

Potentiel thérapeutique des cellules souches mésenchymateuses humaines dans les lésions cutanées radioinduites

par Morad Bensidhoum^{1*}, Stéphanie Gobin^{1,2*}, Alain Chapel³, Gilles Lemaitre^{1,2}, Stéphan Bouet⁴, Gilles Waksman^{1,2}, Dominique Thierry³ et Michèle T. Martin^{1,2#}

¹Service de Génomique Fonctionnelle, CEA, 2, rue Gaston Crémieux, Evry, 91057 France.

E-mail : michele.martin@cea.fr; ²EA2541, Université d'Evry Val d'Essonne; ³LTCRA Laboratoire de Thérapie Cellulaire et de Radioprotection Accidentelle IRSN/DRPH/SRBE, BP 17, 92262, Fontenay aux Roses France;

⁴UMR CEA INRA Radiobiologie et Étude du Génome, Jouy en Josas, France.

*Contribution égale des deux premiers auteurs. #Auteur correspondant

Reçu le 19 octobre 2005

RÉSUMÉ

Les connaissances récentes acquises sur les cellules souches adultes permettent d'envisager des applications de thérapie cellulaire pour la cicatrisation cutanée. Les cellules mésenchymateuses (CSM), issues de la moelle osseuse, sont des cellules candidates pour une telle application car elles sont multipotentes. Après un traitement anticancéreux par radiothérapie, les séquelles cutanées sont fréquentes et posent des problèmes thérapeutiques non résolus. Nous avons donc testé chez la Souris NOD/SCID la capacité de CSM d'origine humaine à participer à la cicatrisation d'une peau irradiée. Dans ce modèle, une lésion cutanée sur une patte arrière est obtenue par une exposition à 30 Gy de rayons γ . Le pic de lésions est situé autour de

la troisième semaine et la cicatrisation est complète à treize semaines. Les CSM humaines sont injectées par voie intraveineuse vingt quatre heures après irradiation. L'analyse du score clinique montre une diminution significative de la sévérité des lésions chez les souris greffées. Six semaines après l'exposition, la présence de cellules dérivées des CSM humaines est détectée dans les zones cicatricielles par PCR quantitative et en histologie. Ces premiers résultats montrent que les CSM injectées par voie intraveineuse sont capables de migrer vers une lésion cutanée et de participer directement à sa réparation. Ils ouvrent des perspectives de thérapie cellulaire par les CSM pour la cicatrisation cutanée.

SUMMARY Therapeutic effect of human mesenchymal stem cells in skin after radiation damage

Over 50 % of all cancer patients presently receive radiotherapy at one stage in their treatment course. Inevitably skin is one of the most frequently damaged tissue due to its localization and constant turn-over. Our present goal is to reduce radiation-induced complications in human skin through stem cell therapy, particularly in human epidermis. Mesenchymal Stem Cells (MSCs) have been shown to be multipotent cells able to engraft in many tissues after injury. Herein, we isolated human MSCs and tested their capability to improve skin wound healing after irradiation. This potential was assessed in NOD/SCID mice which received 30 Gy locally on the thigh. This dose caused within

3 weeks local epidermis necrosis which was repaired within 13 weeks. MSCs were intravenously injected in irradiated mice 24 hours after exposure. Clinical scoring throughout 6 weeks gave indications that human MSCs reduced the extent of damage and accelerated the wound healing process. We show by quantitative qPCR and histological studies the presence of human MSCs derived cells into the scar. Human MSCs homed to the damaged skin and participated to the wound healing process. These results open prospects for cellular therapy by MSCs in irradiated epithelial tissues and could be extended to the whole general field of cutaneous cicatrization, particularly after burns.

INTRODUCTION

Les connaissances récentes acquises sur les cellules souches adultes permettent d'envisager des applications de thérapie cellulaire pour de nombreuses pathologies. Un

type de cellules, les cellules souches mésenchymateuses (CSM), semble particulièrement intéressant pour ces applications. Décrites dans les années 1970 (Friedenstein et al., 1970), ces cellules ont un pouvoir de prolifération élevé et sont multipotentes, car elles peuvent donner nais-

sance à des lignées stromales, adipocytaires, chondrocytaires et ostéoblastiques. Plus tard, d'autres auteurs ont décrit une potentialité encore plus large puisque ces cellules peuvent donner naissance aux lignages musculaires sarcomériques et se différencier en cellules endothéliales, hépatocytaires, astrocytaires, neuronales et épithéliales (Lakshmiathy & Verfaillie, 2005 ; Caplan, 2005). De plus, il a été montré que les CSM humaines peuvent être transplantées après culture *ex vivo* (Deans et al., 2000). Ces résultats ont permis de proposer de nouvelles possibilités de thérapie cellulaire pour le traitement de multiples lésions tissulaires. Un premier essai clinique de phase I a démontré l'innocuité de la greffe des CSM (Koc et al., 2000). Depuis, des essais cliniques ont été réalisés dans le cadre de la réparation des pertes osseuses, de l'ostéogenèse imparfaite et en hématologie dans la réparation du microenvironnement médullaire ou dans la lutte contre la GVHD post allogreffe (Le Blanc et al., 2005).

Les premiers travaux montrant que les CSM pourraient être impliquées dans la cicatrisation cutanée ont été publiés en 2000 dans le modèle de greffe *in utero* chez le Mouton (Liechty et al., 2000). Dans cette étude, plusieurs semaines après une greffe de CSM dans le fœtus de mouton, des cellules humaines ont été observées dans le derme au niveau de la queue. Chez la Souris, il a été montré que des cellules de la moelle osseuse de souris pouvaient participer à la réparation cutanée, avec une migration et une différenciation de ces cellules dans l'épiderme (Badiavas et al., 2003 ; Borue et al., 2004). Plus récemment une équipe japonaise (Nakagawa et al., 2005) et une équipe américaine (Mansilla et al., 2005) ont montré l'implication des CSM humaines dans l'accélération du processus de cicatrisation cutanée chez la Souris et le Rat « nude ». Toutes les études citées pour la Souris et le Rat ont été effectuées sur des lésions cutanées provoquées par excision.

Notre groupe s'intéresse à la cicatrisation cutanée en terrain irradié. La peau est le premier tissu lésé lors d'une exposition externe aux rayonnements ionisants. Historiquement, c'est l'observation des brûlures aux mains chez les radiologues utilisant les premiers rayons X qui a permis de mettre en évidence la toxicité de ces rayonnements. Aujourd'hui, l'irradiation de la peau reste parfois inévitable, notamment dans le cadre du traitement des tumeurs par radiothérapie externe.

Les lésions de la peau résultant de l'exposition d'un individu à une source de radiations ionisantes sont appelées radiodermes (Archambeau et al., 1995). Pendant la radiothérapie, la peau réagit selon une séquence bien définie, avec plusieurs vagues d'érythèmes. Un érythème transitoire apparaît pendant la première semaine. Après quinze jours, l'érythème typique se développe, la peau devenant alors rouge et oedémateuse. L'épiderme sèche se manifeste pour des doses supérieures à 20 Gy : la peau se dépigmente, devient sèche avec une desquamation fine et un léger prurit. Pour des doses supérieures à 40 Gy, la phase d'érythème peut être suivie d'une épidermite exsudative. Elle se traduit par la mise à nu du derme, avec suintement séreux et douleur locale. L'épidermite exsudative impose l'arrêt de l'irradiation, une désinfection locale et des pansements adaptés ; elle cicatrise sans

séquelle en un à deux mois. Elle est maintenant devenue rare avec les appareils modernes de traitement. Certains patients se révèlent hypersensibles et développent très rapidement des épidermites exsudatives et des ulcérations cutanées pendant le traitement, nécessitant alors une greffe de peau. Pour l'ensemble de ces réactions précoces, bénignes ou sévères, la cible cellulaire majeure de l'irradiation est la population de cellules proliférantes, et donc les kératinocytes de la couche basale proliférative.

Des facteurs de croissance et cytokines ont été testés dans le but de traiter ces lésions précoces (Mendelsohn et al., 2002). Ainsi le TGF- β 1 (*Transforming growth factor β 1*) administré localement permet d'améliorer la cicatrisation de la peau irradiée chez le rat (Nall et al., 1996). Le GM-CSF (*Granulocyte-macrophages colony-stimulating factor*) a été étudié en application cutanée chez des patients de radiothérapie. Il s'est révélé capable de diminuer la durée des radiodermes et d'accélérer la cicatrisation (Kouvaris et al., 2001).

L'irradiation peut également provoquer des effets tardifs au niveau de la peau qui se développent au cours des mois et des années qui suivent le traitement. Ces effets tardifs, comme les télangiectasies, l'atrophie cutanée ou encore la fibrose, sont liés à l'atteinte de l'ensemble des composants du tissu cutané, épiderme, derme et hypoderme (Martin et al., 2000). Ainsi, un an après le traitement, la peau peut être hyperplasique, la fibrose dermique provoquant alors une induration de la peau. Elle est associée à une acanthose et à une kératose de l'épiderme (Sivan et al., 2002). Elle peut être au contraire atrophique, avec un épiderme fin et sec du à l'absence des glandes sébacées, un derme atrophique et un réseau vasculaire raréfié. La peau reste fragile, sensible aux infections et aux traumatismes. Une radioderme chronique peut s'installer avec un risque de radionécrose tardive et un risque de cancer cutané.

Le traitement des séquelles radio-induites est classiquement difficile. Les corticoïdes sont utilisés pour réduire l'inflammation. L'administration de SOD (superoxyde dismutase), une enzyme cellulaire du métabolisme antioxydant, a permis de démontrer pour la première fois la réversibilité d'une fibrose cutanée établie (Delanian et al., 1994). Des résultats intéressants ont également été obtenus par l'association de la pentoxifylline et de la vitamine E (Delanian & Lefaix, 2004).

Dans cette étude, nous avons testé l'utilisation de la thérapie cellulaire par les cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse humaine dans les lésions cutanées précoces. La capacité de ces cellules à participer à la cicatrisation d'une lésion de la peau provoquée par une irradiation γ a été étudiée chez la souris NOD/SCID.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Isolement et mise en culture des cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse humaine

Les cellules médullaires sont isolées d'échantillons de moelle osseuse provenant d'aspirat de crête iliaque. Les

prélèvements sont obtenus après consentement des donneurs sains. Les cellules mononucléées de la moelle osseuse sont isolées sur un gradient de densité, puis les cellules mésenchymateuses sont isolées sur leur capacité d'adhérence au plastique de culture. Les cellules sont amplifiées pendant 2 à 4 semaines, et l'analyse phénotypique est effectuée afin de vérifier l'absence de contamination par les cellules hématopoïétiques.

Irradiation des souris NOD/SCID et greffe

Tous les protocoles ont été effectués en accord avec la réglementation sur l'expérimentation animale. Les souris NOD/SCID (NOD-LtSz-scid/scid) sont maintenues dans des conditions stériles sous cages à couvercle. Ces souris immunodéficientes ne rejettent pas les greffes de cellules humaines. Les souris NOD/SCID reçoivent une dose globale de 3,2 Gy et une dose locale de 30 Gy au niveau de la patte arrière droite. Vingt quatre heures après irradiation, les CSM sont injectées au niveau de la queue, par voie intraveineuse, dans le groupe greffé.

Préparation et analyse par PCR en temps réel de l'ADN

L'ADN génomique pour l'analyse par PCR est préparé à partir d'échantillons de peau par extraction au phénol/chloroforme comme décrit précédemment (Bensidhoum *et al.*, 2004). L'analyse de l'ADN est effectuée par PCR quantitative en temps réel avec la technologie Taq-Man (Applied Biosystems). Nous avons utilisé la sonde et les amorces spécifiques pour le gène de la β -GLOBINE humaine pour détecter la présence d'ADN humain. Parallèlement, le gène murin de la RAPSINE a été utilisé comme témoin d'amplification interne. Nous avons montré qu'il n'y a pas de réactions croisées entre le génome humain et murin pour l'amplification des gènes β -GLOBINE et RAPSINE avec les couples d'amorces choisis.

Immunohistologie

Afin de déterminer la présence de cellules humaines dans la peau des souris greffées, nous avons choisi un anticorps dirigé contre la protéine β -2-microglobuline. Cet anticorps est spécifique des cellules humaines et ne croise pas avec les cellules murines. Après sacrifice des souris, les échantillons de peau sont fixés et inclus dans la paraffine pour la réalisation des coupes de 5 μ m.

RÉSULTATS

Établissement du modèle de lésion cutanée

Afin de valider notre hypothèse de travail concernant la capacité des CSM humaines à participer à la régénération de la peau lésée, nous avons mis au point un modèle de lésion radioinduite du tissu cutané chez la souris NOD/SCID. Les souris NOD/SCID (*non-obese diabetic-severe combined immunodeficient*) présentent

un défaut en lymphocytes B et T fonctionnels avec une forte réduction du nombre de lymphocytes T et de cellules NK. Il en résulte une immunodéficiência sévère qui permet une greffe xénogénique.

Les souris NOD/SCID sont irradiées à 30 Gy au niveau de la patte arrière droite pour produire une lésion cutanée, et à 3,2 Gy sur le corps entier pour diminuer l'éventuelle contribution des cellules de la moelle endogène. Une observation clinique des souris est ensuite effectuée chaque semaine de manière à enregistrer un ensemble de 6 paramètres incluant le poids, l'extension de la patte et le développement des lésions cutanées. Les lésions sont notées de 0 pour un état normal à 4 pour une lésion sévère, ce qui permet d'établir un score clinique par souris chaque semaine, qui reflète le développement des lésions cutanées puis leur cicatrisation au cours du temps.

Les lésions se développent à partir de la deuxième semaine, avec une lésion maximale autour de la quatrième semaine. Dans une première phase, on observe une inflammation et un œdème localisés au niveau de la zone irradiée, puis, dans une seconde phase, une desquamation sèche suivie d'une desquamation humide. Les lésions sont essentiellement localisées au niveau de l'épiderme. Une minorité de souris présente une nécrose, qui peut alors atteindre le derme. La phase de cicatrisation débute entre les semaines 4 et 5. Au bout de 13 semaines, cette cicatrisation est complète au niveau de la peau avec un état général normal. Il ne persiste au niveau de la patte irradiée qu'une diminution de l'extension maximale.

Le score clinique que nous avons établi pour chaque souris permet d'évaluer l'effet de la greffe des CSM. Il apparaît que la cinétique de développement des lésions radio-induites suit une courbe similaire entre les souris témoins et les souris greffées, avec un pic de lésion à 3-4 semaines suivi d'une phase de cicatrisation. Cependant les souris greffées développent des lésions moins sévères que les témoins, ainsi qu'une cicatrisation accélérée. Une analyse statistique du score calculé à partir de 6 paramètres montre une différence significative entre les deux groupes. Ces résultats nous permettent de conclure que la greffe de CSM a un effet sur la réparation de la lésion cutanée radio induite.

Migration des cellules souches mésenchymateuses humaines dans la peau de souris

L'analyse des lésions cutanées a été ensuite effectuée sur des coupes histologiques de tissus témoins et de peaux irradiées (Fig. 1). Dans la peau des souris irradiées, on observe à 3 semaines une desquamation humide. Le derme est hyperplasique avec une prolifération fibroblastique importante et une accumulation de matrice extracellulaire. Entre la troisième et la quatrième semaine, un bourgeon cicatriciel épidermique se forme. Treize semaines après irradiation, la lésion est cicatrisée mais l'épaississement des couches suprabasales de l'épiderme (acanthose et kératose) est encore présent.

Pour étudier l'effet de la greffe des CSM, les souris sont sacrifiées six semaines après l'irradiation. Des échantillons de peau de la patte arrière droite sont préle-

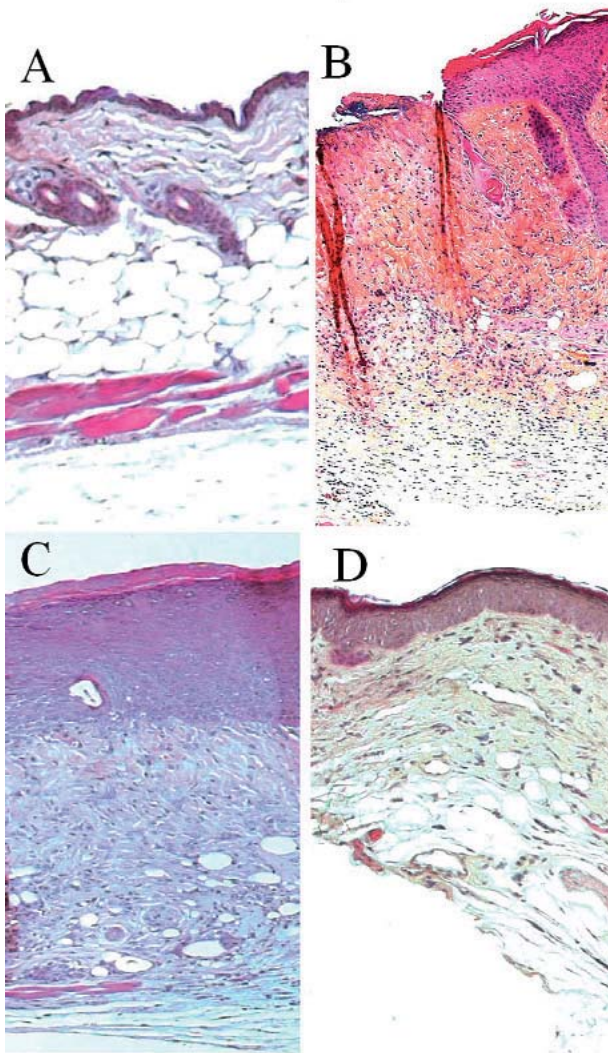


FIG. 1. – Coupe histologique de peau de souris NOD/SCID témoin et irradiée après coloration à l'hématoxyline-éosine. Grossissement $\times 10$.

A : peau témoin. B : peau irradiée, 3 semaines après irradiation. Au pic de lésion, on observe une desquamation humide sévère avec la formation d'un bourgeon cicatriciel. Le derme présente une hyperplasie caractérisée par une infiltration cellulaire et une accumulation de matrice extracellulaire. C : peau de souris irradiée, 6 semaines après irradiation. On observe dans le derme une prolifération fibroblastique importante et une accumulation de matrice extracellulaire. La lésion est cicatrisée, il persiste une hyperplasie des couches suprabasales de l'épiderme (acanthose et kératose). D : peau de souris irradiée, 13 semaines après irradiation. L'hyperplasie de l'épiderme est encore présente.

vés au niveau de la zone de lésion. Des échantillons de peau du dos ainsi que de la patte arrière gauche sont prélevés comme témoins. L'ADN génomique est extrait afin de détecter, par PCR quantitative, la présence du gène de la β -GLOBINE humaine. Afin de s'affranchir des variations de quantité d'ADN génomique d'un échantillon à l'autre, l'amplification du gène RAPSUNE murin est utilisée comme témoin interne. Chez la moitié des souris greffées, on détecte de l'ADN humain dans la

patte irradiée. Aucune cellule humaine n'a été détectée au niveau de la patte témoin et du dos chez ces mêmes souris. Nous pouvons conclure que les cellules dérivées des CSM humaines peuvent migrer vers une blessure cutanée induite dans la peau de souris.

Localisation des cellules souches mésenchymateuses humaines dans la peau de souris

Afin de déterminer la participation des CSM humaines à la régénération de la peau lésée, nous avons analysé sur coupes histologiques les échantillons de peau prélevés lors du sacrifice des souris à 6 semaines. Un marquage avec l'anticorps reconnaissant la β -2-microglobuline humaine a été réalisé pour localiser les cellules humaines dans la peau de souris. Cette protéine membranaire ubiquitaire est retrouvée dans les cellules humaines qui expriment des antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité. Nous avons testé la spécificité de cet anticorps dans le tissu cutané. Les coupes de peau de souris sont négatives alors que les coupes de peau humaine présentent un marquage de la β -2-microglobuline humaine au niveau des membranes cellulaires. L'analyse des coupes de tissus des souris greffées avec les CSM confirme les résultats de PCR. A six semaines, on observe chez les souris positives en ADN humain la présence de cellules humaines. Ces cellules sont localisées dans les zones cicatricielles. Ces résultats démontrent que les CSM humaines peuvent participer directement à la cicatrisation cutanée.

DISCUSSION

Il est connu que les cellules de la moelle osseuse participent à la cicatrisation des lésions cutanées par l'intermédiaire des cellules de l'inflammation. Ces cellules produisent localement des cytokines et induisent une cascade d'événements incluant une migration vers le site de la lésion de cellules d'origines différentes : hématopoïétique, vasculaire, dermique et épidermique. Si les populations cellulaires hématopoïétiques contiennent des cellules souches, ces dernières peuvent alors participer à la régénération du tissu lésé. Il a été démontré chez la Souris et le Rat que les cellules souches mésenchymateuses humaines peuvent accélérer la réparation tissulaire de lésions cutanées provoquées par excision. L'équipe de Mansilla (Mansilla et al., 2005) a utilisé une combinaison d'injection de CSM par voie intraveineuse et d'application locale de CSM dans un implant chez la souris. Ces auteurs ont obtenu une accélération de la réparation cutanée avec cette combinaison, qui permet d'obtenir une cicatrisation en 14 jours alors que les témoins cicatrisent en 30 jours. Par contre, ils n'ont pas d'effet sur le temps de cicatrisation lorsqu'ils utilisent l'injection intraveineuse seule. Ces auteurs n'ont pas étudié les mécanismes de cet effet thérapeutique.

L'équipe de Nakagawa (Nakagawa et al., 2005) a utilisé une greffe d'équivalent dermique en présence ou absence de CSM humaines sur la zone d'excision. La réduction de la taille de la lésion cutanée, mesurée à 3 et 7 jours, a été accélérée par la greffe de CSM. Pour apprécier

hender les mécanismes de cet effet thérapeutique, l'expression de marqueurs épidermiques spécifiquement humains a été recherchée à l'aide d'un anticorps pancytoprotéine humaine. Ces marqueurs humains sont exprimés dans l'épiderme cicatriciel de rat, démontrant la participation directe des CSM au processus global de cicatrisation.

Notre modèle de lésion cutanée radioinduite est différent du modèle de blessure par excision puisque les lésions apparaissent une semaine après l'irradiation et sont maximales à trois semaines. Ceci nous permet d'observer deux phases, d'abord un développement de lésions puis leur cicatrisation, ainsi que l'effet de la greffe de CSM dans chaque phase. Nos résultats montrent que la greffe des CSMs humaines en intraveineuse 24 heures après irradiation a deux effets : elle réduit l'intensité des lésions cutanées et facilite leur cicatrisation. Ces résultats confirment l'intérêt de l'apport des CSM pour la cicatrisation cutanée. Par contre, ils diffèrent de ceux du groupe de Mansilla, car nous montrons que cet effet est obtenu avec une injection par voie intraveineuse seule. Nous montrons de plus que cet effet est lié à une migration dans la peau lésée, puisque l'ADN humain et une protéine humaine sont détectés dans la zone cicatricielle à six semaines. Comme pour le groupe de Nakagawa, nos résultats suggèrent donc une participation directe des cellules mésenchymateuses au processus de cicatrisation cutanée. Ces résultats démontrent la capacité de migration des CSM vers le site de lésion. A notre connaissance, c'est la première fois que ce processus est décrit pour les lésions cutanées. Ceci n'exclut pas d'autres mécanismes possibles, comme une libération locale de facteurs par les CSM pour accélérer la cicatrisation dans la peau lésée.

Des études complémentaires sont nécessaires pour mieux comprendre les effets thérapeutiques des cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse. Nous sommes particulièrement intéressés par la plasticité de ces cellules, qui semble large comme le montrent les études réalisées sur les mécanismes de la différenciation des CSM vers un phénotype de cellules hépatiques ou de cellules de l'épithélium pulmonaire. L'ensemble de ces résultats permettra d'apporter des éléments de réponse tant dans le domaine de l'application clinique à la cicatrisation cutanée que dans celui de la biologie de ce type de cellules souches.

BIBLIOGRAPHIE

Archambeau J. O., Pezner R. & Wasserman T., Pathophysiology of irradiated skin and breast, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 1995, 31, 1171-1185.

Badiavas E. V., Abedi M., Butmarc J., Falanga V. & Quesenberry P., Participation of bone marrow derived cells in cutaneous wound healing. *J. Cell Physiol.*, 2003, 196, 245-250.

Bensidhoum M., Chapel A., Francois S., Demarquay C., Mazurier C., Fouillard L., Bouchet S., Bertho J. M., Gourmelon P., Aigueperse J., Charbord P., Gorin N. C., Thierry D. & Lopez M., Homing of *in vitro* expanded Stro-1- or Stro-1+ human mesenchymal stem cells into the NOD/SCID mouse and their role in supporting human CD34 cell engraftment. *Blood*, 2004, 103, 3313-3319.

Borue X., Lee S., Grove J., Herzog E. L., Harris R., Diflo T., Glusac E., Hyman K., Theise N. D. & Krause D. S., Bone marrow-derived cells contribute to epithelial engraftment during wound healing. *Am. J. Pathol.*, 2004, 165, 1767-1772.

Caplan A. I., Mesenchymal stem cells: cell-based reconstructive therapy in orthopedics. *Tissue Eng.*, 2005, 11, 1198-1211.

Deans R. J. & Moseley A. B., Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp. Hematol.*, 2000, 28, 875-884.

Delanian S., Baillet F., Huart J., Lefaix J. L., Maulard C. & Housset M., Successful treatment of radiation-induced fibrosis using liposomal Cu/Zn superoxide dismutase: clinical trial. *Radiother. Oncol.*, 1994, 32, 12-20.

Delanian S. & Lefaix J. L., The radiation-induced fibroatrophic process: therapeutic perspective via the antioxidant pathway. *Radiother. Oncol.*, 2004, 73, 119-131.

Friedenstein A. Y. & Lalykina K. S., Lymphoid cell populations are competent systems for induced osteogenesis. *Calcif. Tissue Res.*, 1970, Suppl., 105-106.

Gillitzer R. & Goebeler M., Chemokines in cutaneous wound healing. *J. Leukoc. Biol.*, 2001, 69, 513-521.

Koc O. N., Gerson S. L., Cooper B. W., Dyhouse S. M., Haynesworth S. E., Caplan A. I. & Lazarus H. M., Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy. *J. Clin. Oncol.*, 2000, 18, 307-316.

Kouvaris J. R., Kouloulis V. E., Plataniotis G. A., Kokakis J. D. & Vlahos L. J., Topical granulocyte-macrophage colony-stimulating factor for radiation dermatitis of the vulva. *Br. J. Dermatol.*, 2001, 144, 646-647.

Lakshmiathy U. & Verfaillie C., Stem cell plasticity. *Blood Rev.*, 2005, 19, 29-38.

Le Blanc K. & Ringden O., Immunobiology of human mesenchymal stem cells and future use in hematopoietic stem cell transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.*, 2005, 11, 321-334.

Liechty K. W., MacKenzie T., Shaaban A. F., Radu A., Moseley A. M., Deans R., Marshak D. R. & Flake A. W., Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after *in utero* transplantation in sheep. *Nat. Med.*, 2000, 6, 1282-1286.

Mansilla E., Marin G. H., Sturla F., Drago H. E., Gil M. A., Salas E., Gardiner M. C., Piccinelli G., Bossi S., Petrelli L., Iorio G., Ramos C. A. & Soratti C., Human mesenchymal stem cells are tolerated by mice and improve skin and spinal cord injuries. *Transplant. Proc.*, 2005, 37, 292-294.

Martin M., Lefaix J. & Delanian S., TGF- β 1 and radiation fibrosis: a master switch and a specific therapeutic target? *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 2000, 47, 277-290.

Mendelsohn F. A., Divino C. M., Reis E. D. & Kerstein M. D., Wound care after radiation therapy. *Adv. Skin Wound Care*, 2002, 15, 216-224.

Nakagawa H., Akita S., Fukui M., Fujii T. & Akino K., Human mesenchymal stem cells successfully improve skin-substitute wound healing. *Br. J. Dermatol.*, 2005, 153, 29-36.

Nall A. V., Brownlee R. E., Colvin C. P., Schultz G., Fein D., Cassisi N. J., Nguyen T. & Kalra A., Transforming growth factor β 1 improves wound healing and random flap survival in normal and irradiated rats. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.*, 1996, 122, 171-177.

Sivan V., Vozenin-Brotans M. C., Tricaud Y., Lefaix J. L., Cosset J. M., Dubray B. & Martin M. T., Altered proliferation and differentiation of human epidermis in cases of skin fibrosis after radiotherapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 2002, 53, 385-393.