



HAL
open science

Application de la thérapie cellulaire et génique au traitement du syndrome cutané radio-induit

Diane Riccobono

► **To cite this version:**

Diane Riccobono. Application de la thérapie cellulaire et génique au traitement du syndrome cutané radio-induit. Médecine humaine et pathologie. Université de Grenoble, 2014. Français. NNT : 2014GRENS031 . tel-01556578

HAL Id: tel-01556578

<https://theses.hal.science/tel-01556578v1>

Submitted on 5 Jul 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité: **Biotechnologie, instrumentation, signal et imagerie
pour la biologie, la médecine et l'environnement**

Arrêté Ministériel: 7 août 2006

Présentée par

Diane RICCOBONO

Thèse dirigée par le **Dr Michel Drouet** et codirigée par le **Dr Isabelle Hininger-Favier**.

Préparée au sein de l'**Institut de Recherche Biomédicale des Armées**

Dans l'**Ecole Doctorale d'Ingénierie pour la Santé, la Cognition et l'Environnement (EDISCE)**

APPLICATION DE LA THÉRAPIE CELLULAIRE ET GÉNIQUE AU TRAITEMENT DU SYNDROME CUTANÉ RADIO-INDUIT

Thèse soutenue publiquement le 3 décembre 2014, devant le jury composé de :

Dr Nicolas FORAY : (Rapporteur)
Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon ; UMR 5288

Dr Christine LINARD : (Rapporteur)
Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire

Pr Luc DOUAY : (Président)
Université Pierre et Marie Curie ; UMR S938

Pr Louis CASTEILLA : (Examineur)
STROMALab, UMR 5273

Pr Jean-Claude DEBOUZY : (Examineur)
Ecole du Val de Grâce

Dr Michel DROUET : (Directeur de thèse)
Institut de Recherche Biomédicale des Armées



« Ce qui est aujourd'hui prouvé ne fut jadis qu'imaginé »

William Blake

REMERCIEMENTS

Aux directeurs de cette thèse :

Docteur Diane Agay, je vous remercie d'avoir initié la direction de cette thèse, de m'avoir orientée et guidée dans les premières étapes de ce travail. Je garde en souvenirs l'ensemble de nos péripéties en biologie appliquée qui ont été très formatrices.

Médecin en Chef Michel Drouet, je tiens à vous exprimer mes plus sincères remerciements pour avoir poursuivi la direction de cette thèse malgré les difficultés engendrées par notre départ des montagnes vers la région parisienne. Je vous remercie également pour vos conseils pertinents qui ont su me faire progresser.

Docteur Isabelle Hininger-Favier, je vous remercie pour la co-direction de ce travail, votre disponibilité et vos conseils ainsi que l'accueil dans votre laboratoire ont été une aide précieuse.

Aux membres du jury,

Docteur Christine Linard je vous remercie infiniment de me faire l'honneur de juger la qualité de l'ensemble de ce travail

Docteur Nicolas Foray je vous tiens à vous exprimer ma reconnaissance pour avoir accepté l'évaluation de ces travaux.

Professeur Luc Douay, je vous exprime toute ma gratitude et mes remerciements pour l'honneur que vous me faites de participer à ce jury

Professeur Louis Casteilla, je vous remercie sincèrement, votre présence dans ce jury est un privilège.

Médecin chef des Services et Professeur Agrégé du Val de Grâce Jean-Claude Debouzy votre présence dans ce jury est un immense honneur pour moi, merci infiniment.

A l'Institut de Recherche Biomédicale des Armées

Je remercie le **Général Garin**, **Général Esquivié** et le **Général Bourdon** pour m'avoir donné tous les moyens nécessaires à la réalisation de ce travail.

Au département des effets biologiques de radiations

Je tiens tout d'abord à remercier le **Dr Francis Hérodin**, chef du département pour votre soutien, votre relecture critique et pour m'avoir fait profiter de votre rigueur scientifique.

A tous les membres de l'unité de thérapie cellulaire en particulier **Fabien Forcheron**, merci pour l'encadrement de cette thèse et pour tes conseils avisés.

Je remercie également, la CeDoC, toute l'unité des rayonnements non ionisants, **David** à sa tête, et **Véronique** pour votre soutien tout au long de ce travail

Au pôle de génomique

Un immense merci au **Docteur André Peinnequin** (Ex général et chef du pôle de génomique !) pour tous tes conseils avisés, ton soutien et les connaissances que tu m'as transmises. Ton aide et nos discussions scientifiques, ou pas, m'ont été plus que précieuses tout au long de ce travail.

Mes remerciements vont aussi à l'ensemble de son équipe, **Catherine Mouret**, **Thomas Poyot**, **Graziella Penot** et **Charles Chapus** pour votre aide et votre patience. Il paraît que la PCR c'est super, je ne suis pas encore convaincue !

A l'unité de biologie appliquée

Un grand merci aux personnels de la biologie appliquée, **Hervé Chaussard**, **David Coulon**, ce travail n'aurait pas pu être réalisé sans vous, je vous dois un grand nombre de tablettes de chocolats et de fraises tagada !

A la DIVAS

Je remercie tout particulièrement **l'adjudant-chef Gourby** pour votre patience lors de la reproduction de cette thèse et **David Bois** pour ton aide technique. Promis je ne me mettrai plus de polices sans empatement dans mes posters.

Aux anciens personnels du CRSSA

Je remercie tout les personnels du CRSSA qui ont préféré les Alpes aux joies de la vie parisienne, notamment **Jean-François Mayol** et **Josiane Denis** qui avez accepté de me

former aux techniques que vous maîtrisez, **Bruno Ballester** et **Mylène Vivier** pour votre aide technique et morale durant ce travail.

Au Centre de Transfusion Sanguine des Armées

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements au **Médecin en Chef Jean-Jacques Lataillade** pour m'avoir permis de travailler dans de bonnes conditions au sein de votre service ;

Egalement un très grand merci à **Cédric, Massimo, Aurélie** pour votre accueil chaleureux et votre aide durant mon « exil » chez vous.

Au Laboratoire de Bioénergétique Fondamentale et Appliquée

Un grand merci à **Murielle Osman** qui a eu la patience de me faire découvrir les joies de l'étude des ROS et de m'avoir aidé à analyser les échantillons.

A ma famille

Mes Parents **Doris** et **Charles**, mon frère **William** et mes sœurs **Angélique, Orianne** et **Lorëva**, toujours présents malgré la distance, merci pour la confiance que vous me porter.

A l'ensemble des « smala » Riccobono, Ambrogi, Djitli et Vétillard.

A mon grand-père....

A mes amis

De l'IRBA, **Estelle, Cédric, Fabienne, Marco, Flo, Yannick, Guillaume**. Je vous remercie, votre soutien est précieux, vos sourires et votre bonne humeur étaient des bouffées d'oxygène lors des moments les plus difficiles. Un grand merci de plus à **Estelle** qui garde le sourire en toute occasion et qui sait le transmettre, tu es un exemple de courage pour nous tous.

Un immense merci tout particulier pour **Sabine**. Ton aide, ta patience, ton soutien, ton stoïcisme (et j'en oublie... !) durant les moments difficiles sont inestimables. Tes pensées « sans transition », tes minutes sénégalaises et mes blagounettes à tes dépends ont ponctué cette rédaction de rires bien nécessaires. Ces mots ne reflètent qu'une infime partie de ma reconnaissance. Mais je me rattraperai avant que l'on ait besoin de notre déambulateur. Merci également à **Bruno** qui a subit indirectement mes moments de grands stress.

A tous les membres de l'Ucep Crew, **Cécile, Emmy, Arnaud, Julie, Morgane, Damien, Line, Gildas** et tous les autres. Merci pour ces moments d'amitiés inoubliables et ces soirées drôles, complices, toujours animées !!!

A celles de toujours, **Bride, Steph, Odile, Sophy** et **Vivi**, merci, pour être toujours là, tout simplement.

RESUME

Le syndrome cutané radio-induit (SCR) est une lésion cutanée spécifique secondaire à une irradiation localisée de forte dose, qui se caractérise par des douleurs importantes, des vagues inflammatoires extensives, un défaut de revascularisation et de cicatrisation. De nouvelles stratégies thérapeutiques peuvent être envisagées pour la prise en charge de cette pathologie avec l'émergence récente des cellules souches mésenchymateuses. Ces cellules multipotentes ont des propriétés de transdifférenciation et de sécrétion de facteurs favorisant la régénération tissulaire. L'association de la chirurgie d'exérèse, des greffes de peau autologue et des injections de cellules souches autologues isolées à partir de la moelle osseuse (Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells ou BM-MSc) a confirmé ces hypothèses mais leur utilisation reste limitée à des cas de patients isolés.

L'objectif de ce travail était d'optimiser la prise en charge du SCR par thérapie cellulaire pour l'étendre aux cas d'accidents de masse ou d'irradiation hétérogène associée.

Les cellules souches dérivées du tissu adipeux (ASC pour Adipose tissue derived Stem Cells), plus abondantes que les BM-MSc et présentant des propriétés pro-angiogéniques, anti-apoptotiques et immunomodulatrices équivalentes voire supérieures, ont été choisies pour développer cet outil de thérapie cellulaire. La faisabilité de différentes stratégies thérapeutiques a été évaluée dans ce travail : la constitution de banques cellulaires autologues et allogéniques, une potentialisation des effets des ASC par thérapie génique transitoire et l'utilisation du sécrétome des ASC.

La constitution de banques autologues ou allogéniques de cellules souches permet de pallier le délai d'obtention de greffons de taille suffisante en termes de quantité de cellules souches. Cette stratégie évaluée sur un modèle *in vivo* de miniporc a démontré la pertinence des banques d'ASC autologues mais a également mis en évidence les difficultés liées aux injections d'ASC allogéniques en particulier de type immunologique.

La stratégie d'optimisation des ASC par manipulation *ex vivo* a pour but de potentialiser leurs effets par la sécrétion d'une protéine *ad hoc* impliquée dans les processus de réparation tissulaire et ainsi, de diminuer la quantité de cellules injectées et donc le temps de culture. La protéine sélectionnée dans ce travail est la protéine Sonic Hedgehog (Shh) décrite comme présentant des propriétés pro-angiogéniques et anti-apoptotiques. L'évaluation d'un protocole de thérapie génique transitoire utilisant des ASC transfectées par une construction plasmidique codant pour Shh (ASC-Shh) a montré la faisabilité de cette stratégie sur un modèle *in vivo* de miniporc.

Les effets pro-angiogéniques de même que les effets du sécrétome des ASC et ASC-Shh sur des fibroblastes irradiés ont confirmé le rôle des facteurs paracrines des ASC dans la survie cellulaire et mis en évidence la potentialisation de leurs effets pro-angiogéniques par Shh. Ainsi l'utilisation du sécrétome des ASC ou ASC-Shh apparaît également comme une stratégie pertinente permettant de s'affranchir de la compatibilité donneur-receveur lors des greffes de cellules souches.

Ces différentes techniques basées sur les cellules souches dérivées du tissu adipocytaire représentent donc des stratégies prometteuses pour la prise en charge du syndrome cutané radio-induit.

ABSTRACT

Cutaneous radiation syndrome (CRS) is a specific skin lesion caused by high dose local irradiation. It is characterized by severe pain, extensive inflammatory waves, incomplete revascularization and wound healing. For the last few years, mesenchymal stem cells (MSC) have become a promising cell source for cell therapy. MSC are multipotent cells which can transdifferentiate and secrete many paracrine factors involved in tissue regeneration, and they may be considered as a new therapeutic strategy for the management of this pathology. This was confirmed by the results of works associating surgical resection, autologous skin graft and autologous bone marrow mesenchymal stem cells (BM-MSC) injections, although the use of the latter remains limited to isolated cases of patients.

The aim of this work was to optimize the management of CRS using stem cell therapy in order to extend it to mass casualties or associated heterogeneous irradiation.

Adipose tissue derived stem cells (ASC) were chosen to develop cell therapy as they are more abundant than BM-MSC and exhibit higher pro-angiogenic, anti-apoptotic and immunomodulation properties.

The feasibility of different therapeutic strategies has been evaluated in this work: the establishment of autologous and allogeneic cell banks, potentiation of ASC effects by transient gene therapy and the use of ASC secretome.

The constitution of autologous or allogeneic stem cell banks overcomes the cell expansion delay required to obtain stem cells of clinical quantity. This strategy was evaluated in an *in vivo* minipig model of CRS and the relevance of autologous ASC banks was shown but this study highlighted difficulties associated with allogeneic injections especially immunological ones.

Here is also reported an ASC optimization by *ex vivo* manipulation that aims to decrease the amount of injected cells and culture time through the secretion of an *ad hoc* protein involved in tissue repair processes and thus to, decrease the amount of injected cells and therefore the culture time. The protein chosen was Sonic Hedgehog (Shh), known to be involved in pro-angiogenic and anti-apoptotic processes. The evaluation of a transient gene therapy protocol using ASC transfected with a plasmid construct encoding Shh (ASC-Shh) confirmed the feasibility of this strategy in the same minipig model of CRS.

The pro-angiogenic effects as well as other effects of ASC and ASC-Shh secretome on irradiated fibroblasts have confirmed the role of ASC paracrine factors in cell survival and demonstrated potentiation of their pro-angiogenic effects by Shh. Thus the use of ASC or ASC-Shh secretome also appears as a relevant strategy to overcome the donor-recipient compatibility during stem cell transplants.

These techniques based on adipose tissue derived stem cells represent promising strategies for the management of cutaneous radiation syndrome.

VALORISATION DU TRAVAIL DE THESE

Articles

- **Advances in stem cell therapy; Specific application in the treatment of cutaneous radiation syndrome.**
Riccobono Diane; François Sabine; Forcheron Fabien; Valente Marco; Drouet Michel.
Journal of Stem Cell Research and Therapy 2014; March. vol 4, issue 3: 1000186
- **Transient gene therapy to treat cutaneous radiation syndrome: development in a minipig model**
Riccobono Diane; Agay Diane; Fabien Forcheron; Scherthan Harry; Meineke Viktor; Drouet Michel.
Health Physics 2014; Jun 106(6): 713-719
- **Application of adipocyte derived stem cells in treatment of cutaneous radiation syndrome.**
Riccobono Diane; Forcheron Fabien; Scherthan Harry; Agay Diane; Vivier Mylène ; Ballester Bruno; Meineke Viktor; Drouet Michel.
Health Physics 2012; Aug 103: 120-6
- **Autologous adipocyte derived stem cells favour healing in a minipig model of cutaneous radiation syndrome.**
Forcheron Fabien; Agay Diane; Scherthan Harry; Riccobono Diane; Hérodin Francis; Meineke Viktor; Drouet Michel.
PlosOne 2012; Feb 7:e31694
- **Adipocyte derived stem cells favour healing in a new minipig model of cutaneous radiation syndrome through reepithelialisation and neoangiogenesis.**
Forcheron Fabien; Agay Diane; Scherthan Harry; Riccobono Diane; Vivier Mylène; Ballester Bruno; Hérodin Francis; Meineke Viktor; Drouet Michel.
Burns 2011. Sept. 37:S21.

Communications orales :

Congrès internationaux

- **Cutaneous radiation syndrome: Advances in Stem Cell Therapy.**
Riccobono Diane; François Sabine; Forcheron Fabien; Agay Diane; Scherthan Harry; Meineke Viktor; Drouet Michel.
2nd symposium of radiobiology; Paris (France); 13-14 octobre 2014
- **Thérapie génique transitoire; évaluation d'une nouvelle stratégie pour le traitement du syndrome cutané radio-induit.**
Riccobono Diane; Agay Diane; Forcheron Fabien; Scherthan Harry; Meineke Viktor; Drouet Michel.
11^{ème} Colloque International de Radiobiologie Fondamentale et Appliquée; La Grande Motte (France); 6-10 octobre 2013
- **Gene therapy and radiologic burn: a preclinical study.**
Riccobono Diane; Agay Diane; Forcheron Fabien; Scherthan Harry; Meineke Viktor; Drouet Michel.
15th European Burn Association Congress; Vienne (Autriche); 28-31 août 2013
- **Gene therapy: a new approach to mitigate cutaneous radiation syndrome.**
Riccobono Diane; Fabien Forcheron; Scherthan Harry; Agay Diane; Meineke Viktor; Drouet Michel.
Global conference on radiation topics, ConRad; Munich; 13-17 mai 2013

Congrès nationaux

- **Thérapie génique et brûlure radiologique: premier pas vers une application clinique.**
Riccobono Diane; Agay Diane; Forcheron Fabien; Scherthan Harry; Meineke Viktor; Drouet Michel.
33^{ème} congrès national de la Société Française d'Etude et de Traitement des Brûlures; Nantes; 12-14 juin 2013
- **Application de la thérapie cellulaire et génique au traitement du syndrome cutané radio-induit.**
Riccobono Diane.
5^{ème} biennale de la recherche du Service de Santé des Armées; Paris; 26-28 juin 2012

- **Cellules souches d'origine adipocytaire autologues et allogéniques utilisées pour le traitement du syndrome cutané radio-induit.**
Riccobono Diane; Forcheron Fabien, Scherthan Harry; Agay Diane; Meineke Viktor; Drouet Michel.
32^{ème} congrès national de la Société Française d'Etude et de Traitement des Brûlures ; Nantes ; 13-15 juin 2012
- **Cellules Souches d'origine adipocytaire dans le traitement du syndrome cutané radio-induit : banking or not banking ?**
Riccobono Diane.
Journée des Internes et des Assistants de l'Ecole du Val de Grâce ; Paris, 13 octobre 2011

Communications affichées

Congrès internationaux

- **Intra-muscular injections of adipose tissue derived stem cells for cutaneous radiation syndrome: preliminary results in minipig**
Riccobono Diane; Forcheron Fabien; Hérodin Francis ; Agay Diane; François Sabine; Scherthan Harry; Meineke Viktor; Drouet Michel.
41st Annual meeting European Radiation Research Society; Rhodes, Grèce; 14-19 septembre 2014
- **Development of a new minipig model of transient gene therapy to treat cutaneous radiation syndrome**
Riccobono Diane; Forcheron Fabien; Agay Diane; Scherthan Harry; Meineke Viktor; Drouet Michel.
20th congress of International Society of Cellular Therapy; Paris, France; 24-26 avril 2014
- **Gene and cell therapy: application to mitigate cutaneous radiation syndrome**
Riccobono Diane; Agay Diane; Forcheron Fabien; Scherthan Harry; Meineke Viktor; Drouet Michel.
23rd European Tissue Repair Society meeting; Reims, France; 23-25 octobre 2013

- **Cell and gene therapy to mitigate cutaneous radiation syndrome: evaluation in animal models**
Riccobono Diane; Agay Diane; Forcheron Fabien; Scherthan Harry; Meineke Viktor; Drouet Michel.
11th annual meeting of International Society for Stem Cell Research; Boston, USA; 11 -18 juin 2013
- **Application de la thérapie génique au traitement de la brûlure radiologique.**
Riccobono Diane; Garrigou Philippe; Scherthan Harry; Meineke Viktor; Agay Diane; Drouet Michel.
10^{ème} Colloque International de Radiobiologie Fondamentale et Appliquée ; Anglet ; 11-16 septembre 2011
- **Gene therapy as a new approach to mitigate cutaneous radiation syndrome: hype or reality?**
Riccobono Diane; Forcheron Fabien, Garrigou Philippe; Scherthan Harry; Vivier Mylène; Meineke Viktor; Agay Diane; Drouet Michel.
9th annual meeting of International Society for Stem Cell Research; Toronto, Canada; 15 -18 juin 2011

Congrès nationaux

- **Intérêt des cellules souches d'origine adipocytaire autologues ou allogéniques dans le traitement du syndrome cutané radio-induit.**
Riccobono Diane; Forcheron Fabien; Scherthan Harry; Agay Diane; Meineke Viktor; Drouet Michel.
Congrès annuel de la Société Française de Greffe de Moelle osseuse et de Thérapie Cellulaire ; Paris ; 25 et 26 octobre 2012
- **Utilisation des cellules souches d'origine adipocytaire autologues ou allogéniques pour la prise en charge du syndrome cutané radio-induit.**
Riccobono Diane; Forcheron Fabien; Scherthan Harry; Agay Diane; Meineke Viktor; Drouet Michel.
5^{ème} Biennale de la recherche du Service de Santé des Armées ; Paris ; 26 et 28 juin 2012 :
- **Les cellules souches d'origine adipocytaire autologues ou allogéniques pour le traitement de la brûlure radiologique.**
Riccobono Diane; Garrigou Philippe; Scherthan Harry; Meineke Viktor; Agay Diane; Drouet Michel.
Journée de la recherche biomédicale de la faculté de Grenoble ; Grenoble ; 4 mai 2011

TABLES DES MATIERES

TABLES DES MATIERES

ABREVIATIONS	25
---------------------	-----------

LISTE DES TABLEAUX	31
---------------------------	-----------

LISTES DES FIGURES	31
---------------------------	-----------

INTRODUCTION GENERALE	37
------------------------------	-----------

I) EFFETS BIOLOGIQUES DES RAYONNEMENTS IONISANTS	38
I.A) GENERALITES SUR LES RAYONNEMENTS IONISANTS	38
I.A.1) Définition	38
I.A.2) Caractérisation d'une source : éléments de dosimétrie	40
I.A.3) Les principales sources de rayonnements ionisants	41
I.A.4) Mode d'exposition	42
I.A.5) Radioactivité naturelle	43
I.B) RISQUE D'ACCIDENTS GRAVES D'EXPOSITIONS	45
I.B.1) Risque civil	45
I.B.2) Risques militaire et terroriste	46
I.C) PHYSIOPATHOLOGIE DES FORTES DOSES	47
I.C.1) Niveau physique	49
I.C.2) Niveau physico-chimique	49
I.C.2.a) Effets directs des rayonnements ionisants	50
I.C.2.b) Effets indirects des rayonnements ionisants	50
I.C.2.c) Lésions moléculaires	50
I.C.3) Niveau biologique	53
I.C.3.a) Réponse cellulaire	53
I.C.3.b) Niveau tissulaire	63

II) LE SYNDROME CUTANE RADIO-INDUIT	65
II.A) LE TISSU CUTANE	65
II.A.1) Description	65
II.A.2) Réparation cutanée	67
II.A.2.a) Phase inflammatoire	67
II.A.2.b) Phase de prolifération	68
II.A.2.c) Remodelage	69
II.A.2.d) Importance de la vascularisation	69
II.B) EVOLUTION CLINIQUE DU SYNDROME CUTANE RADIO-INDUIT	71
II.C) TRAITEMENT LOCAL ET MEDICAL DU SYNDROME CUTANE RADIO-INDUIT	72
II.D) PRISE EN CHARGE CHIRURGICALE DU SYNDROME CUTANE RADIO-INDUIT	73
II.D.1) Evaluation dosimétrique et prise en charge chirurgicale	73
II.D.2) Injection de cellules souches mésenchymateuses isolées à partir de la moelle osseuse	74
II.D.2.a) Intérêt des cellules souches mésenchymateuses isolées à partir de la moelle osseuse	75
II.D.2.b) Production des BM-MSC	81
II.D.3) Protocole de prise en charge des patients victimes de SCR	81
II.E) LIMITE DU TRAITEMENT PAR INJECTION DE BM-MSC	83
II.E.1) Prélèvement de moelle osseuse : acte invasif et douloureux	83
II.E.2) Pertes massives et retard au diagnostic	83
II.E.3) Irradiation hétérogène	83
III) OPTIMISATION DU TRAITEMENT	85
III.A) LES CELLULES SOUCHES DERIVES DU TISSU ADIPEUX	85
III.A.1) Caractérisation des ASC	86
III.A.2) Potentiel de prolifération et capacité de différenciation des ASC	87
III.A.3) Migration et activité paracrine des ASC	88
III.A.4) Applications cliniques des ASC dans la régénération tissulaire	90
III.A.5) Evaluation des greffes d'ASC autologues dans le traitement du syndrome cutané radio-induit	90
III.B) BANQUE CELLULAIRE	91
III.C) THERAPIE GENIQUE TRANSITOIRE	92
III.C.1) Principes et intérêt	92
III.C.2) La protéine Sonic Hedgehog	94
III.C.2.a) Description	94

III.C.2.b) Voie de signalisation Shh	97
III.C.2.c) Intérêt de Shh pour la thérapie génique transitoire	98

OBJECTIFS DE LA THÈSE **103**

PARTIE I : EVALUATION DES BANQUES DE CELLULES SOUCHES **107**

I) EXPERIMENTATION <i>IN VIVO</i> SUR UN MODÈLE DE MINIPORC	107
II) ETUDE TRANSCRIPTOMIQUE DE PRELEVEMENTS CUTANES IRRADIES	129
II.A) MATÉRIELS ET MÉTHODES	129
II.A.1) Biopsies cutanées	129
II.A.2) Extraction des ARNm	130
II.A.3) Préparation des échantillons pour l'analyse par micro-array	130
II.A.4) Identification des sondes	131
II.A.5) Analyse statistique	132
II.B) RÉSULTATS	133
II.B.1) Classification hiérarchiques et gènes sélectionnés	133
II.B.2) Voies métaboliques analysées	135
III) DISCUSSION	141

PARTIE II : MISE AU POINT D'UN PROTOCOLE DE THÉRAPIE GÉNIQUE **149**

I) MATÉRIELS ET MÉTHODES	150
I.A) MISE AU POINT DU PROTOCOLE DE TRANSFECTION	150
I.A.1) Description et production du plasmide	150

I.A.2) Transformation bactérienne	151
I.A.3) Extraction	151
I.A.4) Culture des ASC et ensemencement	151
I.A.5) Transfection	153
I.A.6) Evaluation des conditions optimales de transfection	154
I.A.7) Contrôle de la production de Shh	155
I.A.7.a) Extraction des protéines	155
I.A.7.b) Dosage des protéines totales	156
I.A.7.c) Western-Blot	156
I.A.8) Analyses statistiques	157
I.B) MODELE ANIMAL	157
II) RESULTATS	159
II.A) DETERMINATION DES CONDITIONS OPTIMALES DE TRANSFECTION	159
II.B) EVALUATION DE L'EFFICACITE ET DE LA TOLERANCE DU GREFFON ASC-SHH DANS UN MODELE PRECLINIQUE DE SCR (ARTICLE 2)	161
III) DISCUSSION	181
<u>PARTIE III : ETUDE MECANISTIQUE DE LA</u>	
<u>MODULATION DE LA REPONSE CELLULAIRE A</u>	
<u>L'IRRADIATION PAR LES ASC/ASC-SHH. IMPLICATION</u>	
<u>D'UNE ACTIVITE PRO-ANGIOGENIQUE</u>	189
I) MATERIELS ET METHODES	191
I.A) EVALUATION DE L'EFFET DES MILIEUX CONDITIONNES SUR DES FIBROBLASTES PORCINS IRRADIES	191
I.A.1) Culture des fibroblastes dermiques de miniporcs	191
I.A.2) Protocole expérimental	191
I.A.2.a) Production de milieux conditionnés	191
I.A.2.b) Irradiation	194
I.A.2.c) Choix des paramètres évalués	194

I.A.3)	Evaluation des espèces réactives de l'oxygène dans les fibroblastes porcins après irradiation	195
I.A.3.a)	Préparation des lysats cellulaires	196
I.A.3.b)	Test du Ferric Reducing Anti-oxidant Power ou Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP):	196
I.A.3.c)	Dosage des groupements thiols protéiques	197
I.A.3.d)	Activité glutathion peroxydase	198
I.A.4)	Evaluation des dommages à l'ADN des fibroblastes porcins après irradiation	199
I.A.5)	Evaluation de la survie des fibroblastes dermiques porcins après irradiation	201
I.A.5.a)	Pouvoir de prolifération des fibroblastes irradiés	201
I.A.5.b)	Apoptose/ nécrose	201
I.A.5.c)	Sénescence	203
I.A.6)	Etude de l'expression génique des fibroblastes porcins après irradiation	203
I.A.6.a)	Extraction des ARN totaux	204
I.A.6.b)	Transcription inverse	204
I.A.6.c)	PCR	205
I.A.7)	Analyse statistique	209
I.B)	EVALUATION DES PROPRIETES PRO-ANGIOGENIQUES DES ASC ET ASC-SHH <i>IN VIVO</i> DANS UN MODELE DE MATRIGEL™	210
I.B.1)	Souris NOD/SCID $\beta 2^{-/-}$	210
I.B.2)	Conception de l'implant	211
I.B.3)	Traitement de l'implant	212
I.B.4)	Spectrophotométrie	213
I.B.5)	Analyse statistique	213
I.B.6)	Marquage immunohistochimique des implants	214
II)	RÉSULTATS : EFFETS DES MILIEUX CONDITIONNES SUR DES FIBROBLASTES PORCINS IRRADIES	217
II.A)	EVALUATION DES ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE DANS LES FIBROBLASTES PORCINS APRES IRRADIATION	217
II.A.1)	Evaluation du FRAP	217
II.A.2)	Quantification des protéines thiols	219
II.A.3)	Evaluation de l'activité glutathion peroxydase	220

II.B) EVALUATION DES DOMMAGES A L'ADN DES FIBROBLASTES PORCINS APRES IRRADIATION	222
II.C) EVALUATION DE LA SURVIE DES FIBROBLASTES DERMIIQUES PORCINS APRES IRRADIATION	223
II.C.1) Pouvoir de prolifération des fibroblastes irradiés	223
II.C.2) Apoptose/ Nécrose	225
II.C.2.a) Apoptose	225
II.C.2.b) Nécrose	226
II.C.3) Sénescence	227
II.D) ETUDE DE L'EXPRESSION GENIQUE DES FIBROBLASTES PORCINS APRES IRRADIATION	229
II.D.1) Effet des milieux conditionnés sur l'expression des gènes pro-angiogéniques	229
II.D.2) Effet des milieux conditionnés sur l'expression des gènes pro-inflammatoire	232
II.D.3) Effets des milieux conditionnés sur l'expression des gènes du cycle cellulaire	233
III) RESULTATS : EVALUATION DES PROPRIETES PRO-ANGIOGENIQUES DES ASC ET ASC-SHH <i>IN VIVO</i> DANS UN MODELE DE MATRIGEL™	235
III.A) ANALYSE SPECTROMETRIQUE DE LA QUANTITE D'HEMOGLOBINE DANS LES MATRIGEL™	235
III.B) ANALYSE MACROSCOPIQUE ET IMMUNO-HISTOCHEMIE	236
III.B.1) Etude macroscopique	236
III.B.2) Etude immuno-histochimique	237
III.B.2.a) Analyse histologique	237
III.B.2.b) Marquage immunochimique	238
IV) DISCUSSION	241
IV.A) EFFETS DU SECRETOME DES ASC ET ASC-SHH SUR LES REPOSES CELLULAIRES PRECOSES POST-IRRADIATION	242
IV.B) SURVIE CELLULAIRE DES FIBROBLASTES IRRADIES	246
IV.C) EFFET IMMUNOMODULATEUR DU SECRETOME DES ASC ET ASC-SHH	249
IV.D) PROPRIETES PRO-ANGIOGENIQUES DES ASC ET ASC-SHH	251
<u>DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES</u>	<u>259</u>

ANNEXES	271
----------------	------------

REFERENCES	309
-------------------	------------

I) INDEX DES SITES INTERNET	309
II) REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	313

ABREVIATIONS

7-AAD: 7 Amino-Actinomycine D

A

ADNc : Acide Désoxyribonucléique complémentaire

AIEA: Agence Internationale de l'Energie Atomique

AMH: Anti-Mullarian Hormon

ANG: Angiopoïétine

Apaf: Apoptotic peptidase activating factor

APC: Allophycocyanine

ARBP: Attachment Region Binding Protein

ARF: Alternate Reading Frame

ARNm: Acide Ribonucléique messenger

ASC: Adipose tissue derived Stem Cell

ATM: Ataxia Telangectasia Mutated

ATR: Ataxia Telangectasia and Rad3 related

B-C

BCA: Acide Bicinchoninique

Bcl 2: B-Cell Lymphoma 2

BLM: Bloom syndrome, RecQ helicase-like

BM MSC: Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell

Bmi1: B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog

BMP: Bone Morphogenic Protein

BMPR2: Bone Morphogenic Protein Receptor 2

Bq: Becquerel

BSA: Bovine Serum Albumin

CDB: Cassure Double Brin

Cdc: Cell division cycle

CDK: Kinase dépendante des Cyclines

CFLAR: CASP8 and FADD-like Apoptosis Regulator

Chk: Checkpoint

CMF : Cytométrie en Flux

CMH: Complexe Majeur d'Histocompatibilité
Cq: quantification Cycle
CSB: Cassure Simple Brin
CTSA: Centre de Transfusion Sanguine des Armées
CXCL1: Chemokine C-X-C motif Ligand 1
Cy: Cyanine
CycA: Cyclophilin A
Cyr61: Cystein rich angiogenic inducer 61

D-E

DAB: Diaminobenzidine
Dhh: Desert Hedgehog
DIPS: Dispatched Protein
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO: Diméthylsulfoxyde
DO: Densité Optique
DTNB: bis-5',5'-dithio-2-nitrobenzoate
ECL: Enhanced Chemiluminescence
EGF: Epithelial Growth Factor
EPO: érythropoïétine
EPPI: Eau Pour Préparation Injectable
ERO: Espèces Réactives de l'Oxygène
eV: électron-Volt

F-G

FADD: Fas-Associated protein with Death Domain
FGF: Fibroblast Growth Factor
FITC: Fluorescein IsoThioCyanate
FLICA: Fluorochrom Labeled Inhibitor of Caspases
FRAP: Ferric Reducing Anti-oxidant Power / Ferric Reducing Ability of Plasma
FVS: Fraction Vasculaire Stromale
GDNF: Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor
GFP: Green Fluorescent Protein
GPx: Glutathion peroxydase

GR: Glutathion Reductase

GSH: Glutathion réduit

GSSH: Glutathion oxydé

Gy: Gray (1J/Kg)

H-I-J-K-L

Hb: Hémoglobine

HBSS: Hank's Buffered Salt Solution

HES: Hématoxyline – Eosine - Safran

HIA: Hôpital d'Instruction des Armées

hRP: horseradish peroxydase

Ig: Immunoglobuline

IGF-1: Insulin Growth Factor-1

IGFBP: Insulin like Growth Factor Binding Protein

Ihh: Indian hedgehog

IL: Interleukine

IMDM: Iscove's Modified DMEM

INHA: Inhibin Alpha iPSC : induced Pluripotent Stem Cells

IRBA: Institut de Recherche Biomédicale des Armées

IRSN: Institut de Radioprotection et de Sureté Nucléaire

ISCT: International Society of Cellular Therapy

KGF: Keratinocyte Growth Factor

Kif7: Kinesin Family member 7

LB: Lutheria Broth

LINGO1: Leucin Rich repeat and Ig Domain containing 1

M-N-O

MC: Milieu Conditionné

MCP: Monocyte Chemoattractant Protein

MEC: Matrice Extracellulaire

MICI: Maladie Inflammatoire Chronique de l'Intestin

MIP: Macrophage Inflammatory Protein

MMP: Metallopeptidase

MO: Moelle Osseuse

MSC: Mesenchymal Stem/ Stromal Cell; Cellules Souches/Stromales Mésoenchymateuses

NADPH: Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate

NFκB: Nuclear Factor kappa B

NK: Natural Killer

NTRK2: Neurotrophic Tyrosine Kinase Receptor type 2

NO: monoxide d'azote

NOD/SCID: Non Diabetic Disease/ Severe Combined Immune Deficiency

NODAL: Nodal growth differentiation factor

NOx: NADPH oxidase

Nrf2: Nuclear factor erythroid 2 [NF-E2]-related factor 2

P-Q-R

PBS: Phosphate BufferSaline

PCR: Polymerase Chain Reaction

PDGF: Platelet derived Growth factor

PECAM: Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule

PG: Prostaglandine

PIC: Protease Inhibitor Cocktail

PKA: Protéine Kinase A

Ptch: Protéine Patched

PVDF: Polyvinylidene Fluoride

RANTES: Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted

RECQL4: RecQ Protein Like 4

RI: Rayonnements Ionisants

RIPA: Radio-Immuno-Precipitation Assay

RIPK2: Receptor Interacting Serine -Threonine Kinase 2

RPMI: Roswell Park Memorial Institute medium

RTqPCR: Retrotranscription quantitative Polymerase Chain Reaction

S-T-U

SAI: Syndrome Aigu d'Irradiation

SCGE: Single Cell Gel Electrophoresis assay

SCR: Syndrome Cutané Radio-induit

SDF-1: Stromal Derived Factor 1

SH: Groupement thiol

Shh: Protéine Sonic hedgehog Protéine Smoothened

SMAD: condensation de Small body size et Mothers Against Decapentaplegic Smo

SOC: Super Optimal broth with Catabolite repression

SOD: Superoxyde Dismutase

SPARC: Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine

SPRI: Sénescence Prématuratione Radio-Induite

SuFu: Suppressor of Fused

Sv: Sievert

SVF : Sérum de Veau Foetal

TA: Tissu Adipeux

TBP: Tata Box Binding Protein

TGF: Tumor Growth Factor

TIMP: Metallopeptidase Inhibitor

TNF: Tumor Necrosing Factor

TPTZ: tripyridyltriazine

TRADD: Tumor necrosis factor Receptor type 1-Associated Death Domain protein

V-W-X-Y-Z

VE: Vésicules Extracellulaires

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

vWF: Facteur Von Willebrandt

WB: Western Blot

YWHAZ: Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein,

Zeta polypeptide

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Caractéristiques phénotypiques des BM-MSc.	77
Tableau II : Avantages et inconvénients des BM-MSc pour leur utilisation clinique.....	80
Tableau III: Caractéristiques phénotypiques des ASC.....	86
Tableau IV : Tableau récapitulatif des molécules sécrétées par les ASC.	89
Tableau V : Listes des voies métaboliques impliquant directement des gènes significativement surexprimés chez les animaux recevant des greffes d'ASC autologues.....	135
Tableau VI : Voies métaboliques dans lesquelles des gènes significativement surexprimés chez les animaux recevant des ASC autologues sont indirectement impliqués.	139
Tableau VII : Tableau récapitulatif des résultats d'optimisation du protocole de thérapie génique in vitro.	183
Tableau VIII: Evaluation des effets des milieux conditionnés sur les fibroblastes irradiés.....	195
Tableau IX: Caractéristiques des couples d'amorces utilisés pour l'amplification des ADNc par PCR en temps réel et leurs conditions optimales de PCR.	207
Tableau X: Liste et références des anticorps utilisés pour l'analyse immuno-histochimique des Matrigel™ implantés dans des souris NOD/SCID β 2.....	214

LISTES DES FIGURES

Figure 1 : Schéma descriptif simplifié des émissions α , β , neutrons et γ	39
Figure 2 : Caractéristiques principales d'une source de rayonnements ionisants et grandeurs dosimétriques.....	40
Figure 3: Les différents modes d'exposition aux rayonnements ionisants.....	42
Figure 4 : Effets des différents rayonnements ionisants en fonction du mode d'exposition.....	43
Figure 5: Les différentes sources de radioactivité naturelle.....	44
Figure 6 : Accidents radiologiques rapportés au niveau mondial.	45
Figure 7 : Cinétique des dommages radio-induits.....	48
Figure 8 : Effets physico-chimique des rayonnements ionisants.	49
Figure 9 : Aberrations chromosomiques secondaires à une irradiation.	51
Figure 10 : Schéma simplifié des mécanismes d'arrêt du cycle cellulaire mis en place en réponse aux dommages à l'ADN.	55
Figure 11 : Représentation simplifiée des voies intrinsèques et extrinsèques de l'apoptose.	58
Figure 12 : Morphologie des fibroblastes en sénescence.	60

Figure 13 : Schéma simplifié des voies d'activation de l'apoptose dépendante de p53 et de la sénescence après dommages à l'ADN.....	61
Figure 14 : Représentation schématique de la peau humaine et de ses principaux composants.	65
Figure 15 : Les différentes étapes et les facteurs impliqués dans l'angiogenèse.....	70
Figure 16 : Evolution clinique du syndrome cutané radio-induit.....	72
Figure 17 : Chronologie du traitement de référence du syndrome cutané radio-induit par chirurgie et thérapie cellulaire.....	82
Figure 18 : Structure 3D de la protéine ShhN.....	95
Figure 19 : Schéma récapitulatif de la synthèse, la sécrétion et la signalisation de la protéine Sonic Hedgehog.....	96
Figure 20 : Mode d'action des récepteurs de Shh.	97
Figure 21 : Protocole de préparation et d'injection d'ASC dans un modèle miniporc de syndrome cutané radio-induit.....	108
Figure 22 : Classification hiérarchique des gènes analysés par micro-array.....	133
Figure 23 : Analyse statistique des gènes différentiellement exprimés dans chacun des groupes étudiés.....	134
Figure 24 : Voie de signalisation de l'actinine R.	136
Figure 25 : Voie de signalisation de libération de la norépinéphrine.....	137
Figure 26 : Voie de signalisation pour l'assemblage des jonctions focales et des mouvements basés sur l'actomyosine.....	137
Figure 27 : Voie de signalisation de l'apoptose.	138
Figure 28 : Plasmide pIRES 2-EGFP.	150
Figure 29 : Viabilité des ASC 2 jours après transfection en fonction du pourcentage de confluence.	159
Figure 30 : Pourcentage de cellules transfectées en fonction de la confluence.....	160
Figure 31 : Schéma récapitulatif de la chronologie expérimentale.	192
Figure 32: Protocole expérimental d'étude des effets des milieux conditionnés par des ASC ou des ASC-Shh sur des fibroblastes irradiés.	193
Figure 33 : Exemple de résultats de test SCGE et valeurs permettant de déterminer le tail moment.	200
Figure 34: Schéma synthétique du protocole expérimental d'évaluation des effets pro-angiogéniques des ASC et des ASC-Shh in vivo.	212
Figure 35: Evaluation du pouvoir anti-oxydant des fibroblastes après irradiation par mesure du FRAP.	218
Figure 36 : Concentration des protéines thiols dans les fibroblastes après irradiation.....	219
Figure 37 : Unité relative de GPx dans les fibroblastes post-irradiation.....	220

Figure 38 : Comparaison de l'activité GPx post-irradiation aux temps précoces et tardifs pour chaque condition.....	221
Figure 39 : Evaluation des dommages à l'ADN après irradiation.....	222
Figure 40: Pourcentage de colonies formées 14 jours après irradiation.....	224
Figure 41 : Evaluation de l'apoptose des fibroblastes après irradiation.....	225
Figure 42 : Evaluation du nombre de fibroblastes en nécrose après irradiation à 25Gy en fonction du milieu de culture.	226
Figure 43 : Pourcentage de fibroblastes en sénescence prématurée dans le milieu témoin.	227
Figure 44 : Evaluation de la sénescence des fibroblastes après irradiation.....	228
Figure 45: Variations d'expression de l'ANG1.	230
Figure 46: Variations d'expression de VEGF α	231
Figure 47 : Variations d'expression l'I β 1 α	232
Les protéines p53 et p16/14 sont impliquées dans les étapes d'arrêt du cycle cellulaire et de mort programmée.....	233
Figure 48: Variations d'expression de p53 et p16/14.....	233
Figure 49 : Quantité d'hémoglobine dans les Matrigel™ 2 semaines après leur implantation dans des souris NOD/SCID β 2 ^{-/-}	235
Figure 50 : Photographie des Matrigel™ avant prélèvement, à J14 post implantation.	236
Figure 51: Coloration hématoxyline-éosine-safran des Matrigel™.....	237
Figure 52: Analyse immunochimique des Matrigel™ marqués par un anticorps anti CD31.....	239
Figure 53 : Schéma synthétique des voies de signalisation activant la transcription du gène de l'angiopoïétine 1.....	251
Figure 54 : Schéma synthétique des voies de signalisation activant la transcription du gène du VEGF α	252

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

La radioactivité est un domaine méconnu dont les conséquences ont longtemps été sous-estimées. Les effets déterministes des fortes doses sont désormais bien connus pour chaque tissu et de nombreux travaux de recherche ont été réalisés pour améliorer la prise en charge des atteintes hématologiques, neurologiques, gastro-intestinales et cutanées secondaires à une irradiation. La peau qui représente un organe de défense contre les agressions extérieures peut ainsi être exposée lors d'irradiation externe à des doses importantes de rayonnements X ou γ , qui entraîneront le développement de lésions cutanées spécifiques rassemblées sous le terme de syndrome cutané radio-induit (SCR). Avec l'émergence ces dix dernières années des cellules souches et de leur potentiel pro-régénératif en thérapie cellulaire leur application a naturellement été envisagée dans le traitement du SCR. Le protocole actuel combinant la chirurgie guidée par dosimétrie physique, les injections de cellules souches mésenchymateuses isolées à partir de la moelle osseuse et les greffes de peau autologue est une véritable avancée médicale. Ce traitement lourd et douloureux reste cependant limité à la prise en charge de patients isolés.

Le travail présenté dans cette thèse concerne l'utilisation potentielle d'un autre type de cellules souches, les cellules souches dérivées du tissu adipocytaire pour améliorer la prise en charge du SCR. Différentes stratégies thérapeutiques ont été mises au point et évaluées : les banques de cellules souches autologues et allogéniques, l'optimisation des cellules souches par thérapie génique transitoire et l'utilisation du sécrétome des cellules souches dérivées du tissu adipeux génétiquement modifiées ou non.

Les protocoles de thérapie cellulaire ainsi proposés ouvrent un vaste champ de recherche et d'application en clinique humaine pour le traitement du syndrome cutané radio-induit.

I) EFFETS BIOLOGIQUES DES RAYONNEMENTS IONISANTS

I.A) Généralités sur les rayonnements ionisants

I.A.1) Définition

Les rayonnements ionisants (RI) ont été découverts il y a plus d'un siècle par Henry Becquerel en 1895. Ils disposent d'une énergie suffisante pour ioniser une molécule dans la matière et sont produits naturellement suite au passage d'un état instable de l'atome vers son état stable (radioactivité naturelle tellurique, rayonnements cosmiques...) ou artificiellement (accélérateurs, tubes à rayons X, *etc*). Les RI peuvent être classifiés en corpusculaires et électromagnétiques en fonction de leur nature et directement/indirectement ionisant en fonction de leur mode d'interaction avec la matière. Les atomes, constituants de la matière, présentent tous une structure générale similaire avec un noyau constitué à la fois de protons chargés positivement et de neutrons (particule neutre). Autour du noyau gravitent des électrons, 2000 fois plus légers et chargés négativement, qui constituent le cortège électronique. En fonction du nombre de neutrons et de protons, le noyau atomique est plus ou moins stable. En cas d'instabilité, celui-ci libère l'excédent de matière et/ou d'énergie (désintégration radioactive) pour tendre vers un état plus stable. C'est le phénomène de radioactivité (Bertin, 1994). Il existe différentes désintégrations radioactives à l'origine des quatre principaux types de rayonnements ionisants.

Le rayonnement α est une particule chargée qui correspond à l'émission de deux neutrons et deux protons par le noyau d'un élément lourd tel que le radon ou le plutonium. Du fait de sa masse, son trajet dans l'air est court : de l'ordre de quelques centimètres. Il est arrêté par une feuille de papier et sa pénétration ne dépasse pas les cellules mortes de la couche cornée de la peau (Bonche, 2012) (Figure 1).

Le rayonnement β est le mode de désintégration de nombreux noyaux d'atomes et se traduit par l'émission, à partir du noyau, d'une particule chargée négativement (β^-), similaire à un électron ou positivement (β^+) : positon. Cette particule plus légère a un trajet dans l'air de quelques mètres et de quelques millimètres dans les tissus, elle est arrêtée par une feuille d'aluminium (Bonche, 2012) (Figure 1).

L'émission de neutrons est naturellement moins fréquente et fait suite à la fragmentation de noyaux très lourds par un mécanisme de fission. A l'inverse des précédentes, cette particule est neutre. Son trajet dans l'air est d'environ un kilomètre et d'un mètre dans les tissus. Ils sont arrêtés par interaction avec les noyaux des éléments légers tels que l'eau ou la paraffine (Figure 1). Ces trois types de rayonnements (α , β et neutrons) ont une masse. Ce sont des rayonnements dit particuliers ou corpusculaires.

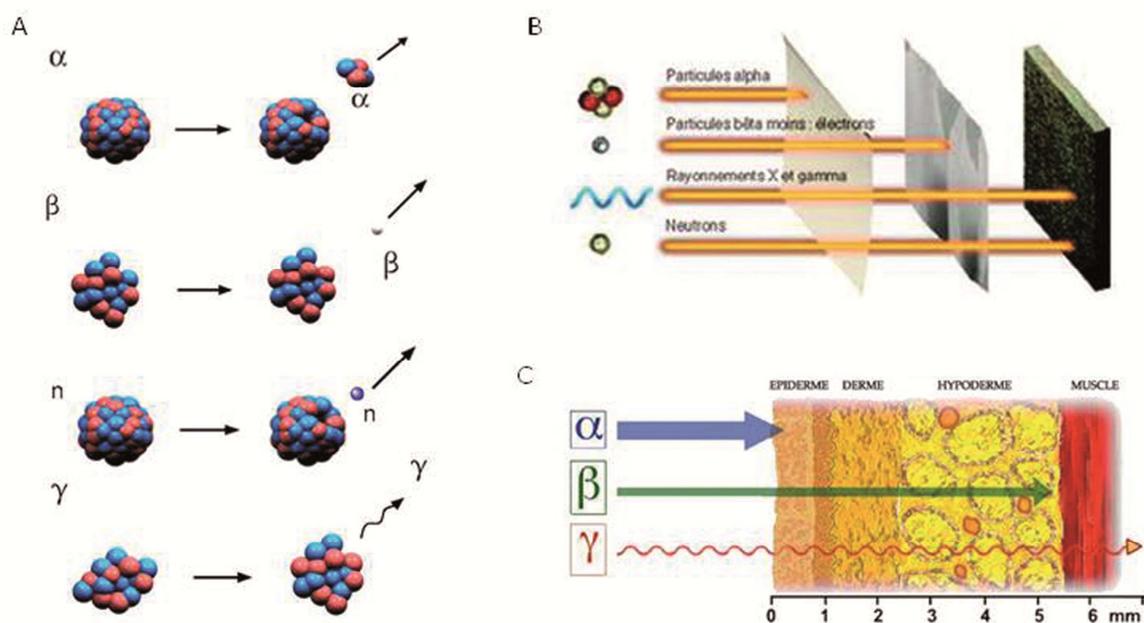


Figure 1 : Schéma descriptif simplifié des émissions α , β , neutrons et γ .

A. Les différents modes de désintégration radioactive

B. Trajet dans l'air des rayonnements α , β , γ/X et neutronique

C. Pénétration tissulaire des rayonnements α , β et γ

Schéma réalisé d'après (Bertin, 1994).

A l'inverse, il existe également des **rayonnements électromagnétiques γ et X** qui n'ont ni masse ni charge. Ils correspondent à un excès d'énergie émis par le radio-isotope sous forme de grain d'énergie : le photon. La différence entre un rayonnement γ et un rayonnement X vient de son origine. Le rayon γ est émis à partir du noyau et accompagne le plus souvent une émission α ou β . Le rayonnement X est issu du cortège électronique. Le Fe^{55} est un émetteur naturel de rayonnement X mais le plus souvent ces rayons sont produits industriellement dans un générateur de rayons X. Leur trajet dans l'air est de plusieurs kilomètres et de quelques mètres dans les tissus. Ils sont ralentis par les métaux lourds comme le plomb (Basdevant, 2011; Bonche, 2012) (Figure 1).

I.A.2) Caractérisation d'une source : éléments de dosimétrie

Pour déterminer et quantifier les effets d'un rayonnement ionisant lors de son interaction avec la matière vivante, et adapter les moyens de détection, de protection et de traitement, on dispose d'un certain nombre de paramètres résumés dans la figure 2.

Activité de la source A: Nombre de désintégrations/seconde en Becquerels (Bq)	
Période T: caractérisant les désintégrations (λ : constante radioactive d'un radio-isotope)	$T = \ln 2 / \lambda$ en Secondes (Sec)
Transfert d'énergie linéique TEL: Energie moyenne déposée localement par une particule lors de l'interaction avec la matière en keV/μm	
Dose absorbée D: Energie déposée par le RI par unité de masse $D = E$ (en joules)/masse (en Kg) D s'exprime donc en J/Kg= Gray (Gy)	
Dose équivalente H: prend en compte la nature du rayonnement $H = D$ (en Gy) $\times W_R$ en Sievert (Sv) W_R : facteur de pondération du rayonnement	
Dose efficace E: prend en compte la nature du rayonnement et le tissu traversé $E = H$ (en Sv) $\times W_T$ en Sievert (Sv) W_T : facteur de pondération du tissu traversé	

Figure 2 : Caractéristiques principales d'une source de rayonnements ionisants et grandeurs dosimétriques.

Une source radioactive se définit tout d'abord par son activité (nombre de désintégrations radioactives par seconde (en Becquerel : Bq)) et sa période radioactive (T) (temps nécessaire pour que la moitié des atomes radioactifs d'une source considérée à un instant t soit désintégrés naturellement).

Par ailleurs, l'énergie du rayonnement ionisant (E) est aussi importante à définir car elle va conditionner en partie sa pénétration. Elle s'exprime en Joules (J) ou en électron-

volt (eV). Cette énergie permet de quantifier les effets physiques et biologiques d'un faisceau de rayonnements ionisants.

En radiobiologie, le calcul de la dose absorbée (D) correspondant à l'énergie déposée par unité de masse en Gray (Gy= Joules/ Kg) est utilisé pour évaluer les effets biologiques et physiques des fortes doses de rayonnements ionisants.

Le débit de dose et le fractionnement de dose sont également des paramètres impactant fortement la réponse tissulaire principalement dans le cadre de la radiothérapie.

Enfin, en radioprotection, on utilise les doses équivalentes (H) et efficaces (E) exprimées en Sievert (Sv) qui tiennent compte de la qualité du rayonnement (rayonnement à fort ou faible transfert d'énergie linéique) et du tissu traversé (Bolus, 2001).

I.A.3) Les principales sources de rayonnements ionisants

Parmi les principales sources, il existe les **sources radioactives non scellées** constituées d'un élément radioactif dispersable. Elles sont utilisées pour le marquage de molécules ou en thérapeutique pour le traitement des cancers de la thyroïde notamment avec de l'iode¹³¹.

Par définition, les **sources scellées** sont non dispersables et composent notamment les gammagraphes utilisés en métallurgie pour contrôler la qualité des pièces. Elles sont également utilisées dans l'industrie pour la stérilisation ou en médecine (curiethérapie).

Les générateurs de rayonnements ionisants sont aussi une source d'utilisation fréquente. Ils permettent principalement la production de rayons X grâce à une alimentation électrique et sont très utilisés en radiothérapie et radiodiagnostic.

Enfin on retiendra les activités utilisant l'énergie nucléaire telles que les réacteurs ou les armes nucléaires. **Les réacteurs nucléaires** sont au nombre de 58, répartis dans 19 centrales nucléaires en France (plus grand nombre de réacteurs par habitant au monde).

Les armes nucléaires quant à elles peuvent être à l'origine de dégâts immenses en cas d'utilisation volontaire, mais pour lesquelles le risque d'accident est extrêmement faible (Cavallo *et al*, 2010). En revanche les essais nucléaires aériens réalisés il y a quelques décennies ont été à l'origine d'une dispersion importante de radioéléments dans l'atmosphère (Alexakhin *et al*, 2007).

I.A.4) Mode d'exposition

L'exposition aux rayonnements ionisants se caractérise par trois modes pouvant être combinés : l'exposition externe (ou irradiation), la contamination externe et la contamination interne.

En fonction du mode d'exposition et du type de rayonnements les effets biologiques seront différents (Cavallo *et al*, 2010) (Figure 3).

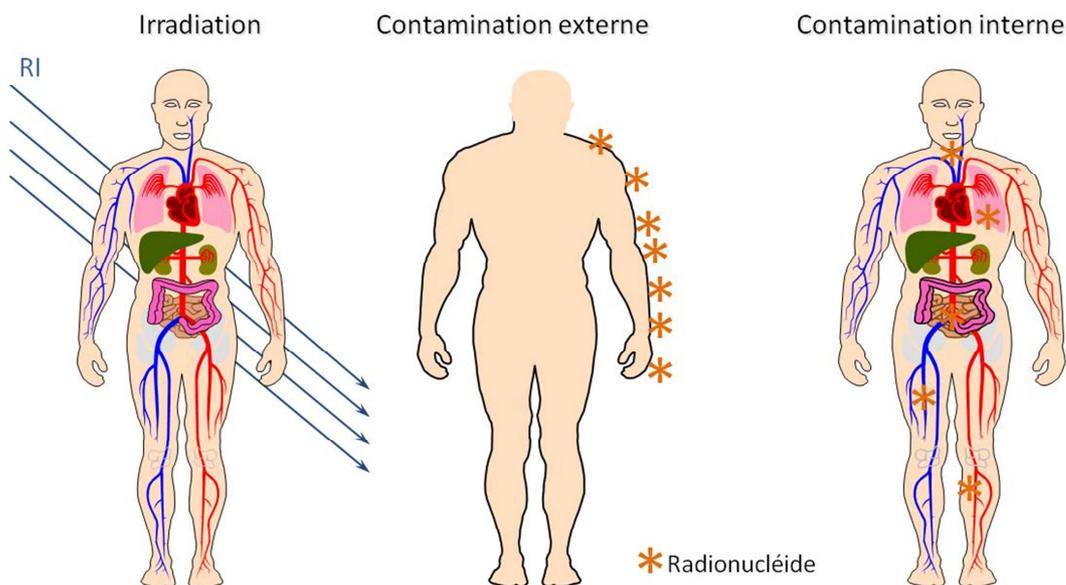


Figure 3: Les différents modes d'exposition aux rayonnements ionisants.

L'exposition externe correspond à une irradiation par une source qui est à distance de l'organisme. Lorsque celui-ci n'est plus exposé à la source, l'irradiation cesse. Un paradigme en médecine pour représenter cette notion est le suivant : « un blessé irradié n'irradie pas plus qu'un brûlé ne brûle ». Les rayonnements α ne passent pas la couche cornée de la peau et les rayonnements β de faible et moyenne énergie ne présentent pas un risque en exposition externe. Les rayonnements β de haute énergie peuvent passer le derme et causer des dommages, de même que les rayonnements γ/X qui peuvent atteindre à la fois la peau, le derme et les tissus profonds (Figure 4).

La contamination externe se définit par le dépôt de matières radioactives sur la peau suite à un contact direct avec des radio-isotopes d'une source non scellée ou à des

retombées de matières radioactives. Comme pour l'exposition externe, les rayonnements α n'ont aucun effet biologique et les rayonnements γ/X présentent les mêmes dangers. En revanche, les rayonnements β présentent un danger particulier par une atteinte exclusive de la peau (Figure 4).

Enfin, lors d'une **contamination interne** due à la pénétration de radio-isotopes dans l'organisme par ingestion, inhalation, voie transcutanée ou lésion cutanée, le risque lié aux rayonnements α est majeur car ces particules lourdes vont déposer leur énergie sur un parcours très court, induisant des lésions cellulaires importantes. Les effets des rayonnements β et γ/X sont identiques à ceux décrits lors d'une exposition externe (Figure 4).

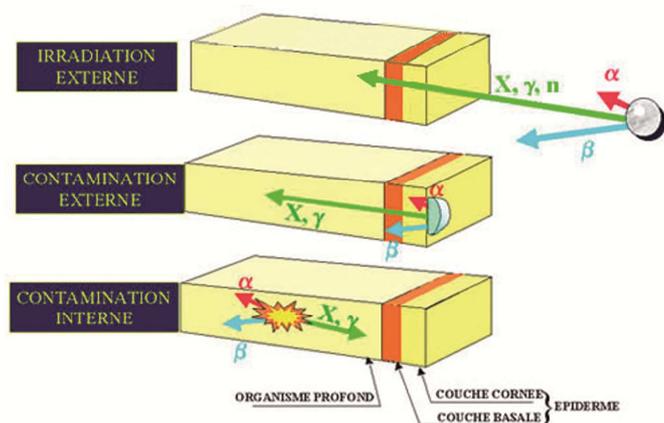


Figure 4 : Effets des différents rayonnements ionisants en fonction du mode d'exposition.

L'effet de chaque type de rayonnements varie en fonction du mode d'exposition en raison de leur énergie, de leur masse et de leur charge qui conditionnent leur trajet dans les tissus et le dépôt d'énergie.

Figure réalisée d'après (Bolus, 2001).

Dans ce travail, le mode d'exposition utilisée est l'exposition externe (ou irradiation externe) par des rayonnements à forte dose.

I.A.5) Radioactivité naturelle

La radioactivité naturelle constitue la principale source d'exposition aux rayonnements ionisants. En France, chaque personne reçoit une dose moyenne de

2,4 mSv à 3,7 mSv par an contre 1 mSv pour les examens médicaux. Les expositions varient d'une personne à l'autre en fonction de l'altitude, de la nature des sols et de l'habitation.

Cette exposition naturelle est due à quatre phénomènes distincts (Bertin, 1994) (Figure 5):

- Le rayonnement cosmique atténué par l'atmosphère et dont l'importance augmente avec l'altitude
- Le rayonnement tellurique provenant de la dégradation de l'écorce terrestre. Il varie selon la nature du sol : la radioactivité est 5 à 20 fois plus importante au niveau des sols granitiques par rapport aux sols sédimentaires
- L'ingestion de différents aliments ou de boissons composés naturellement d'isotopes radioactifs qui se fixent dans l'organisme
- L'inhalation de radioéléments en particulier le radon, la source de radioactivité naturelle la plus importante

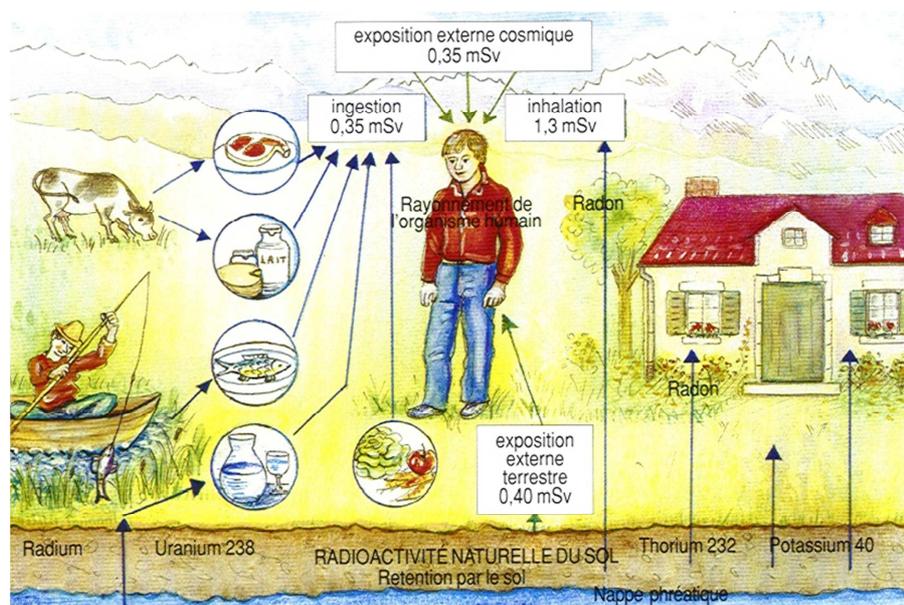


Figure 5: Les différentes sources de radioactivité naturelle.

L'homme est naturellement exposé à quatre sources naturelles de radioactivité : le rayonnement cosmique, le rayonnement tellurique, l'ingestion de produits contenant naturellement des radio-isotopes et l'inhalation de radioéléments en particulier le radon. Figure réalisée d'après [1, 2].

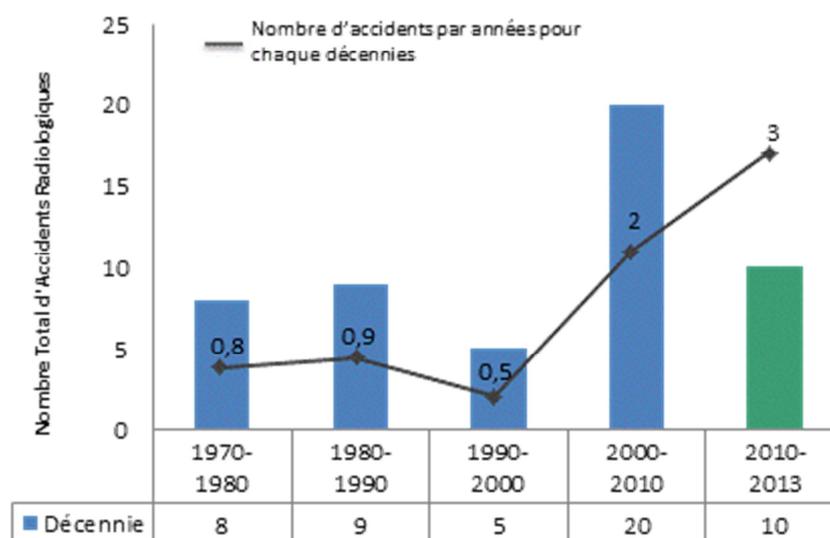
I.B) RISQUE D'ACCIDENTS GRAVES D'EXPOSITIONS

I.B.1) Risque civil

Ces 30 dernières années avec la montée en puissance de l'énergie nucléaire et de l'utilisation des rayonnements ionisants dans de nombreux domaines d'activité en particulier industriels et médicaux, une augmentation du nombre d'accidents a été rapportée à l'Agence Internationale de l'Energie Atomique (AIEA).

La figure 6A révèle une augmentation du nombre d'incidents graves ces deux dernières décennies avec une moyenne de trois accidents par an [3].

A



B

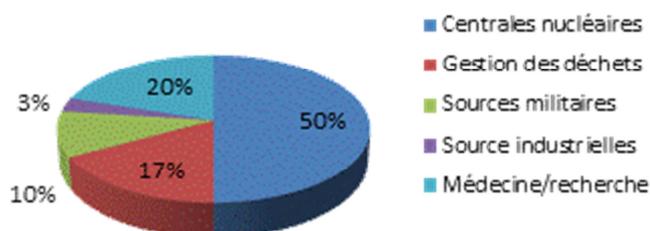


Figure 6 : Accidents radiologiques rapportés au niveau mondial.

A. Nombre d'accidents radiologiques par décennie

B. Distribution des victimes d'accidents radiologiques en fonction de l'origine de la source radioactive

Figure réalisée d'après les données de l'institut de Radioprotection et de Sureté Nucléaire (IRSN) et de l'AIEA [3; 4].

En considérant le nombre de victimes par accident, les centrales nucléaires sont à l'origine de la majorité des victimes sur ces 30 dernières années (pour exemple la catastrophe de Fukushima Daiichi en 2011 avec des doses relativement faibles (Taira *et al*, 2014) et Tchernobyl en 1986, fortes doses (Alexakhin *et al*, 2007)), cependant la fréquence de ces accidents est très faible avec un recul sur ces 50 dernières années. Le secteur industriel est néanmoins responsable de 51 % du nombre total des accidents radiologiques graves, suivi par la recherche avec 20 %, le nucléaire civil avec 13 %, la médecine avec 11 % et les activités militaires avec 5 % (Figure 6B) ; [4] ; (Lipsy *et al*, 2013)). Par ailleurs plusieurs accidents de surexpositions ont été rapportés ces quinze dernières années (Nenot, 2009) avec notamment l'accidents des patients sur-irradiés à l'hôpital d'Epinal qui a conduit au décès de quatre personnes et les accidents de surexposition à des sources scellées du Chili en 2006 et du Sénégal en 2007 au cours desquels deux personnes ont été exposées à des sources de gammagraphie (iridium¹⁹²).

I.B.2) Risques militaire et terroriste

Dans le domaine militaire, aucun accident grave n'a été rapporté en France depuis la catastrophe de In Ecker (essai nucléaire en mai 1962) qui a nécessité la décontamination de plus de 1 000 personnes sans que des cas de syndrome aigu d'irradiation aient été à déplorer. Cependant depuis le 11 septembre 2001, avec la montée de la menace terroriste et la dislocation de l'Union Soviétique plusieurs scénarios terroristes sont à envisager.

Deux d'entre eux en particulier sont considérés comme très probables : l'utilisation d'une source scellée ou d'une bombe sale.

La source scellée pourrait être déposée dans un lieu public comme le métro, un parc, un centre commercial et irradierait alors à forte dose et de manière insidieuse un grand nombre de personnes, provoquant chez les victimes exposées des irradiations corporelles partielles, totales ou localisées puis une panique importante à la découverte de la source.

Le scénario de la bombe sale consiste en un engin explosif « improvisé » contenant une matière radioactive qui serait dispersée au moment de l'explosion. Ce scénario aurait pour conséquence des blessures chirurgicales graves associées à une contamination interne et externe. Plusieurs attentats de ce type ont été déjoués notamment près de Grozny en 1998

par les services secrets russes qui avaient retrouvé des engins explosifs chargés de matières radioactives.

Les autres scénarios envisagés sont la contamination intentionnelle de population via l'eau ou les épandages, l'attaque de centrales nucléaires et l'utilisation d'un engin nucléaire improvisé ou d'une arme nucléaire. Ces scénarios sont moins probables car plus, ou très difficilement réalisables. Dick Cheney déclarait cependant en 1991 : « *Les soviétiques possèdent 25 000 à 30 000 armes nucléaires. Si ils font un bon travail de contrôle avec 99% de réussite, cela signifie que l'on pourrait avoir 250 bombes non contrôlées* » [5]. Ce risque, bien que peu probable, reste donc non négligeable.

I.C) PHYSIOPATHOLOGIE DES FORTES DOSES

Les risques liés à l'utilisation des rayonnements ionisants sont connus depuis longtemps, les premiers effets (lésion cutanée et dépilation) ayant été découverts dès 1896 (Stevens *et al*, 1896), un an seulement après la découverte des rayons X par Röntgen. De nombreuses études ont été réalisées et il a été clairement démontré que les effets biologiques des rayonnements étaient directement liés à la dose reçue. La limite faibles doses/fortes doses est difficile à définir. On parle de fortes doses lorsque leurs effets sont « déterministes » c'est-à-dire clairement identifiés, obligatoires et avec une dose seuil. En dessous de 0,5 Gy, on définit les faibles doses, pour lesquelles les effets sont aléatoires et retardés, dits « stochastiques » (Stewart *et al*, 2012); [6].

Dans ce travail nous ne nous intéresserons qu'aux fortes doses d'irradiation dont les effets biologiques suivent une cinétique très bien décrite (Figure 7).

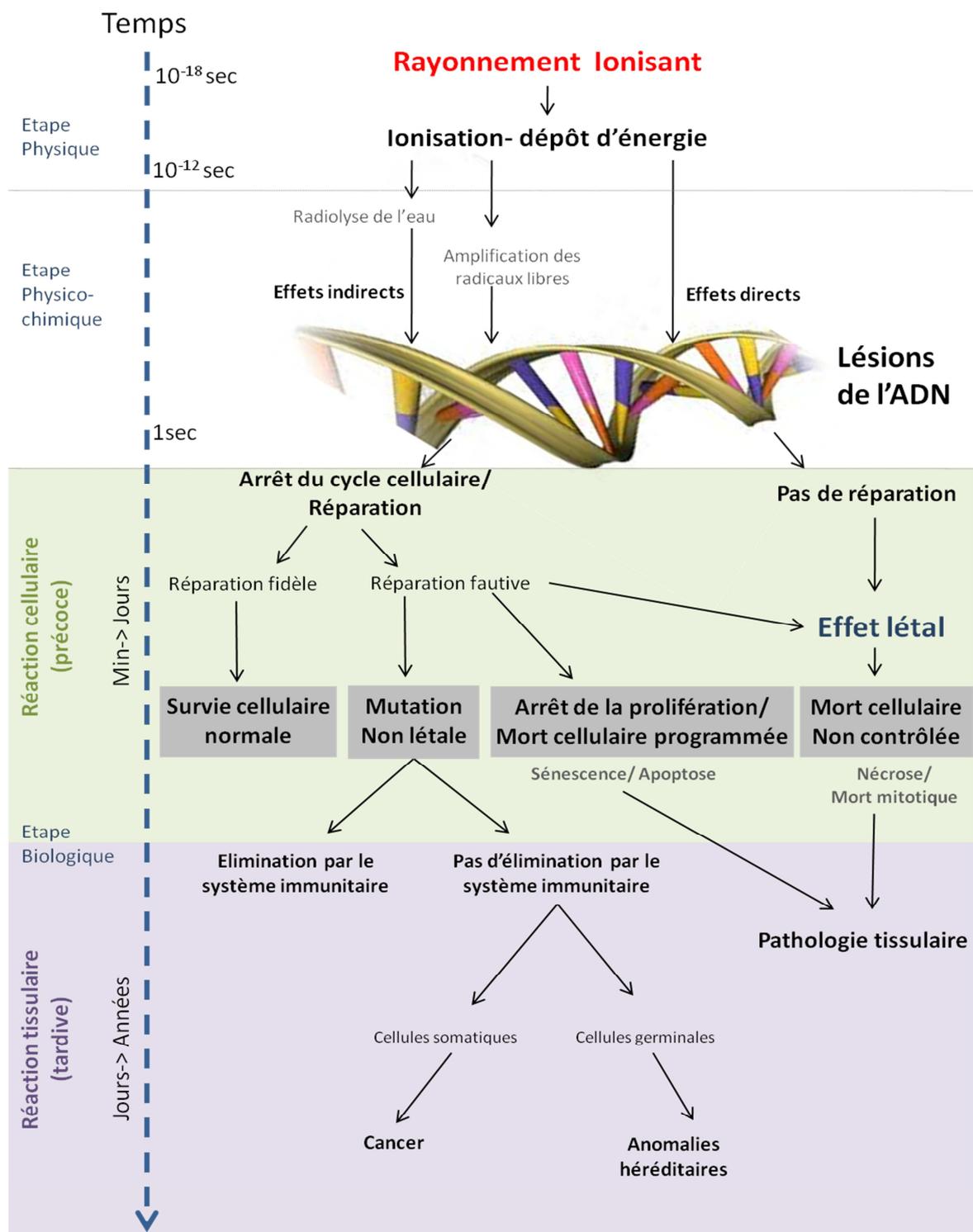


Figure 7 : Cinétique des dommages radio-induits.

Cette figure a été réalisée d'après les travaux de (Schmidt-Ullrich et al, 2000; Mitchell et al, 2006; Campisi and d'Adda di Fagnana, 2007; Tubiana; 2008, Bernardo et al, 2009 et Zaim et al, 2012).

I.C.1) Niveau physique

L'étape physique intervient dès les 10^{-18} à 10^{-12} seconde après le contact entre le rayonnement ionisant incident et la matière. Elle se caractérise par le dépôt d'énergie du RI sous forme de « collisions » avec les électrons, provoquant des ionisations et des excitations d'atomes au sein de la cellule.

Un rayonnement est dit « directement ionisant » lorsqu'il est lui-même chargé (rayonnement α , $\beta^{+/-}$, électrons) ou « indirectement ionisant ». S'il est électriquement neutre (neutrons, photons) : il mobilise alors des particules chargées dans la cellule (électrons secondaires) qui produiront des ionisations. Ces excitations et ionisations ont lieu tout le long du trajet du rayonnement dans la matière et sont à l'origine de réactions physico-chimiques et biologiques des RI (Bertin, 1994) ; (Figure 7).

I.C.2) Niveau physico-chimique

Les réactions physico-chimiques interviennent entre 10^{-12} et 1 seconde après le contact du rayonnement ionisant avec la matière (Figure 7-8).

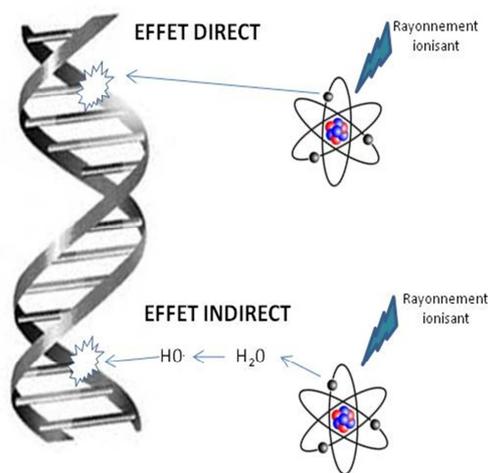


Figure 8 : Effets physico-chimique des rayonnements ionisants.

Les rayonnements ionisants entraînent par excitation et ionisation des lésions des molécules clés de la cellule telles que l'ADN, directement ou indirectement via la production de radicaux libres issus de la radiolyse de l'eau.

Figure réalisée d'après (Tubiana et al, 2005).

I.C.2.a) Effets directs des rayonnements ionisants

Les molécules excitées et ionisées précédemment décrites peuvent être des constituants des protéines, des lipides ou de l'ADN. Elles présentent un excès d'énergie et sont instables. Cet excès d'énergie sera libéré par émission de nouveaux photons ou par rupture de liaisons covalentes de la molécule. Les effets directs des rayonnements résultent de ces ruptures.

I.C.2.b) Effets indirects des rayonnements ionisants

Les effets indirects résultent de l'interaction des produits de radiolyse de l'eau avec les constituants des cellules (ADN, lipides, protéines, *etc*). Les rayonnements ionisants peuvent produire par interaction avec les molécules d'eau, des radicaux libres très réactifs tels que le radical hydroxyle ($^{\circ}\text{OH}$) ou l'anion superoxyde (O_2°). Ces radicaux issus de la radiolyse de l'eau sont aussi appelés espèces réactives de l'oxygène (ERO). Le radical $^{\circ}\text{OH}$ est considéré comme le plus toxique en biologie et peut réagir avec les protéines, les lipides ou l'ADN (Rich *et al*, 2000). Certaines protéines cellulaires telles que la NADPH oxydase (Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate oxydase : NOx) dont il existe plusieurs formes (NOx2 , NOx4) génèrent la formation d'ERO (O_2° , H_2O_2 , HOCl) en catalysant l'oxydation du substrat NADPH^+ par l'oxygène moléculaire O_2 en NADP^+ . Les transporteurs d'électrons de la chaîne respiratoire contribuent également à la formation d'ERO : environ 2% de l'oxygène moléculaire échappent à la réduction tétravalente en H_2O associé à la formation d'ATP, pour former l'anion superoxyde O_2° à l'origine des effets délétères dans les compartiments cellulaires lorsque la production augmentent. Les effets indirects sont à l'origine de 90% des effets des rayonnements ionisants dans les tissus biologiques (Schmidt-Ullrich *et al*, 2000).

I.C.2.c) Lésions moléculaires

I.C.2.c.1) Lésions de l'ADN

Les effets des rayonnements ionisants sur l'ADN sont multiples (cassures simple brin (CSB) ou double brin (CDB), altération de bases, pontage intra et inter-chaine...), les

plus délétères étant les cassures double brin de l'ADN car leurs mécanismes de réparation cellulaire sont plus complexes (Tubiana *et al*, 1986; Tubiana, 2008).

- Les CSB surviennent le plus souvent entre la base et le désoxyribose entraînant une ouverture en « fermeture éclair » de l'ADN. Une énergie déposée supérieure à 10 ev/mm^3 est nécessaire pour l'apparition de ce type de lésion. Pour une dose absorbée de 1 Gy, on observe dans une cellule environ 1000 CSB
- Les CDB de l'ADN correspondent à une rupture des deux chaînes à des niveaux distants de moins de trois bases. Elles sont plus rares mais plus graves. On observe environ 40 CDB pour 1 Gy dans une cellule. L'énergie requise pour provoquer une rupture double brin est supérieure à 100 ev/mm^3 . L'accumulation de cassures double brin peut aboutir à court terme à des aberrations chromosomiques telles que la formation de chromosomes dicentriques, acentriques ou en anneaux qui sont des anomalies instables (Figure 9A) et à long terme à des translocations chromosomiques stables (Figure 9B). La détection de ces anomalies est utilisée en dosimétrie biologique afin d'évaluer la dose absorbée par les tissus.

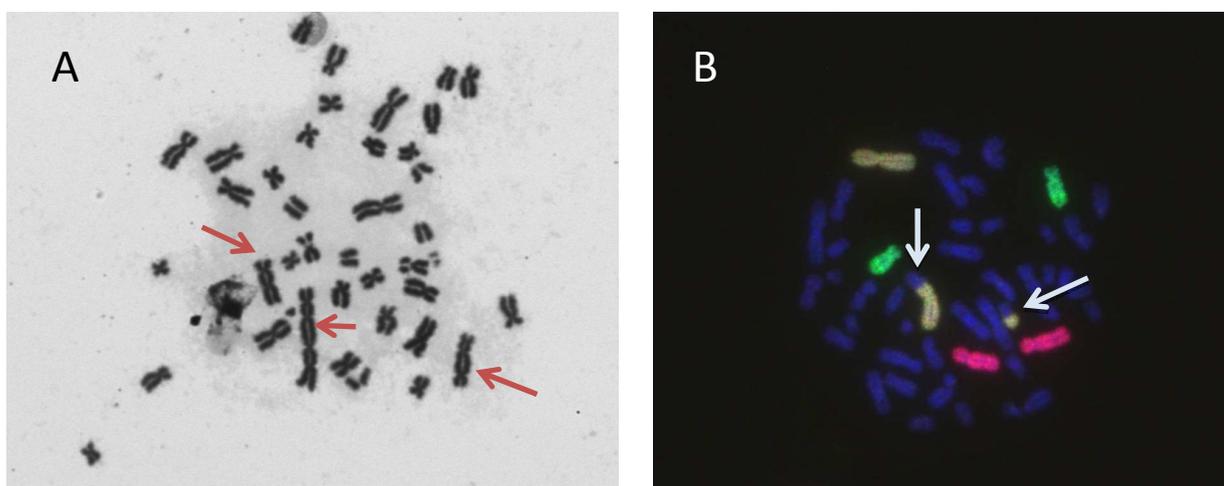


Figure 9 : Aberrations chromosomiques secondaires à une irradiation.

A. Chromosomes dicentriques (flèches rouges)

B. Translocation chromosomiques (flèches blanches)

Images fournies par le Dr M. Valente de la Cellule de Dosimétrie Biologique de l'Institut de Recherche Biomédicale des Armées.

Il existe d'autres lésions de l'ADN qui nécessitent une énergie déposée moins importante. Elles sont donc plus fréquentes mais moins délétères pour l'avenir de la cellule (Cadet *et al*, 1999) :

- Les altérations de bases qui peuvent être partiellement détruites ou modifiées chimiquement (environ 10 000/Gy dans une cellule)
- Les modifications de sucres (environ 1 500/Gy dans une cellule)
- Les pontages intra-chaîne ou inter chaîne (environ 30/Gy dans une cellule)
- Les liaisons ADN-protéines (environ 150/Gy dans une cellule)

En réponse à ces dommages, des mécanismes de réparation cellulaires spécifiques de chaque type de lésions existent. Ils seront décrits dans le paragraphe suivant.

I.C.2.c.2) Lésions des protéines et des lipides

Les lésions des protéines et des lipides suite à une irradiation ont été moins étudiées que les lésions de l'ADN. Les RI provoquent dans la cellule des peroxydations lipidiques et protéiques.

La peroxydation des lipides membranaires est une réaction en chaîne, aboutissant à la formation de radicaux réactifs puis des aldéhydes. Les conséquences sont nombreuses. Les membranes deviennent rigides, perdent leur perméabilité sélective ou leur intégrité et les produits de la peroxydation lipidique peuvent inhiber les fonctions enzymatiques (Schmidt-Ullrich *et al*, 2000 ; Bolus, 2001).

Les dommages oxydatifs des acides aminés sont principalement dus à l'attaque par les radicaux issus de la radiolyse de l'eau. Ils mènent à des modifications de la structure secondaire et tertiaire des protéines par dénaturation, fragmentation ou formation d'agrégats et ainsi à une perte de fonction de la protéine (White and Mallya, 2012).

I.C.3) Niveau biologique

I.C.3.a) Réponse cellulaire

Les mécanismes moléculaires secondaires aux lésions cellulaires radio-induites dépendent de la dose, du type de cellule, et du stade du cycle cellulaire ainsi, les cellules se divisant rapidement (index mitotique important) telles que les cellules épithéliales du tractus gastro-intestinal sont plus radiosensibles que les cellules à faible index mitotique comme les cellules nerveuses.

Cette réponse cellulaire est caractérisée par l'activation des protéines impliquées dans :

- la réparation de l'ADN
- l'arrêt temporaire du cycle cellulaire (dans le cas de cellules se divisant)
- la mort cellulaire

I.C.3.a.1) Mise en place des systèmes de réparation

Pour éviter la transmission d'altérations génétiques, plusieurs systèmes de réparation de l'ADN agissent en même temps que les points de contrôle. Les principaux mécanismes de réparation sont (Pirsel *et al*, 2004):

- Excision/re-synthèse
- Réparation de défaut d'appariement (mismatch)
- Réparation des cassures simple brin
- Réparation des cassures double brin

La plupart des cassures doubles brins sont réparées après exposition des cellules aux rayonnements ionisants. Il existe deux voies majeures :

- la recombinaison homologue (RH) qui prédomine après la réplication de l'ADN et répare avec précision les CDB en utilisant la chromatide sœur comme matrice
- la voie de recombinaison non homologue (NHEJ pour Non Homologous End Joining) qui prédomine en phase G0 et G1 du cycle cellulaire. Ce processus de réparation est imprécis et peut générer la perte de nucléotides au niveau des sites de cassure (Sancar *et al*, 2004).

I.C.3.a.1.1) Réparation correcte

Lorsque la structure et l'information de l'ADN sont restituées à l'égale de la situation précédant l'irradiation (réparation fidèle), la cellule sort de son arrêt transitoire et reprend son rythme habituel de division et réplication.

I.C.3.a.1.2) Réparation incorrecte

Malgré des systèmes de réparation très efficaces, des lésions peuvent subsister. Les bases modifiées non réparées ne bloquant pas l'ADN polymérase, peuvent être associées avec des bases non apparentées au cours de la réplication. Un point de mutation est alors produit dans le brin dupliqué qui sera fixé aux réplications cellulaires suivantes. De telles modifications sont en général non létales. Si ces modifications ne sont pas détectées par les systèmes de contrôle de la cellule, elles mènent à une instabilité génomique ou à des mutations de gènes pouvant évoluer à terme vers des cancers (Shah *et al*, 2012). Les effets de ces mutations sont retardés et aléatoires, ce sont des effets stochastiques des RI (Tubiana, 2008), ainsi la réparation fautive de cellules souches après exposition aux RI pourrait être à l'origine de cancérisation (Panganiban *et al*, 2013).

A l'inverse, si les anomalies génétiques ont été détectées, la cellule via l'activation de la protéine p53 entrera en apoptose ou arrêtera sa prolifération par le mécanisme de sénescence prématurée.

Lorsque les systèmes de réparation de l'ADN sont dépassés, les anomalies génétiques et cellulaires sont trop importantes pour permettre à la cellule d'induire une mort programmée ainsi, une mort cellulaire par nécrose ou par mort mitotique est observée (Panganiban *et al*, 2013).

I.C.3.a.2) Arrêt du cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est composé de quatre phases : G1, S, G2, M. Le passage d'une phase du cycle cellulaire à la suivante est contrôlée par l'activation et l'inactivation de protéines appartenant à une famille de serine/thréonine kinases : les kinases dépendantes des cyclines (CDKs). Sous forme de monomères les CDKs sont inactives et sont activées

après liaison aux cyclines. Différents complexes cycline/CDK sont assemblés et activés pour contrôler les différents passages d'une phase du cycle cellulaire à l'autre (Figure 10).

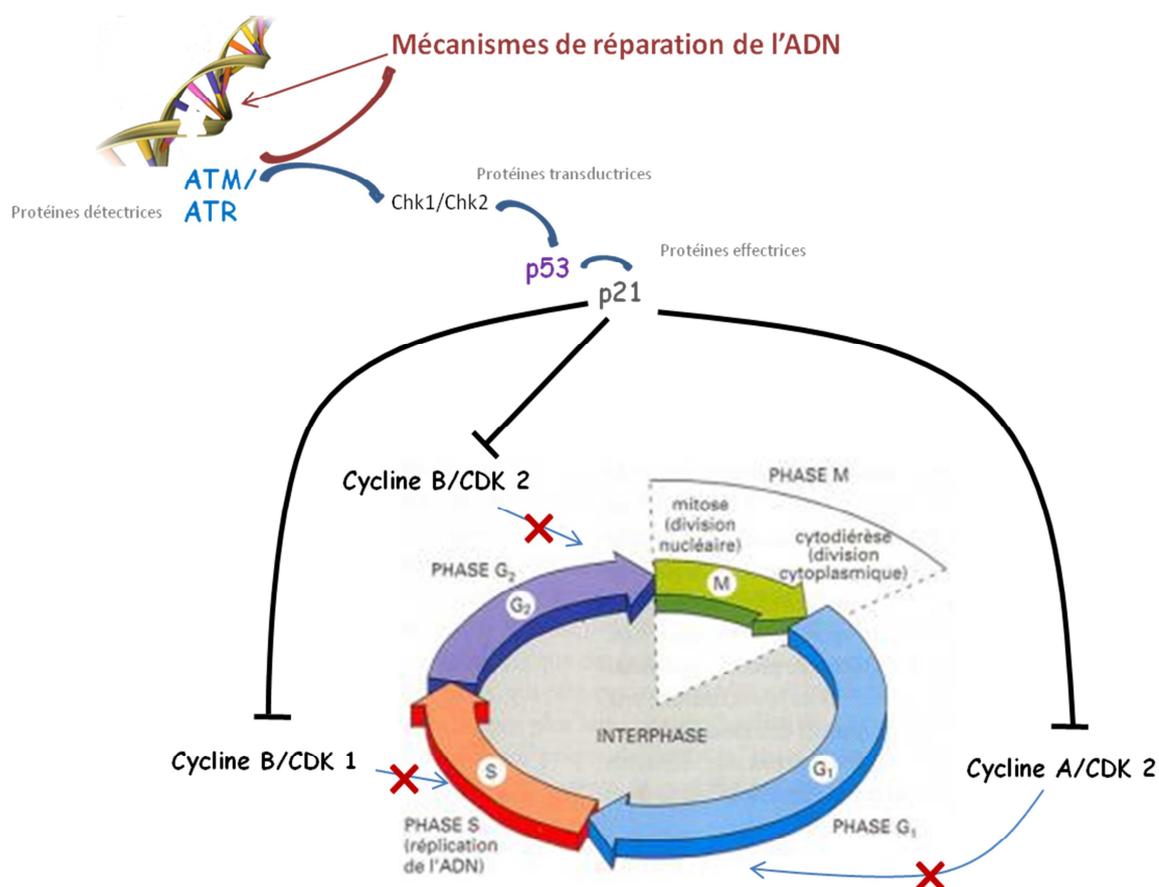


Figure 10 : Schéma simplifié des mécanismes d'arrêt du cycle cellulaire mis en place en réponse aux dommages à l'ADN.

En réponse à des lésions de l'ADN, des protéines vont détecter les lésions (ATM/ATR) et transmettre un signal aux protéines effectrices via des transducteurs (Chk1, Chk2). Les protéines effectrices, en particulier p53 qui active p21 vont bloquer le cycle cellulaire aux points de contrôle G1/S, S et G2/M en inhibant l'action des couples cycline/kinase dépendants des cyclines (CDK)..

Figure réalisée d'après (Alberts et al, 2007).

Les dommages de l'ADN induits par les RI peuvent temporairement activer des points de contrôle du cycle cellulaire conduisant soit à la réparation de l'ADN, soit à un arrêt irréversible de la prolifération. L'exposition aux radiations ionisantes entraîne des modifications de la progression normale du cycle cellulaire (Iliakis, 1997) pendant le

passage de la phase G1 à la phase S (point de contrôle en G1/S), de la phase S à la phase G2 (point de contrôle en S) et surtout pendant le passage de la phase G2 à la mitose (point de contrôle en G2/M). Les points de contrôle du cycle cellulaire nécessitent des détecteurs («sensors», principalement ATM et ATR), des transducteurs du signal (tels que Chk1 et 2) et des effecteurs (dont p53/p21 ; Cdc25) qui vont bloquer l'action des complexes cycline/CDK et activer les mécanismes de réparation (Alberts *et al*, 2007) ; (Figure 10).

I.C.3.a.3) Mort cellulaire

Différents types de morts cellulaires ont été décrits tels que l'autophagie, l'apoptose, l'intercinèse, la nécrose (Kroemer *et al*, 2009). Suite à une irradiation celui-ci est dépendant du type cellulaire (proliférant ou non, adhérent ou en suspension) et les morts cellulaires observées sont la nécrose, l'apoptose, la sénescence et la mort mitotique (Tubiana, 2008).

I.C.3.a.3.1) Mort clonogénique ou mort radiologique « globale »

La notion de mort biologique comme perte des capacités de réplication d'une cellule est une définition spécifique à la radiobiologie. Cette définition ne se base pas sur des modifications morphologiques de la cellule mais sur sa capacité à proliférer. Ainsi, l'étude *in vitro* de la perte de capacité d'une cellule à former des clones ne différencie pas les processus de morts cellulaires mais reflète la mort cellulaire «radiobiologique». En 1956, Puck TT a décrit pour la première fois la technique des colonies de Puck ou « Plating efficiency » qui permet d'évaluer la mort clonogénique des cellules irradiées par détermination du pourcentage de cellulesensemencées capables de former des colonies (Puck and Marcus, 1956 ; Puck *et al*, 1957) par comparaison avec l'efficacité de clonage de cellules non irradiées.

I.C.3.a.3.2) Nécrose

La nécrose est une mort cellulaire non programmée qui survient suite à une agression sévère des cellules.

Elle se caractérise essentiellement par la destruction massive et rapide de la cellule par lyse osmotique : une entrée massive d'eau suite à l'arrêt de l'activité des pompes membranaires provoque un gonflement de la cellule suivie d'une rupture des membranes, de la destruction des organites et de la libération du contenu cellulaire (en particulier les enzymes lytiques) dans l'espace extracellulaire. Cette lyse déclenche une réaction inflammatoire particulièrement néfaste pour les cellules avoisinantes aboutissant à la formation de tissu cicatriciel inerte (Dorn, 2013).

En cas d'exposition aux rayonnements ionisants, ce type de mort est observé pour de fortes doses et se déclenche avant la mise en place des processus de réparation de l'ADN ou lorsque ceux-ci sont dépassés (Panganiban *et al*, 2013).

I.C.3.a.3.3) Apoptose

L'apoptose contrairement à la nécrose est une forme de mort cellulaire programmée, dite « propre » car entraînant peu de processus inflammatoires. Indispensable au cours de l'embryogenèse et pour l'homéostasie des tissus elle fut décrite pour la première fois en 1972 par Kerr *et al*. (Kerr *et al*, 1972).

Lors du processus apoptotique la cellule se condense. Son cytosquelette s'affaisse, l'enveloppe nucléaire se désassemble et l'ADN nucléaire se fragmente. La surface cellulaire se modifie, notamment avec une bascule des phosphatidylsérines de la face interne à la face externe de la membrane plasmique et présente des particularités qui provoquent la phagocytose rapide de la cellule apoptotique soit par une cellule voisine soit par un macrophage (Dorn, 2013).

La machinerie intracellulaire principalement responsable de l'apoptose dépend de protéases particulières : les caspases. Celles-ci sont synthétisées sous forme de pro-enzymes, les pro-caspases dont l'activation se fait par clivage de la protéine déclenchant une cascade protéolytique amplificatrice. Les derniers maillons de cette chaîne peuvent couper les lamines nucléaires et activer une enzyme de dégradation de l'ADN. Cette cascade amplificatrice est irréversible et peut être déclenchée selon deux modes : déclenchement extra ou intracellulaire.

Le déclenchement extracellulaire (voie extrinsèque) intervient après l'activation des «récepteurs de mort» tels que Fas (CD95) à la surface de la cellule. L'agrégation des récepteurs Fas permet le recrutement de protéines adaptatrices qui activent la caspase 8 qui va elle-même activer des caspases en aval, déclenchant la cascade protéolytique. Ce déclenchement extracellulaire est particulièrement observé dans la réaction immunitaire et l'activation de la mort cellulaire des cellules infectées par les macrophages qui expriment Fas-ligand à leur surface et pourrait être impliquée dans le déclenchement de l'apoptose des cellules souches hématopoïétiques exposées aux RI (Drouet *et al*, 1999).

En cas de stress ou de lésion interne, on observe une **activation mitochondriale (déclenchement intracellulaire ou voie intrinsèque)**. Les lésions cellulaires vont entraîner la libération dans le cytosol par la mitochondrie d'une protéine transporteuse d'électrons, le cytochrome C. Celle-ci se fixe sur la protéine Apaf1 et l'active. Apaf1 activée va cliver la caspase 9 et ainsi initier la cascade protéolytique. Ce mécanisme est observé en cas de lésions de l'ADN via une activation de p53 qui active la transcription de gènes codant pour les protéines libératrices du cytochrome C (famille des protéines Bcl-2) (Hengartner, 2000) (Figure 11).

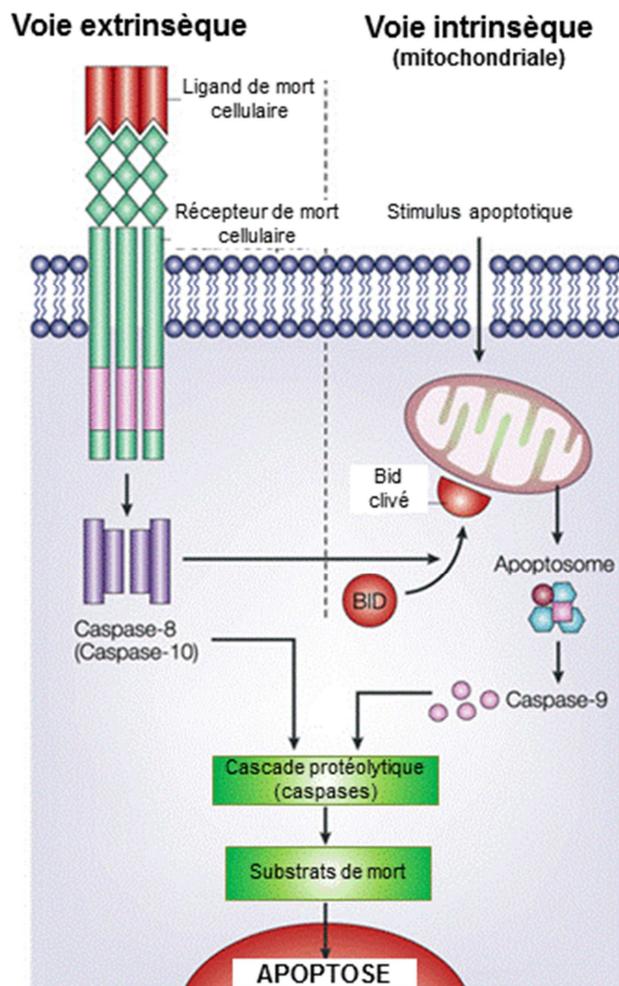


Figure 11 : Représentation simplifiée des voies intrinsèques et extrinsèques de l'apoptose.

Figure réalisée d'après (Hengartner, 2000 ; Igney and Krammer, 2002).

Lors d'exposition aux RI, ce type de mort cellulaire est observé juste après irradiation (apoptose précoce), après arrêt du cycle cellulaire lorsque les mécanismes de réparation de l'ADN ne suffisent pas à récupérer l'intégrité du matériel génétique ou après plusieurs divisions cellulaires lorsque des réparations incorrectes sont détectées (apoptose tardive). La mort par apoptose post-irradiation est rapportée principalement pour les cellules en suspension par opposition à cellules adhérentes telles que les fibroblastes (Panganiban *et al*, 2013).

I.C.3.a.3.4) Mort mitotique

Les mécanismes de la mort mitotique ou catastrophe mitotique ne sont encore que partiellement connus. Elle résulte de déficiences au niveau des différentes étapes de la mitose telle qu'un défaut d'arrêt en phase G2 qui conduit à l'entrée prématurée en mitose ou à un défaut de formation du fuseau mitotique (Castedo *et al*, 2004). Sur le plan morphologique, ces défaillances provoquent la formation de cellules aneuploïdes ou de cellules géantes multinucléées contenant des micronoyaux qui présentent une membrane nucléaire intacte et contiennent une quantité anormale d'ADN sous forme de chromosomes non condensés. Cette mort implique l'activation de la machinerie apoptotique avec une activation des caspases et une fragmentation de l'ADN (Vakifahmetoglu *et al*, 2008). La catastrophe mitotique est une mort « propre » car le contenu cellulaire est retenu dans une membrane plasmique mais non contrôlée. Tout comme la nécrose, la mort mitotique est observée pour de fortes doses de RI avant la mise en place des systèmes de réparations cellulaires ou lorsqu'ils sont dépassés (Vakifahmetoglu *et al*, 2008).

I.C.3.a.3.5) Sénescence prématurée

La sénescence est une voie de mort cellulaire qui contrairement à l'apoptose et à la nécrose ne provoque pas de grandes modifications morphologiques et structurales de la cellule.

Elle a été décrite pour la première fois en 1961 par Hayflick *et al* sur des cellules en culture qui perdaient leur capacité de prolifération mais conservaient une faible activité métabolique (Hayflick and Moorhead, 1961). Deux mécanismes de sénescence ont été

décrits par la suite : la sénescence dite «répllicative» ou «cellulaire» et la sénescence « prématurée » ou « accélérée » induite par le stress (Dierick *et al*, 2002).

La sénescence répllicative ou cellulaire est secondaire au raccourcissement des télomères (les cellules adhérentes non immortalisées n'exprimant pas la télomérase) suite aux divisions cellulaires. Ces télomères constitués d'une répétition de nucléotides TTAGGG ont pour rôle de préserver l'intégrité des chromosomes dont l'extrémité est raccourcie à chaque réplication. Lorsqu'ils atteignent une longueur inférieure à 7 kb, la cellule entre en sénescence : la division cellulaire est interrompue de manière irréversible mais les cellules peuvent maintenir une activité métabolique pendant plusieurs mois (Golstein and Kroemer, 2007).

La sénescence prématurée ou accélérée a été décrite plus tardivement et correspond à un arrêt de la prolifération indépendant du raccourcissement des télomères, en réponse à un stress : stress oxydatif, lésions de l'ADN, exposition à des rayonnements ou des agents chimiques. Tout comme la sénescence cellulaire, les cellules en sénescence prématurée gardent une fonctionnalité métabolique pendant quelques mois (Chen J. *et al*, 2008).

Quel que soit le mécanisme initiateur, les cellules en sénescence sont caractérisées par des changements physiologiques structuraux, biochimiques et moléculaires identiques. Sur le plan morphologique, les cellules en sénescence apparaissent plus larges avec un volume cytoplasmique accru, vacuolisé et un contour irrégulier au microscope optique. Dans le noyau, les nucléoles sont proéminents, les mitochondries sont moins denses en microscopie électronique et la masse lysosomale est augmentée (Figure 12).

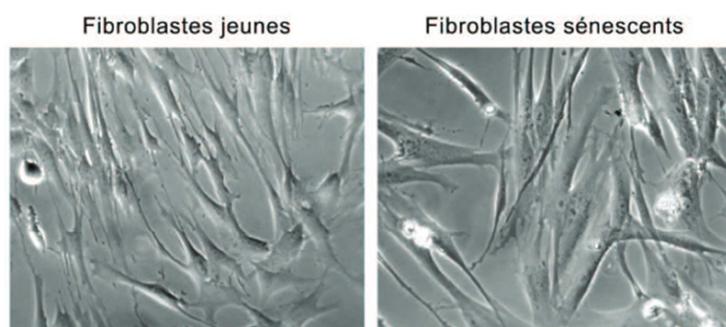


Figure 12 : Morphologie des fibroblastes en sénescence.

Observation au microscope optique de fibroblastes jeunes et de fibroblastes sénescents.

Image tirée de (Binet, 2011).

Cette dernière caractéristique permet la détection des cellules en sénescence. En effet l'augmentation du volume des lysosomes associée à une augmentation des exoglycosidases qu'ils contiennent peuvent être mis en valeur par le marquage de l'une d'entre elle : la β -galactosidase à pH sub-optimal (pH6) (Kurz *et al*, 2000 ; Lee BY. *et al*, 2006).

Parmi les caractéristiques biochimiques des cellules sénescents, on peut retenir, la surexpression des inhibiteurs du cycle cellulaire tels que p21, p16^{ink4a} et la résistance à la mort par apoptose (Wang, 1995). On observe également au niveau de la chromatine la formation de foci d'hétérochromatine spécifiques (SAHF : Senescence Associated Heterochromatin Foci) et une méthylation locale de l'histone H3 (Zhang *et al*, 2005).

Après exposition aux RI, l'entrée en sénescence intervient dans les 48 h post-irradiation. A l'inverse de la quiescence, c'est un mécanisme irréversible qui permet cependant aux cellules de maintenir une intégrité et une fonction métabolique temporaire (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007).

L'initiation sur le plan biochimique de la sénescence prématurée peut passer par deux voies. La voie de la protéine p53 (dépendante ou non de p14^{arf}) qui active la protéine p16 et/ou la protéine p21 qui va elle-même bloquer le cycle cellulaire en inhibant le complexe cycline/CDK. La voie de la protéine p16^{ink4a} est également un inhibiteur direct des CDK. Une des cibles des CDK est la protéine pRb qu'elles inhibent. La levée d'inhibition par p16^{ink4a} augmente son activité : elle interrompt la prolifération et le cycle cellulaire en inhibant le facteur E2F dont la fonction principale est de stimuler l'expression des gènes indispensables à la prolifération cellulaire (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007) (Figure 13).

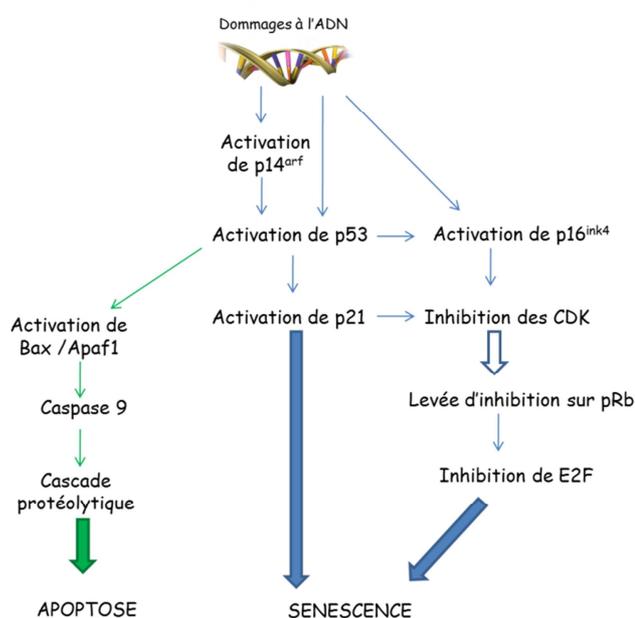


Figure 13 : Schéma simplifié des voies d'activation de l'apoptose dépendante de p53 et de la sénescence après dommages à l'ADN.

Figure réalisée d'après les travaux de (Hengartner, 2000 ; Kong *et al*, 2011).

I.C.3.a.4) Effet « Bystander »

Pendant des dizaines d'années, il était admis que les effets biologiques des rayonnements ionisants résultaient de leur action directe sur la cellule irradiée. Des études ont cependant démontré que des cellules non-irradiées voisines de cellules irradiées pouvaient présenter une réponse cellulaire à l'irradiation, c'est l'effet « bystander » (Mothersill and Seymour, 2001 ; Waldren, 2004 ; Blyth and Sykes, 2011 ; Hei *et al*, 2011). Ce dernier dépend du débit de dose, de la dose absorbée, et de la radiosensibilité intrinsèques des cellules dites « bystander » (Baskar, 2010). Différents effets négatifs et positifs ont été rapportés sur les cellules bystander : une entrée en sénescence prématurée, en apoptose et une nécrose contribuant à une diminution du potentiel clonogénique, mais aussi une augmentation de la prolifération pour certains types cellulaires *in vivo* tels que les hépatocytes (Mothersill and Seymour, 1997 ; Iyer *et al*, 2000 ; Sedelnikova *et al*, 2007).

Au niveau moléculaire, la formation de micronoyaux et de cassures double brin ont également été démontrées (Sokolov *et al*, 2005 ; Sedelnikova *et al*, 2007). Les travaux dans ce domaine mettent en évidence le rôle important des contacts cellule-cellule via les jonctions gap entre cellules irradiées et non irradiées, ainsi que la sécrétion de facteurs solubles par les cellules irradiées dont les ERO, le TGF β 1 (Tumor growth Factor), le TNF α (Tumor Necrosing Factor) et la cyclo-oxygénase-2 (Yang *et al*, 2005 ; Zhou *et al*, 2005 ; Blyth and Sykes, 2011). Paradoxalement en culture, le TGF β 1 a aussi été identifié avec le NO (monoxyde d'azote) comme un facteur favorisant la prolifération de cellules bystander (Baskar *et al*, 2007 ; Han *et al*, 2010).

In vivo, seuls des effets délétères ont été mis en évidence à ce jour. Un modèle expérimental de souris irradiées unilatéralement par rayonnement X a révélé des dommages de l'ADN dans le tissu cutané à plus d'un centimètre en dehors du champ d'irradiation (Koturbash *et al*, 2006). Cependant *in vivo*, la distinction entre effet bystander et complications secondaires à l'inflammation induite par l'irradiation reste difficile.

I.C.3.a.5) Effet abscopal

L'effet abscopal correspond à l'effet systémique des rayonnements ionisants dans l'organisme entier à distance de la zone irradiée (Ohba *et al*, 1998). Il a également été mis en cause dans d'autres lésions sévères à type de troubles gastro-intestinaux lors de traumatismes infectieux ou mécaniques (Deitch, 2001) et de brûlures sévères (Messick *et al*, 1994). Cet effet principalement étudié dans le cadre de la radiothérapie pour le traitement des cancers semble être médié par le système immunitaire et la production de cytokines (Kaminski *et al*, 2005).

I.C.3.b) Niveau tissulaire

A l'issue de la réponse cellulaire les dommages secondaires aux radiations vont provoquer un effet létal immédiat (nécrose, apoptose précoce) ou une mort différée qui survient au moment des premières divisions. L'effet biologique des RI au niveau d'un tissu donné résultera de la radiosensibilité et du mode de réponse des différents compartiments cellulaires qui le composent. Les cellules souches hématopoïétiques qui sont peu différenciées et capables de se diviser un grand nombre de fois sont très radiosensibles. A l'inverse, les cellules très différenciées qui se divisent rarement comme les neurones, sont moins radiosensibles, mais les lésions cellulaires peuvent rester latentes et ne se révéler que tardivement. Un tissu sera donc d'autant plus radiosensible que les cellules le composant sont peu différenciées, avec un potentiel de différenciation et de division importants (moelle osseuse par exemple) (Tubiana *et al*, 2005). Par ailleurs il a été observé que des cellules même viables après irradiation se multiplient et se différencient moins rapidement que des cellules non irradiées. Dans un tissu, cette diminution du nombre de cellules viables associée à une réponse diminuée aux stimuli de prolifération et de différenciation entraîne une déplétion tissulaire (von Wangenheim *et al*, 1995 ; Tubiana *et al*, 2005).

Dans un tissu comme la moelle osseuse, ou le tissu gastro-intestinal, très radiosensibles du fait du renouvellement et du nombre de divisions cellulaires important, la déplétion tissulaire est précoce et à l'origine respectivement d'aplasie médullaire (dès 3 à 4 Gy) ou

de diarrhées hémorragiques (dès 6 Gy). Cependant si une fraction de cellules souches est épargnée, le renouvellement tissulaire permet une récupération fonctionnelle. A l'inverse, le système nerveux, très radio-résistant, peut supporter des doses localisées jusqu'à 65-70 Gy en doses fractionnées mais il n'est pas capable de se renouveler ce qui provoque à long terme l'apparition de paraplégies et de lésions cérébrales irréversibles (Stewart *et al*, 2012).

Lors d'une irradiation corporelle totale, l'ensemble des manifestations pathologiques se développant est regroupé sous le nom de syndrome aigu d'irradiation (SAI). Celui-ci se caractérise par le développement de syndromes spécifiques doses-dépendants: le syndrome hématopoïétique, gastro-intestinal et neurovasculaire. Chacun de ces trois syndromes est responsable du décès dans une gamme de doses spécifiques : 3 à 10 Gy pour le syndrome hématopoïétique, 10 à 40 Gy pour le syndrome gastro-intestinal et au-delà de 50 Gy pour le syndrome neurovasculaire (Delanian and Lefaix, 2005).

Le tissu cutané également très radiosensible a une réponse complexe aux rayonnements du fait des radiosensibilités particulières des différents types cellulaires qui le composent. Ce tissu fait l'objet d'un paragraphe complet.

II) LE SYNDROME CUTANE RADIO-INDUIT

II.A) Le tissu cutané

II.A.1) Description

La peau, ou tégument externe, constitue l'enveloppe de revêtement de l'organisme qu'elle protège du milieu extérieur. Sa structure est très complexe, elle se subdivise en quatre régions superposées : l'épiderme, la jonction dermo-épidermique, le derme et l'hypoderme (Figure 14).

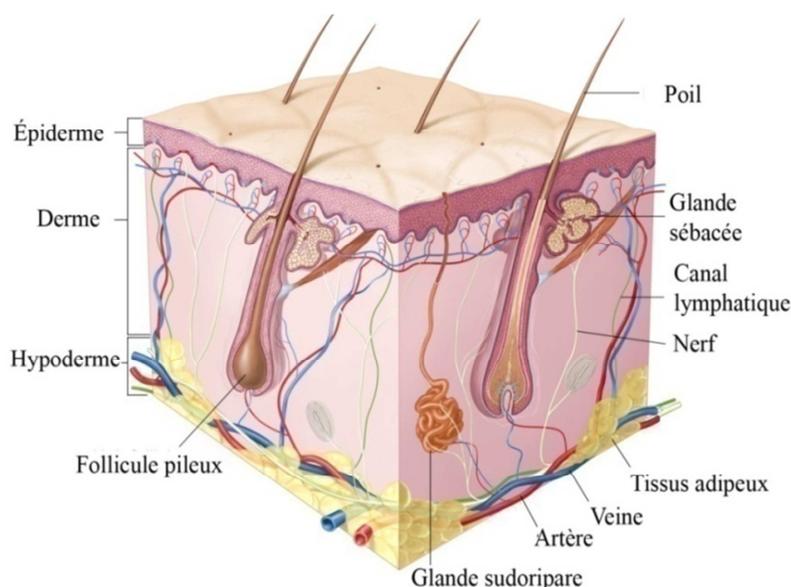


Figure 14 : Représentation schématique de la peau humaine et de ses principaux composants.

Cette figure a été réalisée d'après les travaux de (Poirier, 1999).

L'épiderme issu du feuillet ectodermique embryonnaire est un épithélium de revêtement, stratifié, pavimenteux et kératinisé. Il est normalement constitué de quatre types cellulaires : les kératinocytes répartis en quatre couches (basale, spumeuse, granuleuse et cornée) qui représentent 80% de l'épiderme, les mélanocytes dont la fonction est la synthèse de mélanine, les cellules de Langerhans qui sont des cellules

dendritiques présentatrices d'antigènes et les cellules de Merkel qui ont des fonctions trophiques et de mécanorécepteurs sur les terminaisons nerveuses périphériques. Il ne contient aucun vaisseau sanguin ni lymphatique (Heath *et al*, 2008). Au niveau de la couche basale, la présence de cellules souches épidermiques permet la régénération quotidienne des différentes couches de l'épiderme. Ces cellules souches sont unipotentes et ne peuvent se différencier qu'en kératinocytes (Fuchs and Nowak, 2008). Elles contrôlent l'homéostasie de l'épiderme, c'est-à-dire la balance prolifération/apoptose (Plikus *et al*, 2012).

La jonction dermo-épidermique est constituée d'une structure typique de lames basales (lamina lucida et lamina densa) et de complexes d'ancrage de l'épiderme sur le derme.

Le derme et l'hypoderme sont des tissus conjonctifs issus du feuillet embryonnaire mésodermique. **Le derme** est composé de tissu conjonctif riche en fibre de collagène de type I, III et IV, de fibroblastes qui synthétisent les protéines de la matrice extracellulaire (MEC), de cellules dendritiques dermiques, de terminaisons nerveuses, d'un réseau vasculaire et des follicules pilo-sébacés (Heath *et al*, 2008). **Le follicule pilo-sébacé** est une structure importante qui provient d'une invagination tubulaire de l'épiderme qui pénètre dans le derme. Il comporte : le poil et ses gaines, la glande sébacée et le muscle érecteur du poil. A l'extrémité profonde du follicule un renflement forme le « bulge » zone particulièrement importante où sont situées les cellules souches du follicule pileux. Celles-ci sont capables de reconstituer l'épiderme entre les follicules pileux lors de la cicatrisation d'une plaie (Ito *et al*, 2007 ; Nowak *et al*, 2008) mais ne sont pas impliquées dans l'homéostasie de l'épiderme (Ito *et al*, 2005).

L'hypoderme est constitué de lobules graisseux de tissu adipeux blanc et d'un important réseau vasculaire (Braverman, 2000).

La vascularisation du tissu cutané est complexe. L'épiderme n'est pas vascularisé mais il est nourri par imbibition via les capillaires du derme. Celui-ci, de même que l'hypoderme, est très vascularisé par un réseau systématisé et anastomotique d'artérioles de moyens et petits calibres parallèles à la surface de la peau.

II.A.2) Réparation cutanée

La réparation du tissu cutané est bien documentée et peut être divisée en trois phases successives : l'inflammation, la prolifération cellulaire/ réépithélialisation et le remodelage.

II.A.2.a) Phase inflammatoire

Suite à une effraction cutanée, les mécanismes d'hémostase vont se mettre en place pour restaurer l'intégrité des vaisseaux sanguins.

Après l'agrégation et la dégranulation plaquettaire au niveau des vaisseaux sanguins lésés, la coagulation du sang conduit en quelques minutes à la formation d'un caillot fibrino-plaquettaire. Le « clou » plaquettaire ainsi formé initie la réaction inflammatoire par libération de facteurs de coagulation, de facteurs vasoactifs, chimioattractifs et de cytokines pro-inflammatoires.

Ce cocktail cytokinique précoce permet le recrutement sur le site lésé de cellules inflammatoires circulantes : neutrophiles et monocytes qui assurent la neutralisation des antigènes étrangers et la stérilisation de la plaie. Les cytokines pro-inflammatoires, principalement IL-1(Interleukine 1) et TNF α (Tumor Necrosis Factor) sécrétées par les macrophages et les neutrophiles induisent elles-mêmes la production autocrine d'IL-6 et d'IL-8 par les fibroblastes et régulent les phénomènes d'adhésion et de transmigration des leucocytes. Cette phase inflammatoire se déroule dans les heures qui suivent l'effraction cutanée. Elle est indispensable pour le recrutement des cellules impliquées dans la réparation tissulaire provenant du derme environnant et de la circulation (Barrientos *et al*, 2008 ; Gurtner *et al*, 2008).

Une inflammation prolongée ou survenant de manière plus tardive dans la chronologie de réparation tissulaire aura cependant des effets délétères. Lors de la réponse inflammatoire, un grand nombre de protéases sont activées : les sérine-protéases et les métalloprotéases (MMP) (stimulées par les cytokines inflammatoires) qui participent initialement à la protéolyse matricielle pour favoriser la migration des cellules dans la MEC. Ces protéases sont sous le contrôle d'anti-protéases et d'anti-métalloprotéase (TIMPs) et sont activées par des cytokines pro-inflammatoires (IL1 β , IL1 α , TNF α , TGF β (Tumor Growth Factor)). En cas d'emballement des processus pro-inflammatoires, le dérèglement de la balance

protéase/anti protéase provoque une destruction de la MEC empêchant la formation du tissu de granulation et la prolifération des cellules (Rayment and Upton, 2009 ; Gajendrareddy *et al*, 2013).

II.A.2.b) Phase de prolifération

A l'issue de la phase inflammatoire, le caillot se rétracte et le tissu conjonctif sous-jacent prend le nom de tissu de granulation en raison des granulations roses correspondant aux nombreux capillaires qui l'envahissent. Cette néo-vascularisation est due à l'angiogenèse déclenchée et entretenue principalement par le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) et le bFGF (Fibroblast Growth Factor) sécrétés par les cellules endothéliales lésées et les macrophages. A ce stade, de nombreux fibroblastes stimulés par la sécrétion de TGF β par les macrophages se transforment en myofibroblastes, ressemblant étroitement à des cellules musculaires lisses (car ils expriment l'alpha-actine). Les fibroblastes et les myofibroblastes interagissent pour produire les protéines de la matrice extracellulaire (Werner *et al*, 2007 ; Liu *et al*, 2012). La réépithélialisation de la lésion fait intervenir les différentes cellules souches de la peau : les cellules souches épidermiques et les cellules souches des follicules pilo-sébacés. La part de chacune n'est pas encore clairement déterminée. Des travaux ont démontré que les cellules souches du follicule pileux sont nécessaires pour initier une réépithélialisation rapide mais leur rôle dans la fermeture de la plaie reste contesté (Plikus *et al*, 2012). Leur différenciation en kératinocytes est dépendante de nombreuses protéines tel que la β -caténine, la BMP-4 (Bone Morphogenic Protein), Wnt 4-6, l'EGF (Epithelial Growth Factor) et la colonisation du tissu de granulation nécessite une migration de ces cellules depuis le bulge jusqu'à la jonction dermo-épidermique (Huelsken *et al*, 2001 ; Ito *et al*, 2007). De même que pour les kératinocytes issus de la différenciation des cellules épidermiques, cette migration est assurée par la formation et la stabilisation de points d'adhérence cellule-MEC et par une dégradation de la MEC via la sécrétion, par les cellules souches et les cellules colonisant le tissu de granulation (fibroblastes, myofibroblastes, macrophages), de sérine-protéases et de métalloprotéases (Niu *et al*, 2007 ; Martins *et al*, 2013).

La reconstitution d'un épithélium stratifié nécessite une prolifération cellulaire par mitose des kératinocytes stimulés par un mécanisme autocrine impliquant IL1, EGF, et bFGF, complétés par l'action paracrine des fibroblastes et des leucocytes qui libèrent différents médiateurs tels que KGF (Keratinocyte Growth Factor), IGF-1 (Insulin Growth Factor 1), IL1, TNF α , et bFGF. En réponse aux signaux locaux du microenvironnement, les kératinocytes prolifèrent jusqu'à la réépithélialisation de la lésion (Raja *et al*, 2007 ; Gurtner *et al*, 2008).

II.A.2.c) Remodelage

La phase de remodelage est la dernière étape mais aussi la plus longue du processus de réparation des plaies. Elle concerne principalement la portion dermique de la cicatrice qui subit de multiples réarrangements afin d'accroître sa résistance mécanique. Elle consiste en un remaniement de la MEC et à une réduction de la densité cellulaire par apoptose des fibroblastes, myofibroblastes, macrophages et cellules endothéliales avec régression vasculaire (Werner *et al*, 2007).

II.A.2.d) Importance de la vascularisation

Il est important de noter qu'à chaque phase de la réparation cutanée, tous les mécanismes précédemment décrits sont dépendants de la vascularisation des tissus. Les dommages vasculaires influencent l'apport en nutriments et en oxygène aux tissus et la viabilité des cellules épithéliales. L'intégrité des vaisseaux du derme ou la néoangiogenèse (en fonction de la profondeur de la lésion cutanée) sont donc des processus clés de la réparation tissulaire (Tamarat *et al*, 2012).

La néo-vascularisation débute avec le bourgeonnement de capillaires sanguins à partir des veinules adjacentes à la plaie : en réponse à des stimuli angiogéniques, les cellules endothéliales produisent des enzymes (MMP2, activateurs du plasminogène, collagénase et stromelysine) afin de dégrader la membrane basale et la MEC. Les cellules endothéliales peuvent alors migrer en direction du gradient de concentration des facteurs angiogéniques et proliférer pour fournir la masse cellulaire requise à la néo-vascularisation. Elles se différencient afin de former une lumière à l'intérieur du vaisseau. La membrane basale se reconstitue progressivement et les péricytes entourent les

capillaires. Le développement de ce nouveau réseau capillaire s'avère essentiel à l'apport de nutriments aux nombreuses cellules de la plaie en métabolisme actif (Tonnesen *et al*, 2000).

Plusieurs facteurs sont responsables de l'angiogenèse. Ils ont pour fonction : la dégradation de la membrane basale et de la MEC, la migration, la prolifération et différenciation des cellules endothéliales. L'EGF, le bFGF, le VEGF, l'ANG1 (Angiopoïétine 1), le TNF α et l'IL8, provenant des plaquettes, macrophages, fibroblastes et kératinocytes, stimulent l'angiogenèse (Gerhardt *et al*, 2003 ; Li *et al*, 2003). Les fragments de matrice dégradée (fibronectine), l'hypoxie tissulaire, l'acide lactique et les amines biogéniques contribuent aussi au développement de nouveaux capillaires. Les cellules endothéliales activées sécrètent plusieurs facteurs bFGF, PDGF (Platelet derived Growth factor) et IGF-1, dont l'action autocrine ou paracrine favorise la néo-vascularisation (Iivanainen *et al*, 2003). L'action angiogénique de ces divers facteurs s'explique par leur effet chimiotactique et mitogène, la production d'enzymes pour dégrader la membrane basale et la matrice extracellulaire et le dépôt de constituants matriciels par les cellules endothéliales ou par d'autres cellules comme les fibroblastes. La stabilisation et la maturation des vaisseaux sont respectivement assurées par la sécrétion de ANG1 (via son récepteur Tie2) et TGF β par les cellules périvasculaires et les péricytes (Tonnesen *et al*, 2000) ; (Figure 15).

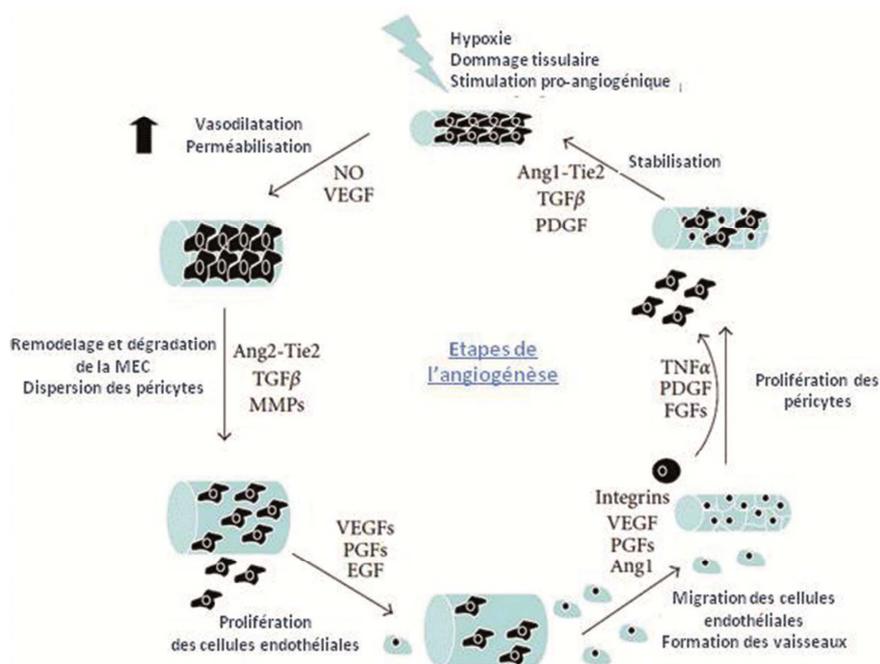


Figure 15 : Les différentes étapes et les facteurs impliqués dans l'angiogenèse.

Figure réalisée d'après les travaux de (Sanz-Cameno *et al*, 2010 ; Yagi and Kitagawa, 2013).

II.B) Evolution clinique du syndrome cutané radio-induit

Le syndrome cutané radio-induit (SCR) est la conséquence d'une exposition externe localisée de la peau à une forte dose de rayonnements ionisants. Il est souvent assimilé au terme de brûlure radiologique en raison des premiers symptômes observés (érythème, chaleur) et des facteurs de gravité identiques tels que la surface cutanée atteinte, la localisation, le terrain (âge, pathologies sous-jacentes). Bien que les symptômes soient proches de ceux de la brûlure thermique, l'évolution clinique du SCR est différente et très spécifique.

La réponse de la peau et des tissus sous-jacents à une exposition externe aux rayonnements ionisants est un processus complexe (Peter, 2005). Elle est le reflet de la radiosensibilité particulière de chaque type de cellules impliquées dans le processus lésionnel et de leur vitesse de renouvellement (index mitotique). Cette réponse varie en fonction de l'énergie du rayonnement, de la répartition de la dose en profondeur, du débit de dose et de la surface exposée.

Les symptômes de SCR sont inconstants et varient en fonction de la dose reçue. On observe un érythème précoce causé par la dilatation des capillaires du derme et un œdème superficiel dans les 24 premières heures après l'irradiation dès 1 Gy, suivi d'une période de latence de quelques semaines, d'autant plus courte que la dose est importante. Cette phase de latence peut entraîner sur le plan médical une erreur ou un retard au diagnostic, ce dernier se répercutant sur la réactivité de la prise en charge thérapeutique. Une dépilation apparaît dès la 2^{ème} semaine et devient totale après un mois ; la restauration des follicules pileux est possible en 2 à 3 mois pour des doses uniques inférieures à 7 Gy. A l'issue de cette dépilation, un érythème secondaire associé à une thrombose des artérioles se développe pour des doses supérieures à 5 Gy puis une desquamation sèche, caractérisée par un épaississement de la peau est observée. A ce stade, pour les doses inférieures à 15 Gy, l'épithélium irradié se détache et laisse apparaître un épiderme sous-jacent érythémateux mais intact. Cette lésion évoluera tardivement vers une cicatrisation avec des troubles pigmentaires.

Pour les doses supérieures à 15 Gy une radioépithéliite se développe avec formation de phlyctènes qui deviennent coalescentes et se rompent. La lésion évolue alors vers une guérison partielle avec formation d'un tissu fibrotique provoquant une impotence fonctionnelle importante. Pour des expositions supérieures à 20 Gy, la lésion évolue vers

une radionécrose irréversible pouvant s'étendre en profondeur au tissu musculaire voire osseux (Delanian and Lefaix, 2005 ; Peter, 2005) ; (Figure 16).

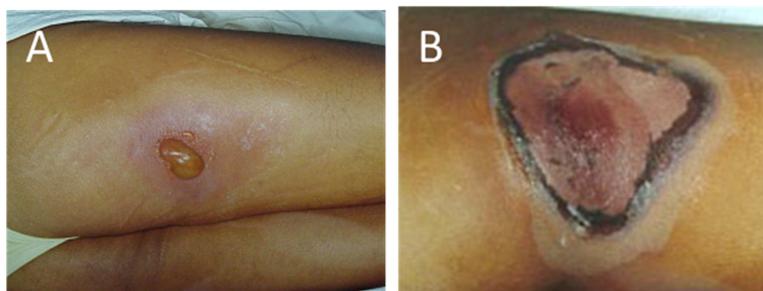


Figure 16 : Evolution clinique du syndrome cutané radio-induit.

A. Erythème secondaire et phlyctène

B. Radioépithéliite exsudative

Images tirées de (Bey et al, 2010a).

Parallèlement aux symptômes décrits ci-dessus, des vagues inflammatoires successives très extensives sont observées au niveau du tissu cutané et des tissus musculaires sous-jacents. Celles-ci sont imprévisibles et aboutissent à une lésion beaucoup plus étendue que l'érythème initial. Des signes fonctionnels de type neurologique sont observés tels que des troubles de la sensibilité et un syndrome douloureux constant résistant aux antalgiques morphiniques et partiellement soulagé par les anti-inflammatoires non stéroïdiens (Peter and Gottlober, 2002).

II.C) Traitement local et médical du syndrome cutané radio-induit

La prise en charge médicale et le traitement local des lésions sont réalisés en phase aiguë du SCR, à l'apparition des premiers symptômes. Pendant les phases inflammatoires, les topiques anti-inflammatoires (corticoïdes) et les pansements secs sont privilégiés sur lésions fermées. A l'inverse, pendant la phase torpide, l'emploi de tulle gras et d'enzymes protéolytiques est recommandé pour accélérer la détersion et diminuer la contraction des berges. Ces soins locaux sont associés à des traitements par antibiotiques et antalgiques par voie systémique (Peter and Gottlober, 2002). Par ailleurs, Lefaix *et al* ont démontré l'intérêt de l'association corticoïdes, anti-inflammatoires non stéroïdiens, anticoagulants, antiagrégants plaquettaire et antihistaminiques pour lutter à la fois contre la douleur, l'infection et favoriser la revascularisation (Lefaix *et al*, 1996). Ce traitement local reste à ce jour d'actualité.

II.D) Prise en charge chirurgicale du syndrome cutané radio-induit

Le traitement médical seul reste insuffisant lors de lésions radio-induites graves et nécessite une approche chirurgicale complémentaire. Celle-ci a considérablement évolué cette dernière décennie avec l'émergence de la thérapie cellulaire.

Jusqu'au début des années 2000, la chirurgie était conservatrice, comportant l'exérèse des tissus nécrosés associée à une greffe de peau ou de lambeau cutané. Cependant l'efficacité restait limitée, chaque acte chirurgical stimulant l'apparition de vagues inflammatoires extensives qui aggravaient l'étendue de la lésion. La reprise chirurgicale devenait alors nécessaire favorisant un cercle vicieux : « chirurgie-vagues inflammatoires-chirurgie » avec une exérèse délabrante aboutissant à l'amputation voire au démembrement, s'ajoutant alors tous les risques d'infection inhérents à cette technique (Zaharia , 2001).

Avec l'émergence de la thérapie cellulaire et l'amélioration des techniques de dosimétrie, une nouvelle stratégie a été proposée par les équipes de l'Hôpital d'Instruction des Armées (HIA) Percy et du Centre de Transfusion Sanguine des Armées (CTSA) à Clamart. Cette approche combine à la fois une chirurgie guidée par l'évaluation dosimétrique de la dose reçue et l'injection de cellules souches/stromales mésenchymateuses autologues isolées à partir de la moelle osseuse (Bey *et al*, 2007 ; Lataillade *et al*, 2007 ; Bey *et al*, 2010a ; Bey *et al*. 2010b).

II.D.1) Evaluation dosimétrique et prise en charge chirurgicale

La dosimétrie physique a pour objectif de déterminer la distribution de la dose délivrée au patient en se basant sur des simulations numériques. Cette évaluation dosimétrique nécessite la connaissance des circonstances exactes de l'accident : la source, sa localisation par rapport au patient, l'environnement et le temps d'exposition pour recréer les conditions d'irradiation sur un fantôme numérique anthropomorphe. Les

calculs réalisés par ordinateur génèrent une carte de distribution de la dose à la surface de la peau et des tissus sous-jacents (Trompier *et al*, 2006).

Cette reconstruction dosimétrique va guider la chirurgie pour réaliser une exérèse des tissus irradiés avant l'apparition de la radionécrose en zone saine, incluant des tissus pouvant apparaître sains au moment de la chirurgie (Bey *et al*, 2007).

Cette étape chirurgicale est similaire à la prise en charge des brûlures thermiques classiques : elle associe la greffe de peau autologue à l'utilisation de substituts dermiques. Elle est ensuite complétée par la greffe d'un lambeau cutané associée à l'injection de cellules souches mésenchymateuses prélevées et isolées à partir de la moelle osseuse (BM-MSC pour bone marrow mesenchymal stem/ stromal cell) lors du premier temps opératoire (Bey *et al*. 2010b).

II.D.2) Injection de cellules souches mésenchymateuses isolées à partir de la moelle osseuse

L'émergence des cellules souches a révolutionné la recherche médicale dans le domaine de la réparation tissulaire.

Concernant le SCR, des travaux expérimentaux sur des modèles murins ont été réalisés depuis 2002 à l'Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN) pour évaluer l'intérêt des greffes de cellules souches/stromales mésenchymateuses isolées à partir de la moelle osseuse dans le traitement de ce syndrome à la fois sur un modèle de xéno greffes (souris NOD/SCID) (Francois *et al*, 2007) mais aussi d'injections locales de cellules souches mésenchymateuses autologues isolées à partir de la moelle osseuse (Francois *et al*, 2006). Ces travaux ont révélé un effet bénéfique de ces cellules sur la cicatrisation avec une accumulation locale transitoire de lymphocytes en bordure du derme, une amélioration de la vascularisation et une augmentation de la réépithélialisation. L'apparition des lésions était retardée et limitée à une desquamation humide (Francois *et al*, 2006 ; Francois *et al*, 2007).

Au vu de ces résultats prometteurs, la thérapie cellulaire pour le traitement du SCR a été proposée pour la première fois en 2006 à titre compassionnel à l'HIA Percy de

Clamart en collaboration avec le CTSA, pour un patient de 27 ans irradié localement par une source de gammagraphie. Depuis, quatre patients ont reçu ce traitement pour lesquels il a été rapporté une cicatrisation des lésions et une meilleure gestion de la douleur et de l'inflammation à long terme (Bey *et al*, 2010a). Il est important de noter qu'une impotence fonctionnelle persiste en raison de l'importance de la reprise chirurgicale. Ce traitement fait actuellement référence au niveau de l'Agence Internationale de l'Energie Atomique [7].

II.D.2.a) Intérêt des cellules souches mésenchymateuses isolées à partir de la moelle osseuse

II.D.2.a.1) Définition des cellules souches/stromales mésenchymateuses

La thérapie cellulaire consiste à utiliser des cellules humaines pour prévenir, traiter ou atténuer une maladie en favorisant la réparation de tissus lésés ou en assurant leur remplacement. Elle se fonde sur l'utilisation de cellules souches définies comme possédant la capacité d'auto-renouvellement et pouvant se différencier en un ou plusieurs types cellulaires (Vainchenker, 2005). On distingue ainsi des cellules souches totipotentes, pluripotentes, multipotentes et unipotentes et selon leur origine des cellules souches embryonnaires, fœtales, amniotiques et adultes/somatiques. Du point de vue de leur utilisation en clinique les cellules souches embryonnaires pluripotentes posent d'importants problèmes éthiques et les cellules souches adultes multipotentes ont une capacité de différenciation en un nombre limité de type cellulaire.

Les cellules souches/stromales mésenchymateuses (l'acronyme MSC pour mesenchymal stem/stromal cells a été choisi dans ce travail par soucis d'homogénéité) ont été décrites et isolées pour la première fois en 1976 par Friedenstein *et al* à partir de la moelle osseuse (MO) (Friedenstein *et al*, 1976), le terme « MSC » ayant été retenu à partir de 1991 suite aux travaux de Caplan *et al* (Caplan, 1991).

Les MSC, capables d'auto-renouvellement, sont définies par trois critères minimum proposés par l'International Society of Cellular Therapy (ISCT) : (1) une adhérence au

plastique en condition standard de culture ; (2) leur phénotype : expression de marqueurs de surface non spécifiques (CD105, CD90 et CD73) et absence d'expression des antigènes CD34, CD45, CD14, CD19 et des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II (HLA-DR) ; (3) leur capacité de différenciation en ostéoblastes, chondroblastes et adipocytes *in vitro* (Dominici *et al*, 2006).

Initialement décrites au niveau de la MO, les MSC ont été isolées à partir du tissu conjonctif de nombreux organes (da Silva Meirelles *et al*, 2006) dont le tissu adipeux (Zuk *et al*, 2001). Elles ont également été isolées à partir du placenta (In 't Anker *et al*, 2004), du sang de cordon (Erices *et al*, 2000), du liquide amniotique (Mareschi *et al*, 2009), du foie, de la rate, des poumons (in 't Anker *et al*, 2003) ou encore de la pulpe dentaire (Nam and Lee, 2009).

Les MSC issues de la moelle osseuse humaine se caractérisent morphologiquement par leur forme en fuseau et leur aspect polynucléé au microscope optique. Au sein de la MO elles se situent à proximité des vaisseaux sanguins sur la face abluminale des sinusoides où elles jouent un rôle clé dans la formation du microenvironnement (niche) des cellules souches hématopoïétiques (Sacchetti *et al*, 2007).

Dans ce travail, pour des raisons d'homogénéité, les cellules souches mésenchymateuses isolées à partir de la moelle osseuse sont abrégées par l'acronyme anglophone BM-MSC (Bone-marrow Mesenchymal Stem Cells).

II.D.2.a.2) Caractérisation des BM-MSC

Les BM-MSC présentent de nombreux antigènes de surface, pour la plupart peu spécifiques, pouvant être retrouvés à la surface d'autres types cellulaires différenciés (Boxall and Jones, 2012). Ils sont résumés dans le tableau I.

On note que les BM-MSC n'expriment pas les marqueurs hématopoïétiques : CD3 ; CD4 ; CD11a ; CD34 ; CD45, ce qui, avec leur caractéristique d'adhérence au plastique, facilite leur séparation à partir d'un prélèvement de moelle osseuse. Elles expriment

cependant des ligands présents sur les cellules hématopoïétiques matures : CD72, LFA-3 et ALCAM, ICAM1, ICAM2, VCAM1 (Majumdar *et al*, 2003) (Tableau I).

Par ailleurs, sur le plan immunologique, les molécules du CMH de classe I sont présentes à la surface des BM-MSc tandis que les molécules du CMH de classe II ne le sont pas. On notera cependant que l'expression du CMH II peut être induite en présence d'interféron γ (Le Blanc, 2003a). Elles n'expriment pas non plus CD40 et CD40-ligand de même que les molécules de co-stimulation B7-1 (CD80) et B7-2 (CD86) (Pittenger and Martin, 2004) (Tableau I).

Tableau I : Caractéristiques phénotypiques des BM-MSc.

Tableau réalisé d'après les travaux de (Kern *et al*, 2006 ; Rasini *et al*, 2013).

	Molécules de surface présentes	Molécules de surface absentes
Molécules d'adhésion	CD29 (β_1 -intégrin); CD49a-b-c-e-f (α_4 intégrin); CD51; CD58; CD102 (ICAM-2); CD105 (endoglin); CD106(VCAM); CD126 (ALCAM); CD166	CD9; CD11a (intégrin); CD15 CD18 (β_2 -intégrin) CD49d (intégrin); CD50 (ICAM-3); CD62e-l-s (selectine); CD133
Récepteurs	CD44 (hyaluronate); CD71 (transferrin) ; CDw11 ; CD120a ; CD120b; TGFb-1/2R; CD123; CD124; CD140a; P75	CD6 ; CD25 ; CD36 ; CD117 ; CD144
Enzymes	CD13 (aminopeptidase) CD73;	CD10 (métalloprotéine); CD38
Molécules de la matrice extracellulaire	CD90	
Protéines impliquées dans la réponse immunitaire	CD127	CD21; CD40; CD40l; CD80; CD86 ; CD95
Antigènes du CMH	HLA ABC (CMH I)	HLA DR (CMH II)
Marqueurs des cellules souches	CD73; CD90; CD166; SSEA-3; SSEA-4	CD133; SSEA-1
Marqueurs des cellules hématopoïétiques	CD72, LFA-3	CD3; CD4; CD11a; CD14; CD31; CD34; CD45

Les BM-MSc expriment également des marqueurs tels que STRO-1 et de nombreuses intégrines impliquées dans l'adhésion et la migration cellulaire. La liste n'est pas exhaustive et les études réalisées complètent régulièrement ces données (Karp and Leng Teo, 2009 ; Boxall and Jones, 2012).

II.D.2.a.3) Potentiel de prolifération et capacité de différenciation des BM- MSC

Les BM-MSC représentent 1/10 000 à 1/100 000 des cellules mononucléées totales de la MO. Elles peuvent être isolées avec une efficacité de 100% et proliférer jusqu'à la 40^{ème} génération (Kern *et al*, 2006). Une morphologie stable (proche de celle des fibroblastes) et l'absence d'anomalies chromosomiques ont été décrites jusqu'au 20-25^{ème} passage *in vitro* (Pittenger *et al*, 1999). Par ailleurs elles sont capables de s'expandre *in vitro* dans des milieux de culture simples tels que les milieux enrichis en Fibroblast Growth Factor (bFGF) avec ou sans cytokines (Lange *et al*, 2007).

Dès 1999, Pittenger *et al* ont décrit les capacités de différenciation *in vitro* des BM-MSC dans les différents tissus issus du feuillet embryonnaire mésodermique tels que l'os, le cartilage, les ligaments, les tendons, les muscles lisses et le tissu adipeux (Pittenger *et al*, 1999). Il est apparu plus récemment que dans des conditions de culture particulières et spécifiques, les BM-MSC peuvent aussi se différencier en une variété plus grande de types cellulaires tels que : les cardiomyocytes (Toma *et al*, 2002), les myocytes squelettiques, les fibroblastes (Pittenger *et al*, 2002), les péricytes (Direkze *et al*, 2003), les cellules rétinienne (Tomita *et al*, 2002), les astrocytes (Wislet-Gendebien *et al*, 2005), les hépatocytes ou encore les cellules pancréatiques (Chen *et al*, 2004). Cette capacité de différenciation en de nombreux tissus est cependant contestée (Bianco *et al*, 2008)

In vivo, cette capacité de différenciation apparaît d'ailleurs moindre, bien que certaines équipes aient mis en évidence une différenciation des BM-MSC en kératinocytes dans un modèle murin en présence de β -catenin, Bone-Morphogenic Protein 4 (BMP4) et d'EGF (Huelsenken *et al*, 2001 ; Sasaki *et al*, 2008) ainsi que dans différentes variétés de cellules épithéliales (Krause *et al*, 2001). L'importance de ce processus de transdifférenciation *in vivo* dans la régénération tissulaire reste controversée. De nombreuses études précliniques suggèrent que lors de la réparation tissulaire les cellules souches agissent principalement via des processus sécrétoires plutôt que par transdifférenciation (Chen L *et al*, 2008). Ainsi dans un modèle murin de SCR, la fraction de cellules retrouvée localement était quantitativement faible par rapport au nombre de BM-MSC injectées et leur nombre a diminué de moitié au cours des quatre jours suivant leur administration (Francois *et al*, 2007).

II.D.2.a.4) Migration et activité paracrine des BM-MSC.

L'intérêt des BM-MSC a été démontré dans la réparation tissulaire de nombreuses pathologies mais les mécanismes impliqués sont encore très mal connus. On retiendra cependant la migration des cellules, la transdifférenciation et la sécrétion de nombreux facteurs paracrines. En effet, les BM-MSC présentent la particularité de migrer grâce aux molécules chémoattractives et à l'expression d'intégrines à la surface cellulaire. Les travaux dans ce domaine montrent qu'elles migrent préférentiellement vers les tissus lésés, ce qui précise leur intérêt en réparation tissulaire et permet également d'envisager une prise en charge systémique (Augello *et al*, 2010 ; Ito, 2011).

Les cellules souches sécrètent de nombreux facteurs de croissance, cytokines et chimiokines impliqués dans la réparation tissulaire tels que : l'EGF, le Keratinocyte Growth Factor (KGF), l'IGF-1, le Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor (GDNF), le Platelet derived Growth factor-BB (PDGF-BB), l'érythropoïétine (EPO) et la Thrombopoïétine (TPO) ainsi que des facteurs pro-angiogéniques dont le VEGF α et l'angiopoïétine 1 (Chen L. *et al*, 2008 ; Estrada *et al*, 2009). Les BM-MSC sécrètent également un certain nombre de chémokines telles que le Stromal Derived Factor 1 (SDF-1), les Macrophage Inflammatory Protein-1 alpha et beta (MIP1 α - β) (Chen L. *et al*, 2008).

Un potentiel immunomodulateur a également été décrit. Les BM-MSC réduisent l'activation des lymphocytes T ainsi que la production de cytokines pro-inflammatoires notamment via la sécrétion de prostaglandine E2 (Najar *et al*, 2010 ; Yanez *et al*, 2010).

De part l'ensemble des propriétés décrites ci-dessus, les BM-MSC apparaissent comme un bon candidat afin de favoriser la réparation tissulaire dans de nombreuses pathologies (Gnecchi *et al*, 2008) et en particulier pour le SCR, caractérisé par un défaut de revascularisation et des poussées inflammatoires extensives à court et long terme.

II.D.2.a.5) Applications cliniques des BM-MSC dans la régénération tissulaire

L'application des BM-MSC en réparation tissulaire est basée sur les propriétés de ces cellules souches : leur capacité à migrer vers les tissus lésés (Augello *et al*, 2010), leur faible immunogénicité et leur propriétés immunomodulatrices (Petrie Aronin and

Tuan, 2010), leur potentiel de transdifférenciation (Chamberlain *et al*, 2007), leur pouvoir d'auto-renouvellement *in vitro* (Mosna *et al*, 2010) et leur propension à sécréter des facteurs solubles qui régulent de nombreux processus impliqués dans la prolifération et la différenciation d'un grand nombre de cellules cibles (Caplan and Dennis, 2006 ; Chen L. *et al*, 2008). En moins de dix ans, depuis la découverte du potentiel de différenciation des BM-MSC par Pittenger *et al*, pas moins de 90 essais cliniques ont été réalisés dans le monde, leurs avantages et leurs inconvénients étant résumés dans le tableau II.

Tableau II : Avantages et inconvénients des BM-MSC pour leur utilisation clinique.

Tableau réalisé d'après les travaux de (Dominici *et al*, 2006 ; Kern *et al*, 2006 ; Bernardo *et al*, 2007).

Avantages	Inconvénients
Faible immunogénicité	Ponction de la MO=procédure chirurgicale lourde
Régulation de processus biologiques: <ul style="list-style-type: none"> • Prolifération • Différenciation • Inflammation • Angiogenèse • Epithélialisation 	Faible pourcentage de BM-MSC dans la MO (1/10000 des cellules nucléées)
Amplification <i>in vitro</i> dans des milieux de culture simples <ul style="list-style-type: none"> • Milieu enrichi en Basic fibroblast growth factor • Milieu enrichi ou non en sérum • Milieu sans cytokine 	Avec l'augmentation du nombre de passages: <ul style="list-style-type: none"> • Diminution du taux de prolifération • Perte de leur morphologie
Bonne expansion en culture avec maintien de: <ul style="list-style-type: none"> • Croissance • Potentiel de différenciation Morphologie stable (fibroblaste) jusqu'à 20-25 passages Pas d'anomalies chromosomiques en culture <i>in vitro</i>	Effet pro-ou anti tumoral des BM-MSC dépendant de: <ul style="list-style-type: none"> • La source tissulaire • Les conditions de culture • La variabilité inter-individuelle des donneurs
Efficacité de l'isolement des BM-MSC : 100%	Diminution du potentiel de différenciation avec l'âge du donneur

Les études cliniques les plus importantes concernent le traitement de l'ostéogénèse imparfaite, la maladie du greffon contre l'hôte et la maladie de Crohn (Strioga *et al*, 2012). Un certain nombre d'étude clinique de phase I et II sont également en cours dans le domaine de la réparation tissulaire, en particulier des lésions ischémiques (pied diabétique, ischémies myocardiques et cérébrales) et des lésions articulaires (Strioga *et al*, 2012).

II.D.2.b) Production des BM-MSC

Dans le protocole proposé par le CTSA et l'HIA Percy, les cellules de la MO totales sont prélevées puis isolées lors du premier temps opératoire à partir d'une zone non irradiée préalablement définie grâce à la dosimétrie physique au niveau des crêtes iliaques. Les cultures sont réalisées dans un milieu de grade clinique enrichi en lysat plaquettaire humain (37°C avec 5% de CO₂). Après trois à quatre jours, seules les BM-MSc adhèrent au plastique, les cellules non adhérentes étant éliminées. Afin d'obtenir une quantité moyenne de 200+/-20.10⁶ cellules, il est nécessaire de les cultiver pendant au moins sept jours. Les BM-MSc ont été conditionnées dans de l'albumine humaine pour leur réinjection. Avant injection au patient, quatre contrôles de qualité sont effectués consistant en l'étude de leur phénotype par cytométrie en flux (CD45- ; CD105+ ; CD73+ ; CD90+), une évaluation de leur pouvoir clonogénique et de leur activité télomérasique. Enfin l'absence de contamination par des bactéries, des phages ou des mycoplasmes a également été contrôlée (Lataillade *et al*, 2007 ; Bey *et al*, 2010a).

II.D.3) Protocole de prise en charge des patients victimes de SCR

Le protocole de prise en charge des patients présentant un SCR traité par thérapie cellulaire et chirurgie a été réalisé sur quatre victimes. Le traitement a été adapté à chaque patient en fonction de la dose reçue et du délai de prise en charge.

Il consiste tout d'abord en une dosimétrie physique réalisée le plus tôt possible pour déterminer l'importance de la zone exposée et les zones non irradiées. Celle-ci permet

ainsi un premier temps opératoire au cours duquel les tissus irradiés malgré leur apparence saine sont excisés et la moelle osseuse est prélevée en zone non irradiée pour en isoler les BM-MSC. Dans un second temps, des greffes de peau autologues sont réalisées trois à quatre semaines après exérèse. Durant cette période, les BM-MSC sont amplifiées et contrôlées pour une injection locale lors du 3^{ème} temps opératoire. Des injections cellulaires itératives de $200 \pm 50 \cdot 10^6$ sont effectuées : la fréquence et le nombre d'injections dépendent de plusieurs facteurs : la dose absorbée, l'évolution clinique, le nombre de reprises chirurgicales nécessaires, et le délai de prise en charge thérapeutique. Ce protocole de prise en charge des victimes de SCR, résumé dans la figure 17, est adapté pour chaque patient, la chronologie et les étapes majeures restant communes.

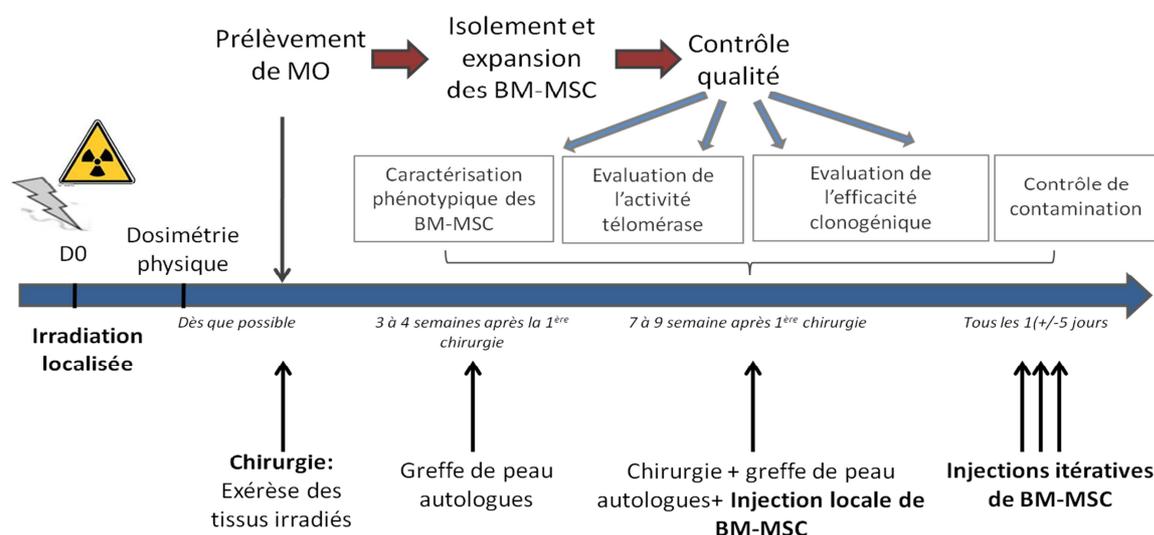


Figure 17 : Chronologie du traitement de référence du syndrome cutané radio-induit par chirurgie et thérapie cellulaire.

Dans ce protocole, la dosimétrie physique est réalisée dès que possible pour permettre de déterminer l'exérèse des tissus irradiés. Durant ce premier temps opératoire, les BM-MSC des patients sont prélevées, mises en culture et amplifiées. Après une première greffe de peau autologue, une reprise chirurgicale associée à une injection de BM-MSC est effectuée. La qualité des cellules a été évaluée avant injection. En fonction du délai de prise en charge du patient et de l'évolution clinique un nombre variable d'injections itératives de BM-MSC peut être réalisé.

Figure réalisée d'après les travaux de (Bey et al, 2007 ; Lataillade et al, 2007 ; Bey et al, 2010a ; Bey et al, 2010b).

II.E) Limite du traitement par injection de BM-MSC

II.E.1) Prélèvement de moelle osseuse : acte invasif et douloureux

Le prélèvement de moelle osseuse est réalisé au niveau des crêtes iliaques du patient sous anesthésie générale pendant l'exérèse des tissus irradiés ce qui évite les douleurs liées à la ponction elle-même. Cependant, cette technique est invasive et douloureuse au réveil et nécessite une prise en charge antalgique déjà lourde suite à l'opération et aux douleurs liées au syndrome cutané radio-induit (Hernigou *et al*, 2014). Par ailleurs le risque de survenue de complications subsiste et la quantité de moelle prélevée peut s'avérer insuffisante (Hernigou *et al*, 2014).

II.E.2) Pertes massives et retard au diagnostic

En cas d'accident de masse, la prise en charge de nombreux blessés serait nécessaire. Le traitement actuel par chirurgie et injection de BM-MSC ne le permet pas en raison des délais de production des greffons et des contraintes logistiques que représente la mise en culture des prélèvements médullaires.

En effet le prélèvement de moelle osseuse permet d'obtenir environ $250 \cdot 10^6$ de cellules totales mais les BM-MSC ne représentent que 1/10 000 à 1/100 000 de ces cellules (Bernardo *et al*, 2009). Malgré une prolifération importante en culture, le délai pour l'obtention de $200 \pm 50 \cdot 10^6$ pour chaque greffe et pour chaque patient entraîne une phase d'attente ayant une répercussion importante sur la chronologie thérapeutique.

II.E.3) Irradiation hétérogène

La dosimétrie physique est une technique très pertinente et efficace pour déterminer les zones irradiées en cas d'irradiation corporelle totale hétérogène ou

localisée. Elle est cependant dépendante des informations détaillées recueillies après l'irradiation telles que la source, la localisation exacte du patient au moment de l'exposition, ses déplacements par rapport à la source et le temps d'exposition à chaque point. Le recueil de ces informations peut être difficile en fonction des circonstances dans le cas d'un accident de masse ou lorsque la prise en charge est retardée. La détermination des zones non irradiées peut alors être compromise.

Par ailleurs en cas d'irradiation localisée à fortes doses associée à une irradiation hétérogène corporelle totale, il est possible que les zones de prélèvements de moelle osseuse qui sont en priorité les crêtes iliaques soient elles-mêmes des zones irradiées, ce qui réduit la possibilité de prélèvement et expose au risque d'isolement de BM-MSK elles-mêmes exposées.

III) Optimisation du traitement

Pour optimiser le traitement du SCR par injections de BM-MSc, de nouvelles stratégies thérapeutiques peuvent être envisagées. Nos travaux porteront en particulier sur l'utilisation des cellules souches issues du tissu adipeux manipulées ou non, proposées comme nouveau produit de thérapie cellulaire en raison des nombreux avantages qu'elles présentent notamment en terme de facilité de collecte et de constitution de banques cellulaires.

III.A) Les cellules souches dérivées du tissu adipeux

Les précurseurs adipocytaires décrits pour la première fois en 1976 par Van *et al.* ont été isolés à partir de tissu adipeux humain par digestion enzymatique (collagénase) puis par adhérence (Van *et al.*, 1976). Les cellules stromales et vasculaires obtenues par cette technique ont été définies comme la fraction stromale vasculaire (FVS). En 2001, Zuk *et al.* ont identifié dans la FVS, une sous-population présentant toutes les caractéristiques des cellules souches : les cellules souches d'origine adipocytaire (Zuk *et al.*, 2001).

Actuellement, la désignation de ces cellules souches d'origine adipocytaire demeure différente au sein de la communauté scientifique :

- PLA cells (Process Lipoaspirate cells)
- ADSC (Adipose tissue Derived Stem/stromal Cells)
- ASC (Adipose tissue derived Stem/ stromal Cells)
- Pré adipocytes
- Fraction cellulaire du stroma vasculaire adipeux

Par souci d'homogénéité, les termes ASC et cellules souches d'origine adipocytaire seront retenus pour ce travail.

Le tissu adipeux et la moelle osseuse ont la même origine embryonnaire : le mésenchyme. Il existe deux types de tissu adipeux, le tissu adipeux brun et le blanc. Les ASC sont isolées à partir du tissu adipeux blanc. Son abondance et la quantité d'ASC par gramme de tissu permettent d'obtenir grâce à un prélèvement moins traumatique pour le patient un grand nombre d'ASC par rapport aux BM-MSc. En effet, 5.10^3 ASC peuvent

être isolées à partir d'un gramme de tissu adipeux (Hass *et al*, 2011), soit une quantité 500 fois supérieure à ce qui peut être isolé avec la même quantité de moelle osseuse (Fraser *et al*, 2006 ; Bernardo *et al*, 2009).

III.A.1) Caractérisation des ASC

Les ASC présentent toutes les caractéristiques définissant les MSC selon les critères de l'ISCT : l'adhérence au plastique dans des conditions standards de culture, l'expression de CD90, CD105 et CD73, l'absence d'expression du CMH de type II, du CD34, CD45, CD19, CD14 et la capacité de se différencier *in vitro* en ostéoblastes, chondroblastes, et adipocytes (De Ugarte *et al*, 2003a, Dominici *et al*, 2006, Bourin *et al*, 2013).

Une grande similarité existe entre les BM-MSC et les ASC. Morphologiquement, ces cellules d'origine tissulaire différente ont une forme en fuseau assez proche des fibroblastes qu'elles conservent *in vitro*. Les ASC se caractérisent également par leurs marqueurs de surface résumés dans le tableau III tels que le CD10, CD13, CD29, CD34, CD44, CD71, CD73, CD90, CD105, CD117 (communs aux BM-MSC).

Tableau III: Caractéristiques phénotypiques des ASC.

Tableau réalisé d'après les travaux de (Zuk *et al*, 2001 ; Kern *et al*, 2006).

	Molécules de surface présentes	Molécules de surface absentes
Molécules d'adhésion	CD9 ; CD29 (β_1 -intégrin); CD49d (α_4 - intégrin); CD54 (ICAM-1); CD105 (endoglin); CD166 (ALCAM)	CD11b (α_b -intégrin); CD18 (β_2 -intégrin) CD49f (α_6 -intégrin); CD50 (ICAM-3); CD56 (NCAM); CD61, CD62e (E-selectin); CD104 (α_4 - intégrin);CD106 (VCAM); CD133
Récepteurs	CD44 (hyaluronate); CD71 (transferrine)	CD16 (récepteur Fc)
Enzymes	CD10, CD13 (aminopeptidase) ; CD73, aldéhyde déshydrogénase	
Molécules de la matrice extracellulaire	CD90; CD146; Collagène I et III; ostéopontin; ostéonectin	
Protéines du complément et du système immunitaire	CD55; CD59 (protectin)	
Antigène du CMH	HLA ABC	HLA DR
Marqueurs des cellules souches	(CD34); ABCG2	
Marqueurs des cellules stromales	CD29; CD44; CD73; CD90; CD166	
Marqueurs des cellules hématopoïétiques		CD14; CD31; CD45

De même que les BM-MSC, ces cellules souches sont décrites comme étant négatives pour les marqueurs des lignées hématopoïétiques, le facteur von Willebrand et les marqueurs des cellules endothéliales (Gimble and Guilak, 2003) ainsi que pour les molécules du CMH II, ce qui permet d'envisager l'utilisation des ASC dans un contexte allogénique (Schaffler and Buchler, 2007). L'immunophénotypage des ASC est identique à 90% à celui des BM-MSC (Kern *et al*, 2006).

On note cependant que certains marqueurs de surface comme CD106 et CD49f sont moins exprimés (Kern *et al*, 2006 ; Gimble *et al*, 2007) que dans les BM-MSC. Les ASC modulent également l'expression de certains marqueurs au cours des différents temps de culture tels que les glycoprotéines de surface CD34 (Mitchell *et al*, 2006 ; Maumus *et al*, 2011), CD54 (De Ugarte *et al*, 2003b) et CD49d (Noel *et al*, 2008), à l'inverse des BM-MSC. Par ailleurs l'expression de STRO-1 par les ASC, caractéristique des BM-MSC est controversée selon les techniques de détection utilisées (Gronthos *et al*, 2001 ; De Ugarte *et al*, 2003b).

III.A.2) Potentiel de prolifération et capacité de différenciation des ASC

De par leur caractéristiques immunophénotypiques et leur capacité d'adhérence au plastique, l'isolement des ASC à partir du tissu adipeux a une efficacité de 100% tout comme les BM-MSC (Kern *et al*, 2006).

Les ASC peuvent être cultivées de façon prolongée et amplifiées avec un temps de doublement stable jusqu'au 6^{ème} passage et un faible taux de sénescence (0 au premier passage, 3,4% au 13^{ème} passage) (Zuk *et al*, 2001 ; Gruber *et al*, 2012). Le potentiel de prolifération *in vitro* des ASC est plus important que celui des BM-MSC, avec une entrée en sénescence plus tardive en culture mais également après décongélation (Izadpanah *et al*, 2006 ; Kern *et al*, 2006 ; Vidal *et al*, 2011). De plus il a été décrit que les ASC sont génétiquement et morphologiquement plus stables en culture à long-terme que les BM-MSC (Kern *et al*, 2006).

Les cellules souches d'origine adipocytaire présentent les mêmes capacités de transdifférenciation que les BM-MSc en adipocytes, chondrocytes et ostéoblastes (De Ugarte *et al*, 2003b ; Bourin *et al*, 2013). Par ailleurs dans des conditions de culture appropriées, une transdifférenciation en fibroblastes (Kern *et al*, 2006), en kératinocytes (Chavez-Munoz *et al*, 2013), en lignée hématopoïétique myéloïdes et lymphoïdes (De Toni *et al*, 2011) et en cellules endothéliales (Nunes *et al*, 2013) ont aussi été rapportées. Enfin, comme pour les BM-MSc, l'âge du donneur influe sur les propriétés des ASC. Les capacités de prolifération et de différenciation sont réduites et l'entrée en sénescence des ASC plus précoce lorsque l'âge du donneur augmente (de Girolamo *et al*, 2009 ; Alt *et al*, 2012).

III.A.3) Migration et activité paracrine des ASC

Tout comme les MSc de la moelle osseuse, les ASC sont capables de migrer en réponse aux molécules chémoattractives de manière préférentielle vers les tissus lésés (Kern *et al*, 2006 ; Salgado *et al*, 2010).

Les ASC présentent également des capacités sécrétoires importantes impliquées dans les mécanismes de réparation tissulaire tels que la prolifération cellulaire, l'inflammation l'angiogenèse (Yanez *et al*, 2010 ; Cerqueira *et al*, 2013 ; Bhang *et al*, 2014).

Le sécrétome des cellules souches, aussi appelé milieu conditionné (MC) est défini comme l'ensemble des protéines sécrétées par la voie de sécrétion classique (via le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi) et par la voie non-classique des vésicules extracellulaires. Ces protéines sécrétées comprennent de nombreuses enzymes, des facteurs de croissance : bFGF, TGF β 1, IGFBP-7 (Insulin like Growth Factor Binding Protein), EGF, des cytokines : IL-6, IL-8, MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein), RANTES (Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted), SPARC (Secreted Protein Acidic and Rich in Cystein), CXCL1 (Chemokine C-X-C motif Ligand 1), des hormones et autres médiateurs (Huang *et al*, 2013). Des facteurs pro-angiogéniques tels que VEGF α , ANG1, la protéine Cyr61 (Cystein rich angiogenic inducer 61) sont aussi produits par les ASC (Rehman *et al*, 2004 ; Estrada *et al*, 2009).

Par ailleurs, la sécrétion de protéines de la matrice extracellulaire (fibronectine, collagène de type 1, MMP 3-9), de protéines et de dérivés lipidiques immunorégulateurs telles que la prostaglandine E2 (PGE2) a été rapportée (Cui *et al*, 2007 ; Yanez *et al*, 2010). Ce sécrétome est résumé dans le tableau IV.

Tableau IV : Tableau récapitulatif des molécules sécrétées par les ASC.

	Molécules	Références
Facteurs de croissance	bFGF ; TGFβ1 ; IGFBP7 ; EGF ;	(Molina <i>et al</i> , 2009 ; Kim <i>et al</i> , 2010 ; Kapur and Katz, 2013)
Cytokines	IL-6 ; IL-8, MCP-1 ; RANTES ; SPARC ; CXCL1	(Molina <i>et al</i> , 2009 ; Rosenow <i>et al</i> , 2010)
Protéines de la matrice extracellulaire	Fibronectine ; Collagène de type 1-2-3, MMP-3 ; MMP-9 ; Héparane sulfate protéoglycane	(Molina <i>et al</i> , 2009 ; Zhong <i>et al</i> , 2010)
Molécules immunomodulatrices	PGE2 ; TNFα	(Cui <i>et al</i> , 2007; Rosenow <i>et al</i> , 2010 ; Yanez <i>et al</i> , 2010)
Molécules pro-angiogéniques	VEGFα ; ANG1 ; Cyr61	(Rehnan <i>et al</i> , 2004 ; Estrada <i>et al</i> , 2009)
Enzymes	Lactate déshydrogénase ; métalloprotéases	(Kim <i>et al</i> , 2010 ; Rosenow <i>et al</i> , 2010)

Les facteurs paracrines des ASC sont impliqués dans les principaux processus de la réparation cutanée. Leur activité pro-angiogénique a été décrite dans des modèles *in vitro* et *in vivo* via la sécrétion de VEGFα, bFGF et MMP3-9 et apparaît accrue par rapport à celle du sécrétome des BM-MSC (Kim Y. *et al*, 2007 ; Casteilla *et al* 2010).

Au niveau de la réponse inflammatoire, l'action des ASC est plus importante que celle des BM-MSC. Elles modulent la réponse immunitaire en inhibant la différenciation des cellules dendritiques, en diminuant leur expression de molécules co-stimulatrices et en augmentant leur sécrétion de cytokines immunomodulatrices (IL-10) (Bochev *et al*, 2008). Une inhibition significativement plus importante de la production d'immunoglobulines (Ig) par le sécrétome des ASC par rapport aux BM-MSC a également été rapportée (Ivanova-Todorova *et al*, 2009), de même qu'une diminution de la réaction inflammatoire via la sécrétion de PGE2. Les facteurs paracrines des ASC favorisent également la prolifération des fibroblastes dermiques et la sécrétion de collagène de type 1, composant majeur de la matrice extracellulaire (Kim WS. *et al*, 2007).

III.A.4) Applications cliniques des ASC dans la régénération tissulaire

La découverte plus récente du potentiel des ASC explique le nombre plus faible d'essais cliniques en cours. A ce jour, elles sont cependant utilisées dans des essais de phase I et II dans le domaine de la maladie du greffon contre l'hôte, des lésions articulaires, (cartilage/ tendons) et de l'ischémie myocardique (Strioga *et al*, 2012). En préclinique, de nombreuses études ont été réalisées pour évaluer l'intérêt des ASC en particulier dans le domaine de la réparation tissulaire, démontrant leur effet bénéfique pour la prise en charge des lésions neurologiques secondaires à une ischémie cérébrale (De Toni *et al*, 2011), des défauts osseux (Field *et al*, 2011), et des lésions cutanées (Ebrahimian *et al*, 2009 ; Forcheron *et al*, 2012 ; Cerqueira *et al*, 2013).

III.A.5) Evaluation des greffes d'ASC autologues dans le traitement du syndrome cutané radio-induit

Se fondant sur les propriétés cellulaires des ASC, leur abondance et leur facilité de prélèvement notre équipe a préalablement évaluée sur un modèle de SCR chez le miniporc (8 animaux témoins et 5 animaux recevant des ASC) l'efficacité de l'injection d'ASC autologues (Forcheron *et al*, 2012) ; (Annexe 1). Ce modèle a été choisi car contrairement aux souris et lapins (Williams *et al*, 2010 ; Meirelles *et al*, 2013), les doses utilisées pour induire les symptômes sont proches de celles utilisées chez l'Homme (Agay *et al*, 2010). Par ailleurs, les porcs ont de nombreuses similarités avec l'Homme en termes de morphologie et de physiologie des organes, mais surtout, ils sont très proches en termes d'histologie et d'architecture vasculaire du derme (Vodicka *et al*, 2005).

Dans ce travail réalisé à l'Institut de Recherche Biomédicale des Armées (IRBA), les animaux ont été irradiés en région lombaire à la dose de 50 Gy gamma, cette configuration d'irradiation protégeant les organes nobles notamment les systèmes cardio-pulmonaire et intestinal et évitant l'exposition de gros troncs vasculaires Les animaux ont reçu quatre injections locales itératives de $50 \cdot 10^6$ ASC : deux injections avant l'apparition des symptômes (J25 et J46) puis deux injections en phase de développement clinique (J76 et J95 post-irradiation).

L'étude immuno-histologique réalisée sur des biopsies cutanées a révélé la présence au niveau du derme et de la jonction dermo-épidermique, d'ASC et de cellules immunitaires mises en évidence par marquage du CD3 (lymphocyte T) et de la chaîne légère λ (lymphocytes B), trois jours après injection. Une coloration hématoxyline-éosine et un marquage de Ki67 (marqueur de prolifération des kératinocytes) ont également révélé une réépithélialisation avec un aspect multi-couches semblable à une peau saine pour les animaux traités par injection d'ASC contrairement aux animaux témoins présentant un épithélium désorganisé dépourvu de kératinocytes quatre mois après irradiation. L'évaluation clinique a montré une amélioration des symptômes avec une cicatrisation totale des lésions. Une phase douloureuse et inflammatoire a été observée suite aux injections d'ASC mais le traitement antalgique a pu être définitivement arrêté six semaines après irradiation. Les animaux témoins ont développé une nécrose irréversible douloureuse caractéristique de l'évolution du SCR à fortes doses (Forcheron *et al*, 2012). Ces résultats ont mis en évidence l'intérêt des ASC autologues dans le traitement du SCR.

III.B) Banque cellulaire

La mise en place de banques cellulaires nationales et internationales permettant de répondre à un besoin critique d'accès rapide à des tissus sains cryoconservés en médecine régénérative représente un véritable défi.

Des banques de cellules de sang de cordon, centralisées au niveau des Etablissements Français du Sang existent en France et sont utilisées pour le traitement des hémopathies sanguines depuis une vingtaine d'année [8].

Il n'existe à ce jour aucun système de banques de cellules souches adultes en France, à la différence des banques de tissus (os, cornée) qui sont en expansion. Aux Etats- Unis et au Royaume-Unis, l'idée est en cours de développement et des banques de cellules souches adultes pour la recherche scientifique existent (West *et al*, 2014).

Dans le contexte du SCR, l'utilisation de banques cellulaires (autologues pour les personnels à risque sur le plan professionnel et préalablement identifiés ou allogéniques)

permettrait de pallier les retards de prise en charge, lors d'accident de masse ou dans des situations ne permettant pas le prélèvement de cellules souches en zones sous exposées.

Les contraintes techniques liées à la qualité du stockage à long-terme, la conservation des propriétés de prolifération ou de différenciation des MSC ont fait l'objet de nombreux travaux et ne représentent plus de réels obstacles (Devireddy and Thirumala, 2011 ; Dhanasekaran *et al*, 2013). La reprise de la prolifération des ASC, le maintien de leur caractère multipotent et l'absence d'anomalies chromosomiques après cryoconservation ont été rapportées et permettent d'envisager leur utilisation pour la régénération tissulaire (Devireddy *et al*, 2005 ; De Rosa *et al*, 2009 ; Dariolli *et al*, 2013). Enfin, la faible immunogénicité des MSC en général et des ASC en particulier en font d'excellentes candidates pour la mise au point de traitement utilisant des cellules souches allogéniques (De Ugarte *et al*, 2003a).

III.C) Thérapie génique transitoire

III.C.1) Principes et intérêt

La thérapie génique est une stratégie consistant à introduire du matériel génétique codant pour une protéine ou une séquence choisie afin de modifier le capital génétique de la cellule dans le but de l'optimiser ou de remplacer des séquences manquantes.

En thérapie génique, il est important de considérer la durée d'expression du transgène, qui sera un point crucial pour le choix de la technique de transfection. Deux méthodes existent : (1) **les techniques intégratives** qui permettent une expression stable du gène, réalisées via l'utilisation de rétrovirus, de lentivirus ou grâce à des recombinaisons sites-spécifiques, (2) **les méthodes non intégratives** pour lesquelles l'expression du gène sera transitoire, la transfection du gène se faisant chimiquement, via un adénovirus, une électroporation ou une nucléofection (Nowakowski *et al*, 2013).

Dans le cadre de la régénération tissulaire, en particulier dans celui de notre approche thérapeutique du SCR, l'optimisation des cellules souches cible principalement

les processus anti-inflammatoires, angiogéniques et prolifératifs *in situ*. Ces deux derniers étant impliqués dans la croissance tumorale, la mise en œuvre de méthodes intégratives représente un risque iatrogène de tumorigénèse limitant leur utilisation clinique.

En thérapie génique transitoire, les BM-MSC et les ASC ne diffèrent pas en termes d'efficacité de transfection (Miyazaki *et al*, 2008). Les adénovirus restant dans le cytoplasme (Morizono *et al*, 2003), le risque de mutagénèse insertionnelle est donc faible mais non nul (Wu and Dunbar, 2011). Cette technique présente de plus, le risque inhérent aux vecteurs viraux : leur immunogénicité (Yang *et al*, 1994). Pour pallier ce risque, les techniques d'électroporation et de nucléofection peuvent être envisagées. L'électroporation consiste à augmenter la conductivité électrique et la perméabilité de la membrane plasmique par application d'un champ électrique au niveau de la face extracellulaire de la membrane. Cette technique permet l'introduction dans la cellule de molécules ou de matériel génétique qui seront conservés dans le cytoplasme (Kim and Im, 2011). La nucléofection est basée sur le principe de l'électroporation mais elle présente en plus, l'intérêt d'introduire le matériel génétique dans le noyau grâce à l'utilisation d'une solution spécifique à chaque type de cellules (composition non connue) développée par le laboratoire Lonza (Lonza, Bâle, Suisse). Elle permet le passage de la membrane plasmique et nucléaire. La présence du matériel génétique dans le noyau augmente ainsi l'efficacité de transfection et d'expression du transgène (Nakashima *et al*, 2005 ; Aluigi *et al*, 2006 ; Zaragosi *et al*, 2007).

Le concept de thérapie génique transitoire se fonde sur la capacité sécrétoire des cellules souches : la transfection d'un matériel génétique contenant la séquence codante d'une protéine d'intérêt permet la sécrétion de cette protéine avec les facteurs paracrines. Il est ainsi possible d'optimiser les propriétés des cellules transduites en choisissant une protéine immunomodulatrice, impliquée dans l'angiogenèse et/ou la prolifération cellulaire permettant d'accroître leur rôle dans la réparation tissulaire et de pallier à des greffons cellulaires de taille réduite.

III.C.2) La protéine Sonic Hedgehog

Afin d'optimiser le potentiel des ASC par thérapie génique transitoire, la protéine Sonic Hedgehog (Shh) a été choisie comme première protéine candidate.

III.C.2.a) Description

Un morphogène est un gène exprimé pendant le développement embryonnaire et codant pour une protéine dont le gradient induit la formation des axes et des polarités de l'embryon.

La protéine Sonic Hedgehog (Shh) est codée par un morphogène du même nom présent sur le chromosome 7 (7q36). Elle a été découverte en 1978 par Wieschaus E, et Nusslein-Vohlard C. lors d'études sur le développement embryonnaire de la *Drosophila melanogaster* (Nusslein-Vohlard and Wieschaus, 1980). Ces travaux sont à l'origine de la découverte de la famille des morphogènes Hedgehog qui comprend Desert Hedgehog (Dhh), Indian Hedgehog (Ihh) et Sonic Hedgehog, le plus étudié. Le morphogène Shh est largement exprimé dans le système nerveux central (SNC). La production de Shh est associée à une capacité de prolifération à la fois des cellules précurseurs des neurones endogènes pendant le développement embryonnaire et des cellules souches neurales dans la zone sous-ventriculaire adulte. Elle a un rôle diffus sur de nombreux organes au cours du développement. Cependant, les multiples effets de Shh sont très répandus mais encore incomplètement compris. Il a été mis en évidence que cette protéine exerce une influence sur le développement des neurones de la notochorde embryonnaire dans laquelle elle module l'induction des neurones moteurs et des cellules précurseurs d'oligodendrocytes (Capdevila and Johnson, 2000). Shh est également sécrétée par certaines cellules adultes telles que les neurones (He *et al*, 2013), les cellules épithéliales du tractus digestif (Yamanaka *et al*, 2011 ; Feng *et al*, 2012) ou les cellules dendritiques (Sacedon *et al*, 2005) et impliquée dans des processus de divisions cellulaires de l'hématopoïèse (Bhardwaj *et al*, 2001) et le développement de certains cancers en particulier gastro-intestinaux (Walter K. *et al*, 2010).

Shh est une glycoprotéine synthétisée sous forme d'un précurseur de 45kDa qui subit une auto-protéolyse produisant une protéine N-terminale de 19kDa (Shh-N) ayant toutes les

activités de signalisation et une protéine C-terminale de 25kDa possédant une activité protéasique à l'origine de l'autocatalyse (Figure 18).

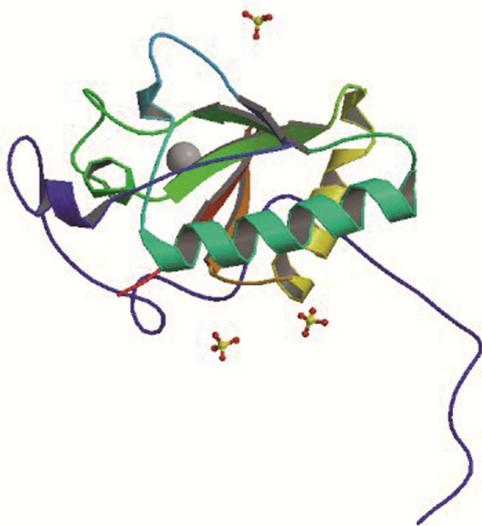


Figure 18 : Structure 3D de la protéine ShhN.

Image tirée de [9] et (Pepinski et al, 2000)..

L'addition post-transcriptionnelle d'un résidu cholestérol sur la partie C-terminale du fragment N-terminal permet l'association de Shh-N à la membrane plasmique. Ce fragment Shh-N subit ensuite une seconde modification lipidique par l'addition, sur le résidu cystéine amino-terminal, d'un acide palmitique grâce à une protéine, la palmitoylacétyl transférase (Hart) donnant ainsi naissance à la forme mature et active de Shh : Shh-Np. Ces modifications post-transcriptionnelles ont lieu dans le réticulum endoplasmique (Bambakidis and Onwuzulike, 2012) ; (Figure 19).

L'adjonction d'un acide gras et d'un résidu cholestérol après ces modifications post-transcriptionnelles lui procure une propriété lipophile lui permettant d'être positionnée dans un radeau lipidique de la membrane plasmique Elle peut également être sécrétée sous forme de monomère pour une action autocrine, ou d'oligomères associés à la protéine DISP pour une action paracrine. Cette dernière forme masque les résidus cholestérol, augmentant ainsi l'hydrosolubilité de Shh et favorisant son processus de diffusion paracrine. (Eaton, 2008 ; Vyas et al, 2008) ; (Figure 19).

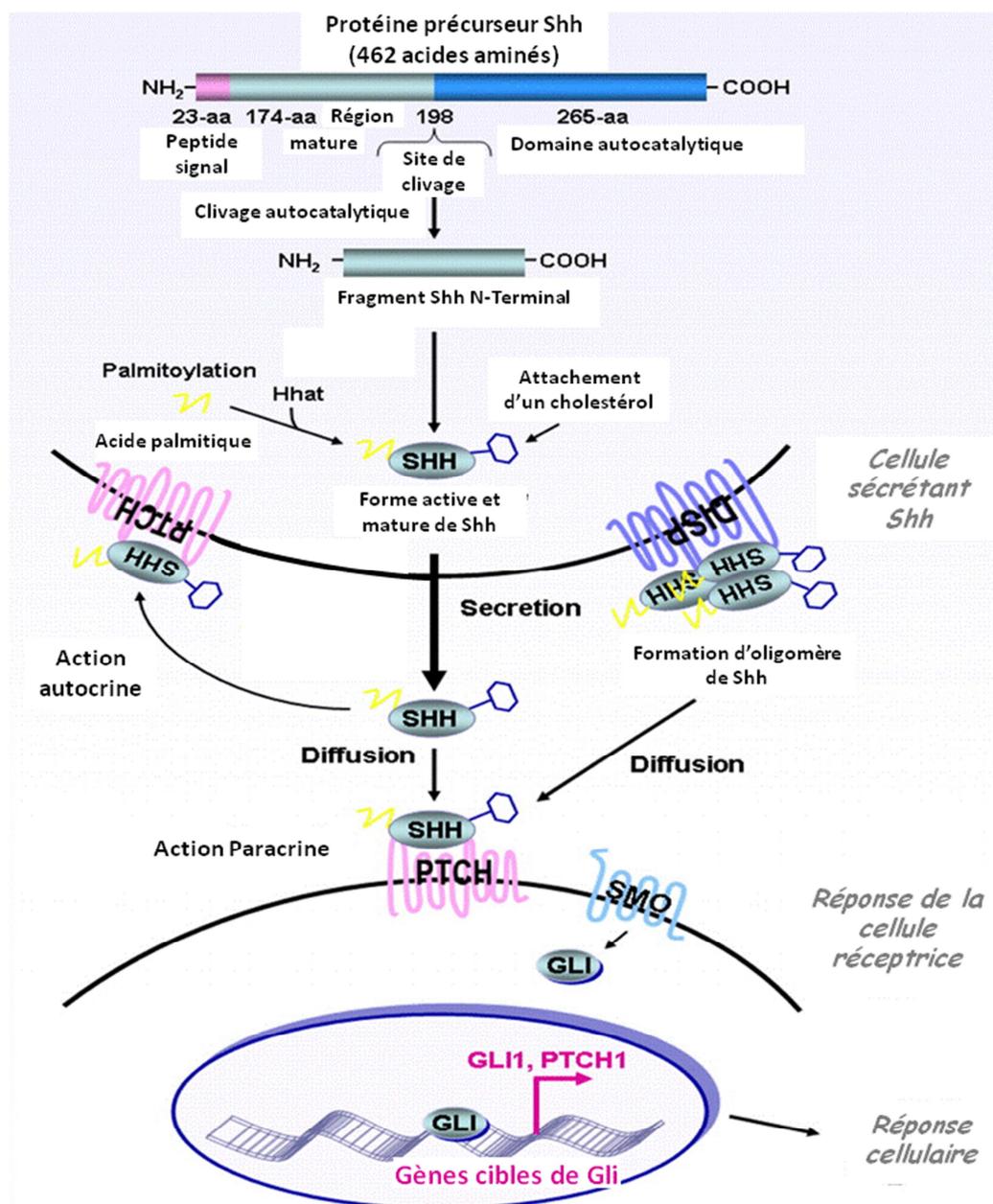


Figure 19 : Schéma récapitulatif de la synthèse, la sécrétion et la signalisation de la protéine Sonic Hedgehog.

La protéine Sonic Hedgehog (Shh) est synthétisée sous forme d'un précurseur de 45kDa qui subira une autocatalyse par sa partie C-terminale, aboutissant à une protéine de 19kDa. Lors de l'autolyse, un résidu cholestérol est ajouté en C-terminal de la partie N-terminale, puis un acide palmitique ajouté par la palmitoylacétyl transférase (Hhat) permettra d'obtenir une protéine fonctionnelle. Elle est sécrétée par diffusion ou après agrégation par la protéine DISP au niveau des radeaux lipidiques de la membrane plasmique. Au niveau de la cellule cible, Shh agit via 2 récepteurs : Ptch et Smo qui permettent l'activation et la translocation d'un facteur de transcription : Gli.

Figure réalisée à partir des travaux de (Mimeault and Batra, 2010).

III.C.2.b) Voie de signalisation Shh

La voie de signalisation Shh principalement décrite dans le cil primaire des cellules ciliées est complexe.

Elle implique deux récepteurs transmembranaires présents sur la cellule réceptrice du signal : Patched (Ptch), une protéine à douze domaines transmembranaires et Smoothened (Smo), une protéine à sept domaines transmembranaires présentant la typologie des récepteurs couplés aux protéines G. Shh se lie à Ptch tandis que Smo agit comme un transducteur du signal. Cette protéine Smo est ancrée dans la membrane des vésicules intracellulaires en l'absence d'activation par Shh (Burglin, 2008). En absence de signalisation, Ptch interagit avec Smo, l'inhibant et empêchant ainsi sa translocation au niveau de la membrane plasmique. Un complexe lié aux microtubules composé (chez les vertébrés) des protéines Kif7 (Kinesin Family member 7), Suppressor of Fused (SuFu) et de Gli recrute des kinases dont la protéine kinase A, maintenant ainsi le facteur Gli sous une forme réprimée et inhibant sa translocation dans le noyau. La liaison de Shh à Ptch lève l'inhibition de Ptch sur Smo qui se fixe à la membrane plasmique. La liaison du complexe lié aux microtubules via l'interaction de Kif7 avec la partie C-terminale de Smo va permettre la libération de Gli (Taipale *et al*, 2002 ; Chen and Jiang, 2013) ; (Figure 20).

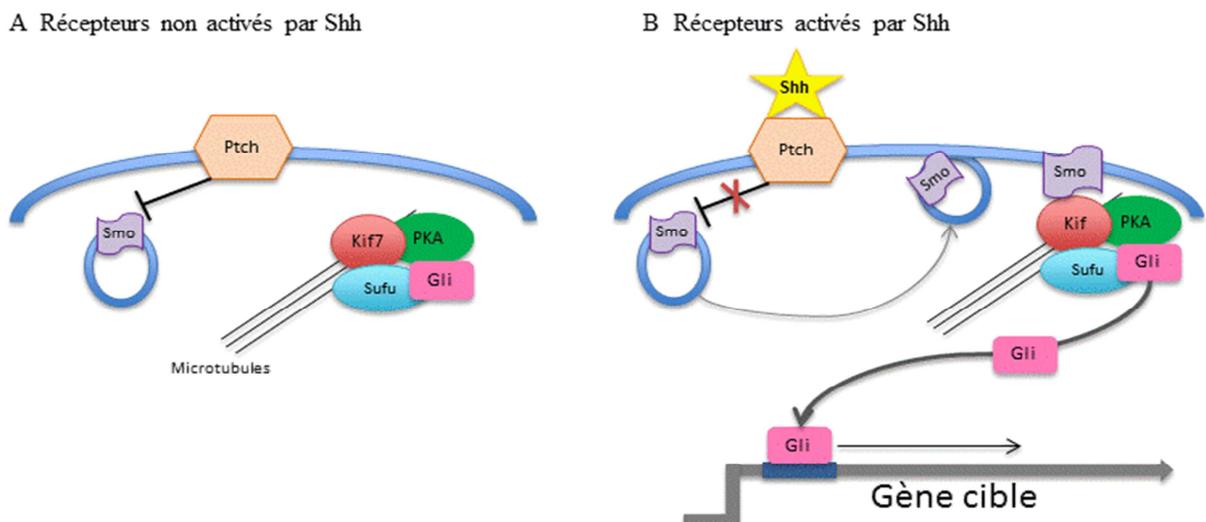


Figure 20 : Mode d'action des récepteurs de Shh.

Figure réalisée à partir des travaux de (Wilson and Chuang, 2010).

Les facteurs de transcription Gli au nombre de 3 (Gli 1-2-3) possèdent cinq domaines en doigt de zinc permettant leur liaison à l'ADN. Gli 1 et Gli 2 sont des activateurs transcriptionnels, tandis que Gli 3 est un répresseur (Koebernick and Pieler, 2002) ; (Figure 19-20).

Les gènes cibles de Shh ne sont actuellement pas encore tous connus mais certains ont été décrits comme étant impliqués dans :

- l'auto-activation des gènes Gli et Ptch (Katoh and Katoh, 2009)
- la régulation du cycle cellulaire comme les cyclines D1/2 et E (Katoh and Katoh, 2009)
- la survie cellulaire via l'activation de l'expression des facteurs anti-apoptotiques (Bcl2/CFLAR) (Kasper *et al*, 2006)
- la néoangiogenèse (VEGF α , ANG1) (Lee *et al*, 2007 ; Pola *et al*, 2001)

III.C.2.c) Intérêt de Shh pour la thérapie génique transitoire

Plusieurs arguments ont orienté le choix de Shh comme protéine d'intérêt pour son utilisation en thérapie génique transitoire dans le traitement du SCR.

Tout d'abord le caractère sécrété de la protéine Shh qui permet sa libération et sa diffusion par la cellule transfectée au niveau du site d'injection. De plus, Shh intervient dans de nombreux processus biologiques tel que l'embryogenèse, la différenciation des cellules souches hématopoïétiques, la régénération des cellules ostéblastiques (Hofmann *et al*, 2009 ; Dohle *et al*, 2010 ; Fan *et al*, 2013), et de manière plus spécifique au SCR, dans les processus de l'angiogenèse (Pola *et al*, 2001) et de la prolifération cellulaire (Parisi and Lin, 1998 ; Mimeault and Batra, 2010). Plusieurs travaux *in vitro* rapportent un effet pro-angiogénique indirect de Shh par induction de la sécrétion de VEGF α et d'ANG1 par les cellules endothéliales et mésenchymateuses. D'autres études *in vivo* révèlent la formation de néovaisseaux et le recrutement de cellules endothéliales (Pola *et al*, 2001 ; Spek *et al*, 2010 ; Podolska *et al*, 2013 ; Tang *et al* 2013 ; Yao *et al*, 2014).

Des travaux menés sur la régénération tissulaire ont également démontré un effet de Shh sur la prolifération des cellules épithéliales (Parisi and Lin, 1998) et sur la réparation du

tissu cutané par activation de la NO synthase qui elle-même favorise l'angiogenèse (Luo *et al*, 2009). Par ailleurs, Shh a été décrite comme impliquée dans la croissance et la morphogenèse du follicule pileux et joue un rôle crucial dans l'organisation des cellules du derme favorisant ainsi la réparation cutanée (Oro and Higgins, 2003). Les propriétés pro-angiogéniques de Shh en thérapie génique sur des modèles murins ont également montré une accélération de la cicatrisation de lésions cardiaques et musculaires (Kusano *et al*, 2005 ; Piccioni *et al*, 2013) et permettent ainsi d'envisager son utilisation afin d'optimiser le traitement du SCR (Donahue, 2006).

Enfin, les fibroblastes du derme, possédant des récepteurs Ptch et Smo, peuvent être une cible de Shh pour favoriser le remodelage de la matrice extracellulaire et la prolifération de ces cellules (Lee *et al*, 2007 ; Varjosalo and Taipale, 2008) impliquées dans la réparation cutanée.

Les traitements actuels ou envisagés du CRS par thérapie cellulaire ont fait l'objet d'une revue publiée (Annexe 2):

Advances in stem cell therapy; Specific application in the treatment of cutaneous radiation syndrome.

Riccobono Diane; François Sabine; Forcheron Fabien; Valente Marco; Drouet Michel.

OBJECTIFS de la THESE

OBJECTIFS DE LA THÈSE

Ce travail de thèse s'inscrit dans la recherche et l'optimisation de nouvelles approches thérapeutiques pour la prise en charge de patients atteints de syndrome cutané radio-induit.

Cette pathologie complexe, secondaire à une irradiation localisée à forte dose de la peau et des tissus sous cutanés présente de nombreux challenges thérapeutiques liés au délai d'apparition, à sa symptomatologie inflammatoire et extensive et à un défaut de revascularisation caractéristique ne permettant pas une évolution spontanée vers la cicatrisation pour les doses supérieures à 20 Gy.

Les progrès réalisés dans le domaine des cellules souches et de la thérapie cellulaire ont révolutionné le traitement du syndrome cutané radio-induit. Depuis le milieu des années 2000, l'association de la chirurgie guidée par dosimétrie et de l'injection de cellules souches isolées à partir de la moelle osseuse a contribué à une nette amélioration du traitement. Cette technique a permis d'éviter chez les patients traités à titre compassionnel une amputation du membre exposé et d'aboutir à une cicatrisation des lésions. Cette technique reste cependant perfectible notamment en raison des délais de production d'un greffon de taille clinique, ainsi que du prélèvement douloureux de moelle osseuse (tissu peu accessible), et nécessite une maîtrise parfaite des limites zone saine-zone irradiée pour prélever des cellules souches non/sous exposées.

Dans la première partie de notre travail nous avons choisi d'évaluer chez le miniporc l'efficacité thérapeutique de cellules souches allogéniques issues du tissu adipeux (ASC) comme alternative aux cellules souches fibroblastiques d'origine médullaire. Celles-ci, plus accessibles et plus abondantes que les BM-MSc, présentent également des propriétés pro-angiogéniques, immunomodulatrices et anti-apoptotiques. L'objectif de cette partie est de valider l'intérêt des ASC dans la prise en charge du syndrome cutané radio-induit dans le but de développer une stratégie fondée sur la constitution de banques cellulaires.

Dans la deuxième partie de ce travail, une stratégie innovante d'optimisation des ASC par thérapie génique transitoire a été mise au point en vue d'enrichir le secrétome des ASC. Elle se fonde sur la manipulation *ex vivo* des ASC au sein desquelles un plasmide codant pour une protéine d'intérêt est introduit par nucléofection. Dans cette étude, la protéine

Sonic Hedgehog a été choisie pour son implication dans la prolifération cellulaire et l'angiogenèse. Ces travaux ont évalué la faisabilité de cette stratégie thérapeutique *in vivo*.

Enfin, dans une troisième partie, les mécanismes d'action sous tendant l'effet biologique des ASC manipulés ou non ont été étudiés 1) *in vitro* sur des fibroblastes dermiques irradiés afin d'évaluer l'implication du sécrétome des cellules souches dans les processus biologiques clés du SCR et 2) *in vivo* chez la souris immunodéficiente.

PARTIE I

EVALUATION DES BANQUES DE CELLULES SOUCHES

PARTIE I : EVALUATION DES BANQUES DE CELLULES SOUCHES

I) EXPERIMENTATION *IN VIVO* SUR UN MODÈLE DE MINIPORC

Article 1: Application of adipocyte derived stem cells in treatment of cutaneous radiation syndrome.

Riccobono Diane; Forcheron Fabien; Scherthan Harry; Agay Diane; Vivier Mylène ; Ballester Bruno; Meineke Viktor; Drouet Michel. *Health Physics* 2012; Aug 103: 120-6

L'étude de l'effet des injections d'ASC allogéniques ainsi que l'évaluation de la faisabilité des banques de cellules souches ont été réalisées sur un modèle de syndrome cutané radio-induit chez le miniporc.

La peau est un organe complexe qui joue un rôle de barrière physique et qui représente 3% du poids du corps (Hopewell, 1990). Suite à une irradiation localisée, l'évolution clinique est influencée par les lésions des tissus sous-jacents tels que les muscles, les tissus nerveux et vasculaires. Les similitudes en termes d'histologie, de morphologie vasculaire et de renouvellement cellulaire entre les tissus cutanés humain et porcine (Vodicka *et al*, 2005 ; Mahl *et al*, 2006) font du miniporc un modèle d'étude pertinent du SCR (Agay *et al*, 2010).

Dans cette étude cinq animaux ont bénéficié de l'injection d'ASC allogéniques. Ces greffons étaient constitués d'un mélange de cellules issues de deux animaux de la cohorte non sélectionnés. L'évolution a été comparée à la cohorte historique d'animaux ayant reçu des cellules autologues ou des injections de PBS (Forcheron *et al*, 2012). L'exposition de la peau aux rayonnements ionisants a été effectuée selon la configuration d'irradiation mise au point précédemment au sein du laboratoire (Agay *et al*, 2010) : au total dix-huit miniporcs ont été irradiés localement par un faisceau gamma homogène et tangentiel au niveau lombaire (sur une zone de 3 cm par 5 cm) avec un irradiateur au Co⁶⁰ (débit de dose : 0,6 Gy/min ; IRDI 4000, Alstom, Levallois-Perret, France). La dosimétrie physique grâce à des dosimètres à poudre d'alumine a confirmé une dose en zone d'entrée et de sortie

respectivement de 50 Gy et 18 Gy (Cf. Figure 1, **Article 1**) ; (Comité d'éthique de l'IRBA : N°2008/24.0)

Un mois avant l'irradiation, une exérèse du tissu adipeux (TA) abdominal a été réalisée chirurgicalement. L'isolation et l'expansion des ASC du TA ont été effectuées selon le protocole décrit dans (Forcheron *et al*, 2012) et un phénotypage a été réalisé (Forcheron *et al*, 2012) en concordance avec les critères de l'ISCT (Dominici *et al*, 2006).

Un protocole d'injections précoces des ASC ($50 \cdot 10^6$ cellules par injection) autologues ou allogéniques a été réalisé sur ces animaux (Groupe témoin (injection de PBS), n=8, Groupe ASC autologues n=5 ; groupe ASC allogéniques n=5). Les injections d'ASC ont été réalisées localement en zone irradiée à raison de 50 points d'injection de $1 \cdot 10^6$ de cellules par point. Comme décrit dans la figure 21, ces injections ont été effectuées post-irradiation à 24 jours +/- 4 d'intervalle dont les deux premières, avant l'apparition des symptômes.

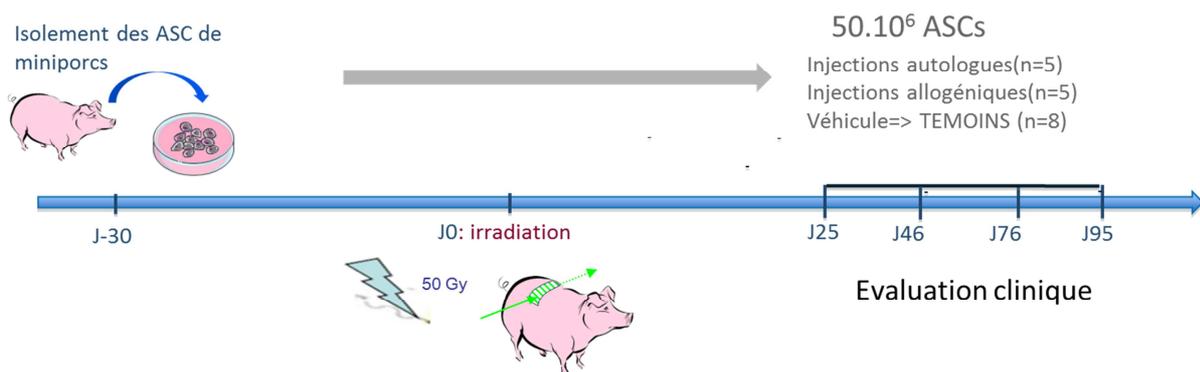


Figure 21 : Protocole de préparation et d'injection d'ASC dans un modèle miniporc de syndrome cutané radio-induit.

Les ASC ont été prélevées et mises en culture 1 mois avant l'irradiation locale des miniporcs à 50 Gy. Quatre injections de $50 \cdot 10^6$ ASC autologues, allogéniques ou de PBS ont été réalisées à J25, J46, J76, J95 post-irradiation.

Pour étudier l'évolution clinique des animaux, un score clinique a été élaboré. Le score initial a été arbitrairement fixé à dix. A l'apparition d'un symptôme, des points étaient soustraits et réajoutés à la disparition de celui-ci. Ce score prenait en compte les symptômes spécifiques du SCR : l'apparition d'un érythème, d'un œdème sous cutané, d'une

desquamation sèche et humide, d'une croûte ou d'une nécrose. L'évolution de la douleur, le comportement et la prise alimentaire était également pris en compte dans ce score clinique.

Cette étude préclinique a montré chez les animaux témoins (véhicule acellulaire : PBS 1X) une évolution similaire aux symptômes décrits chez l'Homme après une irradiation locale à forte dose (Hopewell, 1990). Vingt-quatre heures après irradiation, les animaux ont présenté un érythème associé à une hyperthermie cutanée transitoire non douloureuse. Jusqu'à sept semaines après irradiation, une persistance de l'intégralité des couches supérieures de l'épiderme a été observée révélant une évolution clinique tardive du SCR dans notre modèle. Dès la 8^{ème} semaine post-irradiation, une desquamation humide s'est développée, évoluant en quelques jours (57+/-2 jours post-irradiation) vers la formation d'une croûte en zone d'entrée. En zone de sortie, une tache pourpre, symptôme classiquement observé sur ce modèle de brûlure radiologique et correspondant à un trouble de la vascularisation locale, est apparue.

Le score clinique a significativement diminué de $4.4 \pm 2,3$ points ($p < 0,001$) entre la 7^{ème} et la 10^{ème} semaine suivant l'exposition. Une nécrose extensive à partir de la 13^{ème} semaine, associée à une douleur locale intense, partiellement soulagée par dérivés morphiniques, s'est développée à la fois au niveau des zones d'entrée et de sortie des rayonnements (score clinique : $2,5 \pm 1,6$). Le point final de l'étude, déterminé auprès du comité d'éthique comme une nécrose douloureuse résistante aux antalgiques morphiniques, a été atteint à la 17^{ème} semaine post-irradiation. Un score clinique final de $1,4 \pm 1,67$ a été calculé pour ces animaux témoins. (Cf. Figure 2, **Article 1**)

La comparaison de l'évolution clinique du SCR des animaux irradiés témoins versus irradiés autogreffés a permis de mettre en évidence une diminution significative du score clinique durant les quatre premières semaines post-irradiation (Cf Figure 2, **Article 1**). Quatre jours après la 1^{ère} greffe, le score clinique des animaux autogreffés et témoins était respectivement de $6,8 \pm 2,2$ et $9,1 \pm 1,3$. Cette différence s'explique cliniquement par l'apparition de douleurs post-greffe, soulagées par le traitement antalgique. Entre la 2^{ème} et la 3^{ème} greffe, il a également été observé la formation d'une croûte en zone d'entrée plus précocement chez les animaux greffés en comparaison du groupe témoin associée à une diminution du score clinique ($5,6 \pm 3,5$, $p < 0,049$ à la 7^{ème} semaine). Avant la 3^{ème} greffe, les scores cliniques des animaux témoins et des animaux greffés par des ASC autologues étaient identiques, mais dès la 11^{ème} semaine post irradiation une amélioration a été observée chez

les miniporcs autogreffés. Pour quatre de ces cinq miniporcs, à J130 ± 28 post-irradiation une cicatrisation complète de la lésion a été constatée. Celle-ci était associée à un arrêt complet du traitement antalgique pour deux des cinq animaux. Le score clinique final calculé chez les animaux irradiés recevant des greffes d'ASC autologues est de $5,8 \pm 3,19$. Les autogreffes itératives d'ASC locales après irradiation améliorent donc significativement le score clinique d'un facteur 4 ($p < 0.007$) par rapport aux animaux irradiés non greffés. Cette étude révèle un effet bénéfique du traitement par les ASC autologues sur le SCR (Cf. Figure 2, **Article 1**).

Au sein du groupe des animaux irradiés recevant des greffes d'ASC allogéniques, l'évolution clinique globale du SCR a présenté une similitude avec celle des animaux témoins (Cf. Figure 2, **Article 1**). Une détérioration clinique régulière a été observée jusqu'à la 14^{ème} semaine, associée à un score clinique similaire pour les deux groupes d'animaux jusqu'à la fin de l'étude ($p = 2,5$; NS). Les miniporcs irradiés allogreffés ont présenté comme les témoins une dépilation associée à la formation d'une croûte en zone d'entrée et un défaut de vascularisation en zone de sortie. Les lésions ont évolué vers une radionécrose persistante, aboutissant à un score final de 2,4. Ces symptômes étaient associés à une douleur intense, non soulagée par les dérivés morphiniques, qui a fixé le point final de l'étude entre J97 et J147 en fonction de l'état des miniporcs (Cf Figure 2, **Article 1**). Les allogreffes itératives d'ASC locales après irradiation ne limitent pas la progression du SCR, cependant aucun effet iatrogène n'a été constaté.

L'ensemble de ces travaux montre que, si l'injection d'ASC autologues favorise la cicatrisation, cet effet n'est pas retrouvé en contexte allogénique dans nos conditions expérimentales. Des travaux complémentaires devront être réalisés pour établir définitivement la pertinence de cette approche et l'intérêt de la constitution de banques pour le traitement du SCR.

Ce travail est décrit dans l'article qui suit :

Application of adipocyte derived stem cells in treatment of cutaneous radiation syndrome.

Riccobono Diane; Forcheron Fabien; Scherthan Harry; Agay Diane; Vivier Mylène ; Ballester Bruno ; Meineke Viktor; Drouet Michel.

Health Physics 2012; Aug 103: 120-6

APPLICATION OF ADIPOCYTE-DERIVED STEM CELLS IN TREATMENT OF CUTANEOUS RADIATION SYNDROME

Diane Riccobono,* Diane Agay,* Harry Scherthan,† Fabien Forcheron,* Mylène Vivier,*
Bruno Ballester,* Viktor Meineke,† and Michel Drouet*

INTRODUCTION

Abstract Cutaneous radiation syndrome caused by local high dose irradiation is characterized by delayed outcome and incomplete healing. Recent therapeutic management of accidentally irradiated burn patients has suggested the benefit of local cellular therapy using mesenchymal stem cell grafting. According to the proposed strategy of early treatment, large amounts of stem cells would be necessary in the days following exposure and hospitalization, which would require allogeneic stem cells banking. In this context, the authors compared the benefit of local autologous and allogeneic adipocyte-derived stem cell injection in a large animal model. Minipigs were locally irradiated using a ^{60}Co gamma source at a dose of 50 Gy and divided into three groups. Two groups were grafted with autologous ($n = 5$) or allogeneic ($n = 5$) adipocyte-derived stem cells four times after the radiation exposure, whereas the control group received the vehicle without cells ($n = 8$). A clinical score was elaborated to compare the efficiency of the three treatments. All controls exhibited local inflammatory injuries leading to a persistent painful necrosis, thus mimicking the clinical evolution in human victims. In the autologous adipocyte-derived stem cells group, skin healing without necrosis or uncontrollable pain was observed. In contrast, the clinical outcome was not significantly different in the adipocyte-derived stem cell allogeneic group when compared with controls. This study suggests that autologous adipocyte-derived stem cell grafting improves cutaneous radiation syndrome wound healing, whereas allogeneic adipocyte derived stem cells do not. Further studies will establish whether manipulation of allogeneic stem cells will improve their therapeutic potential.

Health Phys. 103(2):120Y126; 2012

Key words: radiation effects; radiation, gamma; repair, cellular; laboratory animals

THE SKIN is a complex radiosensitive organ that is frequently irradiated in an accidental or therapeutic context (Hopewell 1990; Peter 1996). The wound evolution in ionizing radiation (IR) exposed skin results from its physical barrier role, differentiation program, and immunologic and thermoregulation functions, and it is unique for this tissue. Exposure to a high irradiation dose (9 20Gy) induces the Cutaneous Radiation Syndrome (CRS). This syndrome is clinically characterized by a delayed clinical outcome and diagnosis. CRS is characterized by an early erythema followed by hair loss and dry, then wet desquamation several weeks later. It is associated with recurrent and extensive inflammatory processes leading to irreversible necrotic waves and followed by a poorly spontaneous revascularization and incomplete healing (Lefaix and Delanian 2005; Drouet et al. 2011). CRS treatment remains complex: Following the evaluation of irradiated area extension and excision of the exposed necrotic skin and subcutaneous tissues, a transient skin flap is associated with autologous skin graft (Lefaix and Delanian 2005; Agay et al. 2010).

Mesenchymal stem cells (MSCs) may represent a new therapeutic approach in this context, as bone marrow-MSCs (BM-MSCs) have been shown to enhance wound healing (Wu et al. 2007). However, the mechanisms involved are still poorly understood (Chen et al. 2008). Experiments from different groups indicate that BM-MSCs secrete numerous cytokines and chemokines well known to be important to stimulate and achieve wound healing, such as vascular endothelial growth factor alpha (VEGF alpha), epidermal growth factor-alpha (EGF alpha), insulin growth factor-1 (IGF1), keratinocyte growth factor (KGF), angiopoietin-1 (Ang1), stromal derived factor-1 (SDF1), macrophage inflammatory protein-1 alpha and beta (MIP1 alpha and beta), and erythropoietin in greater amounts than dermal fibroblasts (Estrada et al. 2009). Based on these experiments, local injection of BM-MSCs and skin surgery have been performed in a few cases of accidental CRS (Lataillade et al. 2007). Moreover,

*Département de Radiobiologie, IRBA-antenne La Tronche-CRSSA, 24 Avenue des Maquis du Grésivaudan, 38700 La Tronche, France; †Institut für Radiobiologie der Bundeswehr, Neuherbergstraße 11, 80937 München, Germany.

The authors declare no conflict of interest.

For correspondence contact: Diane Riccobono, Département de Radiobiologie, IRBA-antenne La Tronche-CRSSA, 24 Avenue des Maquis du Grésivaudan, 38700 La Tronche, France, or email at diane.riccobono@gmail.com.

(Manuscript accepted 3 November 2011).

0017-9078/12/0

Copyright © 2012 Health Physics Society

DOI: 10.1097/HP.0b013e318240595b

APPLICATION OF ADIPOCYTE-DERIVED STEM CELLS IN TREATMENT OF CUTANEOUS RADIATION SYNDROME

Diane Riccobono*, Diane Agay*, Harry Scherthan[§], Fabien Forcheron*, Mylène Vivier*, Bruno Ballester*, Viktor Meineke[§], Michel Drouet*.

*: Département de Radiobiologie, IRBA-antenne La Tronche-CRSSA, 24 Avenue des Maquis du Grésivaudan, 38702 La Tronche, France.

§: Institut für Radiobiologie der Bundeswehr, Neuherbergstraße 11, 80937 München, Germany.

Corresponding author: Diane Riccobono: Département de Radiobiologie, IRBA-antenne La Tronche-CRSSA, 24 Avenue des Maquis du Grésivaudan, 38702 La Tronche, France.

Email: diane.riccobono@gmail.com, Tel: +33476636857; Fax: +33476636922

E-mails for the other authors:

Diane Agay*: diane.agay@crssa.net

Fabien Forcheron*: fforcheron@yahoo.fr

Bruno Ballester*: brunoballester@sfr.fr

Michel Drouet*: micheldrouet@crssa.net

Harry Schertan[§]: schert@web.de

Mylène Vivier*: vivier.crssa@yahoo.fr

Viktor Meineke[§]: Viktor.Meineke@uni-ulm.de

Acknowledgements: This work was supported by a grant from Direction Générale de l'Armement (Paris, France). We thank H. Chaussard for his technical assistance.

Keywords: Cutaneous Radiation Syndrome, Adipocyte Derived Stem Cells, Minipigs, Wound healing.

ABSTRACT

Cutaneous radiation syndrome caused by local high dose irradiation is characterized by delayed outcome and incomplete healing. Recent therapeutic management of accidentally irradiated burn patients has suggested the benefit of local cellular therapy using mesenchymal stem cells grafting. According to the proposed strategy of early treatment, large amounts of stem cells would be necessary in the days following exposure and hospitalization, which would require allogeneic stem cells banking. In this context, we compared in a large animal model the benefit of local autologous and allogeneic adipocyte-derived stem cell injection.

Minipigs were locally irradiated using a ^{60}Co gamma source at the dose of 50 Gy and divided in three groups. Two groups were grafted with autologous (n=5) or allogeneic (n=5) adipocyte derived stem cells four times after the radiation exposure whereas the control group received the vehicle without cells (n=8). A clinical score was elaborated to compare the efficiency of the three treatments.

All controls exhibited local inflammatory injuries leading to a persistent painful necrosis thus mimicking the clinical evolution in human victims. In the autologous adipocyte-derived stem cells group, skin healing without necrosis or uncontrollable pain was observed. In contrast, the clinical outcome was not significantly different in the adipocyte-derived stem cell allogeneic group when compared with controls.

This study suggests that autologous adipocyte-derived stem cell grafting improves cutaneous radiation syndrome wound healing whereas allogeneic adipocyte derived stem cells do not. Further studies will establish whether manipulation of allogeneic stem cells will improve their therapeutic potential.

INTRODUCTION

The skin is a complex radiosensitive organ that is frequently irradiated in accidental or therapeutic context (Hopewell 1990; Peter 1996). The wound evolution in ionizing radiation (IR) exposed skin results from its physical barrier role, differentiation program and its immunologic and thermoregulation functions, and is unique for this tissue. Exposure to a high irradiation dose (> 20Gy) induces the Cutaneous Radiation Syndrome (CRS). This syndrome is clinically characterised by a delayed clinical outcome and diagnosis. CRS is characterized by an early erythema, followed by hair loss, dry, then wet desquamation several weeks later. It is associated with recurrent and extensive inflammatory processes leading to irreversible necrotic waves and followed by a poorly spontaneous revascularization and an incomplete healing (Lefaix and Delanian 2005; Drouet et al. 2011). CRS treatment remains complex: following the evaluation of irradiated area extension and excision of the exposed necrotic skin and subcutaneous tissues, a transient skin flap is associated with autologous skin graft (Lefaix and Delanian 2005; Agay et al. 2010).

Mesenchymal Stem Cells (MSCs) may represent a new therapeutic approach in this context as Bone Marrow-MSCs (BM-MSCs) have been shown to enhance wound healing (Wu et al. 2007). However, the mechanisms involved are still poorly understood (Chen et al. 2008) but experiments from different groups indicate that BM-MSCs secrete numerous cytokines and chemokines well known to be important to stimulate and achieve wound healing, such as Vascular Endothelial Growth Factor alpha (VEGF alpha), Epidermal Growth Factor-alpha (EGF alpha), Insulin Growth Factor-1 (IGF1), Keratinocyte Growth Factor (KGF), Angiopoietin-1 (Ang1), Stromal derived factor-1 (SDF1), Macrophage Inflammatory Protein-1 alpha and beta (MIP1 alpha and beta), and erythropoietin in greater amounts than dermal fibroblasts (Estrada et al. 2009). Based on these experiments, BM-MSCs local injection and skin surgery have performed in a few cases of accidental CRS (Lataillade et al. 2007). Moreover, Adipocyte-derived Stem Cells (ASCs) located in adult fat tissues may represent an alternative multipotent stem cell source in adult. ASCs have an equal potential as BM-MSCs to differentiate into cells and tissues of mesodermal origin, such as adipocytes, cartilage, bone, and skeletal muscle (Schaffler and Buchler 2007). As BM-MSCs, ASCs secrete angiogenesis-related cytokines, such as VEGF alpha and anti-apoptotic factors, which might be suitable for regenerative cell therapy (Rehman et al. 2004;

Nakagami et al. 2006). Moreover, the easiness of access (iterative if required) to subcutaneous adipose tissue and the simplicity of isolation procedures provide a clear advantage (Gimble et al. 2007).

Nowadays, the autologous MSCs strategy for CRS treatment is hampered by the delay induced by cell culture, which is aggravated by the fact that CRS diagnosis is frequently delayed many weeks after accidental IR exposure. In this context the development of allogeneic MSCs cell banks may represent an interesting approach and may be required to develop an early cell therapy strategy; indeed stem cell collection from unirradiated area early after accidental irradiation in order to rapidly produce a graft of clinical size appears more problematic than harvesting cells in radiotherapy patients (Akita et al. 2010).

Our group has recently proposed a new minipig model of stem cell therapy to treat CRS (Agay et al. 2010). Using this model, we are now evaluating the therapeutic potential of allogeneic ASCs. We present here the first results of clinical score testing. Globally the animals grafted with allogeneic ASCs exhibited a very low clinical score when compared with autologously grafted animals, which suggests the limit of allogeneic multipotent stem cells use and banking strategy.

MATERIALS AND METHODS

The animal trials of this study were approved by the French Army Animal Ethics Committee (N°2008/24.0). All minipigs were treated in compliance with the European legislation related to animal care and protection in order to minimize pain for the animals. Eighteen female Göttingen Minipigs® weighing about 20 kg were purchased from Ellegaard (Dalmoose, Denmark) and housed in individual pen (21±1°C, 55% relative humidity, 12h/12h light-dark schedule) where they received solid food twice a day and had access to water ad libitum.

Cell cultures

ASCs were isolated from subcutaneous fat tissues harvested on minipigs one month before irradiation. After mincing with scalpels and incubation with collagenase II, fat tissue was centrifuged and isolated cells were seeded in 150 cm² culture flask. Cells were cultured in minimum essential medium (MEM α) (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, New Mexico, US) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) (HyClone part of Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, US) and basic fibroblast growth factor (2ng.mL⁻¹) at 37°C in air with 5% CO₂ during six weeks (two or three passages [P]). P2/P3 cells were considered as a pure population of ASCs. Before freezing ASCs were characterized using flow cytometry (BD LSRII, BD Biosciences, Pont de Claix, France) and were defined as CD90⁺, CD44⁺, CD45⁻ and CD31⁻ cells; multipotency was controlled using differentiation assays. For cell storage, ASCs were freezed in Iscove Modified Dulbecco's Medium (IMDM: 15% FCS and 10% DMSO) according to a multi-step protocol (1h at -20°C, overnight at -80°C then store in liquid nitrogen). Cells were thawed at 37°C before spinning, in 30 mL of IMDM (30% FCS), at 180g during 7 min. Before each graft, ASCs viability was assessed by blue trypan coloration. The viability of injected cells was 86.9% ± 4.8%.

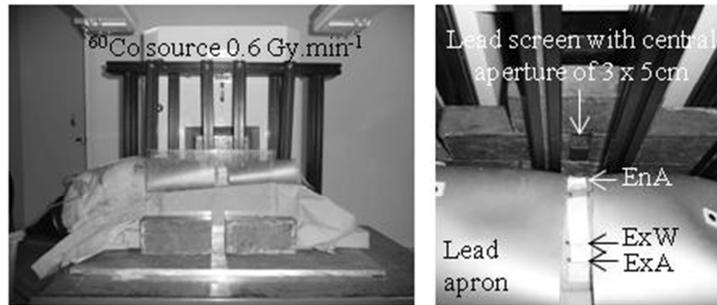
Experimental irradiation

Minipigs were irradiated as previously described (Agay et al. 2010). Briefly, after sedation (azaperone, 50mg.kg⁻¹ intramuscularly) and fixed anaesthesia (tiletamine and zolazepam, 6mg.kg⁻¹ intramuscularly), animals were kept under volatile anaesthesia (1.5% isoflurane in

oxygen) for irradiation. The skin exposure was realized orthogonally to a horizontal and homogeneous gamma beam (^{60}Co source IRDI 4000; Alstom, Levallois-Perret, France), to reach a dose of $50.6 \pm 4.1\text{Gy}$ at the surface of the skin of the entry area, controlled by thermoluminescent dosimeters with alumina powder, with a dose rate of $0.6\text{Gy}\cdot\text{min}^{-1}$ (Fig. 1). Lead screens were used to limit the radiation field to the lumbar cutaneous and muscular area and to prevent injury of vital abdominal organs.

Figure 1: Outline of the experimental irradiation scheme.

Localization of dosimeters	Code	Dose in the air
Entry area	EnA	$50.6\text{Gy} (\pm 4.1\text{Gy})$
Area of wound outcome in exit side	ExW	$19.6\text{Gy} (\pm 1.9\text{Gy})$
Exit area	ExA	$14.4\text{Gy} (\pm 2.1\text{Gy})$



ASCs engraftment in irradiated minipigs

After local gamma exposure, the eighteen minipigs were randomly divided in three groups: autologous ASC-grafted minipigs (group 1; n=5), allogeneic ASC-grafted minipigs (group 2; n=5) and control phosphate buffer saline (PBS) injected animals (group 3; n=8). All minipigs were injected via intradermal route, four times during a three months period following irradiation (at the border or inside the irradiated area; entrance and exit zones). The dates of injection were planned on days 25, 46 (before the onset of clinical symptoms), 76 and 95 after irradiation, to allow grafting of a total of about 200×10^6 ASCs [50×10^6 ASCs each time corresponding to 32×10^6 ASCs in the entry area (1×10^6 ASCs every cm^2) and to 18×10^6 ASCs evenly distributed in the less irradiated exit area]. Each allogeneic ASC sample was a mix from two other animals.

Clinical follow-up

During the follow-up period, the minipigs received a clinical observation three times a week in order to establish a clinical score including all pathological signs and pain evaluation. The initial score of healthy skin was 10, and a negative or a positive point was recorded for each clinical sign. A negative point was recorded for each sign as erythema, subcutaneous oedema, induration, formation of a purple spot corresponding to circulatory trouble, dry skin desquamation, wet peeling, partial or complete crust over the irradiated surface (from -1 to -3 points according to the spread), signs of necrosis (-2 points). To establish whether or not analgesics were needed, a veterinary examination was performed every day with evaluation of the overall condition of the animal based on drink and food intakes and behaviour, on local examination and palpation of the lesions and on assessment of analgesic treatment efficiency. Additive negative points were local sensitivity, spontaneous pain without contact solicitation, pain resistance to major analgesics (Fentanyl 50 µg.h⁻¹, Durogesic™ 8.4 mg.21 cm⁻², Janssen-Cilag, France). A positive point was recorded for the vanishing of previously described signs, for pain relief, for particularly well being, and for the complete healing of radio-induced burn injuries with re-epidermalization of the wound surface. Ultimately, the final point of the experiment was defined as extensive skin necrosis or complete healing, and then the minipigs were euthanized.

Statistical analysis

Due to ethical guidelines recommendation for painful experimental researches performed in higher mammals' models, the cohorts were limited to the minimal size compatible with non parametric statistical analysis. For the clinical study, the three animal groups were compared two to two using the non parametric Mann-Whitney rank sum test (Sigmastat Software). In each group, the comparisons to the initial value were performed using a Wilcoxon signed rank test for paired samples analysis. A *p* value <0.05 was considered significant.

RESULTS

Clinical evolution in controls

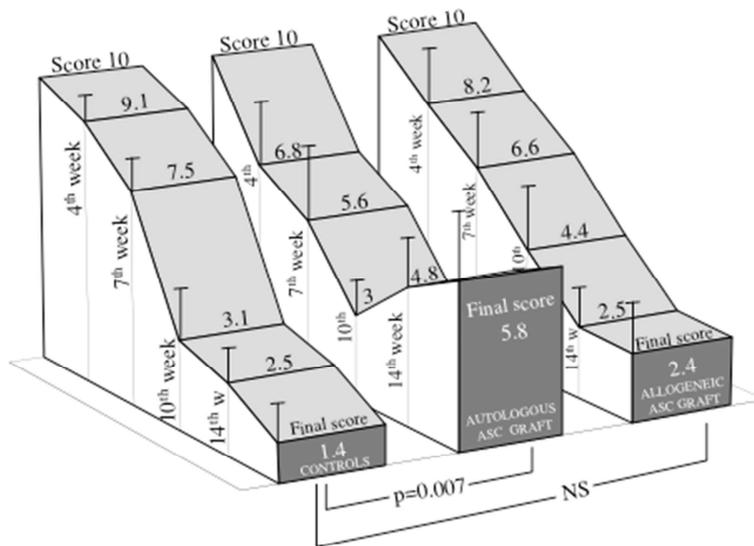
As expected from the literature, all the controls exhibit a similar evolution, typical of the CRS (Archambeau et al. 1984; Hopewell 1990). A superficial skin hyperthermia associated with a transient reddening of the exposed area appeared as soon as the day after irradiation. The clinical evolution in the group was slow during the first four weeks with a clinical score decreasing from 10 to 9.1 ± 0.99 ($p=0.41$) one week after the first PBS-treatment on day 25. Six weeks after exposure a progressive hair loss was noticed, leading to a complete alopecia within 15 days. On about day 50, one week after the second PBS-treatment, the clinical score decreased to 7.5 ± 1.4 ($p=0.002$): a cold purple spot due to vascular failure appeared in the exit area. At the same time an extensive centrifugal moist skin desquamation developed over the entry area, resulting in a thick scab few days later. Between the 7th and 10th week post irradiation, the clinical score strongly decreased to 3.1 ± 2.3 ($p<0.001$) due to a worsening of the initial symptoms. Finally, the skin wounds progressively display extensive skin necrosis from day 91 onwards (clinical score 2.5 ± 1.6 , $p<0.001$), in both entry and exit area. These clinical symptoms were associated with local intensive pain that required morphine-based products. This evolution led to a final clinical score of 1.4 ± 1.67 ($p<0.001$) and determined the end-point of the study on day 119 to 124, depending on the minipigs state (Fig 2).

Autologous ASC-grafting enhanced clinical skin repair

In all grafted minipigs, each ASC injection in the irradiated area induced a transient and painful localized inflammation for several days, restricted to the grafted area, and this reaction was more severe than what we previously observed after BM-MSCs injections (Agay et al. 2010). Due to the graft-induced inflammation, the decrease of the clinical score was faster in the autologous ASC-grafted minipigs than in controls during the first four weeks, with a clinical score reaching 6.8 one week after the first treatment versus 9.1 in controls. Moreover, this score was even further reduced after the second graft (5.6 ± 3.5 , $p=0.049$) due to the development of thin scab lesions on the entry area, which appeared significantly earlier than in controls (day 42 ± 6 versus day 70 ± 15 , $p=0.003$). In the exit area, the cold purple wound developed at the same time than in non-grafted controls. The

radio-induced wounds also required an earlier analgesic treatment in autologous grafted animals than in controls (day 81 versus day 89). However the clinical score calculated just after the third treatment was similar in autologous ASC-grafted minipigs and in controls. After this 10th week post irradiation, a real difference was noted between the evolution of controls and autologous ASC-grafted pigs. Wound healing was observed in four out of five ASC-grafted animals at days 130 ±28 (range days 106 to 160). Healing was complete in two pigs, while it never occurred in controls, and persisted for more than 18 months post exposure for one pig during long term follow up. In addition, the analgesic treatment could be dismissed after 6 weeks in one of these two animals and was not required at all in the other one. In the end, the final clinical score of autologous ASC-grafted animals was significantly improved compare to the control group (5.8±3.19 and 1.4±1.68, respectively; p=0.007) (Fig 2).

Figure 2: Evolution of the clinical score after irradiation in ASC grafted animals and non grafted controls. The scores calculated as explained in Materials and Methods are shown as mean and SEM.



PBS-treated control minipig (day 110)



Autologous ASC-grafted minipig (day 134)



Allogeneic ASC-grafted minipig (day 133)

Clinical evolution in allogeneic ASC-grafted animal

In the allogeneic ASC engraftment group a regular clinical deterioration was observed until the 14th week after irradiation, and the clinical score after the last treatment was also the same (2.5, non significant difference versus controls), reaching 2.4 at the end of the study ($p=0.002$ versus initial score of 10). Locally, the evolution of skin wound was very similar to the control group, and allogeneic ASC-grafted pigs likewise developed a persistent necrosis on the entry area at the end of the study, which was associated with an intensive pain. Allogeneic ASC engraftment did not significantly improve wound healing after local irradiation compared to non-grafted controls. This clinical evolution led to a final score of 2.4 and determined the end-point of the study on day 97 to 147, depending on the minipig's state (Fig 2).

DISCUSSION

For CRS support, ASC-grafting may represent a new strategy, because adipose-derived stem cells can be very easily and with little impact harvested from patients. ASCs secrete many paracrine factors such as pro-angiogenic and anti-apoptotic factors (Rehman et al. 2004; Ebrahimian et al. 2009) contributing to skin regeneration (Zuk 2010). Furthermore, autologous ASCs have been shown to favour wound healing in a mouse model of radiation burn (Ebrahimian et al. 2009). Using a minipig model, which is close to human with respect to skin histology and vascular morphology of the dermis (Van den Aardweg et al. 1990; Swindle and Smith 1998; Vodicka et al. 2005; Mahl et al. 2006), our group is currently evaluating the therapeutic potential of allogeneic ASCs in comparison with autologous grafts.

Here, we reported that autologous ASCs improved healing of radiation wounds, since severe necrosis that characterized the irreversible final state in the PBS control group was not observed. A transient increase of inflammation during local ASCs injection was observed and may be related to ASCs properties or to the early injection schedule. However, the local transient inflammation did not appear to be detrimental as the clinical

scoring showed both an ultimate improvement of skin repair and pain decrease. The therapeutic efficacy of stem cells transplantation is reflecting observations from BM-MSCs that have been demonstrated to favour skin repair through mechanisms of differentiation and/or release of paracrine factors (Wu et al. 2007).

Nevertheless, in this model, ASCs were harvested one month before irradiation in order to be able to graft cells before day 30. Thus, we tested the efficacy of autologous ASCs not exposed or modified by radio-induced systemic reactions. However, following accidental irradiations, ASCs would be harvested after the radiological exposure, preferable from non-exposed or low dose exposed regions. In practical this would raise difficulties as after accidental exposure local dosimetry is complex and specification of underexposed areas remains imperfect. Therefore preventive stem cells banking could represent a valuable strategy for nuclear power plant workers for example. However it can be pointed out that strategies of autologous stem cell banking are still highly controversial (Fukushima recent accident). So, in one hand, cell culture protocols should be optimized to graft auto-ASCs as soon as possible after an accidental exposure (Akita et al. 2010). On the other hand, early grafting in the days following irradiation could be highly efficient, which would require large amounts of ASCs, only feasible in an allogeneic context. In case of mass casualties, allogeneic stem cells grafting represents a realistic strategy which would avoid the pitfalls of a large autologous stem cell harvest in a hurry. This way, very precocious ASCs injections from cell banks could allow a prompt treatment of Acute Radiation Syndrome, especially CRS. Provided that experimental studies are positive, the early grafting of such cells could avoid the deleterious evolution of irradiated tissues towards inflammation and necrosis, while awaiting the autologous grafts production. Moreover, in the worst cases in which localized exposure is associated with a heterogeneous irradiation pattern precluding ASCs collection from unirradiated territories, the allograft approach would be the only feasible. Interestingly, previous freezing studies have shown that BM-MSC senescence appeared earlier than for ASCs so that safety concern reduces the passage numbers for MSCs when compared with ASCs (Vidal et al. 2011).

In this study, we compared the respective benefit of allogeneic and autologous ASC grafting in our minipig model. Clinical score after allogeneic ASC-grafting decreased constantly and ultimate evolution did not differ from PBS-treated animals with irreversible

necrosis accounting for similar clinical score. These preliminary results differ from those of other studies testing MSCs suitability for muscle or bone repair. This discrepancy could be related to the stem cell source or, alternatively, to the irradiation context. Indeed, MSCs are immunologically characterised by the lack of HLA II expression (Cui et al. 2007) and have been shown to reduce T-cell activation and pro-inflammatory cytokine production through prostaglandin E2 secretion (Najar et al. 2010; Yanez et al. 2010). These properties have been used in experiments of allogeneic MSC engraftment after injuries in cardiac muscle (Vassalli and Moccetti 2011), in skeletal muscles (Gimble et al. 2011) and in bone (Zhu et al. 2011), highlighting the absence of immune rejection and the graft efficacy.

The reasons why allogeneic ASCs failed here to significantly improve wound healing when compared with autologous ASCs is unclear. Based on their well-established low immunogenicity and at least transient engraftment capacity in other tissues, some effects were expected. The graft schedule may have not been optimal and treatments from the first week will be tested in the future. Alternatively higher amounts of allogeneic cells may be required and grafts $>200 \times 10^6$ cells will also be evaluated. Globally as MSCs wound healing capacity is suspected to be strongly related to immune cell mitigation, the paracrine activity of the two respective cell populations need to be compared in term of inflammation markers and transcriptome profile in skin and blood.

CONCLUSIONS

Our group has recently reported the benefit of local iterative injections of autologous MSCs to favour wound healing and mitigate CRS in a localised irradiation minipig model (Agay et al 2010). These experiments, performed in the same model, completed these results and showed the real benefit, in CRS healing, of the iterative graft of autologous ASCs. These stem cells, more abundant and easier to harvest than BM-MSCs, may represent useful therapeutic tools in the future. Moreover the banking of allogeneic ASCs (especially to cope with mass casualties scenario) has been discussed for some years by experts. In particular such a strategy would be very useful to treat patients exhibiting heterogeneous irradiation patterns. However experimental data are still lacking to demonstrate the therapeutic efficacy of allogeneic cells. In clinic only autologous cells have

been used yet to our knowledge in accidental irradiations. Here, although further studies are required to definitely state, we show that autologous and allogeneic ASCs did not exhibit similar wound healing potential. Meanwhile the MSCs/ASCs engraftment processes and mechanisms of action have to be more importantly documented including links with angiogenesis, cell proliferation or extra cellular matrix deposition. As MSCs have been reported to enhance angiogenesis of muscle cells and growth factors production (Lee 2010), the capacity of MSCs to mitigate radiation-induced fibrosis and rhabdomyolysis should be explored. These studies are necessary to optimize graft efficacy which could be obtained in the future via ex vivo manipulation of MSCs. In particular, the improvement of the homing capacity and the enrichment of the secretome i.e. transient gene therapy, represent promising perspectives.

REFERENCES

Agay D, Scherthan H, Forcheron F, Grenier N, Herodin F, Meineke V, Drouet M. Multipotent mesenchymal stem cell grafting to treat cutaneous radiation syndrome: development of a new minipig model. *Exp Hematol* 38: 945-956; 2010.

Akita S, Akino K, Hirano A, Ohtsuru A, Yamashita S. Noncultured autologous adipose-derived stem cells therapy for chronic radiation injury. *Stem Cells Int* 2010: ID532704; 2010.

Archambeau JO, Ines A, Fajardo LF. Response of swine skin microvasculature to acute single exposures of X rays: quantification of endothelial changes. *Radiat Res* 98: 37-51; 1984.

Chen L, Tredget EE, Wu PY, Wu Y. Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. *PLoS One* 3: e1886; 2008.

Cui L, Yin S, Liu W, Li N, Zhang W, Cao Y. Expanded adipose-derived stem cells suppress mixed lymphocyte reaction by secretion of prostaglandin E2. *Tissue Eng* 13: 1185-1195; 2007.

Drouet M, Schertan H, Meineke V, Agay D. Radiation burns and mesenchymal stem cell therapy. In: Hayat MA, Springer eds. *Stem cells and cancer stem cells: therapeutic applications in disease and injury*. 2011. In press.

Ebrahimian TG, Pouzoulet F, Squiban C, Buard V, Andre M, Cousin B, Gourmelon P, Benderitter M, Casteilla L, Tamarat R. Cell therapy based on adipose tissue-derived stromal cells promotes physiological and pathological wound healing. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29: 503-510; 2009.

Estrada R, Li N, Sarojini H, An J, Lee MJ, Wang E. Secretome from mesenchymal stem cells induces angiogenesis via Cyr61. *J Cell Physiol* 219: 563-571; 2009.

Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res* 100: 1249-1260; 2007.

Gimble JM, Grayson W, Guilak F, Lopez MJ, Vunjak-Novakovic G. Adipose tissue as a stem cell source for musculoskeletal regeneration. *Front Biosci (Schol Ed)* 3: 69-81; 2011.

Hopewell JW. The skin: its structure and response to ionizing radiation. *Int J Radiat Biol* 57: 751-773; 1990.

Lataillade JJ, Doucet C, Bey E, Carsin H, Clairand I, Bottolier-Depois JF, Chapel A, Ernoud I, Gourven M, Boutin L, Hayden A, Carcamo C, Buglova E, Joussemet M, De Revel T, Gourmelon P. New approach to radiation burn treatment by dosimetry-guided surgery combined with autologous mesenchymal stem cell therapy. *Regen Med* 2: 785-794; 2007.

Lee T. Host tissue response in stem cell therapy. *World J Stem Cells* 2: 61-66; 2010.

Lefaix JL, Delanian S. Le syndrome cutané radio-induit. In: De Revel T, Gourmelon P, Vidal D, eds. *Nuclear, Radiobiological, Biological, Chemical – terrorist threat and medical approach*. 1st ed. Montrouge: John Libbey Eurotext; 2005: 87-95.

Mahl JA, Vogel BE, Court M, Kolopp M, Roman D, Nogués V. The minipig in dermatotoxicology: methods and challenges. *Exp Toxicol Pathol* 57(5-6): 341-345; 2006.

Najar M, Raicevic G, Boufker HI, Fayyad Kazan H, De Bruyn C, Meuleman N, Bron D, Tougouz M, Lagneaux L. Mesenchymal stromal cells use PGE2 to modulate activation and proliferation of lymphocyte subsets: Combined comparison of adipose tissue, Wharton's Jelly and bone marrow sources. *Cell Immunol* 264: 171-179; 2010.

Nakagami H, Morishita R, Maeda K, Kikuchi Y, Ogihara T, Kaneda Y. Adipose tissue-derived stromal cells as a novel option for regenerative cell therapy. *J Atheroscler Thromb* 13: 77-81; 2006.

Peter RU. The cutaneous radiation syndrome. In: MacVittie Tj, Weiss JF, Browne D, eds. *Advances in the treatment of radiation injuries*. Oxford: Elsevier Sciences Ltd; 1996: 237-240.

Rehman J, Traktuev D, Li J, Merfeld-Clauss S, Temm-Grove CJ, Bovenkerk JE, Pell CL, Johnstone BH, Considine RV, March KL. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation* 109: 1292-1298; 2004.

Schaffler A, Buchler C. Concise review: adipose tissue-derived stromal cells – basic and clinical implications for novel cell-based therapies. *Stem Cells* 25: 818-827; 2007.

Swindle MM, Smith Ac. Comparative anatomy and physiology of the pig. *Scand J Lab Amin Sci.* 25 (suppl1): 11-21; 1990.

Van den Aardweg GJ, Arnold M, Hopewell JW. A comparison of the radiation response of the epidermis in two strains of pig. *Radiat Res.* 124(3): 283-287; 1990.

Vassalli G, Moccetti T. Cardiac repair with allogeneic mesenchymal stem cells after myocardial infarction. *Swiss Med Wkly* 141: w13209; 2011.

Vidal MA, Walker NJ, Napoli E, Borjesson DL. Evaluation of senescence in mesenchymal stem cells isolated from equine bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord tissue. *Stem Cells Dev*; 2011.

Vodicka P, Smetana K Jr, Dvoránková B, Emerick T, Xu YZ, Ourednik J, Ourednik V, Motlík J. The miniature pig as an animal model in biomedical research. *Ann N Y Acad Sci*.1049: 161-171; 2005.

Wu Y, Wang J, Scott PG, Tredget EE. Bone marrow-derived stem cells in wound healing: a review. *Wound Repair Regen* 15 Suppl 1: S18-26; 2007.

Yanez R, Oviedo A, Aldea M, Bueren JA, Lamana ML. Prostaglandin E2 plays a key role in the immunosuppressive properties of adipose and bone marrow tissue-derived mesenchymal stromal cells. *Exp Cell Res* 316: 3109-3123; 2010.

Zhu J, Li Y, Gharaibeh B, Ma J, Kobayashi T, Quintero AJ, Huard J. Intravenous transplantation of allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells and its directional migration to the necrotic femoral head. *Int J Med Sci* 8: 74-83; 2011.

Zuk PA. The adipose-derived stem cell: looking back and looking ahead. *Mol Biol Cell* 21: 1783-1787; 2010.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Outline of the experimental irradiation scheme.

Figure 2: Evolution of the clinical score after irradiation in ASC grafted animals and non grafted controls. The scores calculated as explained in Materials and Methods are shown as mean and SEM.

II) ETUDE TRANSCRIPTOMIQUE DE PRELEVEMENTS CUTANES IRRADIES

L'étude *in vivo* comparant l'effet des injections d'ASC autologues et allogéniques a mis en évidence une évolution clinique des animaux très différente, avec le développement d'une nécrose irréversible chez les animaux allogreffés et un score clinique final proche de celui des animaux témoins.

Dans ce contexte, une étude du transcriptome des tissus irradiés traités a été effectuée par micro-array pour tenter de mettre en évidence les voies biologiques dont l'activation varie en fonction du traitement réalisé.

II.A) Matériels et méthodes

II.A.1) Biopsies cutanées

Lors du travail expérimental précédemment décrit, des biopsies cutanées ont été effectuées sur les miniporcs. Ces prélèvements ont été réalisés avant irradiation, puis juste avant chacune des trois premières greffes (J25, J46 et J76 post-irradiation).

Les actes chirurgicaux invasifs lors d'un syndrome cutané radio-induit exposent au risque de poussées inflammatoires extensives. Dans ce contexte, les biopsies (actes chirurgicaux mineurs), ont été réalisées sur de petites surfaces (4 mm de diamètre) pour minimiser ce risque, à l'aide de pinces à biopsie (Robbins Instruments Inc, Chatham, USA), et uniquement sur quatre animaux témoins, deux miniporcs ayant reçu des ASC autologues et deux miniporcs ayant reçu des ASC allogéniques.

Après le prélèvement, les biopsies ont immédiatement été déposées dans 700µl de RNA Later (Qiagen, Courtaboeuf, France) et conservées à -20°C.

II.A.2) Extraction des ARNm

Dans chaque échantillon, 300µl de Qiazol (Qiagen, Courtaboeuf, France) ont été ajoutés aux échantillons décongelés à 4°C pour obtenir un volume final de 1ml. Deux billes de tungstène stériles ont été déposées dans chaque échantillon et l'extrait tissulaire a été broyé pendant deux minutes à une fréquence 30Hz dans un broyeur à billes (Retsch, Dusseldorf, Allemagne). Les billes ont ensuite été retirées avec une pince stérile et les échantillons ont été transférés dans des tubes de 1,5 ml (eppendorf®, Le Pecq, France). Dans chacun des tubes, 200 µl de chloroforme ont été ajoutés et les tubes ont été vigoureusement retournés (5 à 10 fois puis mis au repos pendant 5 min). A l'issue, les échantillons ont été centrifugés pendant 15 min à 4°C et 12000g.

Après centrifugation, une extraction des ARN totaux a été effectuée à partir du surnageant chargé dans un automate Qiacube (Qiagen, Courtaboeuf, France) en utilisant le RNeasy Lipid Tissue minikit (Qiagen, Courtaboeuf, France) selon les instructions du fournisseur [10] ; (Annexe 3). Les ARN totaux, chargés négativement sont retenus sur une colonne de silice anionique puis élués. Un volume final de 50 µL a été obtenu pour chaque échantillon. La quantité d'ARN extraite a été déterminée en mesurant l'absorbance à 260 nm des solutions à l'aide d'un spectrophotomètre (ND-1000 ; Labtech, Palaiseau, France) et leur pureté a été mesurée par les rapports 260/230 et 260/280 nm. L'intégrité des ARN a été évaluée par électrophorèse sur un BioAnalyser 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) avec le kit Agilent RNA 6000 Nano Assay en suivant les instructions du fournisseur [11]. L'intégrité des ARN a été déterminée par le rapport ARN 28S/ ARN 18S.

II.A.3) Préparation des échantillons pour l'analyse par micro-array

La préparation des échantillons a été réalisée avec le kit Quick Amp Labelling One color (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) en suivant les instructions du fournisseur [12] ; (Annexe 4). Des ADNc double brin complémentaires des ARNm possédant un promoteur T7 RNA polymérase ont été synthétisés sous l'action de la MMLV-Rétro-transcriptase. A partir de ces ADNc, des ARNc marqués par de la Cyanine 3 ((Cy3), composé fluorescent se liant aux molécules de cytosine) ont été produits et amplifiés par

un facteur 100 par la polymérase T7. A l'issue, les ARNc marqués ont été purifiés avec le kit Qiagen Rneasy Mini (Qiagen, Courtaboeuf, France) par une procédure automatisée sur Qiacube (protocole : Rneasy Mini clean up V3) (Qiagen, Courtaboeuf, France) en suivant les instructions du fournisseur [13]. La quantité d'ARNc extraite a été déterminée en mesurant l'absorbance à 260 nm des solutions à l'aide d'un spectrophotomètre (ND-1000 ; Labtech, Palaiseau, France) et leur pureté a été mesurée par les rapports 260/230 et 260/280 nm. L'intégrité des ARN a été évaluée par électrophorèse sur BioAnalyser 2100 avec le kit Agilent RNA 6000 Assay (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) en suivant les instructions du fournisseur. L'activité spécifique de chaque échantillon a également été calculée par le rapport : concentration de Cy3 en pmol/ μ l (fluorescence/la quantité d'ARN en ng/ μ L). Les caractéristiques nécessaires pour qu'un échantillon puisse être analysé correspondaient à une quantité d'ARN marqué supérieure à 825ng et une activité spécifique de 8pmol/ μ g minimum. Tous les échantillons ont pu être analysés. Les ARN marqués ont ensuite été fragmentés par lyse chimique suivant le protocole du kit Quick Amp Labelling One color afin de diminuer le risque de formation de structures secondaires et de faciliter l'hybridation sur les puces de micro-array. A l'issue, pour chaque échantillon, un volume correspondant à 0,8 μ g d'ARN marqué a été déposé sur des puces Porcine (V2 Gene Expression Microarray, 4x44K ; (Agilent Technologies, Santa Clara, USA)) et incubé pendant 17h à 65°C pour hybridation dans une station Tecan HS Pro (Tecan Group Ltd, Männedorf, Suisse). Les puces ont ensuite été lavées avec des solutions de force ionique décroissante pour éliminer les hybridations non spécifiques et analysées dans un Scanner SureScan Microarray Bundle (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). L'acquisition des données a été réalisée avec le logiciel Feature Extra Software (Agilent Technologies, Santa Clara, USA).

II.A.4) Identification des sondes

Les puces de micro-array utilisées ont été réalisées par le fournisseur à partir des séquences disponibles du génome de porc dans les bases de données, qu'elles soient annotées ou non au moment de la fabrication. Les gènes différentiellement exprimés dont la séquence de la sonde n'était pas annotée ont été comparés à la séquence de gènes connus

en utilisant la base de données USCS Genome Browser assembly, version sus scrofa 10.2 [14] d'août 2011 pour être identifiés.

II.A.5) Analyse statistique

L'analyse statistique a été effectuée avec le logiciel PathwayStudio (Elsevier, Issy les Moulineaux, France).

Pour travailler sur un nombre de prélèvements statistiquement analysable, les échantillons d'un même porc, quel que soit le temps de prélèvement, ont été regroupés.

Une classification hiérarchique a été réalisée sur les conditions expérimentales (animaux témoins, animaux recevant des injections d'ASC autologues ou allogéniques) et sur les différents gènes (entités) pour mettre en évidence les profils d'expression les plus proches, représentés sous forme de cluster. Un test paramétrique d'analyse de variance (ANOVA) à une voie et un post-test de Tukey ont ensuite été réalisés pour comparer le niveau d'expression des différents gènes deux à deux (correction de Bonferroni).

Au vu des résultats cliniques qui ne montrent pas de différence significative entre le groupe témoin et le groupe des animaux ayant reçu des injections d'ASC allogéniques, la suite des analyses s'est concentrée sur les gènes dont l'expression était significativement différente entre les animaux autogreffés par rapport aux animaux témoins ou allogreffés. Le logiciel a recensé les différentes voies métaboliques dans lesquelles intervenaient chacun de ces gènes différenciellement exprimés et a mis en évidence celles dont le nombre et l'importance de la variation était significative par un test de Fischer.

II.B) RÉSULTATS

II.B.1) Classification hiérarchiques et gènes sélectionnés

La classification hiérarchique des gènes étudiés sur les puces a révélé une variation d'expression des entités significativement moins importante entre les animaux recevant des ASC allogéniques et les animaux témoins par rapport aux animaux autogreffés (Figure 22).

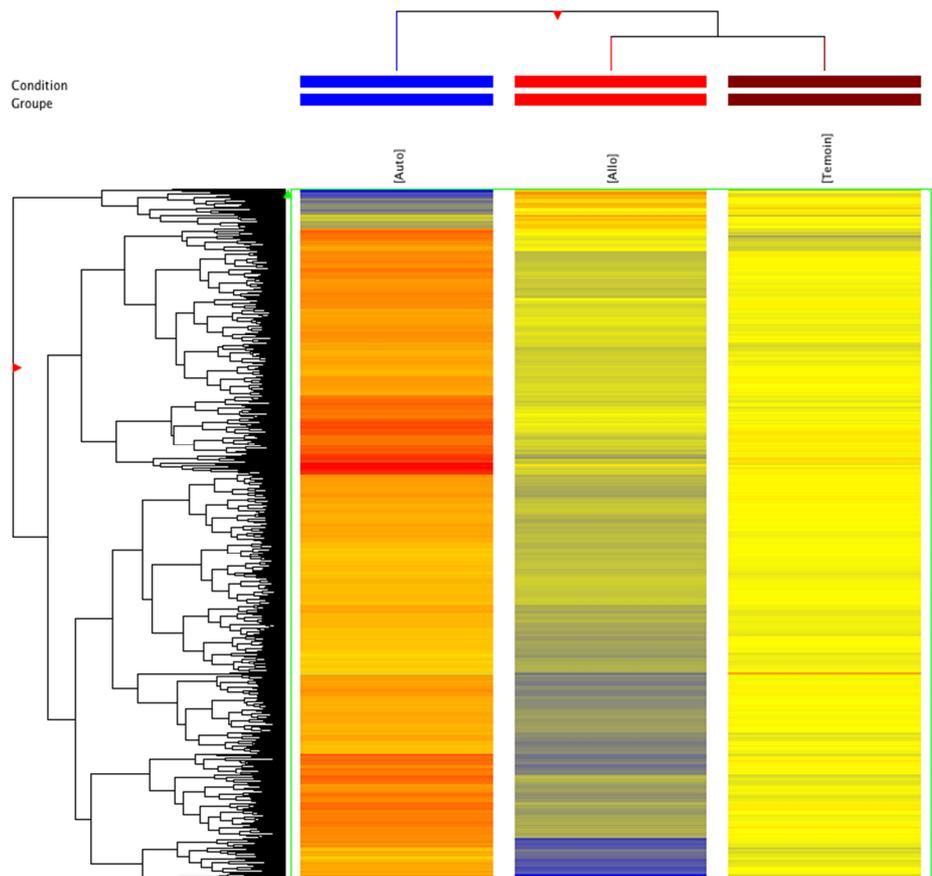


Figure 22 : Classification hiérarchique des gènes analysés par micro-array.

Image fournie par le logiciel PathwayStudio (Elsevier, Issy les Moulineaux, France).

Par ailleurs, l'analyse statistique a révélé 2438 gènes dont l'expression variait significativement entre animaux autogreffés et animaux allogreffés, 1221 gènes entre animaux autogreffés et animaux témoins et 2026 gènes entre animaux allogreffés et animaux témoins (Figure 23).

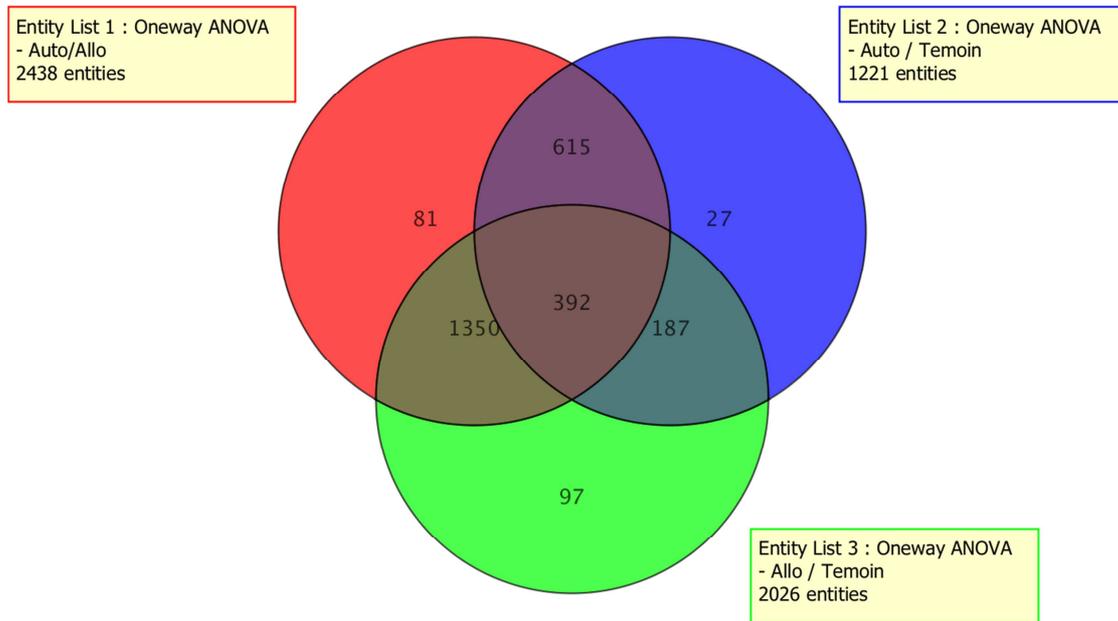


Figure 23 : Analyse statistique des gènes différemment exprimés dans chacun des groupes étudiés.

Les gènes exprimés de manière différentielle dans le groupe des animaux autogreffés, animaux allogreffés et animaux témoins ont été comparés par une analyse de variance à une voie (logiciel PathwayStudio (Elsevier, Issy les Moulineaux, France).) Image fournie par le logiciel PathwayStudio (Elsevier, Issy les Moulineaux, France).

Les résultats cliniques précédemment décrits n'ont pas révélé de différence significative entre l'évolution des animaux témoins et celle des animaux recevant des greffes d'ASC allogéniques. Si l'on considère, pour les raisons indiquées ci-dessus, un regroupement des animaux témoins et allogreffés, le niveau d'expression varie significativement entre les animaux autogreffés et les animaux témoins/allogreffés pour 1007 gènes (615+392). Nous avons restreint cette analyse aux gènes dont le facteur de variation (fold-change) était supérieur à 2 (c'est-à-dire pour lesquels la moyenne autogreffés sur allogreffés et autogreffés sur témoin était supérieure à 2 ou inférieure à 0,5) soit 741 gènes. A partir de ces 741 gènes, la séquence était annotée pour 149 d'entre eux

sur la puce de micro-array et 100 ont été identifiés par comparaison des séquences aux bases de données les plus récentes ce qui a permis de travailler sur 249 gènes annotés.

II.B.2) Voies métaboliques analysées

Parmi ces 249 gènes la variation d'expression entre animaux autogreffés par rapport à animaux allogreffés ou animaux témoins présentait le même profil de variation et 5.3% de ces gènes seulement étaient sous exprimés chez les animaux autogreffés.

L'analyse des voies métaboliques sur-représentées a mis en évidence six voies biologiques dans lesquelles les gènes différentiellement exprimés sont directement impliqués (Tableau V).

Tableau V : Listes des voies métaboliques impliquant directement des gènes significativement surexprimés chez les animaux recevant des greffes d'ASC autologues.

Liste des abréviations complètes dans l'annexe 5.

Voie métabolique	p-value (Test de Fischer)	Nb de gènes dont l'expression varie	Nom des gènes
Régulation de l'apoptose	0.0170056	14	NTRK2 BMP15 NODAL BMPR2 IL1B AMH FANCE INHA BLM RIPK2 RECQL4 LINGO1 IL17 TRPV4
Cycle de libération de l'Épinéphrine/Norépinéphrine	0.0184969	2	PNMT DBH
Voie de signalisation ActivinR/BMPR -> SMAD1/5/9	0.0260417	5	AMH BMP15 INHA BMPR2 NODAL
Voie de signalisation ActivinR -> SMAD2/3	0.0464125	2	INHA NODAL
Mouvements basés sur l'Actomyosin-Based	0.00262489	4	ACTN2 ACTA1 MYH3 ACTC1
Assemblage des jonctions adhérentes	0.00312950	4	ACTN2 ACTN1 ACTA1 ITGB1

L'analyse des voies métaboliques révèle que dans celles de SMAD 1/5/9 et SMAD 2/3 (condensation de Small body size et Mothers Against Decapentaplegic), tous les gènes différentiellement exprimés sont surexprimés et présents dans la voie de signalisation directe, favorisant l'activation des protéines SMAD (Figure 24).

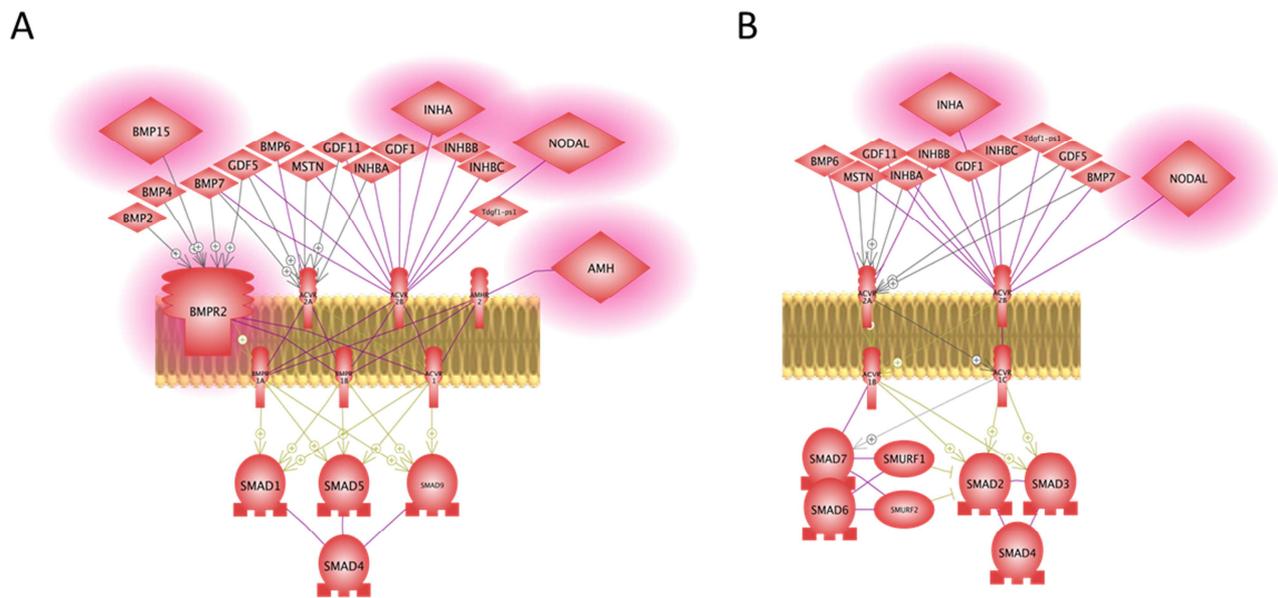


Figure 24 : Voie de signalisation de l'actinine R.

A. Voie de signalisation de SMAD 1/4/5 via l'actinine R

B. B. Voie de signalisation de SMAD 2/3 via l'actinine R

Gènes surexprimés dans ces voies métaboliques

Images fournies par le logiciel PathwayStudio (Elsevier, Issy les Moulineaux, France).

En revanche, concernant la voie de régulation de l'apoptose, seuls les gènes NTRK2 (Neurotrophic Tyrosine Kinase Receptor type 2), IL1 β (Interleukine 1 β), BMP15 (Bone Morphogenic Protein 15), INHA (Inhibin Alpha), AMH (Anti-Mullarian Hormon), NODAL (Nodal growth differentiation factor ; famille des TGF), BMPR2 (Bone Morphogenic Protein Receptor 2; famille des récepteurs aux TNF), et LINGO1 (Leucin Rich repeat and Ig Domain containing 1; composant du récepteurs NOGO) sont surexprimés et directement impliqués dans cette voie métabolique (Figure 27).

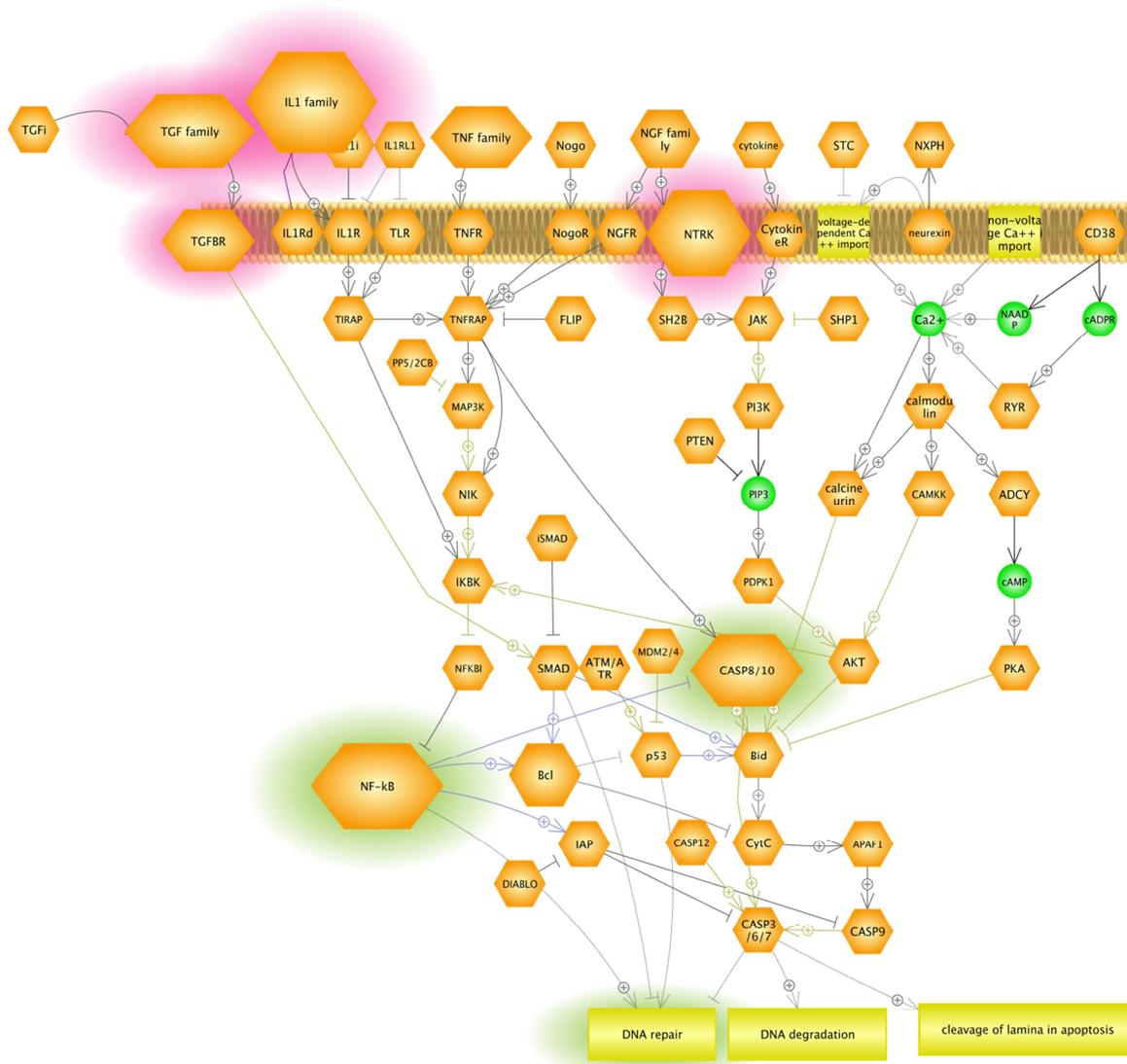


Figure 27 : Voie de signalisation de l'apoptose.

- Gènes surexprimés directement impliqués dans cette voie métabolique
- Gènes dont l'activité est modulée par des gènes surexprimés, non présents dans la voie directe de signalisation

Image fournie par le logiciel PathwayStudio (Elsevier, Issy les Moulineaux, France).

Les autres gènes différentiellement exprimés sont surexprimés mais interviennent indirectement dans la voie de régulation de l'apoptose. L'IL17 module l'activité de NFκB (Nuclear Factor kappa béta) de même que RIPK2 (Receptor Interacting Serine -Threonine Kinase 2) qui active également la caspase 8. La protéine RECQL4 (RecQ Protein Like 4) et BLM (Bloom syndrome, RecQ helicase-like) une hélicase, sont respectivement impliquées dans la ségrégation des chromosomes et la réparation de l'ADN (Figure 27).

L'analyse par le logiciel pathway studio a également mis en évidence des voies de signalisation différentiellement représentées pour lesquels les gènes surexprimés étaient impliqués uniquement de manière indirecte dans différentes voies métaboliques dont les principales sont : la régulation des jonctions GAP, la mélanogénèse, le métabolisme de la phénylalanine, les constituant de l'enveloppe nucléaire, la réparation des mismatch de l'ADN et les excisions de bases (Tableau VI).

Tableau VI : Voies métaboliques dans lesquelles des gènes significativement surexprimés chez les animaux recevant des ASC autologues sont indirectement impliqués.

Liste des abréviations complètes dans l'annexe 5.

Voie métabolique	p-value (Test de Fischer)	Nombre de gènes dont l'expression varie	Nom des gènes
Régulation des jonctions-Gap	0.0261560	14	GRH, GHRHR, CXCL12, OPRD1, RXFP4, DRD1, GALP, ADRA2B, PTPN7, FLT1, CCK, P2RY2, RASGRF1, FFAR1
Mélanogénèse	0.0377956	11	GHRHR, CXCL12, RXFP4, DRD1, GALP, ADRA2B, PTPN7, FLT1, CCK, DBH, TCF7L2
Métabolisme de la Phénylalanine et de la Tyrosine	0.00688951	3	DCT, PNMT, DBH
Enveloppe Nucléaire	0.0242135	1	ACTN2, AKAP1, ACTA1, CDK5R1, ACTC1
Réparation de l'ADN: mismatch et excision de bases	0.0320817	3	RECQL4, FANCE, BLM

On note enfin une surexpression isolée du gène de l'angiopoïétine 4 (ANG4) dans les tissus des animaux recevant des autogreffes. Son expression différentielle isolée n'a pas permis de mettre en évidence une voie métabolique sur-représentée mais ce gène est respectivement 2,1 et 3 fois plus exprimé dans les tissus des animaux traités par des ASC autologues que dans ceux des témoins et des animaux allogreffés.

III) DISCUSSION

Les études réalisées chez le miniporc ont permis d'évaluer la stratégie des banques de cellules souches. De façon intéressante ces travaux ont révélé que les injections d'ASC autologues, à raison de quatre injections de 50.10^6 cellules chacune à des temps précédant l'apparition des symptômes (J26 et J45) puis à J67 et J95, permettent une amélioration de la cicatrisation cutanée avec réépithélialisation de la zone lésée.

Une réaction algique a été observée à l'issue de chaque injection, mais le traitement antalgique a cependant pu être arrêté entre six et dix semaines après irradiation. Ces douleurs étaient principalement liées à une réaction inflammatoire locale au niveau de la zone d'injection observable cliniquement. Cette phase pro-inflammatoire n'apparaît pas délétère pour l'évolution cicatricielle, et semble même bénéfique. Elle n'a pas été observée chez les animaux témoins irradiés recevant des injections locales itératives de solution de PBS 1X, ce qui suggère que cette phase pro-inflammatoire ne résulte pas de micro-lésions induites par l'introduction d'aiguilles en différents points de la zone lésionnelle. En revanche, cette observation suggère que la zone lésée, très réactive, a répondu par une réaction de reconnaissance faisant intervenir un certain nombre de cellules telles que les monocytes, macrophages et lymphocytes ou des protéines du complément. La disparition rapide, dans les 24 heures, des signes inflammatoires et la détection des ASC autologues implantées quatre jours post-injections (Forcheron *et al*, 2012) suggèrent que nos cellules souches isolées du tissu adipeux ont été tolérées et non détruites par l'organisme receveur. De plus cette phase inflammatoire douloureuse est restée transitoire et de faible ampleur répondant au traitement par dérivés morphiniques. Cette réaction inflammatoire semble, en fait, avoir favorisé la cicatrisation, le système immunitaire jouant un rôle primordial dans la détermination de la qualité de la réparation, tant sur le plan structural que fonctionnel (LeBert and Huttenlocher, 2014). Les propriétés immuno-modulatrices (Strioga *et al*, 2012) des ASC ont pu favoriser la mise en place de l'équilibre des cytokines, des chimiokines et des facteurs de croissance jouant un rôle clé dans la régulation des fonctions cellulaires intervenant dans la réparation tissulaire, telles que la migration, la prolifération et la synthèse de matrice au cours du processus de l'inflammation.

Contrairement aux animaux témoins irradiés, les animaux recevant les ASC autologues ont présenté une cicatrisation sans développement de croûte ni de nécrose,

suggérant une bonne orchestration des différents processus impliqués dans la réparation tissulaire.

A l'inverse, le traitement par des ASC allogéniques bien que réalisé selon le même protocole d'injection, les mêmes conditions de préparation, de congélation et de décongélation, n'a permis que de retarder l'apparition des symptômes. Les animaux ont évolué vers une symptomatologie clinique similaire à celle des animaux témoins avec notamment le développement d'une nécrose irréversible et douloureuse et n'ont pas présenté de bénéfice à terme. Comme pour les animaux recevant des ASC autologues, une phase inflammatoire transitoire a été observée à l'issue de chaque greffe suggérant que les acteurs cellulaires de la réaction immunitaire activés (monocytes, macrophages, cellules présentatrices d'antigènes) ont pu réagir à l'introduction de cellules allogéniques. La phagocytose des ASC allogéniques par les macrophages est une hypothèse pouvant expliquer le peu de bénéfice de ce type de traitement et pourrait être confirmée en marquant les ASC allogéniques avant injection.

Au vu de ces résultats, ce travail *in vivo* a été complété par une étude du transcriptome des tissus irradiés traités. Cette analyse avait pour objectif d'analyser la différence de profil phénotypique entre les tissus des animaux autogreffés et ceux des animaux allogreffés ou témoins. Cette étude a permis de mettre en évidence différentes voies qui pourraient avoir été modulées par l'injection d'ASC autologues au sein du tissu cutané irradié. Une première évaluation globale a permis d'observer la surexpression de gènes modulant directement ou indirectement ces voies. De façon importante ces résultats devront être confirmés par une analyse par RT-qPCR réalisés sur des gènes cibles sélectionnés. Il est également important pour l'analyse de ces résultats de considérer que l'étude réalisée a porté sur des prélèvements de tissu cutané, un tissu constitué de nombreux types cellulaires interagissant étroitement ensemble, et non sur une lignée cellulaire isolée ce qui a pu limiter la mise en évidence de voies de signalisation complète. Malgré cette limite, cette première analyse de micro-array a révélé que plusieurs voies métaboliques seraient directement modulées par l'injection d'ASC autologues.

La voie de signalisation de la libération de l'épinéphrine/norépinéphrine montre la surexpression d'un gène indispensable à la synthèse de la norépinéphrine : la dopamine mono-oxygénase qui transforme la dopamine en norépinéphrine. Cette hormone participant

à la régulation de la tension artérielle intervient principalement dans la lutte naturelle contre la douleur exerçant un effet biologique antalgique via l'activation des récepteurs centraux μ (Ono *et al*, 2014). Cette propriété est à la base du traitement antalgique par tramadol ou tapentadol qui sont des agonistes de ces récepteurs, inhibant la recapture de la sérotonine et de la norépinéphrine (Tzschentke *et al*, 2014). A l'inverse, la phényléthanolamine-N-méthyl transférase permet la transformation de norépinéphrine en épinéphrine qui agit principalement sur la régulation de la tension artérielle (Black *et al*, 1981 ; Coupland *et al*, 1984 ; Kepp *et al*, 2007). Cliniquement dans notre modèle de SCR, les animaux recevant des greffes d'ASC autologues ont présenté des douleurs post-injections plus importantes que les animaux témoins après les 2 premières greffes, mais leur traitement antalgique a pu être stoppé plus rapidement. L'activation de cette voie pourrait permettre d'expliquer, à l'issue de la réaction algique post-greffes, l'arrêt plus précoce du traitement antalgique chez les animaux recevant des injections d'ASC autologues. Les effets antalgiques des MSC ont d'ailleurs été démontrés dans la prise en charge de patients présentant un SCR traité par des injections de BM-MSc autologues (Lataillade *et al*, 2007).

On observe également une surexpression des gènes codant pour les protéines initiant les voies de SMAD1/5/9 et SMAD 2/3 respectivement activées par les BMP et le TGF β chez les animaux recevant des ASC autologues. Ces deux voies aboutissent à l'activation de SMAD4 qui est un gène suppresseur de tumeur. Il est impliqué dans l'arrêt du cycle cellulaire et l'entrée en apoptose par activation de la transcription de p21 et KRT23 notamment (Moustakas and Kardassis, 1998 ; Moustakas *et al*, 2001 ; Liffers *et al*, 2011). L'activation de ces voies est en accord avec la sur-représentation de la voie de régulation de l'apoptose pour lesquels tous les gènes surexprimés, directement ou indirectement impliqués dans cette voie sont pro-apoptotiques. L'interprétation de l'implication de cette voie doit tenir compte du regroupement des prélèvements des différents temps post-irradiation pour l'analyse statistique. Il est cependant envisageable que l'apoptose des cellules présentant des dommages puisse prévenir le développement de la fibrose et de la nécrose tissulaire. De plus, l'apoptose est un mécanisme indispensable au cours de la cicatrisation pour le renouvellement de l'épithélium observé chez les animaux autogreffés. La capacité des MSC (ASC et BM-MSc) à moduler l'apoptose a d'ailleurs été clairement rapporté *in vivo* dans différents modèles (Lee BJ. *et al*, 2006 ; Madonna *et al*, 2012 ; Linard *et al*, 2013).

L'actomyosine correspond à l'association de la myosine et de l'actine sous forme de filament. Elle est impliquée dans la migration cellulaire notamment des fibroblastes et des kératinocytes en favorisant la mobilité du noyau cellulaire (Okeyo *et al*, 2009 ; Sixt, 2012 ; Luo *et al*, 2013 ; Wu J. *et al*, 2014). Les jonctions adhérentes sont des jonctions cellules-cellules ou cellule-matrices extracellulaire, qui mettent en jeu les filaments d'actine (respectivement desmosomes et hémi-desmosomes), indispensables pour le maintien des structures épithéliales dont l'épithélium cutané (Kaiser *et al*, 1993 ; Gates *et al*, 1994). Ainsi de façon intéressante on observe après l'injection d'ASC autologues une modulation des voies métaboliques contrôlant l'assemblage des jonctions adhérentes et les mouvements basés sur l'actomyosine qui sont deux mécanismes importants intervenant dans le processus de cicatrisation cutanée.

On observe également une surexpression du gène de l'angiopoïétine 4 (ANG4). Cette surexpression isolée ne permet pas de conclure à elle seule sur un effet pro-angiogénique mais il est à noter que cette protéine tout comme l'angiopoïétine 1 est impliquée dans les mécanismes d'angiogénèse, indispensable pour la régénération tissulaire (Tsigkos *et al*, 2003), suggérant que les injections d'ASC autologues auraient un effet renforcé sur l'angiogénèse via l'ANG4.

Enfin, d'autres voies de signalisation sont indirectement modulées telles que la régulation des jonctions Gap, la mélanogénèse, les composants de l'enveloppe nucléaire, le métabolisme de la phénylalanine ou encore certains mécanismes de réparation de l'ADN.

De façon importante nous avons indiqué ci-dessus les limites d'interprétation de ces premiers résultats : le regroupement des temps d'analyse et des groupes d'animaux pour permettre une interprétation statistique et l'analyse tissulaire globale. Ces résultats devront donc être complétés par une évaluation à chaque temps en individualisant les 3 groupes et une analyse par RT-PCR sur des gènes cibles sélectionnés (en cours). Une étude de voies sélectionnées pourrait également être réalisée dans un modèle de culture de lignée cellulaires représentant les composants majeurs du tissu cutané (kératinocytes, fibroblastes, cellules endothéliales...).

Au final, l'ensemble de ces travaux confirme l'intérêt d'une stratégie de banques de cellules souches autologues pour le traitement du SCR, qui serait applicable dans le cas de personnels/professionnels à risque. L'intérêt de banques cellulaires allogéniques pourtant indispensables dans un contexte d'irradiation hétérogène importante ou d'afflux massif de blessés n'a, en revanche, pas été confirmée dans nos conditions expérimentales. Dans notre étude, les greffons allogéniques étaient constitués d'ASC non caractérisés provenant de deux animaux de la cohorte en se fondant sur les propriétés connues des ASC : faible immunogénicité (Cui *et al*, 2007 ; Najjar *et al*, 2010 ; Yanez *et al*, 2010) et déficit d'expression du CMH de type II (Le Blanc *et al*, 2003b). De plus l'injection de MSC allogéniques pour le traitement de lésions musculaires (Gimble *et al*, 2011), cardiaques (Vassalli and Moccetti, 2011) et cutanées (Chen *et al*, 2009) avait montré une certaine efficacité chez le rongeur. L'existence d'une réaction de rejet des MSC allogéniques reste discutée selon les modèles (Knaan-Shanzer, 2014). Nos résultats suggèrent donc que l'utilisation des ASC en contexte allogénique présente plus de contraintes pour des modèles animaux tels que les grands mammifères, plus proches de l'Homme. De plus le contexte inflammatoire caractéristique du SCR (apparition de vagues inflammatoires extensives) pourrait réduire l'efficacité des greffons injectés. Biologiquement cette inflammation se caractérise par la libération de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL1, l'IL6, l'IFN γ (Darnell *et al*, 1994 ; Peter, 2005 ; Rauch *et al*, 2013) et différentes études ont montré, aussi bien sur les BM-MSC que les ASC, qu'en présence d'IFN γ le phénotype des cellules souches était modifié avec notamment l'expression des molécules de CMH2 à la surface des cellules (Le Blanc *et al*, 2003b ; Kronsteiner *et al*, 2011). Une étude réalisée par Schnabel *et al* a également démontré un effet pro-inflammatoire des cellules souches exprimant le CMH2 dans un modèle équin (Schnabel *et al*, 2014). Ainsi un « cercle vicieux » pourrait être décrit: inflammation-expression du CMH2-inflammation, particulièrement délétère dans le contexte du SCR. Au total la réalisation de banques allogéniques ne pourrait donc s'affranchir d'une caractérisation des propriétés immunologiques des ASC incluant le typage du CMH. L'injection chez le miniporc d'ASC allogéniques histocompatibles pour le traitement du SCR reste à réaliser.

Il a également été mis en évidence ces dernières années des variations inter-individuelles en termes de qualité des cellules souches (Shu *et al*, 2012) : importance du sécrétome, propriétés immunomodulatrices ou anti-apoptotiques, et il a été rapporté que l'âge du donneur influait sur les capacités de prolifération et de différenciation des ASC

(d'autant plus efficace que le donneur est jeune) (Lei *et al*, 2007 ; Zaim *et al*, 2012 ; Scruggs *et al*, 2013). Le sexe du donneur semble également modifier les propriétés des ASC : Shu *et al* ont rapporté un pouvoir sécrétoire, une activité anti-apoptotique et une vitesse de prolifération accrues pour les ASC issues de donneur féminin (Shu *et al*, 2012). Enfin, certaines pathologies chroniques telles que le surpoids ou le diabète altèrent les capacités sécrétoires et de transdifférenciation de ces cellules ainsi que leurs propriétés pro-angiogéniques (Cianfarani *et al*, 2013 ; De Girolamo *et al*, 2013 ; Strong *et al*, 2013 ; Rennert *et al*, 2014).

En vue d'optimiser les banques cellulaires, la recherche de paramètres qualitatifs permettant d'apprécier *a priori* la qualité des cellules souches et leur compatibilité/réactivité avec le receveur apparaît donc nécessaires. La production de MSC n'exprimant pas le CMH 1 pourrait également représenter une approche d'intérêt (Knaan Shantzer, 2014).

Au final, accroître l'efficacité de la thérapie cellulaire en utilisant les ASC pour le traitement du SCR nécessite de réduire le temps de culture indispensable actuellement pour obtenir des greffons de tailles suffisantes et d'augmenter le(s) potentiel(s) pro-régénératifs de ces cellules. Cette optimisation pourrait être obtenue par manipulation *ex vivo* des ASC avant injection dans le but d'accroître leur sécrétome (thérapie génique transitoire). Cette approche fait l'objet de la 2^{ème} partie du travail de thèse.

PARTIE II

MISE AU POINT D'UN PROTOCOLE DE THERAPIE GENIQUE

PARTIE II : MISE AU POINT D'UN PROTOCOLE DE THERAPIE GENIQUE

Article 2: Transient gene therapy to treat cutaneous radiation syndrome: development in a minipig model

Riccobono Diane; Agay Diane; Forcheron Fabien; Scherthan Harry; Meineke Viktor; Drouet Michel. Health Physics. June 2014; 120-6

Cette 2^{ème} partie du travail de thèse vise à évaluer une stratégie de thérapie génique transitoire basée sur la manipulation *ex vivo* des ASC afin de modifier transitoirement leur sécrétome accroissant ainsi leur capacité de réparation et de régénération des tissus lésés. Le caractère transitoire de l'ajout du facteur trophique doit ainsi limiter les risques de réactions iatrogènes. La protéine Sonic Hedgehog (Shh) a été choisie comme première candidate en raison de ses propriétés pro-angiogéniques (Pola *et al*, 2001) et anti-apoptotiques (Bhardwaj *et al*, 2001 ; Parisi and Lin, 1998).

Un protocole de transfection transitoire des ASC par nucléofection utilisant une construction plasmidique contenant la séquence codante de la protéine Shh a été mis au point. La faisabilité de cette approche (optimisation des conditions de transfection, production d'un greffon de taille clinique et tolérance à l'injection) a été évaluée chez le miniporc, modèle proche de l'homme.

I) MATÉRIELS ET MÉTHODES

I.A) Mise au point du protocole de transfection

I.A.1) Description et production du plasmide

Le plasmide BD Science pIRES2-EGFP Vector utilisé (BD Sciences, Franklin Lakes, USA) (Annexe 6) possède un site de clonage multiple permettant l'insertion de la partie codante du gène Shh et, en aval, une séquence codant pour la Green Fluorescent Protein (GFP) permettant la transcription d'un ARNm biscistronique (Figure 28). Ce plasmide pIRES2-EGFP Vector possède une origine de répllication pour son expansion dans les bactéries E.Coli (pUC ori) et une cassette de résistance kanamycine-néomycine permettant la sélection des bactéries transformées. Par ailleurs, son expression dans les cellules eucaryotes est transitoire : il possède une origine de répllication pour les cellules de mammifères eucaryotes, activée uniquement en présence de l'antigène SV40T qui n'est pas exprimé dans les cellules souches (Linnenbach, 1980).

Le plasmide contenant le gène Shh (pIRES2 EGFP-Shh) avait précédemment été produit par un étudiant en thèse d'université dans le laboratoire (Garrigou, 2011). Il a été amplifié dans des bactéries *E.Coli* DH5 α chimio-compétentes.

pIRES2-EGFP Vector Information

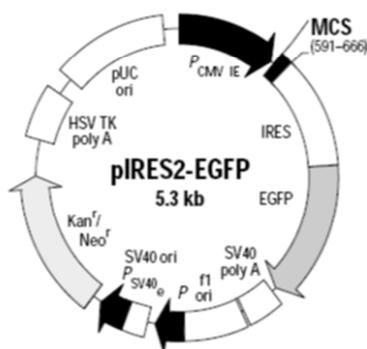


Figure 28 : Plasmide pIRES 2-EGFP.

Le plasmide contient un promoteur fort (pCMV) en amont du site de clonage multiple (MCS) utilisé pour l'insertion du gène d'intérêt. En aval une séquence codant pour la protéine GFP est présente permettant la transcription d'un ARNm biscistronique. Le plasmide possède également une cassette de résistance aux antibiotiques (Kanamycine/ Néomycine) pour la sélection des bactéries transformées.

I.A.2) Transformation bactérienne

La transformation bactérienne a été réalisée par choc thermique. 1 µg de plasmide pIRES2-EGFP-Shh a été ajouté à 50 µL de bactéries chimio-compétentes DH5α dans un tube de 1,5 mL (Eppendorf®, Le Pecq, France) et placé dans la glace pendant 5 min. Le choc thermique a été effectué en mettant le mélange plasmide-bactérie à 42°C pendant 40 sec puis en le remplaçant dans la glace pendant 5 min. Du milieu de culture : 350 µL de SOC (2% tryptone, 0,5% d'extrait de levure, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM glucose) a été ajouté. Les bactéries ont alors été incubées 1 h à 37°C puis la suspension a été étalée au râteau dans des boîtes de Pétri contenant du LB Agar (Luria Broth) avec 1% de kanamycine et incubées à 37°C pendant une nuit. A l'issue, des colonies ont été repiquées et ensemencées chacune dans 3 mL de milieu LB contenant 1% de kanamycine, puis placées à 37°C sous agitation. Six heures après, elles ont été transférées dans 500 mL de milieu LB (avec 1% de kanamycine) dans un erlenmeyer pendant une nuit, sous agitation à 37°C.

I.A.3) Extraction

L'extraction a été réalisée en utilisant l'EndoFree Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) selon les instructions du fournisseur [15] ; (Annexe 7). Il permet de ne pas affecter la culture des ASC avec des endotoxines bactériennes. La quantité d'ADN plasmidique extraite a été évaluée en mesurant l'absorbance à 260 nm de l'échantillon à l'aide d'un spectrophotomètre (ND-1000, Labtech, Palaiseau, France). La pureté de l'échantillon a été évaluée par les rapports des lectures faites à 260 nm/230 nm et 260 nm/280 nm.

I.A.4) Culture des ASC et ensemencement

Les ASC ont été isolées à partir du tissu adipeux sous-cutané de miniporcs Göttingen. Après dilacération au scalpel et incubation pendant 1 h sous agitation à 37°C avec de la collagénase de type II (Biochemical Corporation, Worthington, USA) à une

concentration de 2 mg.ml^{-1} diluée dans du Hank's Buffered Salt Solution (HBSS) contenant des ions bivalents Ca^{2+} et Mg^{2+} (Gibco-Invitrogen, Cergy-Pontoise, France), le tissu adipeux a été centrifugé à 400g pendant 10 min à 18°C . Le surnageant contenant les acides gras et certains déchets cellulaires a été éliminé. Les cellules ainsi isolées, ont été remises en suspension dans du Phosphate Buffer Saline (PBS) 1X, puis filtrées sur un tamis cellulaire de $70 \mu\text{m}$ (BD Biosciences, San José, USA) et centrifugées à 400g pendant 10 min à 4°C . Le culot cellulaire a ensuite été repris dans une solution hypotonique de chlorure d'ammonium (150 mM) pour lyser les globules rouges résiduels et centrifugé à 400g pendant 10 min à 18°C . Les cellules ont finalement été reprises dans du PBS, comptées sous un microscope optique à l'aide d'une cellule de Malassez puisensemencées dans des flasques de 150 cm^2 à raison de $13\,000 \text{ cellules/cm}^2$ (2M/flasque) dans du Minimum Essentiel Medium α (MEM α) (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, USA) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), 100 U.mL^{-1} de pénicilline, $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de streptomycine (Gibco-Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) et incubées à 37°C sous atmosphère humide à 5% de CO_2 avec réensemencement itératif durant six semaines.

Une fois les cellules à confluence, le milieu de culture a été éliminé et le tapis cellulaire rincé 2 fois avec 5 ml de PBS 1X. 5 ml de solution constituée d'un mélange volume/volume de trypsin-EDTA et Versène (Gibco-Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) ont été utilisés pour décoller les cellules du plastique de culture. Les flasques ont été incubées à 37°C et 5% de CO_2 pendant 5 min. L'action de la trypsin a été inhibée par l'ajout de 10 ml de milieu de culture supplémenté avec 10% de SVF. La suspension cellulaire a été transférée dans des tubes en polypropylène de 50 ml à fond conique. Les flasques de cultures ont été rincées 2 fois avec du PBS 1X (5 ml) afin de récupérer la totalité des cellules. Après centrifugation à 400g pendant 10 min à 18°C , les cellules ont été comptées sur cellule de Malassez et réensemencées dans des flasques de 150 cm^2 ($13\,000 \text{ cellules/cm}^2$). Après trois étapes de trypsination/réensemencement, les cellules étaient considérées comme une population pure d'ASC et congelées dans de l'Iscove Modified Dulbecco's Medium (IMDM : 15% SVF et 10% diméthylsulfoxyde ; (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA). Leur potentiel de différenciation et leur caractérisation phénotypique (cluster de différenciation (CD) CD90^+ , CD44^+ , CD45^- et CD31^-) étaient contrôlées sur une fraction de l'échantillon (Forcheron *et al.*, 2012). Pour les expérimentations, les ASC ont été décongelées au bain-Marie à 37°C etensemencées dans

des flaques de 150 cm². Elles ont été cultivées dans du milieu MEM α (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, USA) contenant 10% de SVF décomplémenté, 100 U.mL⁻¹ de pénicilline et 100 μ g.mL⁻¹ de streptomycine (changé une fois par semaine) et maintenues à 37°C sous atmosphère humide à 5% de CO₂.

I.A.5) Transfection

Le milieu de culture des ASC cultivées dans les flasques de 150 cm² a été éliminé et les cellules ont été lavées deux fois au PBS 1X puis 5 mL de trypsine/versène ont été ajoutés et les cellules incubées à 37°C pendant 5min. A l'issue, la trypsine a été inactivée par 10 ml de milieu MEM α (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, USA) contenant 10% de SVF décomplémenté. Les cellules ont été récupérées dans des tubes Falcons® de 50 ml et centrifugées à 400g pendant 10 min à 18°C. Le surnageant a ensuite été éliminé et le culot cellulaire a été remis en suspension dans 5 mL de milieu MEM α . Un comptage et une évaluation de la mortalité ont été réalisés par coloration au bleu Trypan sur cellule de Malassez. La suspension cellulaire a été aliquotée à raison de 10 millions de cellules dans des tubes de 15 mL (ependorf®, Le Pecq, France) et centrifugée à 400g pendant 5 min à 18°C. Le surnageant était éliminé et le culot cellulaire repris dans 100 μ L de tampon : *Human MSC Nucleofactor Solution AMAXA®* (Lonza, Bâle, Suisse). La suspension a ensuite été transférée dans une cuve de transfection en présence de 5 μ g de plasmide. La transfection a été réalisée à l'aide d'un appareil NUCLEOFATOR II™AMAXA® (Lonza, Bâle, Suisse), en mode « MSC high viability » en suivant les instructions du fournisseur [16] ; (Annexe 8). Suite à la nucléofection, 400 μ L de milieu MEM α supplémenté en SVF (10%) ont été ajoutés pour stopper la réaction et les cellules transfectées ont étéensemencées, à raison de 6600 cellules/cm², dans des flasques de 150 cm² contenant 20 mL de milieu MEM α préchauffé, supplémenté en SVF (10%) et en pénicilline et streptomycine (1%).

L'expression de la GFP a permis d'évaluer le pourcentage de cellules transfectées par cytométrie en flux (CMF) 2 à 9 jours post-transfection. Après décollement des cellules comme décrit précédemment, elles ont été centrifugées à 400g pendant 10 min à 18°C. Le culot cellulaire a été repris dans 400 μ L de PBS auquel 4 μ L de 7-AAD (7 Amino-

Actinomycine D) ont été ajoutés. Le 7-AAD est un composé fluorescent qui a la propriété de traverser les membranes des cellules mortes et de s'intercaler au niveau de l'ADN. L'analyse par CMF a été réalisée sur un cytomètre de flux BD™ LSR II (BD Biosciences, San José, USA). Les cellules transfectées vivantes exprimaient la GFP (canal du FITC (Fluorescein IsoThioCyanate), excitation 495 nm ; émission 521 nm) et étaient 7-AAD négatives (canal de l'APC (Allophycocyanine) excitation 488 nm ; émission 647 nm). L'acquisition des données a été effectuée avec le logiciel BD FACS Diva 6.0 (BD Biosciences, San José, USA) et la mesure de l'efficacité de la transfection a été réalisée à l'aide du logiciel FlowJo (Tree star Inc, Ashland, USA). Cette technique de transfection (nucléofection) permet l'introduction du matériel génétique directement dans le noyau augmentant son efficacité, mais sans intégration dans le génome permettant une expression transitoire de la protéine Shh.

I.A.6) Evaluation des conditions optimales de transfection

Pour obtenir les quantités d'ASC transfectées par Shh (ASC-Shh) nécessaires à la réalisation du schéma d'injections locales itératives, il est nécessaire d'optimiser le pourcentage de survie des cellules transfectées. La quantité de plasmide transfectée est une variable importante de cette optimisation. Différents ratios plasmide/cellules avaient préalablement été testés au laboratoire, révélant une transfection optimale de plasmide codant pour Shh de 0,5 µg/million de cellules (Garrigou, 2011). Par ailleurs, selon leur niveau de confluence, les cellules en culture établissent des interactions cellules-cellules différentes, modifiant ainsi le métabolisme cellulaire et la structure membranaire et donc leur sensibilité à la transfection (Wang, 2006). L'efficacité de transfection est l'équilibre optimal entre une expression maximale de la protéine d'intérêt et un impact minimal sur la viabilité cellulaire. La sensibilité des cellules à la transfection dépend de plusieurs facteurs tels que le type cellulaire, l'espèce et les conditions de culture. La densité cellulaire et les connexions intercellulaires étant étroitement liées et modulant la sensibilité des cellules à la transfection (Jaasma *et al*, 2006 ; Maurisse *et al*, 2010), le niveau de confluence permettant la meilleure survie des ASC après transfection a été évalué pour déterminer les conditions de transfection optimales.

Le nombre moyen de cellule par flasque de 150 cm² étant de 10 millions et le temps de doublement des ASC de 2 jours, pour évaluer l'efficacité de la transfection à 50%, 75% et 90% de confluence, les cellules ont étéensemencées comme suit:

- 50% de confluence : 8 300 cellules/cm²
- 75% de confluence : 1 2000 cellules/cm²
- 90% de confluence : 15 000 cellules/cm²

La transfection a été effectuée 4 jours après.

Pour chaque condition (n=6) la nucléofection a été réalisée comme décrite précédemment (§Partie 2 : I.A.5) Transfection).

La survie des ASC a été évaluée 2 jours après la transfection par comptage au bleu Trypan sur cellules de Malassez. Le pourcentage de cellules transfectées et donc GFP positives, a été mesuré par CMF comme décrit dans le paragraphe précédent (§Partie 2 : I.A.5) Transfection), 2, 7 et 9 jours après la nucléofection des cellules.

I.A.7) Contrôle de la production de Shh

I.A.7.a) Extraction des protéines

La synthèse de la protéine Shh par les cellules transfectées et sa sécrétion ont été évaluées.

Pour l'étude des protéines sécrétées, le surnageant a été prélevé et aliquoté à -20°C dans des tubes eppendorfs® de 1,5 mL. Concernant les protéines intracellulaires, après aspiration du milieu de culture les cellules ont été lavées avec 1 mL de PBS 1X. Dans chaque puits, 100 µL de tampon de lyse RIPA (Tris 10 mM pH 7,4 ; Triton 100X 1% ; NaCl 150 mM ; EDTA 1 mM ; PIC : 5 mL.mL⁻¹) ont été ajoutés. Après homogénéisation, les extraits protéiques ont été prélevés et conservés à -20°C.

I.A.7.b) Dosage des protéines totales

La concentration en protéines totales de chaque échantillon a été déterminée par la méthode PIERCE/BCA en utilisant un Protein Assay Kit® (Pierce, Rockford, USA) selon les recommandations du fournisseur [17]. Cette méthode combine la réduction du Cu^{2+} en Cu^+ par les protéines en milieu alcalin et la détection colorimétrique très sensible de l'ion cuivreux avec un agent contenant de l'acide bicinchoninique (BCA). Le produit coloré violet de cette réaction est formé par la chélation de 2 molécules de BCA avec un ion Cu^+ . Ce complexe présente une forte absorbance mesurée à 562 nm par spectrophotométrie sur un appareil Hitachi 912 (Hitachi, Roche Diagnostics, Almere; Pays-Bas) pour déterminer la quantité de protéines totales exprimée en $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

L'ensemble des dosages était réalisé en triplicat.

I.A.7.c) Western-Blot

La cinétique de synthèse/sécrétion de Shh par les ASC transfectées a été contrôlée par Western Blot jusqu'à 9 jours après la transfection. Pour chaque analyse, 30 μg de protéines totales ont été déposées par puits sur un gel de polyacrylamide Tris-Glycine (4-20%) (Invitrogen Life Technologies, Calsbad, USA), puis séparées par électrophorèse et transférées sur une membrane PVDF (Polyfluorure de vinylidene ; Invitrogen Life Technologies, Calsbad, USA). Après saturation des sites aspécifiques par du TBS-Tween 0.1% contenant 5% de lait, les membranes ont été incubées avec des anticorps polyclonaux de chèvre anti-Shh humain (SantaCruz Biotechnologie, Heidelberg, Allemagne) dilués au 1/1 000 dans du TBS-Tween 0.1%-lait pendant 1 nuit sous agitation à 4°C. Après trois lavages au TBS-Tween 0.1%, les membranes ont été incubées avec un anticorps secondaire anti-IgG de chèvre, conjugué à une horseradish peroxydase (peroxydase de raifort, hRP) (SantaCruz Biotechnologie, Heidelberg, Allemagne), dilué au 1/5 000 dans du TBS-Tween 0.1%-lait. Les membranes ont été incubées avec de l'ECL (Enhanced Chemoluminescent substrate ; Pierce, Rockford, USA) afin de révéler la présence des protéines. L'intensité des bandes a été analysée par densitométrie (Genegnome Syngene, Cambridge, Royaume-Uni).

I.A.8) Analyses statistiques

Les résultats ont été analysés à l'aide du logiciel GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, USA) par comparaison globale des lots sur échantillons non appariés. L'analyse a été effectuée par le test de Kruskal-Wallis (alternative non paramétrique de l'analyse de variance pour échantillons non appariés) et une comparaison des lots deux à deux a été réalisée par le test *post hoc* de Dunn. Une différence significative était considérée pour une *p-value* <0,05.

I.B) Modèle animal

Pour valider ce protocole *in vivo*, le modèle de syndrome cutané radio-induit décrit précédemment a été utilisé avec l'accord du comité d'éthique de l'IRBA (N°2008/24.0).

Pour minimiser le nombre d'animaux, en accord avec la législation européenne en termes d'expérimentation animale, la faisabilité de ce protocole de thérapie génique a été évaluée sur un seul animal.

Ce miniporc a été irradié localement à 50 Gy par un faisceau gamma tangentiel en zone lombaire (comme décrit précédemment cf. article 1) et a bénéficié de 4 injections de $25 \pm 7 \cdot 10^6$ ASC-Shh (à J25, J46, J75 et J96 post-irradiation).

Une évaluation clinique a été réalisée quotidiennement et comparée aux résultats antérieurs obtenus dans le laboratoire sur :

- Huit animaux témoins irradiés recevant le véhicule (PBS)
- Cinq animaux irradiés ayant reçu quatre injections de $50 \cdot 10^6$ ASC autologues à J25, J46, J75 et J96 post-irradiation

Ce protocole est détaillé dans l'article qui suit (page 167).

II) RESULTATS

II.A) Détermination des conditions optimales de transfection

Pour optimiser la transfection de la construction plasmidique pIRES2-EGFP-Shh dans les ASC, la survie cellulaire et le pourcentage de cellules GFP positives ont été évalués à différents stades de confluence.

La viabilité des ASC 48 heures après transfection a été quantifiée par la coloration au bleu trypan sur cellule de Malassez. Trois densités cellulaires ont été choisies pour déterminer la condition de confluence optimale des ASC de porc pour la nucléofection. Pour des confluences de 50 et 75%, le pourcentage de viabilité des ASC de porc est proche de 60% (Figure 29).

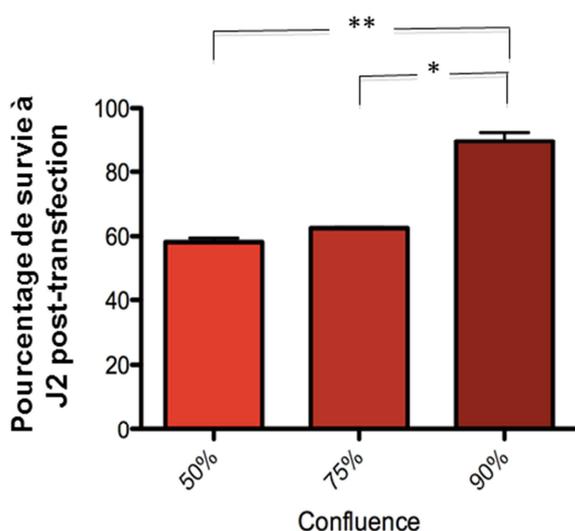


Figure 29 : Viabilité des ASC 2 jours après transfection en fonction du pourcentage de confluence.

Quatre jours avant la transfection, les ASC ont été ensemencées à des densités permettant d'obtenir 50, 75 et 90% de confluence le jour de la nucléofection. La survie des cellules a été évaluée à J2 post-transfection par coloration au bleu Trypan et comptage sur cellule de Malassez.

* : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; Test de Kruskal-Wallis et test de comparaison multiple de Dunn. $n=6$ pour chaque groupe.

Comme l'illustre également la figure 29, la viabilité des ASC après nucléofection est significativement plus importante pour une confluence de 90% que pour les conditions 50% ($p < 0.05$) et 75% ($p < 0.01$).

Ces résultats révèlent que les cellules hautement jointives avant transfection ont un meilleur taux de survie, suggérant que la qualité des communications intracellulaires et la cohésion mécanique représentent des facteurs essentiels de la viabilité cellulaire après nucléofection.

Afin d'obtenir à terme une quantité suffisante d'ASC transfectées utilisables cliniquement, le pourcentage de transfection des cellules a également été évalué, par cytométrie en flux, en fonction de la densité cellulaire lors de la nucléofection. Le pourcentage de cellules exprimant la GFP a été mesuré 2, 7 et 9 jours après nucléofection pour trois conditions de confluence (50, 75 et 90%) (Figure 30). On observe pour ces trois dernières que le pourcentage de transfection diminue en fonction du temps. La comparaison du pourcentage de cellules GFP+ entre J2 et J9 post-nucléofection révèle une diminution significative, en moyenne de $41\% \pm 4\%$ ($p < 0.05$) dans les trois conditions de confluence.

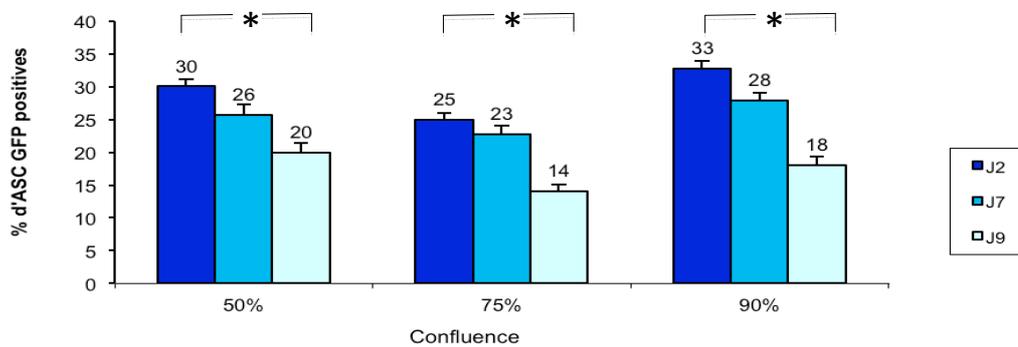


Figure 30 : Pourcentage de cellules transfectées en fonction de la confluence.

Les ASC ont étéensemencées quatre jours avant la transfection pour obtenir des taux de confluences variables le jour de la nucléofection. Le pourcentage de transfection a été mesuré par analyse de l'expression de la GFP codée sur les plasmides pIRES EGFP-Shh par cytométrie en flux 2, 7 et 9 jours post-transfection.

* : $p > 0,05$; Test de Kruskal-Wallis et test de comparaison multiple de Dunn. $n=6$ pour chaque groupe.

La synthèse /sécrétion de Shh par les cellules transfectées, a été évaluée par western blot. Comme l'illustre la figure de l'article 2 (**Article 2** § Figure1), la synthèse de la protéine Shh est maximale dès deux jours post-transfection et sa sécrétion extracellulaire par les ASC augmente entre deux et neuf jours après nucléofection. La diminution du pourcentage d'ASC-GFP+ avec le temps (Figure 30) semble être corrélée à la diminution de la synthèse intracellulaire de Shh (**Article 2** § Figure1). Ces résultats montrent que la synthèse de la protéine d'intérêt est transitoire, comme recherché, et que sa sécrétion par les ASC atteint un maximum à neuf jours post-transfection.

Le produit de thérapie cellulaire obtenu présente donc un sécrétome enrichi transitoirement, correspondant à la stratégie recherchée de réduction des réactions iatrogènes.

II.B) Evaluation de l'efficacité et de la tolérance du greffon ASC-Shh dans un modèle préclinique de SCR (Article 2)

Dans le cadre d'une première validation de protocole de thérapie génique transitoire, l'injection de produits de culture cellulaire manipulés a été réalisée chez un premier animal en se fondant sur l'étude principale réalisée par notre groupe où le schéma d'injection retenu était de quatre injections de $50 \cdot 10^6$ d'ASC autologues ou allogéniques, décrits par Forcheron *et al* (Forcheron *et al*, 2012) et dans l'article précédent (cf. Article 1 ; (Riccobono *et al*, 2012)).

Dans le présent volet de l'étude décrite dans **l'article 2** (Riccobono *et al*, 2014), les quantités d'ASC-Shh par injection n'ont été que de $25 \pm 7 \cdot 10^6$ ASC-Shh en raison des conditions de culture et réalisées selon le plan expérimental décrit dans la Figure 21 (§partie 1). Cette concentration cellulaire a été considérée comme cliniquement suffisante. En effet, il n'existe pas actuellement de consensus concernant la quantité de cellules souches à injecter et les données chez l'homme apparaissent empiriques. Des approches précliniques de traitement de la brûlure thermique chez le miniporc rapportent des quantités injectées de $0.35 \cdot 10^6$ BM-MSc par cm^2 contre $0.5 \pm 0.16 \cdot 10^6$ dans ce protocole (Fu *et al*, 2006 ; Li *et al*, 2006).

Le suivi clinique du miniporc traité montre un bon état général et comportemental de l'animal après injection, sans perte d'appétit ni de poids. La tolérance locale à l'injection a été bonne avec une réaction algique similaire à celle des animaux ayant bénéficié de l'injection d'ASC autologues et une bonne réponse au traitement antalgique par les dérivés morphiniques. L'évolution clinique locale chez ce miniporc greffé avec des ASC-Shh a été favorable et similaire à celle des animaux recevant des ASC autologues non manipulées bien que la taille du greffon ait été réduite. Un défaut plus marqué du tissu sous-cutané a cependant été observé, correspondant à une fibrose des tissus musculaires sous-cutanés confirmée lors de la nécropsie. Cette étude chez un premier animal doit être complétée notamment en augmentant le nombre d'animaux pour pouvoir procéder à une analyse définitive.

Cette étude initiale préclinique de thérapie génique transitoire du SCR a été valorisée par la rédaction d'une publication internationale en juin 2014 :

Transient gene therapy to treat cutaneous radiation syndrome: development in a minipig model

Riccobono Diane; Agay Diane; Forcheron Fabien; Scherthan Harry; Meineke Viktor; Drouet Michel. Health Physics June 2014; 120-6

TRANSIENT GENE THERAPY TO TREAT CUTANEOUS RADIATION SYNDROME: DEVELOPMENT IN A MINIPIG MODEL

Diane Riccobono,* Fabien Forcheron,* Diane Agay,* Harry Scherthan,†
Viktor Meineke,† and Michel Drouet*

Abstract—Cutaneous radiation syndrome is the delayed consequence of localized skin exposure to high doses of ionizing radiation. Adipocyte derived stem cells injection may improve tissue regeneration through secreted factors. Thus mesenchymal stem cells secretome optimization, using transient transfection, may represent a new strategy to treat this syndrome. Sonic Hedgehog, a secreted protein involved in cell proliferation and angiogenesis, has been chosen as a first candidate. Here preliminary results are reported of the therapeutic potential of transient gene therapy to cure cutaneous radiation syndrome in a minipig model. Adipocyte derived stem cells were transiently transfected by electroporation with a plasmid coding for Sonic Hedgehog. Göttingen minipigs were locally irradiated using a ^{60}Co gamma source at the dose of 50 Gy and received Phosphate Buffer Salin (controls: $n = 8$), stem cells (50×10^6 each time, $n = 5$) or transfected stem cells ($25 \pm 7 \times 10^6$ each time, $n = 1$). All controls exhibited a homogeneous clinical evolution of cutaneous radiation syndrome with final necrosis (day 91). In stem cells injected minipigs, an ultimate wound healing was observed in four out of five grafted animals (day 130 ± 28 , complete in two of them) (historical results). The Sonic Hedgehog animal, albeit injected with a lower number of transfected stem cells, presented a very similar evolution of skin healing without necrosis or uncontrollable pain. Globally this preliminary report suggests that local injection of Sonic Hedgehog transfected adipocyte derived stem cells may improve wound healing. Thus work is ongoing to evaluate this therapeutic strategy on a larger number of animals. *Health Phys.* 106(6):000–000; 2014

Key words: exposure, radiation; laboratory animals; radiation damage; repair, cellular

INTRODUCTION

IN AN accidental or therapeutic context, the skin, a radio-sensitive organ, is frequently irradiated. This exposure leads to severe damage to many of its cellular components. The classical clinical evolution is characterized by the delayed onset of the manifestation stage and consists in transient early erythema, dry/moist desquamation (swelling, blister), dermal ischemia/necrosis, and dermal atrophy (Hopewell 1990; Lefaix and Delanian 2005; Peter and Gottlober 2002). It also depends on the radiation dose, quality, and penetration depth. It is associated with recurrent and extensive inflammatory processes leading to irreversible necrotic waves and followed by a poorly spontaneous revascularization and an incomplete healing (Lefaix and Delanian 2005). This association of symptoms is called Cutaneous Radiation Syndrome (CRS). Its treatment remains complex: following the evaluation of irradiated area extension and excision of the exposed necrotic skin and subcutaneous tissues, a transient skin flap is associated with autologous skin graft (Bey et al. 2007).

It has been hypothesized a decade ago that mesenchymal stem cells (MSCs) injection could reduce normal tissue injury (Badiavas et al. 2003; Hill et al. 2001). Mechanisms involved are still poorly understood (Chen et al. 2008), but experiments from different groups indicate that MSCs secrete numerous cytokines and chemokines well known to be important to stimulate and achieve wound healing, such as Epidermal Growth Factor-alpha (EGF alpha), Keratinocyte Growth Factor (KGF), Angiopoietin-1 (Ang1), Stromal derived factor-1 (SDF1), and erythropoietin in greater amounts than dermal fibroblasts (Estrada et al. 2009). Based on these experiments, local grafting of bone marrow MSCs has been combined recently with classical surgery in several patients who showed an improved clinical evolution (Bey et al. 2010; Lataillade et al. 2007). In addition to MSCs, stem cells contained in the stromal vascular fraction of adipose tissues (Baglioni et al. 2009; Dominici et al. 2006; Zuk 2010), the adipocyte derived stem cells (ASCs) represent a new promising multipotent

*Institut de Recherche Biomédicale des Armées (IRBA), Département des Effets Biologiques des Rayonnements, BP 73, Brétigny sur Orge Cedex, France; †Institut für Radiobiologie der Bundeswehr, Neuherbergstraße 11, 80937 München, Germany.

AQ1 The authors declare no conflicts of interest.

For correspondence contact: Diane Riccobono, IRBA, Département des Effets Biologiques des Rayonnements, BP 73, Brétigny sur Orge Cedex, France, or email at diane_riccobono@gmail.com.

(Manuscript accepted 7 January 2014)

0017-9078/14/0

Copyright © 2014 Health Physics Society

DOI: 10.1097/HP.0000000000000099

TRANSIENT GENE THERAPY TO TREAT CUTANEOUS RADIATION SYNDROME :
DEVELOPMENT IN A MINIPIG MODEL

Diane Riccobono*, Fabien Forcheron*, Diane Agay*, Harry Scherthan[§], Viktor Meineke[§], Michel Drouet*.

*: Institut de Recherche Biomédicale des Armées (IRBA) ; Département des Effets Biologiques des Rayonnements ; BP 73 ; Brétigny sur Orge Cedex, France.

[§]: Institut für Radiobiologie der Bundeswehr, Neuherbergstraße 11, 80937 München, Germany.

Corresponding author: Diane Riccobono: IRBA ; Département des Effets Biologiques des Rayonnements ; BP 73 ; Brétigny sur Orge Cedex, France.

email: diane.riccobono@gmail.com, Tel:+ 33476636857; Fax: +33476636922

E-mails for the other authors:

Diane Agay*: diane.agay@crssa.net

Harry Scherthan[§]: scherth@web.de

Fabien Forcheron*: fforcheron@yahoo.fr

Michel Drouet*: micheldrouet@crssa.net

Viktor Meineke[§]: Viktor.Meineke@uni-ulm.de

Acknowledgements: This work was supported by a grant from Direction Générale de l'Armement (Paris, France). We thank H. Chaussard and B. Ballester for their technical assistance.

Conflict of interest statement: No conflicts of interest, financial, or otherwise, are declared by the authors.

ABSTRACT

Cutaneous radiation syndrome is the delayed consequence of localized skin exposure to high doses of ionizing radiation. Adipocyte derived stem cells injection may improve tissue regeneration through secreted factors. Thus mesenchymal stem cells secretome optimization, using transient transfection, may represent a new strategy to treat this syndrome. Sonic Hedgehog, a secreted protein involved in cell proliferation and angiogenesis has been chosen as a first candidate.

Here we reported preliminary results of the therapeutic potential of transient gene therapy to cure cutaneous radiation syndrome in minipig model. Adipocyte derived stem cells were transiently transfected by electroporation with a plasmid coding for Sonic Hedgehog. Göttingen minipigs were locally irradiated using a ^{60}Co gamma source at the dose of 50 Gy and received Phosphate Buffer Salin (controls: n=8), stem cells (50×10^6 each time, n=5) or transfected stem cells ($25 \pm 7 \times 10^6$ each time n=1). All controls exhibited an homogeneous clinical evolution of cutaneous radiation syndrome with final necrosis (day 91). In stem cells injected minipigs an ultimate wound healing was observed in four out of five grafted animals (day 130 ± 28 , complete in two of them) (historical results). The sonic hedgehog animal, albeit injected with a lower number of transfected stem cells, presented a very similar evolution of skin healing without necrosis or uncontrollable pain.

Globally this preliminary report suggests that local injection of Sonic Hedgehog transfected adipocyte derived stem cells may improve wound healing. Thus work is ongoing to evaluate this therapeutically strategy on a larger animal number.

Keywords: Radiation damage, Cellular repair, laboratory animals, adipocyte derived stem cells, gene therapy, Sonic Hedgehog.

INTRODUCTION

In an accidental or therapeutic context, the skin, a radiosensitive organ, is frequently irradiated. This exposure leads to severe damages of many of its cellular components. The classical clinical evolution is characterized by the delayed onset of the manifestation stage and consists in transient early erythema, dry/moist desquamation (swelling, blister), dermal ischemia/necrosis and dermal atrophy (Hopewell 1990; Lefaix JL 2005; Peter and Gottlober 2002). It also depends on the radiation dose, quality and penetration depth. It is associated with recurrent and extensive inflammatory processes leading to irreversible necrotic waves and followed by a poorly spontaneous revascularization and an incomplete healing (Lefaix JL 2005). This association of symptoms is called Cutaneous Radiation Syndrome (CRS). Its treatment remains complex: following the evaluation of irradiated area extension and excision of the exposed necrotic skin and subcutaneous tissues, a transient skin flap is associated with autologous skin graft (Bey et al. 2007).

It has been hypothesized a decade ago that mesenchymal stem cells (MSCs) injection could reduce normal tissue injury (Badiavas et al. 2003; Hill et al. 2001). Mechanisms involved are still poorly understood (Chen et al. 2008) but experiments from different groups indicate that MSCs secrete numerous cytokines and chemokines well known to be important to stimulate and achieve wound healing, such as Epidermal Growth Factor-alpha (EGF alpha), Keratinocyte Growth Factor (KGF), Angiopoietin-1 (Ang1), Stromal derived factor-1 (SDF1), and erythropoietin in greater amounts than dermal fibroblasts (Estrada et al. 2009). Based on these experiments, bone marrow MSCs local grafting has been recently combined with classical surgery in several patients who showed an improved clinical evolution (Bey et al. 2010; Lataillade et al. 2007). In addition to MSCs, stem cells contained in the stromal vascular fraction of adipose tissues (Baglioni et al. 2009; Dominici et al. 2006; Zuk 2010), the adipocyte derived stem cells (ASCs) represent a new promising multipotent stem cells source. Located close to adipocytes in fat tissues, ASCs have been reported to acquire mesenchymal and neurogenic phenotype in ad hoc conditions, to induce vascular-like structure formation in matrigel model and to stimulate neovascularization in ischemic tissues (Gimble et al. 2011; Nakagami et al. 2006; Planat-Benard et al. 2004; Schaffler and Buchler 2007).

Nowadays, the autologous MSCs strategy for CRS treatment is hampered by the delay induced by cell culture, which is aggravated by the fact that CRS diagnosis is frequently delayed many weeks after accidental IR exposure due to latency period before symptoms development. In this context our group has previously set up an animal model (Agay et al. 2010) to evaluate the therapeutic potential of local injection of ASCs. In our hands, local injection of autologous ASCs favoured wound healing (Forcheron et al. 2012) whereas unmatched allogeneic ASCs were ineffective (Riccobono et al. 2012). Importantly the optimization of cell grafts, especially in order to compensate the delay required by cell culture, has to be considered. Thus we hypothesized that a transient transfection of ASCs to enrich their secretome may enhance their efficiency. A morphogene on Chromosome 7 (7q36) coding for a protein: Sonic hedgehog (Shh) has been chosen as a first candidate. Shh is a secreted glycoprotein. It interfaces and binds with Shh receptor Patched (Ptc). Shh binding to Ptc dissociates the coreceptor Smoothed (Smo) from Ptc inhibition and provides downstream signalling with the end result of nuclear aggregation and binding of transcription factors on Shh-target genes (Bambakidis and Onwuzulike 2012). This pathway is involved in several cell types proliferation such as keratinocytes, neural stem cells and hematopoietic stem cells (Bambakidis and Onwuzulike 2012; Bhardwaj et al. 2001). Moreover it enhances angiogenesis through pro-angiogenic factors secretion increase: Vascular Endothelial Growth Factor alpha (VEGF alpha) and Angiopoietin1 (Kusano et al. 2005; Pola et al. 2001).

Here, using our CRS model, we reported the feasibility of the transient gene strategy in a first animal treated with Shh transfected ASCs (Shh-ASCs).

MATERIALS AND METHODS

This study was approved by the French Army Animal Ethics Committee (N°2008/24.0). All minipigs were treated in compliance with the European legislation related to animal care and protection in order to minimize pain for the animals. Fourteen female Göttingen Minipigs® weighing about 20 kg were purchased from Ellegaard (Dalmore, Denmark) and housed in individual pen ($21\pm 1^{\circ}\text{C}$, 55% relative humidity, 12h/12h

light-dark schedule) where they received solid food twice a day and had access to water ad libitum.

Cell cultures

As previously described (Forcheron et al. 2012), ASCs were isolated from subcutaneous fat tissues harvested in minipigs thirty days before irradiation. After mincing with scalpels and incubation with collagenase II (30min at 37°C) fat tissue was centrifuged and isolated cells were seeded in 150 cm² culture flask. Cells were cultured in minimum essential medium (MEM alpha) (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, New Mexico, US) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) (HyClone part of Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, US) and basic fibroblast growth factor (2ng.mL⁻¹) at 37°C in air with 5% CO₂. ASCs were characterized using flow cytometry (BD LSRII, BD Biosciences, Pont de Claix, France) and multipotency was controlled. For cell storage, ASCs were frozen in Iscove Modified Dulbecco's Medium (IMDM: 15% FCS and 10% DMSO) according to a multi-step protocol (1h at -20°C, overnight at -80°C then stored in liquid nitrogen). Cells were thawed at 37°C before spinning, in 30 mL of IMDM (30% FCS), at 180g during 7 min. Before each graft, ASCs viability was assessed by trypan blue coloration. The viability of injected ASCs was 86.9% ± 4.8%.

Gene therapy

For the gene therapy study, soluble N-terminus human Shh isoform required for Shh biologic activity was cloned in a bicistronic pIRES2-EGFP plasmidic vector (Clontech Laboratories, Mountain View, California) which allows the gene of interest and the EGFP reporter gene to be translated separately from a single bicistronic mRNA. E. Coli bacteria were transformed with this plasmid in order to overproduce it. Plasmidic DNA was extracted using EndoFree Plasmid Mega Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) following the manufacturer instructions. The amount of plasmid DNA collected was evaluated by measuring sample absorbance at 260 using a spectrophotometer (ND-1000, Labtech, Palaiseau, France). The sample purity was assessed by reports of 260nm/230nm and 260nm/280nm.

ASCs grew until 85 to 95% confluence. Then they were dissociated in 0.25% of Trypsin-EDTA and numbered. For each transfection, 10×10^6 ASCs were suspended in human MSCs nucleofector solution under a 100 μ l volume and nucleofected with 5 μ g of plasmid. Transfection was performed using the Nucleofector II™ and the human MSCs Nucleofector Kit (Amaxa Biosystems part of Lonza, Levallois-Perret, France) to obtain Shh-ASCs. After five days of incubation in MEM alpha medium all viable cells were grafted.

Transfection evaluation

The viability of transfected ASCs was evaluated by flow cytometry assay (BD LSRII, BD Biosciences, Pont de Claix, France), adding 1 μ L of 7-Amino-Actinomycin D (7-AAD, a cell death marker). The viability of transfected ASCs was 91% \pm 5.2. The alive Shh-ASCs subpopulation (EGFP positive and 7-AAD negative cells) was also quantified by flow cytometry assay (BD LSRII, BD Biosciences, Pont de Claix, France) before injection.

To evaluate Shh production and secretion, intra and extra cellular fraction were harvested from 2 days to 9 days post transfection. Total proteins quantity was measured by Pierce™ BCA assay kit (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, US) following the manufacturers' instructions and the same amount of total proteins was loaded in each well.

Western blot analysis was used to detect Shh secreted protein in cell fraction and culture media (2, 7 and 9 days after irradiation). Membranes were probed with polyclonal goat anti-human Shh secreted subunit (22kDa) antibody 1/1000 (SantaCruz Biotechnology, Heidelberg, Germany) followed with incubation of anti-IgG conjugated with peroxidase antibody 1/5000 (SantaCruz Biotechnology, Heidelberg, Germany). Intensity of the band was determined by densitometry (Genegnome, Syngene, Cambridge, UK).

Experimental irradiation

Minipigs were irradiated as previously described (Agay et al. 2010). Briefly, after sedation (azaperone, 50mg.kg⁻¹ intramuscularly) and fixed anaesthesia (tiletamine and zolazepam, 6mg.kg⁻¹ intramuscularly), animals were kept under volatile anaesthesia (1.5% isoflurane in oxygen) for irradiation. The skin exposure was realized orthogonally to a horizontal and

homogeneous gamma beam (^{60}Co source IRDI 4000; Alstom, Levallois-Perret, France), to reach a dose of $50.6 \pm 4.1\text{Gy}$ in the entry area, controlled by thermoluminescent dosimeters with alumina powder, with a dose rate of $0.6\text{ Gy}\cdot\text{min}^{-1}$. Lead screens were used to limit the radiation field to the lumbar cutaneous and muscular area and to prevent injury of vital abdominal organs.

ASCs engraftment in irradiated minipigs

After local gamma exposure, the fourteen minipigs were randomly divided in three groups: control phosphate buffer saline (PBS) injected animals (group 1; $n=8$), autologous ASCs-grafted minipigs (group 2; $n=5$), and Shh-ASCs-grafted minipigs (group 3; $n=1$). Due to ethical guidelines recommendation for painful experimental researches performed in higher mammals models, group 1 and 2 are historical results and to establish feasibility of transient gene therapy only one animal was included in group 3. All minipigs were injected via intradermal route, four times during a three months period following irradiation (at the border or inside the irradiated area; entrance and exit zones). The dates of injection were planned on days 25, 46 (before the onset of clinical symptoms), 76 and 91 after irradiation, to allow grafting of 50×10^6 ASCs each time corresponding to 32×10^6 ASCs in the entry area and to 18×10^6 ASCs evenly distributed in the less irradiated exit area. For group 3 (Shh-ASCs), 30×10^6 ASCs to 18.5×10^6 ASCs were injected.

Clinical follow-up

As previously described (Riccobono et al. 2012), during the follow-up period, the minipigs were clinically evaluated, including all pathological signs and pain evaluation. To establish whether or not analgesics were needed, a veterinary examination was performed every day with evaluation of the overall condition of the animal, based on drink and food intakes and behaviour, on local examination and palpation of the lesions and on assessment of analgesic treatment efficiency (Fentanyl $50\ \mu\text{g}\cdot\text{h}^{-1}$, Durogesic™ $8.4\ \text{mg}\cdot 21\ \text{cm}^{-2}$, Janssen-Cilag, France). Ultimately, the final point of the experiment was defined as extensive skin necrosis, complete healing or hind limb paralysis, and then the minipigs were euthanized.

Statistical analysis (group 1 and 2)

Due to ethical guidelines recommendation for painful experimental researches performed in higher mammal models, the cohorts were limited to the minimal size compatible with non parametric statistical analysis. For the clinical study, the three animal groups were compared two to two using the non parametric Mann-Whitney rank sum test (Sigmastat Software). In each group, the comparisons to the initial value were performed using a Wilcoxon signed rank test for paired samples analysis. A p value <0.05 was considered significant.

RESULTS

Transfection evaluation

Transfection percentage showed a sub population of Shh-ASCs of 23 to 27% (Fig.1A). Regarding Shh production, Shh synthesis was observed in cells from two days post transfection and its expression decreased to nine days post transfection. As a mirror Shh secretion was noticed from two days post transfection in extra cellular medium and increased until nine days post transfection (Fig. 1B).

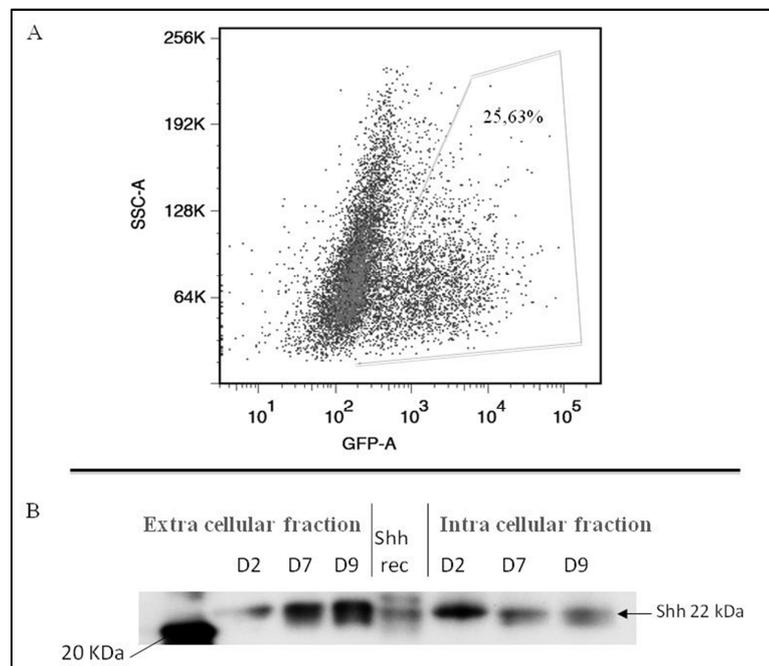


Figure 1: Shh-ASCs analysis. A) Flow cytometric evaluation of GFP cells 2 days after transfection; B) Western blot analysis of intra cellular Shh cells content and of Shh secreted protein in culture media from day 2 to 9 days after transfection.

Clinical evolution in controls (Historical results)

As expected from the literature (Archambeau et al. 1979; Hopewell 1990), all the controls exhibit a similar evolution (Riccobono et al. 2012). A progressive hair loss was noticed during 6 weeks post exposure, leading to a complete alopecia after two months (Fig.2A). On about day 60, one week after the second PBS-treatment, a cold purple spot due to vascular failure appeared in the exit area. At the same time an extensive centrifugal moist skin desquamation developed over the entry area, resulting in a thick scab over the entry area at day 76. During the last months (from month 3 to euthanasia) local intensive pain was controlled with morphine-based products. Finally, the skin wounds in both entry and exit areas progressively displayed extensive skin necrosis (from day 91) determining the end-point of the study (Fig.2B). In the PBS control group the minipigs had to be killed about day 119 after irradiation (6 out of 8 animals), while the two remaining pigs were killed on day 124 and 140.

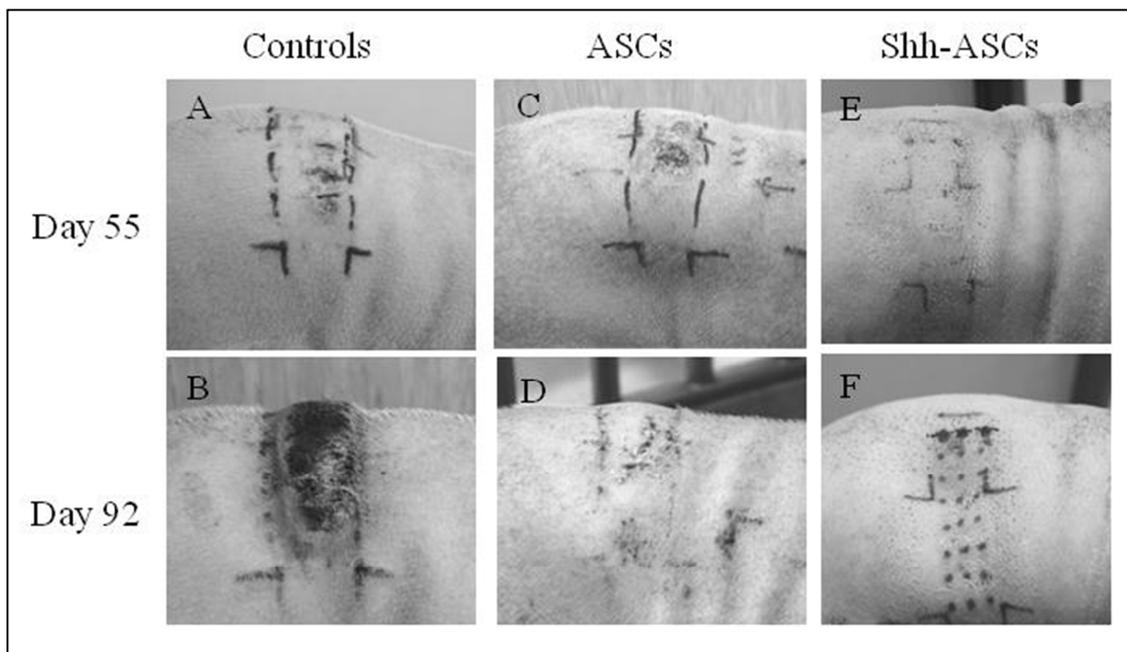


Figure 2: Clinical evolution of controls (group 1: A, B), autologous ASCs injected animals: (group 2: C, D) and Shh-ASCs injected animal (group 3: E, F) from 55 to 92 days post irradiation.

Enhancement of clinical skin repair in autologous ASCs injected animals (Historical results)

In all grafted minipigs, each ASCs injection in the irradiated area induced a transient and painful localized inflammation for several days, restricted to the grafted area (Agay et al. 2010). The entry area displayed significant muscular swelling and thin scab lesions (Fig. 2C), which appeared significantly earlier than in controls (day 42 ± 6 versus day 70 ± 15 , $p=0.003$) and before the second graft in two minipigs. In exit area, the cold purple wound developed at the same time than in non-grafted controls. An early (day 81 versus day 89 in controls) and prolonged (30 days versus 18 days) analgesic treatment was required. Wound healing was observed in four out of five ASCs-grafted animals at day 130 ± 28 (range days 106 to 160). Healing was complete in two pigs. Final clinical evaluation was improved (Fig. 2D). The analgesic treatment could be dismissed after 6 weeks in one of these two animals and was not required in the other one. Healing was definite in the pig followed during 18 months.

Clinical evolution in Shh-ASCs-injected animal

At this time, one minipig has been given Shh-ASCs. Tolerance was good. After each Shh-ASCs injection a transient inflammation was observed but painless in opposition to autologous ASCs injected animals. It was limited to an erythema restricted to the grafted area (Fig. 2E). As in autologous ASCs injected minipigs, the asymptomatic period was shorter than in controls (group 2: 42 days \pm 7 and group 3 animal: 35 days versus 76 days \pm 12 for controls), due to the development of pain and subcutaneous oedema in entry area. In exit area, the cold purple wound appeared at the same time than in the two other groups. In this Shh-ASCs injected animal, oedema was persistent during all the experiment and required antalgic during all the study in opposition to group 2 but no wet or moist desquamation neither necrosis were observed. Clinical evaluation was satisfactory until day 93 (Fig. 2F). It was euthanized on day 94 due to the development of hind limb paralysis. At this time necropsy revealed an important muscle wasting and an inflammation of the spinal cord.

DISCUSSION

Dermis damages following irradiation at dose above 25Gy are severe, including stasis or occlusion, oedema of vascular walls and necrosis. Neovascularization also appeared to be reduced and fibroblasts may be permanently altered, especially regarding the production and maturation of collagen during the acute phases (Tibbs 1997). As the dermis is known to derive from mesenchyme, the grafting of BM-MSCs has been proposed to prevent/cure such damages in animal models (Francois et al. 2007; Wu et al. 2010) and has been evaluated in few patients (Bey et al. 2010; Lataillade et al. 2007). ASCs injection may also represent a valuable alternative, as adipose-derived stem cells can be very easily harvested in large numbers. ASCs secretome is rich with many paracrine factors such as pro-angiogenic and anti-apoptotic factors (Ebrahimian et al. 2009; Rehman et al. 2004) contributing to skin regeneration (Zuk 2010). Furthermore, autologous ASCs have been shown to favour wound healing in mouse and minipig CRS models (Ebrahimian et al. 2009; Forcheron et al. 2012). Nowadays, the autologous MSCs strategy for CRS treatment is hampered by the delay induced by cell culture, which is aggravated by the fact that CRS diagnosis is frequently delayed many weeks after accidental IR exposure. In this context, optimizing ASCs efficiency would be of interest allowing early treatment with autologous or allogeneic cells as well as graft size reduction. Indeed our group has reported (Riccobono et al. 2012) that unmatched allogeneic ASCs injections do not improve CRS healing in minipig. To achieve this goal we proposed a transient gene therapy approach using ASCs transiently secreting the Shh morphogene involved in cell proliferation and neoangiogenesis (Bambakidis and Onwuzulike 2012).

The use of a bicitronic plasmid coding for the GFP and Shh allowed control of Shh expression by flow cytometry. In this experiment about 25% +/-2 of ASCs were positively transfected and expressed Shh which is less than in human [until 76% of transfection (Zaragosi et al. 2007)] and requires optimization. Modulating ASCs confluence state for example could be of interest. Shh production and secretion had been confirmed by western-blot. This, added to the demonstration of a 3 days in situ persistence of grafted cells (Forcheron et al. 2012), was the rationale for a day 5 post transfection injection schedule. Shh-ASCs injection was well tolerated. Local transient inflammation did not appear to be detrimental as the clinical evolution showed both an ultimate improvement

of skin repair and pain decrease. We can notice that this inflammatory reaction was less painful than in group 2. This may have resulted from the graft size reduction (group3: 18,5 to 30×10^6 Shh-ASCs versus group 2: 50×10^6 for each injection). Alternatively Shh anti-inflammatory properties such as direct increase of IL10 production (Zhou et al. 2012), or via CD4+ activation (Stewart et al. 2002) may have played a role. Interestingly the clinical benefit was similar in the groups albeit graft size was reduced in group 3, but this has to be confirmed in a larger cohort. Pro-angiogenic activity (Pola et al. 2001) and stimulation of stem cells may also have played a role (Bhardwaj et al. 2001; Fan and Khavari 1999).

CONCLUSION

In this work, we established the feasibility of transient gene therapy strategy in a animal model of CRS. Significant amounts of Shh-ASCs were produced to allow the local injection of autologous cells in a first minipig. Tolerance was good. Further studies will establish whether such an approach accelerates wound healing when compared with unmanipulated cells grafting.

REFERENCES

Agay D, Scherthan H, Forcheron F, Grenier N, Herodin F, Meineke V, Drouet M. Multipotent mesenchymal stem cell grafting to treat cutaneous radiation syndrome: development of a new minipig model. *Exp Hematol* 38(10): 945-956, 2010. DOI : 10.1016/j.exphem.2010.06.008

Archambeau JO, Bennett GW, Abata JJ, Brenneis HJ. Response of swine skin to acute single exposures of X rays: quantification of the epidermal cell changes. *Radiat Res* 79(2): 298-337 ; 1979. DOI : 10.2307/3575099

Badiavas EV, Abedi M, Butmarc J, Falanga V, Quesenberry P. Participation of bone marrow derived cells in cutaneous wound healing. *J Cell Physiol* 196(2): 245-250 ; 2003. DOI : 10.1002/jcp.10260

Baglioni S, Francalanci M, Squecco R, Lombardi A, Cantini G, Angeli R, Gelmini S, Guasti D, Benvenuti S, Annunziato F, Bani D, Liotta F, Francini F, Perigli G, Serio M, Luconi M. Characterization of human adult stem-cell populations isolated from visceral and subcutaneous adipose tissue. *FASEB* 23(10): 3494-3505 ; 2009. DOI : 10.1096/fj.08-126946

Bambakidis NC and Onwuzulike K. Sonic Hedgehog signaling and potential therapeutic indications. *Vitam Horm* 88: 379-394 ; 2012.

Bey E, Doucet C, Duhamel P, Brachet M, Prat M, Bargues L, Amabile JC, Gourmelon P, Lataillade JJ. Radiation burn : « innovating therapeutic approach » . *Ann Chir Plast Esthet* 55(5): 354-362 ; 2010.

Bey E, Duhamel P, Lataillade JJ, de Revel T, Carsin H, Gourmelon P. Treatment of radiation burns with surgery and cell therapy. A report of two cases. *Bull Acad Natl Med* 191(6): 971-978; 2007.

Bhardwaj G, Murdoch B, Wu D, Baker DP, Williams KP, Chadwick K, Ling LE, Karanu FN, Bhatia M. Sonic hedgehog induces the proliferation of primitive human hematopoietic cells via BMP regulation. *Nat Immunol* 2(2): 172-180 ; 2001.

Chen L, Tredget EE, Wu PY, Wu Y. Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. *PLoS One* 3: e1886; 2008. DOI: 10.1371/journal.pone.0001886

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal

stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8(4): 315-317 ; 2006. DOI : 10.1080/14653240600855905

Ebrahimian TG, Pouzoulet F, Squiban C, Buard V, Andre M, Cousin B, Gourmelon P, Benderitter M, Casteilla L, Tamarat R. Cell therapy based on adipose tissue-derived stromal cells promotes physiological and pathological wound healing. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29: 503-510; 2009. DOI: 10.1161/ATVBAHA.108.178962

Estrada R, Li N, Sarojini H, An J, Lee MJ, Wang E. Secretome from mesenchymal stem cells induces angiogenesis via Cyr61. *J Cell Physiol* 219: 563-571; 2009. DOI: 10.1002/jcp.21701

Fan H. and Khavari PA. Sonic hedgehog opposes epithelial cell cycle arrest. *J Cell Biol* 147(1): 71-76 ; 1999. DOI : 10.1083/jcb.147.1.71

Forcheron F, Agay D, Scherthan H, Riccobono D, Herodin F, Meineke V, Drouet M. Autologous adipocyte derived stem cells favour healing in a minipig model of cutaneous radiation syndrome. *PLoS One* 7(2): e31694 ; 2012. DOI : 10.1371/journal.pone.0031694

Francois S, Mouseddine M, Mathieu N, Semont A, Monti P, Dudoignon N, Sache A, Boutarfa A, Thierry D, Gourmelon P, Chapel A. Human mesenchymal stem cells favour healing of the cutaneous radiation syndrome in a xenogenic transplant model. *Ann Hematol* 86(1): 1-8 ; 2007. DOI : 10.1007/s00277-006-0166-5

Gimble JM, Grayson W, Guilak F, Lopez MJ, Vunjak-Novakovic G. Adipose tissue as a stem cell source for musculoskeletal regeneration. *Front Biosci (Schol Ed)* 3: 69-81; 2011. DOI: 10.2741/s133

Hill RP, Rodemann HP, Hendry JH, Roberts SA, Anscher MS. Normal tissue radiobiology: from the laboratory to the clinic. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 49(2): 353-365 ; 2001. DOI : 10.1016/S0360-3016(00)01484-X

Hopewell JW. The skin: its structure and response to ionizing radiation. *Int J Radiat Biol* 57: 751-773; 1990. DOI: 10.1080/09553009014550911

Kusano KF, Pola R, Murayama T, Curry C, Kawamoto A, Iwakura A, Shintani S, Ii M, Asai J, Tkebuchava T, Thorne T, Takenaka H, Aikawa R, Goukassian D, von Samson P, Hamada H, Yoon YS, Silver M, Eaton E, Ma H, Heyd L, Kearney M, Munger W, Porter JA, Kishore R, Losordo DW. Sonic hedgehog myocardial gene therapy: tissue repair through transient reconstitution of embryonic signaling. *Nat Med* 11(11): 1197-1204 ; 2005. DOI : 10.1038/nm1313

Lataillade JJ, Doucet C, Bey E, Carsin H, Clairand I, Bottolier-Depois JF, Chapel A, Ernoud I, Gourven M, Boutin L, Hayden A, Carcamo C, Buglova E, Joussemet M, De Revel T, Gourmelon P. New approach to radiation burn treatment by dosimetry-guided surgery combined with autologous mesenchymal stem cell therapy. *Regen Med* 2: 785-794; 2007. DOI: 10.2217/17460751.2.5.785

Lefaix JL, Delanian S. Le syndrome cutané radio-induit. In: De Revel T, Gourmelon P, Vidal D, eds. *Nuclear, Radiobiological, Biological, Chemical: terrorist threat and medical approach*. 1st ed. Montrouge: John Libbey Eurotext; 2005: 87-95.

Nakagami H, Morishita R, Maeda Z, Kikuchi Y, Ogihara T, Kaneda Y. Adipose tissue-derived stromal cells as a novel option for regenerative cell therapy. *J Atheroscler Thromb* 13(2): 77-81 ; 2006. DOI : 10.5551/jat.13.77

Peter RU, and Gottlober P. Management of cutaneous radiation injuries: diagnostic and therapeutic principles of the cutaneous radiation syndrome. *Mil Med* 167(2 Suppl): 110-112 ; 2002.

Planat-Benard V, Silvestre JS, Cousin B, Andre M, Nibbelink M, Tamarat R, Clergue M, Manneville C, Saillan-Barreau C, Duriez M, Tedgui A, Levy B, Penicaud L, Casteilla L. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation* 109(5): 656-663 ; 2004.

Pola R, Ling LE, Silver M, Corbley MJ, Kearney M, Blake Pepinsky R, Shapiro, Taylor FR, Baker DP, Asahara T, Isner JM. The morphogen Sonic hedgehog is an indirect angiogenic agent upregulating two families of angiogenic growth factors. *Nat Med* 7(6): 706-711 ; 2001.

Rehman J, Traktuev D, Li J, Merfeld-Clauss S, Temm-Grove CJ, Bovenkerk JE, Pell CL, Johnstone BH, Considine RV, March KL. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation* 109: 1292-1298; 2004. DOI: 10.1161/01.CIR.0000121425.42966.F1

Riccobono D, Agay D, Scherthan H, Forcheron F, Vivier M, Ballester B, Meineke V, Drouet M. Application of Adipocyte-Derived Stem Cells in Treatment of Cutaneous Radiation Syndrome. *Health Physics* 103(2): 120-126 ; 2012. DOI: 10.1097/HP.0b013e318240595b

Schaffler A, Buchler C. Concise review: adipose tissue-derived stromal cells – basic and clinical implications for novel cell-based therapies. *Stem Cells* 25: 818-827; 2007. DOI: 10.1634/stemcells.2006-0589

Stewart GA, Lowrey JA, Wakelin SJ, Fitch PM, Lindey S, Dallman MJ, Lamb JR, Howie SE. Sonic hedgehog signaling modulates activation of and cytokine production by human peripheral CD4+ T cells. *J Immunol* 169(10): 5451-5457 ; 2002.

Tibbs MK. Wound healing following radiation therapy: a review. *Radiother Oncol* 42(2): 99-106 ; 1997. DOI : 10.1016/S0167-8140(96)01880-4

Wu Y, Wang J, Scott PG, Tredget EE. Bone marrow-derived stem cells in wound healing: a review. *Wound Repair Regen* 15 Suppl 1: S18-26; 2007. DOI: 10.1111/j.1524-475X.2007.00221.x

Zaragosi LE, Billon N, Ailhaud G, Dani C. Nucleofection is a valuable transfection method for transient and stable transgene expression in adipose tissue-derived stem cells. *Stem Cells* 25(3): 790-797 ; 2007. DOI : 10.1634/stemcells.2006-0235

Zhou X, Liu Z, Jang F, Xiang C, Li Y, He Y. Autocrine Sonic hedgehog attenuates inflammation in cerulein-induced acute pancreatitis in mice via upregulation of IL-10. *PLoS One* 7(8): e44121 ; 2012.

Zuk PA. The adipose-derived stem cell: looking back and looking ahead. *Mol Biol Cell* 21: 1783-1787; 2010. DOI: 10.1091/mbc.E09-07-0589

FIGURES LEGENDES

Figure 1: Shh-ASCs analysis. A) Flow cytometric evaluation of GFP cells 2 days after transfection; B) Western blot analysis of intra cellular Shh cells content and of Shh secreted protein in culture media from day 2 to 9 days after transfection.

Figure 2: Clinical evolution of controls (group 1: A, B), autologous ASCs injected animals: (group 2: C, D) and Shh-ASCs injected animal (group 3: E, F) from 55 to 92 days post irradiation.

III) DISCUSSION

Le choix des cellules souches dérivées du tissu adipeux comme outil de thérapie cellulaire pour le traitement du syndrome cutané radio-induit se fonde sur leur capacité à moduler les mécanismes clés de la cicatrisation du tissu cutané (Zuk *et al*, 2001 ; Izadpanah *et al*, 2006), sur leurs propriétés immunomodulatrices (Cui *et al*, 2007 ; Ivanova-Todorova *et al*, 2009) ainsi que sur l'accessibilité et l'abondance de leur tissu d'origine (Fraser *et al*, 2006 ; Hass *et al*, 2011). Bien que plus abondantes que les BM-MS-C, le temps de culture nécessaire pour obtenir des greffons de taille clinique peut limiter leur utilisation au traitement de patients isolés. Pour pallier cet obstacle, il est impératif d'optimiser le potentiel *in situ* de ces cellules. Notre groupe a ainsi développé une stratégie de manipulation *ex vivo* des cellules souches dans un but de production/sécrétion de facteurs trophiques enrichissant leur sécrétome. Les injections locales itératives de cellules souches dans la zone irradiée après leur modification permettrait la sécrétion de la protéine d'intérêt dans le territoire lésé, stimulant ainsi le(s) processus favorisant la régénération cutanée. De plus, l'injection locale des cellules, comme réalisée en clinique humaine à l'HIA Percy (Lataillade *et al*, 2007 ; Bey *et al*, 2010b), doit permettre de maximiser l'apport cellulaire *in situ*, même si l'existence d'un tropisme vers les tissus lésés a été documentée après injection systémique (Kern *et al*, 2006 ; Salgado *et al*, 2010).

La protéine choisie pour ce travail de thèse est la protéine Sonic Hedgehog (Shh), décrite comme impliquée non seulement dans l'embryogenèse (Capdevila and Johnson, 2000 ; Chuong *et al*, 2000) mais également dans la néo-angiogenèse (Pola *et al*, 2001 ; Donahue, 2006 ; Lee *et al*, 2007 ; Dohle *et al*, 2010), la prolifération cellulaire (Fan and Khavari, 1999 ; Parisi and Lin, 1998 ; Bhardwaj *et al*, 2001) et l'inflammation (Stewart *et al*, 2002 ; Benson *et al*, 2004 ; Zhou *et al*, 2012).

Pour limiter le caractère pro-tumoral (Wicking and McGlinn, 2001 ; Marini *et al*, 2011) de la protéine d'intérêt, la modification génétique des ASC doit être transitoire. Nous avons ainsi choisi la technique de nucléofection pour introduire directement mais de façon non intégrative le plasmide codant pour Shh dans le noyau des ASC. Cette technique a été décrite comme une méthode fiable de transfection transitoire (Aluigi *et al*, 2006 ;

Zaragosi *et al*, 2007). L'absence de vectorisation virale est en effet souhaitable pour une utilisation en clinique humaine même si le taux de transfection par des vecteurs viraux reste décrit comme plus élevé (Mellott *et al*, 2013). L'efficacité de transfection par nucléofection est cependant supérieure à celle obtenue avec les agents chimiques, et ce dans de nombreux types cellulaires malgré une viabilité moindre. Ce dernier paramètre pouvant être un obstacle à l'obtention d'un greffon de taille clinique, il est donc nécessaire de pallier cela par une action locale et ciblée des cellules injectées.

La densité cellulaire conditionnant l'efficacité de la transfection, les premiers travaux réalisés ont donc porté sur la détermination du niveau de confluence optimal des ASC avant transfection pour obtenir un taux de survie maximal. Nos résultats ont montré que le pourcentage de survie maximal des ASC transfectées avec pIRES2 EGFP-Shh était obtenu pour une confluence de 90%. Ce résultat n'est pas en accord avec les recommandations d'utilisation du fournisseur qui certifiait que, dans le cas de cellules adhérentes, des densités cellulaires importantes pouvaient réduire l'efficacité de transfection. Cette observation est cependant en accord avec l'étude comparative de Maurisse *et al* qui recommandait, dans le cas des techniques non virales une évaluation empirique de l'efficacité de transfection et de la survie cellulaire, paramètres dépendants du type cellulaire et de l'espèce (Maurisse *et al*, 2010). L'efficacité de transfection de 90% pour des cellules souches adhérentes humaines n'a été que de 25 à 35% dans notre étude. Cette différence peut s'expliquer par le fait que le tampon de transfection utilisé, de composition inconnue, est spécifique des cellules souches humaines et non porcines. Ainsi il est possible qu'il y ait eu une forte spécificité d'espèce ou une faible sensibilité des cellules de porc. L'utilisation du programme de nucléofection « high efficiency » de l'AMAXA™2D, en place du programme « high viability » utilisé dans cette étude, pourrait permettre d'accroître l'efficacité de transfection en déterminant également la densité cellulaire optimale permettant un meilleur taux de survie. Par ailleurs, la technique de nucléofection a été choisie pour sa sécurité et l'entrée du matériel génétique dans le noyau (sans intégration au génome), permettant ainsi une très bonne expression du plasmide. Cependant bien que les études comparatives montrent actuellement une efficacité moindre des méthodes de transfection lipidique, de nouveaux réactifs et techniques basés sur les propriétés des composés liposolubles telles que les nanoparticules lipidiques semblent prometteurs et devront être envisagés (Apaolaza *et al*, 2014 ; Pensado *et al*, 2014 ; Vankayala *et al*, 2014 ; Wang *et al*, 2014). Il sera également intéressant d'anticiper les

pertes cellulaires occasionnées par les étapes de décollement, en augmentant sensiblement le nombre d'ASC en culture.

La détection par western-blot de la protéine Shh après transfection a permis de mettre en évidence une présence intracellulaire transitoire de la protéine d'intérêt (dès J2 post-transfection) avec une augmentation croissante de la sécrétion de Shh pendant 9 jours dans le milieu de culture. Pour optimiser l'action *in situ* du greffon ASC-Shh, il est nécessaire que la sécrétion de cette protéine soit en phase croissante au moment de l'administration. Les résultats obtenus par Forcheron *et al* ont mis en évidence que les ASC injectées localement étaient détectées jusqu'à quatre jours après greffe au niveau du site d'administration (Forcheron *et al*, 2012). Ces résultats *in vivo* combinés à nos résultats sur la cinétique de sécrétion de Shh par les ASC-Shh *in vitro*, nous ont permis d'établir un intervalle de temps optimal entre la transfection et l'injection des cellules (Tableau VII). Afin d'évaluer l'effet bénéfique des ASC-Shh sur le développement du SCR, nous avons choisi de transfecter les ASC cinq jours avant leur injection. Selon le plan expérimental d'injection (Figure 21, §partie 1), les ASC-Shh implantées localement dans la zone lésée devraient ainsi avoir un potentiel de sécrétion de Shh maximal et transitoire pendant environ quatre jours. Cette courte période d'implantation du greffon et de sécrétion empêchera une action prolongée de Shh dans un contexte inflammatoire aigu minimisant le risque d'une potentielle iatrogénie. En effet, bien que Shh ait été décrite comme un facteur anti-inflammatoire, elle est également impliquée dans le processus évolutif de la dérégulation inflammatoire lors de la tumorigénèse (cancer gastrique et pancréatique) (Morton and Lewis, 2007 ; Sherman and Zavros, 2011).

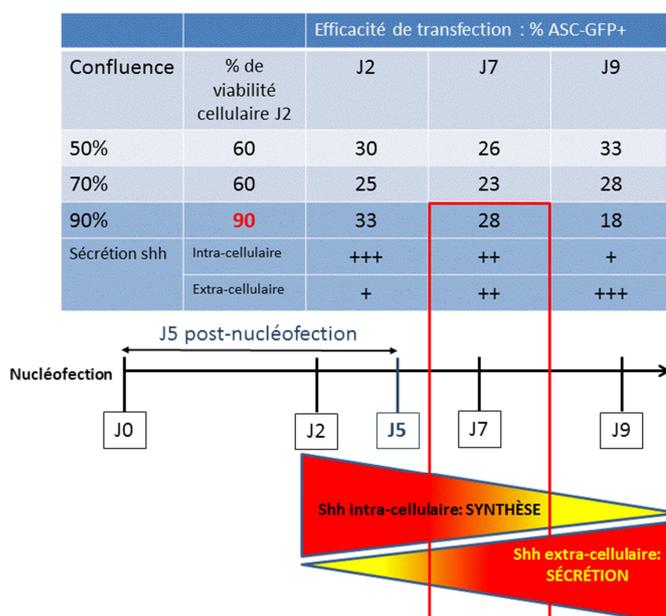


Tableau VII : Tableau récapitulatif des résultats d'optimisation du protocole de thérapie génique *in vitro*.

Pour évaluer *in vivo* le potentiel thérapeutique de l'injection d'ASC-Shh dans le traitement du syndrome cutané radio-induit, des injections locales itératives ont été évaluées sur le modèle miniporc précédemment utilisé par notre groupe. Les résultats ont été comparés à ceux préalablement obtenus chez des animaux témoins irradiés et des animaux irradiés traités par des injections locales répétées d'ASC autologues (Forcheron *et al*, 2012). Un premier animal a été mis en expérimentation pour étudier la tolérance au traitement.

On note tout d'abord une très bonne tolérance au traitement sans perte d'appétit de l'animal ou d'altération de l'état général. Par ailleurs, suite aux premières injections d'ASC-Shh (à J25 et J46 post irradiation ; Figure 21, §partie 1), une courte phase inflammatoire locale dans la zone d'administration des cellules est apparue, qui ne semble pas liée à la sécrétion *in situ* de Shh car également observée chez les animaux ayant reçu les ASC autologues non manipulées. Une activité anti-inflammatoire de Shh dans certains contextes tels que la pancréatite aiguë a d'ailleurs été rapportée (Zhou *et al*, 2012), diminuant ainsi la possibilité d'une action pro-inflammatoire induite par Shh. Cette phase inflammatoire n'apparaît par ailleurs pas délétère pour l'évolution cicatricielle, et semble même bénéfique comme observé après les injections d'ASC autologues.

Cliniquement, au point d'arrêt de l'étude, l'animal recevant les ASC-Shh présentait une cicatrisation des lésions sans douleur ni développement de nécrose similaire à celle observée avec les ASC autologues. On note un défaut sous cutané correspondant à une fibrose des tissus plus importante que celle observée chez les animaux recevant des ASC autologues. Cette différence peut s'expliquer par la quantité deux fois plus faible de cellules injectées à chaque greffe. En effet seules 25±7% des cellules injectées exprimaient Shh, et l'animal a reçu quatre injections itératives de 25±7.10⁶ versus 50.10⁶ pour les greffons autologues. Ce résultat qui devra être confirmé (sur des miniporcs greffé de façon itérative avec 25x10⁶ d'ASC autologues non manipulées), suggère que l'efficacité *in vivo* des ASC a été accrue par leur capacité à produire localement Shh. Pour confirmer cet effet, il serait de plus, important de comparer la qualité du réseau vasculaire de la lésion et le taux de prolifération des cellules endothéliales chez les animaux irradiés-greffés par des ASC autologues versus des ASC-Shh. Cette étude permettrait de confirmer que Shh a eu une action ciblée *in situ*.

L'ensemble de cette première étude préclinique réalisée sur un miniporc a permis de confirmer la faisabilité de la stratégie d'une thérapie génique transitoire fondée sur l'optimisation des ASC par manipulation *ex vivo* pour le traitement du SCR. Il est cependant nécessaire de confirmer l'effet observé en augmentant la cohorte d'animaux pour réaliser une analyse statistique et d'évaluer l'effet d'injections d'ASC-Shh de taille croissante. Globalement une meilleure compréhension des mécanismes d'actions des ASC manipulées ou non reste cependant requise pour optimiser la manipulation des ASC. Cette recherche a fait l'objet du troisième volet de notre travail de thèse.

PARTIE III

**ETUDE MECANISTIQUE DE LA
MODULATION DE LA REPONSE
CELLULAIRE A L'IRRADIATION PAR
LES ASC/ASC-Shh.
IMPLICATION D'UNE ACTIVITE PRO-
ANGIOGENIQUE**

PARTIE III : ETUDE MECANISTIQUE DE LA MODULATION DE LA REPONSE CELLULAIRE A L'IRRADIATION PAR LES ASC/ASC-SHH. IMPLICATION D'UNE ACTIVITE PRO-ANGIOGENIQUE

La capacité des cellules souches d'origine adipocytaire (ASC) à moduler les processus de cicatrisation et de régénération tissulaire semble, pour la plupart des auteurs, impliquer principalement des mécanismes sécrétoires (Chamberlain *et al*, 2007) même si le rôle des processus de transdifférenciation reste à préciser. Les ASC représentent par là même, un médicament cellulaire innovant. Leur optimisation par manipulation *ex vivo* dans le but d'introduire un matériel génétique codant pour une protéine sélectionnée permettrait d'enrichir leur sécrétome en ciblant dans notre problématique les processus biologiques clés du traitement du SCR : immunomodulation, stimulation de l'angiogenèse et de la prolifération cellulaire (Kim *et al*, 2013). Ces processus étant communs à la tumorigenèse, il n'apparaît pas souhaitable de prolonger dans le temps leur activation ce qui constitue le fondement d'une approche de thérapie génique transitoire, c'est-à-dire sans intégration du matériel génétique dans le génome lors de la transfection (Zaragosi *et al*, 2007). La première protéine candidate évaluée dans notre travail est la protéine Sonic Hedgehog (Shh) sélectionnée pour son implication dans la prolifération cellulaire et la néoangiogenèse (Bambakidis and Onwuzulike, 2012).

Dans notre étude nous avons choisi dans un premier volet d'étudier tout particulièrement la réponse des fibroblastes après irradiation aux traitements par le sécrétome des ASC et ASC-Shh. Cette composante clé du tissu dermique subit en effet un stress biologique intense lors de l'irradiation. Cette réponse a été évaluée en terme de

- lutte contre le stress oxydant
- réparation des dommages à l'ADN
- survie cellulaire
- réponse inflammatoire
- sécrétion de facteurs pro-angiogéniques

Dans un deuxième volet nous avons choisi d'évaluer l'activité pro-angiogénique des ASC et des ASC-Shh *in vivo* dans un modèle murin de Matrigel™ chargé avec ces cellules. Une

évaluation de la quantité d'hémoglobine présente dans ces Matrigel TM ainsi qu'une analyse immunohistochimique pour mettre en évidence la présence de cellules endothéliales fonctionnelles ont été réalisées.

I) MATERIELS ET METHODES

I.A) Evaluation de l'effet des milieux conditionnés sur des fibroblastes porcins irradiés

I.A.1) Culture des fibroblastes dermiques de miniporcs

Les cellules utilisées sont des fibroblastes de miniporcs Göttingen (Ellegaard, Dalmoose, Danemark) obtenus à partir de prélèvements cutanés. Le derme et l'endoderme ont été isolés de l'épiderme puis dilacérés au scalpel. Les fragments obtenus ont été déposés dans des flasques de 25 cm² en présence de DMEM glutaMAX (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, USA) contenant 10% de SVF décomplémenté, 100 U.mL⁻¹ de pénicilline, 100 µg.mL⁻¹ de streptomycine, 2,5 µg.mL⁻¹ de fungizone (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, USA) et incubés à 37°C sous atmosphère humide à 5% de CO₂. Les cellules commencent à s'expandre autour des explants après deux à trois jours de culture. A confluence, elles ont été décollées avec 1 ml de trypsine-EDTA et Versène (v/v) (Gibco-Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) pendant 5 min à 37°C. La trypsine a été inactivée par 2 mL de RPMI contenant 10% de SVF décomplémenté. Après centrifugation à 400g pendant 10 min à 18°C, le culot cellulaire a été repris dans 2 mL de milieu DMEM et les cellules ont étéensemencées en flasques de 150 cm² (6 600 cellules/cm²). Les fibroblastes ont ensuite été cultivés dans le même milieu que précédemment (sans fungizone), renouvelé tous les deux jours. Les fibroblastes prélevés étaient issus de trois miniporcs.

Pour obtenir une quantité de cellules suffisante pour l'étude, les fibroblastes dont le temps de doublement est de 24 à 30 heures ont été mis en culture six semaines avant l'irradiation.

I.A.2) Protocole expérimental

I.A.2.a) Production de milieux conditionnés

Un milieu conditionné se définit comme un milieu contenant les facteurs libérés par des cellules en culture. Il est composé des protéines secrétées par la voie classique de

l'appareil de Golgi et du réticulum endoplasmique ainsi que des protéines libérées depuis la surface cellulaire et des protéines intracellulaires excrétées par des vésicules extracellulaires (VE) (exosomes et microvésicules) (Katsuda *et al*, 2013).

Pour obtenir des milieux conditionnés (MC), sept jours avant l'irradiation des fibroblastes, des ASC ont été réensemencées ou transfectées par Shh (ASC-Shh) et mises en culture en milieu MEM α (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, USA) supplémenté avec 10% de SVF, 100 U.mL⁻¹ de pénicilline et 100 μ g.mL⁻¹ de streptomycine (Figure 31).

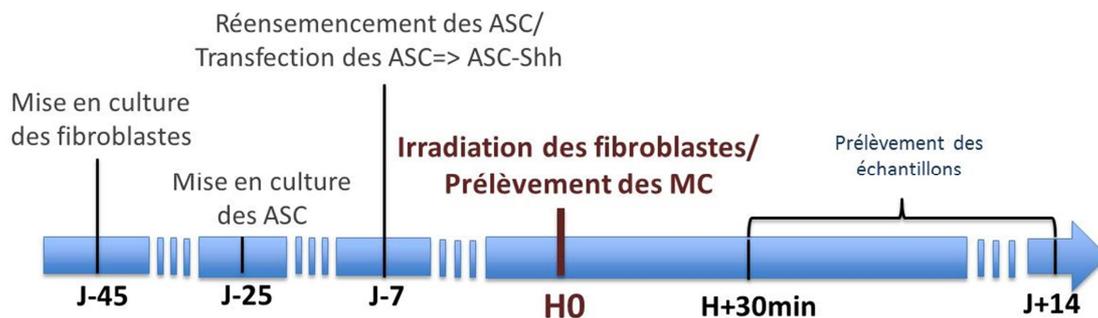


Figure 31 : Schéma récapitulatif de la chronologie expérimentale.

Les fibroblastes ont été prélevés et mis en culture six semaines avant l'irradiation. Une semaine avant celle-ci, les milieux conditionnés ont été préparés par réensemencement des ASC pour les MC-ASC ou transfection des ASC par le plasmide codant pour Shh pour les MC-ASC-Shh.

Après l'irradiation, les milieux de culture des fibroblastes ont été aspirés et remplacés par les MC. A différents temps post-irradiation les échantillons cellulaires ont été recueillis.

Nous avons étudié trois milieux conditionnés différents pour la culture des fibroblastes irradiés :

- un milieu conditionné produit par des ASCs (**MC-ASC**) cultivées en milieu MEM α (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, USA) supplémenté avec 10% de SVF, 100 U.mL⁻¹ de pénicilline et 100 μ g.mL⁻¹ de streptomycine
- un milieu conditionné produit par des ASCs transfectées par Shh (**MC-ASC-Shh**) cultivées en milieu MEM α (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, USA) supplémenté avec 10% de SVF, 100 U.mL⁻¹ de pénicilline et 100 μ g.mL⁻¹ de streptomycine

- un milieu standard DMEM glutaMAX (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, USA) supplémenté en SVF 10%, 100 U.mL⁻¹ de pénicilline et 100 µg.mL⁻¹ de streptomycine (**Milieu Témoin**)

Selon les paramètres étudiés, un contrôle négatif a été réalisé et défini dans ce travail comme : **contrôle non irradié**. Il était constitué de fibroblastes n'ayant subi aucune irradiation, cultivés dans du DMEM glutaMAX (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, USA) supplémenté en SVF 10%, pénicilline et streptomycine.

Le jour de l'irradiation des fibroblastes, les milieux conditionnés par les ASC (MC-ASC) et par les ASC-Shh (MC-ASC-Shh) ont été obtenus en récupérant les surnageants après centrifugation (400g pendant 10 min à 18°C).

Après l'irradiation, le milieu de culture des fibroblastes a été aspiré et remplacé par les différents milieux conditionnés : MC-ASC, MC-ASC-Shh et milieu témoin, à raison de 1 ml ou 500 µl respectivement dans les puits des plaques 6 ou 24 puits.

Ce protocole est résumé dans la figure 32.

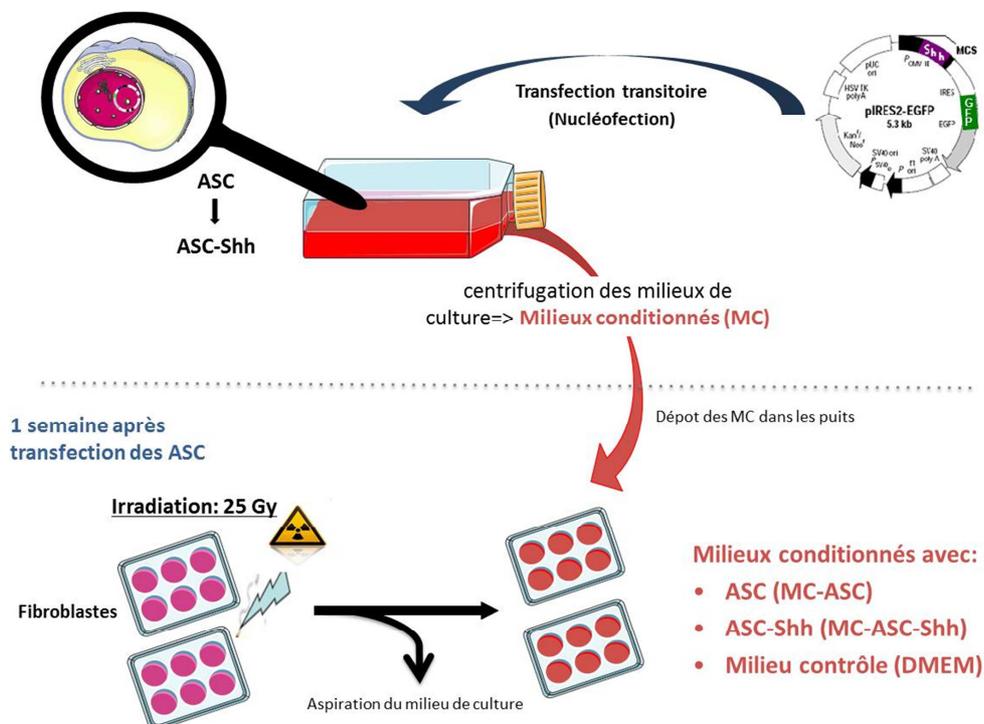


Figure 32: Protocole expérimental d'étude des effets des milieux conditionnés par des ASC ou des ASC-Shh sur des fibroblastes irradiés.

I.A.2.b) Irradiation

Sept jours après la transfection/réensemencement des ASC (qui permettent la production des milieux conditionnés), les fibroblastes ont été irradiés en plaques 6 ou 24 puits à la dose de 25 Gy (débit de dose : 1,4 Gy/min, source Cs¹³⁷) dans un irradiateur auto-protégé IBL-637 (CIS BIO, Saclay, France).

Immédiatement après irradiation, le milieu de culture a été éliminé et remplacé par les milieux conditionnés à évaluer et le milieu témoin (Figures 31 et 32).

I.A.2.c) Choix des paramètres évalués

Les effets des milieux conditionnés sur les fibroblastes irradiés ont été évalués sur les principales conséquences biologiques de l'irradiation : la variation du statut rédox, les dommages à l'ADN, la mort cellulaire et l'adaptation de l'expression génique des cellules.

Les effets directs et indirects des rayonnements ionisants par dépôt d'énergie dans la cellule ont été évalués par une étude des dommages à l'ADN (de 30 min à 24 h post-irradiation) et de la variation de concentration des espèces réactives de l'oxygène (ERO).

En radiobiologie, la mort cellulaire se définit par une perte des capacités de prolifération des cellules irradiées. L'analyse de la survie cellulaire a donc compris l'étude de la mort clonogénique à J14 post-irradiation (temps nécessaire pour six doublements de population de fibroblastes), de l'apoptose (réaction précoce), et de la sénescence qui est une mort cellulaire dite « tardive » après irradiation.

L'adaptation des cellules au stress passe également par une modification d'expression génique qui a été étudiée de 6 à 48 heures post-irradiation.

Le tableau suivant illustre les différents paramètres étudiés (Tableau VIII).

Tableau VIII: Evaluation des effets des milieux conditionnés sur les fibroblastes irradiés.

Les différents effets des milieux conditionnés ont été évalués à différents temps post irradiation en fonction de leur cinétique de survenue.

	30min	3h	6h	24h	48h	72h	96h	14jours
Mort clonogénique								√
Apoptose	√	√	√	√				
Sénescence			√	√	√	√	√	
Dommages à l'ADN	√		√	√				
Espèces réactives de l'oxygène	√		√	√	√			
Expression génique	√		√	√	√			

I.A.3) Evaluation des espèces réactives de l'oxygène dans les fibroblastes porcins après irradiation

Pour se protéger des effets toxiques de l'oxygène, les cellules développent des systèmes de défense qui permettent de réguler la production des espèces réactives de l'oxygène. Ces systèmes sont composés d'antioxydants (e.g : le groupe des vitamines A, C et E), d'oligo-éléments et de protéines qui empêcheront le fer de déclencher une production d'ERO. Des enzymes protéolytiques dont le rôle consiste à dégrader les substrats oxydés, complètent cet arsenal. De plus, en fonction de son environnement et de ses caractéristiques génomiques, la cellule n'aura pas le même potentiel anti-oxydant. Le stress oxydant se définit comme étant le résultat d'un déséquilibre entre la balance des pro-oxydants et les systèmes de défense (antioxydants) (Delattre *et al*, 2007). Le potentiel antioxydant des fibroblastes irradiés a été évalué dans les groupes expérimentaux précédemment définis par trois techniques :

- La méthode de FRAP (ferric-reducing anti-oxidant power)
- La mesure de l'activité de la glutathion peroxydase (GPx)
- Le dosage des protéines à groupement thiols

I.A.3.a) Préparation des lysats cellulaires

Trois jours avant irradiation, les fibroblastes ont été ensemencés dans des plaques 6 puits à la concentration de 250 000 cellules/puits. Après irradiation, le milieu a été remplacé par les milieux conditionnés (MC-ASC, MC-ASC-Shh et Milieu Témoin). A 30 minutes, 6 heures, 24 heures et 48 heures post-irradiation le statut du stress oxydant des fibroblastes a été évalué. A chaque temps étudié, les cellules ont été collectées, transférées dans un tube en polypropylène à fond conique, et centrifugées à 400g pendant 10 minutes à 18°C. Le surnageant a été retiré et le culot cellulaire resuspendu dans 5 ml d'une solution isotonique composée de 0,4 M de Trizma Base (WM 121,4) dans de l'H₂O_d ajustée à pH 7,3 avec du HCl puis dilué 2 fois. La suspension a été centrifugée à 400g pendant 5 min à 4°C. Le surnageant a été éliminé et l'opération renouvelée 2 fois. Pour chaque condition un comptage des cellules a été effectué sur cellule de Malassez et les culots secs ont été stockés à -80°C.

Une lyse cellulaire a été réalisée par 5 chocs thermiques congélation/décongélation successifs. La congélation s'effectue dans l'azote liquide à -80°C (2 min) et la décongélation dans un bain marie à 40°C (5 min). La quantification des protéines totales a été effectuée comme décrit précédemment (§Partie 2 : I.A.7.b) Dosage des protéines totales). La mesure de la réduction ferrique, l'activité de la GPx et le dosage des groupements thiols ont été réalisés en utilisant l'automate Hitachi 912 (Hitachi, Roche diagnostics, Almere ; Pays-Bas) en déposant 10 à 20 µl de lysat cellulaire.

I.A.3.b) Test du Ferric Reducing Anti-oxidant Power ou Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP):

La méthode FRAP est un dosage colorimétrique du transfert d'électrons qui évalue la réduction du fer (passage de la forme ferrique à ferreux) en présence d'un antioxydant. Une molécule contenant du fer change de couleur lorsqu'elle est réduite, permettant une quantification par spectrophotométrie. Les avantages de cette méthode sont sa simplicité et sa rapidité. L'inconvénient de cette méthode est qu'elle n'est pas capable de détecter les protéines ou les composés contenant le group -SH, incluant les thiols, qui peuvent transférer l'hydrogène. Le test FRAP sous-estime ainsi souvent l'activité antioxydante

(Schlesier *et al*, 2002 ; Pellegrini *et al*, 2003). L'étude du statut du stress oxydatif des fibroblastes a donc été renforcée par le dosage des groupements thiols.

Le test du FRAP donne une indication sur le pouvoir réducteur, et donc anti-oxydant, global d'une cellule.

Cette méthode développée par Benzie *et al* en 1996 se base sur la réduction d'un complexe tripyridyltriazine ferrique $[(Fe^{3+}TPTZ)_2]$ en un complexe tripyridyltriazine ferreux $[(Fe^{2+}TPTZ)_2]$ par un antioxydant, à pH acide (pH=3,6) (Benzie and Strain, 1996). La réduction du complexe ferrique en complexe ferreux est détectée par l'apparition rapide d'une coloration bleu intense avec un maximum d'absorption à 593 nm.

La quantification par spectrométrie a été réalisée sur 10 μ l de lysat cellulaire auxquels ont été ajoutés 10 μ L d'une solution de travail produite en extemporané, composée d'un tampon d'acétate de sodium, d'une solution de TPTZ et de chlorure de fer (composition en annexe 9). Le mélange a été incubé à 37°C pendant 30 min puis analysé dans l'automate Hitachi 912 (Roche diagnostics, Almere, Netherlands) pour lecture à 595 nm et une gamme d'étalonnage a été réalisée avec du fer ferreux (Fe^{2+}). Les résultats sont exprimés en EC1 (μ M.L⁻¹) qui se définit comme la concentration en anti-oxydant ayant une capacité de réduction du fer ferrique équivalent à 1 mM de sel ferreux, rapportée à la quantité de protéines (g.L⁻¹) soit en EC1/g (μ M.g⁻¹).

I.A.3.c) Dosage des groupements thiols protéiques

Les groupements thiols (-SH) ont des propriétés réductrices en interagissant avec les radicaux hydroxyles et en réparant les radicaux centrés sur le carbone. Ce sont des mécanismes non enzymatiques de lutte contre le stress oxydant. Leur dosage est un marqueur sensible de non oxydation des protéines. Ainsi une diminution du taux de groupement thiols reflètera un état oxydatif des cellules.

Cette technique colorimétrique repose sur les propriétés réductrices des groupements -SH (Favier *et al*, 2014). En présence des groupements thiols, les ponts disulfures contenus dans le réactif d'Ellman ou DTNB (bis-5,5'-dithio-bis (2-nitrobenzoic acid) vont être réduits et former des dérivés thiols aromatiques fortement colorés.

A 20 µl d'échantillon, 330 µl de tampon phosphate (0,05 mmol.L⁻¹ à pH8) et 33 µl de réactif d'Ellman ont été ajoutés. Une lecture à 415 nm a été effectuée avec l'automate Hitachi 912 (Roche diagnostics, Almere, Pays Bas).

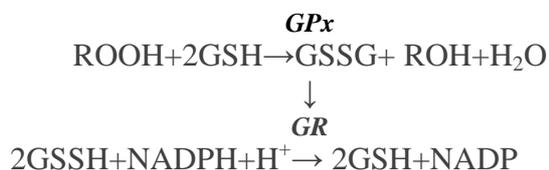
La concentration de groupement thiols est exprimée en U.L⁻¹ et rapporté à la quantité de protéines totales mesurée (U.g⁻¹).

Le dosage des groupements totaux tels qu'il a été réalisé correspond essentiellement aux dosages des groupements thiols protéiques portés par les cystéines. Toute diminution traduit une oxydation des groupements -SH en S-S et donc une altération oxydative des protéines.

I.A.3.d) Activité glutathion peroxydase

La glutathion peroxydase (GPx) est une enzyme séléno-dépendante dont le rôle principal est d'éliminer les peroxydes lipidiques résultant de l'effet du stress oxydant sur les acides gras polyinsaturés.

Le dosage de la glutathion peroxydase est effectué à partir de la formule suivante décrite par Paglia *et al* (Paglia and Valentine, 1967):



Le principe du dosage repose sur la réaction couplée entre la GPx et la glutathion réductase (GR). La GPx catalyse l'oxydation du glutathion réduit (GSH) par l'hydroperoxyde de cumène. En présence de GR, et de NADPH (Nicotinamide Adénine Dinucleotide Phosphate), le glutathion oxydé est immédiatement converti dans sa forme réduite simultanément à l'oxydation de NADPH en NADP⁺. L'activité de la GPx est ainsi déterminée par la mesure de la disparition du NADPH par spectrométrie à 340 nm.

Le Kit RANSEL (Randox laboratories ; Crumlin, Royaume unis) a été utilisé en suivant les instructions du fournisseur [18] pour le dosage des échantillons sur l'automate Hitachi 912 (Roche diagnostics, Almere, Pays-bas).

La concentration de GPx est exprimée en U.L⁻¹ et rapportée à la quantité de protéines totales mesurée (U.g⁻¹).

I.A.4) Evaluation des dommages à l'ADN des fibroblastes porcins après irradiation

Comme pour l'analyse des ERO, les fibroblastes ont étéensemencés 3 jours avant l'irradiation en plaques 6 puits (250 000 cellules/puits) pour étudier les atteintes de l'ADN. Le test des « Comètes » ou SCGE (Single Cell Gel Electrophoresis assay) a été réalisé (Annexe 10). Ce test permet de déterminer le taux de cassures d'ADN et ce, de façon relativement homogène au sein d'une même population cellulaire irradiée (Olive, 2009). Il mesure sur microgel d'agarose les cassures induites directement par l'agent génotoxique et indirectement lors des processus enzymatiques de réparation des dommages ou lors de processus secondaires de fragmentation de l'ADN tel que l'apoptose. L'évaluation des dommages à l'ADN a été réalisée aux temps précoces post-irradiation, 30 minutes, 6 heures et 24 heures.

Le milieu de culture a été éliminé et les fibroblastes récoltés comme décrit précédemment (§Partie 3 : I.A.1) Culture des fibroblasres dermiques de miniporcs). Après centrifugation à 400g pendant 10 min à 18°C, le surnageant a été aspiré et le culot repris puis aliquoté par 100 µl (PBS 1X) à une concentration de 300 000 cellules/ml. 90 µl de la suspension cellulaire ont été mélangés à 90 µl de gel d'agarose low melting à 1,2% (w/v) et déposés sur une lame de microscopie. Une lamelle a été posée sur la préparation et l'assemblage placé 10 min à 4°C à plat et à l'abri de la lumière. Les différentes conditions ont été testées en même temps.

Les lamelles ont été retirées et les cellules lysées par incubation 10 min à 4°C à l'abri de la lumière dans une solution contenant 1% de N-lauroylsarcosine de sodium, 2,5 M NaCl, 100 mM Na₂EDTA, 10 mM Tris-HCl, 1% Triton X-100 et 10% DMSO, pH=10. Cette étape entraîne la destruction des membranes, des protéines et des ARN permettant de libérer les noyaux. Ceux-ci ont ensuite été incubés 1 heure à 4°C à l'abri de la lumière, dans un tampon d'électrophorèse basique constitué de 1 mM Na₂EDTA et 300 nM NaOH, pH>13. Ce tampon basique facilite la dénaturation, la détorsion de l'hélice et l'exposition des sites sensibles aux agents alcalins. L'ADN ainsi relâché a été soumis à une électrophorèse (Tension 25 V, 300 mA), pendant 30 minutes. La migration a ensuite été neutralisée par un rinçage des lames dans un tampon constitué de 0,4 M Tris-HCl, pH=7,5 et une incubation de 1 min dans de l'éthanol absolu à 4°C à l'abri de la lumière. L'ADN a été révélé par addition sur les lames de 50 µl d'un intercalant fluorescent (le bromure

d'éthidium à 20 $\mu\text{l/ml}$). Si l'ADN n'a pas été endommagé celui-ci reste sous forme d'une sphère compacte. En revanche si l'ADN a été endommagé celui-ci présentera en plus, des fragments simples et doubles brins (plus légers) qui migreront en dehors de cette sphère formant un « halo » d'ADN qui s'étire en direction de l'anode décrivant la queue de la comète (exemple Figure 33). Deux propriétés sont importantes pour déterminer la migration de l'ADN : (1) la capacité de l'ADN à migrer qui est fonction de sa taille et donc du nombre de cassures, (2) la longueur de la queue de la comète qui augmente avec le nombre de cassure.

La lecture des lames a été réalisée par microscopie à fluorescence (Leitz Laborluc, Leica, Allemagne), couplée à une caméra HITACHI DENSHI (KP.ME1E/K-S10 Hitachi, Denshi, Japon) à un grossissement x400. Pour chaque échantillon réalisé en triplicat, 50 photos ont été traitées individuellement par le logiciel COMET4Software [19] mesurant la largeur nucléaire et l'ampleur de la migration des fragments d'ADN qui permettent de calculer le « tail moment », comme illustré ci-dessous (Figure 33).

Le « tail moment » est une unité relative tenant compte du pourcentage d'ADN contenu dans la queue de la comète et de sa longueur.

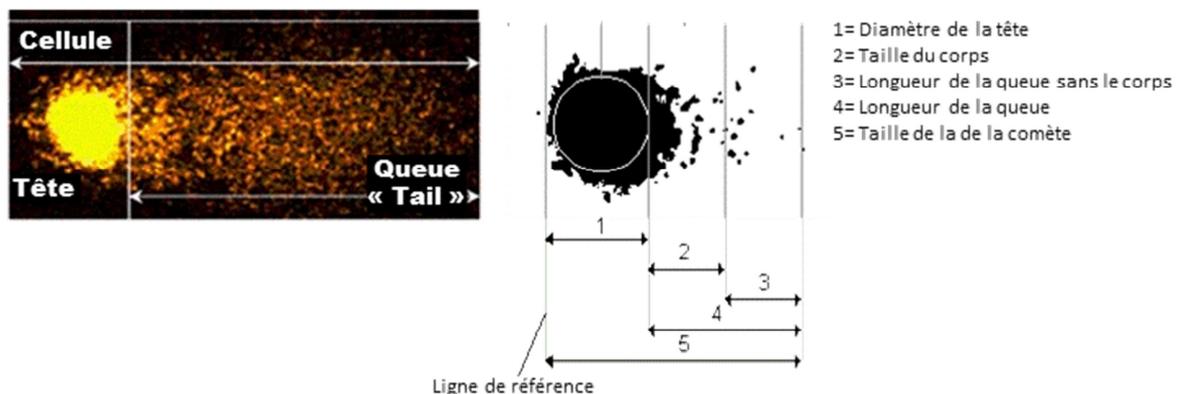


Figure 33 : Exemple de résultats de test SCGE et valeurs permettant de déterminer le tail moment.

Figure réalisée d'après [20].

I.A.5) Evaluation de la survie des fibroblastes dermiques porcins après irradiation

I.A.5.a) Pouvoir de prolifération des fibroblastes irradiés

La capacité des fibroblastes irradiés à former des colonies (CFU-F) à partir d'une cellule initiale a été évaluée par ensemencement dans des flasques de 75 cm² à faible densité. Les fibroblastes irradiés, ont étéensemencés à raison de 10 000 par flasque (130 cellules/cm²) 48 h avant l'irradiation dans du DMEM glutaMAX supplémenté avec 10% de SVF décomplémenté, 100 U.mL⁻¹ de pénicilline et 100 µg.mL⁻¹ de streptomycine. Après irradiation des fibroblastes en flasque, les milieux ont été remplacés par les MC étudiés puis incubés à 37°C sous atmosphère humide à 5% de CO₂. Un contrôle (fibroblastes non irradiés) a été réalisé : 100 fibroblastes non irradiés ont été ensemencés dans une flasque avec du milieu de culture classique (DMEM glutaMAX supplémenté avec 10% de SVF décomplémenté, 100 U.mL⁻¹ de pénicilline, 100 µg.mL⁻¹ de streptomycine) et incubés à 37°C sous atmosphère humide à 5% de CO₂.

Un comptage du nombre des CFU-F à J14 post-irradiation a été effectué au microscope optique après aspiration du milieu de culture, lavage au PBS et incubation pendant quelques secondes dans une solution de cristal violet (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) qui permet de révéler les cellules. Une colonie était considérée en tant que telle à partir de 64 cellules (6 divisions).

Chaque condition a été réalisée en triplicat.

I.A.5.b) Apoptose/ nécrose

Pour étudier le phénomène d'apoptose et de nécrose, les fibroblastes ont été ensemencés en triplicat en plaques 24 puits (50 000 cellules/puits) trois jours avant irradiation.

La mort cellulaire par apoptose implique l'activation en cascade d'enzymes protéolytiques : les caspases et la nécrose se caractérise notamment par une perméabilisation de la membrane et une libération des composants cellulaires. L'étude de

l'apoptose et de la nécrose des fibroblastes irradiés a été réalisée 30 min, 3 h, 6 h et 24 h après l'irradiation respectivement en analysant l'activation des caspases et en détectant les résidus aminés libres à l'extérieur et à l'intérieur des cellules mortes, conséquence de l'augmentation de la perméabilité.

Pour évaluer la mort cellulaire par nécrose, nous avons utilisé le kit LIVE / DEAD® fixable Red Dead Cell Stain (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, USA). Ce test est basé sur la réaction du colorant fluorescent qui réagit avec les résidus aminés cellulaires. Dans notre étude le colorant fluorescent (L23102), peut passer à travers la membrane des cellules nécrotiques et réagir avec les résidus aminés intracellulaires ou présents à la surface de la cellule, entraînant une coloration fluorescente intense. En revanche, pour les cellules viables, seuls les résidus aminés à la surface peuvent réagir avec le colorant, entraînant une coloration relativement faible. Les fibroblastes récoltés dans chaque condition de culture ont été marqués avec 1 µl de Red Live red, et incubés 20 minutes à température ambiante à l'abri de la lumière.

Les cellules ont ensuite été co-marquées pour évaluer la mort cellulaire par apoptose avec le Kit FAM-FLICA apoptosis (ImmunoChemistry Technologies, Bloomington, USA) en suivant les instructions du fournisseur [21]. Des sondes FLICA (Fluorochrom Labeled Inhibitor of Caspases) qui pénètrent dans la cellule et se fixent par liaisons covalentes aux résidus de cystéine spécifique de ces caspases activées ont été utilisées pour marquer ces protéines. Après marquage, les cellules ont été recueillies dans des tubes en polyester de 5 ml, conservées à 4°C à l'abri de la lumière avant d'être analysées par CMF avec un cytomètre BD™ LSR II (BD Biosciences, San José, USA). Pour pouvoir utiliser simultanément deux fluorochromes, leurs spectres d'émission doivent se chevaucher le moins possible. La détection des cellules mortes via le marquage avec le réactif fluorescent L23102 du kit Live Dead Fixable Red Dead s'effectue à une longueur d'onde d'émission de 615 nm (dans le canal de l'APC). La détection des cellules apoptotiques (positives pour les caspases activées) a été réalisée en utilisant la carboxyfluorescéine (FAM) réactif du FLICA (longueur d'émission de 515 à 525 nm ; canal du FITC).

L'acquisition des données a été effectuée avec le logiciel BD FACS Diva 6.0 (BD Biosciences, San José, USA).

Un contrôle positif de validation de cette technique a été réalisé sur des fibroblastes cultivés dans du DMEM supplémenté avec 10% de SVF : et incubés pendant 48 h avec 10 µM d'etoposide, un inhibiteur de la topoisomérase 2, inducteur d'apoptose.

I.A.5.c) Sénescence

Les dommages à l'ADN causés par le stress oxydatif peuvent entraîner une sénescence précoce des cellules exposées (Naka *et al*, 2004). La sénescence est caractérisée par une incapacité de multiplication, une morphologie cellulaire élargie, une production de molécules inflammatoires et une augmentation caractéristique du contenu lysosomal et notamment de la β -galactosidase. L'analyse de l'activité de cette enzyme à pH 6 est un marqueur spécifique des cellules en sénescence, absent dans les cellules pré-sénescences, quiescentes ou les cellules immortalisées. (Dimri *et al*, 1995 ; Itahana *et al*, 2007).

Dans ce travail, pour étudier la sénescence, les fibroblastes ont étéensemencés en plaques 6 puits en triplicat 3 jours avant irradiation (250 000 cellules/puits). L'effet des différents milieux conditionnés sur la sénescence des fibroblastes a été évalué de 6 h à 96 h post-irradiation à l'aide du kit Senescence β -galactosidase Staining Kit (Cell Signaling Technology, Danvers, USA) en suivant les instructions du fournisseur [22]. Pour chaque puits, 5 champs ont été observés par microscopie optique (grossissement $\times 200$) et le pourcentage de cellules β -galactosidases positives (colorées en bleues) a été déterminé.

I.A.6) Etude de l'expression génique des fibroblastes porcins après irradiation

Pour étudier l'expression des ARNm d'intérêt, les fibroblastes ont étéensemencées en plaques 6 puits à raison de 250 000 cellules/puits, en triplicat trois jours avant l'irradiation.

L'objectif de ces expérimentations était d'analyser les variations d'expression des ARN messagers de plusieurs gènes en fonction des différentes conditions de culture des fibroblastes à différents temps post-irradiation : 30 min, 6 h, 24 h et 48 h. Pour ce faire, la technique de la Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR) ou RT-PCR quantitative en temps réel a été utilisée. Cette technique repose sur la quantification relative de l'expression d'un gène cible par rapport à un ensemble de gènes de référence

(gènes de ménage) dont la stabilité est démontrée. Il s'agit ensuite de comparer les variations de ce ratio dans les différentes conditions étudiées.

I.A.6.a) Extraction des ARN totaux

Pour chaque condition expérimentale, après lavage au PBS 1X, les fibroblastes ont été lysés dans 350 μL de Tampon RLT (contenant de la guanidine isothiocyanate; Qiagen, Courtaboeuf, France). Après centrifugation, une extraction des ARN totaux a été effectuée à partir du surnageant chargé dans un automate QIACube (Qiagen, Courtaboeuf, France) en utilisant le RNeasy Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) selon les instructions du fournisseur [10]. Les ARN totaux, chargés négativement à pH acide par le thiocyanate de guanidine sont retenus sur une colonne de silice chargée positivement puis élués dans un volume final de 50 μL . La quantité d'ARN extraite a été déterminée en mesurant l'absorbance à 260 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (ND-1000 ; Labtech, Palaiseau, France). La pureté des échantillons a été évaluée par les rapports 260/230 et 260/280 nm.

I.A.6.b) Transcription inverse

La rétrotranscription a été réalisée à l'aide du Reverse Transcription Core Kit (Eurogentec, Seraing, Belgique), selon les instructions du fournisseur [23].

Cette étape était effectuée à partir de 300 ng d'ARN totaux, avec 50 μM d'amorces oligo d(T), 2.5 mM de dNTP, 20 U. μL^{-1} d'inhibiteur des ribonucléases et 50 U. μL^{-1} de transcriptase inverse (Euroscript RT ; Eurogentec, Seraing, Belgique) pour un volume final de 15 μL .

Après une phase initiale de 10 min dans un bain-Marie à 25°C, la reverse transcription s'est déroulée à 48°C (bain-Marie) pendant 30 min. La transcriptase inverse a été inactivée par la chaleur (5 min en bain sec à 95°C). Les solutions d'ADNc obtenues pour chaque échantillon ont été diluées au 1/2 dans de l'eau (H₂O Light Cyclor Fast start DNA ; Roche, Mannheim, Allemagne) et conservées à -80°C. Une solution standard d'ADNc (pool

d'ADNc) a été réalisée en prélevant 6 μ L de chaque échantillon afin de réaliser la mise au point des amorces de PCR.

I.A.6.c) PCR

Les amorces ont été conçues à l'aide du logiciel MacVector (Accelrys, San Diego, USA) pour recouvrir la jonction intron-exon afin d'empêcher l'amplification d'ADN génomique. La température d'hybridation de même que la compatibilité des amorces entre elles et le produit ont été déterminées par ce même logiciel.

Quatre gènes de références ont été choisis pour cette étude de variation d'expression:

- Cyclophilin A (CycA)
- Tata Box Binding Protein (TBP)
- Attachment Region Binding Protein (ARBP)
- Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-mono-oxygenase activation protein, Zeta polypeptide (YWHAZ)

Les gènes « cibles » étudiés sont :

- p16^(Ink4a) et p53, toutes 2 impliquées dans la régulation du cycle cellulaire
- Interleukine 1 α (IL1 α), Tumor Necrosis Factor α (TNF α) et Interféron γ (IFN γ) impliqués dans l'inflammation
- Angiopoïétine (ANG1), Angiopoïétine 2 (ANG2) et Vascular Endothelial Growth Factor α (VEGF α) tous trois impliqués dans l'angiogenèse

La spécificité des amorces a été vérifiée par l'algorithme Blast [24] et confirmée pour tous les couples d'amorces à l'exception de p16^(Ink4a). En effet, cette protéine est codée sur 3 exons. L'exon 1 est commun avec une autre protéine : p14(ARF). Ces deux protéines de séquence en acides aminés et de structure très différentes en raison d'un épissage alternatif, interviennent toutes les deux dans le blocage du cycle cellulaire. A l'exception de cet

exon 1, la séquence de l'ARNm de ces deux protéines n'est pas répertoriée et aucune homologie n'a pu être mise évidence entre les séquences génomiques de l'Homme et du porc. Les amorces ont donc été synthétisées à partir de l'exon 1 référencé. Cependant, en raison de séquences très riches en G-C, un seul couple d'amorces présentait les caractéristiques nécessaires pour une PCR efficace (pourcentage de G-C, nombre de nucléotide, température de fusion), spécifique à la fois de p16 et p14.

Les amorces ont été synthétisées par la société Eurogentec (Seraing, Belgique) et celles sélectionnées sont listées dans le tableau IX.

L'optimisation des conditions de PCR a été réalisée en testant chaque couple d'amorces sur des gammes-étalons de dilution en série de notre solution mère d'échantillons biologiques.

Tableau IX: Caractéristiques des couples d'amorces utilisés pour l'amplification des ADNc par PCR en temps réel et leurs conditions optimales de PCR.

Gènes	Amorces	Séquences (5' - 3')	Conditions de PCR				Références
			T° Hybrid.	Temps Hybrid.	Conc. amorces	Conc. Mg ²⁺	
CycA	FW	5'-CGAGCTGTTTGCAGACAAAGTTC-3'	53°C	3 sec	0,5 µM	4 mM	NM_214353
	RW	5'-CCTTCTCCCCAGTGTCTCAGAG-3'					
TBP	FW	5'-GATGGACGTTCCGGTTTAGG-3'	53°C	5 sec	0,5 µM	4 mM	DQ_178129
	RW	5'-AGCAGCACAGTACGAGCAA-3'					
YWHAZ	FW	5'-GCAAAAGACGGAAGGTGCTGA-3'	55°C	5 sec	0,5 µM	4 mM	XM_01927228
	RW	5'-TGAAGCATTGGGGATCAAGAAGT-3'					
ARBP	FW	5'-TGATTACACCTTCCCAGTGTGCTG-3'	55°C	5 sec	0,4 µM	4 mM	NM_001098598
	RW	5'-AGCAGCCACAAAGGCAGATG-3'					
IL1a	FW	5'-ATCACCGATGACGACCTGGGAAG-3'	55°C	5 sec	0,4 µM	4 mM	NM_214029
	RW	5'-TGTTGCTGATCTGGGCTTGATG-3'					
TNFα	FW	5'-CCCCAGAAGGAAGAGTTTCCAG-3					NM_214022
	RW	5'-CGACGGGCTTATCTGAGGTTTG-3					
	FW	5'-CCAAGGACTCAGATCATCGTCTCAA-3					NM_214022
	RW	5'-GCATACCCACTCTGCCATTGGA-3					
IFNγ	FW	5'-AGCTTTCAGCTTTCGGTGAAT-3					NM_213948.1
	RW	5'-GAGGTCCACCATTAGGTACATCTGA-3					
	FW	5'-TTCCTAAATGGTAGCTCTGGGAAAC-3					NM_213948.1
	RW	5'-TTGATGAGTTCAGTATGGCTTTG-3					
P16	FW	5'-GCCACGCTCGCTCAAATC-3'	54°C	8 sec	0,4 µM	3 mM	NM_213735.1
	RW	5'-GTTGCAGTATCTCTGGGTTTCAATG-3'					
P53	FW	5'-CGAGATGTTCCGAGAGCTGAATG-3'	59°C	5 sec	0,4 µM	4mM	NM_213824.3
	RW	5'-AGGGAGACTGCCCTTCTTAGAC-3'					
VEGFα	FW	5'-TGTGCCACTGAGGAGTTCAAC-3'	55°C	8 sec	0,4 µM	4 mM	NM_214084
	RW	5'-TGTTGTGCTGTAGGAAGCTCATCTC-3'					
ANG1	FW	5'-CCACCACCAATAACAGTGTCTTC-3'	60°C	8 sec	0,4 µM	4 mM	NM_213959
	RW	5'-GCAAAGGTTGACGAGATTATGCAC-3'					
ANG2	FW	5'-GGACAGTATTACGCGACGTGAAG-3'					NM_213808
	RW	5'-AACTCATTCCAGCCAGTGTTC-3'					
	FW	5'-TTAGCACAAAGGACGCAGACAAC-3'					NM_213808
	RW	5'-TCTGTGGGTAGTACATCCGTTTCAAG-3'					
	FW	5'-AACAAACCAGCGGCACCTACAC-3'					NM_213808
	RW	5'-CCTCCACCCGTTTCCATGTC-3'					
	FW	5'-GACGCAGACAACGACAAATGTATC-3'					NM_213808
	RW	5'-AAGGACCGCAGGCATCAAAC-3'					

Les conditions de PCR sont les températures d'hybridation (T° Hybrid) en °C, les temps d'hybridation des amorces en secondes, la concentration des amorces en µM, la concentration en magnésium Mg²⁺ en mM.

Les 4 gènes de références sont : CycA: Cyclophilin A ; TBP: TATA Box Bindingprotein ; YWHAZ : Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, Zeta polypeptide ; ARBP: Attachment Region Binding Protein.

Les gènes étudiés sont : IL1a: Interleukine 1a ; TNFα : Tumor Necrosis Factor α ; IFNγ : Interféron γ ; p16: Cyclin dependent kinase 2A ; p53: Tumor Suppressor Protein 53 ; VEGFα: Vascular Endothelial Growth Factor α ; ANG1: Angiopoietin 1 ; ANG2: Angiopoietin 2.

■ Gènes de références ; ■ Gènes pro-inflammatoires ; ■ Gènes du cycle cellulaire
■ Gènes pro-angiogéniques

La température optimale d'hybridation, de même que les concentrations optimales d'amorces et de Mg^{2+} ont ainsi pu être déterminées (Tableau 9). La spécificité de l'amplification a été confirmée par l'analyse des courbes de fusion : les pics de fusion des produits de transcription inverse et d'ADN recombinant étaient identiques. Concernant les amorces de l'angiopoïétine 2, quatre couples d'amorces rassemblaient les conditions théoriques nécessaires mais pour aucune d'entre elles les conditions permettant de réaliser une PCR efficace n'ont pu être déterminées. De même pour les amorces de l'IFN γ et du TNF α , aucunes conditions permettant de réaliser une PCR spécifiques n'ont pu être sélectionnées.

La PCR quantitative a été réalisée avec le Light Cycler Fast Start DNA Master Syber Green kit (Roche Applied Science, Mannheim, Allemagne) dans un volume final de 20 μ L en utilisant le Light Cycler (Roche Applied Science, Mannheim, Allemagne) pendant 50 cycles de 20 sec à 95°C (dénaturation), de 5 sec à 54–60°C (température d'hybridation, qui est amorce-dépendante, tableau 9) et une étape finale de 8 sec à 72°C (élongation). Pour chaque gène, les Cq (quantification Cycle) de chaque échantillon ont été relevés. Le Cq est une valeur relative qui représente le nombre de cycles de PCR nécessaire pour que le nombre de copies amplifiées d'ADNc atteigne un niveau seuil de détection prédéterminé (Johnson *et al*, 2014).

Pour l'analyse des données, il est nécessaire de limiter les variations expérimentales inter-échantillons liées aux conditions de RT-PCR par l'utilisation de gènes de références. Les gènes de références, comme les gènes d'intérêts analysés, sont affectés par tous les facteurs de variation durant le processus expérimental et jouent le rôle de contrôle interne. Ainsi, l'expression de chaque gène d'intérêt est exprimée par rapport à la moyenne géométrique de plusieurs gènes de référence dont l'absence de variabilité a été validée sur nos échantillons par l'analyse GeNorm®. Cette méthode, dont le principe majeur est que le rapport d'expression de deux gènes stables doit être constant au travers des échantillons, consiste à sélectionner les gènes de référence les plus stables pour le calcul d'un facteur de normalisation approprié. Pour notre travail, la normalisation a été validée par le logiciel GeNorm® en utilisant la moyenne géométrique des gènes CycA, TBP, ARBP et YWHAZ. Pour l'analyse statistique, les valeurs normalisées ont été standardisées à partir des valeurs de Cq relevées, en suivant les instructions de Willems *et al* (Willems *et al*, 2008). Tout d'abord, une transformation log10 des valeurs normalisées a été réalisée. Les valeurs

relatives normalisées de chaque triplicats d'un même porc ont ensuite été centrées par la moyenne en soustrayant le niveau d'expression moyen normalisé des triplicats du porc correspondant. Pour compléter cette standardisation, les moyennes centrées obtenues ont été divisées par l'écart-type expérimental ce qui permet d'obtenir des valeurs normalisées centrées réduites. Ce sont ces valeurs relatives qui ont été utilisées pour l'analyse statistique décrite ultérieurement.

I.A.7) Analyse statistique

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, USA) pour comparer la survie des fibroblastes dans les différents milieux conditionnés (apoptose, sénescence et clonogénicité) à différents temps post-irradiation. La même méthode a été utilisée pour l'étude des dommages à l'ADN, du stress oxydant intracellulaire et de l'expression des ARNm d'intérêt : par comparaison globale des lots sur échantillons non appariés. L'analyse a été effectuée par le test de Kruskal-Wallis (alternative non paramétrique de l'analyse de variance pour échantillons non appariés).

Pour une même condition de culture, la comparaison statistique du pourcentage de sénescence à chaque temps post-irradiation a été réalisée sur échantillons appariés par le test de Friedman (alternative non paramétrique de l'analyse de variance pour échantillons appariés).

Lorsque cela était nécessaire, une comparaison des lots deux à deux a été réalisée par le test *post hoc* de Dunn. Ce test proche du test de Bonferroni-Holm permet de contrôler l'inflation secondaire aux comparaisons multiples.

La différence était considérée comme significative pour une *p-value* $p < 0,05$.

I.B) Evaluation des propriétés pro-angiogéniques des ASC et ASC-Shh *in vivo* dans un modèle de Matrigel™

L'étude de l'effet pro-angiogénique des ASC et des ASC-Shh a été approfondie *in vivo* par une évaluation de la néoangiogenèse sur un modèle de BD Matrigel™ chez la souris. Ce protocole a été réalisé avec l'accord du comité d'éthique de l'IRBA (N°2012/17.0).

I.B.1) Souris NOD/SCID $\beta 2^{-/-}$

Les souris NOD/SCID (Non Diabetic Disease/ Severe Combined Immune Deficiency) ont été produites pour la 1^{ère} fois par Schult *et al* en 1995 (Shultz *et al*, 1995). Elles sont issues d'un croisement entre des souris NOD présentant un déficit en cellules NK, une absence de complément circulant et une déficience dans la différenciation des cellules présentatrices d'antigènes, et des souris SCID, présentant un déficit sévère en lymphocytes B et T fonctionnels. L'immunotolérance de ces souris restant cependant partielle, un nouveau modèle de souris NOD/SCID $\beta 2^{-/-}$ a été créé par excision du gène de la $\beta 2$ microglobuline inactivant l'activité NK (Natural Killer). Elles présentent ainsi un déficit supplémentaire de l'immunité cellulaire (Kollet *et al*, 2000).

Dans cette étude, les souris NOD/SCID $\beta 2^{-/-}$ ont été acquises auprès du Dr F. Blanquet (Plateau de Haute Technologie Animale, Institut Jean Roger, Université Joseph Fourier, France).

27 souris : 9 males et 18 femelles ont été hébergées en portoir ventilé. Les injections de Matrigel™ (décrites ultérieurement) ont été effectuées par voie sous cutanée au niveau du dos, en conditions stériles (manipulation sous un poste de sécurité microbiologique) et sous anesthésie gazeuse (isoflurane).

Trois groupes de 9 animaux contenant chacun trois males ont été constitués:

- Un groupe contrôle
- Un groupe recevant des Matrigel™ chargés en ASC
- Un groupe recevant des Matrigel™ chargés en ASC-Shh

Chaque cage contenait un animal de chaque groupe de manière à minimiser l'effet cage. Au terme de l'expérimentation les souris ont été euthanasiées par dislocation cervicale.

I.B.2) Conception de l'implant

Le BD Matrigel™ (BD Sciences, Bedford, USA) est un produit liquide à -4°C et gélatineux à 37°C. Il est produit à partir d'une préparation de membrane basale solubilisée extraite de sarcome de souris, tumeurs riches en protéines de la matrice extracellulaire.

Des BD Matrigel™ Growth Factor Reduced n'induisant pas par eux même leur colonisation par des structures vasculaires (Ohashi *et al*, 2011), ont été utilisés afin d'évaluer les propriétés des ASC et des ASC-Shh sur la néo-vascularisation.

Les ASC ont étéensemencées ou transfectées par Shh quatre jours avant implantation des gels dans les souris NOD/SCID $\beta 2^{-/-}$. Le jour de l'implantation les cellules ont été décollées avec de la trypsine comme décrit précédemment (§Partie 2 : I.A.4) Culture des ASC et ensemencement) et centrifugées à 400g pendant 10 min à 10°C. Le culot cellulaire a été repris dans 200 μ l de PBS 1X et compté sur cellule de Malassez. Les Matrigel™ préalablement décongelés et conservés à +4°C ont été répartis dans des Falcons® de 50 ml. Après dépôt des ASC et ASC-Shh dans les Matrigel™ une homogénéisation a été réalisée. Pour chaque implant, 700 μ l de Matrigel™ ont été recueillis dans une seringue de 1 ml. Pour éviter toute polymérisation des Matrigel™ les cônes et les seringues avaient préalablement été conservés à +4°C pendant la nuit. De plus, la préparation des implants dans les seringues a été réalisée avec des gants stériles pour limiter le risque d'infection des souris recevant les injections.

Trois types d'implants de 700 μ l de BD Matrigel™ ont été constitués et immédiatement injectés en sous-cutané en condition stérile :

- 9 implants témoins constitués uniquement de Matrigel™
- 9 implants constitués de Matrigel™ contenant chacun 1,5 M d'ASC
- 9 implants constitués de Matrigel™ contenant chacun 1,5 M d'ASC-Shh produites comme décrit précédemment quatre jours avant la synthèse de l'implant.

I.B.3) Traitement de l'implant

Deux semaines après injection, les Matrigel™ ont été prélevés. Le protocole expérimental est résumé dans la figure 34.

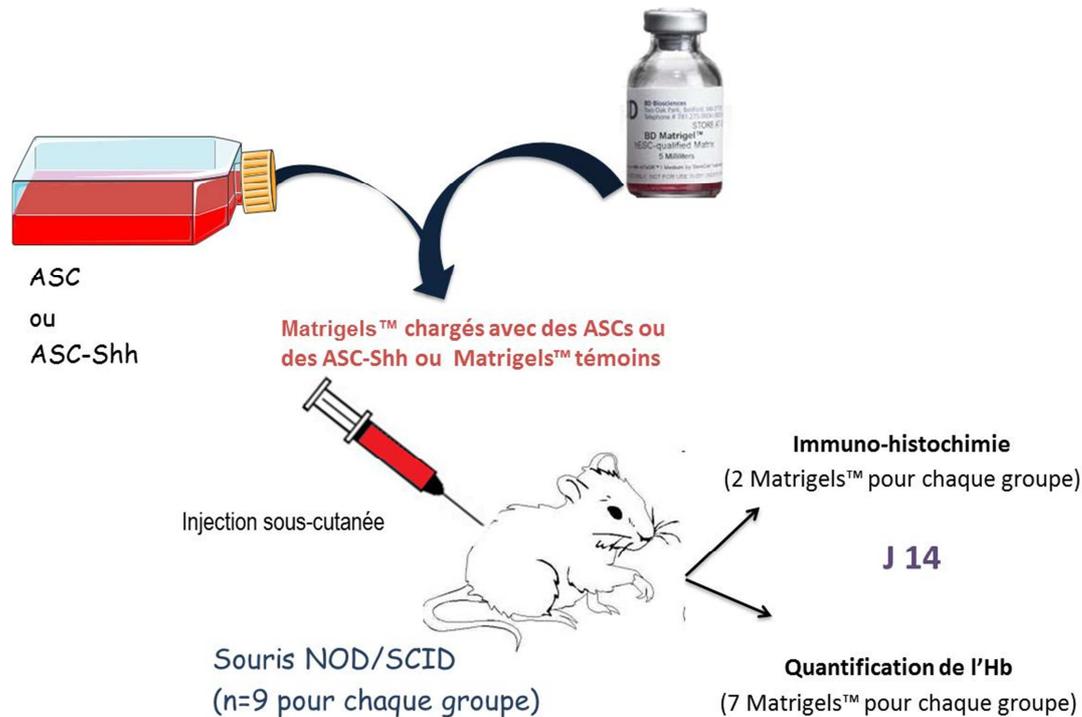


Figure 34: Schéma synthétique du protocole expérimental d'évaluation des effets pro-angiogéniques des ASC et des ASC-Shh in vivo.

Les Matrigel™ ont été chargés ou non avec des cellules souches (ASC ou ASC-Shh) et injectés en sous-cutané à des souris NOD/SCID $\beta 2^{-/-}$. 14 jours après injection, les Matrigel™ ont été prélevés et analysés par spectrophotométrie pour quantifier l'hémoglobine ou par immunohistochimie.

Sept Matrigel™ de chaque groupe (21) ont été recueillis dans des tubes contenant 1 ml d'H₂Od.

Les prélèvements ont été dilacérés au potter mécanique à +4°C puis centrifugés pendant 20 min à 10 000g. Le surnageant a été recueilli et conservé à -80°C en vue d'une analyse par spectrophotométrie pour quantifier l'hémoglobine (Hb) présente dans les Matrigel™.

Deux Matrigel™ de chaque groupe (6) ont été prélevés et conservés dans du formol tamponné 4% (w/v) pour une analyse immunohistochimique réalisée au sein d'un laboratoire privé (NOVOTEC, Lyon, France).

I.B.4) Spectrophotométrie

Le dosage de l'hémoglobine dans les échantillons d'homogénats de Matrigel™ a été réalisé sur un lecteur de plaques BioTek EL808 (BioTek Instruments Inc, Winooski, USA) par la méthode de Drabkin (solution de Drabkin : 20 mg de potassium ferricyanure, 5 mg de potassium cyanure et 100 mg de bicarbonate de potassium dans 100 ml d'H₂O). Le potassium ferricyanure a la propriété de transformer l'hémoglobine en méthémoglobine, elle-même transformée sous l'action du potassium cyanure en cyanméthémoglobine qui a la propriété d'être stable et dont la densité optique (DO) peut être mesurée à 540 nm.

Après décongélation dans de la glace, 100 µl d'échantillons ont été déposés dans des plaques 96 puits à fond plat en duplicat. Une solution de Drabkin (100 µl) a été ajoutée dans chaque puits puis homogénéisée pendant 35 min à 37°C. Une lecture de la DO a été réalisée à 540 nm. La quantification de l'hémoglobine dans les échantillons a été calculée à partir d'une gamme d'hémoglobine standard de concentration connue (réactifs HITACHI-ABX ; Tokyo, Japon).

I.B.5) Analyse statistique

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, USA) par comparaison globale des lots sur échantillons non appariés. L'analyse a été effectuée par le test de Kruskal-Wallis (alternative non paramétrique de l'analyse de variance pour échantillons non appariés) et une comparaison des lots deux à deux a été réalisée par le test *post hoc* de Dunn. La différence était considérée comme significative pour une *p-value* $p < 0,05$.

I.B.6) Marquage immunohistochimique des implants

Pour observer la structure et la morphologie des tissus, une analyse histologique a été réalisée par coloration successive des coupes à l'hématoxyline de Harris, l'éosine G et au safran après déparaffinage (HES). Les échantillons ont été coupés en deux fragments puis déshydratés et inclus en paraffine. Des coupes de 5 µm ont été réalisées au microtome longitudinalement sur le premier fragment et transversalement sur le second puis placées sur lames.

Une analyse immuno-histochimique a été réalisée pour visualiser le collagène IV (lames basales) et spécifiquement les cellules endothéliales (anticorps (Ac) anti-CD31, anti CD34 et anti facteur Von Willebrand (vWF)). Après déparaffinage, les sites antigéniques ont été démasqués par traitement à la hyaluronidase (anti collagène IV) ou par traitement en tampon citrate pH=6 (pour les Ac anti-CD31, anti-CD34 et anti-vWF) (Tableau X).

Tableau X: Liste et références des anticorps utilisés pour l'analyse immuno-histochimique des Matrigel™ implantés dans des souris NOD/SCID β2^{-/-}.

Anticorps	Référence	Dilution
Ac de rat anti-CD31 de souris	AbDSerotec, MCA 1364 (Raleigh, USA)	1 :25
Ac de chèvre anti-CD34 de rat	R&D Systems AF4117 (Minneapolis, USA)	1 :100
Ac de rat anti-vWF de souris	Bioss, bs-05586R (Boston, USA)	1 :250
Ac de rat anti-collagène IV polyclonal de souris	Novotec, 20451 (Lyon, France)	1 :2000
Ac secondaire de lapin anti rat	Dako EnVision, K4002 ; 312-035-044 (Les Ulis, France)	1 :200
Ac secondaire de lapin anti chèvre	Dako EnVision, K4002 ; 305-035-045 (Les Ulis, France)	1 :500

Les sections de Matrigel™ ont été incubées une nuit à 4°C avec l'anticorps primaire selon la dilution optimale validée par NOVOTEC (Lyon, France). La réaction croisée de l'anticorps anti-CD34 de rat avec le tissu de souris a été validée par NOVOTEC (Lyon, France) et contrôlée sur foie sain de souris. Après inhibition des peroxydases endogènes par l'eau oxygénée, les coupes ont été incubées avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase. La réaction avec son substrat, la diaminobenzidine (DAB) (Dako, Les Ulis, France) a révélé les complexes antigène-anticorps par apparition d'un marquage brun. Les coupes ont été contre-colorées à l'hématoxyline de Mayer puis montées entre lames et

lamelles en milieu aqueux. L'anticorps primaire a été remplacé par du PBS-BSA 3% pour le témoin négatif.

Pour visualiser la densité du collagène et la présence de cellules endothéliales, les sections de Matrigel™ ont été observées au microscope optique (Leica DM2000 ; Wetzlar, Allemagne) relié à une caméra digitale (Leica DFC450 ; Wetzlar, Allemagne) pilotée par un logiciel d'acquisition d'image (LAS V4.2 Leica DFC450 ; Wetzlar, Allemagne).

II) RÉSULTATS : Effets des milieux conditionnés sur des fibroblastes porcins irradiés

II.A) Evaluation des espèces réactives de l'oxygène dans les fibroblastes porcins après irradiation

L'effet de l'irradiation sur le stress oxydant des fibroblastes est lié à l'existence d'un déficit en système de défense anti-oxydante ou une surproduction d'ERO. Il existe deux systèmes de défense anti-oxydant, enzymatique et non enzymatique. Le système anti-oxydant enzymatique est composé notamment de la glutathion peroxidase (GPx), de la superoxyde dismutase et de la peroxyredoxine. Le système non enzymatique est constitué de vitamines, d'oligo-éléments tels que le sélénium, le cuivre et le zinc et de composés à groupement thiols (-SH) comme le glutathion réduit (GSH).

Pour évaluer l'effet des milieux conditionnés sur le statut anti-oxydant des fibroblastes irradiés, nous avons mesuré le taux de FRAP, quantifié les protéines thiols et mesuré l'activité de la GPx.

II.A.1) Evaluation du FRAP

La mesure du FRAP qui reflète le pouvoir anti oxydant global d'une cellule été mesuré par spectrophotométrie et s'exprime en EC1/gramme de protéines totales ($\mu\text{M/g}$).

Aucune différence du FRAP entre les fibroblastes du milieu témoin et ceux des 2 milieux conditionnés n'a été observée. De plus il n'y a pas de différence significative entre

fibroblastes irradiés (quelques soit le milieu de culture) et les fibroblastes non irradiés dont le pouvoir anti oxydant est de 16,25 EC1/g de protéines totales (Figure 35).

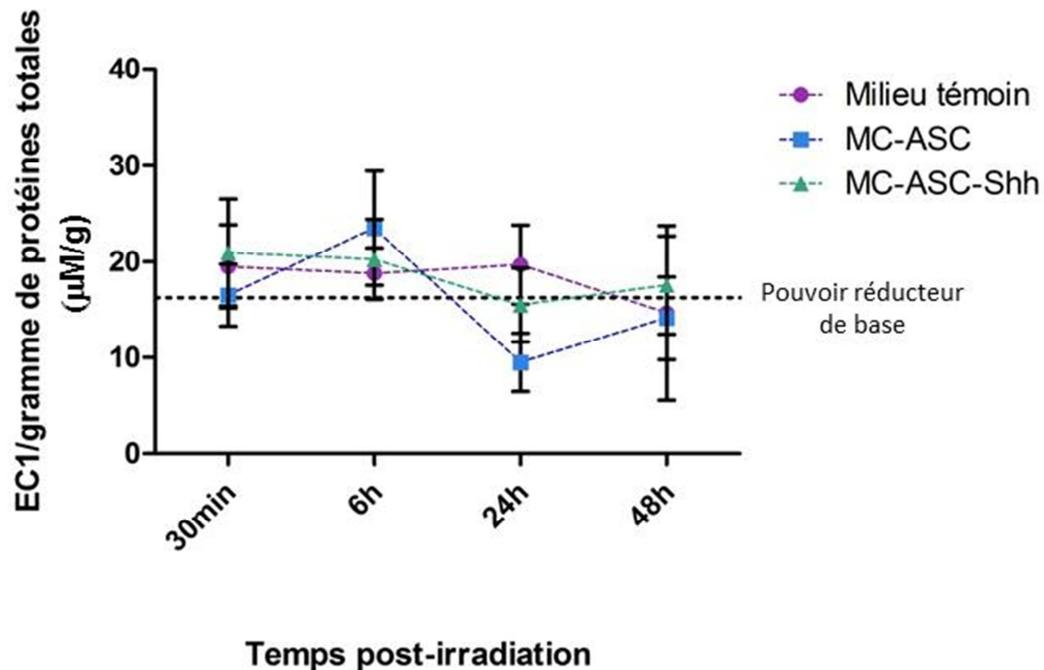


Figure 35: Evaluation du pouvoir anti-oxydant des fibroblastes après irradiation par mesure du FRAP.

Le potentiel de réduction du fer a été mesuré dans les fibroblastes irradiés et cultivés dans les différents milieux conditionnés à 30 min, 6 h, 24 h et 48 h post-irradiation ainsi que dans des fibroblastes non irradiés, cultivés dans des conditions standards ($n=3$ dans chaque groupe).

Test de Kruskal-Wallis.

Les milieux conditionnés ne semblent pas moduler le pouvoir anti-oxydant intrinsèque global des fibroblastes irradiés.

II.A.2) Quantification des protéines thiols

Les groupements thiols (-SH) font partie des mécanismes non enzymatiques de lutte contre le stress oxydant en interagissant avec les radicaux hydroxyles.

Le dosage des protéines thiols montre, pour les fibroblastes irradiés une augmentation non significative des groupements -SH par rapport à la valeur de base de $17 \pm 1,5 \mu\text{M-SH/g}$ de protéines totales aux temps 30 min et 6 h après l'irradiation. Une différence significative est observée pour les fibroblastes du milieu conditionné par les ASC-Shh à 30 min post-irradiation ($p < 0,05$) (Figure 36). Ce résultat suggère une meilleure adaptation précoce des fibroblastes du MC-ASC-Shh au stress oxydant. Pour les temps plus tardifs, aucune différence n'est observée entre les fibroblastes non irradiés et les fibroblastes irradiés (tous milieux de culture confondus).

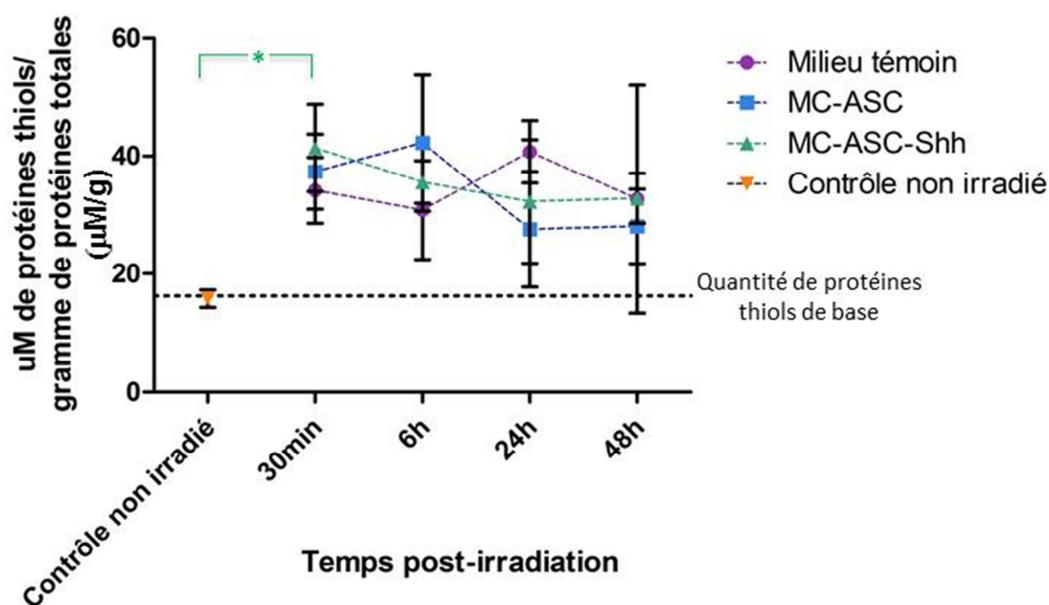


Figure 36 : Concentration des protéines thiols dans les fibroblastes après irradiation.

La concentration des protéines thiols a été mesurée dans les fibroblastes irradiés et cultivés dans les différents milieux conditionnés à 30 min, 6 h, 24 h et 48 h post-irradiation ainsi que dans des fibroblastes non irradiés, cultivés dans des conditions standards ($n=3$ dans chaque groupe).

* : $p < 0,05$; Test de Kruskal-Wallis et Test de comparaison multiple de Dunn.

II.A.3) Evaluation de l'activité glutathion peroxydase

Dans les fibroblastes irradiés, la glutathion peroxydase par rapport à la catalase, est considérée comme la source majeure de protection contre l' H_2O_2 et les radicaux hydroxyles ($^{\circ}OH$). Elle est présente dans le cytosol et les mitochondries des cellules.

Les courbes de la figure 37 représentent l'activité de la glutathion peroxydase des fibroblastes, exprimée en unité de GPx/g de protéines totales, en fonction du temps après irradiation, et ce pour les 3 milieux de culture (milieu témoin, MC-ASC et MC-ASC-Shh). L'activité basale de la GPx fibroblastique est de $26,7 \pm 0,4$ U/g de protéines totales. Après irradiation, l'activité de la GPx augmente significativement par rapport aux fibroblastes non irradiés dans les 3 groupes. L'activité GPx augmente d'un facteur $1,8 \pm 0,5$, $2,8 \pm 0,7$ et $2,3 \pm 0,6$ respectivement pour les groupes milieu témoin, MC-ASC et MC-ASC-Shh à 6 h (NS) et d'un facteur $5,6 \pm 0,8$, $2,4 \pm 0,6$ et $5 \pm 0,7$ à 24 h post-irradiation ($p < 0,05$).

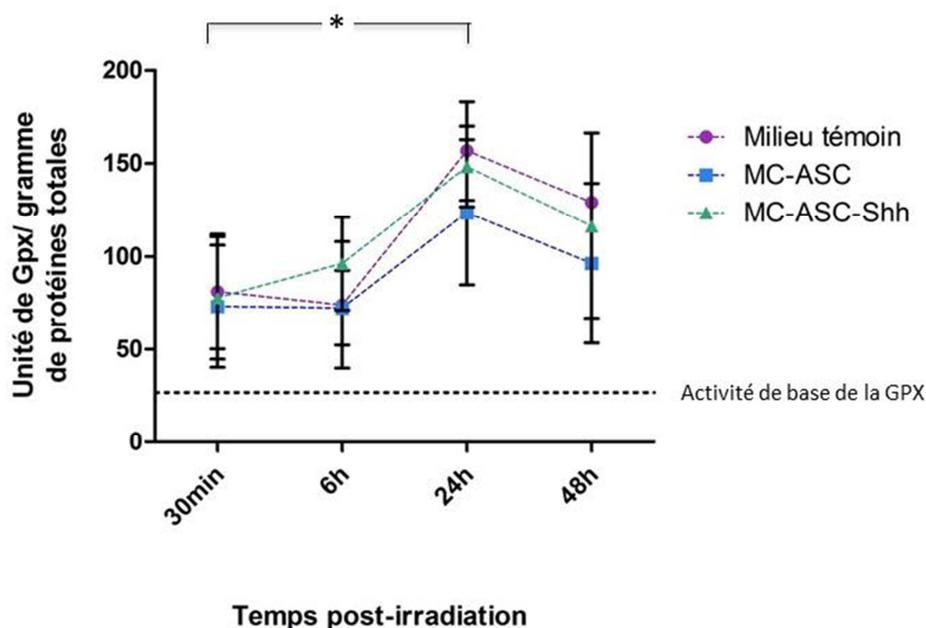


Figure 37 : Unité relative de GPx dans les fibroblastes post-irradiation.

La concentration de GPx a été mesurée par spectrophotométrie dans les fibroblastes irradiés et cultivés dans les différents milieux conditionnés à 30 min, 6 h, 24 h et 48 h post-irradiation ainsi que dans des fibroblastes non irradiés, cultivés dans des conditions standards ($n=3$ dans chaque groupe).

* : $p < 0,05$; Test de Kruskal-Wallis et Test de comparaison multiple de Dunn.

La comparaison des temps très précoces (30 min-6 h) versus des temps plus tardifs (24 h-48 h) montre une augmentation de l'activité de l'enzyme dans les 3 groupes, significative d'un facteur 3 pour le groupe milieu témoin aux temps tardifs ($p < 0,05$) (Figure 38A). On observe également aux temps précoces une augmentation de l'activité GPx dans les 2 milieux conditionnés par rapport aux fibroblastes irradiés du milieu témoin (facteur 1,5). Cependant la grande variabilité intra-groupe et le faible nombre d'échantillons ne permettent pas de révéler une significativité. (Figure 38 B, C).

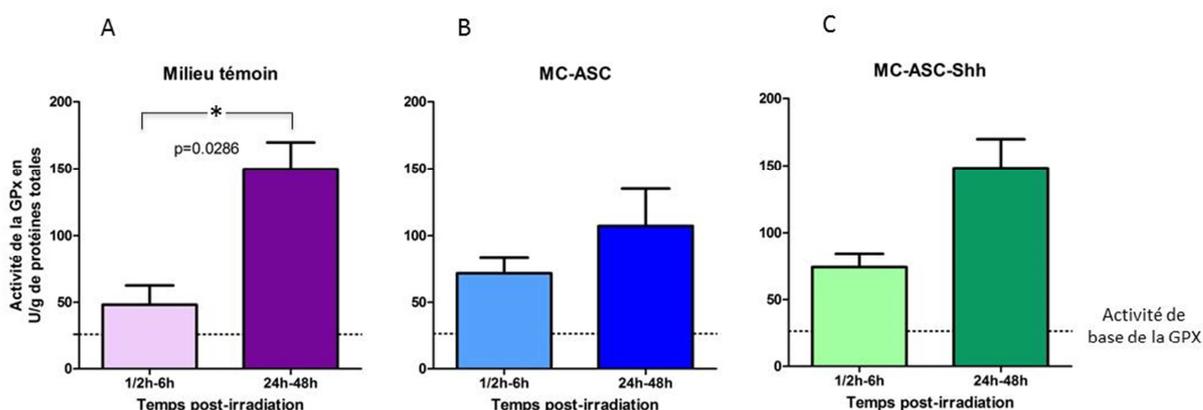


Figure 38 : Comparaison de l'activité GPx post-irradiation aux temps précoces et tardifs pour chaque condition.

A. Fibroblastes irradiés du milieu témoin

B. Fibroblastes irradiés du MC-ASC

C. Fibroblastes irradiés du MC-ASC-Shh

$n=3$ pour chaque groupe ; * : $p < 0,05$. Test de Mann-Whitney.

Cette augmentation significative de l'activité de la GPX peut être considérée comme une adaptation de l'activité antioxydante en réponse à une augmentation du stress oxydant dans les fibroblastes après irradiation, augmentation non modulée par les milieux MC-ASC et MC-ASC-Shh. L'activation de la GPx tend cependant à être plus précoce pour les fibroblastes des 2 milieux conditionnés.

II.B) Evaluation des dommages à l'ADN des fibroblastes porcins après irradiation

Les fibroblastes cutanés porcins isolés et amplifiés au sein de notre laboratoire présentent un TM (tail moment) moyen de base de $4,1 \pm 0,3$ pouvant s'expliquer par le remaniement de l'ADN et l'activité des enzymes de réparation de l'ADN au cours du cycle cellulaire. La mesure du TM des fibroblastes irradiés a été réalisée aux temps 30 min, 6 h et 24 h après l'irradiation dans les groupes milieu témoin, MC-ASC et MSC-ASC-Shh (Figure 39).

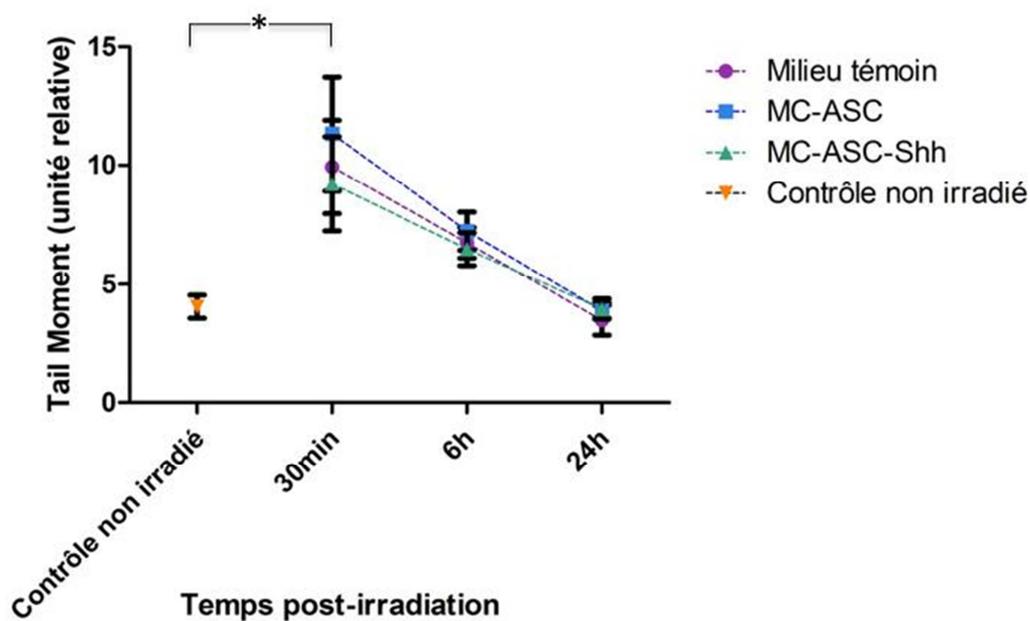


Figure 39 : Evaluation des dommages à l'ADN après irradiation.

Les dommages à l'ADN ont été évalués par SCGE (Single Cell Gel Electrophoresis assay). La valeur du témoin non irradié représente la valeur standard des cellules en culture. Les dommages à l'ADN ont été analysés pour les fibroblastes irradiés des différents milieux conditionnés : milieu de culture témoin, MC-ASC ; MC-ASC-Shh 30 min, 6 h et 24 h post-irradiation ($n=3$ dans chaque groupe).

* : $p < 0,05$; Test de Kruskal-Wallis et Test de comparaison multiple de Dunn.

L'irradiation à 25 Gy des fibroblastes cutanés porcins entraînent une augmentation significative d'un facteur 2,4 ($p < 0.05$) du TM dans le milieu témoin au temps 30 min correspondant à l'apparition rapide de cassures de l'ADN au cours des 30 minutes suivant l'exposition. Entre 6 h à 24 h, le TM moyen des fibroblastes du groupe milieu témoin diminue respectivement de $6,7 \pm 0,4$ et de $3,5 \pm 0,1$ pour retrouver la valeur de base à 24 h. Dans les groupes des milieux conditionnés, le TM ne diffère pas de celui du groupe milieu témoin quel que soit le temps.

II.C) Evaluation de la survie des fibroblastes dermiques porcins après irradiation

L'évaluation de l'effet des milieux conditionnés sur la survie cellulaire après irradiation a été réalisée en étudiant leur capacité de prolifération, la mort cellulaire et la sénescence.

II.C.1) Pouvoir de prolifération des fibroblastes irradiés

La capacité à former des colonies a été évaluée 14 jours après irradiation. La figure 40 représente la clonogénicité (CFU-F) des fibroblastes non irradiés, et des fibroblastes cultivés en milieu témoin, MC-ASC et MC-ASC-Shh après irradiation.

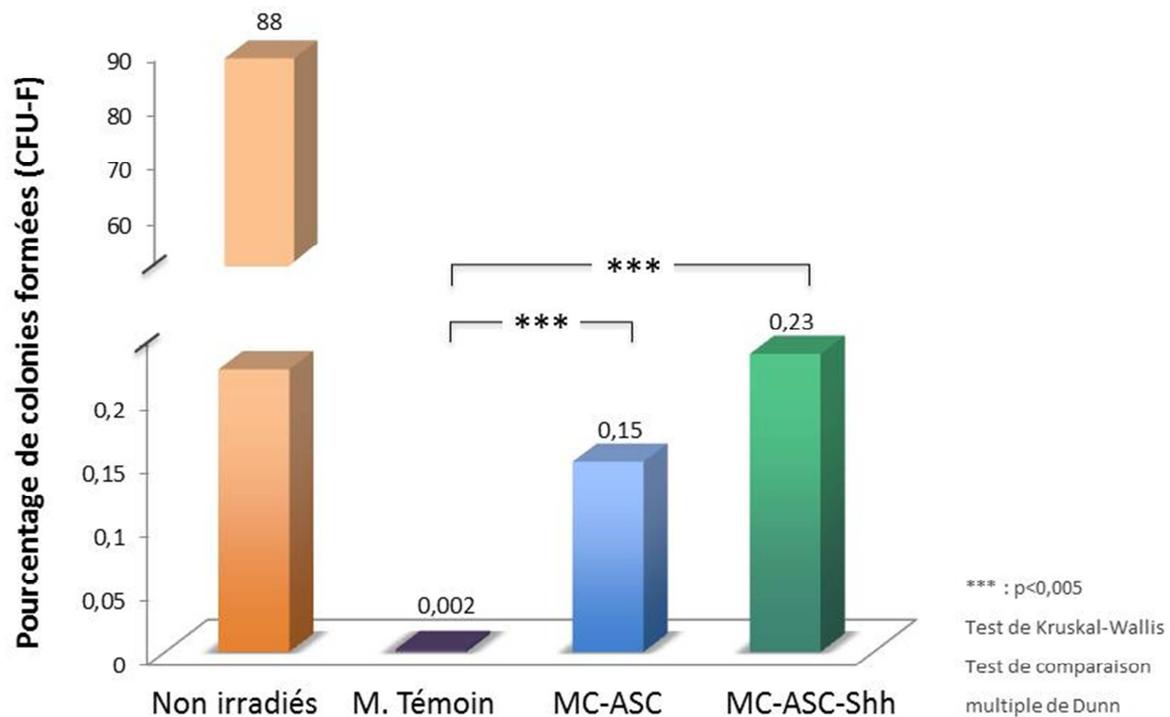


Figure 40: Pourcentage de colonies formées 14 jours après irradiation.

Les colonies (constituées de 64 clones : CFU-F) ont été dénombrées après 6 temps de doublement soit 14 jours après irradiation.

Test de Kruskal-Wallis et post de test de Dunn.

*** : p<0.005 ; n=3 pour chaque groupe.

On observe 88% \pm 7 de CFU-F après 14 jours de culture pour les fibroblastes cutanés porcins non irradiés. L'irradiation à 25 Gy a entraîné une perte quasi-totale de la capacité de prolifération des fibroblastes cultivés en milieu témoin avec 0.002% \pm 0.0005 de CFU-F. Les milieux MC-ASC et MC-ASC-Shh préservent partiellement la clonogénicité avec des pourcentages respectifs de 0,15% \pm 0,1 et 0,23% \pm 0,08 : x 75 (p<0.005) et x 115 (p<0.005) par rapport aux fibroblastes irradiés cultivées en milieu témoin. La protéine Shh a accru l'effet protecteur mais les deux groupes ne diffèrent pas significativement.

II.C.2) Apoptose/ Nécrose

II.C.2.a) Apoptose

L'apoptose est un mécanisme de mort cellulaire précoce impliqué dans les 24 premières heures après irradiation. Comme l'illustre la figure 41, Ce mécanisme de mort cellulaire semble peu impliqué dans la mort radio-induite des fibroblastes atteignant un pourcentage maximum de 4%+/-1,5 à 24 h post-irradiation. Aucune réduction de l'apoptose n'a été observée dans les groupes milieux conditionnés.

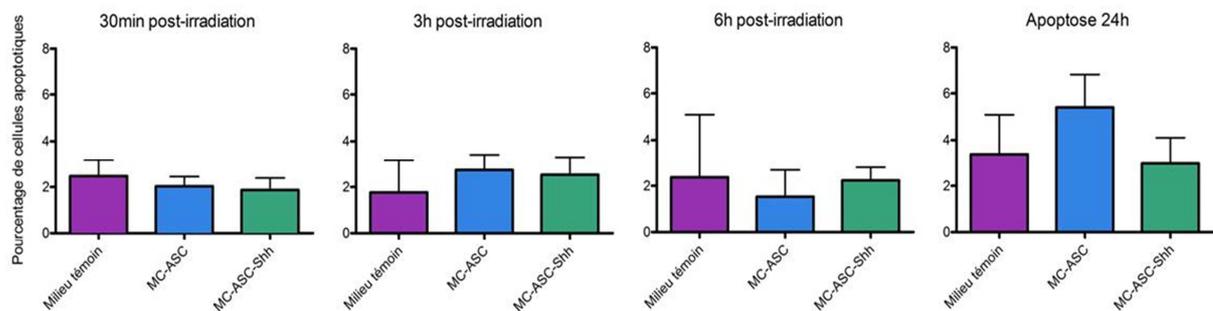


Figure 41 : Evaluation de l'apoptose des fibroblastes après irradiation.

Evaluation de l'apoptose des fibroblastes irradiés et cultivés dans les différents milieux conditionnés, analysée par marquages des caspases activées et cytométrie en flux à 30 min, 3 h, 6 h et 24 h post-irradiation.

Test de Kruskal-Wallis ; n=9 pour chaque groupe.

II.C.2.b) Nécrose

Le pourcentage de cellules nécrotiques augmente de 12% +/-2 à 27% +/-3 après irradiation dans le groupe milieu de contrôle ($p < 0,05$) et il n'a pas été réduit dans les groupes des milieux conditionnés ASC ou ASC-Shh (Figure 42).

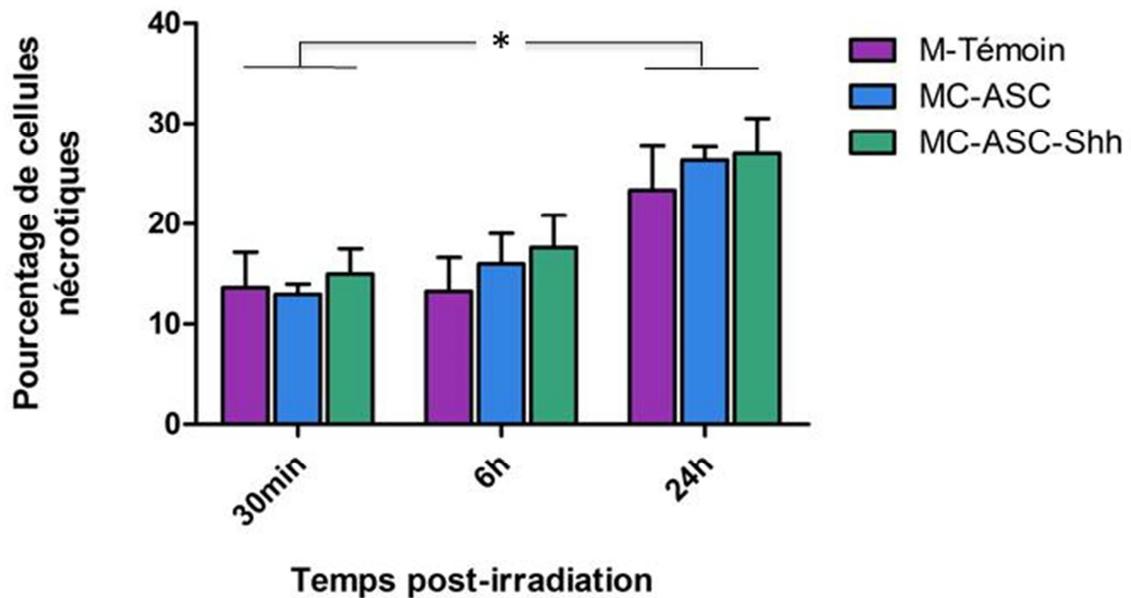


Figure 42 : Evaluation du nombre de fibroblastes en nécrose après irradiation à 25Gy en fonction du milieu de culture.

Evaluation du pourcentage de fibroblastes nécrotiques après irradiation et culture dans les différents milieux conditionnés, analysée par cytométrie en flux à 30 min, 6 h et 24 h post irradiation..

*Test de Kruskal-Wallis ; n=9 pour chaque groupe. * : $p < 0,05$.*

II.C.3) Sénescence

L'irradiation induit la sénescence (sénescence prématurée radio-induite (SPRI)) des fibroblastes dans nos conditions expérimentales. Dans le milieu témoin, le nombre de cellules positives pour la bêta-galactosidase (Figure 43) augmente d'un facteur 2,8 à 24 h, 6,5 à 48 h, 17,5 à 72 h et 29,7 à 96 h (17,8% de SPRI) post-irradiation par rapport au pourcentage de cellules en SPRI 6 h après irradiation (Figure 43 et 44A) avec un accroissement notable de la pente à partir de 48 heures post irradiation.

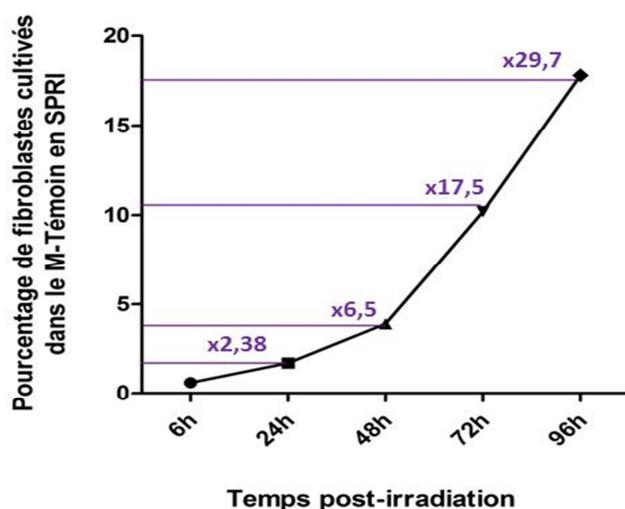


Figure 43 : Pourcentage de fibroblastes en sénescence prématurée dans le milieu témoin.

En revanche le pourcentage de fibroblastes en SPRI dans les MC-ASC et MC-ASC-Shh ne dépasse pas 1,6% entre 6 h et 96 h post-irradiation, suggérant un effet bénéfique des milieux conditionnés sur le développement de la SPRI fibroblastique. Une différence significative est observée entre les fibroblastes du milieu témoin et ceux des 2 milieux conditionnés par les ASC et les ASC transfectées dès 48 h post irradiation ($p < 0,05$) ainsi que 3 jours (Figure 44B, $p < 0,01$) et 4 jours (Figure 44A, C, D, $p < 0,005$) après l'irradiation. A 72 h post-irradiation notamment (Figure 44B), le pourcentage de cellules en SPRI est diminué significativement dans les deux milieux conditionnés MC-ASC et MC-ASC-Shh, respectivement d'un facteur 50 ($p < 0,005$) et 25 ($p < 0,005$) par rapport aux fibroblastes irradiés du milieu témoin. A tous les temps post-irradiation étudiés, les deux milieux conditionnés ne diffèrent pas significativement.

Ces résultats suggèrent que les MC-ASC diminuent le développement de la sénescence prématurée et que la transfection de Shh ne semble pas modifier cette action bénéfique.

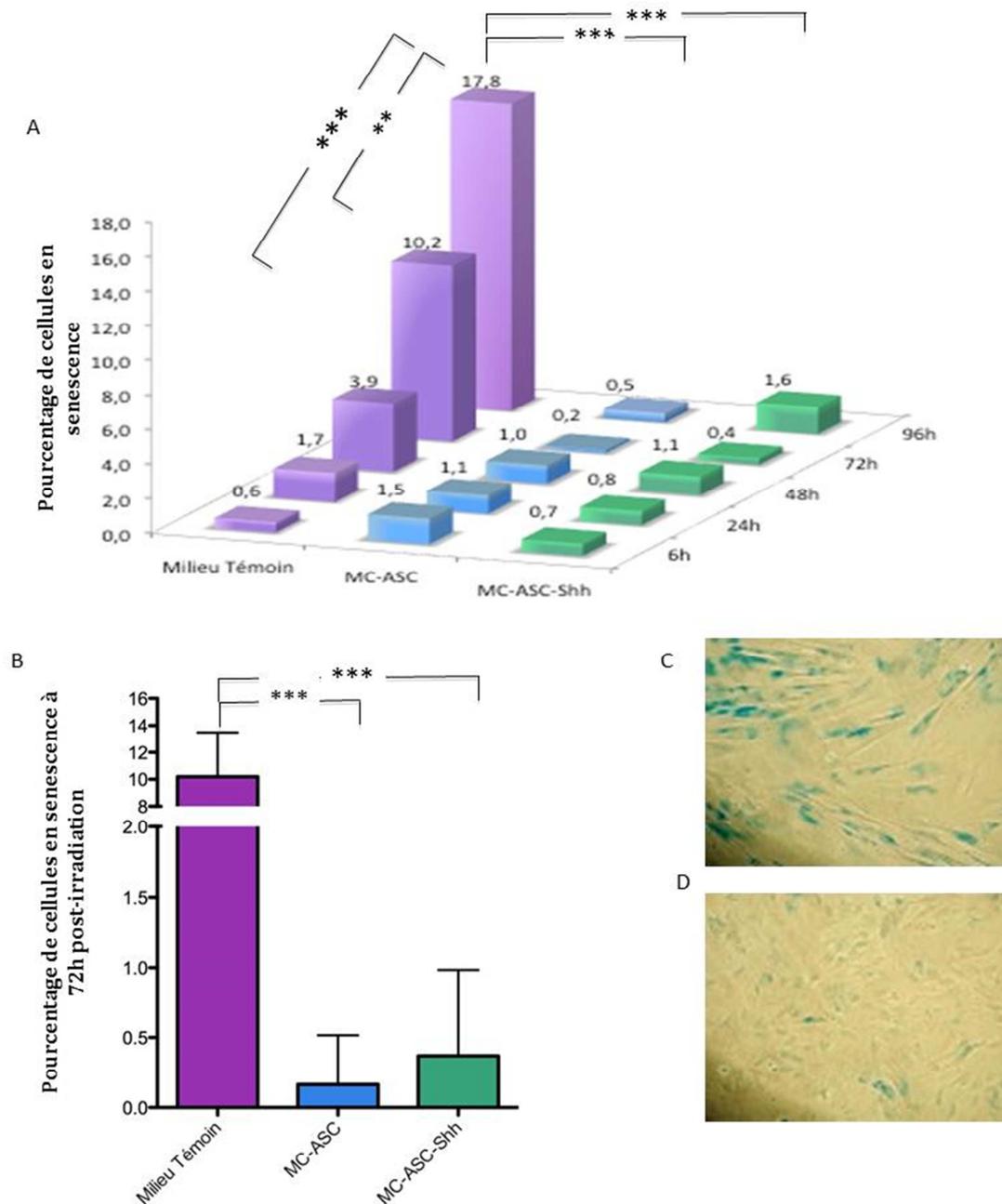


Figure 44 : Evaluation de la sénescence des fibroblastes après irradiation.

La sénescence des fibroblastes cultivés dans les différents milieux conditionnés après irradiation a été étudiée par marquage de l'activité β -galactosidase et observation au microscope optique.

- A. Evolution de la sénescence de 6 h à 96 h post irradiation.
- B. Analyse du pourcentage de sénescence à 72 h post irradiation
- C. Activité β -galactosidase observée à 96 h post irradiation pour les fibroblastes du milieu témoin
- D. Activité β -galactosidase observée à 96 h post irradiation pour les fibroblastes du MC-ASC

Test de Kruskal-Wallis sur échantillons non appariés et test de Friedman sur échantillon appariés.

Comparaison multiple par le post test de Dunn; ** : $p < 0,01$ *** : $p < 0,005$; $n = 9$ pour chaque groupe.

II.D) Etude de l'expression génique des fibroblastes porcins après irradiation

II.D.1) Effet des milieux conditionnés sur l'expression des gènes pro-angiogéniques

Pour évaluer les effets pro-angiogéniques des MC-ASC et des MC-ASC-Shh sur les fibroblastes irradiés, les gènes codant pour ANG1, ANG2 et VEGF α ont été choisis. L'analyse de l'expression de l'angiopoïétine 2 n'a pu être effectuée car les conditions optimales permettant une efficacité suffisante de la PCR n'ont pas pu être déterminées malgré les adaptations des conditions envisagées : modification du temps et de la température d'hybridation, variation des concentrations d'amorces ou de magnésium.

Les résultats présentés dans les figures 45 et 46 révèlent une variation de l'expression des gènes de l'ANG1 et du VEGF α en fonction du temps et du milieu conditionné dans lequel les fibroblastes étaient cultivés après irradiation.

Les fibroblastes cultivés dans le milieu témoin répondent à l'irradiation par une réduction du taux des ARNm de l'ANG1 pendant les 48 premières heures, très marquée à 6 h post-irradiation ($p < 0,05$ par rapport au taux de base). Les 2 milieux conditionnés modulent cette réaction aux temps 6 h et 24 h post-irradiation. A 6 h la réduction des taux d'ARNm de l'ANG1 est moindre (milieu témoin versus MC-ASC et MC-ASC-Shh respectivement $p < 0,05$ et $p < 0,01$) et les taux à 24 h sont proches du niveau basal. Cette modulation est transitoire puisque les taux d'ARNm de l'ANG1 sont réduits et similaires à 48 h post-irradiation dans toutes les conditions (Figure 45).

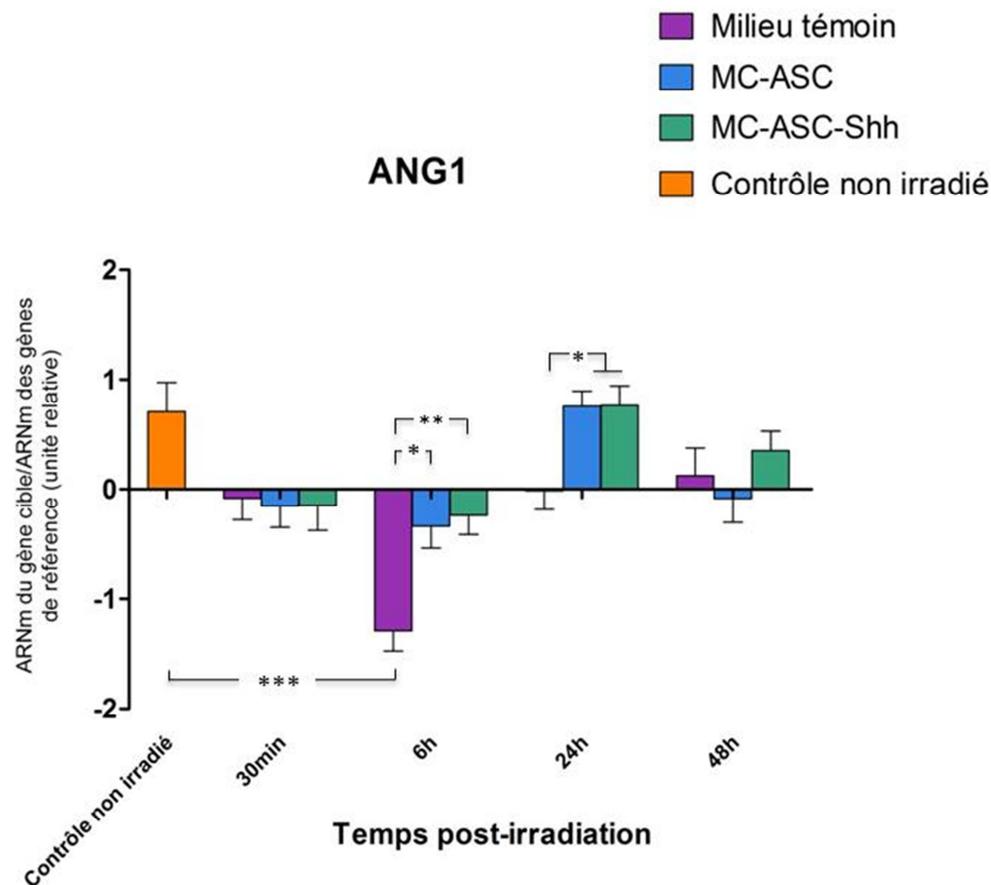


Figure 45: Variations d'expression de l'ANG1.

Expression relative de l'ANG1 obtenue à partir des valeurs centrées réduites sur lesquelles l'analyse statistique a été réalisée.

Test de Kruskal-Wallis et test de comparaison multiple de Dunn.

* : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,005$; $n = 9$ pour chaque groupe.

L'expression du VEGF α des fibroblastes cutanés de porc révèle une cinétique différente.

On observe peu de modulation d'expression de VEGF α dans les fibroblastes du groupe témoin avec une augmentation tardive et non significative à 48 h post-irradiation. A l'inverse, les milieux conditionnés modifient cette réaction avec une réduction à 6 h puis une augmentation significatives des taux d'ARNm de VEGF α 24 h après exposition aux RI

(respectivement $p < 0,005$ et $p < 0,01$). A 48 h post-irradiation, l'augmentation se maintient à un niveau significativement élevé dans le groupe MC-ASC-Shh ($p < 0,05$) par rapport aux fibroblastes irradiés cultivés dans le milieu témoin et le MC-ASC (Figure 46).

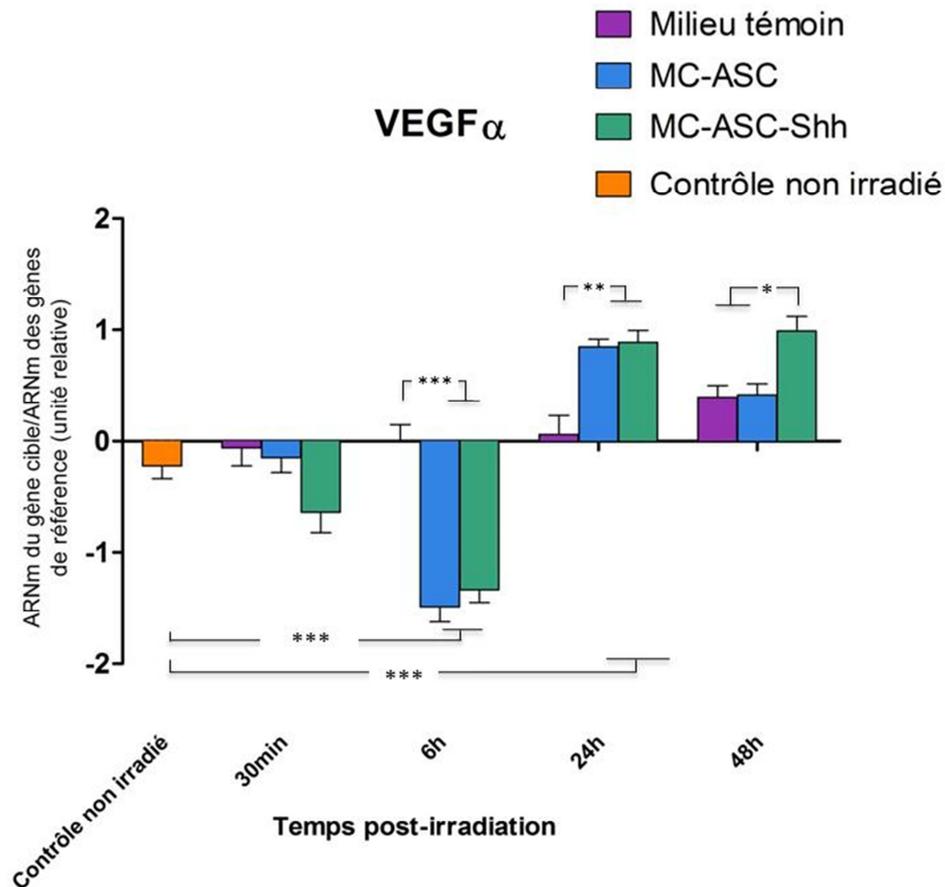


Figure 46: Variations d'expression de VEGF α .

Expression relative de VEGF α obtenue à partir des valeurs centrées réduites sur lesquelles l'analyse statistique a été réalisée.

Test de Kruskal-Wallis et test de comparaison multiple de Dunn.

* $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,005$; $n = 9$ pour chaque groupe.

Ces résultats suggèrent que le sécrétome des ASC module négativement l'expression fibroblastique des gènes pro-angiogéniques ANG1 et VEGF α à des temps précoces post-irradiation mais à l'inverse, présentent à 24 h post-irradiation un effet pro-angiogénique renforcé par la présence de Shh 48 heures après exposition aux rayonnements ionisants.

II.D.2) Effet des milieux conditionnés sur l'expression des gènes pro-inflammatoires

Pour l'étude de la réaction inflammatoire, l'expression de la protéine IL1 α , cytokine pléiotropique impliquée dans les réactions immunitaires et les processus inflammatoires, a été retenue. L'IL1 α est majoritairement synthétisée par les macrophages activés, mais aussi par les cellules épithéliales et les fibroblastes. L'absence de spécificité des amorces de l'IFN γ et du TNF α n'a pas rendu la quantification de ces gènes possible.

Le niveau d'expression des ARNm de l'IL1 α varie très fortement après irradiation (Figure 47). A 30 min post-irradiation, une diminution d'expression par rapport aux fibroblastes contrôles non irradiés ($p < 0,01$) est observée quel que soit le milieu de culture. De même, pour toutes les conditions de culture, le niveau d'expression de l'IL1 α à 6 h est proche de celui des fibroblastes non irradiés.

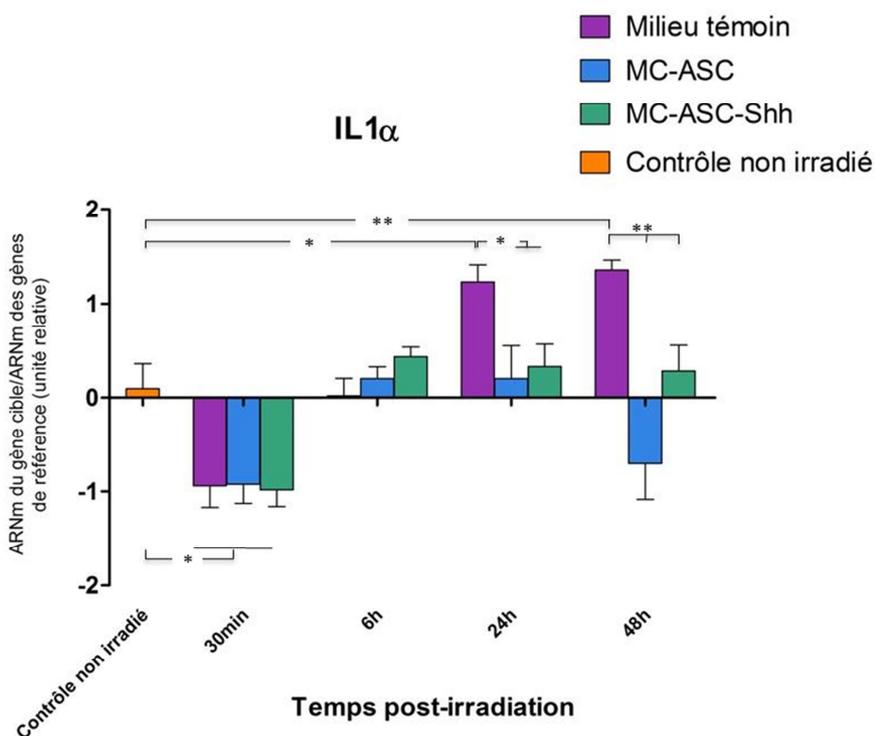


Figure 47 : Variations d'expression l'IL1 α .

Expression relative de l'IL1 α obtenue à partir des valeurs centrées réduites sur lesquelles l'analyse statistique a été réalisée.

Test de Kruskal-Wallis et test de comparaison multiple de Dunn.

* : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; $n = 9$ pour chaque groupe.

A 24 h et 48 h post-irradiation, l'expression de l'IL1 α est significativement augmentée (respectivement $p < 0,05$ et $p < 0,01$) par rapport au niveau basal dans le groupe milieu témoin contrairement aux groupes milieux conditionnés ASC et ASC-Shh, proches du niveau basal d'expression ($p < 0,05$ et $p < 0,01$ entre groupe ASC-Shh et milieu contrôle respectivement à 24 et 48 h post-irradiation).

Ces résultats suggèrent une action immunosuppressive tardive du sécrétome des ASC sans bénéfice de la transfection par Shh.

II.D.3) Effets des milieux conditionnés sur l'expression des gènes du cycle cellulaire

Les protéines p53 et p16/14 sont impliquées dans les étapes d'arrêt du cycle cellulaire et de mort programmée.

A 30 min post irradiation aucune variation de l'expression de p53 par les fibroblastes n'est observée (Figure 48A).

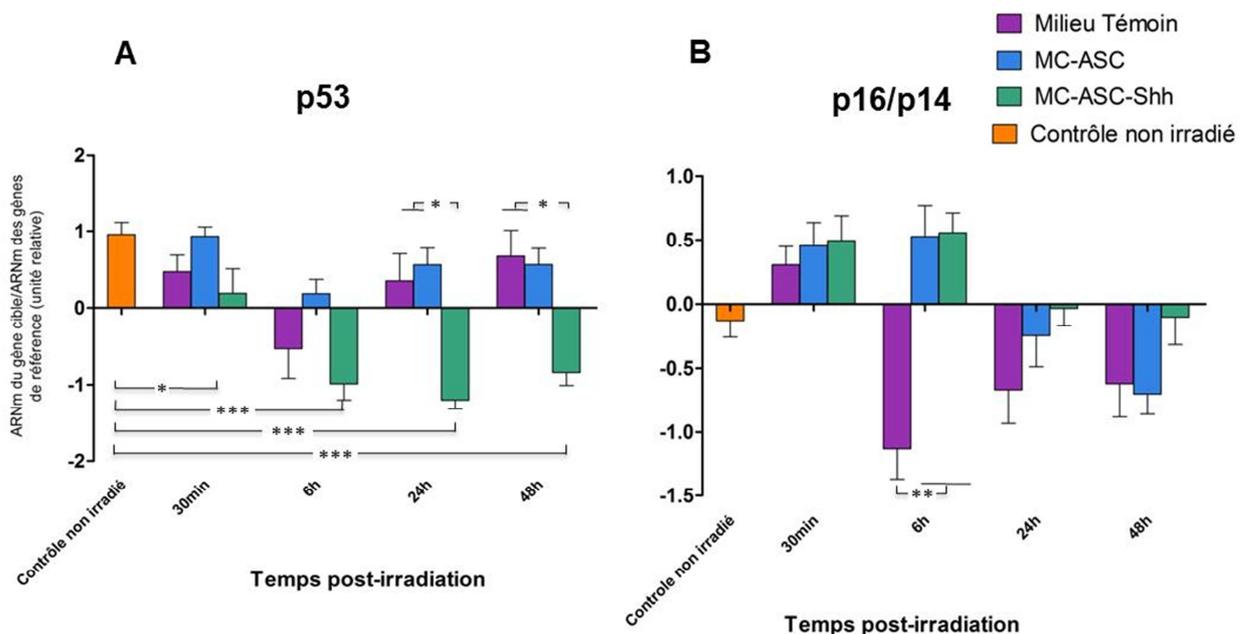


Figure 48: Variations d'expression de p53 et p16/14.

Expression relative de p53 et p16/14 obtenue à partir des valeurs centrées réduites sur lesquelles l'analyse statistique a été réalisée.

A. Expression relative de p53

B. Expression relative du p14/16

Test de Kruskal-Wallis et test de comparaison multiple de Dunn.

* : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,005$; $n = 9$ pour chaque groupe.

A 6 h post-irradiation, on note une diminution transitoire de l'expression de cette protéine par les fibroblastes irradiés du groupe milieu témoin (fibroblastes irradiés du milieu témoin versus contrôle non irradié : $p < 0,05$). Cette diminution est également observée pour les fibroblastes irradiés cultivés dans le MC-ASC-Shh et persiste de 6 h à 48 h post irradiation contrairement au groupe MC-ASC qui reste proche du niveau d'expression basale quel que soit le temps (Figure 48 A).

L'absence de spécificité des amorces utilisées ne permet pas de distinguer les variations d'expression de p16 et p14. Cependant bien qu'agissant par des mécanismes différents, p16 et p14 sont tous deux des gènes suppresseurs de tumeurs impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire. On observe une induction précoce de p16/p14 dans le groupe milieu témoin suivie d'une inhibition aux temps plus tardifs. Cette évolution est décalée dans le temps dans les groupes des milieux conditionnés avec une augmentation du taux d'ARNm p16/14 significative à 6 h ($p < 0,005$) (Figure 48 B).

En résumé, l'évaluation de l'impact du sécrétome des ASC et ASC-Shh sur les fibroblastes dermiques irradiés à 25 Gy ne montrent pas d'effet de leurs facteurs paracrines sur les réactions cellulaires précoces des fibroblastes après irradiation (régulation du stress oxydant et réparation des dommages à l'ADN). En revanche les résultats observés lors de l'étude des capacités de prolifération des fibroblastes, de l'entrée en sénescence prématurée, en apoptose ou en nécrose révèlent un effet significatif du sécrétome des ASC sur la survie cellulaire par inhibition de l'entrée en sénescence prématurée sans bénéfice de la transfection par Shh. Un effet anti-inflammatoire des facteurs paracrines des ASC sans bénéfice de la transfection est également mis en évidence par une expression significativement moins importante de la cytokine pro-inflammatoire IL1 α à 24 h post irradiation.

A l'inverse, la nucléofection des ASC par Shh module l'expression de la protéine p53 qui est significativement réduite pour les fibroblastes du MC-ASC-Shh par rapport aux conditions milieux témoin et MC-ASC à 24h et 48h post-irradiation.

Enfin, l'analyse de l'expression des gènes pro-angiogéniques montre une augmentation transitoire de l'expression de l'ANG1 et du VEGF α des fibroblastes irradiés par le sécrétome des ASC 24h après l'irradiation, potentialisé pour le VEGF α par la transfection jusqu'à 48h post-irradiation.

III) RESULTATS : Evaluation des propriétés pro-angiogéniques des ASC et ASC-Shh *in vivo* dans un modèle de Matrigel™

L'évaluation de la néoangiogénèse dans un modèle de Matrigel™ injectés en sous cutané chez des souris immunodéficientes est une technique couramment utilisée notamment en l'oncologie pour évaluer les capacités pro-angiogéniques des cellules tumorales.

III.A) Analyse spectrométrique de la quantité d'hémoglobine dans les Matrigel™

La quantité d'hémoglobine a été mesurée en mg/dl par la méthode de Drabkin. Les résultats de cette mesure sont présentés dans la figure 49.

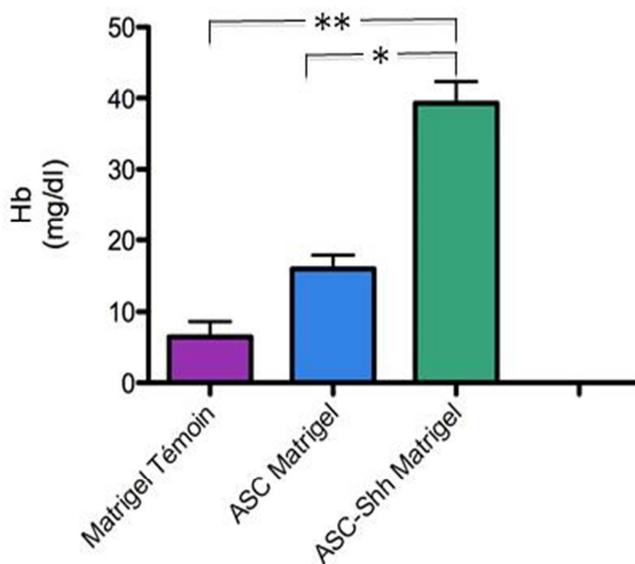


Figure 49 : Quantité d'hémoglobine dans les Matrigel™ 2 semaines après leur implantation dans des souris NOD/SCID β 2^{-/-}.

Des Matrigel™ chargés avec des ASC, des ASC-Shh ou des Matrigel™ témoins ont été injectés en sous cutané à des souris NOD/SCID β 2^{-/-}. 14 jours après l'implantation, les Matrigel™ ont été prélevés et l'hémoglobine présente dans ceux-ci a été dosée en mg/dl par méthode de Drabkin.

*Test de Kruskal-Wallis et test de comparaison multiple de Dunn ; * : $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. $n = 7$ dans chaque groupe.*

On observe une quantité d'hémoglobine supérieure dans les Matrigel™ chargés en ASC et en ASC-Shh (respectivement 16 mg/dl et 39 mg/dl versus Matrigel™ témoins : 6,5 mg/dl). De plus, la concentration d'hémoglobine est significativement plus importante dans les Matrigel™ contenant les ASC-Shh par rapport à ceux chargés en ASC ($p < 0,05$) et aux témoins ($p < 0,01$).

III.B) Analyse macroscopique et immuno-histochimique

L'étude spectrophotométrique a été complétée par une étude macroscopique et immuno-histochimique des Matrigel™.

III.B.1) Etude macroscopique

Le prélèvement des Matrigel™ après 14 jours d'implantation a révélé des différences macroscopiques en fonction des groupes.

Les Matrigel™ témoins ne contenant pas de cellules souches, sont totalement translucides (Figure 50A). Les Matrigel™ chargés en ASC (Figure 50B), présentent un aspect opaque avec présence de sang corrélée à l'augmentation de l'hémoglobine observée par la méthode de Drabkin précédemment citée.

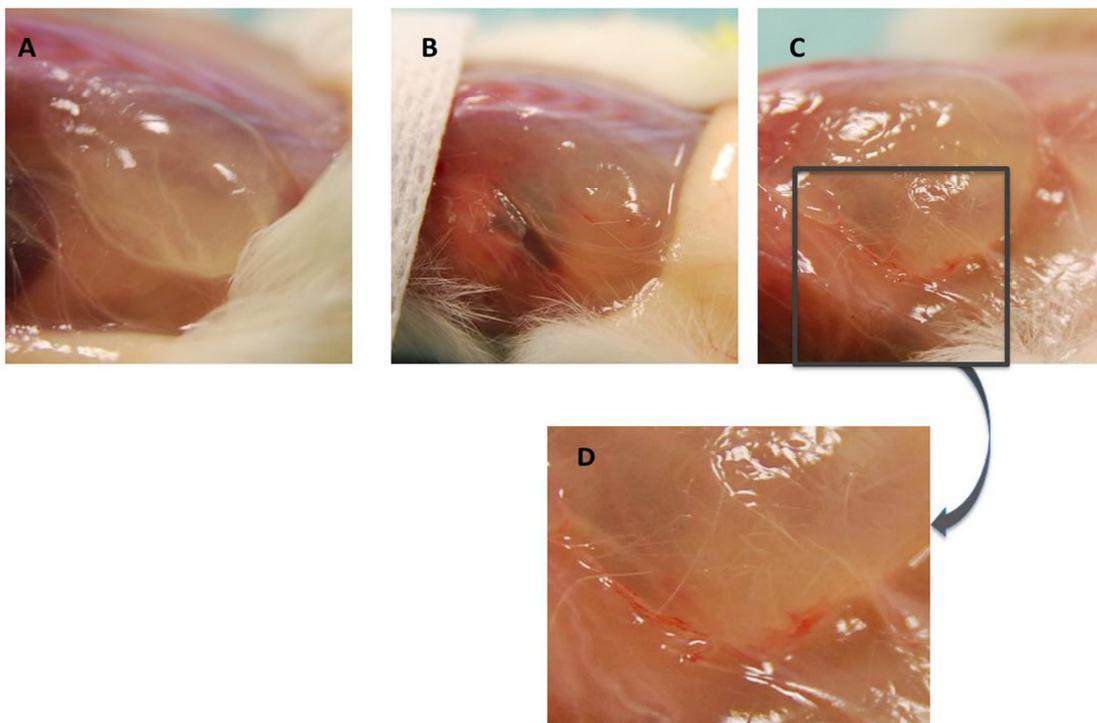


Figure 50 : Photographie des Matrigel™ avant prélèvement, à J14 post implantation.

Les photographies ont été réalisées avant le prélèvement des Matrigel™, 2 semaines après leur implantation.

A : Matrigel™ témoin ne contenant aucune cellule souche

B : Matrigel™ contenant des ASC

C et D : Matrigel™ contenant des ASC-Shh

Enfin dans les Matrigel™ chargés en ASC transfectées par Shh (Figure 50 C et D) on peut noter la présence d'un vaisseau et d'un ancrage vasculaire en bordure du gel, macroscopiquement observable.

III.B.2) Etude immuno-histochimique

III.B.2.a) Analyse histologique

L'analyse HES révèle que les échantillons sont constitués d'une matrice dense amorphe colonisée par des cellules de morphologie et de distribution hétérogènes sans différence observable entre les différentes conditions (Figure 51).

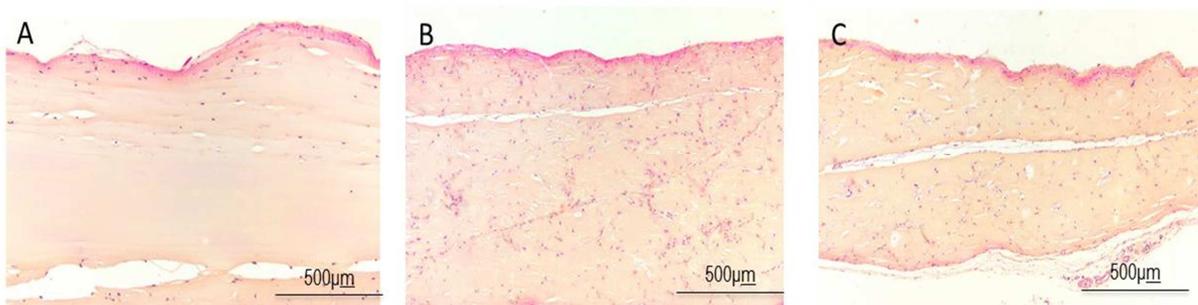


Figure 51: Coloration hématoxyline-éosine-safran des Matrigel™

Les Matrigel™ témoins, chargés en ASC ou en ACS-Shh ont été colorés avec de l'hématoxyline-éosine-safran pour analyser leur morphologie.

A : Matrigel™ témoins

B : Matrigel™ chargés avec des ASC

C : Matrigel™ chargés avec des ASC-Shh

III.B.2.b) Marquage immunochimique

Un marquage immunochimique des Matrigel™ a également été réalisé pour évaluer la présence de marqueurs endothéliaux.

Un premier marquage anti-collagène IV qui est spécifique des lames basales n'a révélé aucune différence entre les différents Matrigel™ avec la présence d'un bruit de fond au niveau de la matrice amorphe de tous les gels s'expliquant par la présence connue de collagène IV dans les Matrigel™.

Le CD34, glycoprotéine membranaire, est un marqueur non spécifique des tissus vasculaires dont la fonction n'est pas entièrement connue et dont l'expression relativement variable tend à être corrélée à la taille des vaisseaux : plus intense dans les capillaires et les sinusoides, le marquage du CD34 est moindre dans les artères, les veines, les artéioles et les veinules. Dans ce travail, le marquage met en évidence des cellules fines à prolongements cytoplasmiques longs, probablement en migration. Les échantillons témoins montrent localement de rares cellules positives, tandis que dans les échantillons chargés avec des ASC ou des ASC-Shh, les cellules positives sont plus nombreuses et localisées uniquement en périphérie du gel qu'elles semblent infiltrer.

Le facteur von Willebrand (vWF), un marqueur spécifique des cellules endothéliales mais dont l'expression présente une grande variabilité individuelle a également été étudié. A l'inverse du CD34, le vWF apparait plus faiblement marqué dans les capillaires que dans les vaisseaux de gros calibre (veines > artères > artéioles > capillaires). Dans notre étude, aucune différence n'a été observée entre les différents gels.

Enfin, la présence de CD31 (PECAM-1) a été étudiée. Cette glycoprotéine transmembranaire est un marqueur usuel des cellules endothéliales, en particulier dans les phases de migration, ce qui en fait un marqueur de choix dans la caractérisation des phénomènes d'angiogénèse. Dans les échantillons de Matrigel™ témoins peu de cellules apparaissent positives (marquage brun sur la figure 52A), alors qu'elles sont plus nombreuses dans les échantillons chargés en ASC (Figure 52B) et ASC-Shh (Figure 52C et D). Dans ces échantillons, des cellules rondes présentent un signal intense.

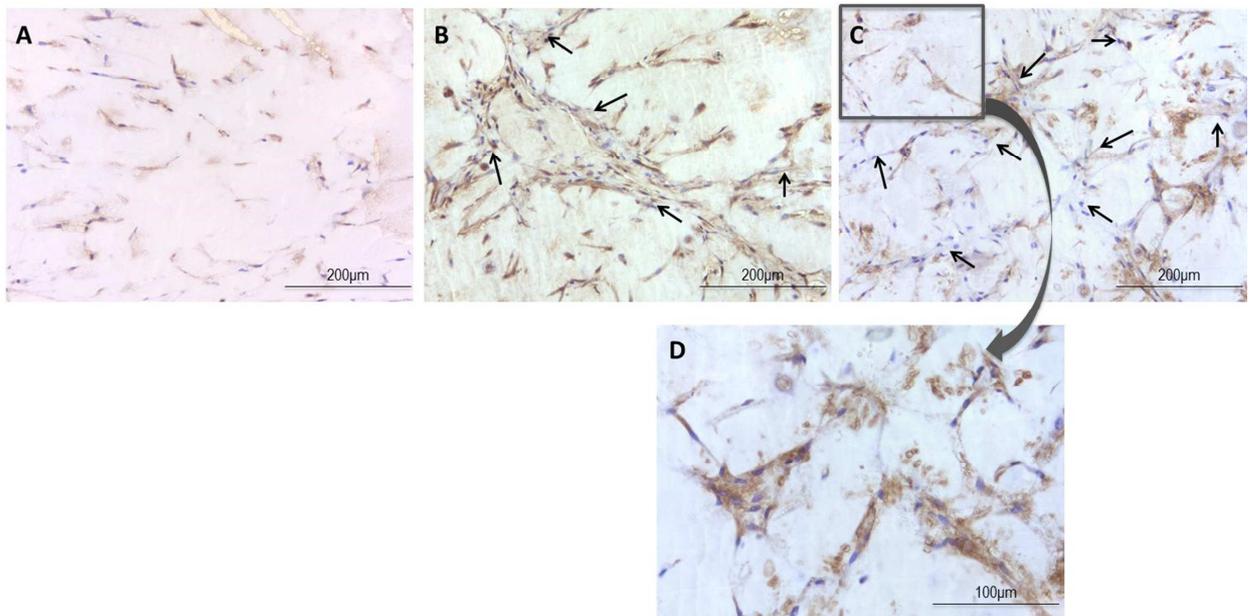


Figure 52: Analyse immuno-chimique des MatrigelTM marqués par un anticorps anti CD31.

Après fixation, les gels ont été marqués avec un anticorps anti-CD31 (marquage brun), glycoprotéine spécifique des cellules endothéliales.

A : MatrigelTM témoins

B : MatrigelTM chargés avec des ASC

C et D : MatrigelTM chargés avec des ASC-Shh

Les échantillons de gels chargés en ASC-Shh montrent également un marquage préférentiel des cellules regroupées en foyers ou présentant de nombreuses interactions entre elles (Figure 52C et D). Ces observations mettent en évidence une néoangiogenèse au sein des MatrigelTM chargés, laquelle est plus marquée dans les gels contenant des ASC-Shh.

IV) DISCUSSION

La symptomatologie clinique du SCR est caractérisée par une phase de latence susceptible de retarder le diagnostic et donc la prise en charge thérapeutique, puis par des lésions marquées par un retard de cicatrisation et l'évolution vers une nécrose cutanée. Ce défaut de régénération tissulaire s'explique notamment sur le plan physiopathologique par des réponses cellulaires aboutissant à la mort des cellules après irradiation et un défaut des capacités de prolifération. On retiendra également les effets délétères des vagues inflammatoires extensives qui retardent les processus de régénération tissulaire et enfin un défaut de revascularisation de la zone irradiée diminuant d'autant l'apport en nutriments essentiels vers les tissus lésés.

Le volet de notre étude réalisée *in vivo* chez le miniporc a confirmé le potentiel régénératif des ASC autologues. La connaissance des mécanismes sous-tendant cet effet clinique reste cependant partielle. La transdifférenciation ne semble pas être le mode d'action principal des ASC lors de la réparation tissulaire (Rehman *et al*, 2004 ; Chen L. *et al*, 2008 ; Sasaki *et al*, 2008 ; Hocking and Gibran, 2010) mais à l'inverse, celles-ci sécrèteraient de nombreux facteurs paracrines, modulant les processus clés de la réparation cutanée : néoangiogenèse, prolifération cellulaire (Rehman *et al*, 2004 ; Nauta *et al*, 2013), immunomodulation (Cui *et al*, 2007 ; Bochev *et al*, 2008). Par ailleurs le bénéfice de l'injections d'ASC allogéniques *in vivo* (Riccobono *et al.*, 2012), reste discuté justifiant la recherche de stratégies complémentaires pour pallier aux accidents de masse ou aux cas de SCR pour lesquels le prélèvement de cellules souches en zone sous exposée serait délicat. Dans ce contexte, l'utilisation du sécrétome (Milieu Conditionné) des ASC permettrait de s'affranchir des contraintes de compatibilité donneur-receveur. La manipulation *ex vivo* de ces cellules permettant d'enrichir leur sécrétome (thérapie génique transitoire utilisant par exemple le gène Shh) représente une autre approche thérapeutique.

Cette partie du travail de thèse a porté sur la mitigation : 1) des processus de cicatrisation, 2) de la réponse au stress oxydant et 3) de la réparation des dommages à l'ADN par les milieux conditionnés.

Pour étudier les effets paracrines des ASC et des ASC-Shh, un modèle de milieux conditionnés a été choisi, permettant l'évaluation du sécrétome complet des cellules souches : aussi bien les protéines sécrétées par la voie classique que les protéines excrétées par la voie des vésicules extracellulaires. Les sécrétomes ont été testés sur des fibroblastes

irradiés en culture à la dose de 25 Gy, se basant sur : 1) l'incapacité des fibroblastes du derme à lutter seuls contre les dommages secondaires aux rayonnements ionisants de plus de 20 Gy (Hopewell, 1990 ; Archambeau *et al*, 1995), 2) dans un modèle de SCR chez le miniporc irradié localement à 50 Gy, la dose reçue par ces cellules *in vivo* est de 25 à 30 Gy (Archambeau, 1989 ; Agay *et al*, 2010).

IV.A) Effets du sécrétome des ASC et ASC-Shh sur les réponses cellulaires précoces post-irradiation

Les réponses cellulaires précoces des cellules à l'irradiation, étudiées dans ce travail, sont la réponse au stress oxydant et la réparation des dommages à l'ADN. Suite à une irradiation, les RI provoquent, au sein de la cellule, la formation de radicaux libres extrêmement réactifs qui interagissent notamment avec les protéines intracellulaires et l'ADN aboutissant à des dommages du matériel génétique (Bolus, 2001 ; Azzam *et al*, 2012). Les plus fréquentes sont les altérations de bases, mais les plus délétères sont les cassures double brin plus difficilement réparables. En réponse à cette agression la cellule active la machinerie de réparation de l'ADN et les mécanismes de réponse au stress oxydant pour lutter contre la formation des radicaux libres ou espèces réactives de l'oxygène (ERO).

Les ERO présentent un paradoxe en ce qui concerne leur fonction biologique : d'une part, ils interviennent dans l'activation du système immunitaire, la médiation de la signalisation cellulaire et jouent un rôle essentiel dans l'apoptose. D'autre part, ils peuvent endommager d'importantes macromolécules dans les cellules et intervenir dans la cancérogénèse et les maladies cardiovasculaires (Fang *et al*, 2002).

Les molécules ou microconstituants capables d'interférer avec les ERO sont appelés antioxydants (Valko *et al*, 2004 ; Valko *et al*, 2006). Ils se composent : 1) d'enzymes (superoxydes dismutases Cu-Zn et Mn, catalase, glutathion peroxydases, couple thiorédoxine - thiorédoxine réductase, hème oxygénase, protéines de choc thermique, 2) de protéines transporteuses du fer et du cuivre (transferrine, ferritine, céruléoplasmine), 3) de

molécules antioxydantes de petite taille (glutathion et groupements thiols, acide urique, bilirubine, glucose, vitamines A, C, E, ubiquinone, caroténoïdes, flavonoïdes), et d'oligo-éléments (cuivre, zinc, sélénium) indispensables pour l'activité des enzymes antioxydantes. Une seule méthode ne peut à elle seule rendre compte du statut oxydant (Gutteridge, 1993 ; Ho *et al*, 2013). Actuellement plus de 80 dosages peuvent être proposés dont une bonne trentaine sont réalisables dans les conditions usuelles de la routine clinique. Dans ce travail, 3 paramètres ont été étudiés pour évaluer la réponse des fibroblastes irradiés au stress oxydant: le FRAP, la concentration de GPx, et la quantité intracellulaire de protéines thiols.

Dans notre étude, le FRAP qui caractérise le potentiel réducteur c'est-à-dire anti-oxydant global de la cellule est paradoxalement augmenté après irradiation sans modulation significative par les milieux conditionnés.

La baisse du taux des groupements thiols est un marqueur de stress oxydatif et reflète l'oxydation des protéines intracellulaires et les capacités non enzymatiques de lutte contre le stress oxydant. Dans notre modèle, seuls les fibroblastes du groupe MC-ASC-Shh ont présenté une augmentation significative des protéines thiols à 30 min post-irradiation. Ce résultat n'ayant jamais été décrit dans la littérature, son interprétation est complexe. Une augmentation des protéines thiols reflète un milieu intracellulaire plus réducteur et ainsi un meilleur système d'adaptation des cellules. Cet effet est en accord avec l'augmentation du FRAP observé précédemment qui pourrait ainsi protéger les groupements thiols. Pour confirmer ce résultat il sera nécessaire d'augmenter le nombre de lots de fibroblastes étudiés et de réaliser des investigations complémentaires, notamment un dosage des protéines carbonyles. Toute attaque radicalaire d'un acide aminé provoque l'oxydation de certains résidus aminés avec, pour conséquences, l'apparition de groupements carbonylés, des clivages de chaînes peptidiques et des ponts bi-tyrosine intra- et inter-chaînes (Haleng *et al*, 2007). Ainsi l'augmentation des protéines carbonyles est un indicateur du stress oxydant de la cellule qui permettra de compléter et de confirmer les résultats obtenus avec le dosage des protéines thiols.

Enfin, la GPx intracellulaire, enzyme séléno-dépendante impliquée dans la lutte enzymatique contre les ERO est significativement augmentée dans les fibroblastes irradiés par rapport aux fibroblastes non irradiés sans bénéfice observé dans les MC-ASC et les

MC-ASC-Shh. Bien que non significative, cette augmentation tend à être plus précoce pour les fibroblastes des 2 milieux conditionnés. Il a d'ailleurs été rapporté que le sécrétome des ASC favorisait la protection des fibroblastes contre le stress oxydant par augmentation de l'activité SOD (Superoxyde Dismutase) et GPx (Kim *et al*, 2008). Cette augmentation de la GPX, en catalysant la réduction de H₂O₂ en H₂O, pourrait aussi participer à augmenter le pouvoir réducteur du milieu mesuré par le FRAP et protéger les groupements thiols d'une oxydation.

Par ailleurs, des travaux ont démontré, sur des cellules neurales, un rôle protecteur de Shh contre les ERO par stimulation de ces mêmes enzymes (Dai *et al*, 2011, Peterson and Turnbull, 2012). Plusieurs hypothèses peuvent expliquer nos résultats. Les capacités de réponses peuvent être dépassées par l'importance du stress oxydant. En effet la GPx se comporte de deux manières selon l'intensité de la production radicalaire : 1) surexpression de l'enzyme dans un premier temps sous le contrôle du facteur de transcription Nrf2 (Nuclear factor erythroid 2 [NF-E2]-related factor 2), inducteur des systèmes enzymatiques de défenses antioxydantes et des enzymes impliquées dans la détoxification, 2) destruction si le stress oxydant perdure (Delattre *et al*, 2007). En effet, la GPx est sensible à un stress oxydant important et en cas de production élevée de ERO cette enzyme est détruite. Dans le cas d'une irradiation des fibroblastes, la quantité des ERO produite est très importante et pourrait expliquer une destruction de l'enzyme. L'action du sécrétome des ASC et de Shh serait alors inefficace sur une protéine non fonctionnelle. Par ailleurs la GPx est une enzyme séléno-dépendante. Les milieux de culture utilisés dans ce travail, contrairement aux milieux tels que l'IMDM (Iscove's Modified DMEM), ne sont pas supplémentés avec cet oligoélément, ce qui pourrait expliquer la faible activité de la GPx malgré l'activation par les facteurs paracrines des ASC et Shh. Sieber *et al*. ont d'ailleurs mis en évidence sur un modèle rongeur, l'intérêt du sélénium comme protecteur contre les lésions rénales radio-induites (morphologiques et fonctionnelles) (Sieber *et al*, 2009).

Il serait donc utile d'évaluer l'activité de la GPx en supplémentant les milieux en sélénium et d'étudier l'activité de la SOD décrite comme accrue à la fois par le sécrétome des ASC et par Shh. Par ailleurs, aucune étude n'a été publiée à notre connaissance, sur l'activation du facteur de transcription Nrf2 par le sécrétome des ASC ou Shh, cependant, des travaux récents confirment son importance dans la réponse des fibroblastes au stress post-irradiation. McDonald *et al*, ont démontré une activation importante mais retardée (J5 post-irradiation) de Nrf2 dans des fibroblastes irradiés à plus faible dose (8Gy) (McDonald *et al*, 2010), activation qui permet cependant la protection des fibroblastes, confirmée par les

travaux de Mathew *et al* (Mathew *et al*, 2014). Ainsi, une étude de l'effet du sécrétome des ASC/ASC-Shh et un dosage plus tardif de l'activité GPx permettraient également de compléter ce travail.

L'évaluation des dommages à l'ADN a été réalisée 30 min, 6 h et 24 h post-irradiation par SCGE. Cette technique semi-quantitative permet d'obtenir un état global des dommages de l'ADN et plus particulièrement des CDB. Les résultats confirment la formation de cassures double brin de l'ADN à 30 min post-irradiation avec un retour au statut de base des cellules dès 24 h après irradiation. Ce résultat est en accord avec les travaux décrits sur la réparation des dommages à l'ADN suivant l'irradiation, qui rapportent un délai de 24 à 72 h pour la réparation des CDB dans des fibroblastes irradiés (Lobrich and Jeggo, 2005 ; Prendergast *et al*, 2011).

On ne note cependant aucune différence entre les fibroblastes irradiés du milieu témoin et les fibroblastes irradiés des milieux conditionnés par les ASC ou les ASC-Shh. L'activation interne des mécanismes de réparation de l'ADN est fortement impliquée dans la radiorésistance des cellules souches, principalement cancéreuses (Hambardzumyan *et al*, 2006). Il a en effet été démontré que ces dernières étaient capables d'activer des checkpoints cellulaires en particulier via l'activation de Chk1 et 2, favorisant ainsi la mise en place des systèmes de réparation (Squatrito *et al*, 2010 ; Signore *et al*, 2014). Cependant l'activation des systèmes de réparation (excision de base, recombinaison homologue ou recombinaison non homologue) via des processus de paracrinie n'a pas été décrite au niveau des cellules souches et de leur environnement.

A l'inverse, il a été rapporté un effet de Shh sur la mise en œuvre des mécanismes de réparation de l'ADN. L'effet radioprotecteur (Chen *et al*, 2011) ou radiosensibilisant (Leonard *et al*, 2008) du blocage des mécanismes de réparation reste controversé mais le mode d'action est accepté. Via l'activation du facteur de transcription Gli, la voie de ATR est altérée en aval d'ATR par inhibition de la liaison Chk1-Clapsine. Ce checkpoint permet, dans des conditions normales, de bloquer le cycle cellulaire en phase S. L'absence d'arrêt du cycle pour la mise en place des réparations induit une poursuite du cycle cellulaire malgré les dommages de l'ADN. Aux vues de ces travaux on pouvait envisager une réparation plus tardive ou réduite des dommages de l'ADN pour les fibroblastes irradiés cultivés dans le MC-ASC-Shh qui n'a pas été observé. Ceci peut s'expliquer par le type de cellules irradiées (fibroblastes versus cellules souches cancéreuses hépatiques et

cellules rénales embryonnaires), ou par une trop faible concentration de Shh dans le milieu conditionné. Il est à noter également que la technique SCGE est une technique indicative qui ne permet pas de déterminer avec exactitude le type de lésion du matériel génétique ni les mécanismes de réparation mis en place par la cellule. Pour ce faire, il serait donc nécessaire d'étudier par immunofluorescence ou cytométrie en flux le nombre de foyers H2AX dans les noyaux des fibroblastes irradiés cultivés dans les différents MC. Ce travail permettrait de quantifier le nombre de CDB et les effets des milieux conditionnés sur cette lésion spécifique ainsi que d'identifier la voie de réparation majoritairement mise en place dans chaque condition.

L'ensemble de ces résultats ne met en évidence aucun effet significatif du sécrétome des ASC ni de Shh sur les réponses cellulaires précoces après irradiation.

IV.B) Survie cellulaire des fibroblastes irradiés

L'irradiation des fibroblastes provoque des dommages notamment au niveau de l'ADN qui peuvent excéder les capacités de réparation des cellules entraînant alors la mort cellulaire. Cette dernière se définit comme la perte des capacités de prolifération. Ainsi, l'évaluation de la capacité des fibroblastes à former des colonies (CFU-F) après irradiation est un reflet global de cette capacité à proliférer quel que soit le type de mort cellulaire des fibroblastes.

Dans ce travail les CFU-F ont été comptées 14 jours après irradiation. Les résultats ont montré un effet significatif des milieux conditionnés par les ASC et les ASC-Shh sur la survie des fibroblastes irradiés par rapport aux fibroblastes irradiés du milieu témoin suggérant que le sécrétome des ASC favorise la survie cellulaire après irradiation sans bénéfice de Shh.

Pour caractériser le type de mort cellulaire impliqué, nous nous sommes tout d'abord intéressés à l'apoptose en utilisant les caspases comme marqueurs (enzymes protéolytiques activés lors de l'apoptose des cellules). Cette dernière est un phénomène précoce qui a été étudié de 30 min à 24 h post-irradiation. En accord avec la littérature, les résultats montrent la faible participation de l'apoptose dans la mort précoce radio-induite dans le cas des fibroblastes (2 à 6% à 24 h post-irradiation). Contrairement aux cellules en suspension comme les lymphocytes, l'apoptose n'est pas le type de mort privilégiée pour les cellules adhérentes telles que les fibroblastes (Stewart *et al*, 2012). Cmielova *et al*. décrivent un pourcentage maximum d'apoptose de 10% à 20 Gy (Cmielova *et al*, 2011) pour ce type de cellules en concordance avec nos résultats. Il est à noter également qu'une partie des cellules détectées comme « apoptotiques » peut, en fait, correspondre à des cellules en mort mitotique, les caspases ne constituant pas des marqueurs spécifiques permettant de distinguer les deux types de mort (Vakifahmetoglu *et al*, 2008). Il serait donc intéressant de compléter cette étude par une analyse différenciant la mort mitotique de l'apoptose après irradiation en utilisant un marquage à l'annexin V spécifique de la bascule des phosphatidylsérines de la face interne à la face externe des cellules, caractéristique du phénomène d'apoptose.

La mort par nécrose représente un deuxième processus de mort cellulaire précoce décrit en cas de forte dose de radiation lorsque les systèmes de réparation cellulaire sont dépassés par la quantité d'espèces réactives de l'oxygène et les lésions de l'ADN, avant arrêt du cycle cellulaire (Panganiban *et al*, 2013). Dans notre étude aucune différence significative entre les taux de nécrose des fibroblastes irradiés des différentes conditions de culture n'a été observée de 30 min à 24 h post-irradiation. La mitigation de la nécrose radio-induite par le sécrétome des ASC ou par Shh n'a, à notre connaissance fait l'objet d'aucune étude. L'initiation très précoce de ce mécanisme pourrait expliquer l'absence d'effet des milieux conditionnés par les ASC/ASC-Shh.

L'entrée en sénescence non répliquative est un type de mort cellulaire plus tardif que l'apoptose ou la nécrose, fréquemment observé pour les fibroblastes irradiés (Stewart *et al*, 2012). Le critère d'évaluation de notre étude pour caractériser les cellules sénescents a été le dosage de l'activité β -galactosidase des cellules de 6 h à 96 h post-irradiation. Notre

étude confirme l'implication de la sénescence prématurée dans la mort tardive radio-induite des fibroblastes qui atteint un taux de 17.8% à 96 h en accord avec la littérature (Stewart *et al*, 2012). On observe par ailleurs, un effet protecteur du sécrétome des ASC sans bénéfice résultant de la transfection par Shh (MC-ASC et MC-ASC-Shh versus milieu témoin respectivement 0.5 et 1.7% ; $p < 0.05$) par rapport aux fibroblastes irradiés du milieu témoin à 72 et 96 h post-irradiation.

Les protéines p53, p14, et p16 représentant des acteurs clés de la sénescence, la fluctuation des taux de leurs ARNm entre 30 min et 48 h post-irradiation a été choisie comme critère d'étude dans notre travail.

Lors de la sénescence prématurée, les protéines p14 et p16 sont activées, aboutissant, via une inhibition des CDK, à l'entrée en sénescence (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007). Dans notre évaluation par RT-PCR, les amorces utilisées sont communes à p14 et p16 mais il faut noter que ces deux protéines sont codées par un même gène et qu'elles possèdent un même promoteur. Elles diffèrent uniquement par un épissage alternatif de l'exon 1 et la régulation de leur expression est commune par répression du locus Ink4a/Arf par Bmi1 (B-lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog, un complexe polycomb répressif). Leur expression varie dans le même sens en cas de lésion de l'ADN (augmentation de leur expression) (Jacobs *et al*, 1999 ; Bruggeman *et al*, 2005).

Dans notre étude une diminution des taux d'ARNm de p14/p16 est observée à 6 h post-irradiation pour les fibroblastes irradiés du milieu témoin et cette exposition aux RI n'entraîne pas d'augmentation des taux d'ARNm 24 h à 48 h après l'irradiation malgré un pourcentage de cellules sénescents significativement augmenté. Les fluctuations de p14 dans ce contexte n'ont pas été décrites mais il a été démontré que l'augmentation d'expression de p16, bien qu'impliquée dans l'entrée en sénescence n'était détectable qu'après l'apparition de la sénescence morphologique en culture (Hara *et al*, 1996 ; Stein *et al*, 1999). Nos résultats sont également en accord avec ceux de Song *et al* qui ont rapporté une diminution de la sénescence des fibroblastes photo-irradiés sans diminution de l'expression de p16 (Song *et al*, 2011). Cette étude sera complétée en augmentant le temps d'observation et en évaluant l'expression de ces deux protéines par WB ou ELISA afin de différencier les effets du sécrétome des cellules souches sur chacune d'entre elles. Concernant l'action de la protéine Shh il nous semble nécessaire d'évaluer l'activité de la protéine en l'absence du sécrétome ASC pour conclure définitivement.

Concernant la protéine p53, celle-ci est impliquée à la fois dans l'entrée en sénescence et en apoptose après activation par les protéines sensors (Purvis *et al*, 2012). Elle est active sous forme phosphorylée et va orienter la cellule vers les voies de mort spécifiques via l'activation respectivement de p16/p21 (senescence) et Bax/Apaf1 (apoptose) (Hengartner, 2000 ; Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007). Dans notre travail, on observe une diminution significative de l'expression des taux d'ARNm de p53 par les fibroblastes irradiés du milieu conditionné ASC-Shh. Ce résultat est en accord avec la littérature qui rapporte une modulation de l'expression, de la phosphorylation et de la stabilité de p53 phosphorylée, par Shh via le facteur de transcription Gli 3, prévenant le blocage du cycle cellulaire et inhibant l'entrée en apoptose des cellules (Prykhozhij, 2010 ; Kang *et al*, 2012). Il a cependant été démontré que malgré des variations d'expression, seule la quantité de p53 active, c'est-à-dire phosphorylée, est un reflet de son activité (Webley *et al*, 2000). Shh agit également en aval de p53 en stabilisant les protéines anti-apoptotiques Bcl2 et Bcl-X2 (Bigelow *et al*, 2004). Au total notre travail n'établit pas la capacité de Shh à moduler l'apoptose dans le contexte de l'irradiation mais il faut remarquer que cette mort est marginale dans le modèle fibroblaste. Enfin soulignons que la protéine p53, à l'inverse de p16, module préférentiellement la sénescence dite « répllicative » secondaire au raccourcissement des télomères par rapport à la sénescence prématurée secondaire aux lésions de l'ADN (Webley *et al*, 2000) à l'inverse de p16 (Herbig *et al*, 2004).

IV.C) Effet immunomodulateur du sécrétome des ASC et ASC-Shh

L'effet délétère des vagues inflammatoires extensives observées au cours du syndrome cutané radio-induit constitue un objectif thérapeutique prioritaire.

Les ASC peuvent moduler la réponse inflammatoire de façon directe en agissant sur les macrophages et les cellules dendritiques, en inhibant à la fois leur différenciation, leur expression de molécules de co-stimulation et en favorisant leur sécrétion de molécules immunosuppressives telle que l'IL10 (Ivanova-Todorova *et al*, 2009). Elles peuvent également inhiber la sécrétion d'immunoglobulines par les cellules mononucléées du sang (Bochev *et al*, 2008) et diminuent la réaction inflammatoire par sécrétion de PGE2 (Cui *et al*, 2007 ; Yanez *et al*, 2010).

Notre étude a porté quant à elle sur le potentiel immunosuppresseur indirect des ASC c'est-à-dire impliquant l'action des facteurs paracrines qu'elles sécrètent sur les fibroblastes irradiés.

Concernant la protéine Shh, celle-ci intervient également à différentes étapes de la réponse immunitaire et inflammatoire exerçant *in vitro* un rôle immuno-suppresseur ou immuno-activateur selon les équipes. Ainsi il a été rapporté que Shh inhibe la différenciation des thymocytes et à l'inverse, a un effet stimulateur sur la différenciation des lymphocytes CD4⁺ du sang périphérique (Benson *et al*, 2004). Par ailleurs Stewart *et al* ont démontré à la fois une augmentation de la sécrétion d'IFN γ et d'IL2 (pro-inflammatoire) mais aussi d'IL10 (anti-inflammatoire) par les lymphocytes CD4⁺ (Stewart *et al*, 2002) en présence de Shh. Les études réalisées *in vivo* sont plus homogènes : un effet cliniquement évaluable anti-inflammatoire a été observé dans un modèle murin de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), associé à une diminution de la sécrétion de l'IL6 (Zacharias *et al*, 2010). De même, des travaux sur un modèle rongeur de pancréatite aiguë ont mis en évidence un effet immunomodulateur de Shh impliquant la sécrétion d'IL10 par les macrophages pancréatiques (Zhou *et al*, 2012).

Notre étude a porté sur l'IL1 α , une cytokine pro-inflammatoire pléiotropique principalement sécrétée par les macrophages mais également par les fibroblastes ou les cellules endothéliales.

Les résultats mettent en évidence une réponse inflammatoire à l'irradiation sur les fibroblastes irradiés du milieu témoin avec une augmentation significative du taux d'ARNm de l'IL1 α . Cette réaction a été réduite de façon similaire par les MC-ASC et MC-ASC-Shh de 24 h à 48 h post-irradiation, les taux d'ARNm pour l'IL1 α restant voisins du taux basal des fibroblastes non irradiés.

Cette étude devra être complétée par celle de l'expression d'autres cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN γ , le TNF α (pour lesquels nous avons été confrontés à l'absence de spécificité des amorces Syber green) mais aussi l'IL2 en réalisant un design d'amorce pour sonde Taqman par exemple. De plus l'étude de l'expression des cytokines anti-inflammatoires telle que l'IL10 permettrait de compléter ce travail. Enfin au vu de ces résultats une étude de l'expression de ces gènes codant pour des protéines de l'inflammation devrait être étendue à 96 h post-irradiation.

IV.D) Propriétés pro-angiogéniques des ASC et ASC-Shh

Le défaut de revascularisation, qui ne permet pas l'arrivée des nutriments aux tissus irradiés, est un facteur clé du défaut de cicatrisation et de l'évolution vers la nécrose dans le SCR. Nous avons donc étudié de façon comparative le potentiel angiogénique des ASC et des ASC-Shh.

Notre travail a d'abord porté sur la réponse des fibroblastes à l'irradiation en ciblant deux des principaux gènes de l'angiogénèse : VEGF α et ANG1, ANG2 n'ayant pu être étudié pour des raisons techniques.

En réponse à l'irradiation, les taux d'ARNm de ANG1 sont diminués de 6 h à 24 h post-irradiation dans les fibroblastes du groupe milieu témoin alors que dans les deux groupes milieux conditionnés une augmentation transitoire d'expression est observée au temps 24 h. L'inhibition radio-induite de ANG1 a précédemment été décrite dans un modèle d'irradiation cérébrale de rats à 8 h post irradiation (Lee *et al*, 2011), ce qui est en concordance avec nos résultats.

Sur le plan mécanistique, la voie de signalisation aboutissant à l'expression de l'ANG1 est partiellement connue. Elle met en jeu deux cascades de signalisation principales : la voie des PI3K/Akt et de Ras/Erk qui activent l'expression du gène de l'ANG1 de même que le facteur Hif1- α (Kaur *et al*, 2005) (Figure 53).

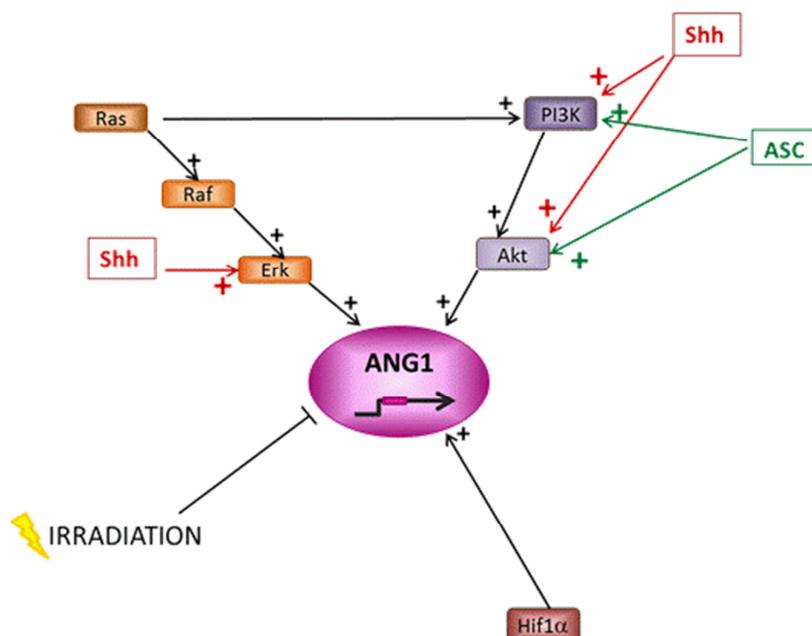


Figure 53 : Schéma synthétique des voies de signalisation activant la transcription du gène de l'angiopoïétine 1.

De façon pertinente, il a été rapporté que le sécrétome des ASC favorisait l'activation de la voie PI3K/Akt (Fan *et al*, 2012) de même que Shh qui est également impliquée dans la stimulation de la voie Ras/Erk par activation de Erk (Chang *et al*, 2010 ; Madhala-Levy *et al*, 2012 ; Yao *et al*, 2014) (Figure 53). Ces voies métaboliques ont pu être activées dans les fibroblastes des groupes milieux conditionnés permettant d'expliquer l'augmentation transitoire d'expression de l'ANG1 observée dans notre étude.

Concernant le VEGF on observe, dans les milieux conditionnés par les ASC et ASC-Shh, une diminution 6 h après exposition suivie d'une augmentation à 24 h post-irradiation. Cette augmentation persiste jusqu'à 48 h post-irradiation pour les fibroblastes irradiés du MC-ASC-Shh avec une différence statistiquement significative entre MC-ASC et MC-ASC-Shh. La voie de signalisation aboutissant à l'expression du VEGF α , bien que plus complexe, est mieux connue que celles de l'ANG1. Aux voies de signalisation PI3K/Akt, RAS/Erk (Rak *et al*, 2000 ; Pages and Pouyssegur, 2005 ; Banerjee *et al*, 2007) et Hif1- α (Kaur *et al*, 2005), s'ajoute la protéine p38, impliquée dans l'augmentation d'expression du VEGF α et la stabilisation de son ARNm et principalement activée en cas de stress cellulaire (Tate *et al*, 2013). La voie de signalisation JAK/STAT, stimulant l'expression de ce gène (Niu *et al*, 2002) et la protéine SPARC qui, à l'inverse réprime VEGF α (Rivera *et al*, 2011) sont également impliquées (Figure 54).

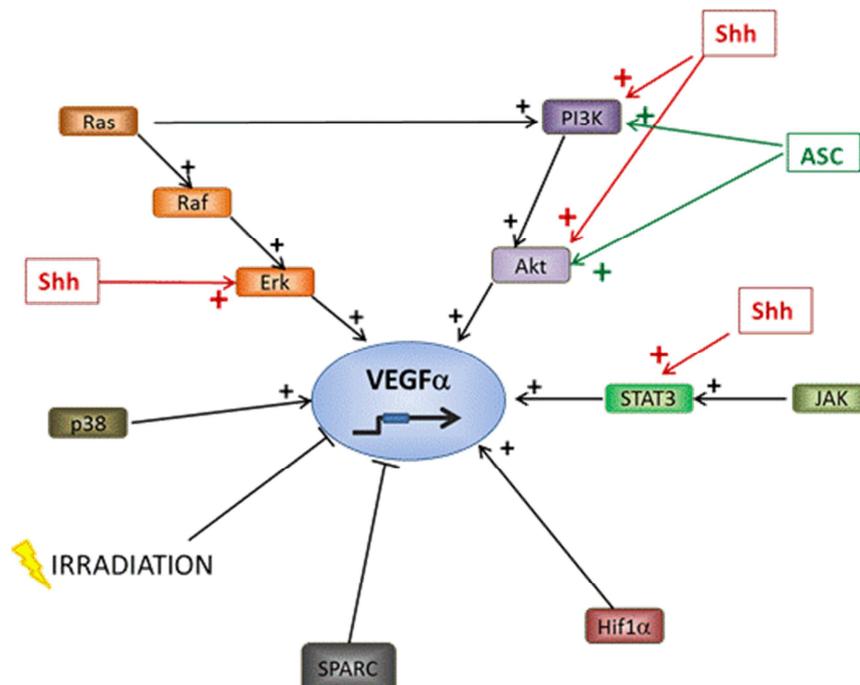


Figure 54 : Schéma synthétique des voies de signalisation activant la transcription du gène du VEGF α .

Comme nous l'avons indiqué précédemment, le sécrétome des ASC stimule la voie des PI3K/Akt (Fan *et al*, 2012) expliquant l'augmentation d'expression du VEGF α à 24 h post-irradiation pour les fibroblastes du MC-ASC. De plus, de nombreux travaux *in vitro* ont montré que la protéine Shh intervient à plusieurs niveaux dans les voies de transduction de l'expression de VEGF α . En effet, elle stimule la voie PI3K/Akt (Madhala-Levy *et al*, 2012), RAS/Erk (Chang *et al*, 2010) comme pour l'angiopoïétine 1, mais également la voie JAK/STAT3 (Lappano and Maggiolini, 2011). Il est également important de noter que pour la régulation de l'expression de VEGF α , les voies préférentielles d'activation diffèrent en fonction du type cellulaire. Pagès *et al*, ont mis notamment en évidence que les voies PI3K/Akt (stimulée par les ASC et Shh) et RAS/Erk (stimulée par Shh) sont respectivement mises en œuvre de façon préférentielle dans les cellules épithéliales et les fibroblastes (Pages and Pouyssegur, 2005). L'augmentation persistante de l'expression de VEGF α dans les fibroblastes irradiés du MC-ASC-Shh est en accord avec ces données.

Dans ce travail, on observe également une diminution transitoire significative de l'expression du VEGF α à 6 h post-irradiation pour les cellules irradiées des deux milieux conditionnés (ASC et ASC-Shh). Il est à noter que, tout comme l'angiopoïétine 1, l'expression du VEGF α est diminuée par l'exposition aux rayonnements ionisants (Lee *et al*, 2011). Celle-ci a été observée entre 8 h et 24 h post irradiation. Une cinétique d'expression du VEGF α variable suite aux RI entre les différents milieux de culture est envisageable. En effet, l'expression de ce gène n'a été quantifiée qu'à quatre temps post-irradiation, il n'est donc pas possible d'exclure un décalage de la cinétique d'expression avec une diminution de l'expression de VEGF α plus précoce ou vraisemblablement plus tardive dans les fibroblastes irradiés du milieu témoin.

Au total cette étude par RT-qPCR a permis d'analyser les effets directs de Shh et indirect des ASC via leur sécrétome sur l'expression des gènes pro-angiogéniques par des fibroblastes irradiés. Ces travaux dont les résultats sont en accord avec la littérature nécessitent cependant d'être complétés par une analyse de l'expression protéique de ANG1, ANG2 et VEGF α par WB ou ELISA. La cinétique d'expression du VEGF α nécessite d'être précisée, notamment par une évaluation à des temps plus précoces. L'existence d'une synergie entre sécrétome des ASC et Shh, comme suggérée par le maintien prolongé de l'augmentation de l'expression de VEGF α dans le groupe MC-ASC-

Shh devra être confirmée. Le nombre important de voies de signalisation activées par Shh, dont certaines, communes avec le sécrétome ASC, pourrait sous tendre un tel effet coopératif.

Dans une deuxième étape, l'activité pro-angiogénique directe des ASC et des ASC-Shh a été confirmée *in vivo* dans un modèle de souris NOD/SCID implantées avec des Matrigel™ préalablement chargés avec des cellules souches manipulées ou non.

L'observation macroscopique des Matrigel™ implantés a permis de mettre en évidence une revascularisation (existence d'un ancrage vasculaire) accrue par la sécrétion de la protéine Shh et confirmée par le dosage du contenu en Hb et l'analyse immunohistochimique. Différents marqueurs spécifiques des cellules endothéliales ont été utilisés : le facteur von Willebrandt protéine cytoplasmique des cellules endothéliales, également impliqué dans la cascade de coagulation, le CD34, une protéine transmembranaire et le CD31 (PECAM-1) une molécule d'adhésion cellulaire de l'endothélium vasculaire (Gehling *et al*, 2000). Ces protéines initialement utilisées pour l'étude de l'angiogénèse tumorale représentent des marqueurs de choix des cellules endothéliales (Weidner *et al*, 1993).

Le facteur von Willebrandt ne révèle pas de différence entre les diverses conditions de Matrigel™ mais il est important de noter que ce facteur est principalement exprimé dans les vaisseaux de gros calibre. A l'inverse on observe des marquages CD34 et CD31 importants dans les Matrigel™ chargés avec des ASC et des ASC-Shh. Particulièrement le CD31, spécifique des cellules endothéliales, met clairement en évidence la présence de cellules positives pour cette protéine formant des agrégats dans les Matrigel™ contenant des ASC-Shh.

Afin de compléter ces résultats, des approches optimisées de marquage des ASC et ASC-Shh avant chargement des biogels permettrait d'étudier leur localisation finale au regard des structures vasculaires et d'identifier des phénomènes éventuels de transdifférenciation. Nos résultats confirment de manière pertinente le potentiel pro-angiogénique des ASC et leur optimisation par Shh.

L'ensemble de ces travaux utilisant des cellules porcines n'a pas montré une activité du sécrétome des ASC et ASC-Shh vis à vis des réactions cellulaires précoces post-irradiation des fibroblastes : induction des systèmes de réparation de l'ADN, modulation de la réponse au stress oxydatif, apoptose et nécrose. Ils ont en revanche confirmé l'activité pro-angiogénique des facteurs sécrétés par les ASC et leur effet sur la survie cellulaire, impliquant principalement l'inhibition de l'entrée en sénescence. Dans le contexte du SCR une cellule en sénescence bien que métaboliquement active est incapable de division. En inhibant cette voie sans activer l'apoptose ou la nécrose des fibroblastes irradiés, les facteurs paracrines des ASC vont permettre de maintenir un nombre plus important de cellules capables de proliférer. De plus, nous avons observé une optimisation du sécrétome des ASC par la transfection transitoire de Shh. Cette protéine ne semble pas agir sur l'entrée en sénescence mais possède une action anti-inflammatoire particulièrement importante pour le traitement du SCR. Il est intéressant de noter que le sécrétome des ASC-Shh présente également un potentiel angiogénique plus important que celui des ASC, induisant une augmentation significativement plus prolongée de l'expression du VEGF α . Ceci suggère que, comme recherché, la transfection transitoire des ASC par Shh optimise leur potentiel pro-régénératif avec une action synergique sur l'immunosuppression et l'angiogénèse. Globalement ces résultats confirment les résultats de Chen *et al* (Chen L. *et al*, 2008), sur l'importance des facteurs paracrines pour favoriser la cicatrisation. Ils soulèvent la question de l'utilisation de milieux conditionnés acellulaires pour s'affranchir de la compatibilité donneur-receveur.

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECIVES

DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Les caractéristiques cliniques et physiopathologiques du syndrome cutané radio-induit rendent sa prise en charge complexe en raison notamment des délais d'apparition des lésions et d'une évolution ponctuée de vagues inflammatoires extensives imprévisibles (Delanian and Lefaix, 2005). Cependant, si la chirurgie d'exérèse très délabrante était fréquente voire de règle il y a une quinzaine d'années, les progrès réalisés depuis ont été notables, en particulier grâce à la définition d'une stratégie qui combine injection de cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse et traitement chirurgical guidé par dosimétrie physique (Bey *et al*, 2010a). Le potentiel régénératif des cellules souches multipotentes adultes a été démontré par de nombreux travaux bien que leur mécanisme d'action reste discuté (Caplan, 2009 ; Zuk, 2010 ; Chen *et al*, 2012 ; Strioga *et al*, 2012). Se fondant sur ces données, l'objectif de ce travail de thèse était d'identifier des approches permettant d'améliorer la prise en charge du SCR. En effet, celle-ci est actuellement limitée aux cas isolés de surexposition cutanée en raison du temps d'expansion nécessaire pour produire des greffons de cellules souches de taille suffisante. De nombreux travaux ont été réalisés dans le domaine de la réparation tissulaire avec des BM-MSc (Strioga *et al*, 2012), cependant, depuis la découverte des cellules souches dans les autres tissus conjonctifs, les cellules souches dérivées du tissu adipeux (ASC) ont révélé un potentiel pro-régénératif important voire supérieur au BM-MSc (De Ugarte *et al*, 2003b ; Kern *et al*, 2006). Elles sont par ailleurs plus faciles d'accès et plus abondantes. Ainsi, nous avons choisi dans notre étude, d'évaluer les ASC comme nouvelle source de cellules souches adultes pour la prise en charge du SCR (Fraser *et al*, 2006 ; Hass *et al*, 2011).

Fondées sur les propriétés décrites des ASC, différentes stratégies thérapeutiques étaient envisageables :

- la constitution de banques cellulaires, autologues et allogéniques
- l'optimisation *ex vivo* des cellules souches limitant ainsi le nombre de cellules constituant le greffon (thérapie génique transitoire)
- l'utilisation du sécrétome de cellules souches optimisées ou non (milieux conditionnés)

La constitution de banques est une approche réaliste, maîtrisée pour d'autres sources de cellules souches (greffons de sang de cordon (Petrini, 2014)). Elle permet la mise à disposition du clinicien, sans délai, d'un greffon de taille clinique. Nos travaux réalisés chez le miniporc ont permis de montrer le bénéfice clinique de l'injection d'ASC autologues ayant subi un cycle de congélation-décongélation. La fonctionnalité des cellules injectées confirme les travaux mettant en évidence un temps de doublement, une entrée en sénescence et une expression des marqueurs de surface similaires pour des ASC dites « fraîches » et congelées (De Rosa *et al*, 2009 ; Devireddy and Thirumala, 2011 ; Miyamoto *et al*, 2012) ainsi que l'absence d'aberrations chromosomiques (Dariolli *et al*, 2013). Cependant, dans un contexte d'application clinique, l'absence de toxicité du cryoconservateur reste un défi technique majeur. Des travaux sont en cours pour diminuer voire abolir l'utilisation du diméthyl sulfoxyde notamment par l'utilisation de séricine (Miyamoto *et al*, 2012) ou de méthyl cellulose (Thirumala *et al*, 2010) permettant, à terme, l'obtention de greffons de grade clinique.

Les injections d'ASC allogéniques sans phénotypage, produites dans les mêmes conditions que les ASC autologues, n'ont, dans notre modèle, pas permis d'observer de bénéfice clinique. Les propriétés immunomodulatrices (Cui *et al*, 2007 ; Yanez *et al*, 2010), l'absence d'expression du CMH2 des ASC (Le Blanc *et al*, 2003b) et les résultats de greffes allogéniques publiés chez le rongeur justifiaient ce volet de notre étude (Chen *et al*, 2009 ; Gimble *et al*, 2011). Le modèle miniporc, plus proche de l'Homme, est cependant plus complexe que le modèle rongeur sur le plan immunologique. De plus, le micro-environnement pro-inflammatoire a pu favoriser l'expression du CMH2 par les ASC (Kronsteiner *et al*, 2011). Au total, la stratégie des banques cellulaires nécessite donc, à ce stade, des investigations supplémentaires pour pouvoir être mise en place notamment avec le typage du CMH des cellules souches.

La manipulation *ex vivo* des ASC dans le but de leur faire sécréter des facteurs trophiques d'intérêt (thérapie génique transitoire), impliqués dans les processus majeurs de la cicatrisation tels que la prolifération cellulaire, la néoangiogénèse, l'inflammation, représente une autre approche innovante. Elle se fonde sur une expression transitoire (sans intégration dans le génome du matériel génétique) de la protéine choisie, pendant une durée suffisante pour permettre de produire un effet thérapeutique mais non prolongée, pour limiter une iatrogénie de type pro-tumoral. Dans ce travail, l'évaluation d'un

protocole de thérapie génique transitoire par nucléofection permettant la synthèse de la protéine Shh par les ASC a confirmé tant *in vitro* que *in vivo* la faisabilité de cette technique. En effet, le protocole évalué permet la transfection d'environ 25% des ASC avec une survie des cellules de 90% et ainsi, l'obtention de greffons de tailles cliniques, bien tolérés après injections locales chez le miniporc irradié localement à 50 Gy. La protéine Shh, choisie pour ses propriétés pro-angiogéniques (Pola *et al*, 2001) et anti-apoptotiques (Kasper *et al*, 2006), a montré son intérêt *in vitro* et *in vivo* en particulier en stimulant la néoangiogénèse. D'autres protéines pourraient permettre d'optimiser le potentiel des ASC. On retiendra notamment la protéine Klotho naturellement exprimée dans les cellules des tubules rénaux distaux. Cette protéine, à la fois récepteur membranaire et protéine sécrétée après clivage, initialement appelée « hormone de jeunesse » (Kuro-o, 2008), est impliquée dans la lutte contre les espèces réactives de l'oxygène, via la stimulation de la synthèse des enzymes anti-oxydantes (Kuro-o, 2009). Cette action anti-oxydante influe indirectement sur la mort cellulaire en diminuant l'entrée en apoptose des cellules et surtout l'entrée en sénescence prématurée (Ikushima *et al*, 2006 ; Carracedo *et al*, 2012). Par ailleurs, il a également été mis en évidence que Klotho favorisait la néoangiogénèse *in vivo* dans un modèle murin d'ischémie vasculaire (Fukino *et al*, 2002) et qu'elle présentait un potentiel immunosuppresseur observé au niveau rénal (Izquierdo *et al*, 2012 ; Zhou *et al*, 2014).

La stratégie de thérapie génique transitoire nécessite à ce stade, pour être validée, la réalisation d'une cohorte complète d'animaux. La production de greffons de tailles plus importantes doit être également recherchée. Globalement, concernant l'application à la clinique, la législation encadrant l'utilisation et les essais de thérapie génique considère cette stratégie comme un médicament et impose donc un contrôle des bonnes pratiques cliniques et de laboratoire qu'il importera de respecter avec une grande rigueur.

Dans notre modèle, il a été observé que les injections d'ASC autologues et d'ASC-Shh ont permis une cicatrisation des lésions cutanées avec cependant un défaut sous cutané associé, secondaire à une fibrose des tissus musculaires sous-jacents, plus important avec les injections d'ASC-Shh. Ces injections étaient réalisées localement, en sous cutané, dans la zone irradiée et les ASC injectées sont restées 4 jours dans le derme à proximité du point d'administration (Forcheron *et al*, 2012). En se fondant sur les résultats observés avec les BM-MSK et les ASC sur la réparation myocardique et la réparation des muscles squelettiques (Dezawa *et al*, 2005 ; Farini *et al*, 2012 ; Henning, 2013), l'injection

complémentaire d'ASC en profondeur ou en intramusculaire pourrait permettre de réduire cette fibrose musculaire.

Pour s'affranchir des risques d'incompatibilité donneur-receveur évoqués précédemment, l'utilisation du sécrétome des ASC ou des ASC transfectées par Shh (*i.e.* milieux conditionnés) apparaît également comme une stratégie acellulaire innovante. Les résultats *in vitro* de ce travail visant à évaluer les mécanismes d'action des facteurs paracrines des ASC et ASC-Shh ont mis en évidence un effet du sécrétome des ASC sur la survie cellulaire des fibroblastes irradiés par inhibition de l'entrée en sénescence prématurée et sur l'angiogénèse. De plus, ils suggèrent que le sécrétome des ASC-Shh exerce une activité immunosuppressive sur les fibroblastes irradiés qui devra être confirmée par des investigations complémentaires. Ces travaux ont également montré que ce sécrétome favorisait l'angiogénèse et suggèrent une action synergique des facteurs paracrines des ASC et de Shh. L'utilisation des sécrétomes nécessite cependant de lever un certain nombre d'obstacles. Les milieux de culture de ces cellules contiennent des composés toxiques et non désirables pour une utilisation clinique tels que l'HEPES ou le sérum de veau fœtal. De nombreuses équipes travaillent sur ce point et proposent des alternatives avec la mise au point de milieux de culture efficaces, de grade clinique, comme le lysat plaquettaire humain en remplacement du sérum de veau fœtal (Bieback *et al*, 2009 ; Bhang *et al*, 2014). De plus, Timmers *et al* et Lai *et al* ont montré que les principaux facteurs paracrines impliqués dans la réparation tissulaire étaient libérés dans des vésicules extracellulaires (VE) (Timmers *et al*, 2007 ; Lai *et al*, 2010). La séparation des VE par ultracentrifugation est une technique relativement aisée (Katsuda *et al*, 2013). Si les expérimentations confirment *in vivo* les résultats obtenus sur des cultures cellulaires, cette technique permettra l'utilisation du sécrétome en s'affranchissant du milieu de culture des cellules souches. Une autre limite est constituée par le caractère encore partiel des connaissances concernant les mécanismes d'action des MSC/ASC en réparation tissulaire. Il est actuellement admis que les facteurs sécrétés jouent un rôle pivot dans ce domaine (Chen L. *et al*, 2008 ; Gnechi *et al*, 2008 ; Hocking and Gibran, 2010 ; Walter MN. *et al*, 2010 ; Yew *et al*, 2011 ; Liang *et al*, 2013 ; Bhang *et al*, 2014) cependant, l'hypothèse d'une implication/participation des processus de transdifférenciation ne peut être totalement abandonnée. Les travaux de Derby *et al* ont ainsi montré une implantation prolongée des ASC dans le derme et mis en évidence leur différenciation en kératinocytes

dans des modèles *in vivo* de lésion cutanée (Derby *et al*, 2014). Enfin, l'injection de cellules souches au niveau du site de lésion permet la sécrétion en continue de facteurs paracrines avec une forte biodisponibilité contrairement au « pulse » que représente l'injection du sécrétome des cellules souches.

L'utilisation du sécrétome des ASC ou des ASC optimisée par thérapie génique représenterait une alternative permettant de s'affranchir du temps de culture et de la compatibilité donneur-receveur. Des travaux complémentaires *in vivo* sont cependant nécessaires pour déterminer si le potentiel des facteurs paracrines suffit à obtenir, à lui seul, un effet bénéfique sur la cicatrisation du SCR comparable à l'injection d'ASC.

L'optimisation du traitement du SCR ne se limite pas aux banques cellulaires, à la thérapie génique transitoire et à l'utilisation du sécrétome des cellules souches. De nombreux travaux sont en cours dans le domaine de la médecine régénérative.

Le pré-conditionnement ou « priming » des cellules souches dans le but d'accroître leur efficacité thérapeutique après (re)injection représente une autre approche innovante. La culture en condition hypoxique, technique la plus étudiée (Ivanovic, 2009), permet notamment d'améliorer la survie des ASC et des BM-MSC (Stubbs *et al*, 2012 ; Yue *et al*, 2013), de favoriser leur migration vers les tissus lésés (Rosova *et al*, 2008) et leur rôle immunosuppresseur par inhibition de la voie COX1/2 (Loos *et al*, 2008). Une accélération de la différenciation en précurseurs des cellules endothéliales et une sécrétion accrue de facteurs pro-angiogéniques (Wei *et al*, 2012 ; Liu *et al*, 2013) ont également été rapportés. *In vivo*, Kim *et al* ont de plus montré que la culture des ASC sous hypoxie favorisait la réparation cutanée dans un modèle de souris NOD/SCID (Kim and Sung, 2012). La culture des ASC sous condition oxydative favorise également la migration des cellules vers les tissus lésés et semble diminuer leur apoptose (Li *et al*, 2009).

D'autres techniques de pré-conditionnement ont été évaluées, en particulier la co-culture des MSC en présence de cytokines. Le TNF α favoriserait ainsi la sécrétion de facteurs pro-angiogéniques et le rôle immunosuppresseur des MSC (Loos *et al*, 2008 ; Khan *et al*, 2011), tandis que l'érythropoïétine (EPO) favoriserait la différenciation des cellules souches en progéniteurs endothéliaux (Yu *et al*, 2013). Il a également été rapporté des méthodes de pré-conditionnement plus complexes telles que la co-culture des ASC avec des kératinocytes ou dans des milieux conditionnés par des kératinocytes qui orienteraient la différenciation des cellules souches vers ce type cellulaire (Chavez-Munoz *et al*, 2013). Ces

techniques de pré-conditionnement ouvrent un nouveau champ de recherche en accentuant par un « priming » adapté la, ou les propriétés des MSC impliquées dans la réparation cutanée.

Les MSC représentent une source de cellules souches pouvant également être utilisées dans le cadre d'associations avec des biomatériaux pour promouvoir des interactions plus physiologiques et permettre un recouvrement tissulaire. Ainsi, de véritables substituts dermiques pourraient être réalisés dans le cas de la régénération cutanée. Les structures en nanofibres ou les « scaffold » associés avec des MSC représentent à cet égard une stratégie innovante. La majorité de ces biomatériaux ont été développés dans les années 90 pour mimer les propriétés de la matrice extracellulaire et constituent une structure acellulaire mature à la fois en terme d'architecture que de structure moléculaire. Ils représentent un support favorisant l'organisation dans l'espace en 3D du réseau des MSC (Jayarama Reddy *et al*, 2013) et augmentent de manière synergique via leur interaction avec les cellules, l'activité pro-angiogénique de ces dernières (Hodgkinson and Bayat, 2011 ; Liu *et al*, 2011 ; Jayarama Reddy *et al*, 2013). Ce réseau formé favoriserait ainsi le transport des nutriments indispensables à la réparation tissulaire (Egana *et al*, 2009). Cette stratégie thérapeutique émergente semble prometteuse dans la prise en charge du SCR.

Faisant suite aux travaux initiaux du groupe de Yamanaka *et al* présentés en 2006, les cellules souches pluripotentes induites (induced Pluripotent Stem Cells iPSC) peuvent présenter une nouvelle base d'étude pour la régénération tissulaire. Les travaux en cours devront établir si ces cellules souches pluripotentes reprogrammées constitueront dans l'avenir un outil applicable en clinique (Takahashi and Yamanaka, 2006). Ces cellules initialement produites à partir de fibroblastes de souris par la transduction de 4 facteurs de transcription (Oct4, Sox2, Klf4 et c-Myc), sont reprogrammées à un stade de cellules embryonnaires indifférenciées (Takahashi *et al*, 2007). Depuis, les iPSC ont été produites à partir d'un grand nombre de cellules somatiques différenciées et de cellules souches adultes aussi bien chez la souris (Meissner *et al*, 2007 ; Takahashi *et al*, 2007 ; Eminli *et al*, 2008 ; Varga *et al*, 2014) que chez l'Homme (Aasen *et al*, 2008 ; Lowry *et al*, 2008 ; Nakagawa *et al*, 2008). La reprogrammation apparaît comme dépendante de la source

cellulaire utilisée, relativement facilitée dans le cas des cellules souches par rapport aux cellules épidermiques différenciées pour ce qui est de notre domaine d'application (Li *et al*, 2007) et pour les ASC en comparaison des BM-MSc (Ong and Sugii, 2013). Chez l'Homme, Shamis *et al* ont mis en évidence pour des iPSC produites à partir de fibroblastes du derme, des propriétés pro-angiogéniques *in vitro*, avec une sécrétion augmentée de facteurs tels que VEGF α , ANG1, HGF, IL-8, PDGF-AA (Shamis *et al*, 2013). Actuellement, de nombreuses limites affectent l'application de cette thérapie personnalisée, principalement d'ordre technique. En effet, il est nécessaire pour appliquer cette stratégie thérapeutique à l'Homme, de maîtriser le développement de méthodes de production d'iPSC sécurisées et efficaces : l'utilisation de vecteurs rétroviraux pour obtenir ces cellules étant la contrainte majeure actuellement, de même que le choix du type cellulaire à reprogrammer (Li *et al*, 2010). Il est néanmoins, clairement admis que les iPSC représentent un nouvel outil prometteur dans le domaine de la thérapie régénératrice qui couvre un grand domaine de recherche dont la régénération tissulaire en général et la réparation cutanée en particulier.

La découverte en 2010 des télocytes pourrait également permettre des avancées thérapeutiques dans ce domaine. Ces cellules interstitielles de petites tailles présentant des prolongements membranaires (télopodes) ont initialement été observées au niveau du myocarde puis au niveau du rein, du foie et de la peau (Popescu and Fausone-Pellegrini, 2010). Il a été récemment décrit qu'une perte progressive des télocytes du tissu cutané pouvait contribuer à modifier l'organisation de la matrice extracellulaire, diminuant le contrôle de l'activité des fibroblastes et réduisant ainsi la capacité de réparation et de régénération de la peau (Manetti *et al*, 2013). La présence des télocytes est décrite comme étant nécessaire pour prolonger l'efficacité de progéniteurs greffés et maintenir l'homéostasie tissulaire (Ceafalan *et al*, 2012). Par ailleurs, leurs télopodes entourent les cellules souches (Popescu *et al*, 2011), suggérant que leur présence participe fortement à la survie des greffons de MSC et au maintien du réservoir de cellules souches endogènes. Le potentiel de ces cellules n'est pas encore maîtrisé, cependant les travaux menés sur la compréhension des mécanismes d'interactions télocytes-MSc pourraient permettre d'identifier de nouveaux facteurs clés et de développer de nouvelles méthodes d'optimisation des greffes de MSc.

La thérapie cellulaire représente un ensemble d'approches thérapeutiques non exemptes de risques. On citera notamment le risque d'incompatibilité immunologique, de développement de tumeur en raison des propriétés pro-angiogéniques et anti-apoptotiques des cellules souches et le risque intrinsèque représenté par l'injection d'un traitement en particulier l'infection, qui est favorisée, dans ce contexte, par le temps de culture des cellules. Concernant les MSC, l'étude de Tarte *et al* (Tarte *et al*, 2010) suggère que le risque d'accumulation d'instabilités chromosomiques au cours des cultures a été surévalué et qu'elles constituent un médicament cellulaire sûr, même si la maîtrise et la connaissance des conséquences de phénomènes tels que la sénescence reste incomplète. De nombreuses étapes de contrôle qui existent déjà peuvent être mises en place comme l'analyse phénotypique des cellules, l'étude de l'activité télomérase ou les contrôles de contamination pour permettre l'injection de greffon de grade clinique (Lataillade *et al*, 2007). Par ailleurs, l'induction de tumeurs par les MSC reste actuellement un sujet débattu avec des résultats expérimentaux variables en fonction du type de cancer, du tissu d'origine des cellules et du mode d'injection. Un effet pro-tumoral a été rapporté dans le cancer du côlon (Shinagawa *et al*, 2010), du poumon (Karnoub *et al*, 2007) et les lymphomes (Ame-Thomas *et al*, 2007), via une l'induction d'une immunosuppression et la prolifération des MSC dans les tumeurs (Djouad *et al*, 2003 ; Klopp *et al*, 2012). A l'inverse un effet anti-tumoral a été mis en évidence après injections systémiques de MSC dans le cancer du foie (Qiao *et al*, 2008), et des leucémies (Zhu *et al*, 2009) principalement par modification de la voie de signalisation Akt favorisant l'apoptose des cellules cancéreuses (Hong *et al*, 2014). Le seul consensus existant actuellement dans ce domaine est la migration des MSC dans le site de la tumeur, ce qui serait particulièrement problématique lors d'injections systémiques en cas de cancer infra-clinique (Bibber *et al*, 2013 ; Hong *et al*, 2014). Dans le cadre du SCR ce risque apparaît cependant moindre que dans un contexte de patient oncologique mais la balance bénéfico-risque ne doit pas être ignorée et le choix de ce traitement devra être conditionné au cas par cas avec le choix éclairé du patient.

Les travaux récents sur la variabilité inter-individuelle concernant les propriétés des cellules souches suggèrent par ailleurs l'intérêt d'une recherche de marqueurs de qualité. En effet, les capacités sécrétoires, pro-angiogéniques et migratoires des MSC sont influencées par l'âge, le sexe, le statut pondéral et les maladies chroniques du donneur (Lei *et al*, 2007 ; Shu *et al*, 2012 ; Cianfarani *et al*, 2013 ; Scruggs *et al*, 2013 ; Rennert *et al*, 2014 ; Wu LW. *et al*, 2014). La détermination de marqueurs phénotypiques ou sécrétoires

par exemple, permettrait de sélectionner les MSC les plus aptes à la régénération tissulaire et donc les plus intéressantes pour le traitement du SCR. Ce concept, de même que les stratégies de thérapie cellulaire et génique ne limitent pas leur application au syndrome cutané radio-induit.

En conclusion la thérapie cellulaire et génique n'a pas à notre sens atteint à ce jour sa phase de maturité. De nombreuses études ont montré l'intérêt des BM-MSC et ASC dans le cadre de la réparation cutanée (Fu *et al*, 2006 ; Sheng *et al*, 2013), myocardique (Silva *et al*, 2005 ; Mazo *et al*, 2012) et dans la prise en charge de la maladie du greffon contre l'hôte (Yanez *et al*, 2006 ; Polchert *et al*, 2008). L'utilisation des milieux conditionnés est également à l'étude et de nombreuses équipes ont d'ores et déjà montré un effet du sécrétome des cellules souches, aussi bien dans la régénération de la peau (Hocking and Gibran, 2010 ; Walter MN. *et al*, 2010) que dans les ischémies myocardiques (Timmers *et al*, 2007 ; Lai *et al*, 2010 ; Angoulvant *et al*, 2011) ou les lésions intestinales (Gao *et al*, 2012) et bucco-dentaires (Tran *et al*, 2013) post-radiothérapie. De plus, des modèles précliniques ont suggéré l'intérêt de la thérapie génique dans la prise en charge du syndrome aigu d'irradiation pour pallier la myélosuppression radio-induite (Drouet *et al*, 2014a ; Drouet *et al*, 2014b ; Drouet and Herodin, 2014), mais également en dehors du contexte radiopathologique pour le traitement des lésions intestinales (Xiao *et al*, 2013) et myocardiques (Pan *et al*, 2014).

La thérapie cellulaire et génique est donc, à ce jour, un domaine d'étude en pleine évolution. L'application des stratégies actuellement maîtrisées au contexte des victimes d'irradiation à forte dose est prometteuse mais les limites constatées justifient la poursuite de la recherche pour identifier des approches innovantes, telles que la thérapie génique transitoire ou l'utilisation de milieux conditionnés. Au-delà de la prise en charge du SCR, les pathologies radio-induites notamment digestives de même que toutes les pathologies nécessitant une régénération tissulaire pourraient bénéficier à terme des avancées réalisées dans ce domaine.

ANNEXES

ANNEXES

Annexe 1 :

Autologous adipocyte derived stem cells favour healing in a minipig model of cutaneous radiation syndrome.

Forcheron Fabien; Agay Diane; Scherthan Harry; Riccobono Diane; Hérodin Francis; Meineke Viktor; Drouet Michel.

PlosOne 2012; Feb 7:e31694

Autologous Adipocyte Derived Stem Cells Favour Healing in a Minipig Model of Cutaneous Radiation Syndrome

Fabien Forcheron¹, Diane Agay¹, Harry Scherthan², Diane Riccobono¹, Francis Herodin¹, Viktor Meineke², Michel Drouet^{1*}

1 Institut de Recherche Biomédicale des Armées-antenne La Tronche, La Tronche, France, **2** Institut für Radiobiologie der Bundeswehr, München, Germany

Abstract

Cutaneous radiation syndrome (CRS) is the delayed consequence of localized skin exposure to high doses of ionizing radiation. Here we examined for the first time in a large animal model the therapeutic potential of autologous adipose tissue-derived stroma cells (ASCs). For experiments, Gottingen minipigs were locally gamma irradiated using a ⁶⁰Co source at the dose of 50 Gy and grafted (n = 5) or not (n = 8). ASCs were cultured in MEM-alpha with 10% fetal calf serum and basic fibroblast growth factor (2 ng.mL⁻¹) and post irradiation were intradermally injected on days 25, 46, 67 and finally between days 95 and 115 (50.10⁶ ASCs each time) into the exposed area. All controls exhibited a clinical evolution with final necrosis (day 91). In grafted pigs an ultimate wound healing was observed in four out of five grafted animals (day 130 +/- 28). Immunohistological analysis of cytokeratin expression showed a complete epidermis recovery. Grafted ASCs accumulated at the dermis/subcutis barrier in which they attracted numerous immune cells, and even an increased vasculature in one pig. Globally this study suggests that local injection of ASCs may represent a useful strategy to mitigate CRS.

Citation: Forcheron F, Agay D, Scherthan H, Riccobono D, Herodin F, et al. (2012) Autologous Adipocyte Derived Stem Cells Favour Healing in a Minipig Model of Cutaneous Radiation Syndrome. PLoS ONE 7(2): e31694. doi:10.1371/journal.pone.0031694

Editor: Marianne Koritzinsky, University Health Network, Canada

Received: October 5, 2011; **Accepted:** January 18, 2012; **Published:** February 14, 2012

Copyright: © 2012 Forcheron et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by a grant from Direction Générale de l'Armement (Paris, France). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: micheldrouet@crssa.net

Introduction

Skin is a radiosensitive tissue which is exposed to significant radiation doses in radiotherapy and radio-oncology as are the underlying muscles, nerves and vasculature structures [1]. Intentional or accidental exposure of a relatively large area as well as localized "hot spot" exposures of the skin lead to severe damage of many of its cellular components and to the cutaneous radiation syndrome (CRS). The pathophysiology includes radiation-induced cell death (epidermal stem cell depletion, loss of capillary integrity) as well as impairment of the complex communication network between keratinocytes, dermal fibroblasts and resident or circulating immuno-competent cells. The classical clinical evolution of CRS is characterized by the delayed onset of the manifestation stage and consists in transient early erythema, dry/moist desquamation, dermal ischemia/necrosis and dermal atrophy [2]. The severity of the CRS depends on the radiation dose, quality and depth of penetration. Irradiation severely impairs wound healing which normally requires a well-orchestrated integration of complex biological and molecular events, including cell migration and proliferation, extracellular matrix deposition, angiogenesis and remodelling. Nowadays the treatment schedules for severe radiation burns are complex, and include excision of the highly exposed necrotic area (likely >20 Gy) followed by transient coverage of the wound bed and then by autologous skin grafts.

It has been hypothesized for some years that stem cell injection could reduce normal tissue injury or assists its recovery after

irradiation [3,4] but the role of local trophic secretions, anti-inflammatory activity and putative plasticity [5] have to be studied in more detail. Thus mesenchymal stem cells contained in the stromal vascular fraction of adipose tissues (ASCs) [6,7] may represent a new promising multipotent stem cell source.

Using a previously described minipig model [8], we here demonstrate for the first time in a large animal model the therapeutic potential of iterative autologous ASC grafting following high dose local irradiation. Wound healing, involving vascular remodelling and immunocompetent cell recruitment, was accelerated in 4 out of 5 treated animals, whereas all PBS-injected controls exhibited a severe necrotic process.

Materials and Methods

Animals

Thirteen female Gottingen Minipigs weighing about 20 kg were purchased from Ellegaard (Dalmose, Denmark) and housed in individual pen (21±1°C, 55% relative humidity, 12 h/12 h light-dark schedule) where they received solid food twice a day and had access to water ad libitum.

Ethical treatment of animals

This study was carried out in strict accordance with the European legislation for the care of laboratory animals. The protocol was approved by the French Army Animal Ethics Committee (Permit number: 2008/24.0). The irradiation of the

animals and all cell engraftments were performed under anesthesia, and all efforts were made during the study to minimize suffering of the minipigs.

ASC harvest and culture

One month prior irradiation, subcutaneous adipose tissue was collected under anaesthesia from the animal chest. Fat tissue was minced and incubated for 60 min at 37°C with collagenase II (Worthington, Lakewood, New Jersey, US). After centrifugation and filtration, adherent fraction from pelleted cells was cultured in minimum essential medium (MEMa) (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, New Mexico, US) supplemented with 10% fetal calf serum (HyClone part of Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, US) and basic fibroblast growth factor (2 ng mL^{-1}) at 37°C in air with 5% CO_2 . Passages 3 to 8 ASCs were characterized at the end of the culture phase to control stemness using flow cytometry (BD LSRII, BD Biosciences, Pont de Claix, France) and their differentiation potential was assessed [8].

ASC transplantation in irradiated minipigs

The exposure to a collimated ^{60}Co gamma beam (IRDI4000, Alstom, Levallois-Perret, France) of the anesthetized animals induced a delayed burn injury limited to a narrow 20–25 cm long rectangle of lumbar skin and superficial underlying muscles, perpendicular to the body axis, without any vital peritoneal organ irradiation [8]. The dosimetric evaluation indicated a homogeneous dose of 51.465.0 Gy in the entry area, ranging to 14.362.5 Gy in the exit area.

The thirteen irradiated animals were randomly divided into two groups (Fig. 1). ASC-grafted minipigs ($n = 5$) were intradermally injected with autologous ASCs, four times over a 3 month period following irradiation (on days 25 and 46, before the onset of clinical symptoms, then 67, and finally between days 95 and 115). Each grafted minipig received a total of about $200 \cdot 10^6$ ASCs, corresponding to four grafts of $50 \cdot 10^6$ ASCs each time distributed in $32 \cdot 10^6$ ASCs through the entry area exposed to the major dose of 50 Gy where quick necrosis was predictable ($1 \cdot 10^6$ ASCs in 100 ml PBS in every cm^2 of damaged skin) and in $18 \cdot 10^6$ ASCs in the less irradiated exit area where pathological evolution was expected less severe ($1 \cdot 10^6$ ASCs in 100 ml PBS in every 2 cm^2 of skin). Non-grafted controls ($n = 8$) were injected with PBS alone according to the same scheme.

Clinical follow-up and sample harvest

During the follow-up period, all minipigs received a clinical observation three times a week in order to establish a clinical score including all pathological signs and pain evaluation. The initial score of healthy skin was 10, and a negative or a positive point was recorded for each clinical sign. A negative point was recorded for each sign as erythema, subcutaneous oedema, induration, formation of a purple spot corresponding to circulatory trouble, dry skin desquamation, wet peeling, partial or complete crust over the irradiated surface (from -1 to -3 points according to the spread), signs of necrosis (-2 points). To establish whether or not analgesics were needed, a veterinary examination was performed every day with evaluation of the overall condition of the animal based on drink and food intakes and behaviour, on local examination and palpation of the lesions and on assessment of analgesic treatment efficiency. Additive negative points were local sensitivity, spontaneous pain without contact solicitation, pain resistance to major analgesics (Fentanyl 50 mg h^{-1} , DurogesicTM $8.4 \text{ mg} \cdot 21 \text{ cm}^{-2}$, Janssen-Cilag, France). A positive point was recorded for the vanishing of previously described signs, for pain

relief, for particularly well being, and for the complete healing of radio-induced burn injuries with re-epithelialization of the wound surface. Potential tissue inflammatory processes were assessed at weekly intervals by using a thermal camera (Thermacam, Flir Systems, Issy-les-Moulineaux, France) and by measuring the skin dielectric constant which reflects the cutaneous fluid content (MoistureMeter D probe M25, Delfin Technologies, Kuopio, Finland) [9]. The end point of the experiment was defined as definite extensive skin necrosis not evolving towards healing (failure) or complete healing with epidermal regeneration (success). At this time, the pigs were killed (Dolethal, Vétoquinol SA, Lure, France) and underwent a delayed histological analysis. In addition, a kinetic study was performed in 4 controls and 2 grafted minipigs in which skin biopsies were harvested (biopunch 4 mm diameter, Kruuse, North Yorkshire, UK) from irradiated (entry) and time-matched non-irradiated skin area, three days after each ASC graft or PBS injection. The samples were immediately conditioned for histological analysis.

Histological procedures

For histological analysis, tissue samples were recovered by punch biopsy and immediately submersed in 4% formaldehyde/PBS (pH 7) overnight at room temperature. Biopsies were washed three times 5 min in PBS/0.1% Glycin and once in 0.9% NaCl at room temperature, subsequently dehydrated through a graded ethanol series and finally incubated for 30 min in toluene. Thereafter, tissue was embedded in Paraffin (Carl Roth, Karlsruhe, Germany) according to standard procedures.

For immunofluorescent staining, paraffin tissue sections were obtained at 5 mm thickness with a 2055 microtome (Leica, Wetzlar, Germany). Immunofluorescent staining was performed on deparaffinized and rehydrated sections subjected to antigen unmasking using 10 mM citrate buffer (pH 6) for 1 h at 95°C. After 3×5 min washes in PBS, sections were extracted for 20 min with 0.5% Triton X-100 in PBS on ice followed by 3×5 min washes in PBTC (PBS, 0.1% Na-Casein, 0.05% Tween-20, 0.1% fish gelatin) and incubated with the primary antibodies (DakoCytomation, Hamburg, Germany) over night at 4°C: monoclonal mouse anti-Ki67 (M7240 diluted to 1/250) for staining of proliferating cell nuclei, rabbit anti CD3 (N1580 used undiluted) and rabbit anti lambda light chain (A0193 diluted to 1/500) for lymphocyte labeling, mouse anti pan-cytokeratin AE1/AE3 (M3515 diluted to 1/200) for pan-cytokeratin staining, and rabbit anti-human von Willebrand factor (A0082 diluted to 1/200) for identification of endothelial cells and blood vessel integrity. After incubation sections were washed 364 min in PBS, 0.05% Tween20, 0.1% BSA and incubated with appropriate secondary antibodies, goat anti-mouse alexa 488-conjugated antibody (A11017 diluted to 1/250, MoBiTec, Göttingen, Germany) or donkey anti-rabbit Cy3-conjugated antibody (711-067-103 diluted to 1/500, Dianova, Hamburg Germany).

Finally, sections were covered with Vectashield antifade Solution (Vector, Germany) containing 49,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) as nuclear counterstain. Preparations were analyzed using a Zeiss Axioplan 2 fluorescence microscope equipped with the ISIS imaging system and appropriate fluorescent filter sets (MetaSystems, Altlussheim, Germany).

Regarding ASCs in situ localization, three days after each grafting specific biopsies centred on the injection plot of cells (10^6 ASCs in each plot) were performed. In these cases ASCs were previously labelled by an overnight incubation with fluorescent quantum dots (Q-dots; Q-tracker 705, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, New-Mexico, US) to allow their delayed histological tracking.

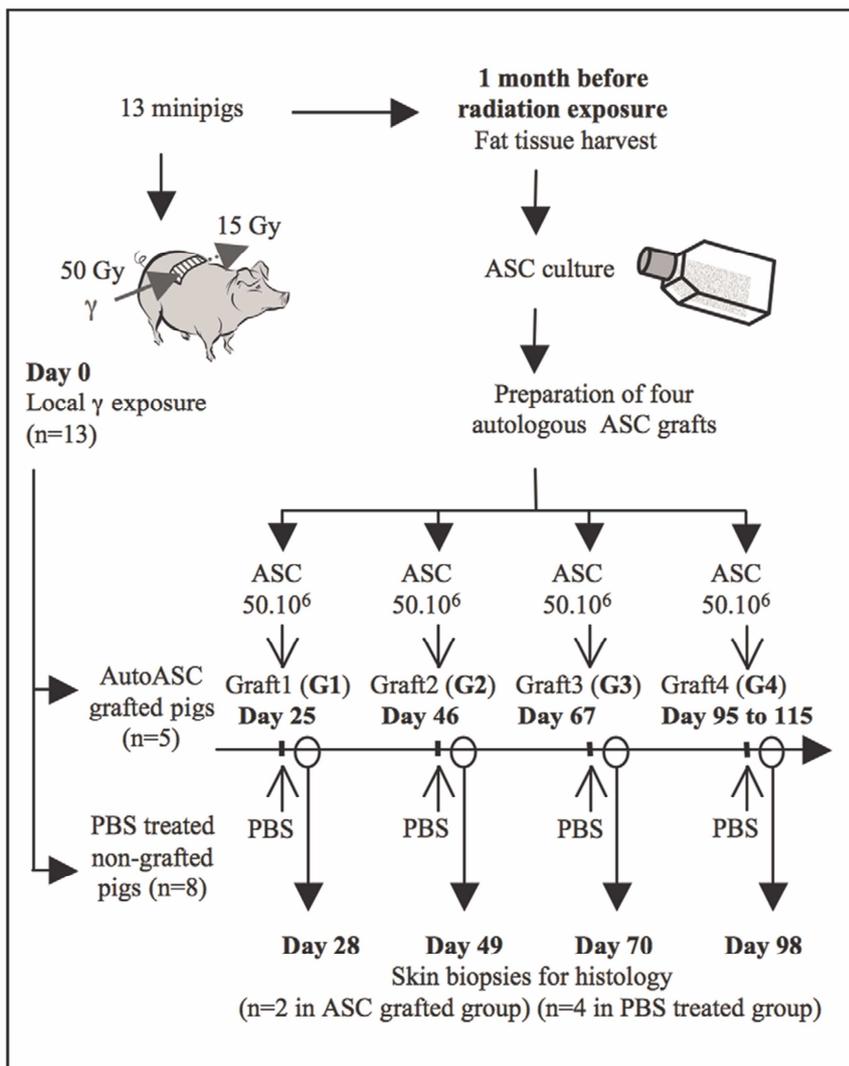


Figure 1. Study design.

doi:10.1371/journal.pone.0031694.g001

Statistical analysis

For the clinical study, comparisons in each group were performed using a Friedman RM Anova on ranks test or a Wilcoxon signed rank test for paired samples analysis (Statistica Software). The two animal groups were compared using a non parametric Mann-Whitney rank sum test. For the complimentary *in vitro* study we used a Wilcoxon matched pair test. A p value < 0.05 was considered significant.

Results

Characterization of ASCs

Flow cytometry analysis of prepared ASCs showed that they expressed the typical surface antigens CD90 and CD44, but were negative for pan-hematopoietic CD45 and CD31 antigens (Fig. 2A). When cultured in adipogenic, chondrogenic or osteogenic medium, they differentiated into adipocytes (accumulation of lipid vesicles), chondrocytes (proteoglycans) and osteocytes (alkaline phosphatases) (Fig. 2B).

Clinical evolution in controls

All controls exhibited a similar clinical evolution (Fig. 3A) in accordance with literature [2,10,11]. There was a transient reddening of the lumbar exposed area, which was confirmed by a superficial skin hyperthermia (Fig. 3B). A progressive hair loss was noted during 6 weeks post exposure, leading to a complete alopecia after two months. On about day 65, just before the third control PBS injection, the thermal camera imaging revealed a superficial skin hyperthermia in the entry area that was quickly followed by the swelling of the muscles and the distension of the cutaneous layer above the exposed tissues (Fig. 3C). This was followed by an extensive centrifugal moist skin desquamation, resulting in a thick scab over the entry area at day 76. At the same time, a cold purple spot due to vasculature failure developed in the 20–25 Gy exit area (Fig. 3D). Local intensive pain required morphine-based products after three months up to euthanasia of the animals. Finally, the skin wounds in both entry and exit areas progressively displayed extensive skin necrosis (from day 91) determining the end-point of the study on about day 119 after irradiation for 6 animals, and on days 124 and 140 for the two

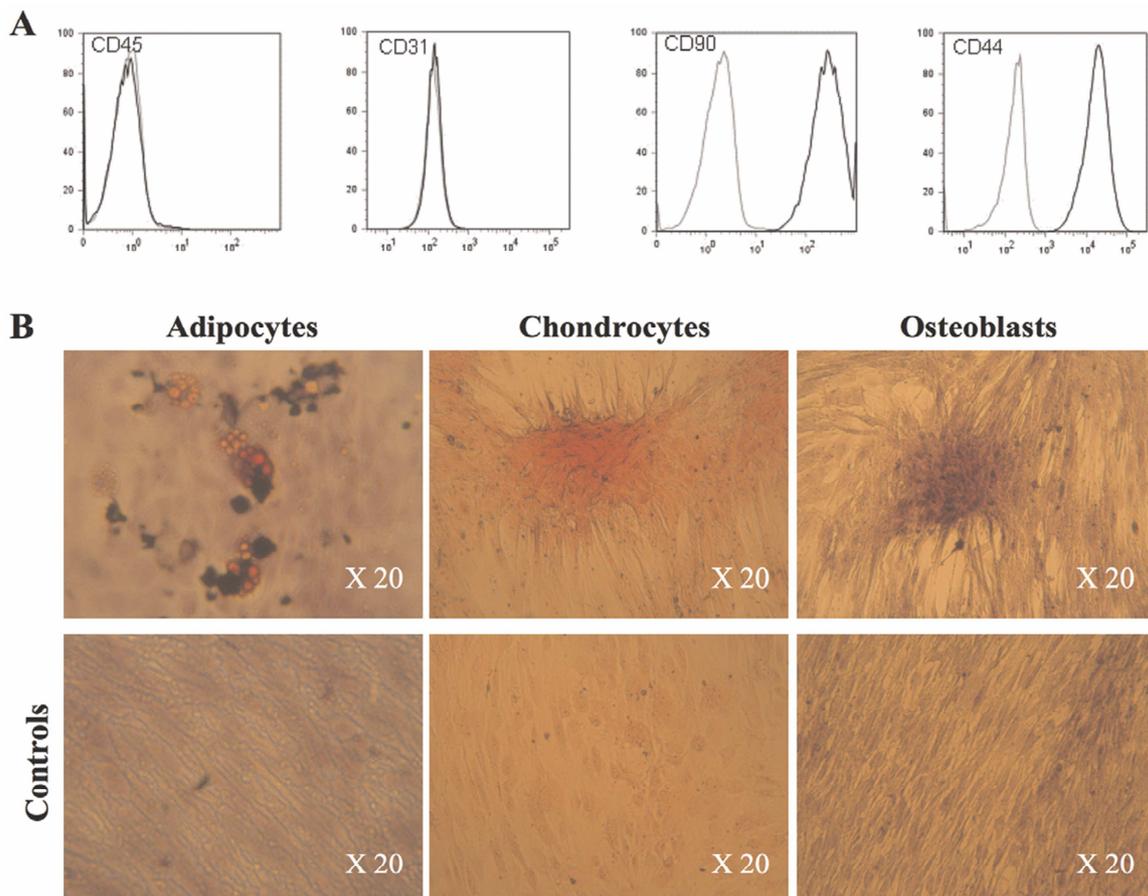


Figure 2. Characterization of ASCs. (A): Flow cytometric analysis after the 3rd passage of porcine ASCs labelled with FITC- or PE-conjugated control isotype IgG (bold curves) or antibodies against indicated cell surface proteins (dark curves). (B): Differentiation of ASCs cultured in specific media.
doi:10.1371/journal.pone.0031694.g002

remainings. Necropsy confirmed that the lesions were limited to the irradiated tissues behind the transversal epiphysis of the lumbar vertebrae: skin necrosis, thinning of the hypodermis (Fig. 3H), and hemorrhagic lesions or hyaline degeneration in the muscles were locally observed.

ASCs injection favours clinical wound healing after local irradiation

Each ASC injection in the damaged area induced a transient and painful localized inflammation for several days more severe than what we previously observed after bone marrow-mesenchymal stem cell (BM-MSC) injections [8]. The entry area displayed significant muscular swelling and thin scab lesions, which appeared significantly earlier than in controls (day 42±6 versus day 70±15, $p = 0.003$) (Fig. 3E) and before the second graft in two minipigs. Interestingly, the dielectric constant of the entire skin, which represents the water content of the whole dermis and subcutaneous fat, was significantly increased in ASC-treated minipigs between the second and the third grafts ($p = 0.021$) (Fig. 3F). In the exit area, a cold purple wound developed at the same time than in non-grafted controls (Fig. 3G). The irradiation-induced wounds necessitated an earlier analgesic treatment in grafted animals than in controls (day 81 versus day 89) and the treatment duration appeared longer (30 days versus 18 days) which may relate to the ASC-induced inflammation. Wound healing was observed in four out of five ASC-grafted animals at days 130±28

(range days 106 to 160). Local complete healing was observed in two grafted pigs, with disappearance of intercurrent inflammatory processes, pathognomonic for radiation burns, and total reepithelialisation (Fig. 3A) which persisted for more than 18 months post-exposure in one pig checked for long term follow up (Fig. 3I). The major analgesic treatment was not required in this animal in which pain was limited and could be dismissed after 6 weeks in the second one. Finally the reduced subcutaneous damage (Fig. 3H) and diminished delayed complications such as neurologic damage (confirmed after necropsy) accounted for a significantly extended survival time in the ASC-treated group in comparison with controls (day 139±16 and day 118±11 respectively, $p = 0,016$).

ASC engraftment in the irradiated skin

Three days after ASC grafting, Q-dot labelled ASCs were detected in the skin by epifluorescence microscopy. Grafted cells accumulated at the dermis/subcutis barrier (Fig. 4) where they had attracted numerous immune cells as reflected by an increased CD3 (T lymphocytes) and λ light chain (B lymphocytes) labelling relative to non-grafted control.

ASCs enhanced reepithelialisation after irradiation

In PBS-treated control minipigs, the intense local irradiation exposure induced the formation of a scabby lesion of the skin three months post irradiation, that was progressively evolving into superficial necrosis (Fig. 5). The HE staining confirmed the clinical

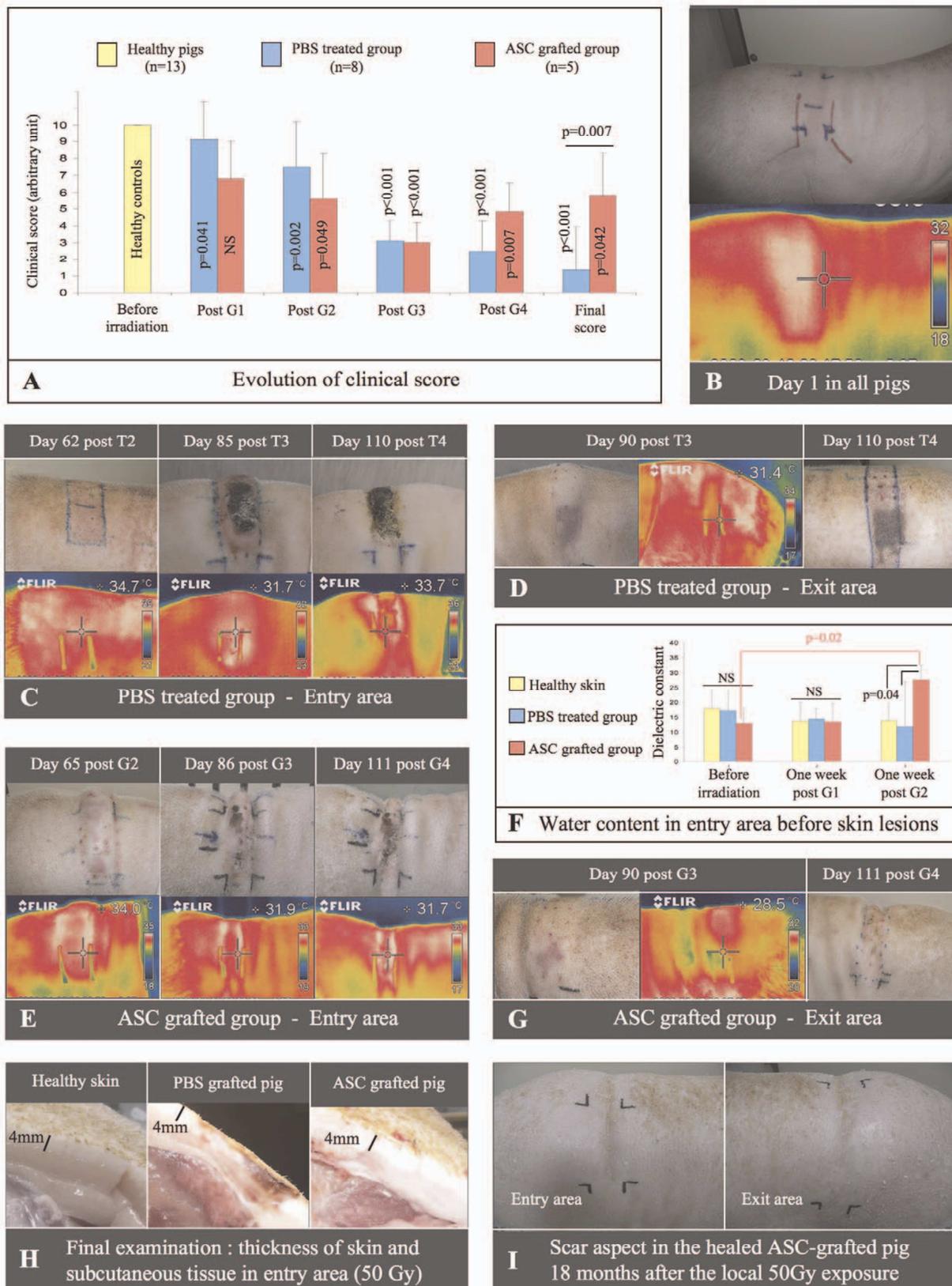


Figure 3. ASCs favoured wound healing after local irradiation. Evolution of clinical score (A). Clinic and thermal camera imaging from representative animals on day 1 (B), then in the entry/exit area of PBS-treated (C/D) or ASC-grafted minipigs (E/G). Water content in entry area skin (F). Final examination of skin thickness and subcutaneous tissue (H). Complete burn healing in one ASC-grafted minipig (I). doi:10.1371/journal.pone.0031694.g003

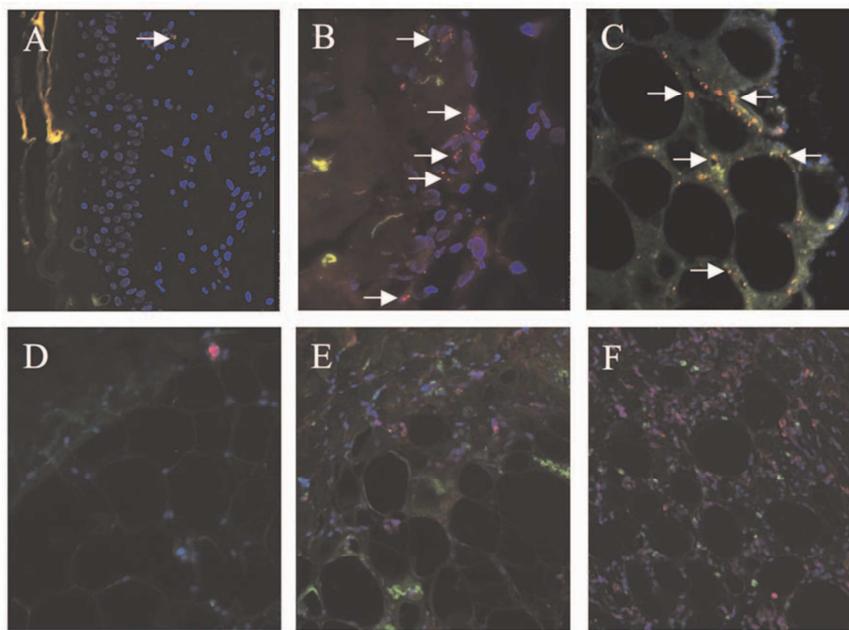


Figure 4. Engraftment of ASCs into the irradiated skin. Location of transplanted ASCs (in red) in the epidermis (A), in the dermis (B), and in the subcutis (C) of skin biopsies centred on injection plots, performed three days after the 3rd graft, on day 70. Brightly red fluorescing quantum dots marked ASCs (arrows) around blue nuclei (DAPI) near the cutis/subcutis border and among adipose tissue. The immunostaining of CD3 and lambda light chains (in pink) in the subcutis of healthy (D), PBS-treated (E), and ASC-grafted (F) skin underlined the infiltration by T and B lymphocytes three days after the ASC graft. Magnification: $\times 100$. doi:10.1371/journal.pone.0031694.g004

observations, with a progressive disorganisation of the epidermal layers, which was evident from the second month onwards after exposure. Pan-cytokeratin immunofluorescence revealed the degeneration of some keratinocytes as soon as day 49 after exposure, leading to vacuolation and the disruption of barrier function. At about day 70 (PBS-treatment 3) keratinocytes underwent proliferation as revealed by Ki67 staining (Fig. 6). Nevertheless, radio-induced lesions in control pigs developed into epidermal disorganization after four months, sometimes with complete destruction of dermo-epidermal junction and abrasion of epidermis.

In contrast, four out of five ASC-grafted animals exhibited a sustained epidermis recovery with a multilayered appearance similar to healthy skin. In the fifth minipig, the complete wound healing could not be observed in the long term because its euthanasia was imposed for ethical reasons during the fifth month after exposure, that is before any complete skin evolution, because of a recurrent pain refractory to all analgesic treatment. In the four other ASC-grafted minipigs, cleansing of the damaged epidermis appeared earlier than in non-grafted controls and images of detersion were rapidly observed after the second graft (Fig. 7). The immunohistological analysis of cytokeratin expression showed a complete epidermis recovery, sometimes associated with a strong hyperproliferative keratinocyte activity leading to surmountous cell layers in the entry area, revealed after DAPI staining of the cell nuclei, as shown in epidermis sections sampled after the fourth graft (Fig. 7).

ASCs favoured lymphocyte infiltration in irradiated dermis

In controls, the dermis at the entry area level was still heavily damaged at the end of the study ($>118 \pm 11$ days) with the formation of numerous cavities and vessels of varying size which

was associated with a progressive lymphocyte infiltration (Fig. 5). In ASC-grafted animals, the lymphocyte infiltration occurred earlier and was noticeable already after the second treatment (Fig. 7). In one of the grafted minipigs, three weeks after the last ASC injection (on day 119 i.e. after the 4th graft), a strong specific CD3 and λ light chain immunohistological staining revealed a T and B lymphocyte infiltration especially near the subcutis (Fig. 7).

ASC secretory activity stimulates in vivo angiogenesis

In parallel to lymphocyte infiltration, a strong increase in vascularization was observed by microscopy after the fourth graft in this ASC-grafted minipig (Fig. 8). When wound healing was achieved (day 119 to day 162 evaluations), vascular proliferation was absent in the other grafted animals.

Discussion

Here we report the benefit of local autologous ASC grafting to prevent/cure CRS in a large animal model close to human. Wound healing was observed in 4 out of 5 treated animals whereas all PBS-injected controls exhibited a detrimental clinical evolution. We used a Göttingen minipig CRS model which we previously showed to be relevant to the human accident situation of large area ionizing radiation exposure [8].

In this study we have tested an early graft schedule for ASCs which were injected in the irradiated area before the onset of local damages in controls. Clinical evolution was characterized by a transient local inflammation (clinic and dermis/subcutaneous fat tissue water content) not observed in our preliminary study with BM-MSCs [8] and in CRS patients given autologous BM-MSCs who exhibited a significant reduction of pain. This may represent a limit of the model or could be related to the specific graft cell content or to the earlier graft schedule than applied in published cases. Interestingly the subsequent muscular swelling and thin scab

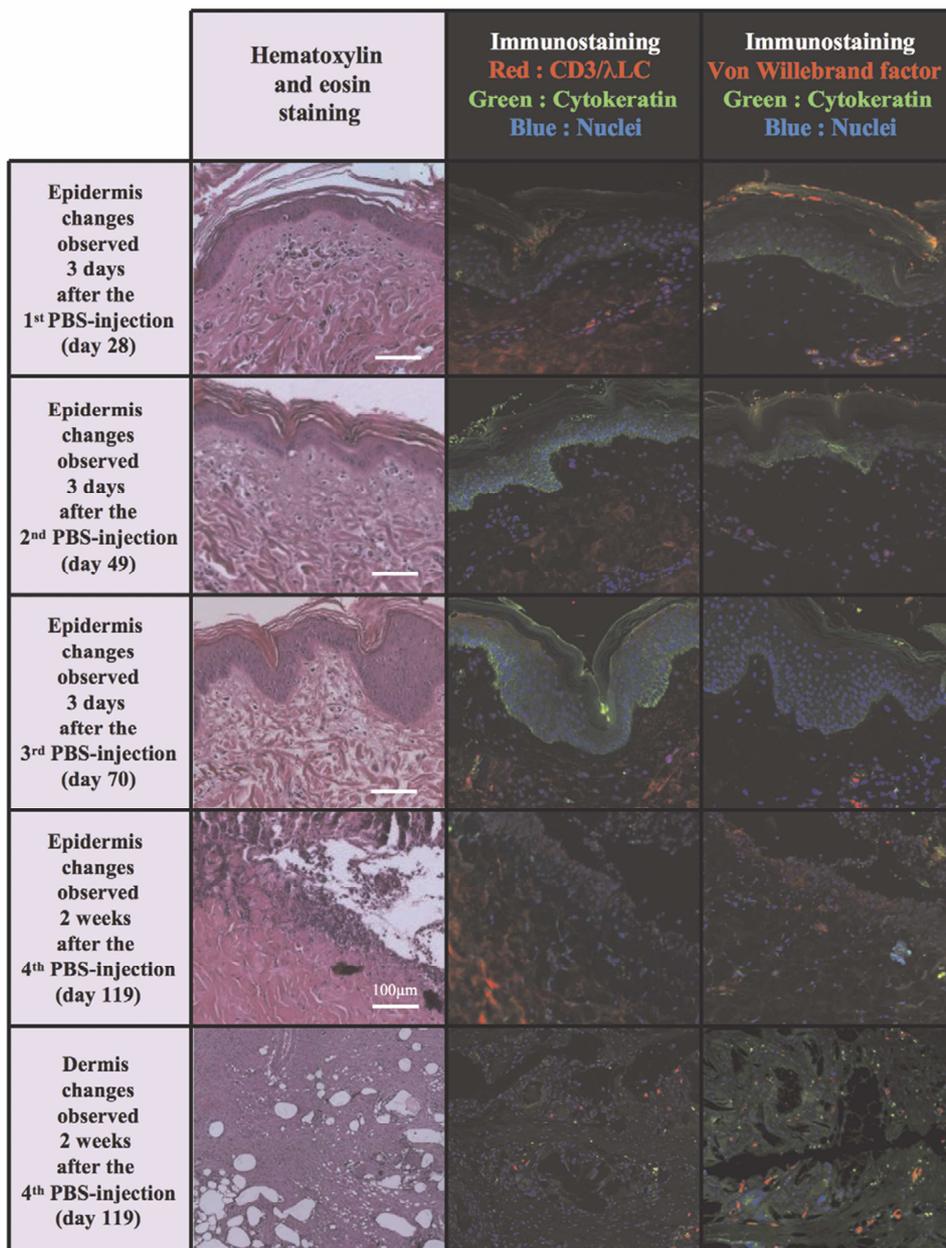


Figure 5. Epidermal and dermal radio-induced injuries in the skin of PBS-treated minipigs. Kinetic study from four iterative biopsies performed few days after each PBS-treatment in representative controls (magnification $\times 100$). Progressive disorganisation of the epidermal layers, keratinocytes degeneration, vacuolation and barrier disruption. Numerous dermal cavities two weeks after the 4th PBS-treatment. doi:10.1371/journal.pone.0031694.g005

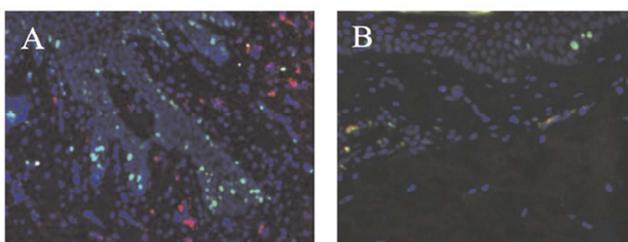


Figure 6. Proliferation of keratinocytes in grafted animals. After the third graft, the proliferation of keratinocytes in the epidermis-dermis junction is revealed by the Ki67 immunostaining (in green) in the irradiated skin of grafted animals (A) versus controls (B). doi:10.1371/journal.pone.0031694.g006

lesions that appeared earlier than in sham treated control pigs were followed by wound healing in four out of five ASC-grafted animals (complete in two of them). This contrasted with the irreversible evolution towards local necrosis in the controls. Histological analysis confirmed the clinic and highlighted a significant reepithelialisation as well as the stimulation of neo-angiogenesis in grafted animals. After autopsy, the thinning of dermis and subcutis appeared limited.

In our study, grafted animal exhibited a strong reepithelialisation. This is in accordance with Wu et al. who showed, using a mouse excisional wound splinting plus BM-MSc grafting model, that MSCs significantly accelerated wound healing in normal and diabetic mice and that BM-MSCs contributed to keratinocytes and

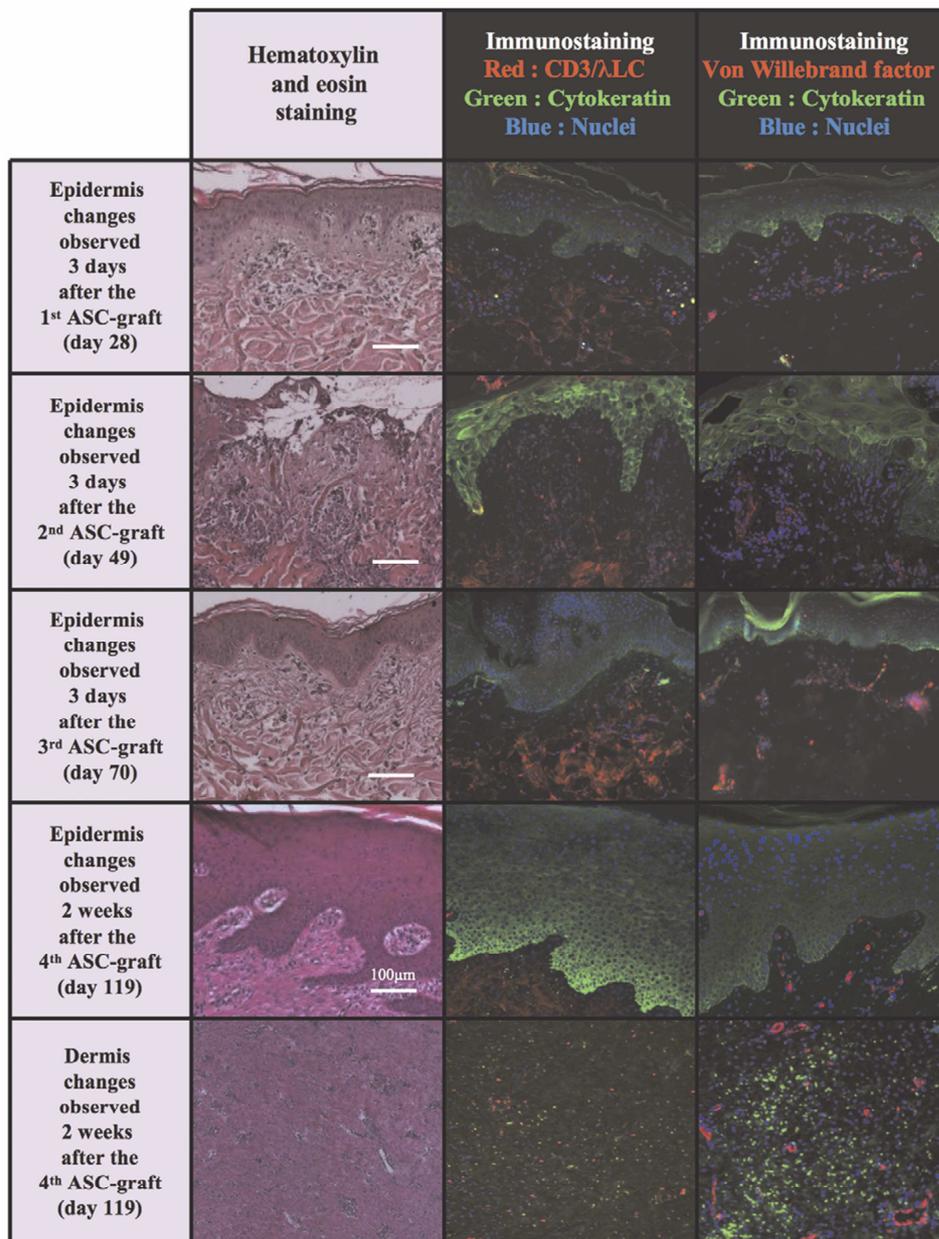


Figure 7. After local irradiation ASCs favoured reepithelialisation and enhanced lymphocyte infiltration and angiogenesis in dermis. Kinetic study from four iterative biopsies performed few days after each ASC-graft in representative animals (magnification in the original $\times 100$). Early cleaning of damaged epidermis was followed by complete epidermis recovery/hyperproliferative keratinocyte activity. Two weeks after the 4th ASC-graft, early T and B lymphocyte infiltration in dermis near the subcutis, with a strong increase in vascularisation. doi:10.1371/journal.pone.0031694.g007

dermal appendages [5]. Confocal microscopy showed cytokeratin-positive MSCs appearing in epidermis and dermis and forming nodules that resembled early sweat or sebaceous gland. No cell fusion was observed. This was also reported by Ebrahimian et al. who used a biopunch plus local irradiation and ASC grafting model [12]. Here we were unable to localize ASCs near or inside the epidermis using the Q-dot technology. This could reflect a limit of this cell labelling strategy or alternatively be related to the difference in term of methods (no skin excision in our study), time of examination (3 days in place of 7 days post grafting) or animal model, or dilution of the cell label by multiple divisions. Thus our study did not support the transdifferentiation potential [12,13],

and reepithelialisation is likely to occur as a consequence of paracrine process which may involve angiopoietin-related growth factor release [14]. This wound healing process may be cell-specific as it was not observed following autologous BM-mononuclear cells injection which we checked in preliminary experiments. Regarding the postulated pro-angiogenic potential of ASCs, our results are in accordance with Ebrahimian et al. who reported in a mouse model of CRS a transient increase of angiogenesis following cell injection [12]. We clearly observed such a pro-angiogenic process in one of the ASC-grafted minipigs on day 119. Interestingly the Q-dot analysis clearly indicated that at this time ASCs were massively located at the deeper level of

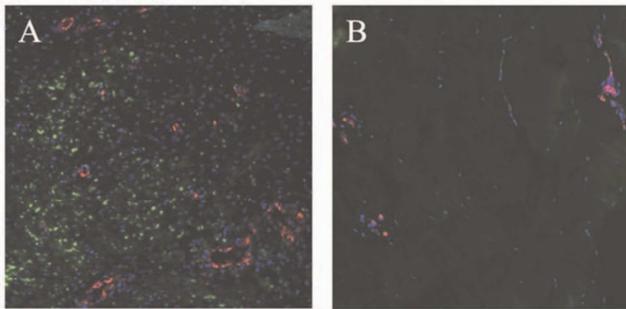


Figure 8. ASC grafting stimulated cutaneous vascularization. The red immunofluorescent staining of Von Willebrand factor revealed the increase of the vasculature in the dermis of the ASC-grafted minipig (A) in comparison with PBS-treated control (B), two weeks after the fourth treatment (day119). Magnification: $\times 100$. doi:10.1371/journal.pone.0031694.g008

dermis, near the subcutis. Importantly a noticeable co-localization of immune cells in the neovascularized dermis was observed which suggests the importance of the recruitment and the activation of lymphoid cells and subsequent secretions in this context [15]. Thus further studies are required to deeper understand the CRS wound healing process but our study suggests that ASCs may have secreted pro-angiopoietic or other factors, while differentiation and/or integration, especially in vascular structures, likely played a limited if any role [16].

References

- Lefaix JL, Delanian S (2005) Le syndrome cutané radio-induit. In: De Revel T, Gourmelon P, Vidal D, et al., editors. Nuclear, Radiological, Biological, Chemical - Terrorist threat and medical approach, 1st ed. Montrouge: John Libbey Eurotext. pp 87–95.
- Hopewell JW (1990) The skin: its structure and response to ionizing radiation. *Int J Radiat Biol* 57: 751–773.
- François S, Mouisseddine M, Mathieu N, Semont A, Monti P, et al. (2007) Human mesenchymal stem cells favour healing of the cutaneous radiation syndrome in a xenogenic transplant model. *Ann Hematol* 86: 1–8.
- Bey E, Prat M, Duhamel P, Benderitter M, Brachet M, et al. (2010) Emerging therapy for improving wound repair of severe radiation burns using local bone marrow-derived stem cell administrations. *Wound Repair Regen* 18: 50–58.
- Wu Y, Chen L, Scott PG, Tredget EE (2007) Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis. *Stem Cells* 25: 2648–2659.
- Zuk PA (2010) The adipose-derived stem cells: looking back and looking ahead. *Mol Biol Cell* 21: 1783–1787.
- Planat-Benard V, Silvestre JS, Cousin B, André M, Nibbelink M, et al. (2004) Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation* 109: 656–663.
- Agay D, Scherthan H, Forcheron F, Grenier N, Hérodin F, et al. (2010) Multipotent mesenchymal stem cell grafting to treat cutaneous radiation syndrome: development of a new minipig model. *Exp Hematol* 38: 945–956.
- Papp A, Lahtinen T, Härmä M, Nuutinen J, Alhava E (2006) Dielectric measurement in experimental burns: a new tool for burn depth determination? *Plast Reconstr Surg* 117: 889–898.
- Archambeau JO, Bennett GW, Abata JJ, Brenneis HJ (1979) Response of swine skin microvasculature to acute single exposures of X rays: quantification of the epidermal cell changes. *Radiat Res* 79: 298–337.
- Archambeau JO, Ines A, Fajardo LF (1984) Response of swine skin microvasculature to acute single exposures of X rays: quantification of endothelial changes. *Radiat Res* 98: 37–51.
- Ebrahimián TG, Pouzoulet F, Squiban C, Buard V, André M, et al. (2009) Cell therapy based on adipose tissue-derived stromal cells promotes physiological and pathological wound healing. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29: 503–510.
- Sasaki M, Abe R, Fujita Y, Ando S, Inokuma D, et al. (2008) Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type. *J Immunol* 180: 2581–2587.
- Oike Y, Yasunaga K, Ito Y, Matsumoto S, Maekawa H, et al. (2003) Angiopoietin-related growth factor (AGF) promotes epidermal proliferation, remodeling, and regeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 9494–9499.
- Chen L, Tredget EE, Wu Y, Wu Y (2008) Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. *PLoS One* 3: e1886.
- Boquest A, Noer A, Sørensen AL, Vekterud K, Collas P (2007) CpG methylation profiles of endothelial cell-specific gene promoter regions in adipose tissue stem cells suggest limited differentiation potential toward the endothelial cell lineage. *Stem Cells* 25: 852–861.
- Tarte K, Gaillard J, Lataillade JJ, Fouillard L, Becker M, et al. (2010) Clinical-grade production of human mesenchymal stromal cells: occurrence of aneuploidy without transformation. *Blood* 115: 1549–1553.
- Drouet M, Hérodin F (2010) Radiation victim management and the haematologist in the future: time to revisit therapeutic guidelines? *Int J Radiat Biol* 86: 636–648.

Regarding clinical use, the 18 months follow up of one minipig suggests the safety of ASC grafting [17]. The ASC dose schedule we used (1.10^6 ASCs per cm^2 , four iterative grafting) was non-toxic and led to improved wound healing. However the feasibility of the early grafting strategy in humans will depend on the availability of large amounts of ASCs in the days following the hospitalization meaning allogeneic stem cells banking. Further studies are required to confirm the debated therapeutic potential of such grafts. This study also indicated that final morbidity highly depended of underlying tissue damages which required specific treatment. Another approach to severe CRS would consist in the application of artificial dermis substitutes colonized with multipotent/angiogenic stem cells when excision is required. Further studies will also explore the therapeutic potential of allogeneic and ex-vivo manipulated ASCs in this context [18].

Acknowledgments

We thank B. Ballester, M. Vivier, D. Gassen, S. Richard and R. Ridi for their technical assistance and H. Chaussard for his help in animal care.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: FF DA HS MD. Performed the experiments: FF DA HS MD DR. Analyzed the data: FF DA DR HS MD VM FH. Contributed reagents/materials/analysis tools: FH. Wrote the paper: FF DA HS MD VM.

Annexe 2:

Advances in stem cell therapy; Specific application in the treatment of cutaneous radiation syndrome.

Riccobono Diane; François Sabine; Forcheron Fabien; Valente Marco; Drouet Michel.

Journal of Stem Cell Research and Therapy 2014; vol 4, issue 3: 1000186



Advances in Stem Cell Therapy: Specific Applications in the Treatment of Cutaneous Radiation Syndrome

Diane Riccobono*, Sabine François, Marco Valente, Fabien Forcheron and Michel Drouet

French Armed Forces Biomedical Research Institut (IRBA) ; Département des Effets Biologiques des Rayonnements ; BP 73 ; Brétigny sur Orge Cedex, France

Abstract

The emergence of stem cell therapy and cellular engineering during the last 10 years has allowed new therapeutic strategies to be considered for the treatment of many wound repair disorders in bones, muscles and skin. The cutaneous radiation syndrome that is often associated with radiation burn may also take advantage of these scientific advances. This syndrome, characterized by inflammatory waves, incomplete wound healing and poor revascularization is the dramatic consequence of local irradiation exposure (above 15Gy). Until the late 90's, the treatment schedule which exhibited poor efficacy consisted in excision followed by transient coverage of the wound bed and then by autologous skin grafts. Recently the local injection of autologous bone marrow mesenchymal stem cells, which favor wound healing and reduce pain, has achieved a major advance. However this strategy hampered by culture delays and requiring non-irradiated areas to harvest stem cells remains to be optimized. Autologous or allogeneic adipose tissue-derived stem cells, easy to collect and expand, may represent a valuable therapeutic alternative especially through pro-angiogenic and anti-inflammatory properties. Other proposed strategies including stem cell manipulation to produce trophic factors (transient gene therapy), bone marrow mesenchymal stem cells or adipose tissue derived stem cells culture media injection appear as valuable alternatives.

In this review we report the latest scientific progresses in pre-clinical and clinical studies concerning stem cell therapy for cutaneous radiation syndrome.

Keywords: Stem cells therapy; Bone-marrow Stem Cell; Adipose tissue derived Stem Cell; Conditioned media; Transient gene therapy; Cutaneous Radiation Syndrome

Introduction

Radiologic Accidents (RA) are tragic events, which may result in mass casualties. For the last few years there has been a higher number of RA resulting from the increased use of ionizing radiation in several activities (mostly industrial and medical). A list of RA identified from 1896 to 2013 compiled by Robert Johnston shows a sharp increase in the last 4 years with a mean of 3 (RA)/year (Figure 1A) [1]. As shown in Figure 1B, the vulnerability of nuclear power plants are responsible for 50% of the total number of serious radiological accidents (for example Fukushima Daiichi disaster, 2011) [2], followed by the industrial sector and the storage of nuclear waste. Four past reactor accidents have each resulted in irreparable damages to the power plant and in substantial radiation exposures involving $\geq 1,000$ people as a consequence of the release of radioactive materials into the environment [3]. Accidental overexposures of persons, in either the occupational or public field, have caused deaths and severe injuries and complications [4]. Many high dose exposures have been reported these last 15 years, such as accidental exposure to radioactive sources in which two victims (accident of Chile, 2006 and accident of Senegal, 2007) were accidentally exposed to an iridium gammagraphy radioactive source, or overexposure to radiotherapy. Importantly these exposures are generally heterogeneous or localized body irradiations. They can induce numerous tissue damages depending on many parameters, the main ones being: (1) the level of absorbed dose, (2) the size of irradiated tissue volumes and the organs exposed, (3) the nature of the radiation.

Medical treatment of irradiated patients is complex depending on the nature or severity of the lesions. For example, a whole body acute irradiation requires hematological reanimation and also treatment for each specific radiosensitive organ or failing system. Radiation skin injury defined as Cutaneous Radiation Syndrome, (CRS) (also called

radiation burn) may need reconstructive surgery acts related to the burn treatment. Assessments of hematopoietic, gastrointestinal and cutaneous syndromes have improved in recent years, but their treatment options remain limited [5]. Importantly, both acute radiation injuries and delayed effects such as cutaneous effects and impaired wound repair are related to angiogenesis deficiency with vascular regression. Vascular damage influences nutrient and oxygen availability to skin tissue as well as epithelial cell viability [6]. The progressive damage of tissues after radiation exposure is the result of the presence of long-lived free radicals, reactive oxygen species, and pro-inflammatory cytokines/chemokines. Normal wound repair process consists of 3 stages (inflammation, proliferation and remodeling) that occur in a predictable series of cellular and biochemical events. The deposition and remodeling of extra-cellular matrix (ECM) are major processes in cutaneous healing and ECM is recognized to play critical roles in regulating progenitors and reparative behaviors such as migration, differentiation, proliferation and survival [7].

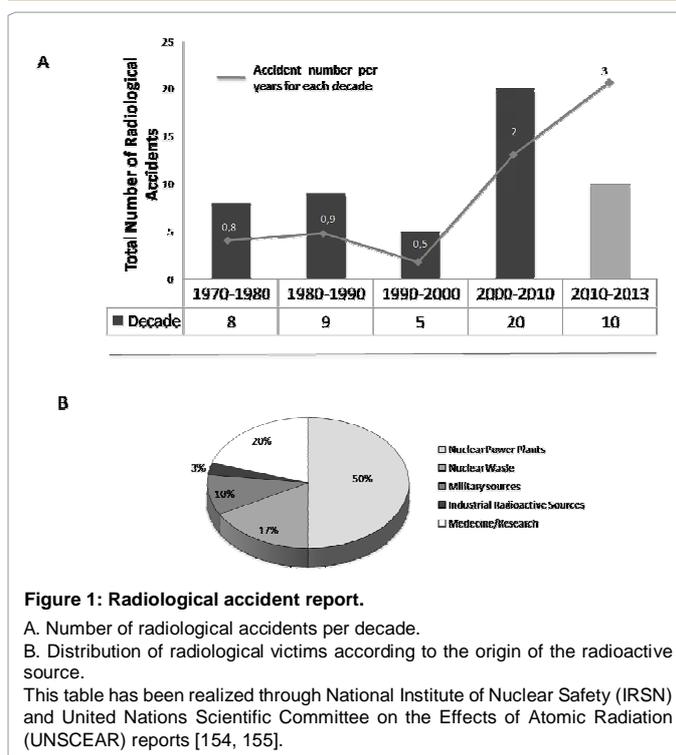
Regarding CRS, the skin is a complex radiosensitive tissue which is exposed to significant radiation doses in radiotherapy, radio-oncology or in an accidental exposure context. The biological

***Corresponding author:** Diane Riccobono MD, IRBA, Département des Effets Biologiques des Rayonnements, BP 73, 91223 Brétigny sur Orge Cedex, France, Tel: +33178651425; Fax: +33178651422; E-mail: diane.riccobono@gmail.com; diane.riccobono@irba.fr

Received February 20, 2014; Accepted March 24, 2014; Published March 26, 2014

Citation: Riccobono D, François S, Valente M, Forcheron F, Drouet M (2014) Advances in Stem Cell Therapy: Specific Applications in the Treatment of Cutaneous Radiation Syndrome. J Stem Cell Res Ther 4: 186. doi:[10.4172/2157-7633.1000186](https://doi.org/10.4172/2157-7633.1000186)

Copyright: © 2014 Riccobono D, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.



responses of the skin occur in a characteristic temporal pattern and mainly depend on radiation quality, dose rate, total dose, and cellular conditions. Immediately after irradiation, synthesis and action of cytokines by skin cells (epidermal keratinocytes, dermal fibroblasts, and resident immunocompetent cells including dermal dendritic cells, neutrophils, eosinophils, and lymphocytes) is initiated and continues as a cascade during all stages of the cutaneous radiation syndrome leading to progressive late symptoms. The predominant one is fibrosis. Interactions between these different cell types within skin tissue are mediated in large part by cytokines. The major cytokines involved in the response of skin cells to high doses of ionizing radiation include IL (interleukin)-1, IL-6, tumor necrosis factor (TNF-alpha), transforming growth factor (TGF-beta), and the chemokines IL-8 and eotaxin [8,9]. Moreover, skin and its appendages provide a protective barrier against the assaults of the environment. To perform this role, epidermis is in constant renewal from keratinocyte stem cells (KSC) residing in a special microenvironment called niche in basal epidermis, adult hair follicle, and sebaceous glands. The KSC control the balance between proliferation and differentiation/apoptosis called homeostasis [10]. Irradiation of KSC and niche induces DNA double strand breaks at the level of KSC (γ H2AX marker), decreases of KSC functionality, and colony-forming activity in culture as well as a delayed hair cycle *in vivo*. In fact niche damage results in the decrease of regeneration capacity with reduction of the production of differentiated keratinocytes over time and so, a limitation of the process of re-epithelialization. This is the rationale of skin autograft or transient flap surgery realized for important defect in wound repair.

Clinically, the classical evolution of CRS is characterized by the delayed onset of the manifestation stages and consists in transient early erythema, dry and then wet desquamation, derma ischemia or necrosis for doses above 20Gy [11]. It is associated with recurrent and uncontrolled inflammatory waves leading to irreversible necrotic processes and followed by a poorly spontaneous revascularization and incomplete healing [12,13]. Consequently, the evolution of skin

lesions often becomes uncontrolled and surgery is the final option, until amputation, leading to a major disability [14,15]. CRS is also characterized by paroxysmal and chronic pain resistant to opiates [16].

Even if these symptoms are very similar to thermal burn, the clinical evolution of CRS is very specific. There are two major differences. First, in opposition to thermal burn, the symptoms onset is delayed. This latency period is very variable: shorter for higher doses and depends on radio-sensitivity (few days to several weeks). It may induce diagnosis delay and even therapeutic delay. Secondly, radiation burn is a very extensive lesion, and first symptoms (erythema or blister) are not an indication of the ultimate extent of injury [16].

Therapeutic management of CRS is difficult due to unpredictable inflammatory waves which lead to extension and to delayed onset of clinical symptoms on the skin. Indeed, when cutaneous fibrosis or necrosis outcome (from 85 to 120 days post irradiation in minipig model according to intrinsic radiosensitivity), deep dermal and underlying muscle structures are already disorganized or necrotic (from 10+/-1 weeks post irradiation) (Figure 2). Until the late 90's, the treatment schedule consisted in excision of the highly exposed necrotic area (skin and subcutaneous tissues) followed by transient coverage of the wound bed and then by autologous skin grafts [17]. The efficacy was limited because limits between radio-injured and safe tissues are not well defined and because each operative act stimulated inflammatory and ischemic processes [14].

In this context, many *in vivo* models such as mouse and rabbit have been investigated to establish a therapeutic strategy [18]. The disadvantages of these models are mainly the different skin structure and the excessive doses of radiation needed to observe the development of CRS [19,20]. Pig seems to be the most relevant animal model to develop and study the effects of cell therapy on CRS and other skin diseases. The porcine species have similarities to human in organ morphology and function, and are easier to maintain and breed than monkey. Pig skin is also very close to human in terms of histology and vascular morphology of the dermis [21-23]. CRS kinetics is a little bit delayed but the symptomatic evolution is similar to human [24]. Moreover it is also a pertinent model to evaluate long-term effects of cell therapy.

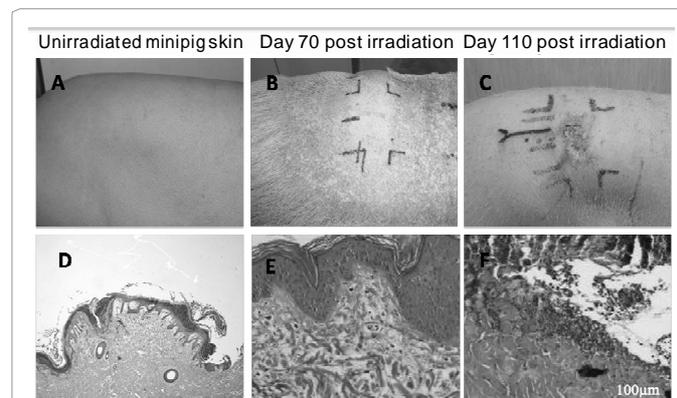


Figure 2: Contrast between speed lesion evolution of the skin and underlying tissues in minipig. A, B, C. Evolution of skin injury after irradiation. After irradiation a latency period is observed on cutaneous tissue and an edema appears on day 70 post irradiation (B). This injury leads to dry and then wet desquamation (C) before necrosis. D, E, F. Evolution of underlying tissues after irradiation: histological analysis with hematoxylin-eosin staining. A disorganization of underlying structures appears previously at the 10th week (E), leading to necrosis (F).

Currently, standardized therapeutic protocols and evidence-based approaches for the management of local injuries do not exist. In the past 10 years, several strategies have been yet needed in order to enhance the beneficial effect of stem cell therapy and to counteract the deleterious effect of an irradiated tissue environment [25]. Based on advances in understanding of cell biology, stem cell therapies such as bone marrow mesenchymal/ stromal stem cells (BM-MSC) have emerged as promising approaches to prevent and cure CRS.

Pre-clinical and clinical applications of MSC

BM-MSC trials: Multipotent stromal cells also named mesenchymal stromal cells or mesenchymal stem cells (MSC) are capable of dividing and their progeny is capable of further differentiating *in vitro* into one of several mesenchymal phenotypes such as osteoblasts, chondrocytes, myocytes, marrow stromal cells, tendon-ligament fibroblasts, and adipocytes [26]. MSC have been isolated predominantly from hematopoietic tissues, such as bone marrow (BM-MSC), peripheral blood and umbilical cord blood but also from parenchymal non-hematopoietic tissues such as muscle, fat or liver. MSC isolated from adult tissues are not ethically restricted, but the isolation efficiency of MSC differs according to the source tissue [27,28]. To uniform characterization of MSC and facilitate the exchange of data among investigators, the guidelines of the International Society for Cellular Therapy (ISCT) proposes a minimal set of standard criteria to define these multipotent precursors : (1) MSC must be plastic-adherent when maintained in standard culture conditions; (2) MSC must express CD105, CD73 and CD90, and lack the expression of CD45, CD34, CD14 or Cd11b, CD79 α or CD19 and HLA-DR surface molecules; (3) MSC must differentiate to osteoblasts, adipocytes and chondrocytes *in vitro* [29].

In just ten years, since the description of the multilineage potential of MSC by Pittenger et al. [30] until now, there have been more than 90 clinical trials worldwide using BM-MSC, 20 of which are being made in East Asia, 19 in Europe and 18 in north America. The potential of these cells for cell-based therapies relies on several key properties: (1) their capacity to differentiate into several cell lineages [31]; (2) their lack of immunogenicity and their immune-modulatory properties [32]; (3) their *ex vivo* expansion potential [33]; (4) their ability to secrete soluble factors which regulate crucial biological functions such as proliferation and differentiation over a broad spectrum of target cells [34,35]; and (5) their ability to home to damaged tissues and tumor sites [36]. Based on these properties MSC are being exploited worldwide for a wide range of potential clinical applications including cell replacement strategies, treatment of graft-versus-host disease, autoimmune diseases and rejection after solid organ transplantation as well as their use as vehicles to deliver anti-cancer therapies. Importantly, the low inherent immunogenicity of MSC means that they could be used not only for autologous but also for allogeneic cell therapies [37].

Different routes of administration are currently discussed concerning stem cell therapy. The main ones are direct injection in wound bed, systemic injection with a homing of MSC in injury location, conditioned media injection and biomaterials. This strategies of stem cells delivery have been elaborated based on the stem cells properties i.e. their capacity to produce and secrete cytokines/trophic factors and to transdifferentiate. Recent studies highlighted synergic and specific effects of these two biological pathways (Figure 3). Cytokines mitigate cell proliferation [28], immune-modulation [38], and pro/neoangiogenesis [39]. Otherwise, direct differentiation of MSC has been reported in fibroblasts, keratinocytes and endothelial cells [38].

Recent works have highlighted the transdifferentiation of MSC (BM-MSC and adipose tissue derived stem cell) in keratinocytes *in vivo* in mouse model [40-42] under β -catenin, bone-morphogenic protein 4 and epithelial growth factor stimulation [42,43] (Figure 3) and have suggested that cells residing in the bone marrow can migrate to the different tissues, transdifferentiate into various epithelial cell types and integrate long-term in these tissues [40]. This transdifferentiation process remains rare but could be underestimated and crucial in skin rejuvenation. In wound repair, closure of epithelial gap and restoration of the epithelium as barrier function is achieved by a combination of keratinocytes migration and differentiation. Moreover, according to the concept of Ito et al. [44], wound healing mimics embryonic development by activating the hair follicle stem cell niche which raises the possibility that stem cells can restore loss of stem cell niche following injection. Finally, as described in Figure 3, MSC can also differentiate in endothelial cells with an impact on vessels integrity and neovascularization which are key processes in wound healing.

The potential therapeutic effect of BM-MSC infusion for the correction of tissue injury (skin [19,24], liver [45], intestine [46]) induced by acute high-dose irradiation has been demonstrated in animal models including (1) xenotransplantation of BM-MSC in NOD/SCID mice 24 hours after exposure [19] and (2) Autologous BM-MSC injected locally (intra-dermal in multiple points) at various times after irradiation [47]. A beneficial effect was observed for both types of transplants. In grafted animals, BM-MSC led to local accumulation of lymphocytes at the dermis border and improved vascularization, with an increase of reepithelialisation. The development of lesions was delayed and limited to moist desquamation. In these cases of acute irradiations, the BM-MSC have been shown to be implicated in tissue homeostasis by maintaining vascular system integrity via the activation of anti-apoptotic and anti-oxidative processes [31], and stimulation of endogenous host progenitor cells to improve the regenerative process to reduce tissue damage [48].

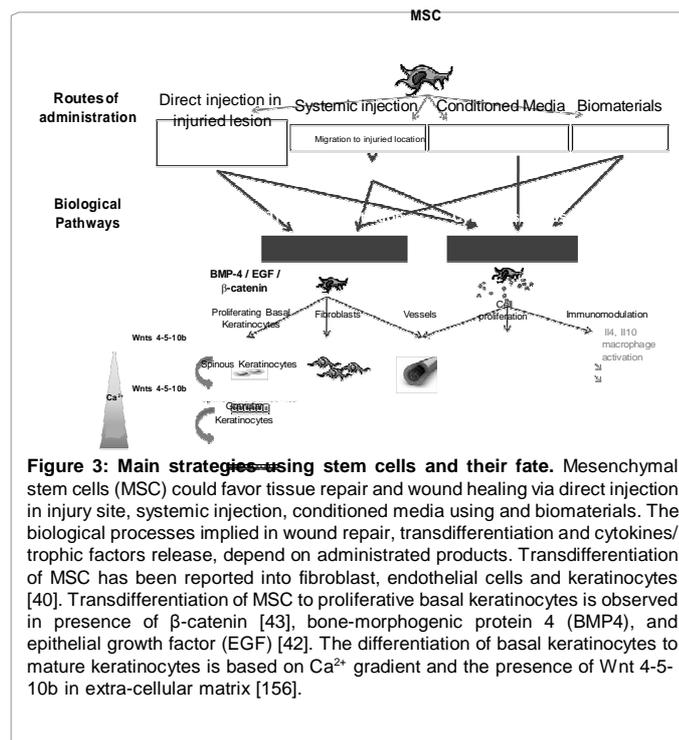


Figure 3: Main strategies using stem cells and their fate. Mesenchymal stem cells (MSC) could favor tissue repair and wound healing via direct injection in injury site, systemic injection, conditioned media using and biomaterials. The biological processes implied in wound repair, transdifferentiation and cytokines/trophic factors release, depend on administrated products. Transdifferentiation of MSC has been reported into fibroblast, endothelial cells and keratinocytes [40]. Transdifferentiation of MSC to proliferative basal keratinocytes is observed in presence of β -catenin [43], bone-morphogenic protein 4 (BMP4), and epithelial growth factor (EGF) [42]. The differentiation of basal keratinocytes to mature keratinocytes is based on Ca²⁺ gradient and the presence of Wnt 4-5-10b in extra-cellular matrix [156].

Due to their beneficial effects, BM-MSC was used for the first time to treat CRS in humans in 2006. Four patients reported with cutaneous radiation syndrome (up to 70 Gy of local exposure) associated with a heterogeneous irradiation (hematopoietic syndrome associated) have received a compassionate protocol using autologous BM-MSC. This regenerative cellular therapy has become the reference treatment used for radiation skin injury according to the International Atomic Energy Agency [49]. It consists first on a physical dosimetric reconstruction of doses absorbed by tissues. This dosimetry-guided surgery performs the most accurate excision in order to prevent iterative surgery and vicious circle induced by the successive inflammatory waves. In this compassionate therapy, autologous bone marrow total cells are harvested from unexposed areas and expanded in culture media supplemented with human platelet lysate. At the confluence step, MSC are harvested. Four quality controls are archived on MSC: a phenotype characterization (CD45⁻; CD105⁺; CD73⁺; CD90⁺), a clonogenic efficiency is calculated, telomerase activity is performed and a contamination control for bacteria, mycoplasma and fungi before administration is realized [50]. Different schedules of MSC injected have been realized: 200 (± 50). 10⁶ stem cells were injected twice at day 90 and 99 post irradiation or five times from day 191 to 268 post-irradiation [50,51] according to clinical evolution and delay between exposition and therapeutic management (Figure 4). This cell therapy is combined with surgery: skin autologous graft +/- transient skin flap. Unlike classical evolution, the size of the wound progressively decreased and almost complete healing was achieved by 1 month after cell therapy. Additionally, there were no recurrent inflammation and a better control of pain was observed. Many mechanisms are involved in radiation burn repair and it has been reported that MSC were implicated in all stages of tissue repair including inflammation [52], epithelialization [53], angiogenesis [39,53,54], and proliferation of fibroblasts [53]. So this cell therapy protocol is efficient but given its complexity and dependence on the production and quality of the stem cells, only a very low number of patients can be treated at the same time.

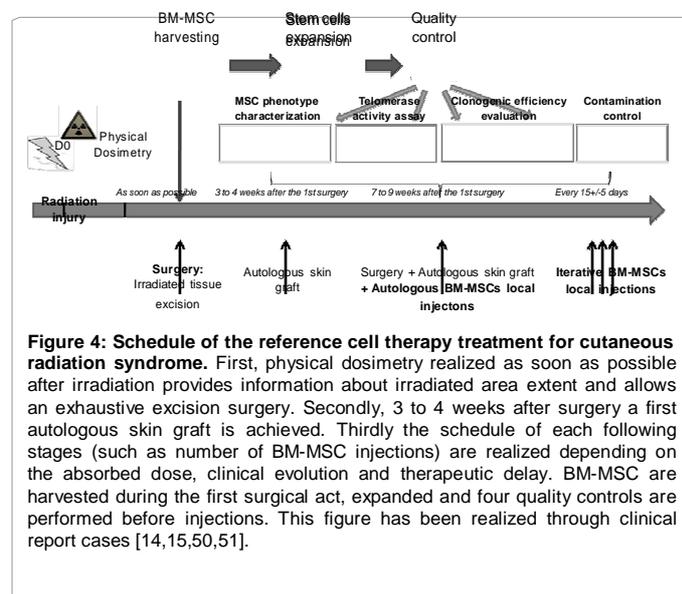
In retrospect, the data from various pre-clinical and clinical trials using BM-MSC, show their strengths and potential weaknesses that limit their use (Table 1). It is essential to optimize the quantity

and the quality of injected stem cells, as only a small amount can be harvested and their engraftment is transient [47]. Some important points to consider in the optimization of this cell therapy will be culture standardization, the choice of source tissue and donor fat status and age. To address the problem of cell quantity an abundant source tissue and cell banking could be a solution. The adipose tissue is such a promising abundant source. Stem cells derived from this tissue (ADSC) exhibit the same properties as BM-MSC which are required to favor wound repair [27]. Furthermore MSC secretome would eliminate the delay of cell culture and extend their use to mass casualties and non-irradiated area cases.

MSC from another connective tissue ADSC: The clinical use of BM-MSCs has presented problems, including poor engraftment, low cell number upon harvest (they only represent about 0,001%-0,01% of the total bone marrow nucleated cells [55]), migration to tumor tissue potentially favoring the growth of breast and prostate cancers [56] and promoting drug resistance in tumors cells [57]. This has led many researchers to investigate alternate sources for MSCs. Adipose tissue, like bone marrow, is derived from the mesenchyme and contains a supportive stroma that is easily isolated. Based on this, adipose tissue may represent a source of stem cells that could have far-reaching effects on several fields. In recent years, interest in the developmental plasticity and therapeutic potential of stromal cells isolated from adipose tissue (which can be isolated from lipoaspirates) has rapidly grown [58]. Their amount is approximately 500-fold greater [59,60] than BM-MSC so adipose tissue represents an abundant, practical, and appealing source of donor tissue for autologous cell replacement.

There is a confusing inconsistency in the literature when using terms describing multipotent precursor cells from adipose tissue stroma, such as processed lipoaspirate (PLA) cells, adipose tissue-derived stromal cells (ADSC), preadipocytes, adipose stroma vascular cell fraction, and others. The stromal-vascular cell fraction is free of adipocytes discarded after centrifugation and is described as cells obtained immediately after collagenase digestion. Accordingly, the term ADSC will be used throughout this review. Considerable effort has been made to characterize the cellular and molecular properties of ADSC. A large number of research teams have demonstrated that mesenchymal stem cells within the stromal-vascular fraction of subcutaneous adipose tissue can be maintained *in vitro* for extended periods with stable population doubling and low levels of senescence [61]. ADSC are more genetically and morphologically stable in long term culture [28]. They also have a higher proliferative capacity and a lower senescence ratio than BM-MSC which allow an easier cell expansion [62]. ADSC differentiate into various cell types including adipogenic, chondrogenic, myogenic, and osteogenic cells in the presence of lineage-specific induction factors [63]. They also have the capacity to transdifferentiate into keratinocyte-like cells (KLC) and furthermore are able to engineer a stratified epidermis. Chavez-Munoz et al. [64] have reported that ADSC co-cultured with human keratinocytes or with keratinocyte conditioned media developed a polygonal cobblestone shape characteristic of human keratinocytes after a 14-day incubation period. This study suggests that adipose tissue is potentially a readily available and accessible source of keratinocytes, particularly for severe wounds encompassing large surface areas of the body and requiring prompt epithelialization.

Otherwise, ADSC have similarities to BM-MSC in terms of cell surface phenotype (Table 2) and they present multilineage differentiation capabilities regardless of the adipose tissue they were



collected from [65]. This information supports the use of ADSC in cell-based therapies such as autologous fat grafting. Currently, 77 clinical studies using ADSC are underway, 27 are made in Europe. Seven of these clinical studies are performed on severe skin disorders, particularly for the reconstruction of the breast and in patient lipodystrophy [30].

Anti-apoptotic and pro-angiogenic effects of ADSC have been clearly described through paracrine factors secretion *in vitro* [66,67] and *in vivo*, in mice models [68,69] as well as trans differentiation processes into endothelial cells also *in vitro* and *in vivo* [70]. Kim et al. [71] have demonstrated in a NOD/SCID model that ADSC improve angiogenesis through VEGF, bFGF and MMP3 and 9 more efficiently than BM-MSC in a comparative study using the same amounts of transplanted cells and Koh et al. [72] have related the formation of vascular networks 2 weeks after injections of ADSC in Matrigels™ (mouse model). It was also found with an *in vitro* experiment that ADSC were better at inhibiting the differentiation of dendritic cells, at decreasing their expression of co-stimulation factors and at stimulating their secretion of immunosuppressive cytokine IL10 [73]. Moreover the same group highlighted a significant inhibition of Ig production in incubated peripheral blood mononuclear cells to a much greater extent than BM-MSC [74]. In addition, it has been reported that ADSC decrease inflammatory reaction via PGE 2 [52,75] and improve wound healing [76,77] in various models (mice, rats, dogs) and pathologies as cardiac ischemia [78] brain lesion [79], musculoskeletal regeneration [80] and spinal cord injury [81]. Furthermore, the onset of senescence for ADSC after freezing has been demonstrated to occur later than for BM-MSC [82] which provides another advantage if stem cell banking is planned for cutaneous radiation syndrome treatment. Due to their

properties described above, the ADSC appear as excellent candidates to counteract the development of CRS, thus pre-clinical and clinical studies were investigated in wound healing.

In the French Armed Forces Biomedical Research Institute (IRBA), autologous ADSC have been evaluated in a specific minipig model of acute radiation syndrome; the experimental design is illustrated in Figure 5. Minipigs were locally exposed to 50 Gy as described in Riccobono et al. [83] (local gamma irradiation) and they received 4 injections of 50.10⁶ ADSC in the irradiated area. These stem cells had been harvested one month before exposure to avoid systemic radio-induced consequences. In contrast to controls that developed a typical evolution of CRS with final necrosis, injected animals ultimately exhibited wound healing. Histological analysis highlighted a progressive and transient lymphocyte infiltration, an increase of vascularization and a sustained epidermis recovery of the skin with a multilayer appearance similar to healthy skin whereas controls skin exhibited a progressive disorganization of epidermal layers [84]. Moreover in opposition to controls analgesic treatment was unnecessary for ADSC treated individuals from 6 weeks post-irradiation.

Autologous ADSC have also been evaluated on severe human cases of chronic radiation injury of the skin in Japan [85,86]. Unlike previous work, ADSC were non cultured cells sampled from liposapirate. This protocol started with an excision of the defective portion of the irradiated skin. During this surgical step, ADSC were harvested by liposuction and grafted in association with a temporary artificial dermis impregnated with bFGF. A regenerative tissue matured in 1.5 years.

Finally, in case of mass casualties or important heterogeneous

Strengths	Weaknesses
Lack of immunogenicity	Heavy surgery :puncture of the bone marrow
Regulation of crucial biological functions: <ul style="list-style-type: none"> • Proliferation • Differentiation • Inflammation 	Low amount of MSC in bone-marrow (1/10000 nucleated cells)
Expansion <i>in vitro</i> obtained in not complex culture medium: <ul style="list-style-type: none"> • Basic fibroblast growth factor-enriched media. • Serum-enriched/serum-free media • Cytokine-free media 	With increasing passage number: <ul style="list-style-type: none"> • Decrease of proliferation rate • Loss of their typical morphology
Good expansion yield in culture with retain of: <ul style="list-style-type: none"> • Growth • Multilineage potential. Stable morphology (fibroblast) up to 20-25 passages No chromosomal abnormalities for MSC expanded <i>in vitro</i>	The discrepancy between pro or anti-tumoral effect of MSC related to: <ul style="list-style-type: none"> • Different tissue sources • Culture conditions • Individual donor variability • Injection timing of MSC
Isolation efficiency of BM-MSC : 100%	Decrease of differentiation potential with age of donor

Table 1: The strengths and weaknesses of BM-MSC for their clinical use. This table has been realized through the results and reflections brought by the pre-clinical and clinical investigations using BM-MSC as reparative therapy [28,29,33,157-159].

	POSITIVE surface Antigen	NEGATIVE surface Antigen
Adhesion molecules	CD9; CD29 (β -integrin); CD49d (α -integrin); CD54 (ICAM-1); CD105 (endoglin); CD166 (ALCAM)	CD11b (α _v -integrin); CD18 (β ₂ -integrin) CD49f (α6-integrin); CD50 (ICAM-3); CD56 (NCAM); CD61, CD62e (E-selectine); CD104 (α ₄ -intearin); CD106 (VCAM); CD133
Receptor molecules	CD44 (hyaluronate); CD71 (transferrin)	CD16 (Fc receptor)
Enzymes	CD10 ; CD13 (aminopeptidase) CD73; aldehyde deshydrogenase	
Extra cellular matrix molecules	CD90; CD146; Collagen I and III; osteopontin; osteonectin	
Complement cascade proteins	CD55; CD59 (protectin)	
Histocompatibility Antigen	HLA ABC	HLA DR
Stem Cell markers	CD34; ABCG2	
Stromal cell markers	CD29; CD44; CD73; CD90; CD166	
Hematopoitic cells markers		CD14; CD31; CD45

Table 2: Phenotypical characteristics of ADSC. This table has been realized based on data from research articles and reviews on ADSC phenotype [28,64,160]

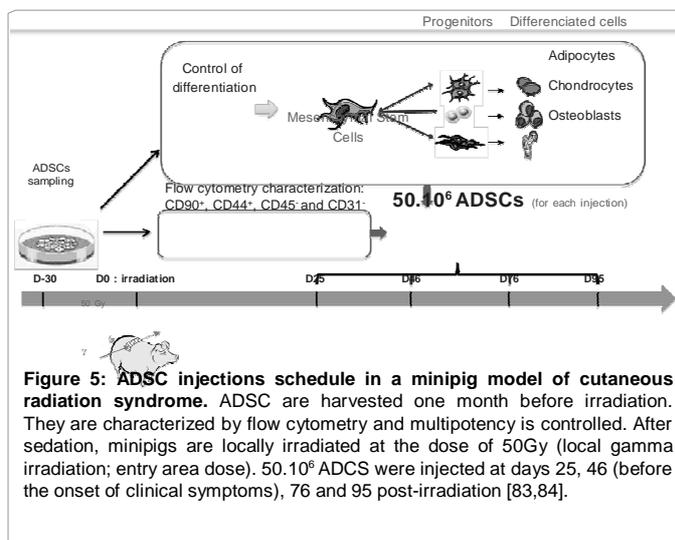


Figure 5: ADSC injections schedule in a minipig model of cutaneous radiation syndrome. ADSC are harvested one month before irradiation. They are characterized by flow cytometry and multipotency is controlled. After sedation, minipigs are locally irradiated at the dose of 50Gy (local gamma irradiation; entry area dose). 50.10⁶ ADSCs were injected at days 25, 46 (before the onset of clinical symptoms), 76 and 95 post-irradiation [83,84].

irradiation associated to CRS, a stem cell bank use may be the only valuable strategy. Technical challenges have to be investigated in this context. The major ones are cryo-protector agents required to allow frozen process without cell damage. They are known to be toxic and currently several safe protocols are proposed using sericin [87] or methyl cellulose [88] to decrease dimethyl sulfoxide concentration. This is a major issue that many groups are working on [89-91]. Otherwise the use of cell bank implied donor-recipient compatibility. Because of MSC low immunogenicity, allogeneic ADSC injections, without HLA typing have been evaluated for treatment of cutaneous radiation syndrome with the same minipig model described earlier [83,84]. In opposition to results achieved previously, allogeneic ADSC injections delayed the onset of symptoms but did not improve wound healing in comparison to controls [83], in spite of low immunogenicity of ADSC and their lack of expression of HLAII [92,93]. Wound repair enhancement was described in pre-clinical studies of allogeneic ADSC grafts on murine models [80,94,95] which suggest that allogeneic grafts may be harder to develop in high mammals closer to human than expected. The effect of stem cell donor and donor-recipient compatibility on wound repair efficiency requires further studies.

In this context, to avoid donor-recipient compatibility problems, MSC conditioned media may represent a valuable therapeutic alternative.

Stem cell therapy strategies under assessment

Conditioned media: The value of MSC secretome: Current data suggest that, following injection, the contribution of MSC differentiation to wound healing improvement is limited as poor engraftment and survival are observed at the site of injury. Indeed studies in mouse models have demonstrated that the percentage of MSC in the injected site was reduced to half 4 days after transplantation [19]. It has also been shown that the release of soluble trophic factors and cytokines of transplanted MSC promote endogenous repair of damaged areas. MSC engrafted mechanisms involved in wound repair are enhanced by paracrine signaling. MSC secretome also called MSC-conditioned medium (CM) is defined as the collection of secreted proteins processed via the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus through the classical secretion pathway as well as encompassed proteins shed from the cell surface and intracellular proteins released

through non-classical secretion pathway or extracellular vesicles. These secreted proteins include numerous enzymes, growth factors, cytokines and hormones or other soluble mediators. They constitute the most biologically significant role of MSC under injury conditions [96]. Thus the concept of MSCs-conditioned media (MSC-CM) from BM-MSCs and ADSC may be an attractive method for amplifying the beneficial effect of engrafted stem cells in injury area. CM from BM-MSC but also from ADSC have been described to have a major effect on wound repair through an accelerated epithelialization [35]. Extra-cellular matrix proteins (fibronectin, type I collagen) and several cytokines were identified in MSC-CM such as IL-6, IL-8, TGF-beta1, MCP-1, EGF, RANTES, SPARC, IGFBP-7, MCP-1 and CXCL1. These biofactors play an important role in stimulating wound healing and migration [97-99] ADSC-CM have been reported to promote human dermal fibroblast proliferation and enhance type I collagen secretion [100]. Other investigations report that the protein Cyr61 (Cysteine-rich angiogenic inducer 61) implicated in cell adhesion, migration, proliferation, differentiation, through interaction with cell surface integrin receptors is present in MSC-CM [54,101]. It was established that this protein promotes angiogenesis *in vitro* and neoangiogenesis *in vivo* in the NOD/SCID mouse model. Otherwise, a better angiogenesis potential was observed with ADSC-CM in comparison with BM-MSC-CM [71].

Thus using stem cell-conditioned medium might be a viable alternative to stem cell graft, which is often hampered by low grafting efficiency. It may overcome the stem cell isolation and culture period and overcome the compatibility between donor and recipient in the case of allogeneic grafts. However, current stem cells culture media contain components that are not intended for human use, such as 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), and bovine serum, necessitating development of an alternative medium that is safe for human clinical use. Bhang et al. [102] provided a new culture process: 3D spheroid culture with a clinically relevant medium composed of vitamins, glucose, amino-acids and human serum. This process showed a cellular proliferation 4 times higher than the one achieved with monolayer culture in conventional media for ADSC. Another promising strategy for conditioned media is the use of extracellular vesicles (EV) which include exosomes and micro vesicles [103]. Extracellular vesicles are membrane vesicles secreted by various cell types including MSC. These EV contain paracrine factors secreted by MSC. Furthermore, in a porcine model, it was shown that the fraction of the CM containing products greater than 1000 kDa provided an improvement of myocardial injury repair [104]. These products were identified as EV. This result suggests that most of the secreted factors in CM are contained in EV [105]. Given that EV are easily isolated by ultra-centrifugation of culture media [103], they represent a pertinent strategy for CRS managing.

To our knowledge, no studies have been published on the use of CM to treat thermal burn or cutaneous radiation syndrome, neither *in vivo* nor *in vitro*. Nevertheless this therapeutic process remains very promising in overcoming stem cell culture requirements and it might present a real benefit for radio-injured patients that need a treatment quickly.

Gene therapy to optimize stem cell treatment: Gene therapy could be considered as an option to enhance and target the processes responsible for the beneficial effects of MSC in tissue repair. The genetically-manipulated stem cells can be used both as the therapeutic agents and the vehicle for gene delivery for wound treatment. This

method serves to provide regenerative cells and bioactive genes within an optimal environment of regulatory molecular expression for wound sites. This method has emerged as a promising strategy for wound regenerative therapy [106]. In gene therapy, it is important to consider the duration of transgene expression, as a crucial point for the choice of transfection technique. Currently two methods are used to target genes transfer [107] (1) integrative techniques with stable expression (retrovirus, lentivirus or specific sites recombinase), (2) non integrative techniques with transient gene expression (plasmid DNA transfection via adenovirus, electroporation or nucleofection and chemical transfection). For wound repair and especially cutaneous radiation syndrome, the most interesting optimizations concern anti-inflammatory properties, angiogenesis and cell proliferation. The pro-angiogenic effect and the stimulation of cell proliferation are processes involved in tumor growth. In this context, permanent gene therapy with integrative methods represents a risk of tumorigenesis and is not valuable. In opposition, non-integrative gene therapy may allow the transient specific secretion of selected proteins. A few studies have been realized on transient gene therapy with adenoviral vectors: adenoviruses are rarely integrated into the host genome but instead stay in the cytoplasm, which explains the transient nature of the gene expression [108,109]. Wound repair enhancement was observed in a rat spinal fusion model with BM-MSK or ADSC transduced with adenovirus and no difference was observed between these two types of stem cells [110]. However, the major inconvenient of virus vectors is their immunogenicity [111] and a non-zero risk of insertional mutagenesis [112]. Feasibility of transient gene therapy for cutaneous radiation syndrome has been evaluated *in vivo* in the minipig model of radiation burn previously described [83,113]. ADSC were nucleofected with a plasmid coding for a protein involved in angiogenesis and cell proliferation: Sonic Hedgehog (Shh). In this study, the choice of nucleofection method of Shh gene was based on two arguments: (1) this technique allows the genetic material to be delivered directly into the nucleus [114,115], resulting in higher transfection efficiency than electroporation [116], (2) this technique does not alter the phenotype and potential multilineage of ADSC [117]. In this *in vivo* study, we checked that nucleofection technique allowed the production of sufficient amounts of transfected ADSC to be grafted to a large animal model [113]. No signs of inflammation, pain or loss of appetite were observed in grafted animals showing a good tolerance to Shh-transfected ADSC. Other non-viral techniques are currently evaluated [118,119] and this genetic technology provides new possibilities for modulation and optimization of MSC to achieve beneficial clinical effects in the future.

Future development areas

Currently, several other therapeutic strategies are being considered at an earlier stage and represent promising strategies for the future, especially induced Pluripotent Stem Cells (iPSC), biomaterials and preconditioning of stem cells.

The emergence of iPSC is a therapeutic hope. These cells were presented in 2006 after a groundbreaking study by Yamanaka's group. They demonstrated that viral transduction of murine fibroblasts with only four transcription factors, Oct-4, Sox-2, Klf4 and c-Myc (OSKM), could reprogram these cells back to an undifferentiated embryonic state. It has opened the possibility of reprogramming adult cells of the skin. These completely reprogrammed cells share almost all the features of murine embryonic stem cells (ESCs) [120]. iPSCs have now been generated from multiple terminally differentiated somatic cells

and adult stem cells from mouse [120-124] as well as from human [125-127]. Fibroblasts derived from human iPSC have been reported to enhance angiogenesis *in vitro*. An elevated secretion of pro-angiogenic soluble mediators, including VEGF, HGF, IL-8, PDGF-AA, and Ang-1, that stimulated endothelial cell sprouting in a 3D model of angiogenesis was observed *in vitro* [128]. Moreover, nuclear transfer of isolated epidermal cells demonstrated that multipotent bulge stem cells could be more easily reprogrammed to pluripotent state than more committed epidermal cells, suggesting that these cells might be a better source of cells for nuclear reprogramming to pluripotent state [129]. Presently, many limitations still affect the possibility to apply this personalized medicine. The main limitations are related to ethical and technical issues, including the development of safe and efficient methods for iPSC generation (the use of retroviral vector to obtain these cells limits their clinical feasibility) as well as the choice of the most appropriate cell type for reprogramming [130]. Nevertheless, iPSC cell biology has admittedly become a new field within stem cell research that covers various important and attractive scientific areas such as wound repair and tissue regeneration.

Otherwise, different biomaterials such as dermal/matrix scaffolds [131], nanofibrous structures [132] or dermal substitutes [133] associated with MSC are evaluated to cure wound damage. Tissue-engineered skin substitute biomaterials need to reproduce all skin physiologic, protective and immune functions. The majority of them was developed during the 1990's and is designed to mimic the basic properties of the extracellular matrix. These de-cellularized ECM represents a mature end-point structure both in term of architecture and molecular structure. Thus, it was hypothesized that biomaterials associated with MSC may improve cutaneous repair through synergic effects of biomaterials which provide a micro-environment and wound healing properties of stem cells. Preliminary results demonstrated that the combination of biomaterials and stem cells increase cellular organization through integration of the stem cells into the biomaterials (scaffold, dermal substitutes such as nanofibrous) [132] and exhibit synergistic angiogenesis promoting effects [131-133] which enhances the transport of essential nutrients for skin repair [134]. Thus they pave the way of new wound repair management.

Furthermore, an arising method to enhance MSC potential is the preconditioning of the stem cells. The aim of this strategy is to improve a well-known property of MSC such as cell migration, secretion of angiogenic factors etc, according to the intended effect, by cultivating the MSC under specific culture conditions, different from classic ones. The most studied preconditioning is hypoxia which has been reported to enhance stem cells (BM-MSK and ADSC) survival *in vitro* and *in vivo* [135,136] and to decrease apoptosis [137]. Hypoxia also favors immune-modulation through an inhibition of COX1/2 [138] and improves MSC migration [137,139]. Pro-angiogenic effects have also been reported with hypoxia preconditioning via an enhancement of transdifferentiation into endothelial precursor cells (EPC) and angiogenic factors secretion [140,141]. Many other preconditioning have also been evaluated such as co-culture with growth factors (TGF α , IGF-1, FGF-2), Tumor Necrosing Factor α , or erythropoietin which respectively enhance pro-angiogenic factors secretion [142], immunomodulation [138] and transdifferentiation in endothelial precursor cells [143]. Several works have been realized *in vivo* on murine models to evaluate preconditioning, mostly on cardiac lesions and have highlighted the benefit of preconditioning on myocardial repair. Concerning wound healing, *in vitro* a very specific preconditioning has already been evaluated by co-culture of ADSC with keratinocytes or

culture in keratinocytes CM. and the study has demonstrated a trans differentiation of these stem cells into keratinocytes [64]. *In vivo*, culture of ADSC under hypoxia has also been reported to enhance wound repair in a NOD/SCID model [144]. Thus, this preconditioning strategy is as promising as previous ones and offers a new development area for the future.

Conclusions

For the past 15 years, the treatment of cutaneous radiation syndrome has evolved due to the emergence of cellular therapy. Therapeutic strategies beyond surgery now include autologous BM-MSC injections and skin grafts in humans and many studies are underway to optimize this process and extend it to the cases of mass casualty and heterogeneous irradiation in pre-clinical experiment. Thus from numerous studies, ADSC may be more appropriate for CRS treatment and allogeneic ADSC injections may represent a very beneficial technique provided that compatibility donor-recipient is checked and donor variability is evaluated. To overcome these challenges conditioned media could be used if confirming their potential and autologous or allogeneic cell therapy could be optimized by gene therapy based on the transient expression of selected proteins involved in wound repair. Many other strategies arise such as iPSC, preconditioning or biomaterials which have not been evaluated presently for the treatment of CRS. They provide interesting biological processes which may supplement stem cells therapies currently studied.

For the treatment of CRS using MSC/ADSC, general inherent risks in cell therapy are still relevant today. In particular the possibility of immunological incompatibility in the case of allogeneic stem cells graft, the risk of tumor development given the anti-apoptotic and pro-angiogenic properties of stem cells and finally intrinsic risk of every injected treatment such as infection, which is favored here by the culture time. Many safety controls may be proposed or already exist to minimize these risks such as phenotype analyze, or telomerase activity evaluation and contamination control previously described [50]. Moreover tumor induction by MSC is presently a source of discussions with different results depending on the type of cancer. Indeed, supportive effect on tumor growth has been reported for cancers of colon [145], lymphoma [146], melanomas [147] through immunomodulation [148] or proliferation of MSC in tumor [149] whereas suppressive roles on tumor development were observed after injection of stem cells in liver cancer [150], leukemia [151], and pancreatic cancer [152] mostly via a modification of Akt signaling [148]. The only consensus in this field is the preferential migration of stem cells to tumor sites [153] which could be problematic for MSC systemic injections in case of unknown subclinical cancer. Nevertheless, these risks does not exclude cell therapy using for CRS but it has to be more investigated and the balance benefit/risk would have to be assessed for each patient with his informed choice.

To conclude, considering CRS, evaluated MSC/ADSC strategies are all currently based on a secretory theory. The arising of graft optimization such as biomaterials, and preconditioning may change the situation in the years to come. Of course, several challenges still need to be overcome before these strategies can be effectively used on human skin radio-injury. Nevertheless, pre-clinical and clinical trials show that stem cell therapy to mitigate CRS is a promising working hypothesis. All these strategies represent a hope and a huge benefit for local irradiated patients.

Acknowledgements

This work was supported by a grant from Direction Générale de l'Armement (Paris, France).

Conflict of Interest Statement

The authors declare no conflicts of interest, financial, or otherwise.

References

1. <http://www.johnstonsarchive.net/nuclear/radevents/radaccidents.html>
2. Lipsy PY, Kushida KE, Incerti T (2013) The Fukushima disaster and Japan's nuclear plant vulnerability in comparative perspective. *Environ Sci Technol* 47(12): 6082-6088.[[PubMed](#)]
3. Bouville A, Linet MS, Hatch M, Mabuchi K, Simon SL (2014) Guidelines for exposure assessment in health risk studies following a nuclear reactor accident. *Environ Health Perspect* 122(1): 1-5.[[PubMed](#)]
4. Nenot JC (2009) Radiation accidents over the last 60 years. *J Radiol Prot* 29(3): 301-320.[[PubMed](#)]
5. Berger ME, Christensen DM, Lowry PC, Jones OW, Wiley AL (2006) Medical management of radiation injuries: current approaches. *Occup Med (Lond)* 56(3): 162-172.[[PubMed](#)]
6. Milliat F, François A, Isoir M, Deutsch E, Tamarat R, et al. (2006) Influence of endothelial cells on vascular smooth muscle cells phenotype after irradiation: implication in radiation-induced vascular damages. *Am J Pathol* 169(4): 1484-1495.[[PubMed](#)]
7. Volk SW, Iqbal SA, Bayat A (2013) Interactions of the Extracellular Matrix and Progenitor Cells in Cutaneous Wound Healing. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 2(6): 261-272.[[PubMed](#)]
8. Muller K, Meineke V (2007) Radiation-induced alterations in cytokine production by skin cells. *Exp Hematol* 35(4 Suppl 1): 96-104.[[PubMed](#)]
9. Varnum SM, Springer DL, Chaffee ME, Lien KA, Webb-Robertson BJ, et al. (2012) The effects of low-dose irradiation on inflammatory response proteins in a 3D reconstituted human skin tissue model. *Radiat Res* 178(6): 591-599. [[PubMed](#)]
10. Pincelli C, Marconi A (2010) Keratinocyte stem cells: friends and foes. *J Cell Physiol* 225(2): 310-305.[[PubMed](#)]
11. Hopewell JW (1990) The skin: its structure and response to ionizing radiation. *Int J Radiat Biol* 57(4): 751-773.[[PubMed](#)]
12. Lefaix JL, Delanian S (2005) Le syndrome cutané radio-induit. (1stedn) John Libbey Eurotext: Montrouge. 87-95.
13. Kim JH, Kolozsvary AJ, Jenrow KA, Brown SL, et al. (2013) Mechanisms of radiation-induced skin injury and implications for future clinical trials. *Int J Radiat Biol* 89(5): 311-318.[[PubMed](#)]
14. Bey E, Duhamel P, Lataillade JJ, de Revel T, Carsin H, et al. Treatment of radiation burns with surgery and cell therapy. A report of two cases. *Bull Acad Natl Med*, 2007; 191(6): 971-978.[[PubMed](#)]
15. Bey E, Doucet C, Duhamel P, Brachet M, Prat M. et al. (2010) Radiation burn "innovating therapeutic approach". *Ann Chir Plast Esthet* 55(5): 354-362. [[PubMed](#)]
16. Delanian L (2005) Menace terroriste, Approche médicale (1stedn). John Libbey Eurotext: Montrouge.
17. Peter RU, Gottlob P (2002) Management of cutaneous radiation injuries: diagnostic and therapeutic principles of the cutaneous radiation syndrome. *Mil Med* 167 (2 Suppl): 110-112.[[PubMed](#)]
18. Williams JP, Jackson IL, Shah JR, Czarniecki CW, Maidment BW, et al. (2010) Animal models for medical countermeasures to radiation exposure. *Radiat Res* 173(4): 557-578.[[PubMed](#)]
19. François S1, Mouiseddine M, Mathieu N, Semont A, Monti P, et al. (2007) Human mesenchymal stem cells favour healing of the cutaneous radiation syndrome in a xenogenic transplant model. *Ann Hematol* 86(1): 1-8.[[PubMed](#)]
20. Meirelles RP, Hochman B, Helene Junior A, Lellis R, Fraga MF, et al. (2013) Experimental model of cutaneous radiation injury in rabbits. *Acta Cir Bras* 28(11): 751-755.[[PubMed](#)]
21. Van den Aardweg GJ, Arnold M, Hopewell JW (1990) A comparison of the radiation response of the epidermis in two strains of pig. *Radiat Res* 124(3): 283-287.[[PubMed](#)]

22. Vodicka P1, Smetana K Jr, Dvoránková B, Emerick T, Xu YZ, et al. (2005) The miniature pig as an animal model in biomedical research. *Ann N Y Acad Sci* 1049: 161-171.[[PubMed](#)]
23. Mahl JA1, Vogel BE, Court M, Kolopp M, Roman D, et al. (2006) The minipig in dermatotoxicology: methods and challenges. *Exp Toxicol Pathol* 57(5-6): 341-345.[[PubMed](#)]
24. Agay D, Scherthan H, Forcheron F, Grenier N, Hérodin F, et al. (2010) Multipotent mesenchymal stem cell grafting to treat cutaneous radiation syndrome: development of a new minipig model. *Exp Hematol* 38(10): 945-956.[[PubMed](#)]
25. Tamarat R, Lataillade JJ, Bey E, Gourmelon P, Benderitter M, et al. (2012) Stem cell therapy: from bench to bedside. *Radiat Prot Dosimetry* 151(4): 633-639.[[PubMed](#)]
26. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, et al. (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284(5411): 143-147.[[PubMed](#)]
27. Rebelatto CK, Aguiar AM, Moretão MP, Senegaglia AC, Hansen P, et al. (2008) Dissimilar differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, and adipose tissue. *Exp Biol Med (Maywood)* 233(7): 901-913.[[PubMed](#)]
28. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K, et al. (2006) Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells* 24(5): 1294-1301.[[PubMed](#)]
29. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, et al. (2006) Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8(4): 315-317.[[PubMed](#)]
30. <http://clinicaltrials.gov>
31. Chamberlain G1, Fox J, Ashton B, Middleton J (2007) Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells* 25(11): 2739-2749.[[PubMed](#)]
32. Petrie Aronin CE, Tuan RS (2010) Therapeutic potential of the immunomodulatory activities of adult mesenchymal stem cells. *Birth Defects Res C Embryo Today* 90(1): 67-74.[[PubMed](#)]
33. Mosna F Sensebe L, Krampera M (2010) Human bone marrow and adipose tissue mesenchymal stem cells: a user's guide. *Stem Cells Dev* 19(10): 1449-1470.[[PubMed](#)]
34. Caplan AI, Dennis JE (2006) Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem* 98(5): 1076-1084.[[PubMed](#)]
35. Chen L, Tredget EE, Wu PY, Wu Y (2008) Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. *PLoS One* 3(4): e1886.[[PubMed](#)]
36. Li ZH, Liao W, Cui XL, Zhao Q, Liu M, et al. (2011) Intravenous transplantation of allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells and its directional migration to the necrotic femoral head. *Int J Med Sci* 8(1): 74-83.[[PubMed](#)]
37. Rodríguez R1, García-Castro J, Trigueros C, García Arranz M, Menéndez P (2012) Multipotent mesenchymal stromal cells: clinical applications and cancer modeling. *Adv Exp Med Biol* 741: 187-205.[[PubMed](#)]
38. Le Blanc K, Ringden O (2007) Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience. *J Intern Med* 262(5): 509-525.[[PubMed](#)]
39. Wu Y, Chen L, Scott PG, Tredget EE (2007) Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis. *Stem Cells* 25(10): 2648-2659.[[PubMed](#)]
40. Krause DS, Theise ND, Collector MI, Henegariu O, Hwang S, et al. (2001) Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 105(3): 369-377.[[PubMed](#)]
41. Derby BM, Dai H, Reichensperger J, Cox L, Harrison C, et al. (2014) Adipose-derived stem cell to epithelial stem cell transdifferentiation: a mechanism to potentially improve understanding of fat grafting's impact on skin rejuvenation. *Aesthet Surg J* 34(1): 142-153.[[PubMed](#)]
42. Sasaki M, Abe R, Fujita Y, Ando S, Inokuma D, et al. (2008) Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type. *J Immunol* 180(4): 2581-2587.[[PubMed](#)]
43. Huelsken J, Vogel R, Erdmann B, Cotsarelis G, Birchmeier W (2001) beta-Catenin controls hair follicle morphogenesis and stem cell differentiation in the skin. *Cell* 105(4): 533-545.[[PubMed](#)]
44. Ito M, Yang Z, Andl T, Cui C, Kim N, et al. (2007) Wnt-dependent de novo hair follicle regeneration in adult mouse skin after wounding. *Nature* 447(7142): 316-320.[[PubMed](#)]
45. Francois S, Mouisseddine M, Allenet-Lepage B, Voswinkel J, Douay L, et al. (2013) Human mesenchymal stem cells provide protection against radiation-induced liver injury by antioxidative process, vasculature protection, hepatocyte differentiation, and trophic effects. *Biomed Res Int* 2013: 151679.[[PubMed](#)]
46. Saha S, Bhanja P, Kabarriti R, Liu L, Alfieri AA, et al. (2011) Bone marrow stromal cell transplantation mitigates radiation-induced gastrointestinal syndrome in mice. *PLoS One* 6(9): e24072.[[PubMed](#)]
47. François S1, Bensidhoum M, Mouisseddine M, Mazurier C, Allenet B, et al. (2006) 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* 24(4): 1020-1029.[[PubMed](#)]
48. Sémont A, Demarquay C, Bessout R, Durand C, Benderitter M, et al. (2013) Mesenchymal stem cell therapy stimulates endogenous host progenitor cells to improve colonic epithelial regeneration. *PLoS One* 8: e70170.[[PubMed](#)]
49. IAEA, International Atomic Energy Agency (2009). The radiological accident in Nueva Aldea. Vienna.
50. Lataillade JJ, Doucet C, Bey E, Carsin H, Huet C, et al. (2007) New approach to radiation burn treatment by dosimetry-guided surgery combined with autologous mesenchymal stem cell therapy. *Regen Med* 2(5): 785-794.[[PubMed](#)]
51. Bey E, Prat M, Duhamel P, Benderitter M, Brachet M, et al. (2010) Emerging therapy for improving wound repair of severe radiation burns using local bone marrow-derived stem cell administrations. *Wound Repair Regen* 18: 50-58.[[PubMed](#)]
52. Yañez R, Oviedo A, Aldea M, Bueren JA, Lamana ML, et al. (2010) Prostaglandin E2 plays a key role in the immunosuppressive properties of adipose and bone marrow tissue-derived mesenchymal stromal cells. *Exp Cell Res* 316(19): 3109-3123.[[PubMed](#)]
53. Smith AN, Willis E, Chan VT, Muffley LA, Isik FF, et al. (2010) Mesenchymal stem cells induce dermal fibroblast responses to injury. *Exp Cell Res* 316(1): 48-54.[[PubMed](#)]
54. Estrada R, Li N, Sarojini H, An J, Lee MJ, et al. (2009) Secretome from mesenchymal stem cells induces angiogenesis via Cyr61. *J Cell Physiol* 219(3): 563-571.[[PubMed](#)]
55. Bernardo ME, Locatelli F, Fibbe WE (2009) Mesenchymal stromal cells. *Ann N Y Acad Sci* 1176: 101-117.[[PubMed](#)]
56. Zhang T, Lee YW, Rui YF, Cheng TY, Jiang XH, et al. (2013) Bone marrow-derived mesenchymal stem cells promote growth and angiogenesis of breast and prostate tumors. *Stem Cell Res Ther* 4: 70.[[PubMed](#)]
57. Bergfeld SA, Blavier L, Declerck YA (2014) Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells Promote Survival and Drug Resistance in Tumor Cells. *Mol Cancer Ther* [[PubMed](#)]
58. Mizuno H, Zuk PA, Zhu M, Lorenz HP, Benhaim P, et al. (2002) Myogenic differentiation by human processed lipoaspirate cells. *Plast Reconstr Surg* 109: 199-209.[[PubMed](#)]
59. Hass R, Kasper C, Böhm S, Jacobs R (2011) Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Commun Signal* 9: 12.[[PubMed](#)]
60. Fraser JK, Wulur I, Alfonso Z, Hedrick MH, et al. (2006) Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends Biotechnol* 24(4): 150-154.[[PubMed](#)]
61. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, et al. (2001) Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 7(2): 211-228.[[PubMed](#)]
62. Izadpanah R, Trygg C, Patel B, Kriedt C, Dufour J, et al. (2006) Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue. *J Cell Biochem* 99(5): 1285-1297.[[PubMed](#)]
63. Huang SJ, Fu RH, Shyu WC, Liu SP, Jong GP, et al. (2013) Adipose-derived

- stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Cell Transplant* 22(4): 701-709.[[PubMed](#)]
64. Chavez-Munoz C, Nguyen KT, Xu W, Hong SJ, Mustoe TA, et al. (2013) Transdifferentiation of adipose-derived stem cells into keratinocyte-like cells: engineering a stratified epidermis. *PLoS One* 8(12): e80587.[[PubMed](#)]
65. Hanson SE, Kim J, Hematti P (2013) Comparative analysis of adipose-derived mesenchymal stem cells isolated from abdominal and breast tissue. *Aesthet Surg J* 33(6): 888-898.[[PubMed](#)]
66. Nauta A, Seidel C, Deveza L, Montoro D, Grova M, et al. (2013) Adipose-derived stromal cells overexpressing vascular endothelial growth factor accelerate mouse excisional wound healing. *Mol Ther* 21: 445-455.[[PubMed](#)]
67. Rehman J, Traktuev D, Li J, Merfeld-Clauss S, Temm-Grove CJ, et al. (2004) Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation* 109(10): 1292-1298.[[PubMed](#)]
68. Sumi M, Sata M, Toya N, Yanaga K, Ohki T, et al. (2007) Transplantation of adipose stromal cells, but not mature adipocytes, augments ischemia-induced angiogenesis. *Life Sci* 80(6): 559-565.[[PubMed](#)]
69. Kondo K, Shintani S, Shibata R, Murakami H, Murakami R, et al. (2009) Implantation of adipose-derived regenerative cells enhances ischemia-induced angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29(1): 61-66.[[PubMed](#)]
70. Nunes SS, Majjub JG, Krishnan L, Ramakrishnan VM, Clayton LR, et al. (2013) Generation of a functional liver tissue mimic using adipose stromal vascular fraction cell-derived vasculatures. *Sci Rep* 3: 2141.[[PubMed](#)]
71. Kim Y, Kim H, Cho H, Bae Y, Suh K, et al. (2007) Direct comparison of human mesenchymal stem cells derived from adipose tissues and bone marrow in mediating neovascularization in response to vascular ischemia. *Cell Physiol Biochem* 20: 867-876.[[PubMed](#)]
72. Koh YJ, Koh BI, Kim H, Joo HJ, Jin HK, et al. (2011) Stromal vascular fraction from adipose tissue forms profound vascular network through the dynamic reassembly of blood endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31(5): 1141-1150.[[PubMed](#)]
73. Bochev I, Elmadjian G, Kyurkchiev D, Tzvetanov L, Altankova I, et al. (2008) Mesenchymal stem cells from human bone marrow or adipose tissue differently modulate mitogen-stimulated B-cell immunoglobulin production in vitro. *Cell Biol Int* 32: 384-393.[[PubMed](#)]
74. Ivanova-Todorova E, Bochev I, Mourdjeva M, Dimitrov R, Bukarev D, et al. (2009) Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells are more potent suppressors of dendritic cells differentiation compared to bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Immunol Lett* 126(1-2): 37-42.[[PubMed](#)]
75. Cui L, Yin S, Liu W, Li N, Zhang W, et al. (2007) Expanded adipose-derived stem cells suppress mixed lymphocyte reaction by secretion of prostaglandin E2. *Tissue Eng* 13: 1185-1195.[[PubMed](#)]
76. Collawn SS, Banerjee NS, de la Torre J, Vasconez L, Chow LT, et al. (2012) Adipose-derived stromal cells accelerate wound healing in an organotypic raft culture model. *Ann Plast Surg* 68(5): 501-504.[[PubMed](#)]
77. Ebrahimian TG, Pouzoulet F, Squiban C, Buard V, André M, et al. (2009) Cell therapy based on adipose tissue-derived stromal cells promotes physiological and pathological wound healing. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29(4): 503-510.[[PubMed](#)]
78. Nakagami H, Morishita R, Maeda K, Kikuchi Y, Ogihara T, et al. (2006) Adipose tissue-derived stromal cells as a novel option for regenerative cell therapy. *J Atheroscler Thromb* 13(2): 77-81.[[PubMed](#)]
79. Kim JM, Lee ST, Chu K, Jung KH, Song EC, et al. (2007) Systemic transplantation of human adipose stem cells attenuated cerebral inflammation and degeneration in a hemorrhagic stroke model. *Brain Res* 1183: 43-50.[[PubMed](#)]
80. Gimble JM, Grayson W, Guilak F, Lopez MJ, Vunjak-Novakovic G (2011) Adipose tissue as a stem cell source for musculoskeletal regeneration. *Front Biosci (Schol Ed)* 3: 69-81.[[PubMed](#)]
81. Kang SK, Shin MJ, Jung JS, Kim YG, Kim CH, et al. (2006) Autologous adipose tissue-derived stromal cells for treatment of spinal cord injury. *Stem Cells Dev* 15(4): 583-594.[[PubMed](#)]
82. Vidal MA, Walker NJ, Napoli E, Borjesson DL (2011) Evaluation of Senescence in Mesenchymal Stem Cells Isolated from Equine Bone Marrow, Adipose Tissue, and Umbilical Cord Tissue. *Stem Cells Dev* 21(2): 273283 [[PubMed](#)]
83. Riccobono D, Agay D, Scherthan H, Forcheron F, Vivier M, et al. (2012) Application of Adipocyte-Derived Stem Cells in Treatment of Cutaneous Radiation Syndrome. *Health Physics* 103(2): 120-126.[[PubMed](#)]
84. Forcheron F, Agay D, Scherthan H, Riccobono D, Herodin F, et al. (2012) Autologous adipocyte derived stem cells favour healing in a minipig model of cutaneous radiation syndrome. *PLoS One* 7(2): e31694.[[PubMed](#)]
85. Akita S, Akino K, Hirano A, Ohtsuru A, Yamashita S (2010) Mesenchymal stem cell therapy for cutaneous radiation syndrome. *Health Phys* 98(6): 858-862.[[PubMed](#)]
86. Akita S, Akino K, Hirano A, Ohtsuru A, Yamashita S (2010) Noncultured autologous adipose-derived stem cells therapy for chronic radiation injury. *Stem Cells Int* 2010: 532704.[[PubMed](#)]
87. Miyamoto Y, Oishi K, Yukawa H, Noguchi H, Sasaki M, et al. (2012) Cryopreservation of human adipose tissue-derived stem/progenitor cells using the silk protein sericin. *Cell Transplant* 21(2-3): 617-622.[[PubMed](#)]
88. Thirumala S, Gimble JM, Devireddy RV (2010) Evaluation of methylcellulose and dimethyl sulfoxide as the cryoprotectants in a serum-free freezing media for cryopreservation of adipose-derived adult stem cells. *Stem Cells Dev* 19(4): 513-522.[[PubMed](#)]
89. Devireddy RV, Thirumala S, Gimble JM (2005) Cellular response of adipose derived passage-4 adult stem cells to freezing stress. *J Biomech Eng* 127(7): 1081-1086.[[PubMed](#)]
90. Thirumala S, Zvonic S, Floyd E, Gimble JM, Devireddy RV (2005) Effect of various freezing parameters on the immediate post-thaw membrane integrity of adipose tissue derived adult stem cells. *Biotechnol Prog* 21: 1511-1524.[[PubMed](#)]
91. Devireddy R, Thirumala S (2011) Preservation protocols for human adipose tissue-derived adult stem cells. *Methods Mol Biol* 702: 369-394.[[PubMed](#)]
92. Friedenstein AJ, Deriglasova UF, Kulagina NN, Panasuk AF, Rudakowa SF, et al. (1974) Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp Hematol* 2(2): 83-92.[[PubMed](#)]
93. Le Blanc K, Tammik C, Rosendahl K, Zetterberg E, Ringdén O, et al. (2003) HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp Hematol* 31: 890-896.[[PubMed](#)]
94. Vassalli G, Moccetti T (2011) Cardiac repair with allogeneic mesenchymal stem cells after myocardial infarction. *Swiss Med Wkly* 141: w13209.[[PubMed](#)]
95. Chen L, Tredget EE, Liu C, Wu Y (2009) Analysis of allogenicity of mesenchymal stem cells in engraftment and wound healing in mice. *PLoS One* 4(9): e7119.[[PubMed](#)]
96. Caplan AI (2009) Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. *J Pathol* 217(2): 318-324.[[PubMed](#)]
97. Walter MN, Wright KT, Fuller HR, MacNeil S, Johnson WE, et al. (2010) Mesenchymal stem cell-conditioned medium accelerates skin wound healing: an in vitro study of fibroblast and keratinocyte scratch assays. *Exp Cell Res* 316(7): 1271-1281.[[PubMed](#)]
98. Yew TL, Hung YT, Li HY, Chen HW, Chen LL, et al. (2011) Enhancement of wound healing by human multipotent stromal cell conditioned medium: the paracrine factors and p38 MAPK activation. *Cell Transplant* 20(5): 693-706.[[PubMed](#)]
99. Yoon BS, Moon JH, Jun EK, Kim J, Maeng I, et al. (2010) Secretory profiles and wound healing effects of human amniotic fluid-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* 19: 887-902.[[PubMed](#)]
100. Kim WS, Park BS, Sung JH, Yang JM, Park SB, et al. (2007) Wound healing effect of adipose-derived stem cells: a critical role of secretory factors on human dermal fibroblasts. *J Dermatol Sci* 48(1): 15-24.[[PubMed](#)]
101. Schütze N, Schenk R, Fiedler J, Mattes T, Jakob F, et al. (2007) CYR61/CCN1 and WISP3/CCN6 are chemoattractive ligands for human multipotent mesenchymal stroma cells. *BMC Cell Biol* 8: 45.[[PubMed](#)]
102. Bhang SH, Lee S, Shin JY, Lee TJ, Jang HK, et al. (2014) Efficacious and Clinically Relevant Conditioned-medium of Human Adipose-derived Stem Cells for Therapeutic Angiogenesis. *Mol Ther* [[PubMed](#)]
103. Katsuda T, Kosaka N, Takeshita F, Ochiya T (2013) The therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles. *Proteomics* 13(10-11): 1637-1653.[[PubMed](#)]

104. Timmers L, Lim SK, Arslan F, Armstrong JS, Hoefler IE, et al. (2007) Reduction of myocardial infarct size by human mesenchymal stem cell conditioned medium. *Stem Cell Res* 1(2): 129-137.[[PubMed](#)]
105. Lai RC, Arslan F, Lee MM, Sze NS, Choo A, et al. (2010) Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem Cell Res* 4(3): 214-222.[[PubMed](#)]
106. Peng LH, Tsang SY, Tabata Y, Gao JQ (2012) Genetically-manipulated adult stem cells as therapeutic agents and gene delivery vehicle for wound repair and regeneration. *J Control Release* 157(3): 321-330.[[PubMed](#)]
107. Nowakowski A, Andrzejewska A, Janowski M, Walczak P, Lukomska B (2013) Genetic engineering of stem cells for enhanced therapy. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 73(1): 1-18.[[PubMed](#)]
108. Morizono K, De Ugarte DA, Zhu M, Zuk P, Elbarbary A, et al. (2003) Multilineage cells from adipose tissue as gene delivery vehicles. *Hum Gene Ther* 14: 59-66.[[PubMed](#)]
109. Stadtfeld M, Nagaya M, Utikal J, Weir G, Hochedlinger K, et al. (2008) Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science* 322: 945-949.[[PubMed](#)]
110. Miyazaki M, Zuk PA, Zou J, Yoon SH, Wei F, et al. (2008) Comparison of human mesenchymal stem cells derived from adipose tissue and bone marrow for ex vivo gene therapy in rat spinal fusion model. *Spine (Phila Pa 1976)* 33(8): 863-869.[[PubMed](#)]
111. Yang Y, Nunes FA, Berencsi K, Furth EE, Gönczöl E, et al. (1994) Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 4407-4411.[[PubMed](#)]
112. Wu C, Dunbar CE (2011) Stem cell gene therapy: the risks of insertional mutagenesis and approaches to minimize genotoxicity. *Front Med* 5(4): 356-371.[[PubMed](#)]
113. Riccobono D, et al. (2014) Transient gene therapy to treat cutaneous radiation syndrome : development in minipig model. *Health Physics*, In press.
114. Gresch O, Engel FB, Nestic D, Tran TT, England HM, et al. (2004) New non-viral method for gene transfer into primary cells. *Methods* 33: 151-163. [[PubMed](#)]
115. Flanagan M, Gimble JM, Yu G, Wu X, Xia X, et al. (2011) Competitive electroporation formulation for cell therapy. *Cancer Gene Ther* 18: 579-586. [[PubMed](#)]
116. Nakashima S, Matsuyama Y, Nitta A, Sakai Y, Ishiguro N (2005) Highly efficient transfection of human marrow stromal cells by nucleofection. *Transplant Proc* 37(5): 2290-2292.[[PubMed](#)]
117. Aluigi M, Fogli M, Curti A, Isidori A, Gruppioni E, et al. (2006) Nucleofection is an efficient nonviral transfection technique for human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 24(2): 454-461.[[PubMed](#)]
118. Kim HJ, Im GI (2011) Electroporation-mediated transfer of SOX trio genes (SOX-5, SOX-6, and SOX-9) to enhance the chondrogenesis of mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* 20(12): 2103-2114.[[PubMed](#)]
119. Wiehe JM, Kaya Z, Homann JM, Wöhrle J, Vogt K, et al. (2013) GMP-adapted overexpression of CXCR4 in human mesenchymal stem cells for cardiac repair. *Int J Cardiol* 167: 2073-2081.[[PubMed](#)]
120. Takahashi K, Yamanaka S (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126(4): 663-676.[[PubMed](#)]
121. Meissner A, Wernig M, Jaenisch R (2007) Direct reprogramming of genetically unmodified fibroblasts into pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 25(10): 1177-1181.[[PubMed](#)]
122. Wernig M, Meissner A, Foreman R, Brambrink T, Ku M, et al. (2007) In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature* 448(7151): 318-324.[[PubMed](#)]
123. Varga E, Nemes C, Davis RP, Ujhelly O, Klincumhom N, et al. (2014) Generation of transgene-free mouse induced pluripotent stem cells using an excisable lentiviral system. *Exp Cell Res* 322(2): 335-344.[[PubMed](#)]
124. Eminli S, Utikal J, Arnold K, Jaenisch R, Hochedlinger K (2008) Reprogramming of neural progenitor cells into induced pluripotent stem cells in the absence of exogenous Sox2 expression. *Stem Cells* 26(10): 2467-2474.[[PubMed](#)]
125. Lowry WE, Richter L, Yachechko R, Pyle AD, Tchieu J, et al. (2008) Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(8): 2883-2888.[[PubMed](#)]
126. Aasen T, Raya A, Barrero MJ, Garreta E, Consiglio A, et al. (2008) Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat Biotechnol* 26(11): 1276-1284.[[PubMed](#)]
127. Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Takahashi K, Ichisaka T, et al. (2008) Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol* 26(1): 101-106.[[PubMed](#)]
128. Shamis Y, Silva EA, Hewitt KJ, Brudno Y, Levenberg S, et al. (2013) Fibroblasts derived from human pluripotent stem cells activate angiogenic responses in vitro and in vivo. *PLoS One* 8: e83755.[[PubMed](#)]
129. Li J, Greco V, Guasch G, Fuchs E, Mombaerts P (2007) Mice cloned from skin cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(8): 2738-2743.[[PubMed](#)]
130. Li M1, Chen M, Han W, Fu X (2010) How far are induced pluripotent stem cells from the clinic? *Ageing Res Rev* 9(3): 257-264.[[PubMed](#)]
131. Liu S, Zhang H, Zhang X, Lu W, Huang X, et al. (2011) Synergistic angiogenesis promoting effects of extracellular matrix scaffolds and adipose-derived stem cells during wound repair. *Tissue Eng Part A* 17: 725-739.[[PubMed](#)]
132. Jayarama Reddy V, Radhakrishnan S, Ravichandran R, Mukherjee S, Balamurugan R, et al. (2013) Nanofibrous structured biomimetic strategies for skin tissue regeneration. *Wound Repair Regen* 21: 1-16.[[PubMed](#)]
133. Hodgkinson T, Bayat A (2011) Dermal substitute-assisted healing: enhancing stem cell therapy with novel biomaterial design. *Arch Dermatol Res* 303(5): 301-315.[[PubMed](#)]
134. Egaña JT, Fierro FA, Krüger S, Bornhäuser M, Huss R, et al. (2009) Use of human mesenchymal cells to improve vascularization in a mouse model for scaffold-based dermal regeneration. *Tissue Eng Part A* 15(5): 1191-1200. [[PubMed](#)]
135. Stubbs SL, Hsiao ST, Peshavariya HM, Lim SY, Dusting GJ, et al. (2012) Hypoxic preconditioning enhances survival of human adipose-derived stem cells and conditions endothelial cells in vitro. *Stem Cells Dev* 21(11): 1887-1896.[[PubMed](#)]
136. Yue Y, Zhang P, Liu D, Yang JF, Nie C, et al. (2013) Hypoxia preconditioning enhances the viability of ADSCs to increase the survival rate of ischemic skin flaps in rats. *Aesthetic Plast Surg* 37(1): 159-70.[[PubMed](#)]
137. Li S, Deng Y, Feng J, Ye W (2009) Oxidative preconditioning promotes bone marrow mesenchymal stem cells migration and prevents apoptosis. *Cell Biol Int* 33(3): 411-418.[[PubMed](#)]
138. Loos B, Smith R., Engelbrecht AM (2008) Ischaemic preconditioning and TNF-alpha-mediated preconditioning is associated with a differential cPLA2 translocation pattern in early ischaemia. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 78(6): 403-413.[[PubMed](#)]
139. Rosová I, Dao M, Capoccia B, Link D, Nolte JA (2008) Hypoxic preconditioning results in increased motility and improved therapeutic potential of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 26(8): 2173-2182.[[PubMed](#)]
140. Liu L1, Gao J, Yuan Y, Chang Q, Liao Y, et al. (2013) Hypoxia preconditioned human adipose derived mesenchymal stem cells enhance angiogenic potential via secretion of increased VEGF and bFGF. *Cell Biol Int* 37(6): 551-560.[[PubMed](#)]
141. Wei L, Fraser JL, Lu ZY, Hu X, Yu SP (2012) Transplantation of hypoxia preconditioned bone marrow mesenchymal stem cells enhances angiogenesis and neurogenesis after cerebral ischemia in rats. *Neurobiol Dis* 46(3): 635-645.[[PubMed](#)]
142. Khan M, Akhtar S, Mohsin S, N Khan S, Riazuddin S (2011) Growth factor preconditioning increases the function of diabetes-impaired mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* 20(1): 67-75.[[PubMed](#)]
143. Yu SP, Wei Z, Wei L (2013) Preconditioning strategy in stem cell transplantation therapy. *Transl Stroke Res* 4(1): 76-88.[[PubMed](#)]
144. Kim WS, Sung JH (2012) Hypoxic Culturing Enhances the Wound-Healing Potential of Adipose-Derived Stem Cells. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 1(4): 172-176.[[PubMed](#)]
145. Shinagawa K, Kitadai Y, Tanaka M, Sumida T, Kodama M, et al. (2010) Mesenchymal stem cells enhance growth and metastasis of colon cancer. *Int J Cancer* 127(10): 2323-2333.[[PubMed](#)]

146. Amé-Thomas P, Maby-El Hajjami H, Monvoisin C, Jean R, Monnier D, et al. (2007) Human mesenchymal stem cells isolated from bone marrow and lymphoid organs support tumor B-cell growth: role of stromal cells in follicular lymphoma pathogenesis. *Blood* 109(2): 693-702. [PubMed]
147. Djouad F, Plerce P, Bony C, Tropel P, Apparailly F, et al. (2003) Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood* 102(10): 3837-3844. [PubMed]
148. Karnoub AE, Dash AB, Vo AP, Sullivan A, Brooks MW, et al. (2007) Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature* 449(7162): 557-563. [PubMed]
149. Klopp AH, Zhang Y, Solley T, Amaya-Manzanares F, Marini F, et al. (2012) Omental adipose tissue-derived stromal cells promote vascularization and growth of endometrial tumors. *Clin Cancer Res* 18(3): 771-782. [PubMed]
150. Qiao L, Xu Z, Zhao T, Zhao Z, Shi M, et al. (2008) Suppression of tumorigenesis by human mesenchymal stem cells in a hepatoma model. *Cell Res* 18(4): 500-507. [PubMed]
151. Zhu Y, Sun Z, Han Q, Liao L, Wang J, et al. (2009) Human mesenchymal stem cells inhibit cancer cell proliferation by secreting DKK-1. *Leukemia* 23(5): 925-933. [PubMed]
152. Cousin B, Ravet E, Poglio S, De Toni F, Bertuzzi M, et al. (2009) Adult stromal cells derived from human adipose tissue provoke pancreatic cancer cell death both in vitro and in vivo. *PLoS One* 4(7): e6278. [PubMed]
153. Bibber B, Sinha G, Lobba AR, Greco SJ, Rameshwar P (2013) A Review of Stem Cell Translation and Potential Confounds by Cancer Stem Cells. *Stem Cells Int* 2013: 241048. [PubMed]
154. http://www.irsn.fr/FR/Larecherche/publications-documentation/collection-ouvrages-IRSN/Documents/IRSN_reference_les_accidents_dus_aux_rayonnements_ionisants.pdf
155. <http://www.unscear.org/docs/reports/gareport.pdf>
156. Okuse T, Chiba T, Katsuimi I, Imai K (2005) Differential expression and localization of WNTs in an animal model of skin wound healing. *Wound Repair Regen* 13(5): 491-497. [PubMed]
157. Bernardo ME, Zaffaroni N, Novara F, Cometa AM, Avanzini MA, et al. (2007) Human bone marrow derived mesenchymal stem cells do not undergo transformation after long-term in vitro culture and do not exhibit telomere maintenance mechanisms. *Cancer Res* 67(19): 9142-9149. [PubMed]
158. Zaim M, Karaman S, Cetin G, Isik S (2012) Donor age and long-term culture affect differentiation and proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Ann Hematol* 91(8): 1175-1186. [PubMed]
159. Yagi H, Kitagawa Y (2013) The role of mesenchymal stem cells in cancer development. *Front Genet* 4: 261. [PubMed]
160. Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA (2007) Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res* 100(9): 1249-1260. [PubMed]

Citation: Riccobono D, François S, Valente M, Forcheron F, Drouet M (2014) Advances in Stem Cell Therapy: Specific Applications in the Treatment of Cutaneous Radiation Syndrome. *J Stem Cell Res Ther* 4: 186. doi:[10.4172/2157-7633.1000186](https://doi.org/10.4172/2157-7633.1000186)

Submit your next manuscript and get advantages of OMICS Group submissions

Unique features:

- User friendly/feasible website-translation of your paper to 50 world's leading languages
- Audio Version of published paper
- Digital articles to share and explore

Special features:

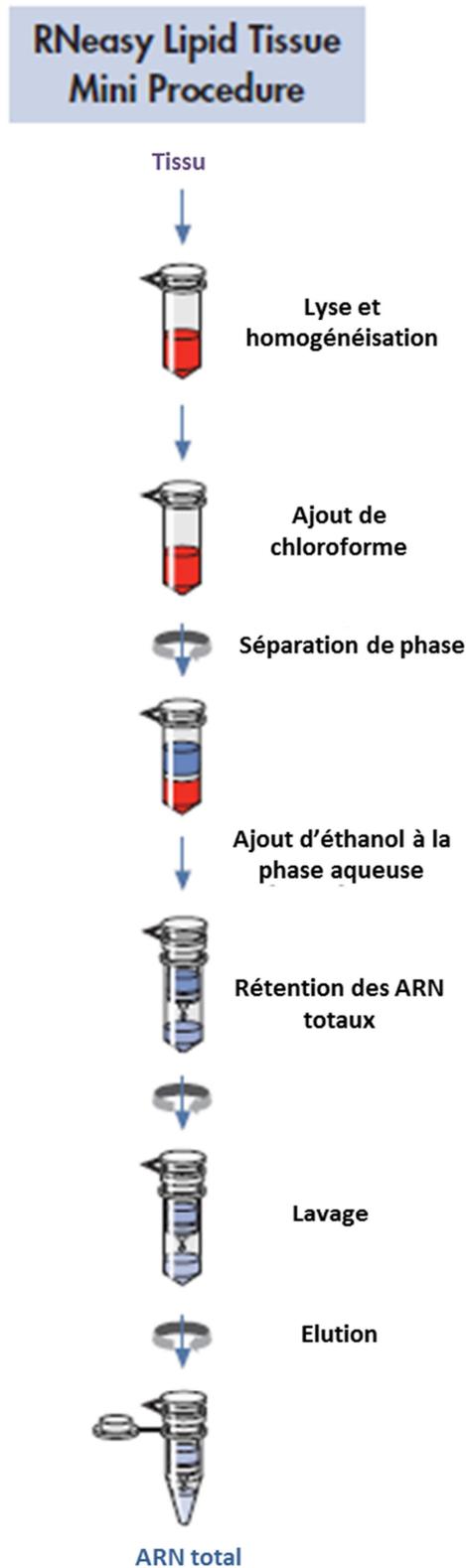
- 350 Open Access Journals
- 30,000 editorial team
- 21 days rapid review process
- Quality and quick editorial, review and publication processing
- Indexing at Pubmed (partial), Scopus, EBSCO, Index Copernicus and Google Scholar etc
- Sharing Option: Social Networking Enabled
- Authors, Reviewers and Editors rewarded with online Scientific Credits
- Better discount for your subsequent articles

Submit your manuscript at: <http://www.omicsonline.org/submission>



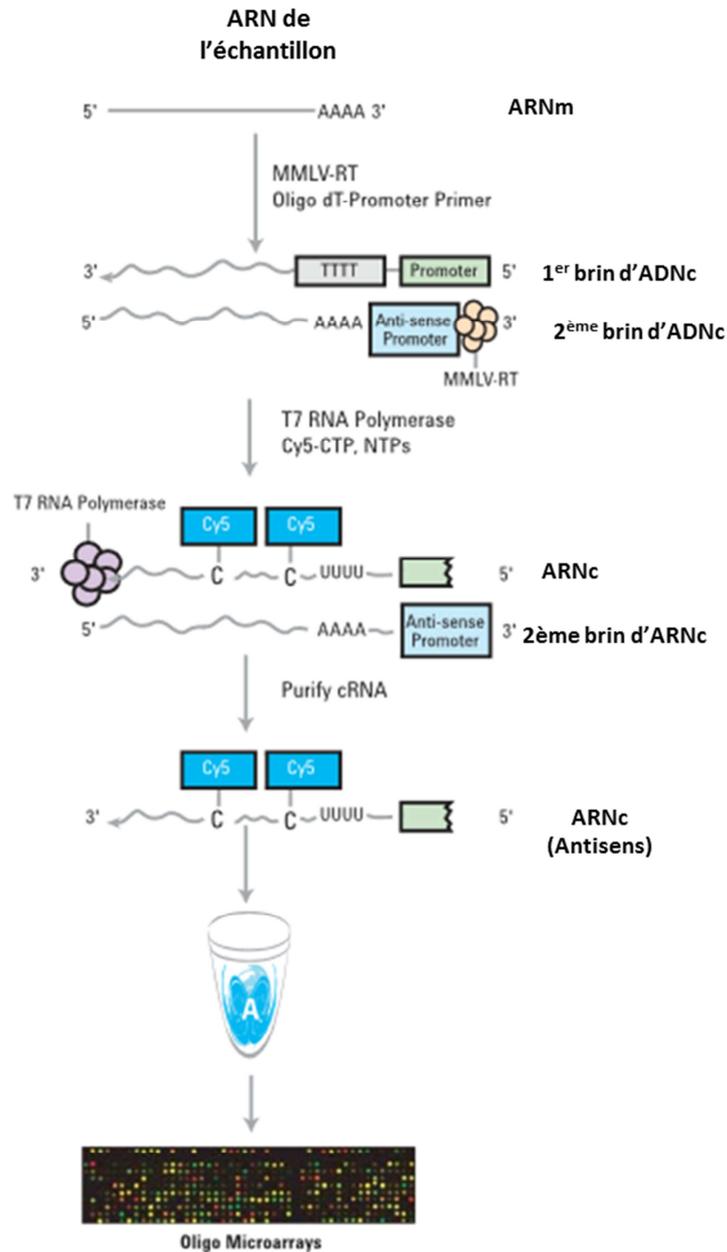
Annexe 3 :

Protocole simplifié d'extraction des ARN avec le RNeasy lipid Tissue Mini Kit.



Annexe 4 :

Procédure simplifiée de production et d'amplification d'ARNc marqué (kit Agilent RNA 6000 Nano Assay protocol).



Annexe 5 :

Abréviations des tableaux 5 et 6 :

ACTA1 : Actine Alpha 1

ACTC1 : Actine Alpha Cardiaque muscle 1

ACTN2 : Actinin Alpha 2

ADRA2B : Adrèboreceptor Alpha 2B

AKAP1 : A-Kinase Anchor Protein1

AMH : Anti-Mullarian Hormon

BLM : Bloom syndrome, RecQ helicase-like

BMP15 : Bone Morphogenic Protein 15

BMPR2: Bone Morphogenic Protein Receptor 2

CCK:Cholecystokinin

CDK5R1 : Cyclin-Dependant Kinase 5 Regulatory subunit 1

CXCL12: C-X-C motif Chemokine Ligand 12

DBH: Dopamine Beta Hydroxylase

DCT : Dopachrome Tautomerase

DRD1: Dopamine Receptor D1

FANCE: Franconi Anemia Protein

FFAR1 : Free Fatty Acide Receptor1

FLT1 : FMS related Tyrosine kinase 1

GALP : Galanin Like Peptide

GRH : GrainyHead Protein

GHRHR : Growth Hormone Releasing Hormone Receptor

IL17 : Interleukine 17

IL1B : Interleukine 1B

INHA : Inhibin Alpha

ITGB1: Integrin Beta 1

LINGO1: Leucin Rich repeat and Ig Domain containing 1

MYH3: Myosin Heavy chain 3

NODAL: Nodal growth differentiation factor

NTRK2: Neurotrophic Tyrosine Kinase Receptor type 2

OPRD1: Opoide Receptor Delta1

P2RY2Purinergic Receptor P2Y

PNMT: Phenylethanolamine N-Methyl Transferase

PTPN7: Protein Tyrosine Phosphatase Non-receptor 7

RASGRF1: Ras protein-Specific Guanine nucleotide-Releasing Factor 1

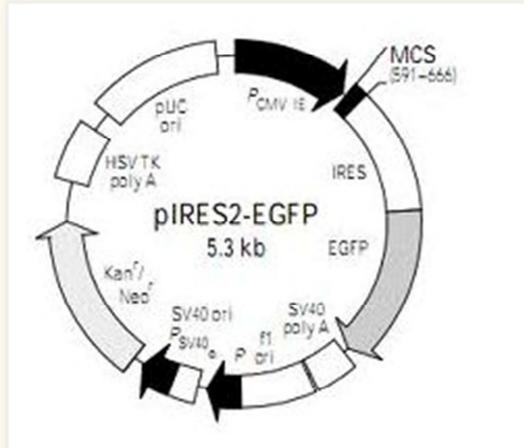
RECQL4: RecQ Protein Like 4

RIPK2: Receptor Interacting Serine -Threonine Kinase 2

RXFP4: Relaxin/insulin like Family Peptide receptor 4

TCF7L2: Transcription Factor 7 Like 2

TRPV4: Transient Receptor Potential cation channel subfamily V member 4

Annexe 6 :*Plasmide pIRES2 EGFP.***pIRES2-EGFP**

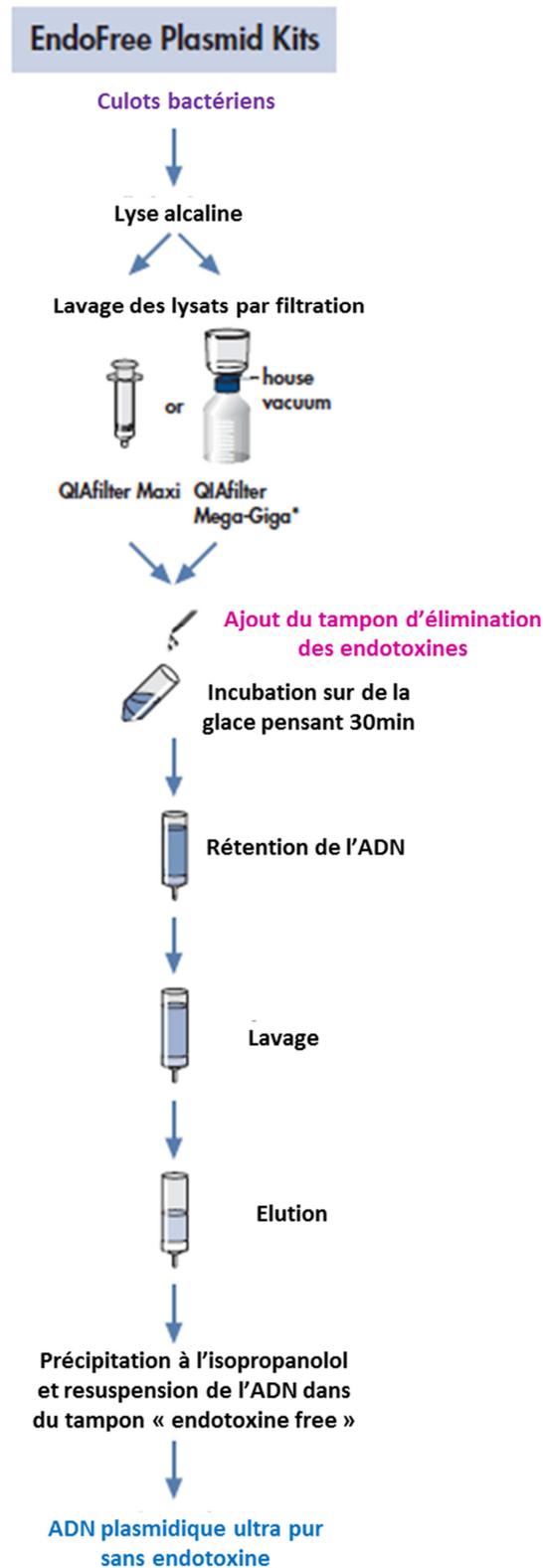
pIRES2-EGFP contains the internal ribosome entry site (IRES; 1, 2) of the encephalomyocarditis virus (ECMV) between the MCS and the enhanced green fluorescent protein (EGFP) coding region. This permits both the gene of interest (cloned into the MCS) and the EGFP gene to be translated from a single bicistronic mRNA. pIRES2-EGFP is designed for the efficient selection (by flow cytometry or other methods) of

transiently transfected mammalian cells expressing EGFP and the protein of interest. This vector can also be used to express EGFP alone or to obtain stably transfected cell lines without time-consuming drug and clonal selection. EGFP is a red-shifted variant of wild-type GFP (3–5) which has been optimized for brighter fluorescence and higher expression in mammalian cells. The MCS in pIRES2-EGFP is between the immediate early promoter of cytomegalovirus (PCMV IE) and the IRES sequence. SV40 polyadenylation signals downstream of the EGFP gene direct proper processing of the 3' end of the bicistronic mRNA. The vector backbone also contains an SV40 origin for replication in mammalian cells expressing the SV40 T antigen. A neomycin-resistance cassette (Neor), consisting of the SV40 early promoter, the neomycin/kanamycin resistance gene of Tn5, and polyadenylation signals from the herpes simplex virus thymidine kinase (HSV TK) gene, allows stably transfected eukaryotic cells to be selected using G418. A bacterial promoter upstream of this cassette expresses kanamycin resistance in *E. coli*. The pIRES2-EGFP backbone also provides a pUC origin of replication for propagation in *E. coli* and an f1 origin for single-stranded DNA production.

pIRES2-EGFP replaces (but is not derived from) the pIRES-EGFP Vector previously sold by BD Biosciences Clontech. pIRES2-EGFP is functionally similarly to pIRES-EGFP; however, pIRES2-EGFP gives brighter EGFP fluorescence than the older vector.

Annexe 7 :

Protocole simplifié d'utilisation de l'Endofree Maxi Kit (Qiagen).



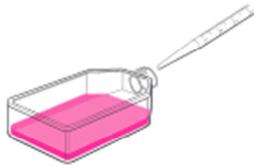
Annexe 8 :

Protocole simplifié de transfection avec l'appareil NUCLEOFECTOR II™AMAXA (Lonza).

Nucleofection™: Manipulation Simple – Protocoles Optimisés

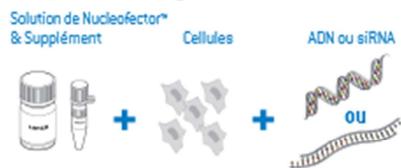
Etape 1

Récolter les cellules d'intérêt.



Etape 2

Compléter & mélanger avec:



Transférer dans une cuvette certifiée Lonza.



Etape 3

Sélectionner le Program Nucleofector™. Insérer la cuvette. Presser le bouton démarrer "X".



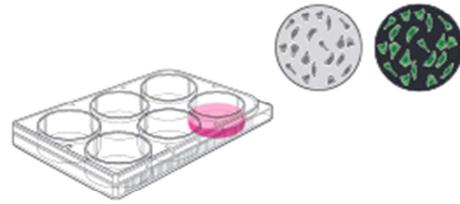
Etape 4

Rincer la cuvette avec du milieu de culture.



Etape 5

Transférer dans une boîte de culture. L'expression est détectée dans les 3 à 8 heures.



www.lonza.com/research

Annexe 9 :

Composition de la solution de travail pour le test du FRAP.

Tampon acétate de sodium 300 mM : Conservation 2 mois

- $C_2H_3NaO_2$ 3.1g
- Acide acétique glacial 16 ml
- H_2O 800 ml
- Ajuster à pH = 3.6
- H_2O qsp 1000 ml

TPTZ (2,4,6 Tripyridyl-S-Triazine) 8 mM : Conservation 1 mois

- TPTZ 249.6 mg
- HCl 36 % : 308 μ l ou HCl 37 % : 300 μ l
- H_2O 100 ml

$FeCl_3$, 20 mM : Conservation 1 mois

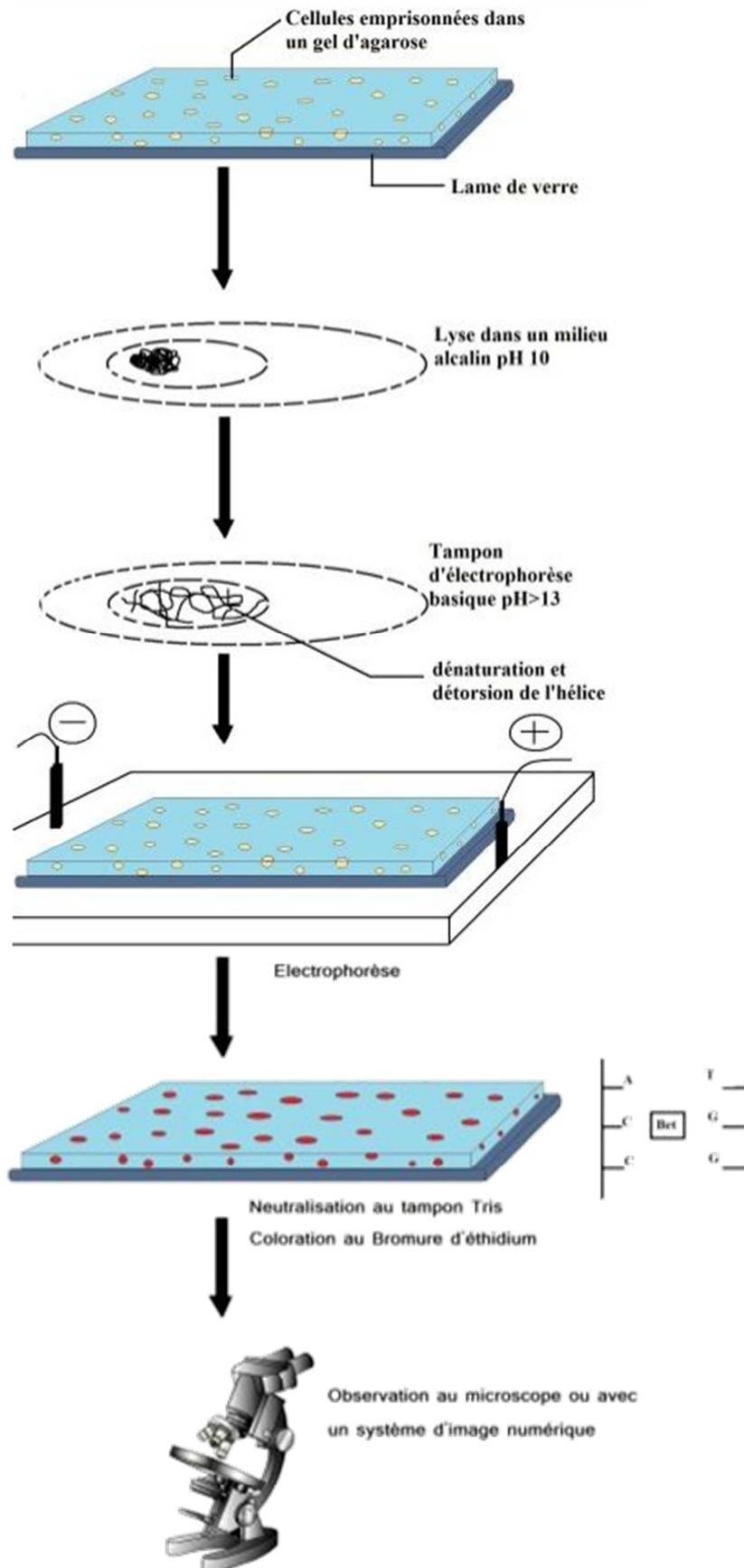
- $FeCl_3$, 540 mg
- H_2O qsp 100 ml

Solution de travail à préparer extemporanément :

- 25 ml Tampon acétate pH 3.6
- 2.5 ml Solution TPTZ
- 2.5 ml $FeCl_3$ 20 mM

Annexe 10 :

Principe de la technique SCGE.



REFERENCES

REFERENCES

I) INDEX DES SITES INTERNET

- [1] Ministère de l'économie, du développement durable et de l'énergie (2004) : *Radioprotection, contexte et enjeu*. Disponible sur: <<http://www.installationsclassees.developpement-durable.gouv.fr/2-Contexte-et-enjeu.html>>
[Consulté le 14 novembre 2013]
- [2] Institut de Radioprotection et de Sureté Nucléaire (2011) : *Origine de la radioactivité ; la radioactivité naturelle et artificielle en France*. Disponible sur : <<http://www.irsn.fr/FR/connaissances/Environnement/radioactivite-environnement/sources-radioactivite>>
[Consulté le 22 novembre 2013]
- [3] United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation (2006): *Report to the general assembly*. Disponible sur: <<http://www.unscear.org/docs/reports/gareport.pdf>>
[Consulté le 08 septembre 2013]
- [4] Institut de Radioprotection et de Sureté Nucléaire (2011): *Les accidents dus aux rayonnements ionisants : le bilan d'un demi-siècle*. Disponible sur : <http://www.irsn.fr/FR/Larecherche/publications-documentation/collection-ouvrages-IRSN/Documents/IRSN_reference_les_accidents_dus_aux_rayonnements_ionisants.pdf>
[Consulté le 18 janvier 2012]
- [5] Department of defense of the United States of America: (2006): *Historical office of the secretary of defense*. Disponible sur: <<http://history.defense.gov/cheney.shtml>>
[Consulté le 12 février 2014]
- [6] International Atomic Energy Agency (2011): *Emergency preparedness and response*. Disponible sur : <http://www-pub.iaea.org/MTCD/publications/PDF/EPR-Biodosimetry%202011_web.pdf>
[Consulté le 14 novembre 2013]
- [7] International Atomic Energy Agency (2009): *The radiological accident in Nueva Aldea*. Disponible sur: <http://www-pub.iaea.org/MTCD/publications/PDF/Pub1389_web.pdf>
[Consulté le 23 septembre 2011]

- [8] Etablissement Français du Sang (2008): *La première greffe de sang de cordon à 20ans*. Disponible sur: <<http://www.dondusang.net/rewrite/article/3785/about-us/espace-presse/dossiers-de-presse/la-premiere-greffe-de-sang-de-cordon-a-20-ans.htm>> [Consulté le 7 juin 2014]
- [9] RCSB, Protein Data Bank (2003) : *Crystal structure of ShhN*. Disponible sur: <<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=3M1N>> [Consulté le 10 Mai 2011]
- [10] QIAGEN support (2009): *RNeasy Lipid Tissue Mini kit Handbook*. Disponible sur: <<http://www.qiagen.com/resources/resourcedetail?id=bcff828a-b4f0-4de0-9cc5-36331a5dc95f&lang=en>> [Consulté le 27 janvier 2012]
- [11] Agilent (2004): *kit Agilent RNA 6000 Nano Assay protocol*. Disponible sur : <<http://grf.lshhtm.ac.uk/RNA6000protocol.pdf>> [Consulté le 04 mars 2013]
- [12] Agilent (2008): *Manual user, kit Quick Amp Labelling One color*. Disponible sur: <http://www.chem.agilent.com/library/usermanuals/Public/G4140-90041_One-Color_Tecan.pdf> [Consulté le 04 mars 2013]
- [13] QIAGEN support (2010): *RNeasy Mini kit handbook*. Disponible sur: <http://www.genome.duke.edu/cores/microarray/services/rna-qc/documents/RNeasy_Mini_Handbook.pdf> [Consulté le 29 janvier 2012]
- [14] University of California, Santa Cruz (2011): *Genome browser assembly version sus scrofa 10.2*. Disponible sur: <<http://genome.ucsc.edu/goldenPath/newsarch.html>> [Consulté le 11 mars 2014]
- [15] Qiagen support (2003): *EndoFree Plasmid Maxi Kit handbook*. Disponible sur: <http://stanxterm.aecom.yu.edu/wiki/data/Product_manuals_attach/qiagenmidimaxi.pdf> [Consulté le 22 juin 2011]
- [16] Lonza; Protocols (2009): *NUCLEOFACTOR II™AMAXA®*. Disponible sur : <https://www.lonzabio.com/fileadmin/groups/marketing/Downloads/Protocols/Generated/Optimized_Protocol_90.pdf> [Consulté le 05 juillet 2011]

- [17] Thermo Fischer Scientific Incorporation (2002): *Pierce™ BCA protein assay kit protocol*. Disponible sur: <<https://www.piercenet.com/instructions/2161296.pdf>>
[Consulté le 08 juillet 2011]
- [18] Randox laboratories (2010): *Ransel Glutathion preoxydase kit protocol*. Disponible sur: <http://www.tokyofuturestyle.com/pdf/randox_RANSEL.pdf>
[Consulté le 17 mai 2013]
- [19] Perspective instrument (2011): *Comet Assay IV*. Disponible sur: <<http://www.perceptive.co.uk/cometassay/fr>>
[Consulté le 06 avril 2013]
- [20] Industrial Toxicology Research Center India (2012): *Comet Assay*. Disponible sur: <<http://www.cometassayindia.org/definitions.htm>>
[Consulté le 07 avril 2013]
- [21] ImmunoChemistry Technologies (2012): *Kit FAM-FLICA apoptosis protocol*. Disponible sur: <<http://www.immunochemistry.com/sites/default/files/FAM%20FLICA%20caspase%20detection%20assay%20kit%20manual.pdf>>
[Consulté le 04 mai 2012]
- [22] Cell Signaling Technology (2010): *Senescence β -galactosidase Staining Kit protocol*. Disponible sur: <<http://media.cellsignal.com/pdf/9860.pdf>>
[Consulté le 10 mai 2012]
- [23] Eurogentec (2008): *Reverse Transcription Core Kit*. Disponible sur : <<https://www.anaspec.com/servePdf.asp?f=RT-RTCK-03.pdf&t=datasheet>>
[Consulté le 17 mars 2011]
- [24] Basic Local Alignment Search Tour (1990): *Standart nucleotide BLAST*. Disponible sur: < http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome>
[Consulté le 30 janvier 2012]

II) REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aasen T., Raya A., Barrero M.J., Garreta E., Consiglio A., Gonzalez F., *et al.* **2008**. Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat Biotechnol*, 26, 1276-84.
- Agay D., Scherthan H., Forcheron F., Grenier N., Herodin F., Meineke V. & Drouet, M. **2010**. Multipotent mesenchymal stem cell grafting to treat cutaneous radiation syndrome: development of a new minipig model. *Exp Hematol*, 38, 945-56.
- Alexakhin R.M., Sanzharova, N.I., Fesenko S.V., Spiridonov S.I. & Panov A.V. **2007**. Chernobyl radionuclide distribution, migration, and environmental and agricultural impacts. *Health Phys*, 93, 418-26.
- Alberts B; Johnson A; Lewis J; Raff M; Roberts K; Walter P., **2007**. Mécanismes de la division cellulaire. In: *Biologie moléculaire de la cellule*. 4ème ed. Paris: Flammarion, M-S.
- Alt E.U., Senst C., Murthy S.N., Slakey D.P., Dupin C.L., Chaffin, A.E., *et al.* **2012**. Aging alters tissue resident mesenchymal stem cell properties. *Stem Cell Res*, 8, 215-25.
- Aluigi M., Fogli M., Curti A., Isidori A., Gruppioni E., Chiodoni C., *et al.* **2006**. Nucleofection is an efficient nonviral transfection technique for human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 24, 454-61.
- Ame-Thomas P., Maby-El Hajjami H., Monvoisin C., Jean R., Monnier D., Caulet-Maugendre S., *et al.* **2007**. Human mesenchymal stem cells isolated from bone marrow and lymphoid organs support tumor B-cell growth: role of stromal cells in follicular lymphoma pathogenesis. *Blood*, 109, 693-702.
- Angoulvant D., Ivanes F., Ferrera R., Matthews P.G., Nataf S. & Ovize, M. **2011**. Mesenchymal stem cell conditioned media attenuates in vitro and ex vivo myocardial reperfusion injury. *J Heart Lung Transplant*, 30, 95-102.
- Apaolaza P.S., Delgado D., Del Pozo-Rodriguez A., Gascon A.R. & Solinis, M.A. **2014**. A novel gene therapy vector based on hyaluronic acid and solid lipid nanoparticles for ocular diseases. *Int J Pharm*, 465, 413-26.
- Archambeau J.O. **1989**. Swine skin: a model to evaluate dose recovery from different radiations. *Basic Life Sci*, 50, 9-20.
- Archambeau J.O., Pezner R. & Wasserman T. **1995**. Pathophysiology of irradiated skin and breast. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 31, 1171-85.
- Augello A., Kurth T.B. & De Bari, C. **2010**. Mesenchymal stem cells: a perspective from in vitro cultures to in vivo migration and niches. *Eur Cell Mater*, 20, 121-33.
- Azzam E.I., Jay-Gerin J.P. & Pain D. **2012**. Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. *Cancer Lett*, 327, 48-60.

- Bambakidis N.C. & Onwuzulike K. 2012.** Sonic Hedgehog signaling and potential therapeutic indications. *Vitam Horm*, 88, 379-94.
- Banerjee S. Dowsett M. Ashworth A. & Martin L.A. **2007.** Mechanisms of disease: angiogenesis and the management of breast cancer. *Nat Clin Pract Oncol*, 4, 536-50.
- Barrientos S., Stojadinovic O., Golinko M.S., Brem H. & Tomic-Canic M. **2008.** Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen*, 16, 585-601.
- Basdevant J. **2011.** *Maitriser le nucléaire: que sait-on et que peut-on faire après Fukushima*, Editions Eyrolles.
- Baskar R., Balajee A.S. & Geard C.R. **2007.** Effects of low and high LET radiations on bystander human lung fibroblast cell survival. *Int J Radiat Biol*, 83, 551-9.
- Baskar R. **2010.** Emerging role of radiation induced bystander effects: Cell communications and carcinogenesis. *Genome Integr*, 1, 13.
- Benson R.A., Lowrey J.A., Lamb J.R. & Howie S.E. **2004.** The Notch and Sonic hedgehog signalling pathways in immunity. *Mol Immunol*, 41, 715-25.
- Benzie I.F. & Strain J.J. **1996.** The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem*, 239, 70-6.
- Bernardo M.E., Zaffaroni N., Novara F., Cometa A.M. Avanzini, M.A. *et al.* **2007.** Human bone marrow derived mesenchymal stem cells do not undergo transformation after long-term in vitro culture and do not exhibit telomere maintenance mechanisms. *Cancer Res*, 67, 9142-9.
- Bernardo M.E., Locatelli F. & Fibbe W.E. **2009.** Mesenchymal stromal cells. *Ann N Y Acad Sci*, 1176, 101-17.
- Bertin M. **1994.** *Les effets biologiques des rayonnements ionisants*. 4ème ed. Paris: Electricité de France.
- Bey E., Duhamel P., Lataillade J.J., De Revel T., Carsin H. & Gourmelon P. **2007.** Treatment of radiation burns with surgery and cell therapy. A report of two cases. *Bull Acad Natl Med*, 191, 971-8; discussion 979.
- Bey E., Prat M., Duhamel P., Benderitter M., Brachet M., Trompier F., *et al.* **2010.** Emerging therapy for improving wound repair of severe radiation burns using local bone marrow-derived stem cell administrations. *Wound Repair Regen*, 18, 50-8.
- Bey E., Doucet C., Duhamel P., Brachet M., Prat M., Barges L., *et al.* **2010.** Radiation burn "innovating therapeutic approach". *Ann Chir Plast Esthet*, 55, 354-62.
- Bhang S.H., Lee S., Shin J.Y., Lee T.J., Jang H.K. & Kim B.S. **2014.** Efficacious and Clinically Relevant Conditioned-medium of Human Adipose-derived Stem Cells for Therapeutic Angiogenesis. *Mol Ther*.

- Bhardwaj G., Murdoch B., Wu D., Baker D.P., Williams K.P., Chadwick K., *et al.* **2001**. Sonic hedgehog induces the proliferation of primitive human hematopoietic cells via BMP regulation. *Nat Immunol*, 2, 172-80.
- Bianco P., Robey P.G. & Simmons P.J. **2008**. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell*, 2, 313-9.
- Bibber B., Sinha G., Lobba A.R., Greco S.J. & Rameshwar P. **2013**. A Review of Stem Cell Translation and Potential Confounds by Cancer Stem Cells. *Stem Cells Int*, 2013, 241048.
- Bieback K., Hecker, A., Kocaomer A., Lannert H., Schallmoser K., Strunk D. & Kluter H. **2009**. Human alternatives to fetal bovine serum for the expansion of mesenchymal stromal cells from bone marrow. *Stem Cells*, 27, 2331-41.
- Bigelow R.L., Chari N.S., Uden A.B., Spurgers K.B., Lee S., Roop D.R., *et al.* **2004**. Transcriptional regulation of bcl-2 mediated by the sonic hedgehog signaling pathway through gli-1. *J Biol Chem*, 279, 1197-205.
- Binet R. **2011**. *Identification et Caractérisation d'un Nouveau Marqueur de la Sénescence Cellulaire : la Protéine WNT16B*. Thèse de Doctorat: Biologie cellulaire: Grenoble, Université Joseph Fourier.
- Black J, Waeber B, Bresnahan MR, Gavras I, Gavras H. **1981**. Blood pressure response to central and/or peripheral inhibition of phenylethanolamine N-methyltransferase in normotensive and hypertensive rats. *Circ Res*. Aug;49(2):518-24
- Blyth B.J. & Sykes P.J. **2011**. Radiation-induced bystander effects: what are they, and how relevant are they to human radiation exposures? *Radiat Res*, 176, 139-57.
- Bochev I., Elmadjian G., Kyurkchiev D., Tzvetanov L., Altankova I., Tivchev P. & Kyurkchiev, S. **2008**. Mesenchymal stem cells from human bone marrow or adipose tissue differently modulate mitogen-stimulated B-cell immunoglobulin production in vitro. *Cell Biol Int*, 32, 384-93.
- Bolus N.E. **2001**. Basic review of radiation biology and terminology. *J Nucl Med Technol*, 29, 67-73; test 76-7.
- Bonche P. **2012**. *Le nucléaire expliqué par les physiciens*. 3^{ème} ed. Les ulis : EDP Sciences.
- Bourin P., Bunnell B.A., Casteilla L., Dominici M., Katz A.J., March K.L. *et al.* **2013**. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytotherapy*, 15, 641-8.
- Boxall S.A. & Jones, E. **2012**. Markers for characterization of bone marrow multipotential stromal cells. *Stem Cells Int*, 2012, 975871.
- Braverman I.M. **2000**. The cutaneous microcirculation. *J Investig Dermatol Symp Proc*, 5, 3-9.

- Bruggeman S.W., Valk-Lingbeek M.E., Van Der Stoop P.P., Jacobs J.J., Kieboom K., Tanger E., *et al.* **2005**. Ink4a and Arf differentially affect cell proliferation and neural stem cell self-renewal in Bmi1-deficient mice. *Genes Dev*, 19, 1438-43.
- Burglin T.R. **2008**. The Hedgehog protein family. *Genome Biol*, 9, 241.
- Cadet J., Delatour T., Douki T., Gasparutto D., Pouget J.P., Ravanat J.L. & Sauvaigo S. **1999**. Hydroxyl radicals and DNA base damage. *Mutat Res*, 424, 9-21.
- Campisi J. & D'adda Di Fagagna F. **2007**. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8, 729-40.
- Capdevila J. & Johnson R.L. **2000**. Hedgehog signaling in vertebrate and invertebrate limb patterning. *Cell Mol Life Sci*, 57, 1682-94.
- Caplan A.I. **1991**. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*, 9, 641-50.
- Caplan A.I. & Dennis J.E. **2006**. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem*, 98, 1076-84.
- Caplan A.I. **2009**. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. *J Pathol*, 217, 318-24.
- Carracedo J., Buendia P., Merino A., Madueno J.A., Peralbo E., Ortiz A., *et al.* **2012**. Klotho modulates the stress response in human senescent endothelial cells. *Mech Ageing Dev*, 133, 647-54.
- Castedo, M., Perfettini, J.L., Roumier, T., Andreau, K., Medema, R. & Kroemer, G. **2004**. Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene*, 23, 2825-37.
- Casteilla L., Planat-Bénard V, Cousin B, Laharrague P, Bourin P. **2010**. Vascular And Endothelial Regeneration. *Curr Stem cell Res Ther*, 23, 141-44.
- Cavallo J.D., Dorandeu F., Laroche P., Vidal D. **2010**. Les risques nucléaires et radiologiques. In :*Les risques NRBC-e; savoir pour agir*. 2nd ed. Montrouge : Xavier Montauban. Pp. 23-55.
- Ceafalan L., Gherghiceanu M., Popescu L.M. & Simionescu O. **2012**. Telocytes in human skin--are they involved in skin regeneration? *J Cell Mol Med*, 16, 1405-20.
- Cerqueira M.T., Pirraco R.P., Santos T.C., Rodrigues D.B., Frias A.M., Martins A.R., *et al.* **2013**. Human adipose stem cells cell sheet constructs impact epidermal morphogenesis in full-thickness excisional wounds. *Biomacromolecules*, 14, 3997-4008.
- Chamberlain G., Fox J., Ashton,B. & Middleton J. **2007**. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells*, 25, 2739-49.

- Chang H., Li Q., Moraes R.C., Lewis M.T. & Hamel P.A. **2010**. Activation of Erk by sonic hedgehog independent of canonical hedgehog signalling. *Int J Biochem Cell Biol*, 42, 1462-71.
- Chavez-Munoz C., Nguyen K.T., Xu W., Hong S.J., Mustoe T.A. & Galiano R.D. **2013**. Transdifferentiation of adipose-derived stem cells into keratinocyte-like cells: engineering a stratified epidermis. *PLoS One*, 8, e80587.
- Chen J., Patschan S. & Goligorsky M.S. **2008**. Stress-induced premature senescence of endothelial cells. *J Nephrol*, 21, 337-44.
- Chen J.S., Wong V.W. & Gurtner G.C. **2012**. Therapeutic potential of bone marrow-derived mesenchymal stem cells for cutaneous wound healing. *Front Immunol*, 3, 192.
- Chen L., Tredget E.E., Wu P.Y. & Wu Y. **2008**. Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. *PLoS One*, 3, e1886.
- Chen L., Tredget E.E., Liu C. & Wu Y. **2009**. Analysis of allogenicity of mesenchymal stem cells in engraftment and wound healing in mice. *PLoS One*, 4, e7119.
- Chen L.B., Jiang X.B. & Yang L. **2004**. Differentiation of rat marrow mesenchymal stem cells into pancreatic islet beta-cells. *World J Gastroenterol*, 10, 3016-20.
- Chen Y. & Jiang J. **2013**. Decoding the phosphorylation code in Hedgehog signal transduction. *Cell Res*, 23, 186-200.
- Chen Y.J., Lin C.P., Hsu M.L., Shieh H.R., Chao N.K. & Chao K.S. **2011**. Sonic hedgehog signaling protects human hepatocellular carcinoma cells against ionizing radiation in an autocrine manner. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 80, 851-9.
- Chuong C.M., Patel N., Lin J., Jung H.S. & Widelitz R.B. **2000**. Sonic hedgehog signaling pathway in vertebrate epithelial appendage morphogenesis: perspectives in development and evolution. *Cell Mol Life Sci*, 57, 1672-81.
- Cianfarani F., Toietta G., Di Rocco G., Cesareo E., Zambruno G. & Odorisio, T. **2013**. Diabetes impairs adipose tissue-derived stem cell function and efficiency in promoting wound healing. *Wound Repair Regen*, 21, 545-53.
- Cmielova J., Havelek R., Jiroutova A., Kohlerova R., Seifrtova M., Muthna D., et al. **2011**. DNA damage caused by ionizing radiation in embryonic diploid fibroblasts WI-38 induces both apoptosis and senescence. *Physiol Res*, 60, 667-77.
- Coupland R.E., Tomlinson A., Crowe J. & Brindley, D.N. **1984**. Effects of hypophysectomy and metyrapone on the catecholamine content and volumes of adrenaline- and noradrenaline-storing cells in the rat adrenal medulla. *J Endocrinol*, 101, 345-52.
- Cui L., Yin, S., Liu W., Li N., Zhang W. & Cao Y. **2007**. Expanded adipose-derived stem cells suppress mixed lymphocyte reaction by secretion of prostaglandin E2. *Tissue Eng*, 13, 1185-95.

- Da Silva Meirelles L., Chagastelles P.C. & Nardi N.B. 2006.** Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci*, 119, 2204-13.
- Dai R.L., Zhu S.Y., Xia Y.P., Mao L., Mei Y.W., Yao Y.F., *et al.* **2011.** Sonic hedgehog protects cortical neurons against oxidative stress. *Neurochem Res*, 36, 67-75.
- Dariolli R., Bassaneze V., Nakamuta J.S., Omae S.V., Campos L.C. & Krieger J.E. **2013.** Porcine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells retain their proliferative characteristics, senescence, karyotype and plasticity after long-term cryopreservation. *PLoS One*, 8, e67939.
- Darnell J.E., Kerr I.M. & Stark G.R. **1994.** Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science*, 264, 1415-21.
- De Girolamo L., Lopa S., Arrigoni E., Sartori M.F., Baruffaldi Preis F.W. & Brini A.T. **2009.** Human adipose-derived stem cells isolated from young and elderly women: their differentiation potential and scaffold interaction during in vitro osteoblastic differentiation. *Cytotherapy*, 11, 793-803.
- De Girolamo L., Stanco D., Salvatori L., Coroniti G., Arrigoni E., Silecchia G., *et al.* **2013.** Stemness and osteogenic and adipogenic potential are differently impaired in subcutaneous and visceral adipose derived stem cells (ASCs) isolated from obese donors. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 26, 11-21.
- De Rosa A., De Francesco F., Tirino V., Ferraro G.A., Desiderio V., Paino F., *et al.* **2009.** A new method for cryopreserving adipose-derived stem cells: an attractive and suitable large-scale and long-term cell banking technology. *Tissue Eng Part C Methods*, 15, 659-67.
- De Toni F., Poglio S., Youcef A.B., Cousin B., Pflumio F., Bourin P., Casteilla L. & Laharrague P. **2011.** Human adipose-derived stromal cells efficiently support hematopoiesis in vitro and in vivo: a key step for therapeutic studies. *Stem Cells Dev*, 20, 2127-38.
- De Ugarte D.A., Alfonso Z., Zuk P.A., Elbarbary A., Zhu M., Ashjian P., *et al.* **2003.** Differential expression of stem cell mobilization-associated molecules on multi-lineage cells from adipose tissue and bone marrow. *Immunol Lett*, 89, 267-70.
- De Ugarte D.A., Morizono K., Elbarbary A., Alfonso Z., Zuk P.A., Zhu M., *et al.* **2003.** Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs*, 174, 101-9.
- Deitch E.A. **2001.** Role of the gut lymphatic system in multiple organ failure. *Curr Opin Crit Care*, 7, 92-8.
- Delanian L. & Lefaix J.L. **2005.** Le syndrome cutané radio-induit. In: De Revel T., Gourmelon P., Vidal D., Renaudeau C. (eds) (2005) *Menace terroriste, Approche médicale*. Montrouge : John Libbey Eurotext. Pp. 87-96.

- Delattre J., Beaudueux J., Bonnefont-Rousselot D. **2007**. *Radicaux libres et stressoxydant; aspects biologiques et pathologiques*. 2nd ed. Londres : Tec&doc-Éd. médicales internationales.
- Derby B.M., Dai H., Reichensperger J., Cox L., Harrison C., Cosenza N., *et al.* **2014**. Adipose-derived stem cell to epithelial stem cell transdifferentiation: a mechanism to potentially improve understanding of fat grafting's impact on skin rejuvenation. *Aesthet Surg J*, 34, 142-53.
- Devireddy R., Thirumala S. & Gimble J.M. **2005**. Cellular response of adipose derived passage-4 adult stem cells to freezing stress. *J Biomech Eng*, 127, 1081-6.
- Devireddy R. & Thirumala S. **2011**. Preservation protocols for human adipose tissue-derived adult stem cells. *Methods Mol Biol*, 702, 369-94.
- Dezawa M., Ishikawa H., Itokazu Y., Yoshihara T., Hoshino M., Takeda S., *et al.* **2005**. Bone marrow stromal cells generate muscle cells and repair muscle degeneration. *Science*, 309, 314-7.
- Dhanasekaran M., Indumathi S., Poojitha R., Kanmani A., Rajkumar J.S. & Sudarsanam D. **2013**. Plasticity and banking potential of cultured adipose tissue derived mesenchymal stem cells. *Cell Tissue Bank*, 14, 303-15.
- Dierick J.F., Eliaers F., Remacle J., Raes M., Fey S.J., Larsen P.M. & Toussaint O. **2002**. Stress-induced premature senescence and replicative senescence are different phenotypes, proteomic evidence. *Biochem Pharmacol*, 64, 1011-7.
- Dimri G.P., Lee X., Basile G., Acosta M., Scott G., Roskelley C., *et al.* **1995**. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 9363-7.
- Direkze N.C., Forbes S.J., Brittan M., Hunt T., Jeffery R., Preston S.L., *et al.* **2003**. Multiple organ engraftment by bone-marrow-derived myofibroblasts and fibroblasts in bone-marrow-transplanted mice. *Stem Cells*, 21, 514-20.
- Djouad F., Ponce P., Bony C., Tropel P., Apparail, F., Sany J., *et al.* **2003**. Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood*, 102, 3837-44.
- Dohle E., Fuchs S., Kolbe M., Hofmann A., Schmidt H. & Kirkpatrick C.J. **2010**. Sonic hedgehog promotes angiogenesis and osteogenesis in a coculture system consisting of primary osteoblasts and outgrowth endothelial cells. *Tissue Eng Part A*, 16, 1235-7.
- Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., *et al.* **2006**. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8, 315-7.
- Donahue J.K. **2006**. Gene therapy, angiogenesis, Sonic Hedgehog: Sonic the Hedgehog to the rescue? *Gene Ther*, 13, 998-9.

- Dorn G.W., **2013**. Molecular mechanisms that differentiate apoptosis from programmed necrosis. *Toxicol Pathol*, 41, 227-34.
- Drouet M., Mathieu J., Grenier N., Multon E., Sotto J.J. & Herodin F. **1999**. The reduction of in vitro radiation-induced Fas-related apoptosis in CD34+ progenitor cells by SCF, FLT-3 ligand, TPO, and IL-3 in combination resulted in CD34+ cell proliferation and differentiation. *Stem Cells*, 17, 273-85.
- Drouet M. **2014**. Determining rational target for in vivo hedgehog gene therapy. *Exp Hematol*, 42, 159-60.
- Drouet M., Garrigou P., Peinnequin A. & Herodin F. **2014**. Short-term sonic-hedgehog gene therapy to mitigate myelosuppression in highly irradiated monkeys: hype or reality? *Bone Marrow Transplant*, 49, 304-9.
- Drouet M. & Herodin F. **2014**. Mitigating radiation-induced toxicity: an overview of new approaches developed at the French Military Biomedical Research Institute. *Health Phys*, 106, 682-8.
- E**aton S. **2008**. Multiple roles for lipids in the Hedgehog signalling pathway. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9, 437-45.
- Ebrahimian T.G., Pouzoulet F., Squiban C., Buard V., Andre M., Cousin B., *et al.* **2009**. Cell therapy based on adipose tissue-derived stromal cells promotes physiological and pathological wound healing. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 29, 503-10.
- Egana J.T., Fierro F.A., Kruger S., Bornhauser M., Huss R., Lavandero S. & Machens H.G. **2009**. Use of human mesenchymal cells to improve vascularization in a mouse model for scaffold-based dermal regeneration. *Tissue Eng Part A*, 15, 1191-200.
- Eminli S., Utikal J., Arnold K., Jaenisch R. & Hochedlinger K. **2008**. Reprogramming of neural progenitor cells into induced pluripotent stem cells in the absence of exogenous Sox2 expression. *Stem Cells*, 26, 2467-74.
- Erices A., Conget P. & Minguell J.J. **2000**. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol*, 109, 235-42.
- Estrada R., Li N., Sarojini H., An J., Lee M.J. & Wang E. **2009**. Secretome from mesenchymal stem cells induces angiogenesis via Cyr61. *J Cell Physiol*, 219, 563-71.
- F**an, C.W., Tuladhar, R. & Lum, L. **2013**. Signaling: Making a leaner Hedgehog. *Nat Chem Biol*, 9, 217-8.
- Fan W., Sun D., Liu J., Liang D., Wang Y., Narsinh K.H., *et al.* **2012**. Adipose stromal cells amplify angiogenic signaling via the VEGF/mTOR/Akt pathway in a murine hindlimb ischemia model: a 3D multimodality imaging study. *PLoS One*, 7, e45621.

- Fang Y.Z., Yang S. & Wu G. **2002**. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, 18, 872-9.
- Farini A., Villa C., Manescu A., Fiori F., Giuliani A., Razini P., *et al.* **2012**. Novel insight into stem cell trafficking in dystrophic muscles. *Int J Nanomedicine*, 7, 3059-67.
- Feng R., Xiao C. & Zavros Y. **2012**. The role of Sonic Hedgehog as a regulator of gastric function and differentiation. *Vitam Horm*, 88, 473-89.
- Favier A., Cadet J., Kalyanaraman B. **2014**. *Analysis of free radicals in biological systems*. 2nd ed. Basel, Boston: Birkhauser ed.
- Field J.R., Mcgee M., Stanley R., Ruthenbeck G., Papadimitrakis T., Zannettino A., *et al.* **2011**. The efficacy of allogeneic mesenchymal precursor cells for the repair of an ovine tibial segmental defect. *Vet Comp Orthop Traumatol*, 24, 113-21.
- Forcheron F., Agay D., Scherthan H., Riccobono D., Herodin F., Meineke V. & Drouet M. **2012**. Autologous adipocyte derived stem cells favour healing in a minipig model of cutaneous radiation syndrome. *PLoS One*, 7, e31694.
- Francois S., Bensidhoum M., Mouiseddine M., Mazurier C., Allenet B., Semont A., *et al.* **2006**. 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*, 24, 1020-9.
- Francois S., Mouiseddine M., Mathieu N., Semont A., Monti P., Dudoignon N., *et al.* **2007**. Human mesenchymal stem cells favour healing of the cutaneous radiation syndrome in a xenogenic transplant model. *Ann Hematol*, 86, 1-8.
- Fraser, J.K., Wulur I., Alfonso Z. & Hedrick M.H. **2006**. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends Biotechnol*, 24, 150-4.
- Friedenstein A.J., Gorskaja J.F. & Kulagina N.N. **1976**. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol*, 4, 267-74.
- Fu X., Fang L., Li X., Cheng B. & Sheng Z. **2006**. Enhanced wound-healing quality with bone marrow mesenchymal stem cells autografting after skin injury. *Wound Repair Regen*, 14, 325-35.
- Fuchs E. & Nowak J.A. **2008**. Building epithelial tissues from skin stem cells. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 73, 333-50.
- Fukino K., Suzuki T., Saito Y., Shindo T., Amaki T., Kurabayashi M. & Nagai R. **2002**. Regulation of angiogenesis by the aging suppressor gene klotho. *Biochem Biophys Res Commun*, 293, 332-7.
- G**ajendrareddy P.K., Engeland C.G., Junges R., Horan, M.P., Rojas I.G. & Marucha P.T. **2013**. MMP-8 overexpression and persistence of neutrophils relate to stress-impaired healing and poor collagen architecture in mice. *Brain Behav Immun*, 28, 44-8.

- Gao Z., Zhang Q., Han Y., Cheng X., Lu Y., Fan L. & Wu Z. **2012**. Mesenchymal stromal cell-conditioned medium prevents radiation-induced small intestine injury in mice. *Cytotherapy*, 14, 267-73.
- Garrigou P. **2011**. *Étude des effets des rayonnements ionisants sur la niche hématopoïétique et traitement du syndrome aigu d'irradiation par thérapie génique chez le macaque irradié à forte dose*. Thèse de Doctorat: Biologie: Grenoble, Université Joseph Fourier.
- Gates R.E., King L.E., Hanks S.K. & Nanney L.B. **1994**. Potential role for focal adhesion kinase in migrating and proliferating keratinocytes near epidermal wounds and in culture. *Cell Growth Differ*, 5, 891-9.
- Gehling U.M., Ergun S., Schumacher U., Wagener C., Pantel K., Otte M., *et al.* **2000**. In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. *Blood*, 95, 3106-12.
- Gerhardt H., Golding M., Fruttiger M., Ruhrberg C., Lundkvist A., Abramsson A., *et al.* **2003**. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J Cell Biol*, 161, 1163-77.
- Gimble J.M., & Guilak F. **2003**. Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Cytotherapy*, 5, 362-9.
- Gimble J.M., Katz, A.J. & Bunnell B.A. **2007**. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res*, 100, 1249-60.
- Gimble J.M., Grayson, W., Guilak F., Lopez, M.J. & Vunjak-Novakovic G. **2011**. Adipose tissue as a stem cell source for musculoskeletal regeneration. *Front Biosci (Schol Ed)*, 3, 69-81.
- Gnecchi M., Zhang Z., Ni A. & Dzau V.J. **2008**. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circ Res*, 103, 1204-19.
- Golstein P. & Kroemer G. **2007**. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem Sci*, 32, 37-43.
- Gronthos S., Franklin D.M., Leddy H.A., Robey P.G., Storms R.W. & Gimble J.M. **2001**. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *J Cell Physiol*, 189, 54-63.
- Gruber H.E., Somayaji S., Riley F., Hoelscher G.L., Norton H.J., Ingram J. & Hanley E.N., Jr. **2012**. Human adipose-derived mesenchymal stem cells: serial passaging, doubling time and cell senescence. *Biotech Histochem*, 87, 303-11.
- Gurtner G.C., Werner S., Barrandon Y. & Longaker M.T. **2008**. Wound repair and regeneration. *Nature*, 453, 314-21.
- Gutteridge J.M. **1993**. Free radicals in disease processes: a compilation of cause and consequence. *Free Radic Res Commun*, 19, 141-58.

- Haleng J., Pincemail J., Defraigne J.O., Charlier C. & Chapelle J.P. 2007.** Oxidative stress. *Rev Med Liege*, 62, 628-38.
- Hambardzumyan D., Squatrito M. & Holland E.C. **2006.** Radiation resistance and stem-like cells in brain tumors. *Cancer Cell*, 10, 454-6.
- Han W., Chen S., Yu K.N. & Wu L. **2010.** Nitric oxide mediated DNA double strand breaks induced in proliferating bystander cells after alpha-particle irradiation. *Mutat Res*, 684, 81-9.
- Hara E., Smith R., Parry D., Tahara H., Stone S. & Peters G. **1996.** Regulation of p16CDKN2 expression and its implications for cell immortalization and senescence. *Mol Cell Biol*, 16, 859-67.
- Hass R., Kasper C., Bohm S. & Jacobs R. **2011.** Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Commun Signal*, 9, 12.
- Hayflick L. & Moorhead P.S. **1961.** The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*, 25, 585-621.
- He Q.W., Xia Y.P., Chen S.C., Wang Y., Huang M., Huang Y., *et al.* **2013.** Astrocyte-derived sonic hedgehog contributes to angiogenesis in brain microvascular endothelial cells via RhoA/ROCK pathway after oxygen-glucose deprivation. *Mol Neurobiol*, 47, 976-87.
- Heath J.W., Wheeler P.R., Stevens A., Young B. & Validire-Charpy P. **2008.** *Atlas d'histologie fonctionnelle de Wheater*. 2nd ed. Bruxelles : De Boeck.
- Hei T.K., Zhou H., Chai Y., Ponnaiya B. & Ivanov V.N. **2011.** Radiation induced non-targeted response: mechanism and potential clinical implications. *Curr Mol Pharmacol*, 4, 96-105.
- Hengartner M.O. **2000.** The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407, 770-6.
- Henning R.J. **2013.** Stem cells for cardiac repair: problems and possibilities. *Future Cardiol*, 9, 875-84.
- Herbig U., Jobling W.A., Chen B.P., Chen D.J. & Sedivy J.M. **2004.** Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21(CIP1), but not p16(INK4a). *Mol Cell*, 14, 501-13.
- Hernigou P., Desroches, A., Queindec S., Flouzat Lachaniette C.H., Poignard A., Allain J., *et al.* **2014.** Morbidity of graft harvesting versus bone marrow aspiration in cell regenerative therapy. *Int Orthop*. Mar 23.
- Ho E., Karimi Galoughi K., Liu C.C., Bhindi R. & Figtree G.A. **2013.** Biological markers of oxidative stress: Applications to cardiovascular research and practice. *Redox Biol*, 1, 483-91.
- Hocking A.M. & Gibran N.S. **2010.** Mesenchymal stem cells: paracrine signaling and differentiation during cutaneous wound repair. *Exp Cell Res*, 316, 2213-9.

- Hodgkinson T. & Bayat A. **2011**. Dermal substitute-assisted healing: enhancing stem cell therapy with novel biomaterial design. *Arch Dermatol Res*, 303, 301-15.
- Hofmann I., Stover E.H., Cullen D.E., Mao J., Morgan K.J., Lee B.H., *et al.* **2009**. Hedgehog signaling is dispensable for adult murine hematopoietic stem cell function and hematopoiesis. *Cell Stem Cell*, 4, 559-67.
- Hong I.S., Lee H.Y. & Kang K.S. **2014**. Mesenchymal stem cells and cancer: Friends or enemies? *Mutat Res*. Feb 7.
- Hopewell J.W. **1990**. The skin: its structure and response to ionizing radiation. *Int J Radiat Biol*, 57, 751-73.
- Huang S.J., Fu R.H., Shyu W.C., Liu S.P., Jong G.P., Chiu Y.W., *et al.* **2013**. Adipose-derived stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Cell Transplant*, 22, 701-9.
- Huelsken J., Vogel R., Erdmann B., Cotsarelis G. & Birchmeier W. **2001**. beta-Catenin controls hair follicle morphogenesis and stem cell differentiation in the skin. *Cell*, 105, 533-45.
- I**gney F.H. & Krammer P.H. **2002**. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer*, 2, 277-88.
- Iivanainen E., Kahari V.M., Heino J. & Elenius K. **2003**. Endothelial cell-matrix interactions. *Microsc Res Tech*, 60, 13-22.
- Ikushima M., Rakugi H., Ishikawa K., Maekawa Y., Yamamoto K., Ohta J., Chihara Y., *et al.* **2006**. Anti-apoptotic and anti-senescence effects of Klotho on vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 339, 827-32.
- Iliakis G. 1997. Cell cycle regulation in irradiated and nonirradiated cells. *Semin Oncol*, 24, 602-15.
- In 'T Anker P.S., Noort W.A., Scherjon S.A., Kleijburg-Van Der Keur C., Kruisselbrink A.B., Van Bezooijen R.L., *et al.* **2003**. Mesenchymal stem cells in human second-trimester bone marrow, liver, lung, and spleen exhibit a similar immunophenotype but a heterogeneous multilineage differentiation potential. *Haematologica*, 88, 845-52.
- In 'T Anker P.S., Scherjon S.A., Kleijburg-Van Der Keur C., De Groot-Swings G.M., Claas F.H., Fibbe, W.E. & Kanhai H.H. **2004**. Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. *Stem Cells*, 22, 1338-45.
- Itahana K., Campisi J. & Dimri G.P. **2007**. Methods to detect biomarkers of cellular senescence: the senescence-associated beta-galactosidase assay. *Methods Mol Biol*, 371, 21-31.
- Ito H. **2011**. Chemokines in mesenchymal stem cell therapy for bone repair: a novel concept of recruiting mesenchymal stem cells and the possible cell sources. *Mod Rheumatol*, 21, 113-21.

- Ito M., Liu Y., Yang Z., Nguyen J., Liang F., Morris R.J. & Cotsarelis G. **2005**. Stem cells in the hair follicle bulge contribute to wound repair but not to homeostasis of the epidermis. *Nat Med*, 11, 1351-4.
- Ito M., Yang Z., Andl T., Cui C., Kim N., Millar S.E. & Cotsarelis G. **2007**. Wnt-dependent de novo hair follicle regeneration in adult mouse skin after wounding. *Nature*, 447, 316-20.
- Ivanova-Todorova E., Bochev I., Mourdjeva M., Dimitrov R., Bukarev D., Kyurkchiev S., et al. **2009**. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells are more potent suppressors of dendritic cells differentiation compared to bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Immunol Lett*, 126, 37-42.
- Ivanovic Z. **2009**. Hypoxia or in situ normoxia : stem cells paradigm. *J cell physiol*, 219(2), 271-5.
- Iyer R., Lehnert B.E. & Svensson R. **2000**. Factors underlying the cell growth-related bystander responses to alpha particles. *Cancer Res*, 60, 1290-8.
- Izadpanah R., Trygg C., Patel B., Kriedt C., Dufour J., Gimble J.M. & Bunnell B.A. **2006**. Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue. *J Cell Biochem*, 99, 1285-97.
- Izquierdo M.C., Perez-Gomez M.V., Sanchez-Nino M.D., Sanz A.B., Ruiz-Andres O., Poveda J., et al. **2012**. Klotho, phosphate and inflammation/ageing in chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant*, 27 Suppl 4, iv6-10.
- J**aasma M.J., Jackson W.M. & Keaveny T.M. **2006**. The effects of morphology, confluency, and phenotype on whole-cell mechanical behavior. *Ann Biomed Eng*, 34, 759-68.
- Jacobs J.J., Kieboom K., Marino S., Depinho R.A. & Van Lohuizen M. **1999**. The oncogene and Polycomb-group gene bmi-1 regulates cell proliferation and senescence through the ink4a locus. *Nature*, 397, 164-8.
- Jayarama Reddy V., Radhakrishnan S., Ravichandran R., Mukherjee S., Balamurugan R., Sundarrajan S. & Ramakrishna S. **2013**. Nanofibrous structured biomimetic strategies for skin tissue regeneration. *Wound Repair Regen*, 21, 1-16.
- Johnson G., Nour A.A., Nolan T., Huggett J. & Bustin S. **2014**. Minimum information necessary for quantitative real-time PCR experiments. *Methods Mol Biol*, 1160, 5-17.
- K**aiser H.W., Ness W., Jungblut I., Briggaman R.A., Kreysel H.W. & O'keefe E.J. **1993**. Adherens junctions: demonstration in human epidermis. *J Invest Dermatol*, 100, 180-5.
- Kaminski J.M., Shinohara E., Summers J.B., Niermann K.J., Morimoto A. & Brousal J. **2005**. The controversial abscopal effect. *Cancer Treat Rev*, 31, 159-72.

- Kang H.N., Oh S.C., Kim J.S. & Yoo Y.A. **2012**. Abrogation of Gli3 expression suppresses the growth of colon cancer cells via activation of p53. *Exp Cell Res*, 318, 539-49.
- Kapur S.K. & Katz A.J. **2013**. Review of the adipose derived stem cell secretome. *Biochimie*, 95, 2222-8.
- Karnoub A.E., Dash A.B., Vo A.P., Sullivan A., Brooks M.W., Bell G.W., *et al.* **2007**. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature*, 449, 557-63.
- Karp J.M. & Leng Teo G.S. **2009**. Mesenchymal stem cell homing: the devil is in the details. *Cell Stem Cell*, 4, 206-16.
- Kasper M., Regl G., Frischauf A.M. & Aberger F. **2006**. GLI transcription factors: mediators of oncogenic Hedgehog signalling. *Eur J Cancer*, 42, 437-45.
- Katoh Y. & Katoh M. **2009**. Hedgehog target genes: mechanisms of carcinogenesis induced by aberrant hedgehog signaling activation. *Curr Mol Med*, 9, 873-86.
- Katsuda T., Kosaka N., Takeshita F. & Ochiya T. **2013**. The therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles. *Proteomics*, 13, 1637-53.
- Kaur B., Khwaja F.W., Severson E.A., Matheny S.L., Brat D.J. & Van Meir E.G. **2005**. Hypoxia and the hypoxia-inducible-factor pathway in glioma growth and angiogenesis. *Neuro Oncol*, 7, 134-53.
- Kepp K, Juhanson P, Kozich V, Ots M, Viigimaa M, Laan M. **2007**. Resequencing PNMT in European hypertensive and normotensive individuals: no common susceptibility variants for hypertension and purifying selection on intron 1. *BMC Med Genet*. Jul 23;8:47.
- Kern S., Eichler H., Stoeve J., Kluter H. & Bieback K. **2006**. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells*, 24, 1294-301.
- Kerr J.F., Wyllie A.H. & Currie A.R. **1972**. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26, 239-57.
- Khan M., Akhtar S., Mohsin S., N Kan S. & Riazuddin S. **2011**. Growth factor preconditioning increases the function of diabetes-impaired mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*, 20, 67-75.
- Kim H.J. & Im G.I. **2011**. Electroporation-mediated transfer of SOX trio genes (SOX-5, SOX-6, and SOX-9) to enhance the chondrogenesis of mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*, 20, 2103-14.
- Kim J., Choi Y.S., Lim S., Yea K., Yoon J.H., Jun D.J., *et al.* **2010**. Comparative analysis of the secretory proteome of human adipose stromal vascular fraction cells during adipogenesis. *Proteomics*, 10, 394-405.

- Kim J.H., Kolozsvary A.J., Jenrow K.A. & Brown S.L. **2013**. Mechanisms of radiation-induced skin injury and implications for future clinical trials. *Int J Radiat Biol*, 89, 311-8.
- Kim W.S., Park B.S., Sung J.H., Yang J.M., Park S.B., Kwak S.J. & Park J.S. **2007**. Wound healing effect of adipose-derived stem cells: a critical role of secretory factors on human dermal fibroblasts. *J Dermatol Sci*, 48, 15-24.
- Kim W.S., Park B.S., Kim H.K., Park J.S., Kim K.J., Choi J.S., *et al.* **2008**. Evidence supporting antioxidant action of adipose-derived stem cells: protection of human dermal fibroblasts from oxidative stress. *J Dermatol Sci*, 49, 133-42.
- Kim, W.S. & Sung, J.H. **2012**. Hypoxic Culturing Enhances the Wound-Healing Potential of Adipose-Derived Stem Cells. *Adv Wound Care (New Rochelle)*, 1, 172-176.
- Kim Y., Kim H., Cho H., Bae Y., Suh K. & Jung J. **2007**. Direct comparison of human mesenchymal stem cells derived from adipose tissues and bone marrow in mediating neovascularization in response to vascular ischemia. *Cell Physiol Biochem*, 20, 867-76.
- Klopp A.H., Zhang Y., Solley T., Amaya-Manzanares F., Marini F., Andreeff M., *et al.* **2012**. Omental adipose tissue-derived stromal cells promote vascularization and growth of endometrial tumors. *Clin Cancer Res*, 18, 771-82.
- Knaan-Shanzer S. **2014**. Concise review: the immune status of mesenchymal stem cells and its relevance for therapeutic application. *Stem Cells*, 32, 603-8.
- Koebnick K. & Pieler T. **2002**. Gli-type zinc finger proteins as bipotential transducers of Hedgehog signaling. *Differentiation*, 70, 69-76.
- Kollet O., Peled A., Byk T., Ben-Hur H., Greiner D., Shultz L. & Lapidot T. **2000**. beta2 microglobulin-deficient (B2m(null)) NOD/SCID mice are excellent recipients for studying human stem cell function. *Blood*, 95, 3102-5.
- Kong Y., Cui H., Ramkumar C. & Zhang H. **2011**. Regulation of senescence in cancer and aging. *J Aging Res*, 2011, 963172.
- Koturbash I., Rugo R.E., Hendricks C.A., Loree J., Thibault B., Kutanzi K., *et al.* **2006**. Irradiation induces DNA damage and modulates epigenetic effectors in distant bystander tissue in vivo. *Oncogene*, 25, 4267-75.
- Krause D.S., Theise N.D., Collector M.I., Henegariu O., Hwang S., Gardner R., *et al.* **2001**. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell*, 105, 369-77.
- Kroemer G., Galluzzi L., Vandenabeele P., Abrams J., Alnemri E.S., Baehrecke E.H., *et al.* **2009**. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ*, 16, 3-11.

- Kronsteiner B., Wolbank S., Peterbauer A., Hackl C., Redl H., Van Griensven M. & Gabriel C. **2011**. Human mesenchymal stem cells from adipose tissue and amnion influence T-cells depending on stimulation method and presence of other immune cells. *Stem Cells Dev*, 20, 2115-26.
- Kuro-O, M. **2008**. Klotho as a regulator of oxidative stress and senescence. *Biol Chem*, 389, 233-41.
- Kuro-O M. **2009**. Klotho and aging. *Biochim Biophys Acta*, 1790, 1049-58.
- Kurz D.J., Decary S., Hong Y. & Erusalimsky J.D. **2000**. Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J Cell Sci*, 113 (Pt 20), 3613-22.
- Kusano K.F., Pola R., Murayama T., Curry C., Kawamoto A., Iwakura A., *et al.* **2005**. Sonic hedgehog myocardial gene therapy: tissue repair through transient reconstitution of embryonic signaling. *Nat Med*, 11, 1197-204.
- Lai R.C., Arslan F., Lee M.M., Sze N.S., Choo A., Chen T.S., *et al.* **2010**. Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem Cell Res*, 4, 214-22.
- Lange C., Cakiroglu F., Spiess A.N., Cappallo-Obermann H., Dierlamm J. & Zander A.R. **2007**. Accelerated and safe expansion of human mesenchymal stromal cells in animal serum-free medium for transplantation and regenerative medicine. *J Cell Physiol*, 213, 18-26.
- Lappano R. & Maggiolini M. **2011**. G protein-coupled receptors: novel targets for drug discovery in cancer. *Nat Rev Drug Discov*, 10, 47-60.
- Lataillade J.J., Doucet C., Bey E., Carsin H., Huet C., Clairand I., *et al.* **2007**. New approach to radiation burn treatment by dosimetry-guided surgery combined with autologous mesenchymal stem cell therapy. *Regen Med*, 2, 785-94.
- Le Blanc K. **2003**. Immunomodulatory effects of fetal and adult mesenchymal stem cells. *Cytotherapy*, 5, 485-9.
- Le Blanc K., Tammik C., Rosendahl K., Zetterberg E. & Ringden O. **2003**. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp Hematol*, 31, 890-6.
- Lebert D.C. & Huttenlocher A. **2014**. Inflammation and wound repair. *Semin Immunol*. May 19.
- Lee B.J., Wang S.G., Lee J.C., Jung J.S., Bae Y.C., Jeong H.J., *et al.* **2006**. The prevention of vocal fold scarring using autologous adipose tissue-derived stromal cells. *Cells Tissues Organs*, 184, 198-204.
- Lee B.Y., Han J.A., Im J.S., Morrone A., Johung K., Goodwin E.C., *et al.* **2006**. Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. *Aging Cell*, 5, 187-95.

- Lee S.W., Moskowitz M.A. & Sims J.R. **2007**. Sonic hedgehog inversely regulates the expression of angiopoietin-1 and angiopoietin-2 in fibroblasts. *Int J Mol Med*, 19, 445-51.
- Lee W.H., Cho H.J., Sonntag W.E. & Lee Y.W. **2011**. Radiation attenuates physiological angiogenesis by differential expression of VEGF, Ang-1, tie-2 and Ang-2 in rat brain. *Radiat Res*, 176, 753-60.
- Lefaix J.L., Delanian S., Leplat J.J., Tricaud Y., Martin M., Nimrod A., *et al.* **1996**. Successful treatment of radiation-induced fibrosis using Cu/Zn-SOD and Mn-SOD: an experimental study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 35, 305-12.
- Lei L., Liao W., Sheng P., Fu M., He A. & Huang G. **2007**. Biological character of human adipose-derived adult stem cells and influence of donor age on cell replication in culture. *Sci China C Life Sci*, 50, 320-8.
- Leonard J.M., Ye H., Wetmore C. & Karnitz L.M. **2008**. Sonic Hedgehog signaling impairs ionizing radiation-induced checkpoint activation and induces genomic instability. *J Cell Biol*, 183, 385-91.
- Li H., Fu X., Ouyang Y., Cai C., Wang J. & Sun T. **2006**. Adult bone-marrow-derived mesenchymal stem cells contribute to wound healing of skin appendages. *Cell Tissue Res*, 326, 725-36.
- Li J., Zhang Y.P. & Kirsner R.S. **2003**. Angiogenesis in wound repair: angiogenic growth factors and the extracellular matrix. *Microsc Res Tech*, 60, 107-14.
- Li J., Greco V., Guasch G., Fuchs E. & Mombaerts P. **2007**. Mice cloned from skin cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 2738-43.
- Li M., Chen M., Han W. & Fu X. **2010**. How far are induced pluripotent stem cells from the clinic? *Ageing Res Rev*, 9, 257-64.
- Li S., Deng Y., Feng J. & Ye W. **2009**. Oxidative preconditioning promotes bone marrow mesenchymal stem cells migration and prevents apoptosis. *Cell Biol Int*, 33, 411-8.
- Liang X., Ding Y., Zhang Y., Tse H.F. & Lian Q. **2013**. Paracrine mechanisms of Mesenchymal Stem cell-based therapy: Current status and perspectives. *Cell Transplant*. May 14.
- Liffers S.T., Maghnoij A., Munding J.B., Jackstadt R., Herbrand U., Schulenburg T., *et al.* **2011**. Keratin 23, a novel DPC4/Smad4 target gene which binds 14-3-3epsilon. *BMC Cancer*, 11, 137.
- Linard C., Busson E., Holler, V., Strup-Perrot C., Lacave-Lapalun J.V., Lhomme, B., *et al.* **2013**. Repeated autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cell injections improve radiation-induced proctitis in pigs. *Stem Cells Transl Med*, 2, 916-27.
- Linnenbach A, Huebner K. & Croce C.M. **1980**. DNA-transformed murine teratocarcinoma cells: regulation of expression of simian virus 40 tumor antigen in stem versus differentiated cells. *Proc Natl Acad Sci*, 77, 4875-9.

- Lipsy P.Y., Kushida K.E. & Incerti T. **2013**. The Fukushima disaster and Japan's nuclear plant vulnerability in comparative perspective. *Environ Sci Technol*, 47, 6082-8.
- Liu J., Wang Y., Pan Q., Su Y., Zhang Z., Han J., Zhu X., *et al.* **2012**. Wnt/beta-catenin pathway forms a negative feedback loop during TGF-beta1 induced human normal skin fibroblast-to-myofibroblast transition. *J Dermatol Sci*, 65, 38-49.
- Liu L., Gao J., Yuan Y., Chang Q., Liao Y. & Lu F. **2013**. Hypoxia preconditioned human adipose derived mesenchymal stem cells enhance angiogenic potential via secretion of increased VEGF and bFGF. *Cell Biol Int*, 37, 551-60.
- Liu S., Zhang H., Zhang X., Lu W., Huang X., Xie H., *et al.* **2011**. Synergistic angiogenesis promoting effects of extracellular matrix scaffolds and adipose-derived stem cells during wound repair. *Tissue Eng Part A*, 17, 725-39.
- Lobrich M. & Jeggo P.A. **2005**. Harmonising the response to DSBs: a new string in the ATM bow. *DNA Repair (Amst)*, 4, 749-59.
- Loos B., Smith R. & Engelbrecht A.M. **2008**. Ischaemic preconditioning and TNF-alpha-mediated preconditioning is associated with a differential cPLA2 translocation pattern in early ischaemia. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 78, 403-13.
- Lowry W.E., Richter L., Yachechko R., Pyle A.D., Tchieu J., Sridharan R., *et al.* **2008**. Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 2883-8.
- Luo J.D., Hu T.P., Wang L., Chen M.S., Liu S.M. & Chen A.F. **2009**. Sonic hedgehog improves delayed wound healing via enhancing cutaneous nitric oxide function in diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 297, E525-31.
- Luo W., Yu C.H., Lieu Z.Z., Allard J., Mogilner A., Sheetz M.P. & Bershadsky A.D. **2013**. Analysis of the local organization and dynamics of cellular actin networks. *J Cell Biol*, 202, 1057-73.
- M**adhala-Levy D., Williams V.C., Hughes S.M., Reshef R. & Halevy O. **2012**. Cooperation between Shh and IGF-I in promoting myogenic proliferation and differentiation via the MAPK/ERK and PI3K/Akt pathways requires Smo activity. *J Cell Physiol*, 227, 1455-64.
- Madonna R., Delli Pizzi S., Di Donato L., Mariotti A., Di Carlo L., D'ugo E., *et al.* **2012**. Non-invasive in vivo detection of peripheral limb ischemia improvement in the rat after adipose tissue-derived stromal cell transplantation. *Circ J*, 76, 1517-25.
- Mahl J.A., Vogel B.E., Court M., Kolopp M., Roman D. & Nogues V. **2006**. The minipig in dermatotoxicology: methods and challenges. *Exp Toxicol Pathol*, 57, 341-5.
- Majumdar M.K., Keane-Moore M., Buyaner D., Hardy W.B., Moorman M.A., McIntosh K.R. & Mosca J.D. **2003**. Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells. *J Biomed Sci*, 10, 228-41.

- Manetti M., Guiducci S., Ruffo M., Rosa I., Fausone-Pellegrini M.S., Matucci-Cerinic M. & Ibba-Manneschi L. **2013**. Evidence for progressive reduction and loss of telocytes in the dermal cellular network of systemic sclerosis. *J Cell Mol Med*, 17, 482-96.
- Mareschi K., Rustichelli D., Comunanza V., De Fazio R., Cravero C., Morterra G., *et al.* **2009**. Multipotent mesenchymal stem cells from amniotic fluid originate neural precursors with functional voltage-gated sodium channels. *Cytotherapy*, 11, 534-47.
- Marini K.D., Payne B.J., Watkins D.N. & Martelotto L.G. **2011**. Mechanisms of Hedgehog signalling in cancer. *Growth Factors*, 29, 221-34.
- Martins V.L., Caley M. & O'toole E.A. **2013**. Matrix metalloproteinases and epidermal wound repair. *Cell Tissue Res*, 351, 255-68.
- Mathew S.T., Bergström P., Hammastern O. **2014**. Repeated Nrf2 stimulation using sulforaphane protect fibroblasts from irradiation. *Toxicol. Appl Pharmacol*, 276(3): 188-94
- Maumus M., Peyrafitte J.A., D'angelo R., Fournier-Wirth C., Bouloumie A., Casteilla L., *et al.* **2011**. Native human adipose stromal cells: localization, morphology and phenotype. *Int J Obes (Lond)*, 35, 1141-53.
- Maurisse R., De Semir D., Enamekhoo H., Bedayat B., Abdolmohammadi A., Parsi H. & Gruenert D.C. **2010**. Comparative transfection of DNA into primary and transformed mammalian cells from different lineages. *BMC Biotechnol*, 10, 9.
- Mazo M., Hernandez S., Gavira J.J., Abizanda G., Arana M., Lopez-Martinez T., *et al.* **2012**. Treatment of reperfused ischemia with adipose-derived stem cells in a preclinical Swine model of myocardial infarction. *Cell Transplant*, 21, 2723-33.
- McDonald J.T., Kim K., Norris A.J., Vlashi E., Phillips T.M., Lagadec C. **2010**. Ionizing radiation activates the Nrf2 anti-oxidant response. *Cancer Res*, 70(21): 8886-95.
- Meirelles R.P., Hochman B., Helene Junior A., Lellis R., Fraga M.F. & Ferreira L.M. **2013**. Experimental model of cutaneous radiation injury in rabbits. *Acta Cir Bras*, 28, 751-5.
- Meissner A., Wernig M. & Jaenisch R. **2007**. Direct reprogramming of genetically unmodified fibroblasts into pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol*, 25, 1177-81.
- Mellott A.J., Forrest M.L. & Detamore M.S. **2013**. Physical non-viral gene delivery methods for tissue engineering. *Ann Biomed Eng*, 41, 446-68.
- Messick W.J., Koruda M., Meyer A. & Zimmerman K. **1994**. Differential changes in intestinal permeability following burn injury. *J Trauma*, 36, 306-11; discussion 311-2.
- Mimeault M. & Batra S.K. **2010**. Frequent deregulations in the hedgehog signaling network and cross-talks with the epidermal growth factor receptor pathway involved in cancer progression and targeted therapies. *Pharmacol Rev*, 62, 497-524.

- Mitchell J.B., McIntosh K., Zvonic S., Garrett S., Floyd Z.E., Kloster, A., *et al.* **2006.** Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. *Stem Cells*, 24, 376-85.
- Miyamoto Y., Oishi K., Yukawa H., Noguchi H., Sasaki M., Iwata H. & Hayashi S. **2012.** Cryopreservation of human adipose tissue-derived stem/progenitor cells using the silk protein sericin. *Cell Transplant*, 21, 617-22.
- Miyazaki M., Zuk P.A., Zou J., Yoon S.H., Wei F., Morishita Y., *et al.* **2008.** Comparison of human mesenchymal stem cells derived from adipose tissue and bone marrow for ex vivo gene therapy in rat spinal fusion model. *Spine (Phila Pa 1976)*, 33, 863-9.
- Molina H., Yang Y., Ruch T., Kim J.W., Mortensen P., Otto T., *et al.* **2009.** Temporal profiling of the adipocyte proteome during differentiation using a five-plex SILAC based strategy. *J Proteome Res*, 8, 48-58.
- Morizono K., De Ugarte D.A., Zhu M., Zuk P., Elbarbary A., Ashjian P., *et al.* **2003.** Multilineage cells from adipose tissue as gene delivery vehicles. *Hum Gene Ther*, 14, 59-66.
- Morton J.P., & Lewis B.C., **2007.** Shh signalling and pancreatic cancer: implication for therapy?. *Cell cycle*, 6(13): 1553-7.
- Mosna F., Sensebe L. & Krampera M. **2010.** Human bone marrow and adipose tissue mesenchymal stem cells: a user's guide. *Stem Cells Dev*, 19, 1449-70.
- Mothersill C. & Seymour C. **1997.** Medium from irradiated human epithelial cells but not human fibroblasts reduces the clonogenic survival of unirradiated cells. *Int J Radiat Biol*, 71, 421-7.
- Mothersill C. & Seymour C. **2001.** Radiation-induced bystander effects: past history and future directions. *Radiat Res*, 155, 759-67.
- Moustakas A. & Kardassis D. **1998.** Regulation of the human p21/WAF1/Cip1 promoter in hepatic cells by functional interactions between Sp1 and Smad family members. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 6733-8.
- Moustakas A., Souchelnytskyi S. & Heldin C.H. **2001.** Smad regulation in TGF-beta signal transduction. *J Cell Sci*, 114, 4359-69.
- Najar M., Raicevic G., Boufker H.I., Fayyad Kazan H., De Bruyn C., Meuleman N., *et al.* **2010.** Mesenchymal stromal cells use PGE2 to modulate activation and proliferation of lymphocyte subsets: Combined comparison of adipose tissue, Wharton's Jelly and bone marrow sources. *Cell Immunol*, 264, 171-9.
- Naka K., Tachibana A., Ikeda K. & Motoyama N. **2004.** Stress-induced premature senescence in hTERT-expressing ataxia telangiectasia fibroblasts. *J Biol Chem*, 279, 2030-7.

- Nakagawa M., Koyanagi M., Tanabe K., Takahashi K., Ichisaka T., Aoi T., *et al.* **2008.** Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol*, 26, 101-6.
- Nakashima S., Matsuyama Y., Nitta A., Sakai Y. & Ishiguro N. **2005.** Highly efficient transfection of human marrow stromal cells by nucleofection. *Transplant Proc*, 37, 2290-2.
- Nam H. & Lee G. **2009.** Identification of novel epithelial stem cell-like cells in human deciduous dental pulp. *Biochem Biophys Res Commun*, 386, 135-9.
- Nauta A., Seidel C., Deveza L., Montoro D., Grova M., Ko S.H., *et al.* **2013.** Adipose-derived stromal cells overexpressing vascular endothelial growth factor accelerate mouse excisional wound healing. *Mol Ther*, 21, 445-55.
- Neot J.C. **2009.** Radiation accidents over the last 60 years. *J Radiol Prot*, 29, 301-20.
- Niu G., Wright K.L., Huang M., Song L., Haura E., Turkson J., *et al.* **2002.** Constitutive Stat3 activity up-regulates VEGF expression and tumor angiogenesis. *Oncogene*, 21, 2000-8.
- Niu J., Chang Z., Peng B., Xia Q., Lu W., Huang P., *et al.* **2007.** Keratinocyte growth factor/fibroblast growth factor-7-regulated cell migration and invasion through activation of NF-kappaB transcription factors. *J Biol Chem*, 282, 6001-11.
- Noel D., Caton D., Roche S., Bony C., Lehmann S., Casteilla L., *et al.* **2008.** Cell specific differences between human adipose-derived and mesenchymal-stromal cells despite similar differentiation potentials. *Exp Cell Res*, 314, 1575-84.
- Nowak J.A., Polak L., Pasolli H.A. & Fuchs E. **2008.** Hair follicle stem cells are specified and function in early skin morphogenesis. *Cell Stem Cell*, 3, 33-43.
- Nowakowski A., Andrzejewska A., Janowski M., Walczak P. & Lukomska B. **2013.** Genetic engineering of stem cells for enhanced therapy. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 73, 1-18.
- Nunes S.S., Maijub J.G., Krishnan L., Ramakrishnan V.M., Clayton L.R., Williams S.K., *et al.* **2013.** Generation of a functional liver tissue mimic using adipose stromal vascular fraction cell-derived vasculatures. *Sci Rep*, 3, 2141.
- Nusslein-Vohland C., & Wieschaus E. **1980.** Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*; *Nature*. 287: 795-801.
- Ohashi K, Y.T., Nakajima Y, Kosovsky M **2011.** Methods for Implantation of BD Matrigel™ Matrix into Mice and Tissue Fixation. *BD Biosciences Discovery Labware*, Technical Bulletin #455.
- Ohba K., Omagari K., Nakamura T., Ikuno N., Saeki S., Matsuo I., *et al.* **1998.** Abscopal regression of hepatocellular carcinoma after radiotherapy for bone metastasis. *Gut*, 43, 575-7.

- Okeyo K.O., Adachi T., Sunaga J. & Hojo M. **2009**. Actomyosin contractility spatiotemporally regulates actin network dynamics in migrating cells. *J Biomech*, 42, 2540-8.
- Olive P.L. **2009**. Impact of the comet assay in radiobiology. *Mutat Res*, 681, 13-23.
- Ong, W.K. & Sugii, S. 2013. Adipose-derived stem cells: fatty potentials for therapy. *Int J Biochem Cell Biol*, 45, 1083-6.
- Ono H., Nakamura A., Kanbara T., Minami K., Shinohara S., Sakaguchi G. & Kanemasa T. **2014**. Effect of the Norepinephrine Transporter (NET) Inhibition on mu-Opioid Receptor (MOR)-Induced Anti-nociception in a Bone Cancer Pain Model. *J Pharmacol Sci*.
- Oro A.E. & Higgins K. **2003**. Hair cycle regulation of Hedgehog signal reception. *Dev Biol*, 255, 238-48.
- P**ages G. & Pouyssegur J. **2005**. Transcriptional regulation of the Vascular Endothelial Growth Factor gene--a concert of activating factors. *Cardiovasc Res*, 65, 564-73.
- Paglia D.E. & Valentine W.N. **1967**. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med*, 70, 158-69.
- Pan Q., Qin X., Ma S., Wang H., Cheng K., Song X., *et al.* **2014**. Myocardial protective effect of extracellular superoxide dismutase gene modified bone marrow mesenchymal stromal cells on infarcted mice hearts. *Theranostics*, 4, 475-86.
- Panganiban R.A., Snow A.L. & Day R.M. **2013**. Mechanisms of radiation toxicity in transformed and non-transformed cells. *Int J Mol Sci*, 14, 15931-58.
- Parisi M.J. & Lin H. **1998**. The role of the hedgehog/patched signaling pathway in epithelial stem cell proliferation: from fly to human. *Cell Res*, 8, 15-21.
- Pellegrini N., Serafini M., Colombi B., Del Rio D., Salvatore S., Bianchi M. & Brighenti F. **2003**. Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *J Nutr*, 133, 2812-9.
- Pensado A., Seijo B. & Sanchez A. **2014**. Current strategies for DNA therapy based on lipid nanocarriers. *Expert Opin Drug Deliv*, 1-11.
- Pepinsky R.B., Rayhorn P., Day E.S., Dergay A., Williams K.P., Galdes A., *et al.* **2000**. Mapping sonic hedgehog-receptor interactions by steric interference. *J Biol Chem*, 275, 10995-1001.
- Peter R.U. & Gottlob P. **2002**. Management of cutaneous radiation injuries: diagnostic and therapeutic principles of the cutaneous radiation syndrome. *Mil Med*, 167, 110-2.
- Peter R.U. **2005**. Cutaneous radiation syndrome in multi-organ failure. *BJR Suppl*, 27, 180-4.

- Peterson R. & Turnbull J. **2012**. Sonic hedgehog is cytoprotective against oxidative challenge in a cellular model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Mol Neurosci*, 47, 31-41.
- Petrie Aronin C.E. & Tuan R.S. **2010**. Therapeutic potential of the immunomodulatory activities of adult mesenchymal stem cells. *Birth Defects Res C Embryo Today*, 90, 67-74.
- Petrini C. **2014**. Umbilical cord blood banking: from personal donation to international public registries to global bioeconomy. *J Blood Med*, 5, 87-97.
- Piccioni A., Gaetani E., Neri V., Gatto I., Palladino M., Silver M., *et al.* **2013**. Sonic Hedgehog Therapy in a Mouse Model of Age-Associated Impairment of Skeletal Muscle Regeneration. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*.
- Pirsel M., Chovanec M., Dudas A., Kleibl K. & Van Houten B. **2004**. Fourth DNA repair workshop on DNA damage and repair: mechanisms and biological consequences Smolenice Castle, 2-5 May 2004. *DNA Repair (Amst)*, 3, 1639-59.
- Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C., Jaiswal R.K., Douglas R., Mosca J.D., *et al.* **1999**. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284, 143-7.
- Pittenger M., Vanguri P., Simonetti D. & Young R. **2002**. Adult mesenchymal stem cells: potential for muscle and tendon regeneration and use in gene therapy. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 2, 309-20.
- Pittenger M.F. & Martin B.J. **2004**. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. *Circ Res*, 95, 9-20.
- Plikus M.V., Gay D.L., Treffeisen E., Wang A., Supapannachart, R.J. & Cotsarelis, G. **2012**. Epithelial stem cells and implications for wound repair. *Semin Cell Dev Biol*, 23, 946-53.
- Podolska K., Lipiec A., Hajdukiewicz K., Lubkowska H. & Malecki M. **2013**. Sonic hedgehog stimulates the recruitment of endothelial progenitor cells. *Med Wieku Rozwoj*, 17, 151-6.
- Poirier J. **1999**. *Histologie moléculaire: texte et atlas*. Paris : Masson.
- Pola R., Ling L.E., Silver M., Corbley M.J., Kearney M., Blake Pepinsky R., *et al.* **2001**. The morphogen Sonic hedgehog is an indirect angiogenic agent upregulating two families of angiogenic growth factors. *Nat Med*, 7, 706-11.
- Polchert D., Sobinsky J., Douglas G., Kidd M., Moadsiri A., Reina E., *et al.* **2008**. IFN-gamma activation of mesenchymal stem cells for treatment and prevention of graft versus host disease. *Eur J Immunol*, 38, 1745-55.
- Popescu L.M. & Faussone-Pellegrini M.S. **2010**. TELOCYTES - a case of serendipity: the winding way from Interstitial Cells of Cajal (ICC), via Interstitial Cajal-Like Cells (ICLC) to TELOCYTES. *J Cell Mol Med*, 14, 729-40.

- Popescu L.M., Manole E., Serboiu C.S., Manole C.G., Suciuc L.C., Gherghiceanu M. & Popescu B.O. **2011**. Identification of telocytes in skeletal muscle interstitium: implication for muscle regeneration. *J Cell Mol Med*, 15, 1379-92.
- Prendergast A.M., Cruet-Hennequart S., Shaw G., Barry F.P. & Carty M.P. **2011**. Activation of DNA damage response pathways in human mesenchymal stem cells exposed to cisplatin or gamma-irradiation. *Cell Cycle*, 10, 3768-77.
- Prykhozhiy S.V. **2010**. In the absence of Sonic hedgehog, p53 induces apoptosis and inhibits retinal cell proliferation, cell-cycle exit and differentiation in zebrafish. *PLoS One*, 5, e13549.
- Puck T.T. & Marcus P.I. **1956**. Action of x-rays on mammalian cells. *J Exp Med*, 103, 653-66.
- Puck T.T., Morkovin D., Marcus P.I. & Cieciura S.J. **1957**. Action of x-rays on mammalian cells. II. Survival curves of cells from normal human tissues. *J Exp Med*, 106, 485-500.
- Purvis J.E., Karhohs K.W., Mock C., Batchelor E., Loewer A. & Lahav G. **2012**. p53 dynamics control cell fate. *Science*, 336, 1440-4.
- Q**iao L., Xu Z., Zhao T., Zhao Z., Shi M., Zhao R.C., *et al.* **2008**. Suppression of tumorigenesis by human mesenchymal stem cells in a hepatoma model. *Cell Res*, 18, 500-7.
- R**aja Sivamani K., Garcia M.S. & Isseroff R.R. **2007**. Wound re-epithelialization: modulating keratinocyte migration in wound healing. *Front Biosci*, 12, 2849-68.
- Rak J., Mitsuhashi Y., Sheehan C., Tamir A., Vilorio-Petit A., Filmus J., *et al.* **2000**. Oncogenes and tumor angiogenesis: differential modes of vascular endothelial growth factor up-regulation in ras-transformed epithelial cells and fibroblasts. *Cancer Res*, 60, 490-8.
- Rasini V., Dominici M., Kluba T., Siegel G., Lusenti G., Northoff H., *et al.* **2013**. Mesenchymal stromal/stem cells markers in the human bone marrow. *Cytotherapy*. 15(3):292-306.
- Rauch I., Muller M. & Decker T. **2013**. The regulation of inflammation by interferons and their STATs. *JAKSTAT*, 2, e23820.
- Rayment E.A. & Upton Z. **2009**. Finding the culprit: a review of the influences of proteases on the chronic wound environment. *Int J Low Extrem Wounds*, 8, 19-27.
- Rehman J., Traktuev D., Li J., Merfeld-Clauss S., Temm-Grove C.J., Bovenkerk J.E., *et al.* **2004**. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation*, 109, 1292-8.
- Rennert R.C., Sorkin M., Januszyk M., Duscher D., Kosaraju R., Chung M.T. *et al.* **2014**. Diabetes impairs the angiogenic potential of adipose derived stem cells by selectively depleting cellular subpopulations. *Stem Cell Res Ther*, 5, 79.

- Riccobono D., Agay D., Scherthan H., Forcheron F., Vivier M., Ballester B., *et al.* **2012**. Application of Adipocyte-Derived Stem Cells in Treatment of Cutaneous Radiation Syndrome. *Health Physics*, 103, 120-126.
- Riccobono D., Forcheron F., Agay D., Scherthan H., Meineke V. & Drouet M. **2014**. Transient gene therapy to treat cutaneous radiation syndrome: development in a minipig model. *Health Phys*, 106, 713-9.
- Rich T., Allen R.L. & Wyllie A.H. **2000**. Defying death after DNA damage. *Nature*, 407, 777-83.
- Rivera L.B., Bradshaw A.D. & Brekken R.A. **2011**. The regulatory function of SPARC in vascular biology. *Cell Mol Life Sci*, 68, 3165-73.
- Rosenow A., Arrey T.N., Bouwman F.G., Noben J.P., Wabitsch M., Mariman E.C., *et al.* **2010**. Identification of novel human adipocyte secreted proteins by using SGBS cells. *J Proteome Res*, 9, 5389-401.
- Rosova I., Dao M., Capoccia B., Link D. & Nolte J.A. **2008**. Hypoxic preconditioning results in increased motility and improved therapeutic potential of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 26, 2173-82.
- Sacchetti B., Funari A., Michienzi S., Di Cesare S., Piersanti S., Saggio I., *et al.* **2007**. Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell*, 131, 324-36.
- Sacedon R., Diez B., Nunez V., Hernandez-Lopez C., Gutierrez-Frias C., Cejalvo T., *et al.* **2005**. Sonic hedgehog is produced by follicular dendritic cells and protects germinal center B cells from apoptosis. *J Immunol*, 174, 1456-61.
- Salgado A.J., Reis R.L., Sousa N.J. & Gimble J.M. **2010**. Adipose tissue derived stem cells secretome: soluble factors and their roles in regenerative medicine. *Curr Stem Cell Res Ther*, 5, 103-10.
- Sancar A., Lindsey-Boltz L.A., Unsal-Kacmaz K. & Linn S. **2004**. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem*, 73, 39-85.
- Sanz-Cameno P., Trapero-Marugan M., Chaparro M., Jones E.A. & Moreno-Otero R. **2010**. Angiogenesis: from chronic liver inflammation to hepatocellular carcinoma. *J Oncol*, 2010, 272170.
- Sasaki M., Abe R., Fujita Y., Ando S., Inokuma D. & Shimizu H. **2008**. Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type. *J Immunol*, 180, 2581-7.
- Schaffler A. & Buchler C. **2007**. Concise review: adipose tissue-derived stromal cells--basic and clinical implications for novel cell-based therapies. *Stem Cells*, 25, 818-27.

- Schlesier K., Harwat M., Bohm V. & Bitsch R. **2002**. Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. *Free Radic Res*, 36, 177-87.
- Schmidt-Ullrich R.K., Dent P., Grant S., Mikkelsen R.B. & Valerie K. **2000**. Signal transduction and cellular radiation responses. *Radiat Res*, 153, 245-57.
- Schnabel L.V., Pezzanite L.M., Antczak D.F., Felipe M.J. & Fortier L.A. **2014**. Equine bone marrow-derived mesenchymal stromal cells are heterogeneous in MHC class II expression and capable of inciting an immune response in vitro. *Stem Cell Res Ther*, 5, 13.
- Scruggs B.A., Semon J.A., Zhang X., Zhang S., Bowles A.C., Pandey A.C., *et al.* **2013**. Age of the donor reduces the ability of human adipose-derived stem cells to alleviate symptoms in the experimental autoimmune encephalomyelitis mouse model. *Stem Cells Transl Med*, 2, 797-807.
- Sedelnikova O.A., Nakamura, A., Kovalchuk O., Koturbash I., Mitchell S.A., Marino S.A., *et al.* **2007**. DNA double-strand breaks form in bystander cells after microbeam irradiation of three-dimensional human tissue models. *Cancer Res*, 67, 4295-302.
- Shah D.J., Sachs R.K. & Wilson D.J. **2012**. Radiation-induced cancer: a modern view. *Br J Radiol*, 85, e1166-73.
- Shamis Y., Silva E.A., Hewitt K.J., Brudno Y., Levenberg S., Mooney D.J. & Garlick J.A. **2013**. Fibroblasts derived from human pluripotent stem cells activate angiogenic responses in vitro and in vivo. *PLoS One*, 8, e83755.
- Sheng L., Yang M., Liang Y. & Li Q. **2013**. Adipose tissue-derived stem cells (ADSCs) transplantation promotes regeneration of expanded skin using a tissue expansion model. *Wound Repair Regen*, 21, 746-54.
- Sherman A.E. & Zavros Y. **2011**. Role of Sonic Hedgehog signaling during progression from inflammation to cancer in the stomach. *World J Gastrointest Pathophysiol*, 2, 103-8.
- Shinagawa K., Kitadai Y., Tanaka M., Sumida T., Kodama M., Higashi Y., *et al.* **2010**. Mesenchymal stem cells enhance growth and metastasis of colon cancer. *Int J Cancer*, 127, 2323-33.
- Shu W., Shu Y.T., Dai C.Y. & Zhen Q.Z. **2012**. Comparing the biological characteristics of adipose tissue-derived stem cells of different persons. *J Cell Biochem*, 113, 2020-6.
- Shultz L.D., Schweitzer P.A., Christianson S.W., Gott B., Schweitzer I.B., Tennent B., *et al.* **1995**. Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice. *J Immunol*, 154, 180-91.
- Sieber F., Muir S.A., Cohen E.P., North P.E., Fish B.L., Irving A.A. *et al.* **2009**. High-dose selenium for the mitigation of radiation injury: a pilot study in a rat model. *Radiat Res*, 171, 368-73.

- Signore M., Pelacchi F., Di Martino S., Runci D., Biffoni M., Giannetti S., *et al.* **2014**. Combined PDK1 and CHK1 inhibition is required to kill glioblastoma stem-like cells in vitro and in vivo. *Cell Death Dis*, 5, e1223.
- Silva G.V., Litovsky S., Assad J.A., Sousa A.L., Martin B.J., Vela D., *et al.* **2005**. Mesenchymal stem cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a canine chronic ischemia model. *Circulation*, 111, 150-6.
- Sixt M. **2012**. Cell migration: fibroblasts find a new way to get ahead. *J Cell Biol*, 197, 347-9.
- Song S.Y., Jung J.E., Jeon Y.R., Tark K.C. & Lew D.H. **2011**. Determination of adipose-derived stem cell application on photo-aged fibroblasts, based on paracrine function. *Cytotherapy*, 13, 378-84.
- Sokolov M.V., Smilenov L.B., Hall E.J., Panyutin I.G., Bonner W.M. & Sedelnikova O.A. **2005**. Ionizing radiation induces DNA double-strand breaks in bystander primary human fibroblasts. *Oncogene*, 24, 7257-65.
- Spek C.A., Bijlsma M.F. & Queiroz K.C. **2010**. Canonical Hedgehog signaling drives proangiogenic responses in endothelial cells. *Cell Cycle*, 9, 1683.
- Squatrito M., Brennan C.W., Helmy K., Huse J.T., Petrini J.H. & Holland E.C. **2010**. Loss of ATM/Chk2/p53 pathway components accelerates tumor development and contributes to radiation resistance in gliomas. *Cancer Cell*, 18, 619-29.
- Stein G.H., Drullinger L.F., Soulard A. & Dulic V. **1999**. Differential roles for cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p16 in the mechanisms of senescence and differentiation in human fibroblasts. *Mol Cell Biol*, 19, 2109-17.
- Stevens L. **1896**. Injurious effects on the skin. *British Medical J.* 1-998.
- Stewart F.A., Akleyev A.V., Hauer-Jensen M., Hendry J.H., Kleiman N.J., Macvittie T.J., *et al.* **2012**. ICRP publication 118: ICRP statement on tissue reactions and early and late effects of radiation in normal tissues and organs--threshold doses for tissue reactions in a radiation protection context. *Ann ICRP*, 41, 1-322.
- Stewart G.A., Lowrey J.A., Wakelin S.J., Fitch P.M., Lindey S., Dallman M.J. *et al.* **2002**. Sonic hedgehog signaling modulates activation of and cytokine production by human peripheral CD4+ T cells. *J Immunol*, 169, 5451-7.
- Strioga M., Viswanathan S., Darinskas A., Slaby O. & Michalek J. **2012**. Same or not the same? Comparison of adipose tissue-derived versus bone marrow-derived mesenchymal stem and stromal cells. *Stem Cells Dev*, 21, 2724-52.
- Strong A.L., Strong T.A., Rhodes L.V., Semon J.A., Zhang X., Shi Z. *et al.* **2013**. Obesity associated alterations in the biology of adipose stem cells mediate enhanced tumorigenesis by estrogen dependent pathways. *Breast Cancer Res*, 15, R102.

- Stubbs S.L., Hsiao S.T., Peshavariya H.M., Lim S.Y., Dusting G.J. & Dilley R.J. **2012**. Hypoxic preconditioning enhances survival of human adipose-derived stem cells and conditions endothelial cells in vitro. *Stem Cells Dev*, 21, 1887-96.
- T**aipale J., Cooper M.K., Maiti T. & Beachy P.A. **2002**. Patched acts catalytically to suppress the activity of Smoothed. *Nature*, 418, 892-7.
- Taira Y., Hayashida N., Orita M., Yamaguchi H., Ide J., Endo Y., *et al.* **2014**. Evaluation of environmental contamination and estimated exposure doses after residents return home in Kawauchi Village, Fukushima Prefecture. *Environ Sci Technol*, 48, 4556-63.
- Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M., Narita M., Ichisaka T., Tomoda K. & Yamanaka S. **2007**. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 131, 861-72.
- Takahashi K., Yamanaka S. **2006**. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 25;126(4):663-76. Epub 2006 Aug 10.
- Tamarat R., Lataillade J.J., Bey E., Gourmelon P. & Benderitter M. **2012**. Stem cell therapy: from bench to bedside. *Radiat Prot Dosimetry*, 151, 633-9.
- Tang T., Wu M. & Yang J. **2013**. Transplantation of MSCs transfected with SHH gene ameliorates cardiac dysfunction after chronic myocardial infarction. *Int J Cardiol*. 168 (5) : 4997-9.
- Tarte K., Gaillard J., Lataillade J.J., Fouillard L., Becker M., Mossafa H., *et al.* **2010**. Clinical-grade production of human mesenchymal stromal cells: occurrence of aneuploidy without transformation. *Blood*, 115, 1549-53.
- Tate C.M., Blosser W., Wyss L., Evans G., Xue Q., Pan Y. & Stancato L. **2013**. LY2228820 dimesylate, a selective inhibitor of p38 mitogen-activated protein kinase, reduces angiogenic endothelial cord formation in vitro and in vivo. *J Biol Chem*, 288, 6743-53.
- Thirumala S., Gimble J.M. & Devireddy R.V. **2010**. Evaluation of methylcellulose and dimethyl sulfoxide as the cryoprotectants in a serum-free freezing media for cryopreservation of adipose-derived adult stem cells. *Stem Cells Dev*, 19, 513-22.
- Timmers L., Lim S.K., Arslan F., Armstrong J.S., Hofer I.E., Doevendans P.A., *et al.* **2007**. Reduction of myocardial infarct size by human mesenchymal stem cell conditioned medium. *Stem Cell Res*, 1, 129-37.
- Toma C., Pittenger M.F., Cahill K.S., Byrne B.J. & Kessler P.D. **2002**. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation*, 105, 93-8.
- Tomita M., Adachi Y., Yamada H., Takahashi K., Kiuchi K., Oyaizu H., *et al.* **2002**. Bone marrow-derived stem cells can differentiate into retinal cells in injured rat retina. *Stem Cells*, 20, 279-83.

- Tonnesen M.G., Feng X. & Clark R.A. **2000**. Angiogenesis in wound healing. *J Investig Dermatol Symp Proc*, 5, 40-6.
- Tran S.D., Liu Y., Xia D., Maria O.M., Khalili S., Wang R.W., *et al.* **2013**. Paracrine effects of bone marrow soup restore organ function, regeneration, and repair in salivary glands damaged by irradiation. *PLoS One*, 8, e61632.
- Trompier F., Tikunov D.D., Ivannikov A. & Clairand I. **2006**. ESR investigation of joint use of dentin and tooth enamel to estimate photon and neutron dose components of a mixed field. *Radiat Prot Dosimetry*, 120, 191-6.
- Tsigkos S., Koutsilieris M. & Papapetropoulos A. **2003**. Angiopoietins in angiogenesis and beyond. *Expert Opin Investig Drugs*, 12, 933-41.
- Tubiana M., Arriagada R. & Sarrazin D. **1986**. Human cancer natural history, radiation induced immunodepression and post-operative radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 12, 477-85.
- Tubiana M., Dutreix J., Wambersie A. **2005**. *Introduction to radiobiology*. 2nd ed. London: Taylor and Francis library.
- Tubiana, M. **2008**. *Radiobiologie: radiothérapie et radioprotection*. 3^{ème} ed. Paris: Hermann.
- Tzschentke T.M., Christoph T. & Kogel B.Y. **2014**. The mu-opioid receptor agonist/noradrenaline reuptake inhibition (MOR-NRI) concept in analgesia: the case of tapentadol. *CNS Drugs*, 28, 319-29.
- V**ainchenker W. **2005**. *Thérapie cellulaire*. Montrouge: John Libbey Eurotext.
- Vakifahmetoglu H., Olsson M. & Zhivotovsky B. **2008**. Death through a tragedy: mitotic catastrophe. *Cell Death Differ*, 15, 1153-62.
- Valko M., Izakovic M., Mazur M., Rhodes C.J. & Telser J. **2004**. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem*, 266, 37-56.
- Valko M., Rhodes C.J., Moncol J., Izakovic M. & Mazur M. **2006**. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact*, 160, 1-40.
- Van R.L., Bayliss C.E. & Roncari D.A. **1976**. Cytological and enzymological characterization of adult human adipocyte precursors in culture. *J Clin Invest*, 58, 699-704.
- Vankayala R., Chiang C.S., Chao J.I., Yuan C.J., Lin S.Y. & Hwang K.C. **2014**. A general strategy to achieve ultra-high gene transfection efficiency using lipid-nanoparticle composites. *Biomaterials*, 35, 8261-72.
- Varga E., Nemes C., Davis R.P., Ujhelly O., Klincumhom N., Polgar Z., *et al.* **2014**. Generation of transgene-free mouse induced pluripotent stem cells using an excisable lentiviral system. *Exp Cell Res*, 322, 335-44.

- Varjosalo M. & Taipale J. **2008**. Hedgehog: functions and mechanisms. *Genes Dev*, 22, 2454-72.
- Vassalli G. & Moccetti T. **2011**. Cardiac repair with allogeneic mesenchymal stem cells after myocardial infarction. *Swiss Med Wkly*, 141, w13209.
- Vidal M.A., Walker N.J., Napoli E. & Borjesson D.L. **2011**. Evaluation of Senescence in Mesenchymal Stem Cells Isolated from Equine Bone Marrow, Adipose Tissue, and Umbilical Cord Tissue. *Stem Cells Dev*.
- Vodicka P., Smetana K., Jr., Dvorankova B., Emerick T., Xu Y.Z., Ourednik J., *et al.* **2005**. The miniature pig as an animal model in biomedical research. *Ann N Y Acad Sci*, 1049, 161-71.
- Von Wangenheim K.H., Peterson, H.P. & Schwenke, K. **1995**. Review: a major component of radiation action: interference with intracellular control of differentiation. *Int J Radiat Biol*, 68, 369-88.
- Vyas N., Goswami D., Manonmani A., Sharma P., Ranganath H.A., Vijayraghavan K., *et al.* **2008**. Nanoscale organization of hedgehog is essential for long-range signaling. *Cell*, 133, 1214-27.
- Waldren C.A. 2004**. Classical radiation biology dogma, bystander effects and paradigm shifts. *Hum Exp Toxicol*, 23, 95-100.
- Walter K., Omura N., Hong S.M., Griffith M., Vincent A., Borge, M. & Goggins M. **2010**. Overexpression of smoothed activates the sonic hedgehog signaling pathway in pancreatic cancer-associated fibroblasts. *Clin Cancer Res*, 16, 1781-9.
- Walter M.N., Wright K.T., Fuller H.R., Macneil S. & Johnson W.E. **2010**. Mesenchymal stem cell-conditioned medium accelerates skin wound healing: an in vitro study of fibroblast and keratinocyte scratch assays. *Exp Cell Res*, 316, 1271-81.
- Wang E. **1995**. Senescent human fibroblasts resist programmed cell death, and failure to suppress bcl2 is involved. *Cancer Res*, 55, 2284-92.
- Wang F. **2006**. Culture of animal cells: A manual of basic technique, fifth edition. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*, 42, 169-169.
- Wang W., Zhou F., Ge L., Liu X. & Kong F. **2014**. A promising targeted gene delivery system: Folate-modified dexamethasone-conjugated solid lipid nanoparticles. *Pharm Biol*, 52, 1039-44.
- Webley K., Bond J.A., Jones C.J., Blaydes J.P., Craig A., Hupp T. & Wynford-Thomas D. **2000**. Posttranslational modifications of p53 in replicative senescence overlapping but distinct from those induced by DNA damage. *Mol Cell Biol*, 20, 2803-8.
- Wei L., Fraser J.L., Lu Z.Y., Hu X. & Yu S.P. **2012**. Transplantation of hypoxia preconditioned bone marrow mesenchymal stem cells enhances angiogenesis and neurogenesis after cerebral ischemia in rats. *Neurobiol Dis*, 46, 635-45.

- Weidner N., Carroll P.R., Flax J., Blumenfeld W. & Folkman J. **1993**. Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma. *Am J Pathol*, 143, 401-9.
- Werner S., Krieg T. & Smola H. **2007**. Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing. *J Invest Dermatol*, 127, 998-1008.
- West C.C., Murray I.R., Gonzalez Z.N., Hindle P., Hay D.C., Stewart K.J. & Peault B. **2014**. Ethical, legal and practical issues of establishing an adipose stem cell bank for research. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*.
- White S.C. & Mallya S.M. **2012**. Update on the biological effects of ionizing radiation, relative dose factors and radiation hygiene. *Aust Dent J*, 57 Suppl 1, 2-8.
- Wicking C. & Mcglinn E. **2001**. The role of hedgehog signalling in tumorigenesis. *Cancer Lett*, 173, 1-7.
- Willems E., Leyns L. & Vandesompele J. **2008**. Standardization of real-time PCR gene expression data from independent biological replicates. *Anal Biochem*, 379, 127-9.
- Williams J.P., Brown S.L., Georges G.E., Hauer-Jensen M., Hill R.P., Huser A.K., *et al.* **2010**. Animal models for medical countermeasures to radiation exposure. *Radiat Res*, 173, 557-78.
- Wilson C.W. & Chuang P.T. **2010**. Mechanism and evolution of cytosolic Hedgehog signal transduction. *Development*, 137, 2079-94.
- Wislet-Gendebien S., Wautier F., Leprince P. & Rogister B. **2005**. Astrocytic and neuronal fate of mesenchymal stem cells expressing nestin. *Brain Res Bull*, 68, 95-102.
- Wu C. & Dunbar C.E. **2011**. Stem cell gene therapy: the risks of insertional mutagenesis and approaches to minimize genotoxicity. *Front Med*, 5, 356-71.
- Wu J., Kent I.A., Shekhar N., Chancellor T.J., Mendonca A., Dickinson R.B. & Lele T.P. **2014**. Actomyosin pulls to advance the nucleus in a migrating tissue cell. *Biophys J*, 106, 7-15.
- Wu L.W., Wang Y.L., Christensen J.M., Khalifian S., Schneeberger S., Raimondi G., *et al.* **2014**. Donor age negatively affects the immunoregulatory properties of both adipose and bone marrow derived mesenchymal stem cells. *Transpl Immunol*.
- X**iao C., Feng R., Engevik A.C., Martin J.R., Tritschler J.A., Schumacher M., *et al.* **2013**. Sonic Hedgehog contributes to gastric mucosal restitution after injury. *Lab Invest*, 93, 96-111.
- Y**agi H. & Kitagawa Y. **2013**. The role of mesenchymal stem cells in cancer development. *Front Genet*, 4, 261.
- Yamanaka Y., Shiotani A., Fujimura Y., Ishii M., Fujita M., Matsumoto H., *et al.* **2011**. Expression of Sonic hedgehog (SHH) and CDX2 in the columnar epithelium of the lower oesophagus. *Dig Liver Dis*, 43, 54-9.

- Yanez R., Lamana M.L., Garcia-Castro J., Colmenero I., Ramirez M. & Bueren J.A. **2006**. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have in vivo immunosuppressive properties applicable for the control of the graft-versus-host disease. *Stem Cells*, 24, 2582-91.
- Yanez R., Oviedo A., Aldea M., Bueren J.A. & Lamana M.L. **2010**. Prostaglandin E2 plays a key role in the immunosuppressive properties of adipose and bone marrow tissue-derived mesenchymal stromal cells. *Exp Cell Res*, 316, 3109-23.
- Yang H., Asaad N. & Held K.D. **2005**. Medium-mediated intercellular communication is involved in bystander responses of X-ray-irradiated normal human fibroblasts. *Oncogene*, 24, 2096-103.
- Yang Y., Nunes F.A., Berencsi K., Furth E.E., Gonczó, E. & Wilson J.M. **1994**. Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 4407-11.
- Yao Q., Renault M.A., Chapouly C., Vandierdonck S., Belloc I., Jaspard-Vinassa B., *et al.* **2014**. Sonic hedgehog mediates a novel pathway of PDGF-BB-dependent vessel maturation. *Blood*, 123, 2429-37.
- Yew T.L., Hung Y.T., Li H.Y., Chen H.W., Chen L.L., Tsai K.S., *et al.* **2011**. Enhancement of wound healing by human multipotent stromal cell conditioned medium: the paracrine factors and p38 MAPK activation. *Cell Transplant*, 20, 693-706.
- Yu S.P., Wei Z. & Wei L. **2013**. Preconditioning strategy in stem cell transplantation therapy. *Transl Stroke Res*, 4, 76-88.
- Yue Y., Zhang P., Liu D., Yang J.F., Nie C. & Yang D. **2013**. Hypoxia preconditioning enhances the viability of ADSCs to increase the survival rate of ischemic skin flaps in rats. *Aesthetic Plast Surg*, 37, 159-70.
- Z**acharias W.J., Li X., Madison B.B., Kretovich K., Kao J.Y., Merchant J.L. & Gumucio D.L. **2010**. Hedgehog is an anti-inflammatory epithelial signal for the intestinal lamina propria. *Gastroenterology*, 138, 2368-77, 2377 e1-4.
- Zaharia M, Goens R.E., Berger ME *et al.* **2001**. *Industrial radiography accident in the Yanango hydroelectric power plant*, London, The Parthenon publishing group.
- Zaim M., Karaman S., Cetin G. & Isik S. **2012**. Donor age and long-term culture affect differentiation and proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Ann Hematol*, 91, 1175-86.
- Zaragosi L.E., Billon N., Ailhaud G. & Dani C. **2007**. Nucleofection is a valuable transfection method for transient and stable transgene expression in adipose tissue-derived stem cells. *Stem Cells*, 25, 790-7.
- Zhang R., Poustovoitov M.V., Ye X., Santos H.A., Chen W., Daganzo S.M., *et al.* **2005**. Formation of MacroH2A-containing senescence-associated heterochromatin foci and senescence driven by ASF1a and HIRA. *Dev Cell*, 8, 19-30.

- Zhong J., Krawczyk S.A., Chaerkady R., Huang H., Goel R., Bade, J.S., *et al.* **2010**. Temporal profiling of the secretome during adipogenesis in humans. *J Proteome Res*, 9, 5228-38.
- Zhou H., Ivanov V.N., Gillespie J., Geard C.R., Amundson S.A., Brenner D.J., *et al.* **2005**. Mechanism of radiation-induced bystander effect: role of the cyclooxygenase-2 signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 14641-6.
- Zhou X., Liu Z., Jang F., Xiang C., Li Y. & He Y. **2012**. Autocrine Sonic hedgehog attenuates inflammation in cerulein-induced acute pancreatitis in mice via upregulation of IL-10. *PLoS One*, 7, e44121.
- Zhou X., Chen K., Lei H. & Sun Z. **2014**. Klotho Gene Deficiency Causes Salt-Sensitive Hypertension via Monocyte Chemotactic Protein-1/CC Chemokine Receptor 2-Mediated Inflammation. *J Am Soc Nephrol*.
- Zhu Y., Sun Z., Han Q., Liao L., Wang J., Bian C., *et al.* **2009**. Human mesenchymal stem cells inhibit cancer cell proliferation by secreting DKK-1. *Leukemia*, 23, 925-33.
- Zuk P.A., Zhu M., Mizuno H., Huang J., Futrell J.W., Katz A.J *et al.* **2001**. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*, 7, 211-28.
- Zuk P.A. **2010**. The adipose-derived stem cell: looking back and looking ahead. *Mol Biol Cell*, 21, 1783-7.

Titre

Application de la thérapie cellulaire et génique au traitement du syndrome cutané radio-induit

Résumé

Le syndrome cutané radio-induit (SCR), lié à une irradiation localisée de forte dose est une pathologie complexe. Le traitement actuel basé principalement sur l'injection de cellules souches autologues de la moelle osseuse (BM-MSC) est efficace mais reste cependant limité aux cas isolés. Pour optimiser ce traitement, la mise en place de banque de cellules souches issues du tissu adipeux (ASC, plus abondantes que les BM-MSC), a été évaluée sur un modèle *in vivo* de SCR. L'intérêt des banques d'ASC autologues ainsi que la complexité du traitement par ASC allogéniques ont été mis en évidence. La faisabilité d'une optimisation du sécrétome des ASC par la protéine Sonic Hedgehog via une technique de thérapie génique transitoire a également été démontrée. L'étude des effets du sécrétome des ASC manipulées ou non sur des fibroblastes irradiés a mis en évidence l'implication de leurs facteurs paracrines dans des processus clés de la régénération tissulaire. L'ensemble de ces travaux permettent d'envisager la mise en place de nouvelles stratégies thérapeutiques pour le SCR, applicables aux accidents de masse et aux patients victimes d'irradiation hétérogène associée.

Mots clés : Thérapie cellulaire ; Thérapie génique ; Cellules souches dérivées du tissu adipeux ; Syndrome cutané radio-induit ; Sonic Hedgehog

Title

Application of cell and gene therapy to treat cutaneous radiation syndrome

Abstract

Cutaneous radiation syndrome (CRS) caused by high dose local irradiation is a complex pathology. Currently, its treatment is mainly based on bone marrow mesenchymal stem cell (BM-MSC) injections which are efficient but limited to isolated cases. In order to optimize this treatment, autologous and allogeneic adipose tissue derived stem cell banks (ASC, more abundant than BM-MSC) have been evaluated in an *in vivo* model of CRS. Interest of autologous ASC banking and the complexity of allogeneic banks have been highlighted. The feasibility of ASC secretome optimization through the secretion of Sonic Hedgehog protein using transient gene therapy has also been demonstrated. Finally, the role of ASC (manipulated or not) paracrine factors in key processes of tissue regeneration have been shown on irradiated fibroblasts. This work suggests that new therapeutic strategies for CRS may be proposed in case of mass casualties and for victims with heterogeneous irradiation.

Keywords: Cell therapy; Gene Therapy; Adipose tissue derived stem cells; Cutaneous radiation syndrome; Sonic Hedgehog

Intitulé et adresse du laboratoire:

Institut de Recherche Biomédicale des Armées
Centre Ernest Duchesne
BP73
91223 BRETIGNY SUR ORGE cedex

Adresse mail : diane.riccobono@gmail.com