



THÉRAPIE CELLULAIRE DES BRÛLURES CUTANÉES

Institut de Recherche Biomédicale des Armées (IRBA)
Unité de Thérapie Cellulaire et Réparation Tissulaire (TCRT)
Antenne Centre de Transfusion Sanguine des Armées
1 rue du lieutenant Raoul Batany
BP 410
92141 CLAMART cedex

31/03/2016

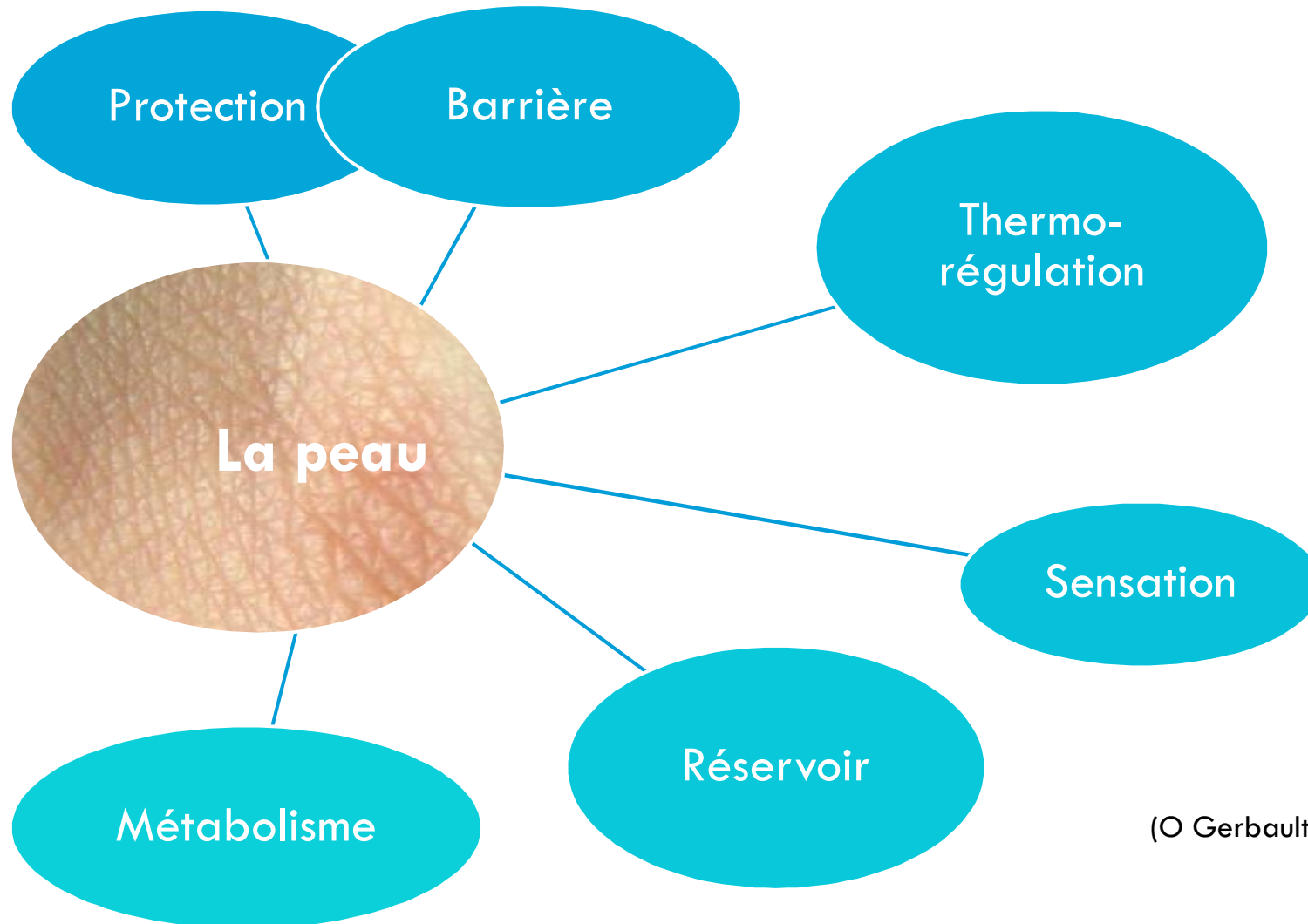
Marina Trouillas, PhD, trouillasmarina@gmail.com, 01.41.46.72.09

Plan

2

1. Introduction sur la brûlure
 - a. Généralités sur la peau
 - b. La brûlure (Définition, physiopathologie, conséquences)
 - c. Réparation cutanée
2. Prise en charge classique d'une brûlure thermique
3. Alternatives: Utilisation de substituts cutanés produits par ingénierie tissulaire
 - a. Les substituts épidermiques
 - b. Les substituts de peau totale
4. L'utilisation des CSM pour la réparation cutanée
5. Utilisation de nouvelles technologies : 3D bioprinting

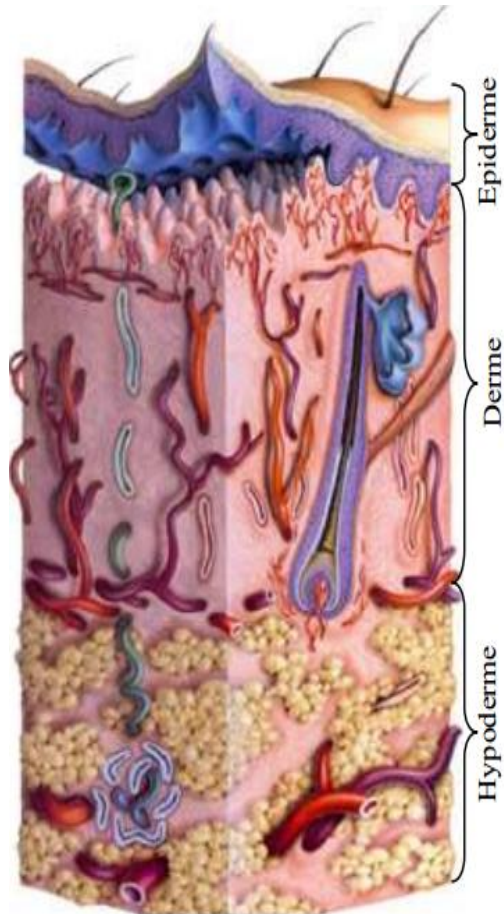
1.a. Introduction – La Peau



(O Gerbault, 1999)

1.a. Introduction - la peau

4



Coupe de peau
d'après Géras, In Dermatology, 1990

Epiderme

- "Protection (couche cornée)
- "Sensibilité (quelques terminaisons)
- "Cicatrisation

Derme

- "Élasticité
- "Sensibilité
- "Vascularisation
- "Régulation thermique
- "Qualité de la cicatrice

Hypoderme

- "Amortissement
- "Protection thermique

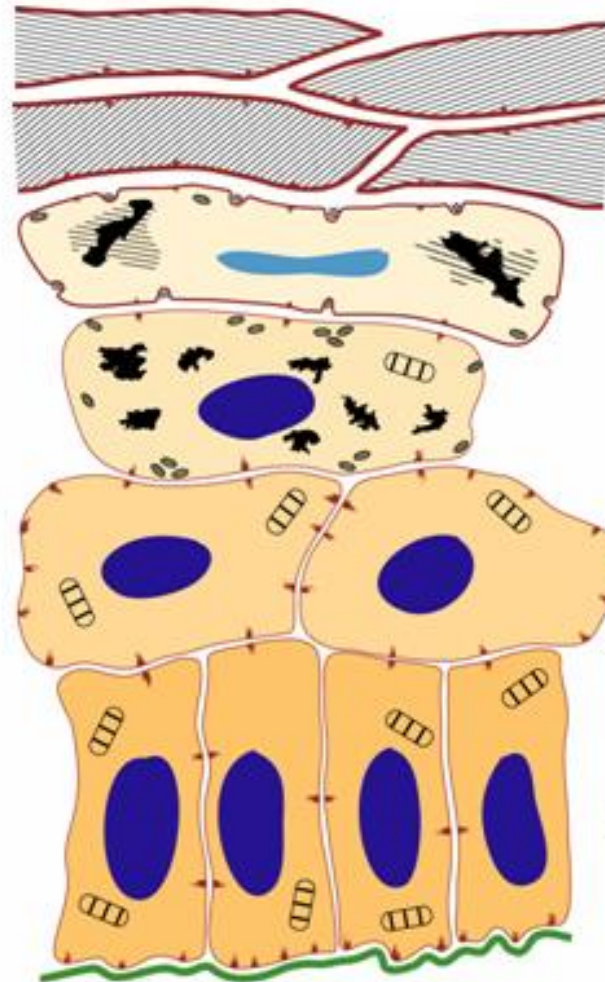
1.a. Introduction – l'épiderme

5

Stade de différenciation

Lavoie et al., 2009

Couche cornée
Couche de transition
Couche granuleuse
Couche épineuse
Couche basale
Membrane basale



Loricrine
Filaggrine
Involucrine

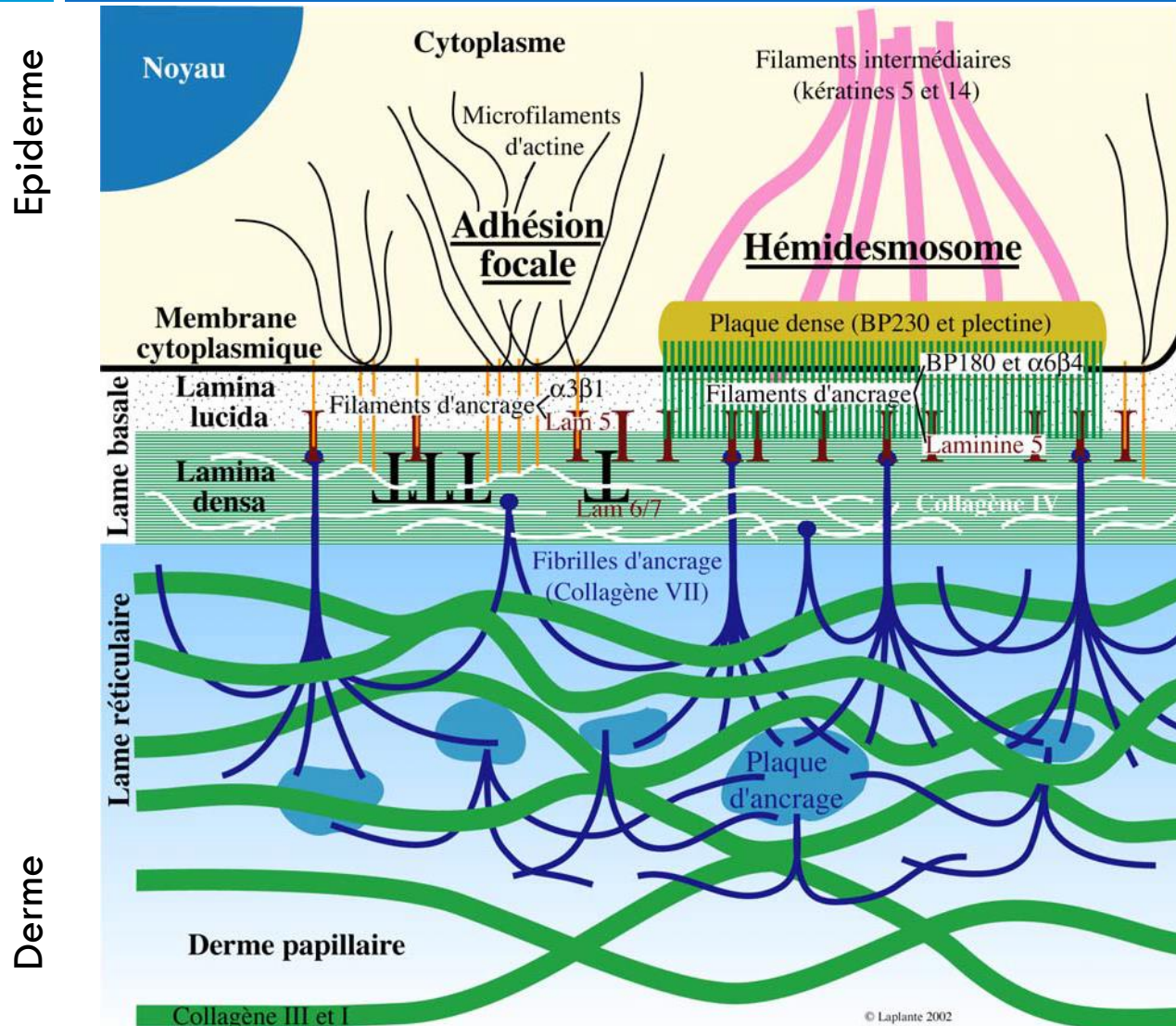
K1, **K10**
Kératohyaline
Loricrine
Profilaggrine
Involucrine

K1, **K10**

Ki67, K5, K14, K19, K15
Intégrines

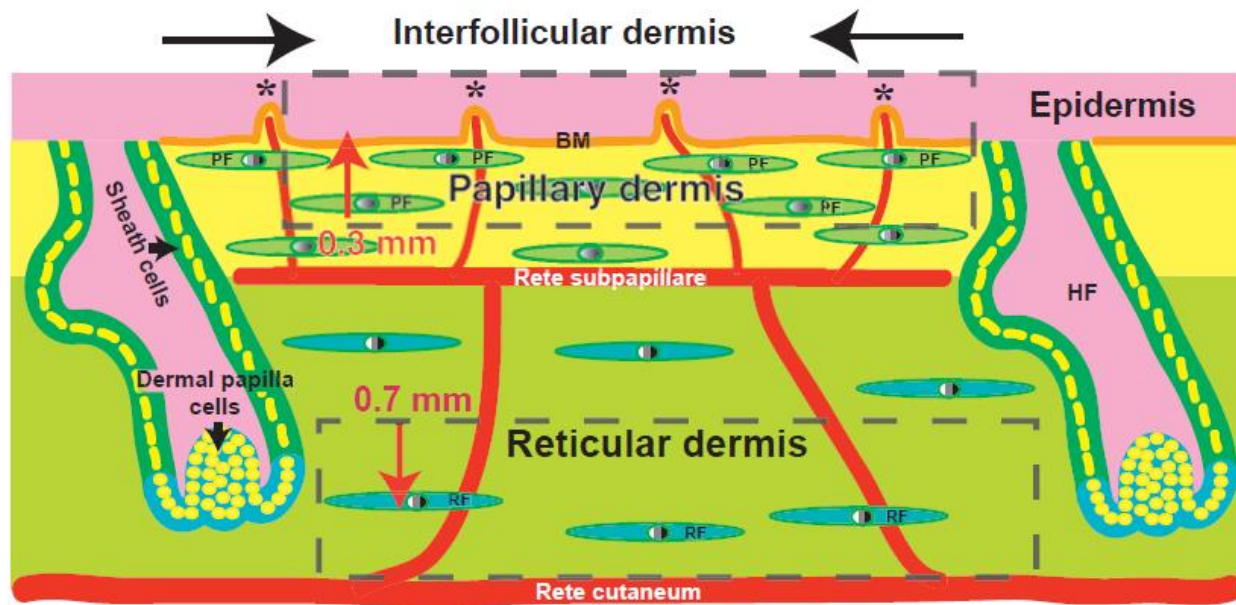
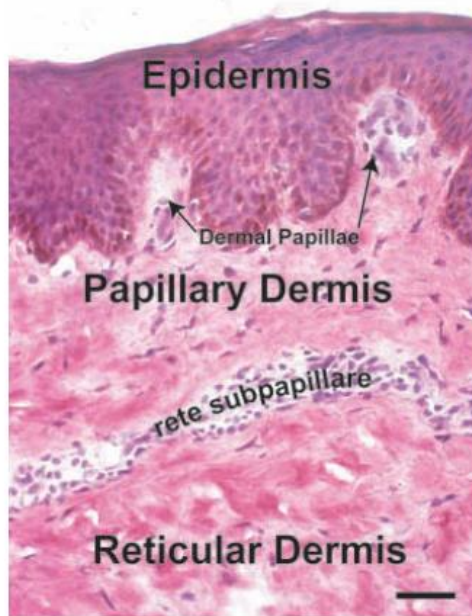
Collagène IV et VII, Laminine
3-3-2, perlecan, etc..

1.a. La jonction dermo-épidermique



Nie 2012: “BM plays a substantial role in cellular communications and maintains the stem cell-like qualities of undifferentiated keratinocytes “

1.a. Le derme



Sorrell & Caplan, 2004

1.b. Introduction – La brûlure

8

□ Les types de brûlure

Brûlures par flammes



Brûlures par liquides



Brûlures thermiques : contact



Brûlures chimiques



Brûlures électriques



Brûlures radio-induites



Brûlures mécaniques



Ces malades ont en commun de ~~de~~ avoir perdu toute ou une partie de leur peau, et ne seront guéris que lorsque cette peau sera reconstituée

1.b. Introduction – La brûlure

9

- 11 824 patients hospitalisés pour brûlures en 2011:
 - 10% de séjours pour brûlure grave
 - Durée moyenne de séjour pour les brûlures graves: 34 jours(Pasquereau A., Thélot B., InVs, 2014)

- Séquelles : problèmes fonctionnels, esthétiques, psychologiques et/ou relationnels (Echinard 2010)



Grand brûlé



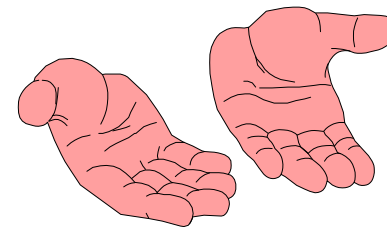
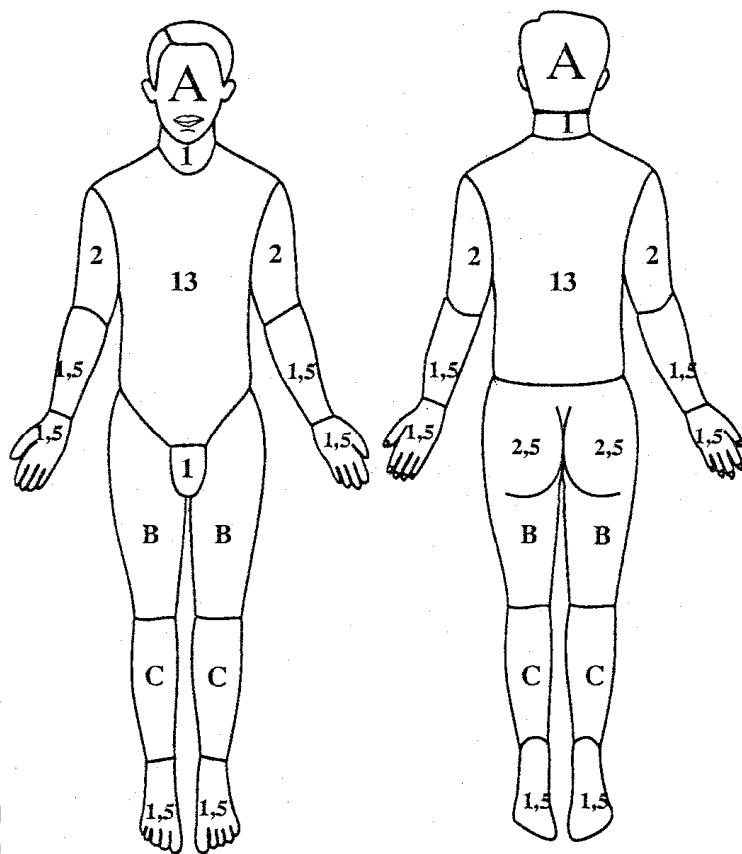
Excision des tissus brûlés



Cicatrices suite à une brûlure

1.b. Introduction – La brûlure

□ Evaluation de la surface brûlée



Face palmaire de la main

=

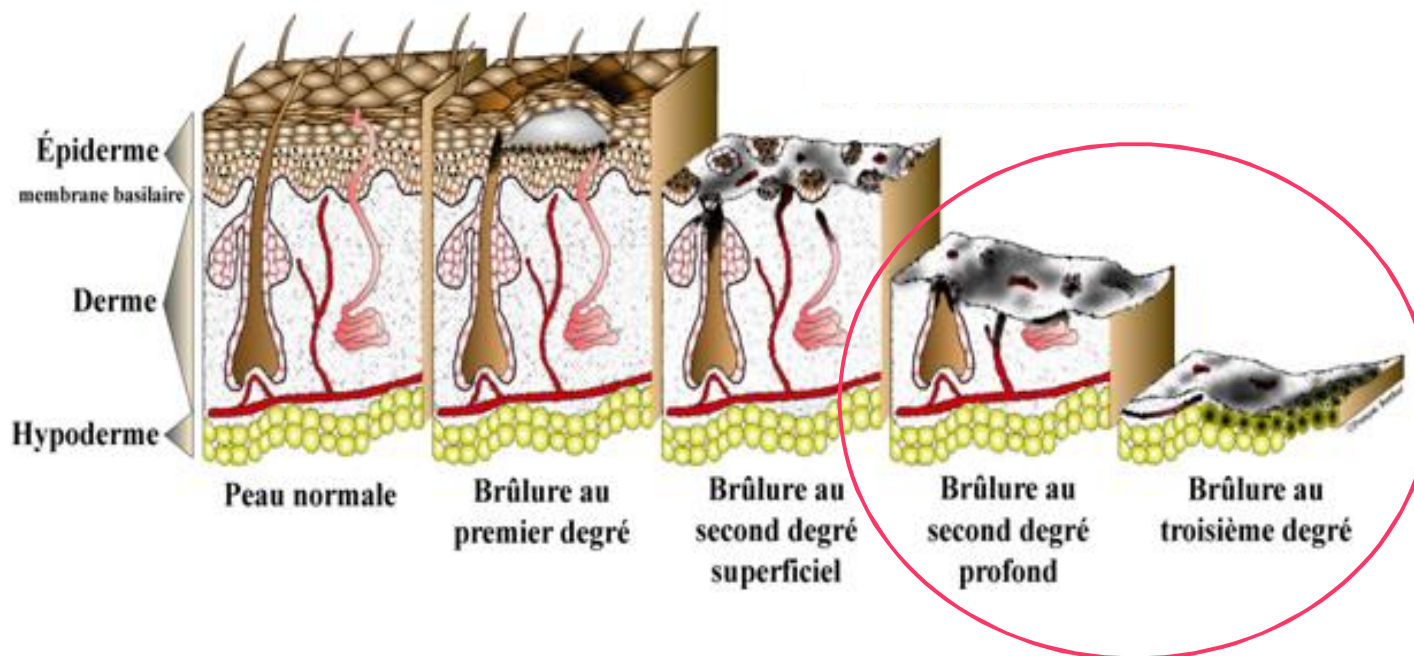
1 % de la surface corporelle

Règle des 9 de Wallace

SITE	% de la surface totale
Tête et cou	1 x 9 %
Membres supérieurs (chacun)	1 x 9 %
Membres inférieurs (chacun)	2 x 9 %
Tronc (faces ant. et post.)	4 x 9 %
Périnée	1 %

1.b. Introduction – La brûlure

□ Degrés de brûlure

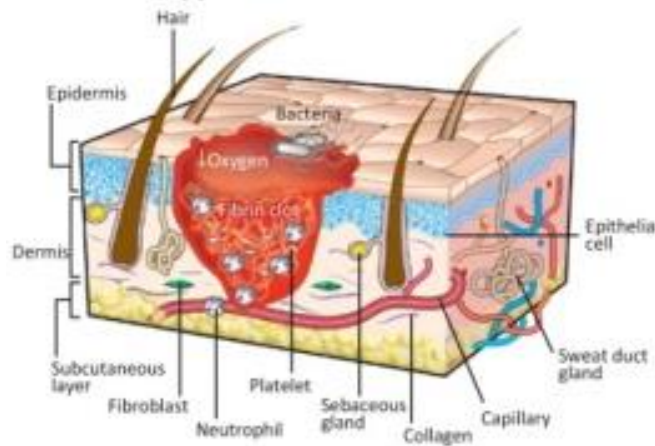


Peu ou pas de
régénération
possible

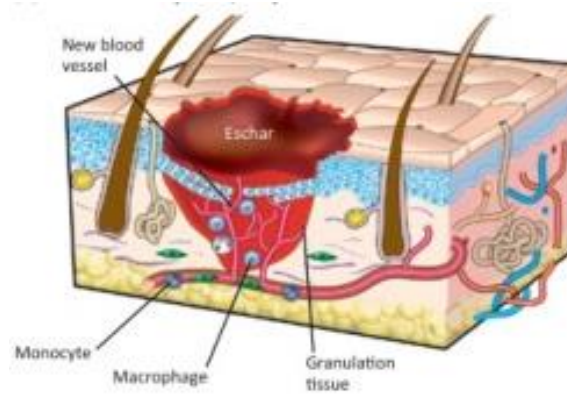
1c. Réparation cutanée et cicatrisation

Réparation cutanée

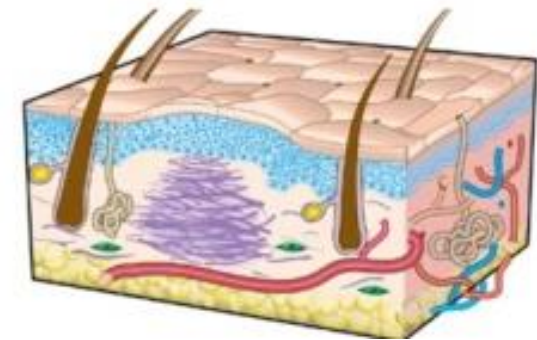
Phase Inflammatoire



Phase de prolifération / Réépithélialisation



Phase de maturation / Remodelage



Gurtner *et al*, 2008

2. Nécessité d'excision-greffe précoce

13

- Tissu nécrotique = toxique
- Brûlure → plaie
- **Brûlure profonde et étendue :**
 - **excision**
 - **greffe**



2.a. Traitement chirurgical de la brûlure

14

□ Utilisation d'Autogreffes: « Gold Standard »



Excision précoce

Prélèvement du site
donneur
0.2 à 0.4 mm
d'épaisseur

Expansion de la
surface prélevée
filet (x 1.5 à 8)

Greffe

Inconvénients immédiats:

- Saignement
- Douleur
- Zone de prélèvement problématique pour un grand brûlé

Inconvénients lointains

- Cicatrices en résilles sur la zone greffée
- Cicatrices de la zone prélevée

2.b. Traitement chirurgical de la brûlure

15

□ Utilisation d'Allogreffes

□ Prélèvement

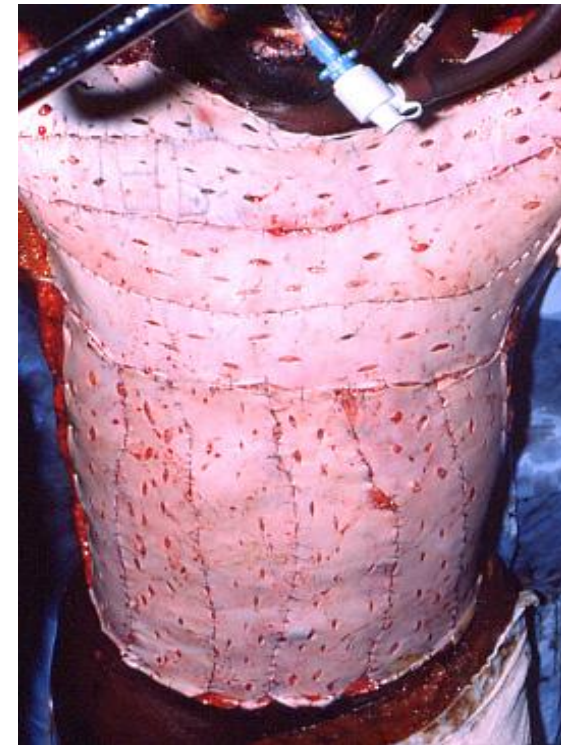
- Donneur décédé

□ Conservation

- Fraîches,
- cryo-préservées,
- Glycérol à 85%

□ Utilisation

- Couverture temporaire
- Greffe composite en sandwich
- Préparation d'un socle aux cultures
- Rarement pour couverture définitive



2.c. Traitement chirurgical de la brûlure

16

□ Utilisation de xénogreffe

- ▣ Peau de grenouille
- ▣ Peau de mouton
- ▣ Peau de porc



▣ Avantages

- Immédiatement disponibles en quantité
- Peu chères

▣ Inconvénients

- Transmission ATNC, virus?

3. Alternatives: Utilisation de substituts cutanés produits par ingénierie tissulaire

17

- Types cellulaires (Kératinocytes, fibroblastes, Cellules endothéliales, autres)
- Autologues vs allogéniques
- Cellules fraîchement isolées ou cultivées *in vitro*



- Collagène
- Fibrine
- Acide hyaluronique
- Glycosamino - glycanes
- Matrices synthétiques

Kamel RA et al, 2013

3.a. Développement de substituts épidermiques

18

- Les substituts épidermiques actuels (*Kamel et al., 2013*)
 - Feuillet de keratinocytes (auto vs allo) produit sur un support plastique
 - Keratinocytes en suspension auto vs allo +/- dans matrice de fibrine
 - Utilisation d'un support matriciel
 - Fibrinogène purifié (*Pellegrini et al., 1999; Ronfard et al., 2000*)
 - Matrices issues de plasma (*Llames et al, 2004; Alexaline et al 2015*)

- Les axes d'études
 - Favoriser la formation d'une barrière épidermique efficace
 - Amélioration de la qualité de la jonction dermo-épidermique reformée
 - Amélioration de la prise de greffe
 - Mise en place d'un protocole clinique (milieu cGMP, utilisation de cellules et matrices d'origines humaines)
 - Réduction des couts

3.a. Les substituts épidermiques

Kamel RA *et al*, 2013

19

Nom	Descriptif du substitut	Références
Epicel (Genzyme Biosurgery)	Feuillet de kératinocytes autologues sur une gaze vaseliné	Rheinwald and Green <i>et al</i> , 1975, Gallico 1984
Cell Spray (ClinicPerthal Cell Culture)	Suspension cellulaire de keratinocytes autologues cultivés ou non	Gravante <i>et al</i> 2007 and Shukla <i>et al</i> 2010
MySkin (CellTran Ltd)	Keratinocytes quasiconfluents sur une couche de silicone	Moustafa <i>et al</i> , 2004
Laserskin or Vivoderm (Fidia Advanced Biopolymers)	Keratinocytes autologues dans une matrice d'acide hyaluronique	Lam PK <i>et al</i> , 1999
Bioseed-S (BioTissue Technologies GmbH)	Keratinocytes autologues en suspension dans une matrice de fibrine	Johnsen S <i>et al</i> , 1994
JACE (Japan Tissue engineering Co)	Feuillet de kératinocytes autologues sur une gaze vaseliné	Matsumura H <i>et al</i> , 2013

3.a. Utilisation de substituts épidermiques pour le traitement des grands brûlés

20

- Alternative de traitement pour les grands brûlés sur plus de 60% de leur surface corporelle (*Cirrode et al., 2011*):
 - Diversité de techniques suivant les centres
 - Greffes de substituts cutanés complets ou greffe en deux temps d'une partie dermique puis d'une partie épidermique

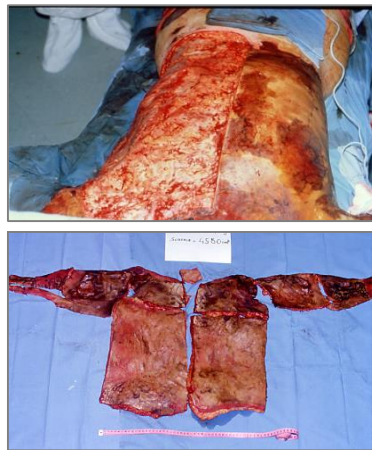
Techniques utilisées au CTB de Percy:

- Technique de Cuono (*Cuono et al., 1986*)
- Technique combinée (*Braye et al, 2000*)

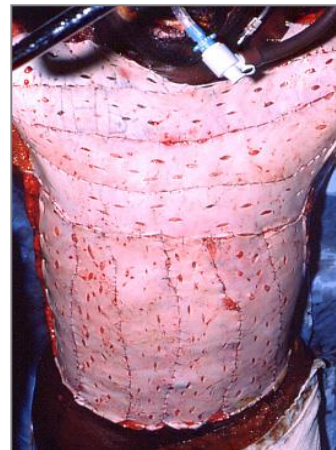
 **Culture
d'épiderme
autologue**

3.a. Technique de Cuono et utilisation de culture d'épiderme autologue (CEA)

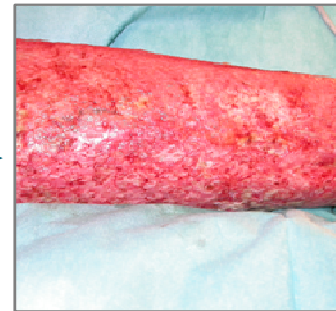
Préparation du socle dermique : technique de « Cuono »



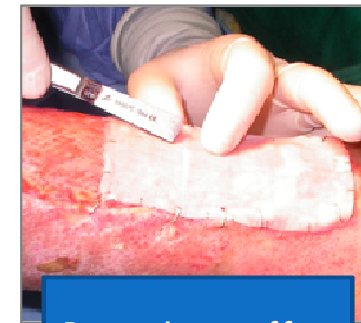
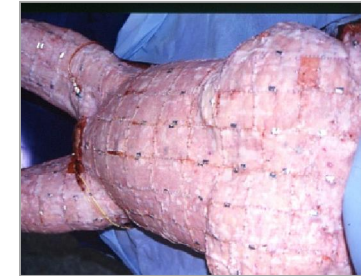
Écision des tissus brûlés et biopsie de peau saine



Couverture temporaire par allogreffe ou xenogreffe
Vascularisation du derme



Abrasion de l'épiderme de la greffe
• Évite la réaction inflammatoire de rejet de l'épiderme de l'allogreffe ou la xenogreffe



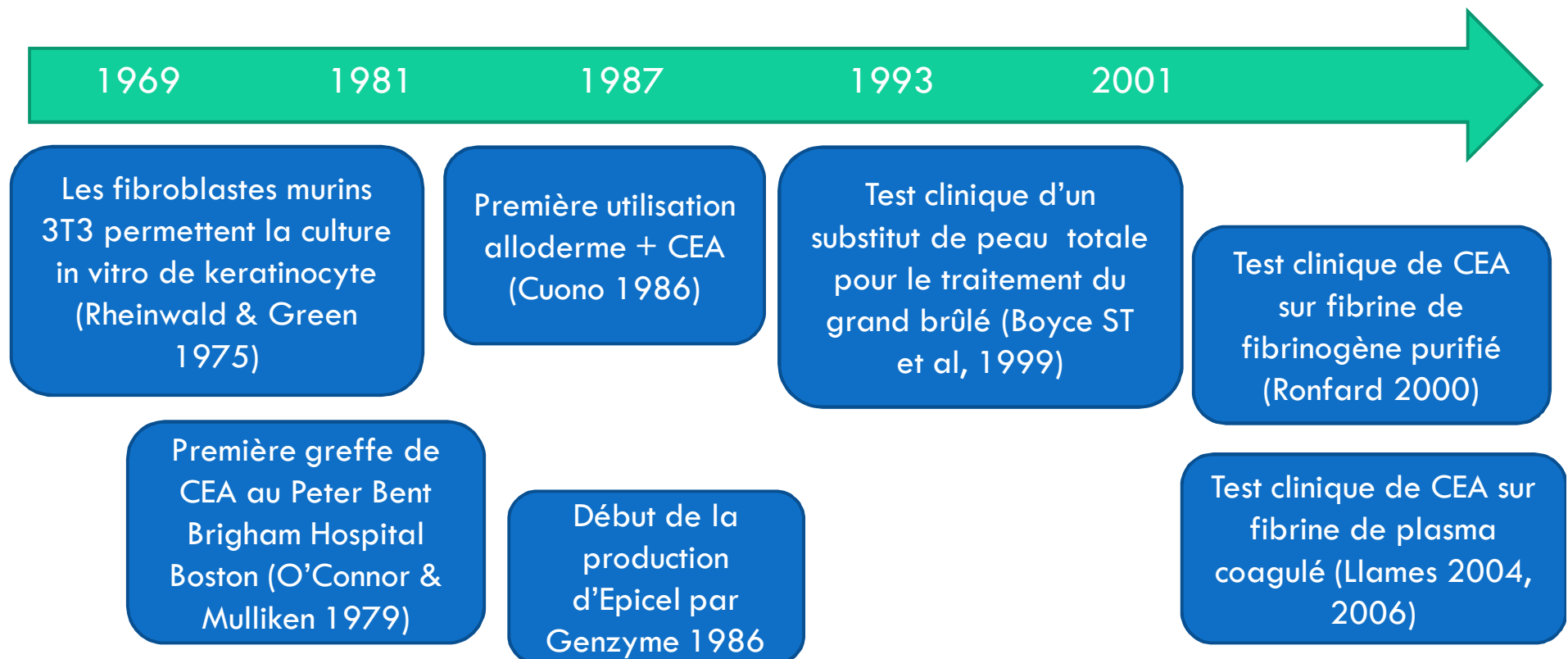
Pose de greffon épidermique autologue sur un derme régénéré

Préparation en parallèle de feuillets épidermiques autologues

3.a. Rétrospective des avancées thérapeutiques sur les CEAs

M3

22



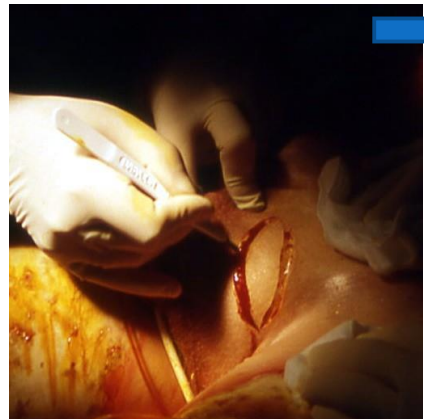
Diapositive 22

M3

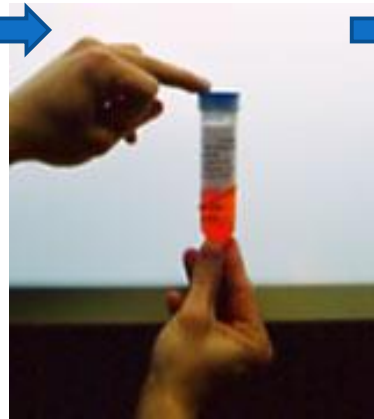
Est-ce que j'ajoute peaux totales et peau autologues/allologues de O.Damour ?

Maia; 08/03/2013

3.a. Timing du traitement



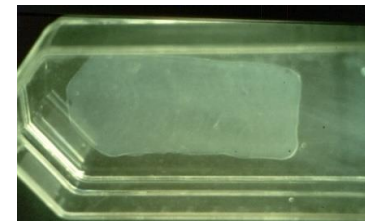
Biopsie J0



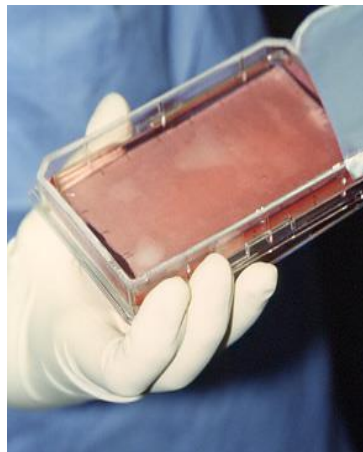
Cultures 1^{ères} J8-10



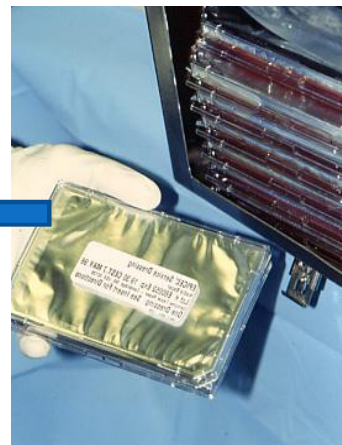
Cultures 2^{èmes} J16-24



Préparation



Pose

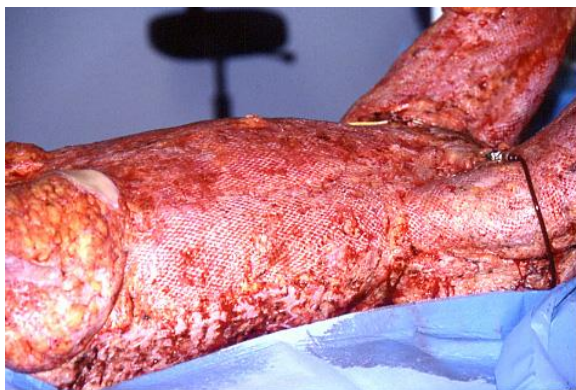


Transport

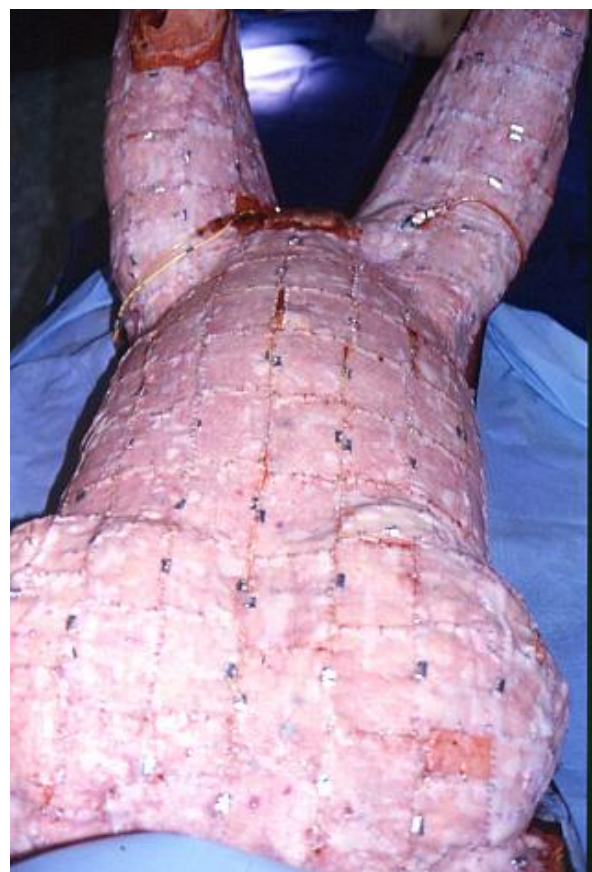
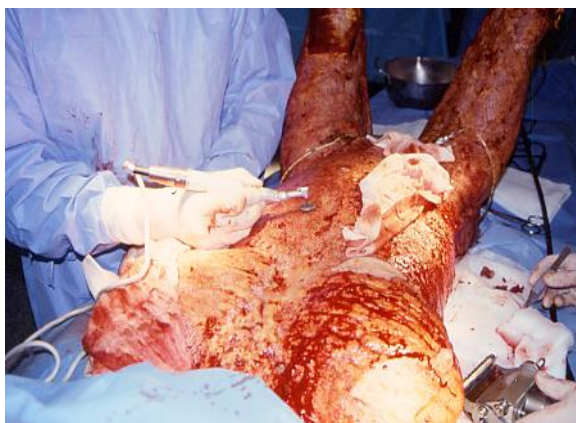


3.a. La pose des CEA

24



Dermabrasion

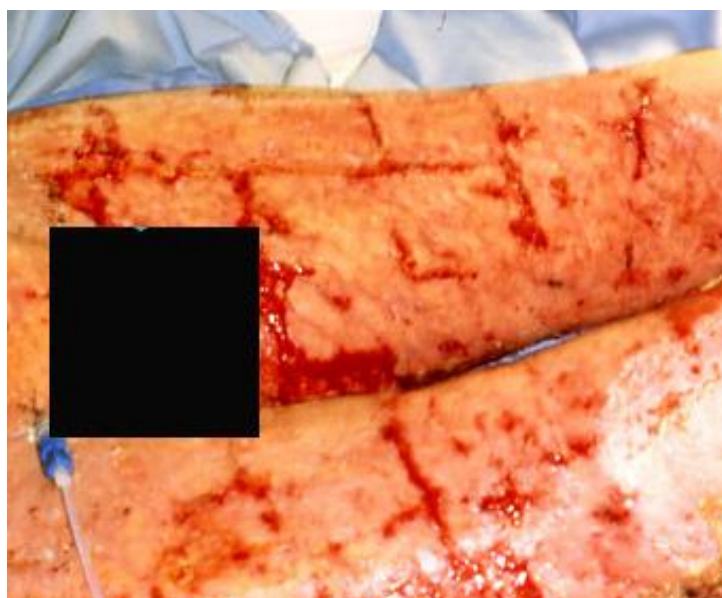


Pose
Pansement
1aire
2aire

J 20 à J 24

3.a. Take-down : pose + 7 jours

25



% dœpidermisation

3.a. À Percy, de 1991 à 2011...

26

- De 1991 to 2007 :
 - Biopsies : 63 patients (4 morts avant la fin du processus de culture)
 - 59 patients traités par cultures
 - 40 % venant d'un autre centre

- 2005-2011:
 - 10 patients

Cirotte A *et al* , 2011

3.a. Traitement d'enfants

27



116 feuillets CEA



3.a. Traitement d'adultes

28



482 feuillets CEA en 2 applications



3.a. Avantages des CEA

29

- Obtention de nombreux feuillets épidermiques à partir d'une biopsie de faible surface
- Remplacement permanent de la peau
- Augmentation du taux de survie



Peau humaine saine



Epiderme de culture (1,5 mois après la greffe) (Ronfard V et al, 2000)

3.a. Les limites des CEA

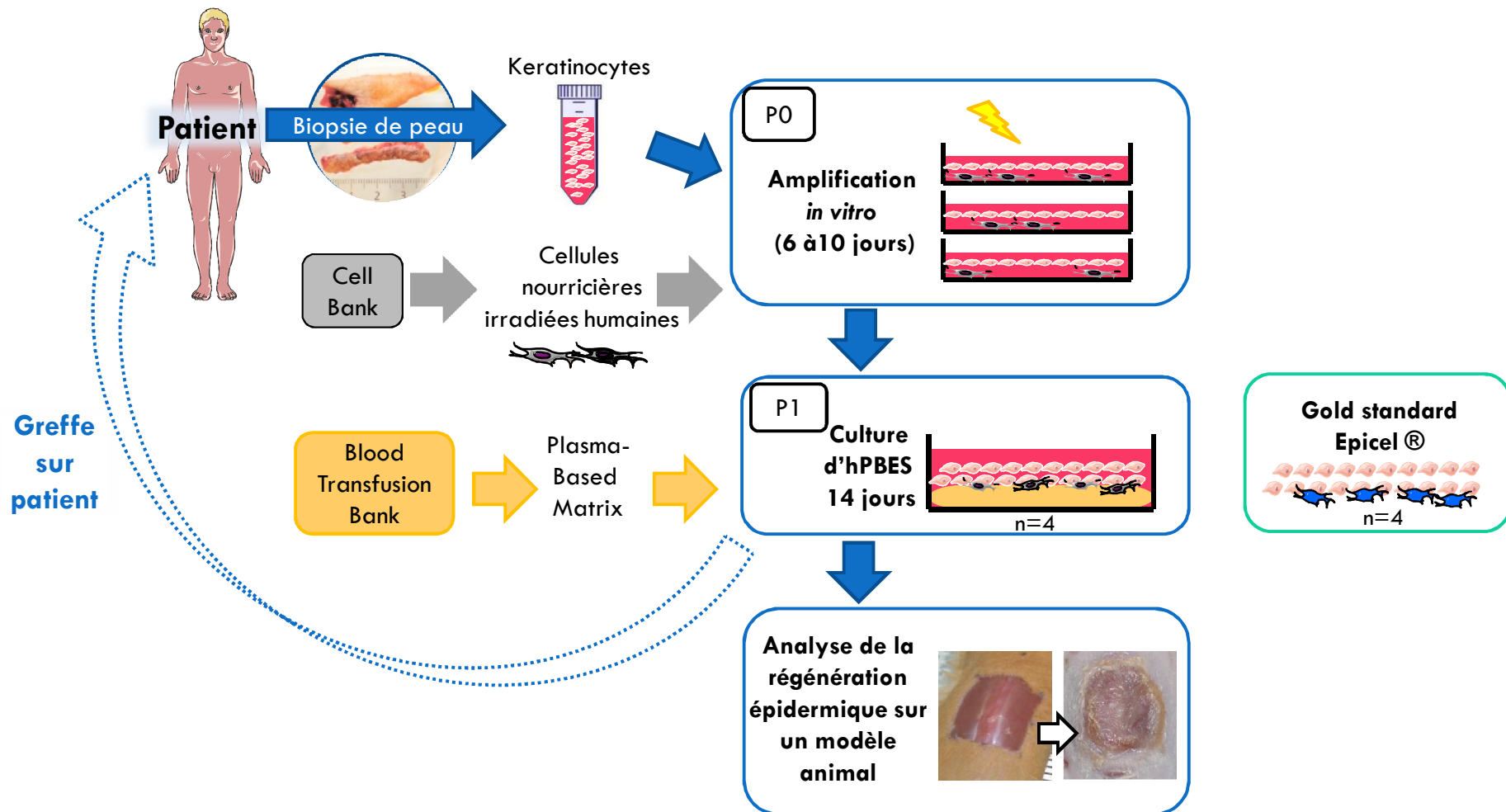
- Insuffisances fonctionnelles
 - Cicatrices (bulles, rétraction, taches, hyperkératoses)
 - Fragilité
 - Immaturité de la peau reconstruite (pas de fibres élastiques avant 2 ans)
 - Néof ormation de la jonction dermo-épidermique difficile (papilles 6 mois)
- Coût de production très élevé (15€/cm², ≈100000€/patient)
- Thérapie assimilée à une xénotransplantation



Plaie suite au frottement d'un jean sur une peau traitée par épiderme de culture

3.a. Développement de substituts épidermiques: Protocole de culture

31

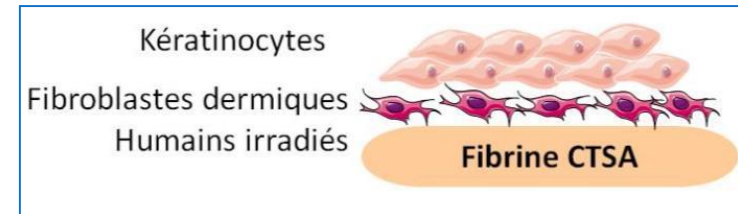
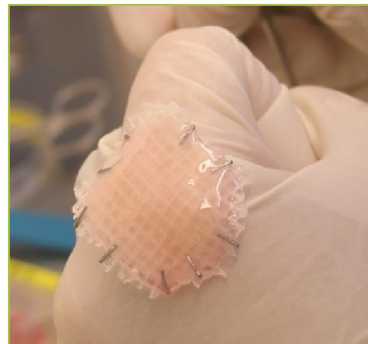


3.a. Développement de substituts épidermiques:

32

Le choix du substitut (en fonction des exigences liées à l'application clinique):

- Substitut épidermique immature
- Utilisation d'une matrice pour la culture des kératinocytes: plasma frais congelé



human Plasma-Based Matrix :
« hPBM »

human Plasma-Based
Epidermal Substitute :
« hPBES »

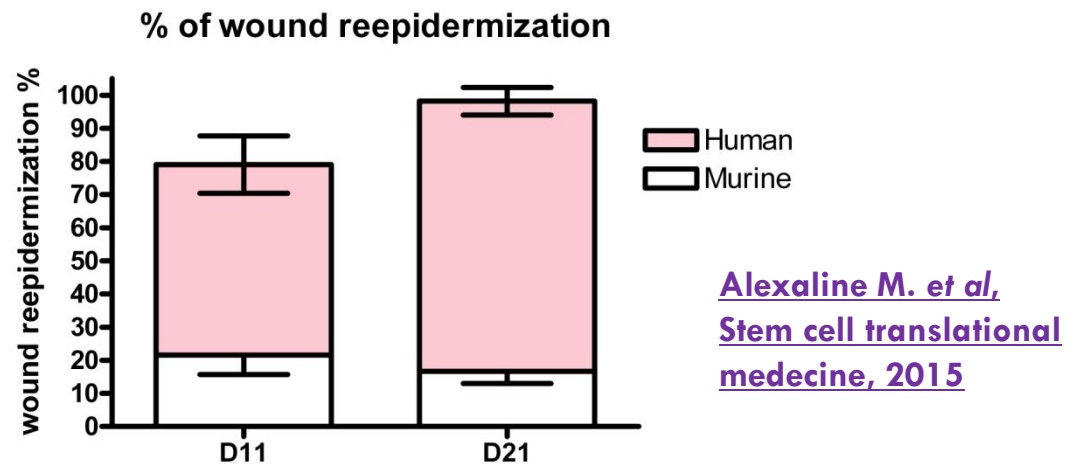
- Intérêt pour la manipulation du feuillet
- Facteurs de cicatrisation
- Préservation de la jonction dermo-épidermique

3.a. Développement de substituts épidermiques: Preuve de concept, Analyse *in vivo*

33

Greffe J0	J11 post greffe	J21 post greffe
<p>“ Greffe d’hPBES “ Plaie vive (1cm²) “ Souris NOD-SCID</p> 	 <p>“Bonne réépidermisation</p>	 <p>“Maintien de la greffe</p>

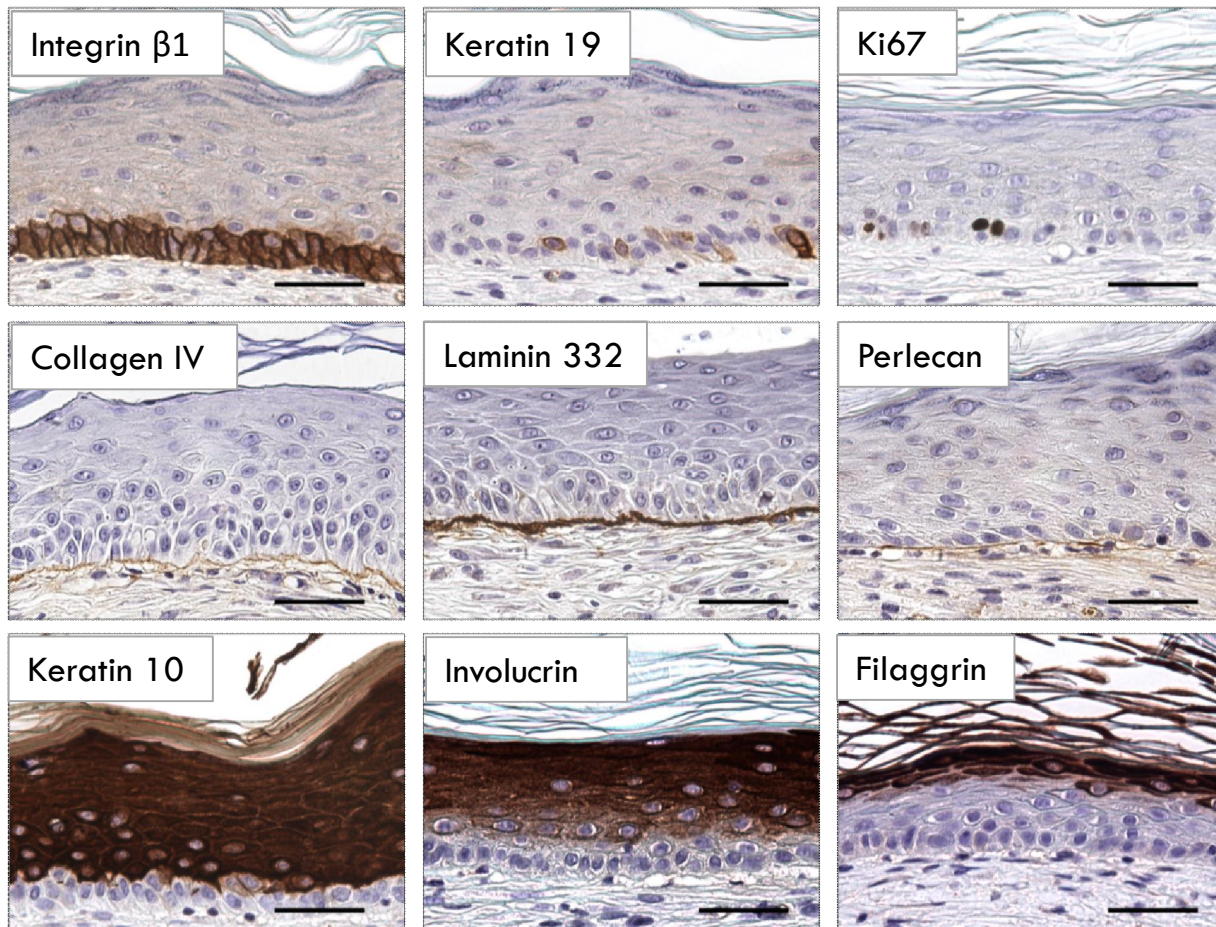
Bonne prise de greffe et régénération d'un épiderme humain au bout de 21 jours post-greffe



3.a. Développement de substituts épidermiques: Preuve de concept, Analyse *in vivo*

34

hPBES, J21 post greffe



Scale bars 100µm

➤ Couche basale contenant des keratinocytes souches et en prolifération

➤ Présence de protéines de la jonction dermo-épidermique

➤ Différenciation terminale

Alexaline M. et al, Stem cell translational medicine, 2015

3.a. Voies de recherche sur les substituts épidermiques

35

- Amélioration des milieux de culture
- Enrichissement en kératinocytes souches
- Amélioration des propriétés mécaniques de la matrice
- Amélioration de la prise de greffe en associant les épidermes de culture à l'injection de cellules stromales mésenchymateuses (Cf paragraphe 3)

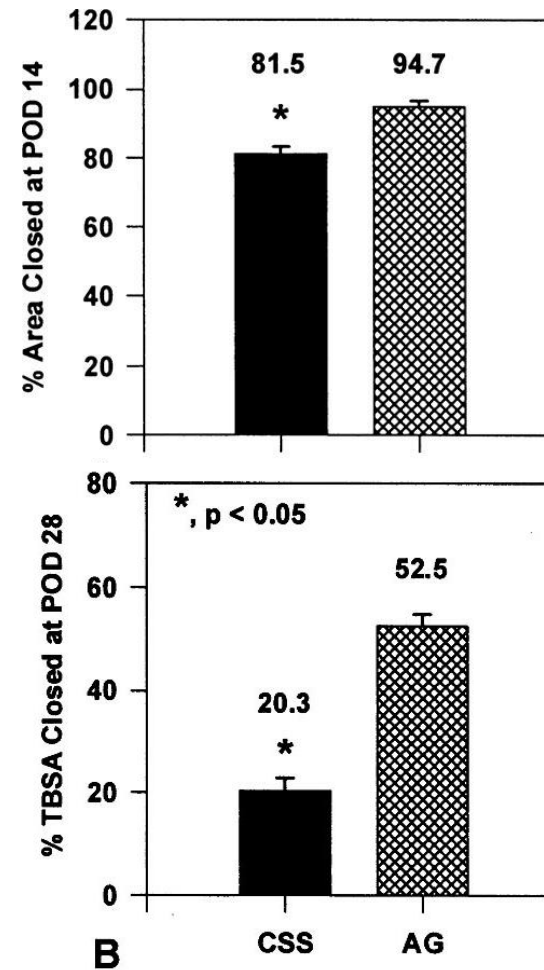
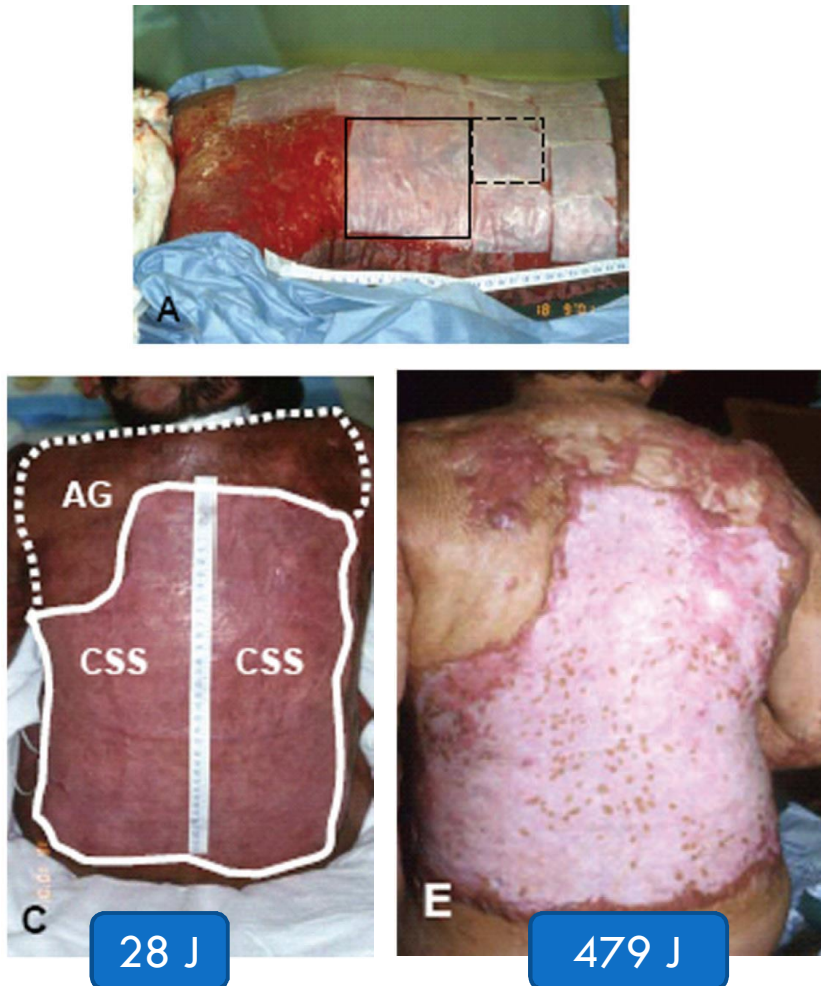
3.b. Les substituts de peau totale

36

Nom	Descriptif du substitut	Références
Apligraf (Organogenesis)	Fibroblastes et kératinocytes allogéniquesensemencés dans du collagène, épiderme stratifié	Kirsner RS <i>et al</i> 1998
Orcell (Ortec International)	Fibroblastes et kératinocytes allogéniquesensemencés dans du collagène, épiderme stratifié	Still J <i>et al</i> 2003
Permaderm (regenecin)	Fibroblastes et kératinocytes autologuesensemencés dans du collagène+GAG, épiderme stratifié	Boyce ST <i>et al</i> , 2006
Polyactive	Fibroblastes et kératinocytes autologuesensemencés dans une matrice synthétique	El-Ghalbzouri A <i>et al</i> , 2004
Laserskin and hyalograf	Fibroblastes et kératinocytes autologuesensemencés dans une matrice d'acide hyaluronique	Uccioli L <i>et al</i> , 2003
Autologous Plasma-Based Bioengineered Skin	Fibroblastes et kératinocytes autologuesensemencés dans une matrice de plasma coagulé	Llames <i>et al</i> , 2004 et 2006

3.b. Les substituts de peau totale

37



Boyce ST et al, 2006

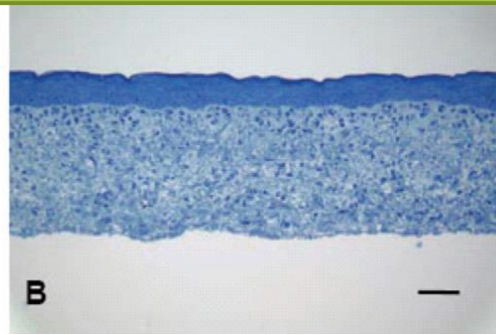
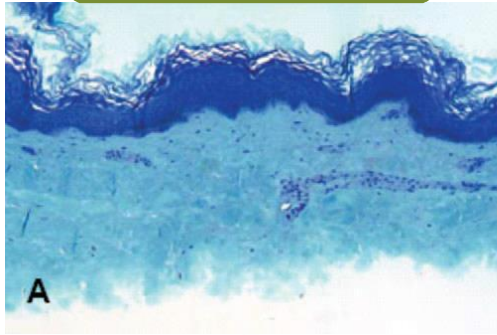
3.b. Les substituts de peau totale

38

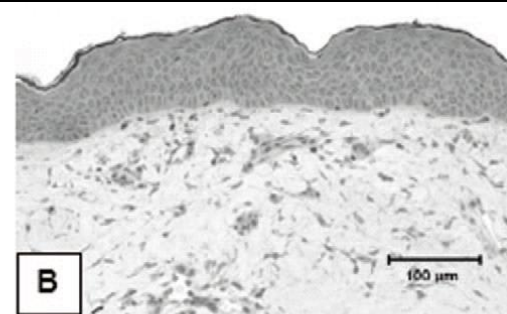
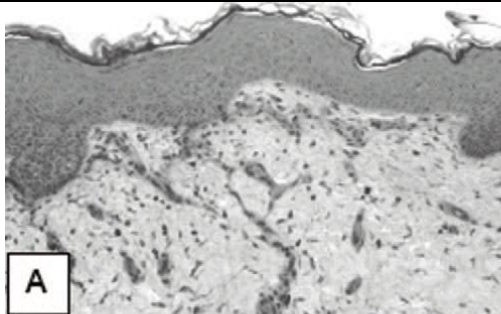
Autogreffe

Substitut de peau totale

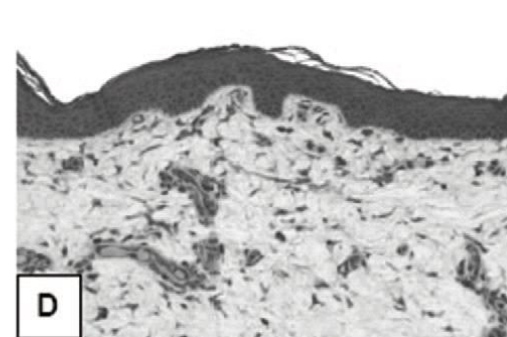
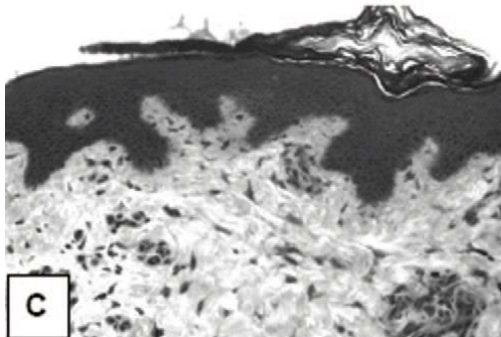
Avant greffe



5 mois



25 mois



Avantages:

- "Autologues,
- "Durée de vie permanente
- "Diminution du nombre de prélèvement

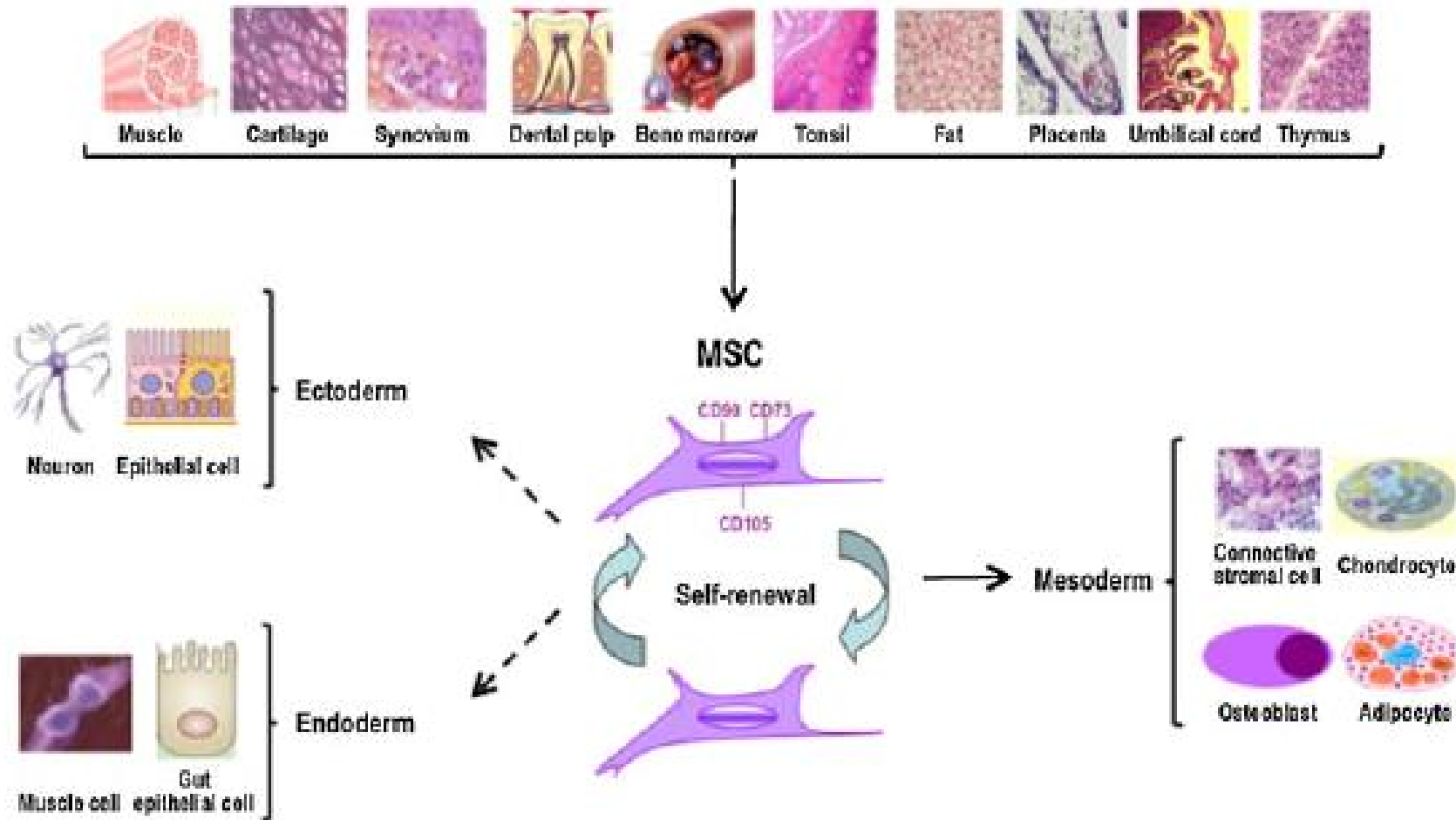
Inconvénients:

- "Prise de greffe un peu moins bonne
- "Manque de vascularisation de la greffe

Boyce ST *et al*, 2006

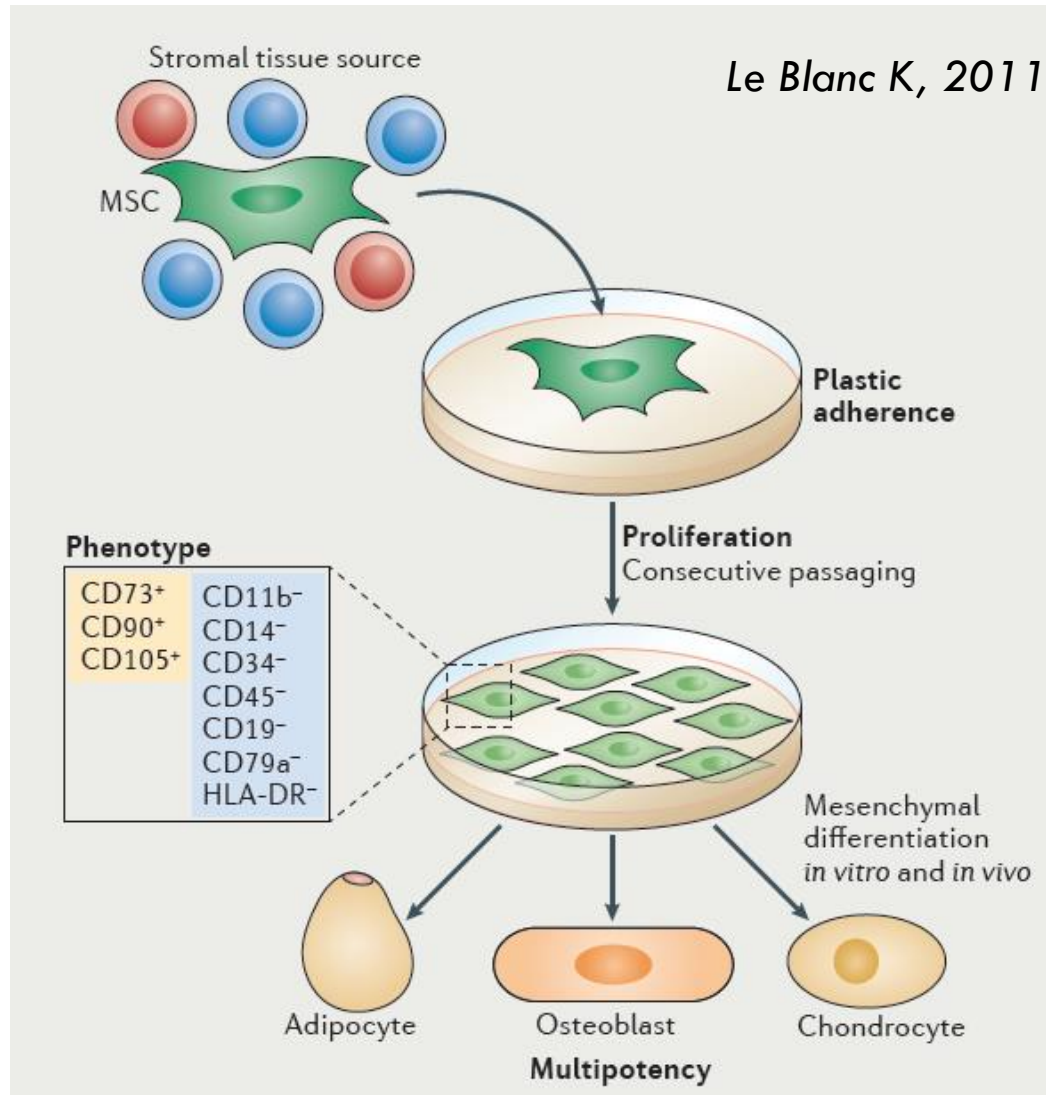
4. L'utilisation de Cellules Souches/Stromales Mesenchymateuses (CSMs) pour la réparation cutanée

39



4. Critères de définition des CSMs

40



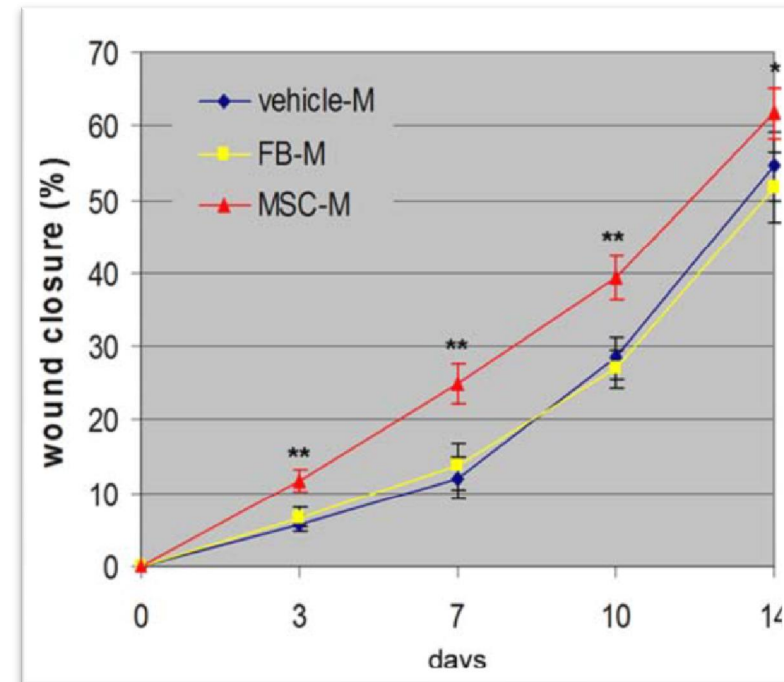
- Population hétérogène
 - ▣ retrouvée dans le compartiment stromal des tissus
 - ▣ isolement par adhérence et passages consécutifs
- Critères minimum proposés par l'International Society for Cellular Therapy (ISCT) pour définir ce type de cellules: basés sur leur capacité d'adhérence, leur potentiel de différenciation et leur profil phénotypique

4. Les facteurs paracrines des CSMs favorisent la cicatrisation

41

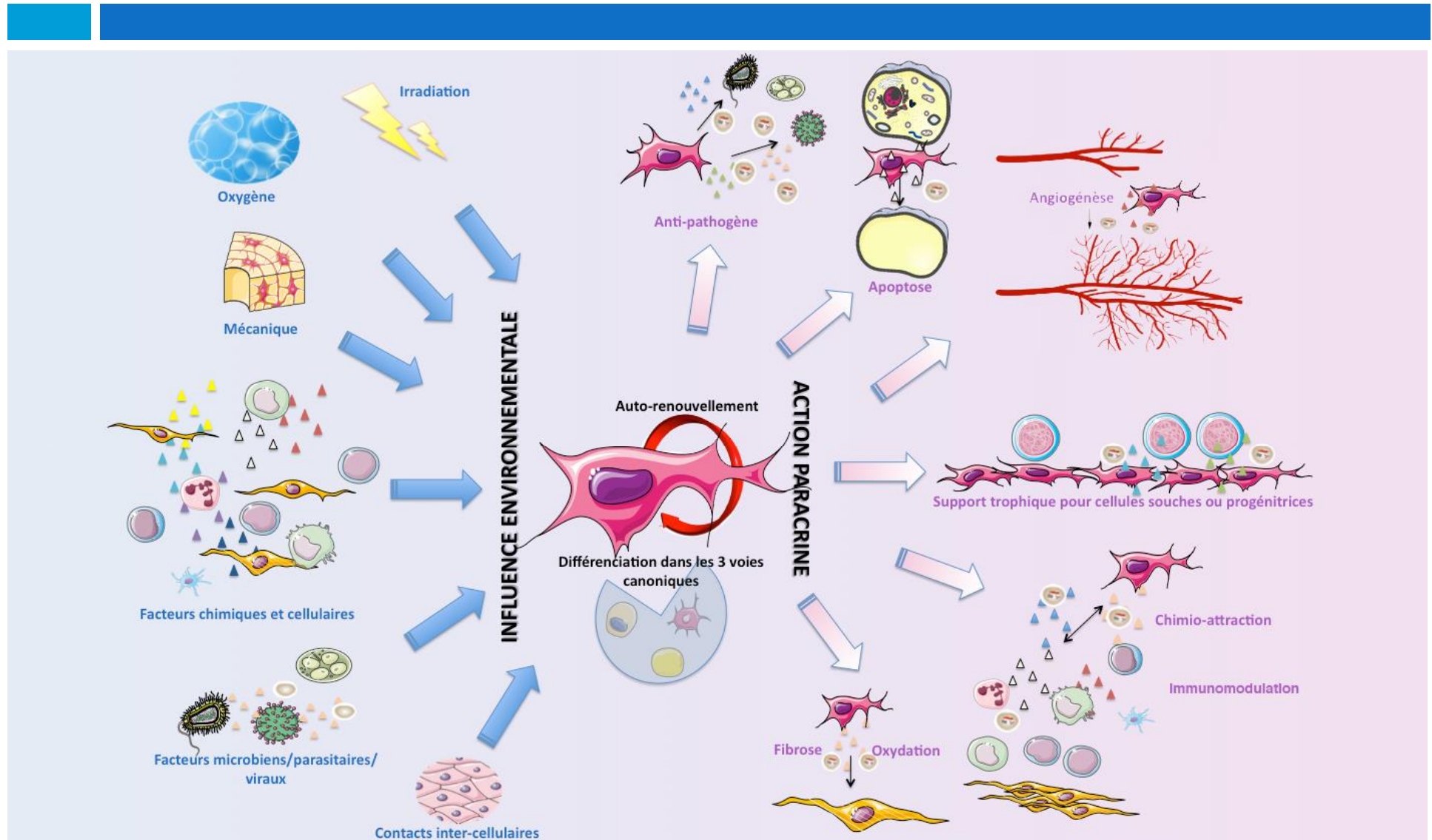
(Chen et al., PLoS One 2008)

Administration of conditioned medium (CM) from cultured MSC in Hypoxia condition



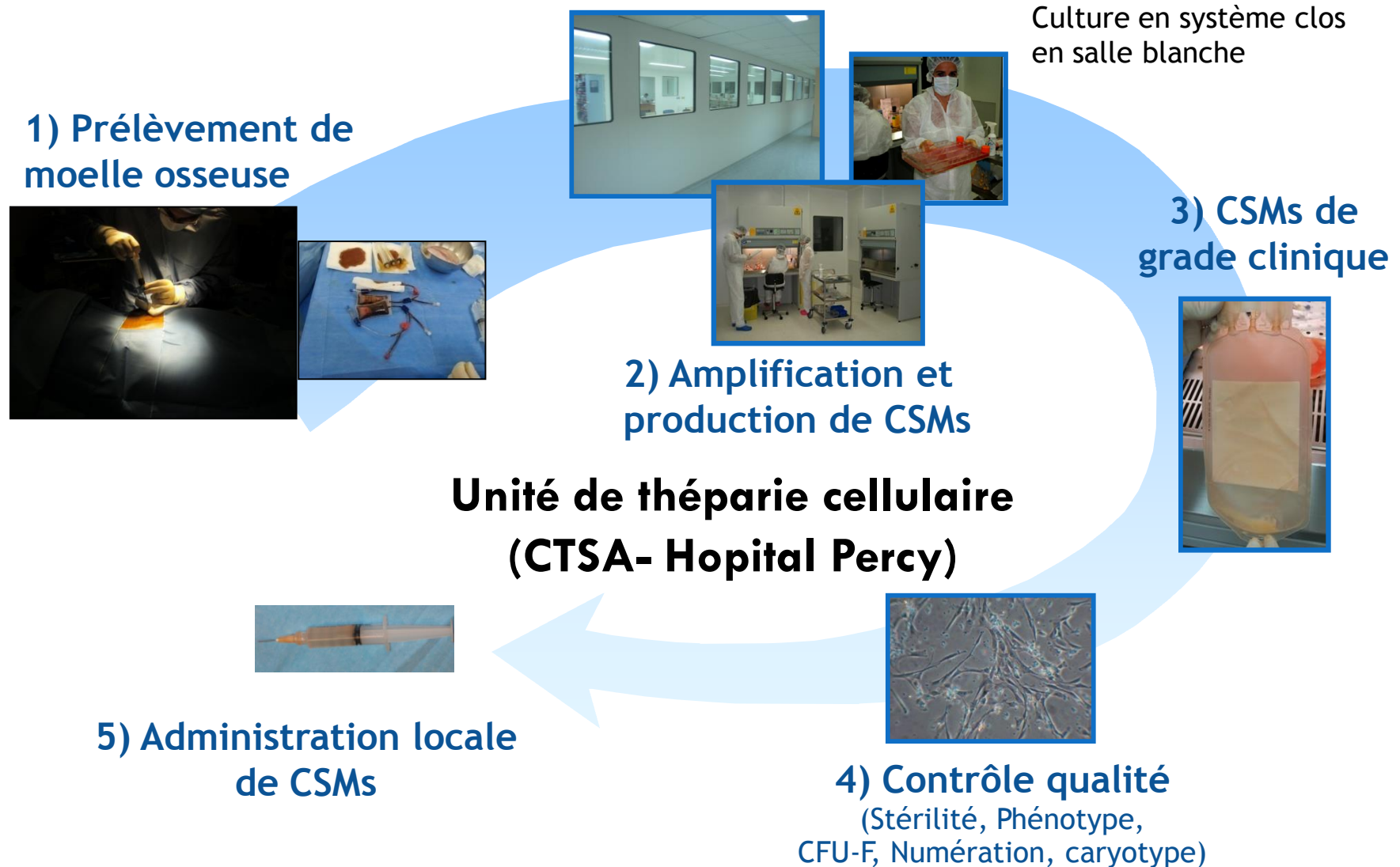
- Forte production de cytokines dans un milieu conditionné de CSMs
- Hypothèses: amélioration de la cicatrisation par les cytokines produites par les CSM via le recrutement notamment de macrophages et de cellules endothéliales plutôt que grâce aux CSMs elle-mêmes.

4. Les CSMs, de bonnes candidates pour la réparation des lésions cutanées



4. Production de grade clinique de CSMs autologues

43



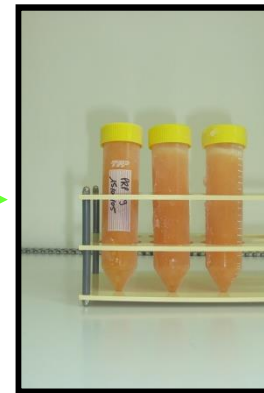
4. Facteurs de croissance plaquettaires



Aphérèse



Concentré Plaquettaire
d'Aphérèse (CPA)



Répartition



Congélation /
Décongélation

**Libération des Facteurs de Croissance
Intra-Plaquettaires =
Lysat Plaquettaire**

4. Isolement de CSM

- ✓ Poche de Recueil de Moelle Aspirée

(Société
MacoPharma Biotech)

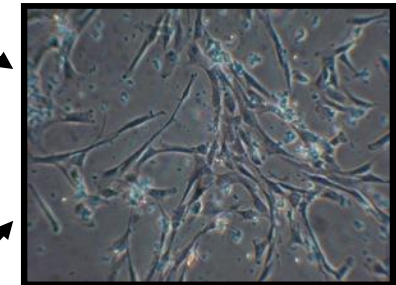
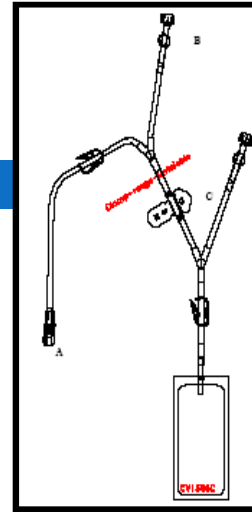
- ✓ Recueil de Résidu de Os spongieux



Prothèse Totale de Hanche Résidus de fraisage
au bloc opératoire de Os spongieux

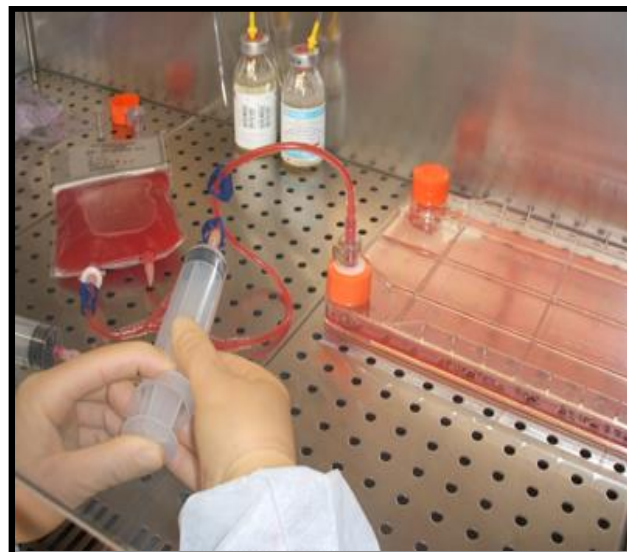
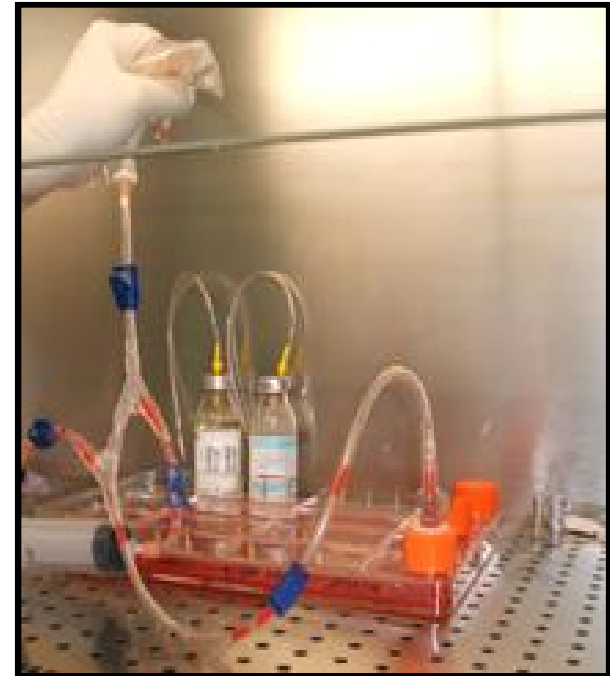


Récupération stérile
du prélèvement



Sélection par Adhérence
Sur Plastique

4. Mise en culture des CMN de Moelle



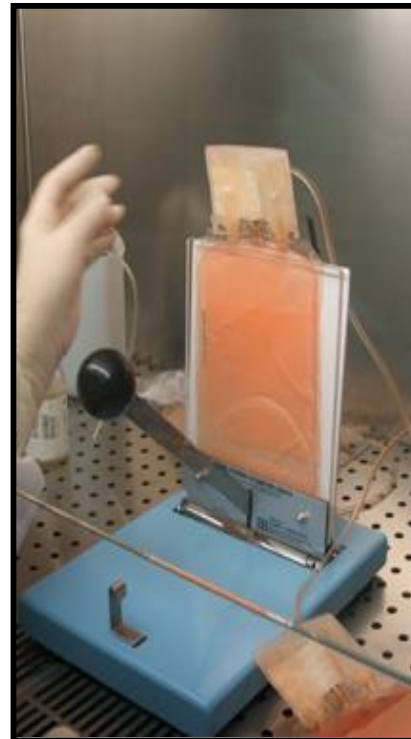
Mise en Atmosphère et Température contrôlées des Cellules



4. Récolte des CSM



**Après
centrifugation**



**Elimination du milieu
par système de
presse**



CSM

4. Contrôles de qualité

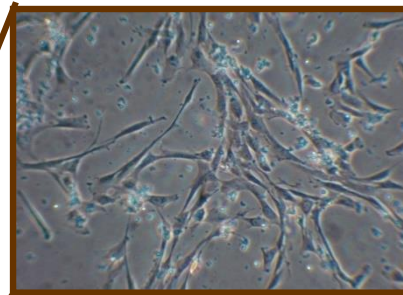
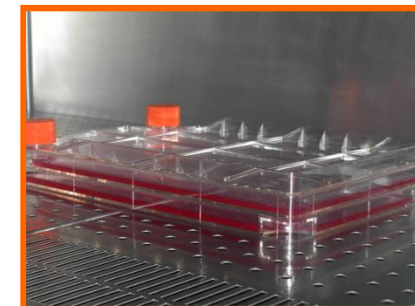
MSC Injection
(ajusted number and volume)



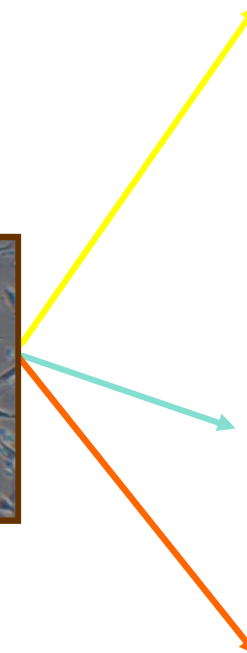
Quality Controls
(Sterility, Phenotype,
CFU-F, Numeration, Karyotypes)

MSC Freezing

MSC Amplification



MSC



4. Traitement compassionnel des brûlures cutanées radio-induites

50

- Injection de CSMs combinée à une autogreffe de peau et de muscle



Brûlure par irradiation accidentelle
(Equateur, 2009)



4. Traitement compassionnel des brûlures cutanées radio-induites

51

Bey_Figure 4

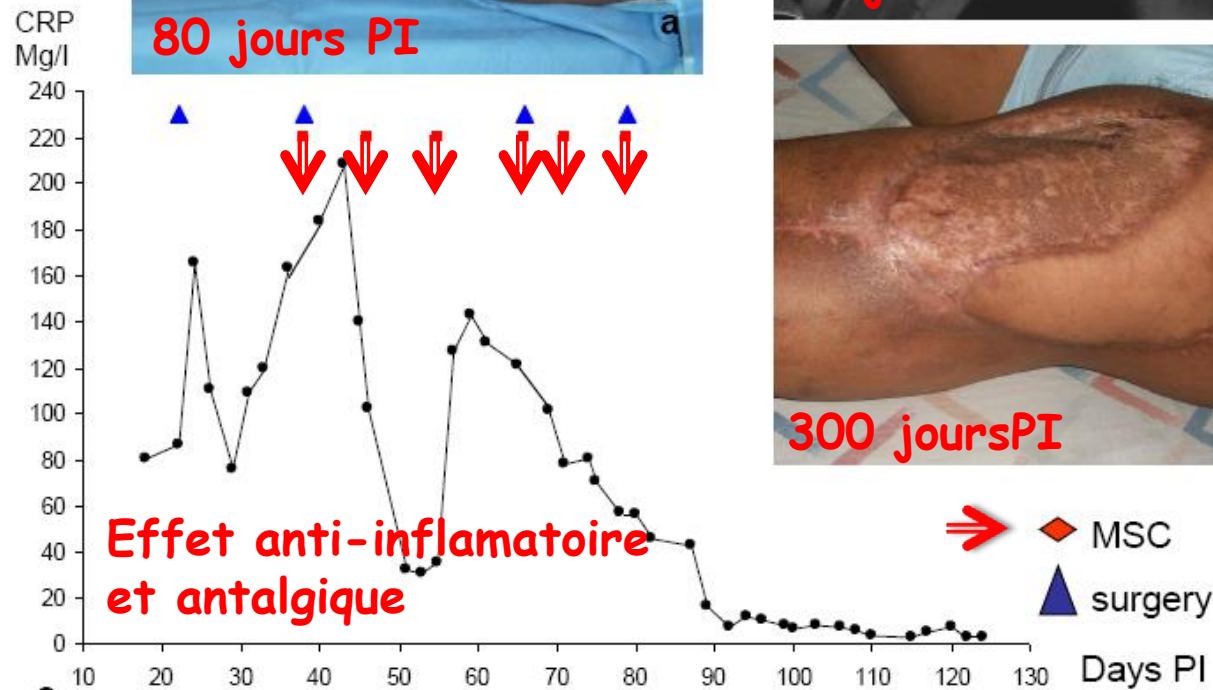
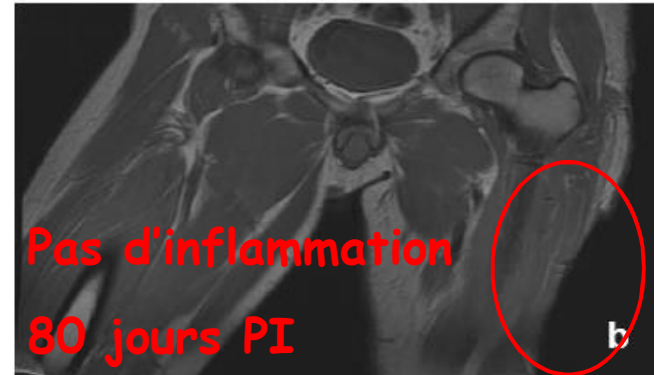


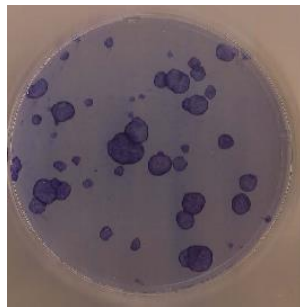
Fig. 4

4. voie de recherches pour l'utilisation des CSMs dans le traitement de la brûlure thermique

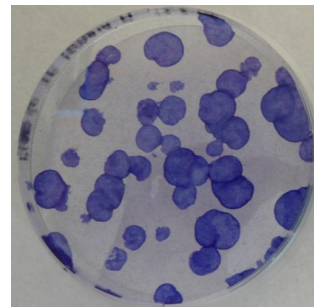
52

- *In vitro*, seul ou en combinaison avec les cellules nourricières murines pour la culture des kératinocytes (technique de Green)
- ▣ Effet chimiotactique des CSMS sur les kératinocytes, amélioration de la stratification de l'épiderme en utilisant un faible % de CSMs (Laco F *et al*, 2009)
- ▣ Impact sur la clonogénicité

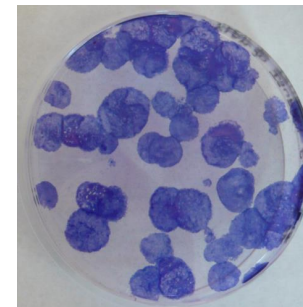
P₀ CFE



i3T3



100% de fibroblastes
dermiques



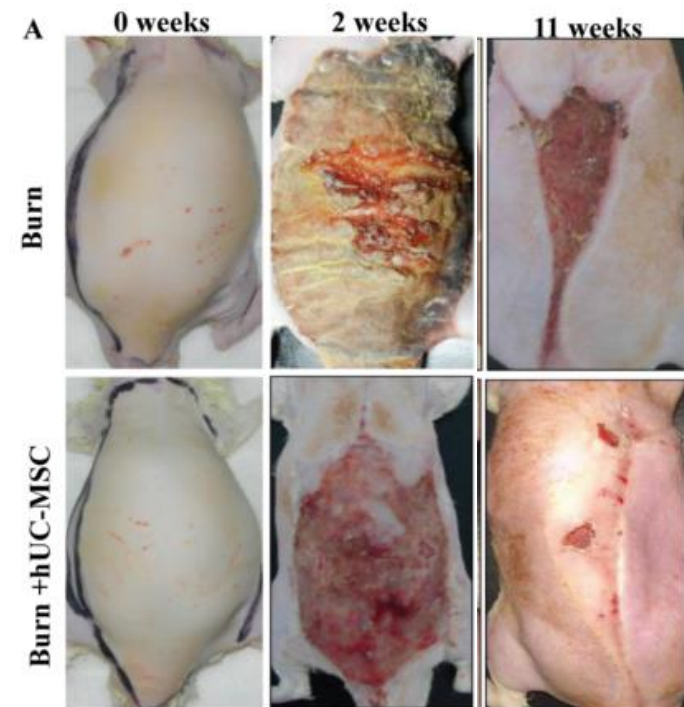
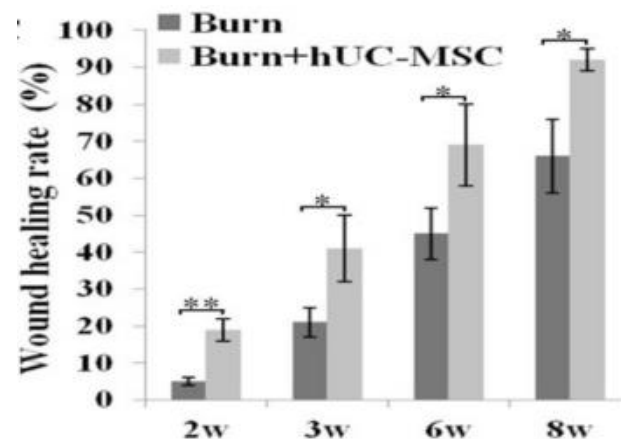
90% fibroblastes
dermiques + 10% BM-MSC

4. Voie de recherches pour l'utilisation des CSMs dans le traitement de la brûlure thermique

53

- *In vivo*, pour améliorer directement la cicatrisation des zones brûlées
- Modèle de brûlure sévère chez le rat avec une injection de CSMs en intraveineux
- En présence de CSMs:
 - **Accélération de la cicatrisation**
 - **Diminution de cellules et cytokines inflammatoires dans la plaie**
 - **Augmentation de la néovascularisation et des taux de VEGF**

Liu L *et al*, 2014



4. Voie de recherches pour l'utilisation des CSMs dans le traitement de la brûlure thermique

54

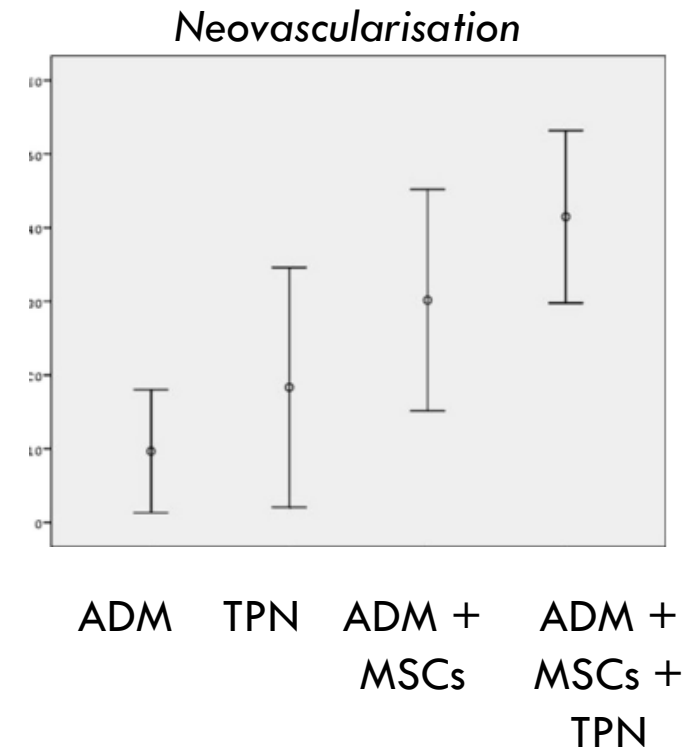
- *In vivo*, en association avec un substitut dermique ou un CEA pour augmenter la prise de greffe
 - ▣ Modèle de plaie vive chez le rat et évaluation de l'injection locale de CSMs sur la prise d'une matrice dermique

ADM: Matrice dermique acellulaire

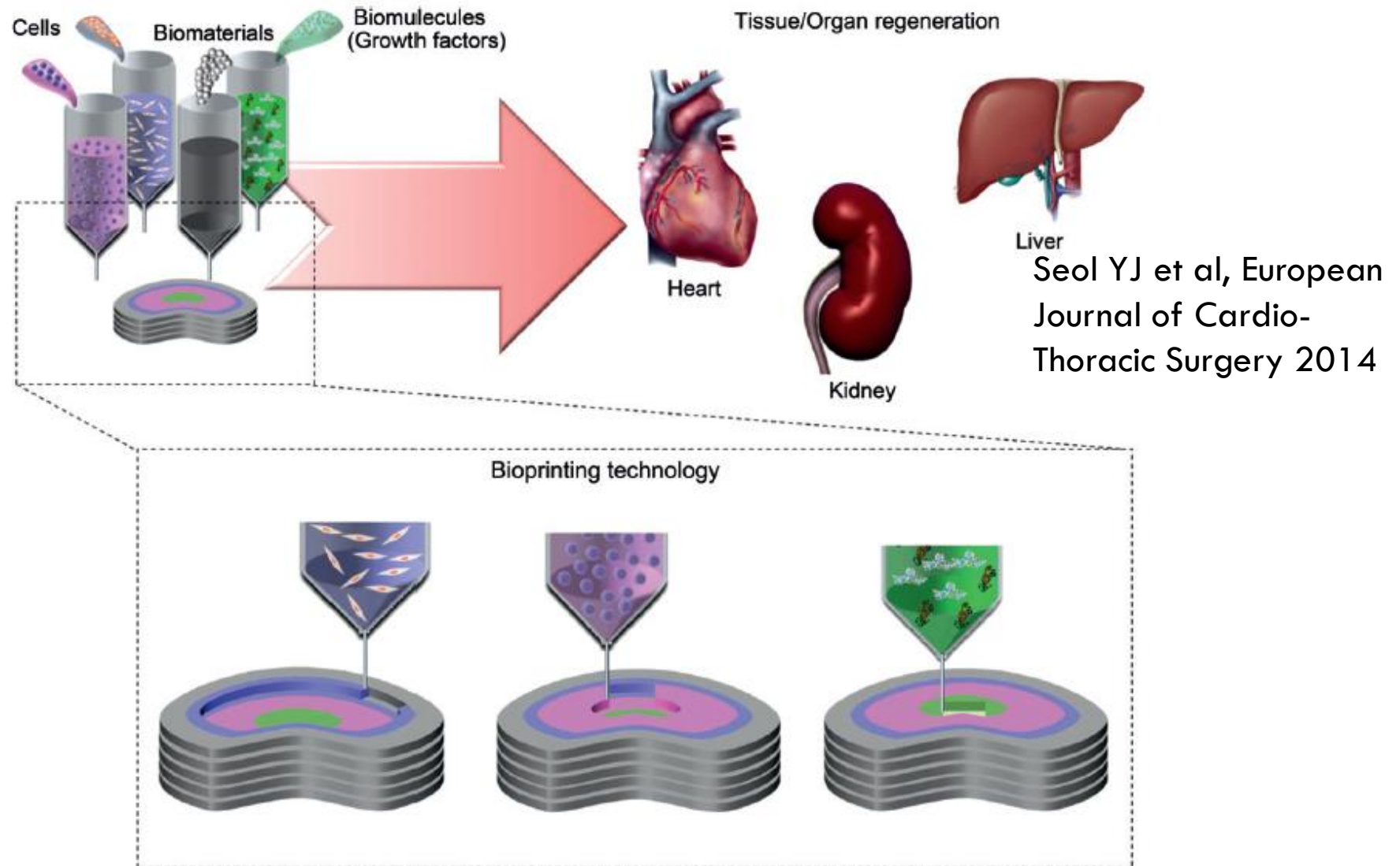
TPN: thérapie par pression négative

- **Augmentation de la vascularisation et de la prise de greffe en présence des CSM**

Sahin I *et al*, 2014

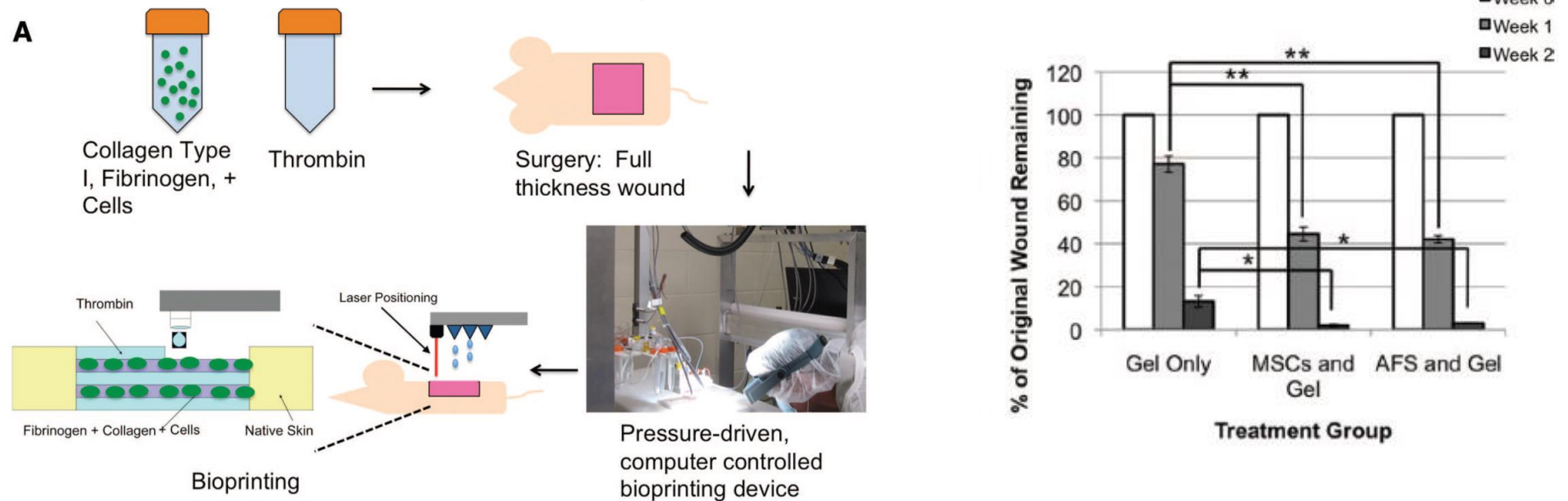


5. Nouvelles technologies : Bioprinting



5. Bioprinting *in situ*

Skardal A et al, Stem cells Trans Med 2012



- ❑ Modèle de plaie chez la souris nude
- ❑ Evaluation de la cicatrisation après bioprinting
- ❑ En présence de CSMs issue de fluide amniotique:
 - ❑ **Accélération de la fermeture de la plaie et la reepithelialization et augmentation de la vascularisation**

Les équipes et collaborations

57



TCRT IRBA

Réparation cutanée:

M. Alexaline, C. Thépenier, M. Nivet, M. Trouillas, Pr. Lataillade



Unité de thérapies cellulaire / CSM

M. Nivet, Boutin L., Tisedre F, Pr Lataillade



Hôpital Percy

Centre de traitement des Brûlés

Pr. Bargues, Dr. Leclerc...

Département de chirurgie plastique

Pr. Bey, Pr. Duhamel...

Département d'anatomie pathologique

Pr. Saint-Blancard...

Celogos

Celogos

Dr. A. Ullman



CEA, Evry

M. Martin, N. Fortunel



ISTEM, Evry

Equipe C. Baldeschi, G. Lemaitre



Hopital Paul Bousse /INSERM U972

G. Uzan, I. Casal(Animalerie)

L'ORÉAL



Pierre Fabre



AGENCE NATIONALE DE LA RECHERCHE
ANR