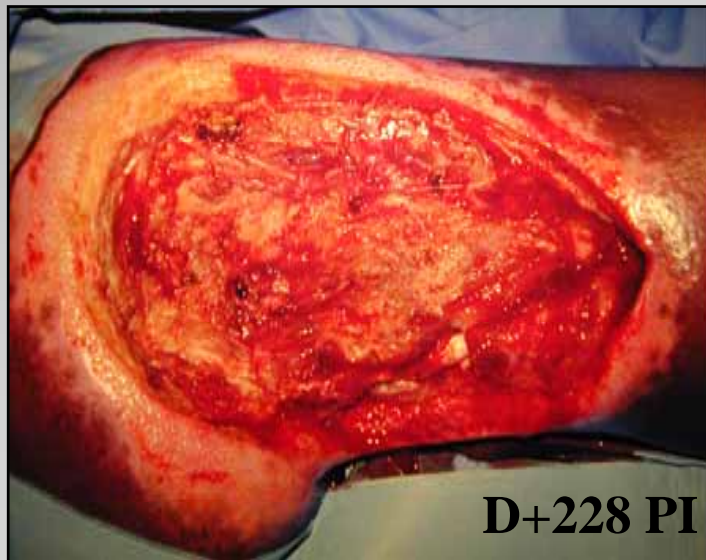
* *Wound closure by rotation flap*

* *Amputation*

3/ In cases of profound and large necrosis, the lesion should be excised and the wound bed should be covered with a good quality, full-thickness skin graft

Accident d'irradiation (1999)

- Traitement chirurgical
- Pas de thérapie cellulaire disponible



Etudes pré-cliniques

lésions cutanées d'irradiation chez la souris
NOD/SCID traitée ou non par CSM



6 weeks

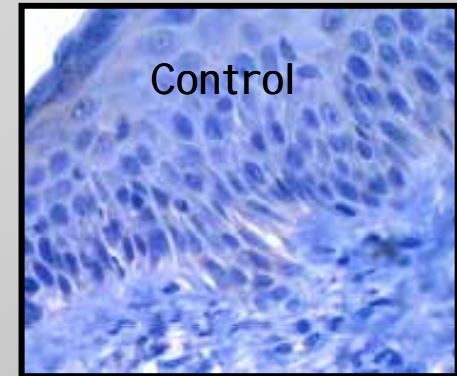


8 weeks



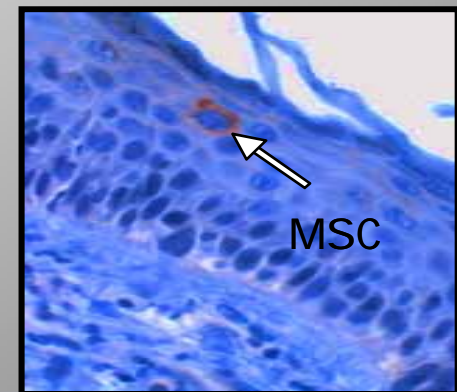
30 Gy

30 Gy
+ MSC



Control

3 weeks



MSC

Meilleure cicatrisation chez les souris traitées

Expansion des CSM en Milieu Optimisé

Platelet Lysates Promote Mesenchymal Stem Cell Expansion: A Safety Substitute for Animal Serum in Cell-Based Therapy Applications

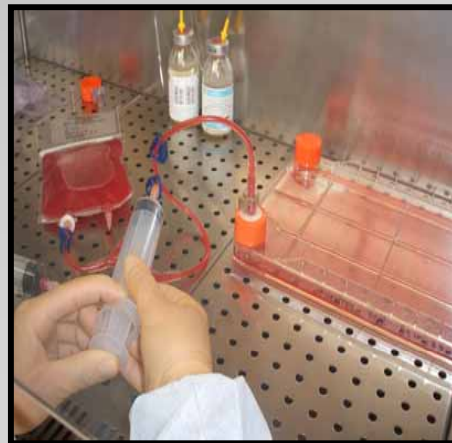
CHRISTELLE DOUCET,¹ ISABELLE ERNOU,¹ YIZHOU ZHANG,² JEAN-ROCH LLENSE,¹ LAURENT BEGOT,³ XAVIER HOLY,³ AND JEAN-JACQUES LATAILLADE^{1*}



Préparation du milieu MEMa + 8% LP



Moelle osseuse totale



Ensemencement des cellules en Flasque 2 étages (636 cm²/étage)

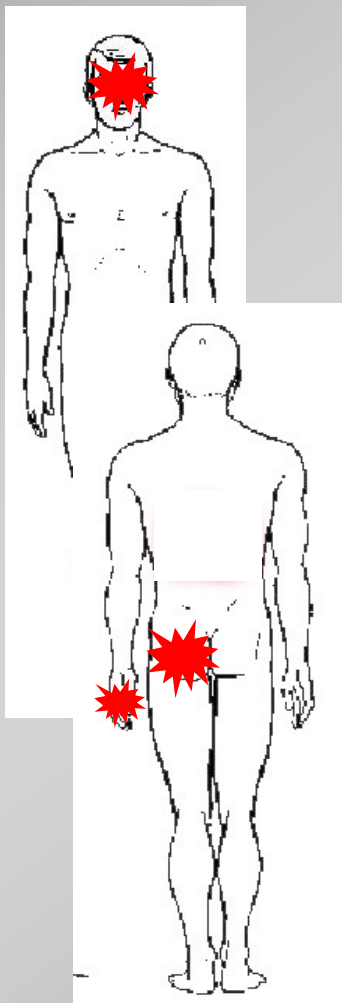


[Doucet C. et al., J. Cell Physiol. 2005]

Accident Irradiation du Chili (2005)



Iridium 192,
Source 3,3 TBq



Face

J+ 34 PI



J+ 25 PI



J+ 34 PI

Main



J+ 4 PI



J+ 18 PI

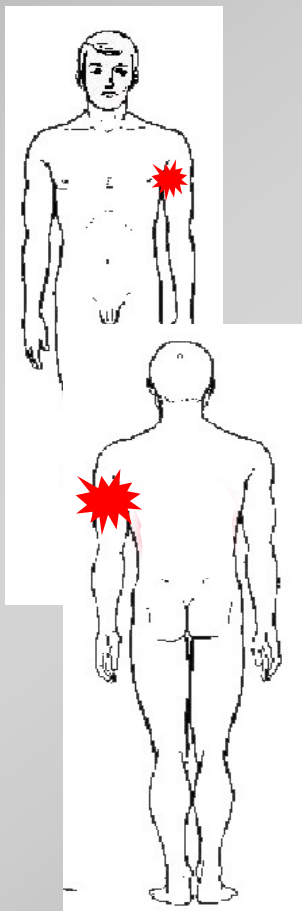
Fesse

Irradiation Localisée

Accident Irradiation de Dakar (2006)



Gammagraphy system
Iridium 192



Bras



Aisselle
(J +20 PI)

Irradiation Localisée (45 Grays)

Evolution des Lésions



J +43 PI cicatrisation de la
Lésion axillaire



J +63 PI Ulcération et Nécrose de
la face post du bras

Quelle nouvelle approche thérapeutique ?

1^{er} cas (chilien)



Desquamation humide et ulcérée de la main: douleurs ++++

>>> injection locale de MSC & autogreffe d'épiderme (J +42)



Ulcération et nécrose de la fesse

>>> Excision chir précoce guidée par la dosimétrie (J + 21PI) & injection locale de CSM (2 administrations: J + 90 et + 98PI)

Autogrefe Epidermique + CSM



76×10^6
CSM autologues

Integra®
artificial
derma

Evolution des lésions



1 mois



2 mois



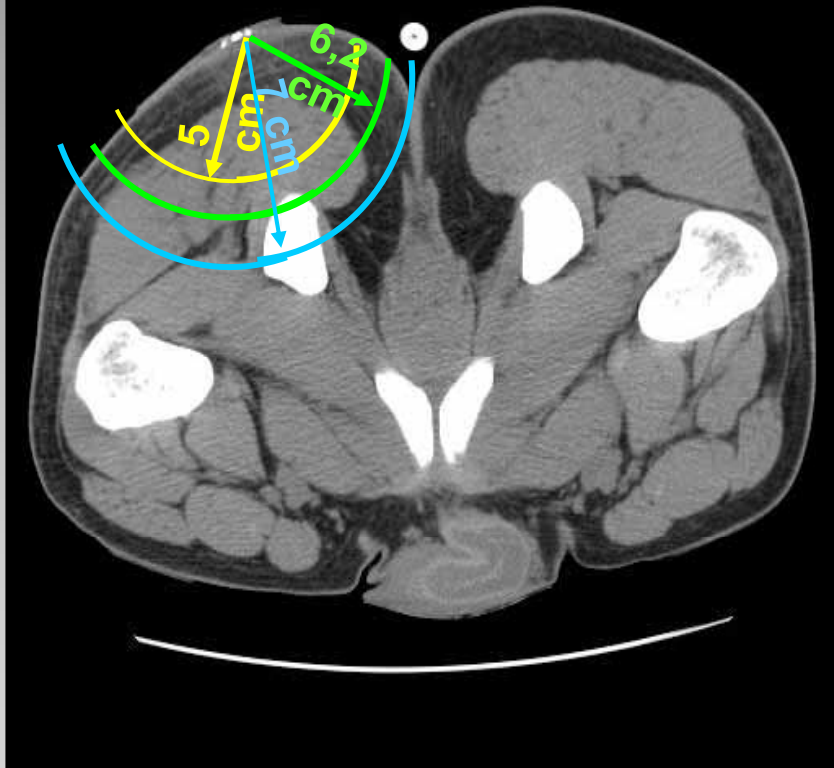
1 an

Post greffe

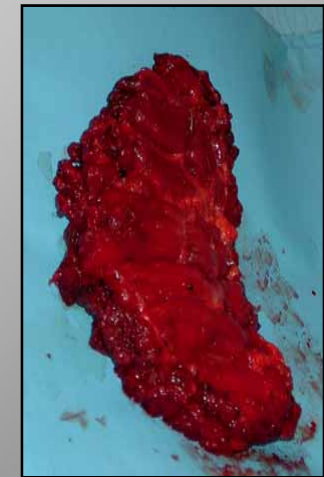
Traitement des lésions de la fesse

20 Gy Isodose for

- 10 minutes
- 15 minutes
- 20 minutes



excision 10 cm diamètre
= 20 Gy isodose



Exérèse cutanée et musculaire
à J+21 PI

Administration de CSM



Autogreffe de peau



1^{ère} injection de 168×10^6 CSM

Evolution de la lésion de la fesse



Mars 2006



Août 2006



Novembre 2007

Quelle nouvelle approche thérapeutique ?

2^{ème} cas (africain)



Excision des tissus nécrotiques
(J+172 PI)

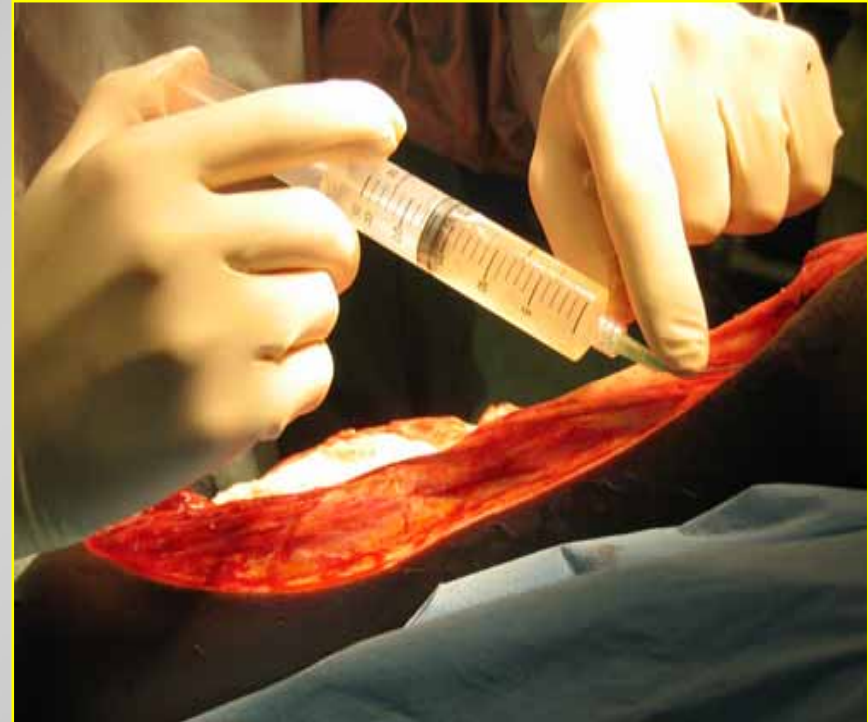


Pièce chirurgicale

Chirurgie + CSM (J 191 PI)



Lambeau Grand Dorsal



1^{ère} injection de CSM
($143 \cdot 10^6$)

Evolution clinique



4^{ème} implantation
de CSM (152.10^6)
(J 239 PI)

5^{ème} implantation
de CSM (184.10^6)
(J 268 PI)



J+240 PI (26 Mars 2007)

Effacité Thérapeutique



Chirurgie précoce
Autogreffe de peau
+ CSM



Excision Chirurgicale
Recouvrement cutané
Lambeau musculaire + CSM

Rôle des CSM ?

Effet anti-
inflammatoire + apport
local de facteurs de
croissance

et/ou

Trans-différenciation
épithéliale ?

*(Han Chun-mao et al.,
Differentiation, 2007)*

[Lataillade J-J et al., Regen. Med. 2007]

La Peau: une Alternative au Clonage Thérapeutique?

Researchers Turn Skin Cells Into Stem Cells

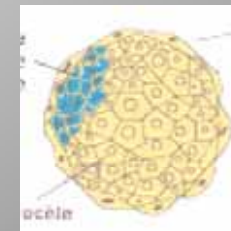
By Gretchen Vogel
ScienceNOW Daily News
20 November 2007

Scientists have managed to reprogram human skin cells directly into cells that look and act like embryonic stem (ES) cells. The technique makes it possible to generate patient-specific stem cells to study or treat disease without using embryos or oocytes--and therefore could bypass the ethical debates that have plagued the field. "This is like an earthquake for both the science and politics of stem cell research," says Jesse Reynolds, policy analyst for the Center for Genetics and Society in Oakland, California.



Fibroblaste
dermique

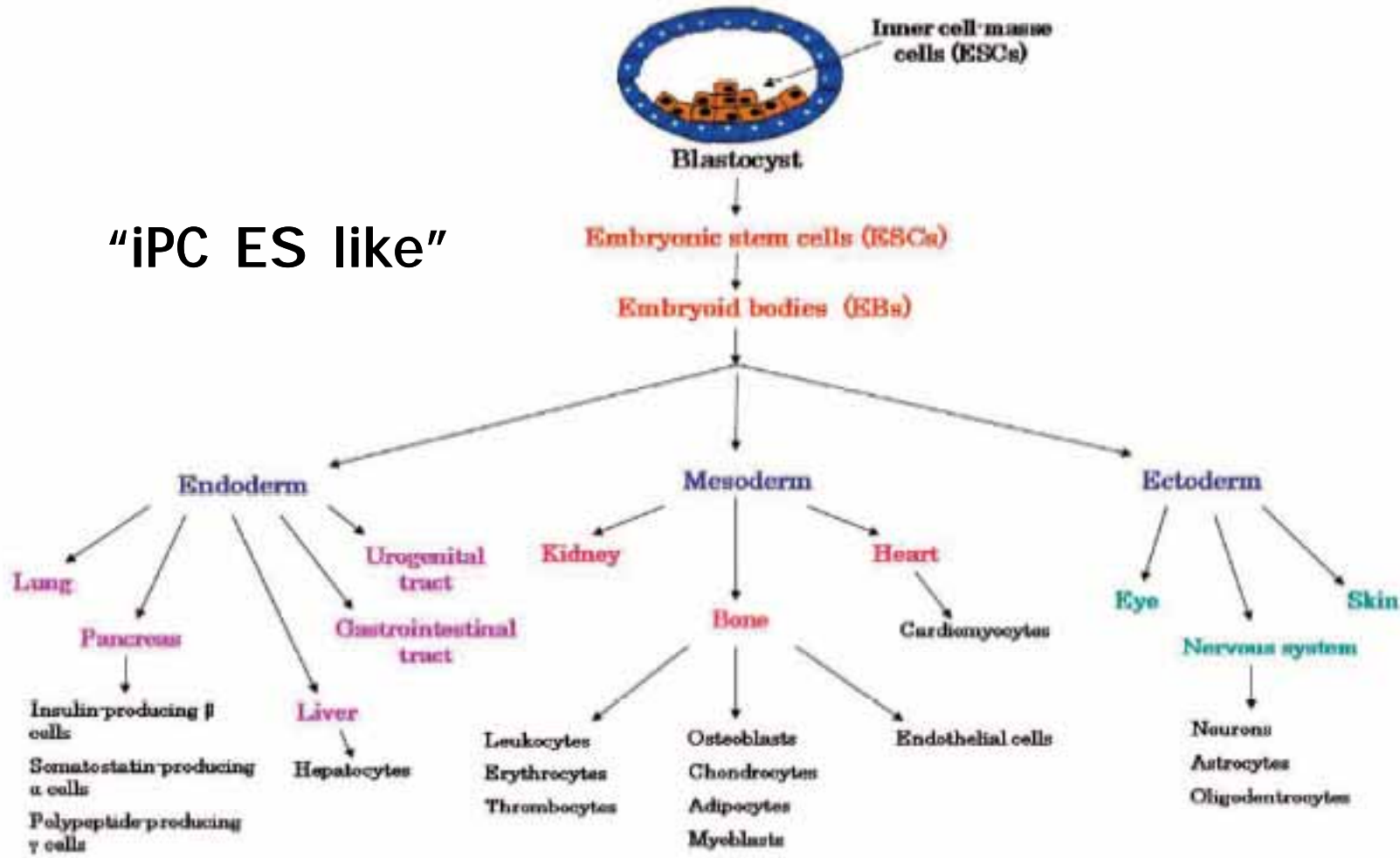
Transfert de gènes *Oct4*,
Sox2, *NANOG*, *LIN28*
(*Lentivirus*)



Induced
Pluripotent Cell
(iPC) = ES Like

La Peau: un Tissu Précieux mais Tellement Vulnérable !

“iPC ES like”



Remerciements

IRSN

Pr Gourmelon,
Drs Bottellier,
Roy, Chapel,
Benderitter...

CTSA

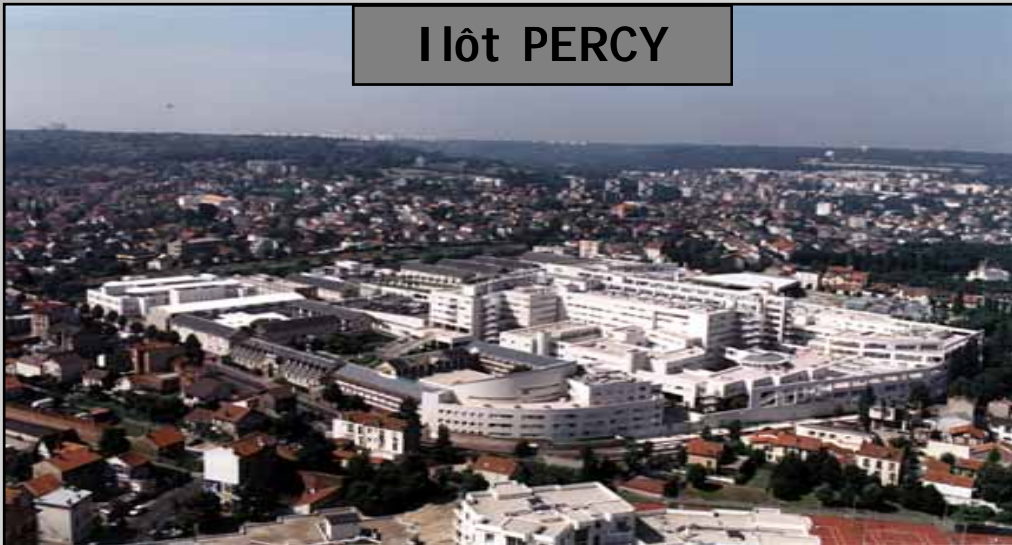
Pr Joussemet
Dr Lataillade
Dr Prat,
I Ernou, M Gourven,
F Tissedre L Boutin,
C Ait-Mansour

HIA PERCY

Hematologie
Pr De Revel

Chirurgie
Drs Bey, Pradier,
Duhamel, Fossat

Ilôt PERCY



CTB



Dr Carsin
Dr Lebever