

# COMMENT JE TRAITE...

## HOLOCLAR<sup>®</sup>, UNE GREFFE AUTOLOGUE DE CELLULES SOUCHES POUR RENDRE LA VUE APRÈS BRÛLURES OCULAIRES

TILKIN C (1), DUCHESNE B (1), CAMBY S (1), PELLEGRINI G (2)

**RÉSUMÉ :** Les brûlures oculaires chimiques ou physiques représentent actuellement 12 % des accidents domestiques en Europe. Ces accidents peuvent entraîner de nombreuses séquelles au niveau ophtalmologique allant de la simple kératite superficielle jusqu'à l'ischémie conjonctivale et la destruction des cellules souches limbiques cornéennes. En résultent des atteintes de la cornée pouvant évoluer vers une néovascularisation et une invasion de tissu conjonctival parfois cécitante, une dégradation stromale, des infections, voire même une perforation oculaire avec perte de la fonction oculaire. Jusqu'à présent, peu de traitements étaient disponibles pour rétablir une transparence cornéenne à distance du traumatisme, et les patients avec une déficience post-traumatique en cellules souches limbiques n'avaient malheureusement que peu de perspective. La thérapie cellulaire régénérative, dont fait partie Holoclar<sup>®</sup>, pourrait révolutionner l'avenir de ces patients.

**MOTS-CLÉS :** *Brûlure oculaire - Cornée - Holoclar<sup>®</sup> - Cellules souches limbiques*

**HOLOCLAR<sup>®</sup>, AN AUTOLOGOUS STEM CELLS GRAFT FOR SIGHT RECOVERY AFTER OCULAR BURNS**

**SUMMARY :** Ocular chemical or physical burns currently represent 12 % of domestic accidents in Europe. They can lead to numerous ophthalmologic sequelae ranging from simple superficial keratitis to conjunctival ischemia and the destruction of limbal corneal stem cells. This results in damages to the cornea which can progress to neovascularization and corneal invasion by conjunctival tissue. Long term consequences affect ocular function (sometimes blindness, stromal degradation, infections, or even ocular perforation). Until now, few treatments were available to restore corneal transparency after a trauma. Patients affected by post-traumatic limbal stem cell deficiency unfortunately had little prospect. Regenerative cell therapy, of which Holoclar<sup>®</sup> is a part, could revolutionize the future of these patients.

**KEYWORDS :** *Ocular burn - Cornea - Holoclar<sup>®</sup> - Limbal stem cells*

### RAPPEL SUR LES CELLULES SOUCHES ET LA RÉGÉNÉRATION CORNÉENNE

Les cellules souches sont des cellules capables d'auto-renouvellement et de différenciation en cellules spécialisées afin de maintenir l'intégrité d'un organisme ou le développement de celui-ci. Elles sont définies par leur potentiel de différenciation (cellules souches pluripotentes, multipotentes et unipotentes). Les cellules souches et la compréhension des mécanismes biologiques de la différenciation cellulaire sont particulièrement prometteurs en médecine régénérative et offrent des perspectives thérapeutiques dans bien des domaines.

La cornée est une membrane transparente qui recouvre l'œil. Son rôle est important par ses propriétés réfractives, anti-microbiennes; elle agit comme une barrière partiellement perméable. Elle est composée de 5 couches essentielles : l'épithélium, la membrane de Bowman, le stroma, la membrane de Descemet et l'endothélium (Figure 1).

L'épithélium, la couche la plus externe, est de type pavimenteux stratifié et non kératinisé. Il s'agit de la première structure de l'œil en contact avec l'environnement extérieur. Ce tissu possède une capacité de régénération rapide grâce à un pool de cellules souches limbiques (LSC) situé dans l'épithélium basal, au niveau du limbe cornéen (zone de transition entre la conjonctive bulbaire et la cornée claire). Cette zone d'épithélium est composée de cellules de Langerhans, de cellules palissadiques de Vogt, de mélanocytes et de cellules souches. Ces dernières ont une activité mitotique importante en cas de dommages épithéliaux et expriment le facteur de transcription nucléaire TP63. Elles jouent donc un rôle primordial dans l'intégrité et la régénération de l'épithélium cornéen (1-3).

Les LSC sont essentielles au maintien de l'intégrité et de la transparence épithéliale. Thoft et coll. ont proposé l'hypothèse selon laquelle les LSC ont une activité mitotique conservée à long terme et génèrent des cellules amplificatrices transitoires (TAC) qui migrent de manière centripète et antérieurement pour devenir des cellules épithéliales cornéennes différenciées (4).

Les dommages directs aux LSC et/ou la destruction de leur microenvironnement entraînent un déficit en cellules souches limbiques (LSCD). En conséquence, l'épithélium cornéen ne se régénère plus et les cellules épithéliales conjonctivales envahissent progressivement la

(1) Service d'Ophtalmologie, CHU Liège, Belgique.  
(2) Centre de Médecine régénérative, Université de Modène et Région Emilia; Holostem Therapie Avanzate, Italie.

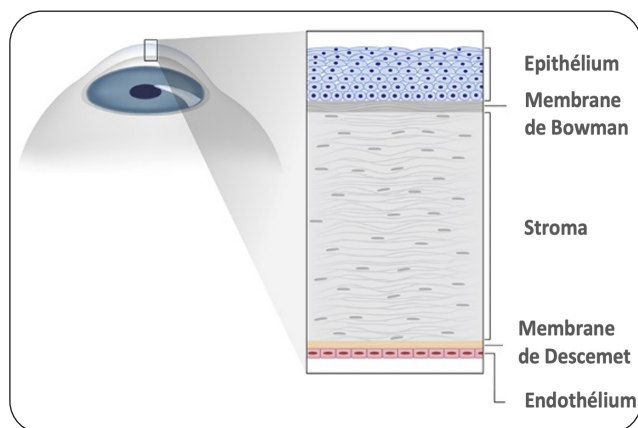
**Figure 1. Structure de la cornée.**

Illustration: Pr G. Pellegrini

cornée. Une néovascularisation peut survenir dans l'épithélium ainsi qu'un remodelage du stroma avec une opacification conduisant à une perte de vision. De nombreuses étiologies sont à l'origine d'un LSCD comme le syndrome de Stevens-Johnson, la pemphigoïde cicatricielle, les dystrophies épithéliales, les anomalies congénitales (dysplasie ectodermique, aniridie,...) ainsi que les brûlures chimiques ou thermiques (5).

## PRISE EN CHARGE DES BRÛLURES OCULAIRES

Les brûlures chimiques et thermiques sont à l'origine de 18 % des dommages oculaires (6) et de 0,33 cas/10.000 cas de LSCD (7). Parmi les brûlures chimiques, les brûlures par agents alcalins sont les plus cécitantes. Le pH basique entraîne une réaction de saponification au niveau des membranes lipidiques cellulaires épithéliales. La rupture de la barrière épithéliale permet une pénétration en profondeur des dérivés alcalins, entraînant rapidement un appel osmotique dans la conjonctive et la cornée, et un changement au niveau de l'ultrastructure fibrillaire du collagène stromal. Les brûlures par acides possèdent, par définition, un pH < 7. Leur pénétration au sein des tissus lors d'une exposition est souvent moins rapide à même dosage et concentration. Les brûlures thermiques sont plus dommageables à hautes températures, dépassant la température d'ébullition des fluides biologiques (6).

La première réaction physiologique à une brûlure est un relargage de médiateurs pro-inflammatoires (prostaglandine, substance P,

interleukines 8 et 1 et VEGF) produits par l'épithélium résiduel ou les kératinocytes du stroma. Ces nombreux médiateurs sont à l'origine de l'inflammation et de l'opacification cornéenne.

Rappelons que la prise en charge immédiate d'une brûlure oculaire consiste à rincer la surface de l'œil avec de l'eau claire ou du Previn (un agent amphotérique qui réduit les dommages oculaires en cas de brûlure par agent alcalin). Un autre aspect important est de retirer les particules résiduelles de la surface oculaire. Cette étape peut nécessiter une intervention chirurgicale (8). Dans un second temps (entre 1 et 7 jours après la brûlure), le traitement vise à réduire l'inflammation excessive et gérer/prévenir les complications (8). Après un ou plusieurs mois, lorsque l'état de la surface oculaire est stable, la prise en charge consiste à enlever les cicatrices qui se sont constituées dans le stroma, éventuellement reconstruire les paupières, mais aussi à reconstituer l'intégrité épithéliale de la cornée (9).

Un LSCD partiel peut être traité par une approche conservative qui consiste à stimuler les capacités de régénération des cellules souches restantes. En cas d'échec ou de lésion trop importante, la transplantation de limbe avec/sans cornée est la seule solution à la restauration cornéenne. Cette transplantation peut être réalisée par greffe allogénique telle que l'allogreffe kérato-limnique (KLAL) ou conjonctivale (CLAL), par greffe autologue telle que la greffe autologue conjonctivale-liminaire (CLAU) et/ou par des matériaux synthétiques. Le facteur limitant le plus important dans la réalisation des greffes allogéniques est une disponibilité limitée de cornées de bonne qualité provenant de donneurs. Elles nécessitent également la prise d'immunosuppresseurs pour éviter le rejet, ce qui compromet fortement la réussite de la greffe à 5 ans. La kératoprothèse synthétique (Boston type-1) est une alternative, surtout en cas de risque élevé de rejet ou de défaillance endothéliale après kératoplastie pénétrante. Cependant, de nombreuses complications à long terme sont associées à cette approche (3, 9-11).

La greffe autologue conjonctivale-liminaire (CLAU) a été la première procédure utilisant une biopsie de l'œil sain controlatéral (ou d'une partie encore saine du même œil). Cependant, elle est réservée aux cas de LSCD unilatéraux et nécessite de larges biopsies risquant d'endommager l'œil sain. Une approche alternative est la transplantation épithéliale limnique simple (SLET). Elle consiste en une exérèse de 20 à 30 % du limbe de l'œil sain. La pièce d'exérèse est ensuite coupée en petits morceaux qui sont

répartis sur un support de membrane amniotique humaine alors transplanté (3, 9-12).

En 1997, Pellegrini et coll. ont développé une technique de culture *ex vivo* de cellules épithéliales limbiques (CLET) réalisée à partir d'un petit échantillon du limbe controlatéral sain. Par rapport au CLAU, le CLET a montré une efficacité supérieure dans l'épithélialisation, la cicatrisation et la réduction de l'inflammation (13). En poursuivant leurs travaux, le Professeur Graziella Pellegrini et le Professeur Michele De Luca, du Centre de médecine régénérative de l'Université de Modène et Reggio Emilia, ont élaboré Holoclar® en collaboration avec la firme Chiesi Farmaceutici SpA et Holostem Therapie Avanzate (14, 15). La transplantation de cellules limbiques autologues cultivées a été reproduite par d'autres équipes selon des protocoles qui varient (support de nature différente, conditions de culture, les cellules sources,...) (16,17) .

## HOLOCLAR®

Le traitement repose sur la technique de culture *ex vivo* de cellules épithéliales limbiques (Figure 2). Le traitement consiste à prélever une petite partie (1 à 2 mm<sup>2</sup>) de limbe non endommagé (où résident les cellules souches limbiques autologues) et les cultiver *in vitro* sur un gel de fibrine. Ce dernier a l'avantage d'être très maniable, rapidement dégradé par le corps et est le substrat naturel de la cicatrisation des plaies épithéliales. En outre, le gel de fibrine est fabriqué à partir de sérums et de matériaux approuvés, garantissant un produit standardisé et sûr. De nos jours, la procédure Holoclar® a un taux de réussite de plus de 70 % (2).

Cette technique est suffisante pour restaurer la vue en l'absence de lésions profondes du stroma cornéen. De plus, la combinaison d'Holoclar® et de greffes de cornée peut restaurer une cornée normale pour des brûlures cornéennes profondes, auparavant incurables à long terme. La quantité de tissu à prélever lors de la biopsie ne nécessite pas d'avoir un œil donneur sain à 100 %. Elle peut se réaliser sur un œil partiellement endommagé. Le risque de dommages au reste de l'œil donneur est réduit.

Ce traitement novateur a fait l'objet de plusieurs études cliniques (14, 15). En Belgique, il a reçu une autorisation de mise sur le marché conditionnelle et sa surveillance afin de minimiser les risques est toujours d'actualité. Aujourd'hui accessible aux patients en pratique clinique courante, les critères actuels d'obtention d'un remboursement sont assez nombreux.

**Figure 2. Illustration des étapes de fabrication de Holoclar®.**

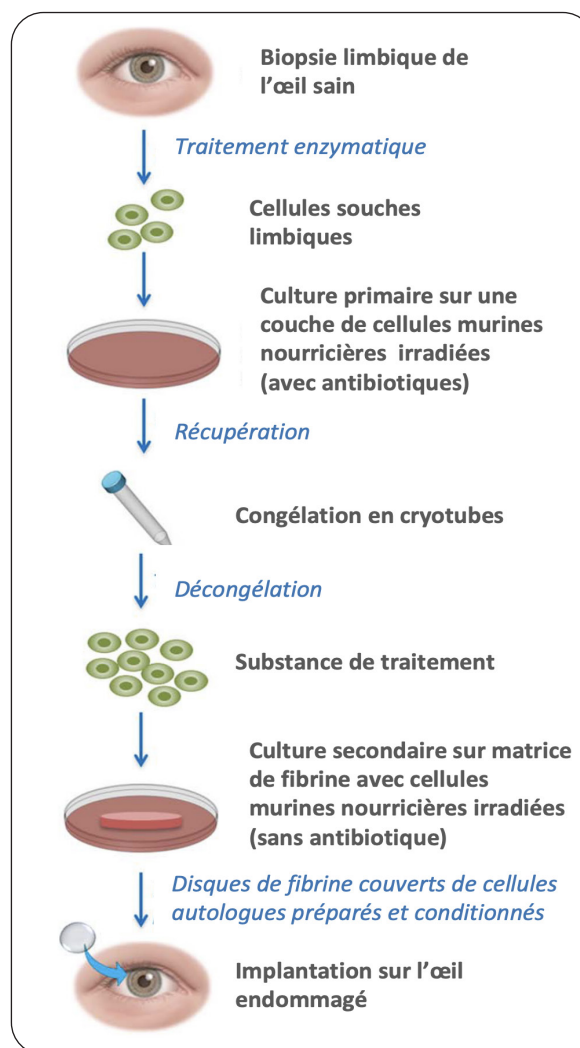


Illustration: Pr G. Pellegrini

Il s'adresse aux patients adultes répondant aux critères suivants :

- Le LSCD est modéré à sévère, stabilisé depuis  $\geq 24$  mois;
- L'atteinte néovasculaire ou l'opacité cornéenne peut être uni- ou bilatérale, et doit entreprendre deux quadrants d'un œil MAIS présente au minimum une zone d'1 à 2 mm<sup>2</sup> de limbe sain pour pouvoir permettre une biopsie de cellules souches;
- L'acuité visuelle doit être inférieure à 1/10 sur l'œil le plus atteint;
- Le déficit a été causé par une brûlure oculaire d'origine chimique ou thermique.

Les situations suivantes sont à exclure :

- Un LSCD léger, incontrôlé;

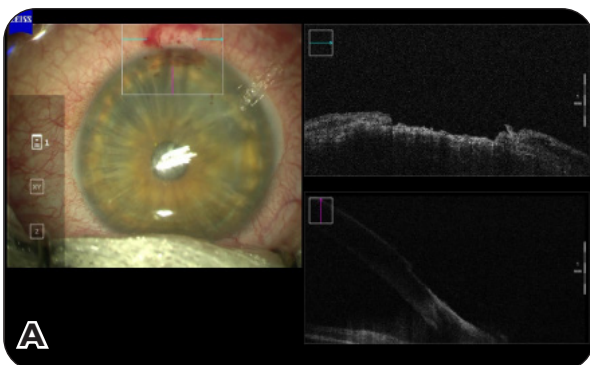
- L'atteinte néovasculaire entreprend moins de deux quadrants;
- Le LSCD est d'origine médicale (ex : radiothérapie), congénitale (ex : aniridie), néoplasique, secondaire à un port de lentilles de contact ou inflammatoire (maladie de Stevens-Johnson, pemphigoïde,...);
- Un test de Schirmer pathologique;
- Une anesthésie cornéenne et conjonctivale;
- Une infection cornéenne en cours;
- Une malposition des paupières, un rétrécissement du fornix conjonctival;
- Une grossesse;
- Les allergies aux excipients de Holoclar®;
- Un état général ne permettant pas une chirurgie ou une prise d'antibiotiques ou corticostéroïdes per os.

Cette procédure exige également des connaissances et compétences chirurgicales spécifiques. Actuellement, seuls deux centres en Belgique sont autorisés à offrir ce traitement. Il s'agit de l'Hôpital Universitaire d'Anvers (UZA) et le Centre Hospitalier Universitaire de Liège (CHU de Liège).

En pratique, la biopsie se réalise sous anesthésie générale ou sous anesthésie locale (Figure 3). Une petite quantité de conjonctive limbique (2 x 2 mm) est prélevée dans l'œil non atteint (si la lésion est unilatérale) ou dans

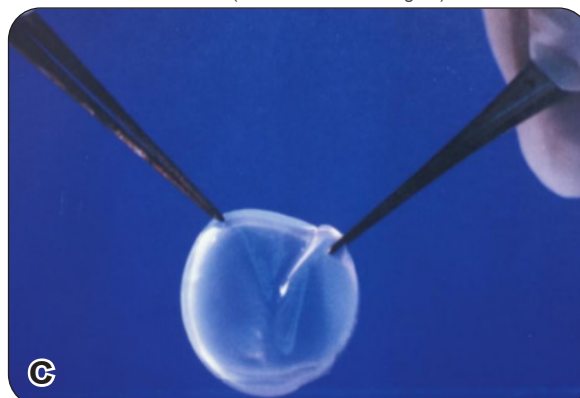
l'œil le moins atteint (si la lésion est bilatérale). Ce prélèvement se réalise idéalement au pôle supérieur ou au pôle inférieur du limbe car les cellules souches y sont plus nombreuses. Le prélèvement est directement placé dans un tube à essai stérile et est pris en charge par Holostem pour être transféré à leur laboratoire dans les 24h. Un traitement antibiotique prophylactique topique est appliqué sur l'œil biopsié durant quelques jours.

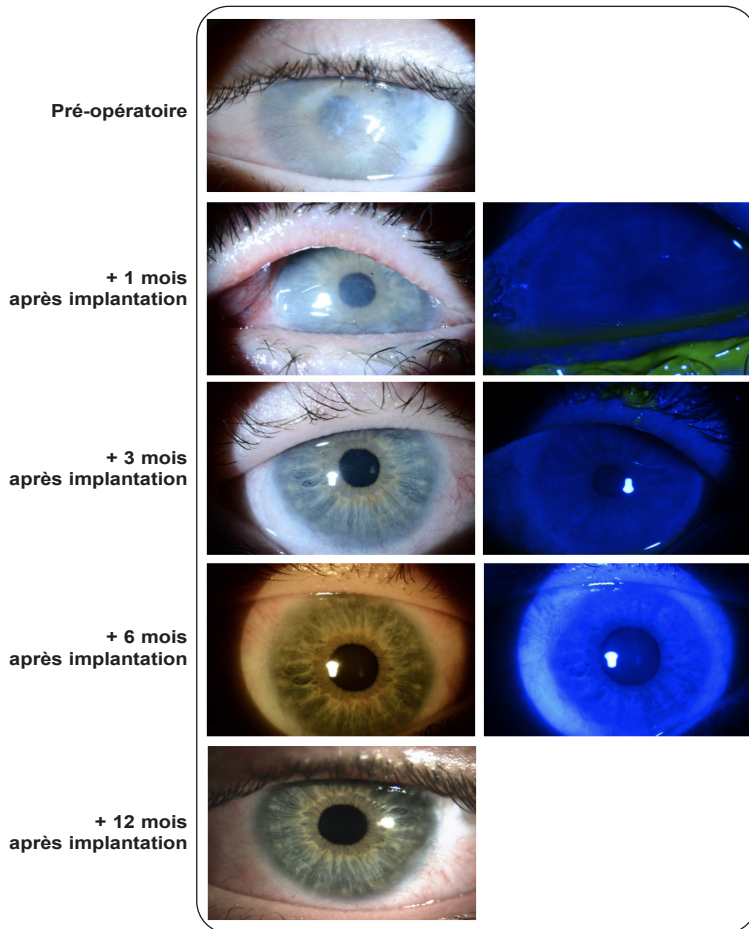
Après prolifération *ex vivo*, un feuillet de 300.000 à 1.200.000 cellules souches et différenciées est produit sur un support de fibrine à une densité de 79.000 à 316.000 cellules/cm<sup>2</sup>. C'est ce feuillet de traitement dans son produit de conservation que l'on appelle Holoclar®. La construction du feuillet en lui-même prend environ 2 semaines. Les contrôles de qualité sont effectués durant 6 à 8 semaines. L'implantation peut donc être réalisée environ 8-10 semaines après la biopsie. La chirurgie d'implantation consiste à exciser le pannus de l'œil atteint, à placer le feuillet cellulaire dans l'espace laissé et le maintenir à la conjonctive par plusieurs points de suture. Le suivi post opératoire est similaire à celui d'une greffe de cornée classique. Un traitement antibiotique et anti-inflammatoire est recommandé. Il est important que le patient réalise le suivi tel que recommandé afin de mener à bien le traitement et éviter toute complication.



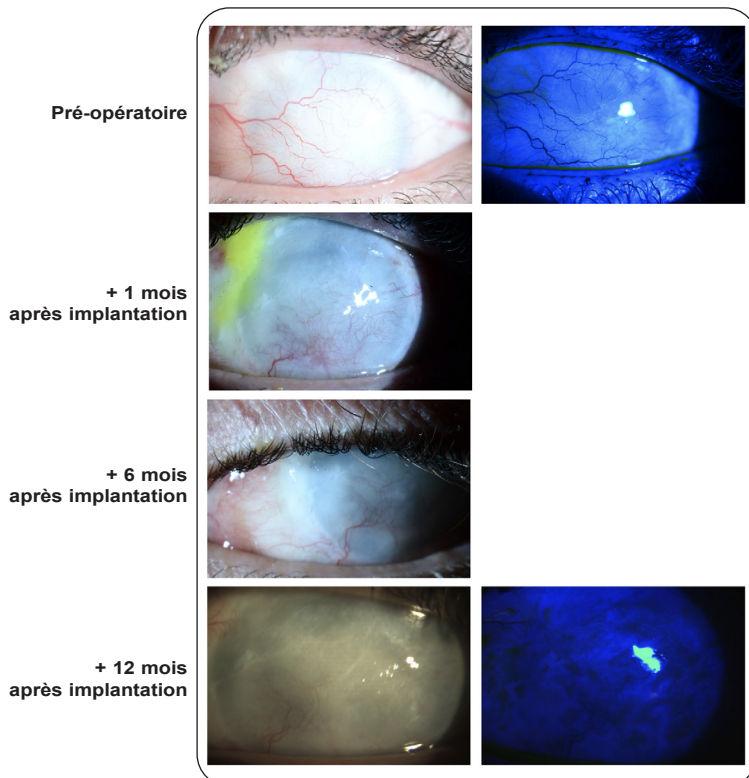
**Figure 3.** Description des étapes de la procédure. (A) Biopsie de 2 x 2 mm<sup>2</sup> à une profondeur de 100-200 microns (l'épaisseur d'une cornée normale est d'environ 540 microns). (B) Dans le 2<sup>ème</sup> temps opératoire, dissection du pannus fibrovasculaire. (C) Dans ce 2<sup>ème</sup> temps opératoire, mise en place du feuillet Holoclar® par une suture de Vycril.

(Photos : Pr G. Pellegrini)





**Figure 4.** Cas n° 1. Evolution de l'aspect oculaire à différents temps après implanatation d'Holoclar®. La colonne de droite montre la surface de l'œil avec utilisation de fluorescéine et un éclairage en lumière bleue. Cette technique met en évidence (sous forme de zones vertes) les lésions de l'épithélium cornéen. Aucune lésion dans cet exemple.



**Figure 5.** Cas n° 2. Evolution de l'aspect oculaire à différents temps après implanatation d'Holoclar®. La colonne de droite montre la surface de l'œil avec utilisation de fluorescéine et un éclairage en lumière bleue. Le traitement a été un échec, la cornée est toujours opaque et présente une néovascularisation.

## EXPÉRIENCE DU SERVICE D'OPHTALMOLOGIE DU CHU DE LIÈGE

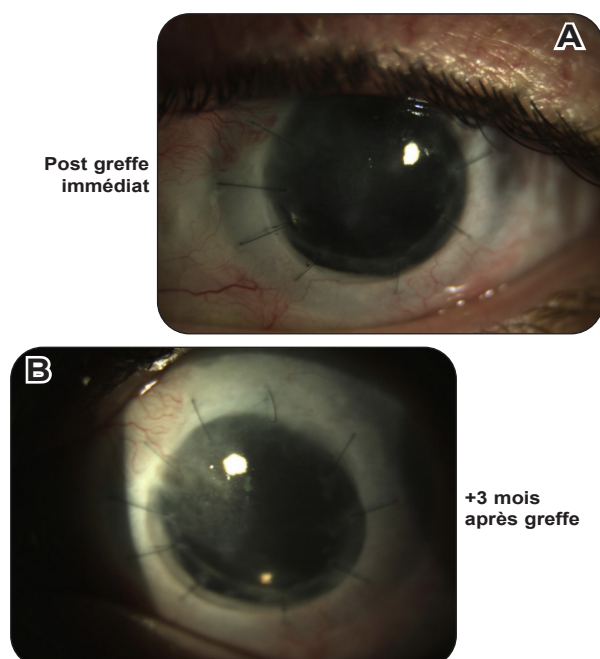
Les images suivantes illustrent l'évolution de deux patients pris en charge dans le service d'Ophtalmologie du CHU de Liège qui ont bénéficié du traitement par Holoclar® (Figures 4, 5 et 6).

L'efficacité du traitement est mesurée en termes de néovascularisation (persistance à disparition totale), acuité visuelle, inflammation résiduelle, symptomatologie résiduelle, sensibilité cornéenne et qualité de vie. En cas d'échec de la biopsie initiale, une deuxième biopsie peut être réalisée dans les 2 à 6 mois. Un maximum de trois biopsies est autorisé.

En cas d'échec du traitement par Holoclar®, un second traitement peut être réalisé (comprenant une biopsie si nécessaire et une nouvelle implantation). Un maximum de deux implantations/patient est autorisé.

Enfin, Holoclar® peut être un traitement préalable à une greffe de cornée transfixiante (par exemple en cas de résultats mitigés). La greffe Holoclar® permet d'améliorer l'environnement cellulaire en vue d'une greffe secondaire en diminuant l'inflammation locale et le risque de rejet de la greffe; par conséquent, la procédure

**Figure 6. Cas n° 2 (suite). Réalisation d'une greffe transfixiante de cornée avec mise en place d'un implant en chambre postérieure suite au traitement Holoclar® (qui a échoué).**



augmente les chances de restauration d'un axe visuel plus transparent.

Dans le premier cas présenté, la technique a été une réussite, même si une légère inflammation persiste. Un an après le traitement, l'acuité visuelle du patient s'est améliorée, l'opacité et la néovascularisation ont disparu. Le second cas illustre l'utilisation d'Holoclar® préalablement à une greffe transfixiante. L'implantation d'Holoclar® n'a pas amélioré l'acuité visuelle. L'opacité et la néovascularisation de la cornée sont toujours présentes.

## CONCLUSION

Le monde de l'ophtalmologie n'a que peu de perspectives thérapeutiques à offrir aux patients atteints de LSCD suite à une brûlure oculaire de longue date. Ces patients se sont souvent faits à l'idée que leur œil était «perdu». Maintenant disponible, Holoclar® pourrait permettre à ces patients de retrouver l'espoir de revoir ou, à défaut, un peu plus de confort.

## Conflit d'intérêts

Au CHU de Liège, le Prof. B. Duchesne, le Dr C. Tilkin et S. Camby ont été respectivement investigateur principal, sous-investigatrice et coordinatrice locale dans l'étude Holocore (phase IV) et le sont toujours dans les études Holocore Follow-Up (phase IV) et Hologlight. Le Prof. G. Pellegrini est co-fondatrice de la spin-off universitaire Holostem Therapie Avanzate.

## BIBLIOGRAPHIE

- Schermer A, Galvin S, Sun T. Differentiation-related expression of a major 64K corneal keratin in vivo and in culture suggests limbal location of corneal epithelial stem cells. *J Cell Biol* 1986;**103**:49-62.
- Rama P, Matuska S, Paganoni G, et al. Limbal stem-cell therapy and long-term corneal regeneration. *N Engl J Med* 2010;**363**:147-55.
- Saccu G, Menchise V, Giordano C, et al. Regenerative approaches and future trends for the treatment of corneal burn injuries. *J Clin Med* 2021;**10**:317.
- Thoft R, Friend J. The X, Y, Z hypothesis of corneal epithelial maintenance. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1983;**24**:1442-3.
- Deng SX, Borderie V, Chan CC, et al. Global consensus on definition, classification, diagnosis, and staging of limbal stem cell deficiency. *Cornea* 2019;**38**:364-75.
- Eslani M, Baradaran-Rafii A, Movahedan A, Djalilian AR. The ocular surface chemical burns. *J Ophthalmol* 2014;**2014**:196827.
- European Medicines Agency. Holoclar orphan designation [Internet]. [cited 2021 Sep 8]. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/orphan-designations/eu308579>
- Soleimani M, Naderan M. Management strategies of ocular chemical burns: Current perspectives. *Clin Ophthalmol* 2020;**14**:2687-99.

9. Qihua Le, Jianjiang Xu, Sophie X. Deng. Review. The diagnosis of limbal stem cell deficiency. *Ocul Surf* 2018;**16**:58-69.
10. Chiavelli C, Attico E, Sceberas V, et al. Stem cells and ocular tissue regeneration. *Ref Modul Biomed Res* 2013;**2**:111-8.
11. Nakamura T, Inatomi T, Sotozono C, et al. Ocular surface reconstruction using stem cell and tissue engineering. *Prog Retin Eye Res* 2016;**51**:187-207.
12. Le Q, Chauhan T, Yung M, et al. Outcomes of limbal stem cell transplant: a meta-analysis. *JAMA Ophthalmol* 2020;**138**:660-70.
13. Pellegrini G, Traveso CE, Franzi AT, et al. Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium. *Lancet* 1997;**349**:990-3.
14. Pellegrini G, Ardigò D, Milazzo G, et al. Navigating market authorization: the path holoclar took to become the first stem cell product approved in the European Union. *Stem Cells Transl Med* 2018;**7**:146-54.
15. Pellegrini G, Lambiase A, Macaluso C, et al. From discovery to approval of an advanced therapy medicinal product-containing stem cells, in the EU. *Regen Med* 2016;**11**:407-20.
16. Stern JH, Tian Y, Funderburgh J, et al. Regenerating eye tissues to preserve and restore vision. *Cell Stem Cell* 2018;**23**:453.
17. Tsai R, Li L, Chen JH. Reconstruction of damaged corneas by transplantation of autologous limbal epithelial cells. *N Engl J Med* 2000;**343**:86-93.

Les demandes de tirés à part doivent être adressées au  
Dr C. Tilkin, Service d'Ophtalmologie, CHU Liège, Belgique.  
Email : Claire.Tilkin@chuliege.be