

Une nouvelle méthode de culture cellulaire pour le remplacement permanent du revêtement cutané endommagé

Mahmoud Rouabhia

Les fonctions de la peau sont multiples et vitales, si bien qu'aucun être humain ou animal ne peut s'en passer. Malheureusement, cet organe essentiel s'avère fragile et est sujet à de nombreuses agressions provenant du milieu extérieur. Les traumatismes graves comme les brûlures nécessitent impérativement le remplacement de la peau endommagée. Plusieurs méthodes ont été développées pour tenter de régénérer le revêtement cutané détruit, chacune présentant ses avantages et ses inconvénients. Ainsi, la solution idéale n'existe-t-elle toujours pas, justifiant de nouvelles recherches et de nouvelles approches. L'une d'entre elles, la culture et la greffe de feuillets épidermiques chimères, apparaît aujourd'hui très prometteuse.

D'un point de vue physiologique, la surface cutanée est le lieu privilégié d'échanges entre le milieu biologique et l'environnement extérieur, mais constitue également une frontière entre deux mondes peu compatibles.

Structure et fonctions de la peau

La peau : un revêtement de protection

Par sa structure, la peau prévient les pertes de fluides du milieu intérieur, agit comme membrane semi-perméable face aux liquides extérieurs et joue le rôle de barrière face

aux micro-organismes [1, 2]. Chez l'homme, le revêtement cutané, fin et souple mais résistant, est bien adapté à une vie où les interactions avec l'environnement sont nombreuses. La peau se compose essentiellement de deux tissus : l'épiderme (dérivant de l'ectoderme embryonnaire) et le derme (d'origine mésodermique). L'épiderme est un épithélium pluristratifié dans lequel on distingue plusieurs couches cellulaires, allant de la couche basale (la plus profonde) à la couche supérieure de l'épiderme. Les kératinocytes, qui représentent 95 % des cellules de l'ensemble de l'épiderme, sont doués d'une forte activité mitotique au niveau basal ; ainsi, 10 % de ces cellules se divisent chaque jour pour migrer progressivement vers le stratum corneum tout en se différen-

ADRESSE

M. Rouabhia : chercheur au laboratoire de recherche des grands brûlés, professeur au département de chirurgie, université Laval, faculté de médecine, Sainte-Foy, Québec. Laboratoire de recherche des grands brûlés/ LOEX, Hôpital du Saint-Sacrement, 1050 Chemin Sainte-Foy, Québec, G1S 4L8 Canada.

RÉFÉRENCES

1. Aoki N, Ito M, Ejiri S, Ozawa H. Ultrastructure of human skin by a rapid freezing technique: structural preservation and antigenicity. *J Invest Dermatol* 1994; 102: 354-61.
2. Fartasch M, Ponc M. Improved barrier structure formation in air-exposed human keratinocyte culture system. *J Invest Dermatol* 1994; 102: 366-74.
3. Tanzer ML. Cross-linking of collagen. *Science* 1973; 180: 561-6.
4. Roop D. Defects in the barrier. *Science* 1995; 267: 474-5.
5. Bos JD, Kapsenberg ML. The skin immune system: progress in cutaneous biology. *Immunol Today* 1993; 14: 75-8.
6. Bagot M, Dubertret L. La peau: un organe lymphoïde périphérique. *médecine/sciences* 1988; 4: 311-6.
7. Schmitt D. La cellule de Langerhans: cellule dendritique de l'épiderme et des muqueuses. *médecine/sciences* 1989; 5: 103-11.
8. Katz SI, Tamaki K, Sachs DH. Epidermal Langerhans cells are derived from cells originating in bone marrow. *Nature* 1979; 282: 324-6.
9. Hanau D, Fabre M, Schmitt DA, et al. Human epidermal Langerhans cells cointernalize by receptor-mediated endocytosis nonclassical major histocompatibility complex class I molecules (T6 antigens) and class II molecules (HLA-DR antigens). *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 2901-5.
10. Girolomoni G, Zamburno G, Manfredini R, et al. Expression of B7 costimulatory molecule in cultured human epidermal Langerhans cells is regulated at the mRNA level. *J Invest Dermatol* 1994; 103: 54-9.
11. Auböck J, Irschick E, Romani N, et al. Rejection after a slightly prolonged survival time, of Langerhans cell-depleted allogeneic cultured epidermis used for wound coverage in humans. *Transplantation* 1988; 45: 730-7.
12. Rouabhia M, Germain L, Bélanger F, Auger FA. Cultured epithelium allografts: Langerhans cell and Thy-1⁺ dendritic epidermal cell depletion effects on allograft rejection. *Transplantation* 1993; 56: 259-64.
13. Phillips TJ. Cultured epidermal allografts: a permanent or temporary solution? *Transplantation* 1991; 51: 937-41.

ciant. La différenciation terminale permet la formation de cornéocytes qui assurent une protection mécanique et physique efficace [1, 2]. L'épiderme est relié au derme par la jonction dermo-épidermique. Le derme, tissu conjonctif constitué essentiellement d'une matrice extracellulaire, joue à la fois le rôle de support pour l'épiderme et celui d'emballage de toutes les structures profondes [3, 4].

La peau: un organe immunocompétent

L'épiderme comprend plusieurs populations cellulaires différentes, tant sur le plan morphologique que fonctionnel. Il possède tous les éléments nécessaires à la réponse immunitaire [5]. Parmi ces cellules, on note la présence de cellules dendritiques capables de présenter l'antigène aux lymphocytes et d'induire une réponse immunitaire de type cellulaire: ce sont les cellules de Langerhans (CL) [6-10]. Depuis longtemps, elles sont considérées comme les seules et uniques cellules

responsables de la reconnaissance et de la présentation antigénique de greffons aux lymphocytes T, provoquant ainsi des réactions de rejet d'allogreffe de peau. Cependant, cette exclusivité a été récemment mise en doute. En effet, plusieurs équipes, dont la nôtre, ont démontré qu'une déplétion totale des CL d'une culture de cellules épidermiques greffées après confluence (multiplication des kératinocytes ensemencés jusqu'au recouvrement total de la surface de culture) ne prévient pas le rejet des greffons épidermiques allogéniques; cela suggère donc que les CL ne sont pas les seules cellules responsables du rejet [11-13]. D'autres cellules dendritiques épidermiques, les Thy-1⁺ chez la souris et leurs homologues CD36⁺ chez l'homme [6, 14, 15], ont été identifiées dans la peau (épiderme). Originaires de la moelle osseuse, ces cellules n'expriment les antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II qu'après une stimulation [15, 16] ou lors d'états pathologiques [16, 17]. Ces cellules sont capables de

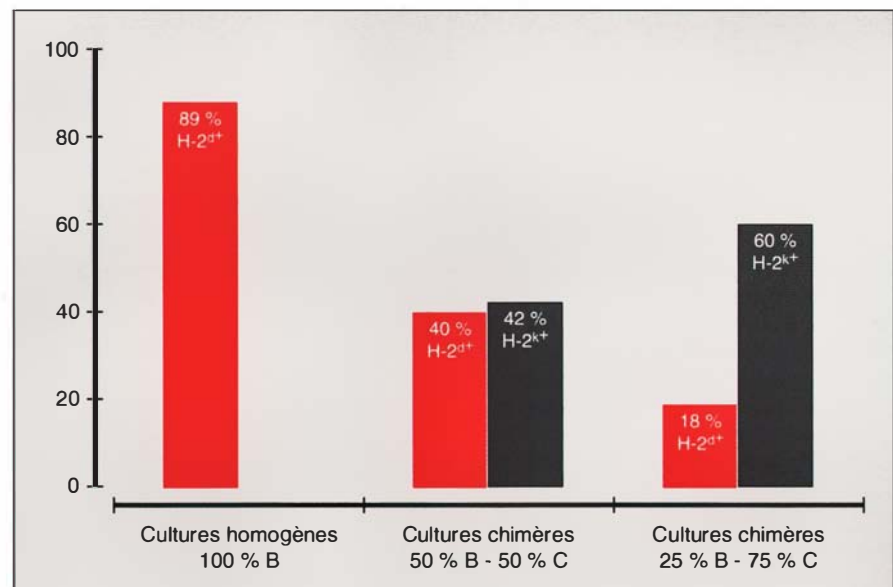


Figure 1. Détermination du pourcentage de chaque population cellulaire dans les cultures chimères avant la greffe. Des kératinocytes de souris Balb/c (B) et de souris C3H/HeN (C) ont été isolés et utilisés pour obtenir des cultures chimères. Ces derniers consistent à mélanger (1) 50 % B avec 50 % C et (2) 25 % B - 75 % C ou 25 % C - 75 % B. Après incubation jusqu'à confluence, chaque culture est dissociée pour obtenir des suspensions cellulaires. Ces cellules sont ensuite marquées par un anticorps monoclonal spécifique de chaque type de kératinocyte (H-2^d pour les cellules provenant des souris B, H-2^k pour les cellules provenant des souris C) puis les cellules marquées sont identifiées par cytométrie en flux.

maintenir en prolifération un clone de cellules T cytotoxiques (CTL) lors d'une présentation antigénique préalable par les CL aux lymphocytes, mais leur rôle dans le rejet n'est pas encore élucidé. Finalement, sources d'interleukine-1 et d'autres cytokines [18], les kératinocytes peuvent aussi être considérés comme une population jouant un rôle immunitaire dans la peau [18-20].

Ainsi, notre revêtement cutané est fin, souple, résistant et bien adapté aux multiples interactions avec l'environnement, mais il n'en demeure pas moins fragile face aux nombreuses agressions pouvant provenir du milieu extérieur.

Les causes majeures de dommages de la peau: les brûlures

La peau, tenant une place privilégiée de barrière entre l'organisme et

l'environnement, est aux premières lignes de combat lors de toutes agressions extérieures. Des accidents particulièrement graves pour la peau sont les brûlures. Leur gravité dépend de deux paramètres: la profondeur et l'étendue. La profondeur des brûlures est décrite en terme de degrés (le premier, le second et le troisième degré).

Les brûlures du premier degré sont les plus superficielles et seul l'épiderme est touché. La peau présente une rougeur localisée, elle est sèche, enflée et douloureuse au toucher. Ces brûlures guérissent sans qu'il soit nécessaire d'y apporter des soins particuliers. Le meilleur exemple de brûlure du premier degré est le coup de soleil causé par une exposition un peu excessive.

Les brûlures du second degré non profond endommagent l'épiderme ainsi que la couche superficielle du

derme alors que les éléments profonds de l'épiderme et du derme demeurent viables. La peau devient très érythémateuse, sa surface est humide et on y voit apparaître des cloques. La plaie est très douloureuse et demeure sensible au toucher léger. Si l'on prend soin de prévenir l'infection, la peau se régénère spontanément grâce au nombre suffisant de cellules épithéliales restant au niveau des follicules pileux.

Les brûlures du deuxième degré profond et du troisième degré détruisent toute l'épaisseur de la peau. La région brûlée prend une coloration blanchâtre, brune ou noire. Cette peau est sèche par manque de glandes sébacées et sudoripares fonctionnelles. En outre, les terminaisons nerveuses ayant été détruites, la région brûlée est insensible. Une structure cutanée brûlée devient fréquemment le siège de colonisations

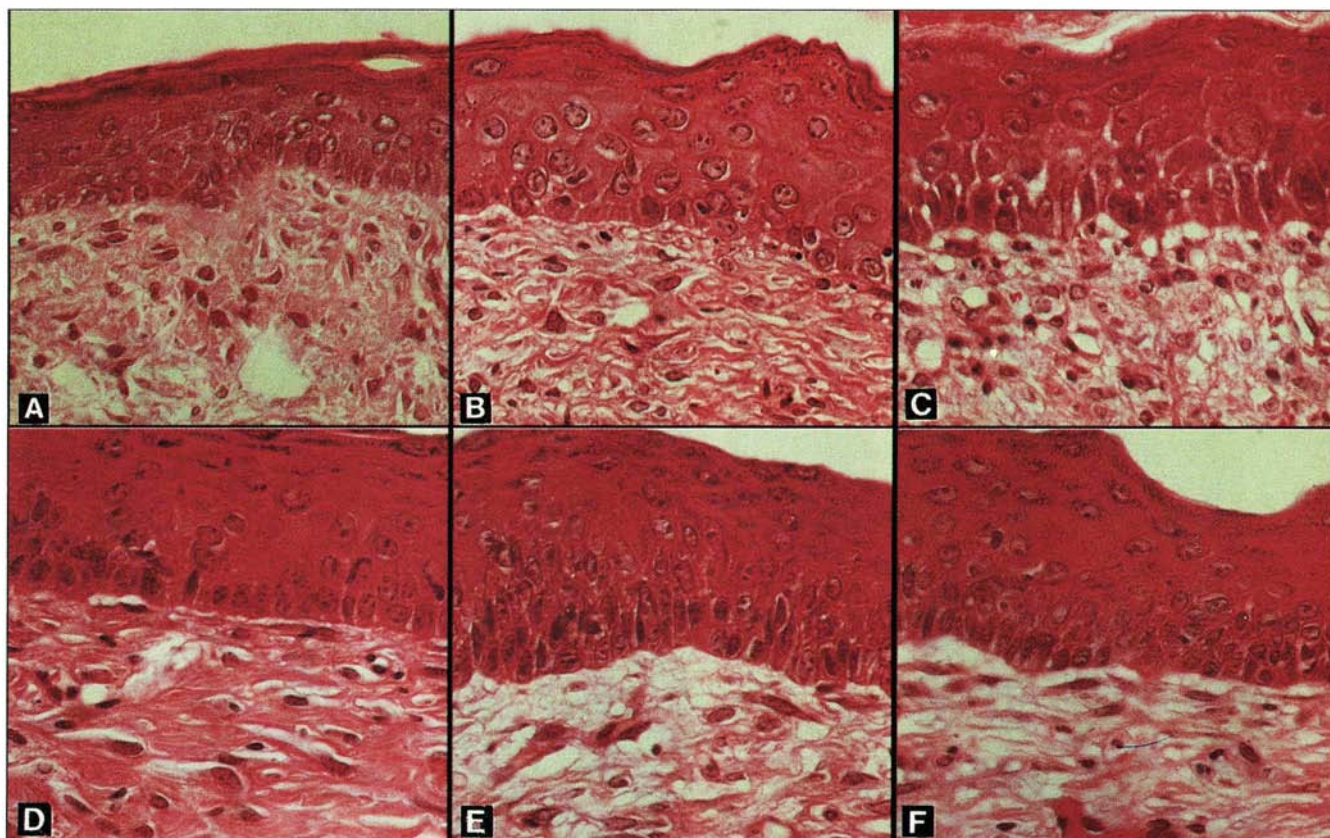


Figure 2. **Analyse histologique des structures cutanées nouvellement formées.** Les biopsies ont été prélevées à partir des greffons chimères ou syngéniques après 14 jours (A, B, C) et 30 jours (D, E, F), puis colorées à l'hématoxyline-éosine. Ces analyses histologiques nous révèlent une structure cutanée bien organisée après greffe de feuillet chimères 50 %B-50 %C (B, E) et 25 %B-75 %C (C, F) comparable à celle obtenue après isogreffes (A, D).

RÉFÉRENCES

14. Bergstresser PR, Tigelaar ER, Dees JH, Streilien WJ. Thy-1 antigen-bearing dendritic cells populate murine epidermis. *J Invest Dermatol* 1983; 81: 286-92.
15. Weber-Matthies K, Sterry F. Organization of the monocyte/macrophage system of normal human skin. *J Invest Dermatol* 1990; 95: 83-9.
16. Ferrari C, Rowden G. A new cell type in normal human epidermis? *J Invest Dermatol* 1992; 98: 121-2.
17. Cooper DK, Neises GR, Katz SI. Antigen presenting OKM5⁺ melanophages appear in human epidermis after ultraviolet radiation. *J Invest Dermatol* 1986; 86: 363-70.
18. Luger TA, Stalder BM, Katz SI, Oppenheim JJ. Epidermal cell (keratinocyte)-derived thymocyte-activating factor (ETAf). *J Immunol* 1991; 127: 1493-8.
19. Strange P, Skov L, Baadsgaard O. Interferon gamma-treated keratinocytes activated T cells in the presence of superantigens: involvement of major histocompatibility complex class II molecules. *J Invest Dermatol* 1994; 102: 150-4.
20. Nickoloff BJ, Turka LA. Immunological functions of non-professional antigen-presenting cells: new insights from studies of T-cell interactions with keratinocytes. *Immunol Today* 1994; 15: 464-9.
21. Alexander JW, MacMillan BG, Law EJ, Kittur DS. Treatment of severe burns with widely meshed skin autograft and mesh skin allograft overlay. *J Trauma* 1981; 21: 433-8.
22. Pellet S, Ménesi L, Novak J, Temesi A. Freeze-dried irradiated porcine skin as a burn wound coverage. In: Wise DL, ed. *Burn wound covering*. CRC Press 1984; vol. 1: 85-114.
23. MacMillan BG. Closing the burn wound. *Surg Clin N Am* 1978; 58: 1205-31.
24. Pruitt BA. Complication of burn wound injury. *Clin Plast Surg* 1974; 1: 667-91.
25. Woodroof EA. Biobrane, a biosynthetic skin prosthesis. In: Wise DL, ed. *Burn wound covering*. CRC Press, 1994; vol. 2: 1-27.
26. Boyce S, Greenhalgh GD, Kagan RJ, et al. Skin anatomy and antigen expression after burn wound closure with composite grafts of cultured skin cells and biopolymers. *Past Reconstr Surg* 1993; 91: 632-41.

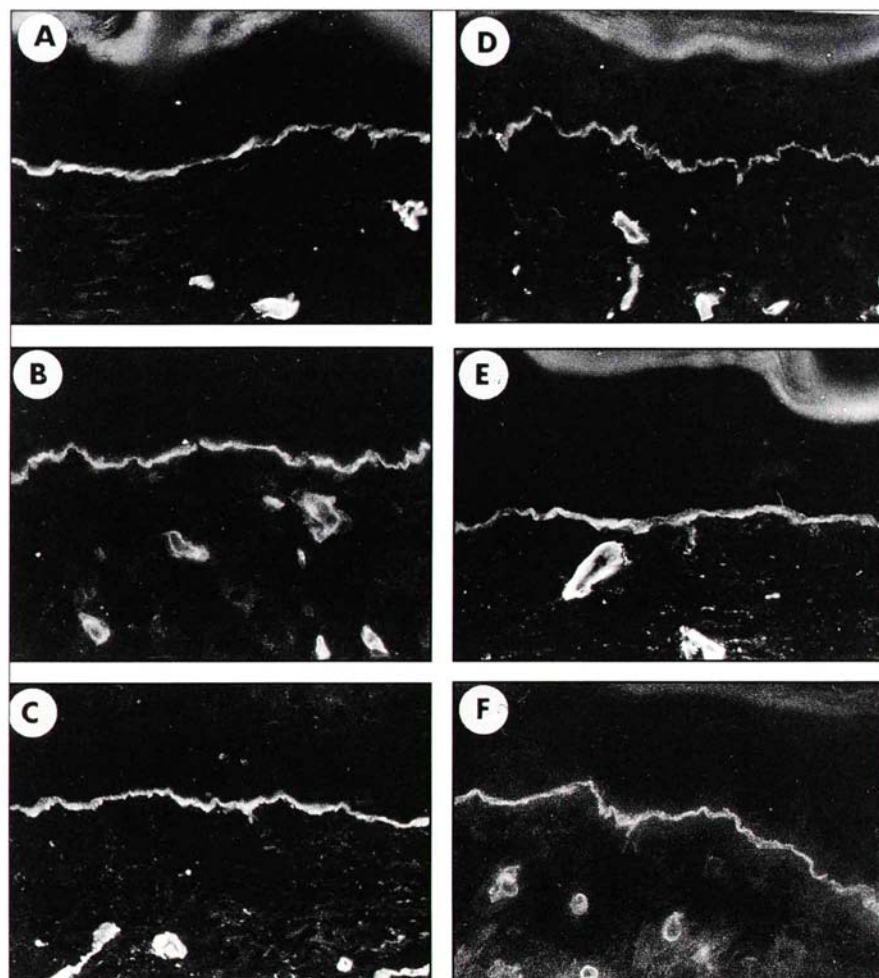


Figure 3. Recherche de la laminine dans les structures cutanées nouvellement formées. Les biopsies ont été prélevées à partir des greffons chimères et syngéniques après 14 jours (A, B, C) et 30 jours (D, E, F), enrobées dans l'OCT, puis des coupes de 4 µm ont été effectuées. Ces coupes ont été marquées par un anticorps antilaminine. Ces analyses révèlent que, comme les isogreffes (A, D), tous les greffons chimères 50 %B-50 %C (B, E) et 25 %B-75 %C (C, F) synthétisent la laminine au niveau de la jonction dermo-épidermique et autour des vaisseaux sanguins. Cette protéine est présente 15 jours et 30 jours après la greffe.

bactériennes. Enfin, avec la destruction du derme, le processus de régénération est interrompu et on doit le plus souvent recourir à une greffe de peau.

Remplacement de la peau endommagée

Greffes en filet autologues

Cette technique met à profit les zones épargnées par l'accident. Ainsi, des morceaux de peau intacte sont prélevés, puis introduits dans un

appareil spécial (*Tanner-Vanderput mesh-graft expander*). Ce dernier produit des incisions parallèles équidistantes dans les greffons, si bien qu'après étirement, ceux-ci sont transformés en une sorte de filet de pêcheur [21, 22]. De cette manière, la surface initiale du greffon est multipliée par trois et plus, ce qui augmente la surface de recouvrement. Cependant, les résultats obtenus à partir de greffons en filet autologues élargis plus de trois fois (6 ou 9), sont beaucoup moins satisfaisants [23, 24]. En effet, les risques d'infec-

tion augmentent et les cicatrices s'avèrent beaucoup moins esthétiques. Pour pallier cet inconvénient, on peut recouvrir ces autogreffes en filet large (6 ou 9 fois) par des allogreffes en filet plus étroit (1, 5 ou 3) ce qui diminue le risque d'infection et améliore les résultats de la prise des autogreffes [21, 23, 24]. En résumé, l'avantage de la greffe en filet est sa disponibilité ainsi que le remplacement permanent du tissu endommagé, et son désavantage est le manque de sites donneurs. De plus, même quand ces autogreffes sont réalisables, elles sont une source additionnelle de traumatisme pour le patient, et une surface supplémentaire fragilisée.

Greffes en filet allogéniques

Des allogreffes de peau humaine, obtenues à partir de cadavres, ont été utilisées pour couvrir les brûlures [21, 23, 24]. Ces greffons peuvent être disponibles rapidement et en quantité suffisante pour couvrir de grandes surfaces cutanées endommagées. Cependant, à cause de l'immunogénicité de ces peaux allogéniques, un processus inévitable de rejet s'installe progressivement. Par conséquent, ces allogreffes ne peuvent être utilisées qu'en tant que pansements, temporaires mais bénéfiques car elles favorisent le maintien de l'homéostasie et préparent la plaie à une future greffe autologue.

Les xénogreffes

Parmi les greffons xénogéniques, la peau de porc présente une structure similaire à celle de la peau humaine, ce qui en fait une source de pansement temporaire pour les brûlures offrant l'avantage d'être disponible en grande quantité [22, 25, 26]. Ces greffes sont moins coûteuses que les allogreffes de peaux de cadavres. Cependant, le processus de rejet est plus rapide et plus agressif en raison de la forte immunogénicité de ces greffons.

Production et greffe de feuillets épidermiques autologues

La greffe de feuillets épidermiques cultivés est utilisée pour les brûlures du second degré profond et du troi-

sième degré qui couvrent plus de 50 % de la surface corporelle. Elle consiste à prélever une biopsie de 2 à 5 cm² de peau saine chez le brûlé. Les cellules épidermiques sont isolées, puis sont ensemencées dans des flacons tapissés de fibroblastes 3T3-J2 irradiés. Ces fibroblastes accélèrent la croissance des kératinocytes et empêchent la contamination de ces cultures par les fibroblastes du patient. Ces cellules (3T3) nourricières seront repoussées par les kératinocytes, puis éliminées complètement lorsque ces derniers atteignent la confluence. Les cellules sont incubées à 37 °C et parviennent à confluence après 14 à 25 jours [27, 28]. Ces cultures sont alors dissociées avec de la trypsine et mises en sous-culture. Après 9 à 15 jours, on obtient de nouveau des cultures confluentes pouvant être détachées en feuillets épidermiques prêts à être greffés [27, 28].

Ces greffes autologues présentent de nombreux avantages. Tout d'abord, elles offrent un remplacement permanent de la peau endommagée. Le prélèvement de 2 à 5 cm² de peau saine cause peu de traumatisme supplémentaire au patient et permet d'obtenir une surface de l'ordre de plusieurs mètres carrés de feuillets épidermiques greffables. Mais il manque à la nouvelle structure cutanée d'importantes fonctions mécaniques du fait de l'absence du derme [29-33]. En effet, les nouvelles structures engendrées après la greffe de feuillets épidermiques autologues sont moins résistantes aux chocs mécaniques et aux expositions solaires. Ces structures ont aussi une élasticité très réduite comparée à celle de la peau normale. Finalement, la fermeture d'une plaie par des greffons épidermiques autologues ou avec des greffons minces entraîne l'apparition de cicatrices hypertrophiques. Des analyses histologiques tardives des nouvelles structures cutanées montrent que ce n'est que 4 à 5 années après la greffe qu'un remodelage tissulaire important menant à l'apparition de structure dermique peut être observé [34]. Par conséquent, l'apport d'une couche dermique lors de la greffe des feuillets épidermiques pourrait contribuer à un remodelage plus précoce et mieux approprié de la nou-

velle peau, réduisant ainsi l'apparition de ces cicatrices hypertrophiques [35]. Il reste cependant un autre handicap de taille pour cette technique, c'est le temps (3 à 5 semaines) nécessaire à la croissance et à l'obtention d'un nombre suffisant de feuillets épidermiques prêts à être greffés.

Ainsi, face à ce grave problème que représentent les brûlures et les techniques de substitution cutanée encore imparfaites, nous avons mis au point une nouvelle méthode de culture cellulaire qui pourrait réduire le délai de culture et être efficace pour le remplacement permanent des tissus cutanés endommagés. Cette nouvelle méthode est la production et la greffe de feuillets épidermiques chimères.

Production et greffe de feuillets épidermiques chimères

Deux populations de kératinocytes provenant de souches de souris génétiquement différentes ont été isolées [12, 36] et mises en co-culture à différents rapports : 50 % BALB/c-50 % C3H/HeN et de 25 % BALB/c-75 % C3H/HeN ou 25 % C3H/HeN-75 % BALB/c [37]. En parallèle, des cultures homogènes composées de 100 % de kératinocytes de souris C3H/HeN ou de 100 % de kératinocytes de souris BALB/c ont été effectuées. Après culture jusqu'à confluence, la croissance et le pourcentage de chaque population cellulaire ont été évalués. La technique utilisée est un marquage spécifique pour chaque population cellulaire fondé sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux anti-H-2^d (spécifique de la souche BALB/c) et H-2^k (spécifique pour la souche C3H/HeN), suivi d'une analyse par cytométrie en flux. Ces manipulations nous ont permis de déterminer si les deux populations cellulaires mises en co-culture se multiplient dans des proportions constantes. Ainsi, comme nous le montrent les figures 1 et 2, les deux types de kératinocytes ont proliféré également, confirmant l'absence de dominance d'une population cellulaire par rapport à l'autre. De plus, les proportions des différentes populations de kératinocytes présentes dans les feuillets épidermiques chimères sont les mêmes que celles utilisées lors de la mise en culture. Après

RÉFÉRENCES

27. Green H, Kehinde O, Thomas J. Growth of cultured human epidermal cells into multiple epithelia suitable for grafting. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76: 5665-8.
28. Gallico GG, O'Connor NE, Compton CC, et al. Permanent coverage of large burn wound with autologous cultured human epithelium. *N Engl J Med* 1984; 311: 448-51.
29. Daly CH. Biomechanical properties of dermis. *J Invest Dermatol* 1982; 79s: 17-20.
30. Lanir Y. A structural theory for the homogeneous biaxial stress-strain relationships in flat collagenous tissues. *J Biomech* 1979; 12: 423-36.
31. Cook T, Alexander H, Cohen M. Experimental method for determining the 2-dimensional mechanical properties of living human skin. *Med Biol Eng Comput* 1977; 15: 381-90.
32. Tong P, Fung Yc. The stress-strain relationship for the skin. *J Biomech* 1976; 9: 649-57.
33. Cuono CB, Langdon R, Brichall N, Bartebort S, McGuire J. Composite autologous-allogeneic skin replacement: development and clinical application. *Plast Reconstr Surg* 1987; 80: 626-35.
34. Rudolph R, Vande Berg J, Ehrlich HP. Wound contraction and scar contracture. In Cohen IK, Diedelmann RF, Lindblad WJ, eds. *Wound healing, biochemical and clinical aspects*. Philadelphia, USA: WB Saunders Company, 1992: 111.
35. Compton CC, Gill JM, Bradford D, et al. Skin regeneration from cultured epithelial autografts on full-thickness burn wounds from 6 days to 5 years after grafting. *Lab Invest* 1989; 60: 600-12.
36. Rouabhia M, Germain L, Bélanger F, et al. Optimization of murine keratinocyte culture for the production of graftable epidermal sheets. *J Dermatol* 1992; 19: 325-34.
37. Rouabhia M, Germain L, Bélanger F, et al. Allogeneic-syngeneic cultured epithelia: a successful therapeutic option for skin regeneration. *Transplantation* 1995; 59: 1229-34.
38. Phillips TJ, Kehinde O, Green H, Gilchrist AB. Treatment of skin ulcers with cultured epidermal allografts. *J Am Acad Dermatol* 1989; 21: 191-9.
39. Gallico GG, O'Connor NE, Compton CC, et al. Cultured epithelial autografts for giant congenital nevi. *J Plast Reconstr Surg* 1989; 84: 1-9.

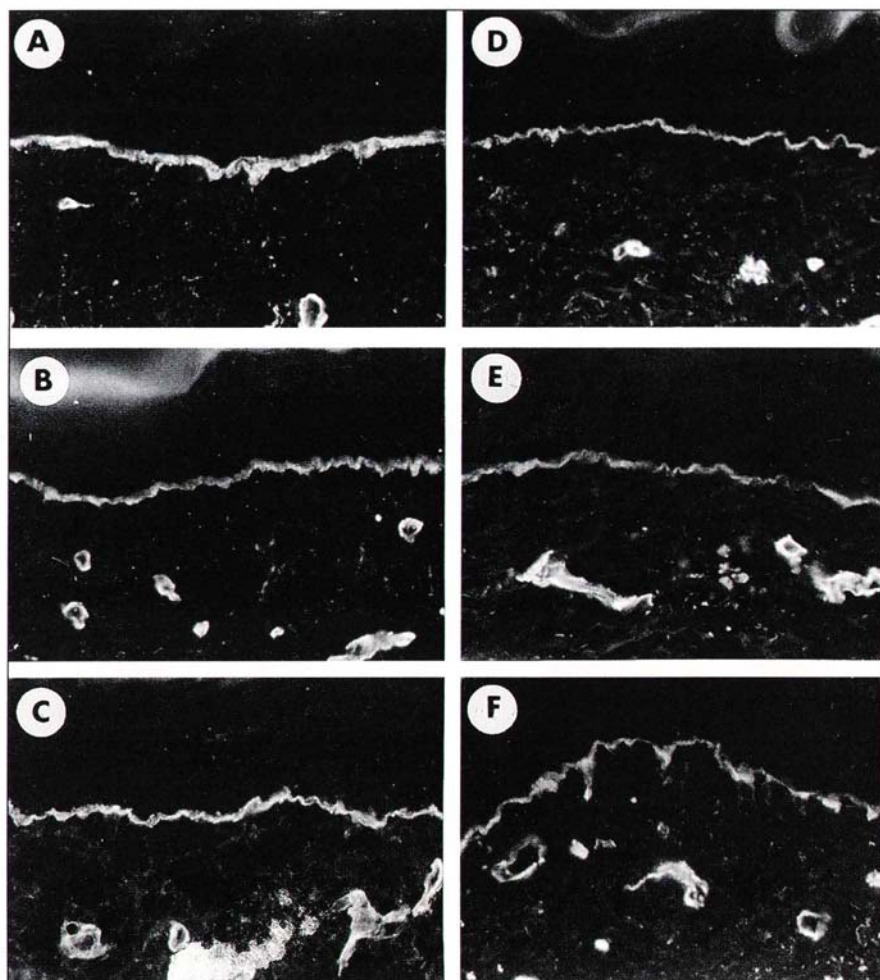


Figure 4. **Recherche du collagène IV dans les structures cutanées nouvellement formées.** Les biopsies ont été prélevées à partir des greffons chimères et syngéniques après 14 jours (A, B, C) et 30 jours (D, E, F), enrobées dans l'OCT puis des coupes de 4 µm ont été effectuées. Ces coupes ont été marquées par un anticorps anticollagène IV. Ces analyses révèlent que, comme les isogreffes (A, D), tous les greffons chimères (B, E) et 25 %B-75 %C (C, F) synthétisent le collagène IV au niveau de la jonction dermo-épidermique et autour des vaisseaux sanguins. Cette protéine est présente 15 jours et 30 jours après la greffe.

ces analyses, des cultures chimères et homogènes ont été réalisées, puis les feuillets obtenus ont été greffés sur des souris adultes. Les greffons chimères 50 %B-50 %C sont greffés sur l'un ou l'autre des donneurs; en revanche, les greffons chimères 25 %B-75 %C sont greffés sur un receveur BALB/c et *vice versa*. Ces isogreffes et les greffons chimères ont été suivis jusqu'à 14 et 30 jours après la transplantation en les comparant aux allogreffes (feuillets composés de 100 % de kératinocytes de souris

BALB/c greffés sur des souris C3H/HeN adultes et *vice versa*).

Analyse histologique des tissus produits à partir des greffons chimères

Des biopsies des greffes chimériques et syngéniques ont été effectuées aux 14^e et 30^e jours après les greffes, puis soumises à des analyses histologiques [12, 37]. Au niveau des greffes chimères (figure 3D, E, F), ces analyses révèlent un épiderme bien organisé

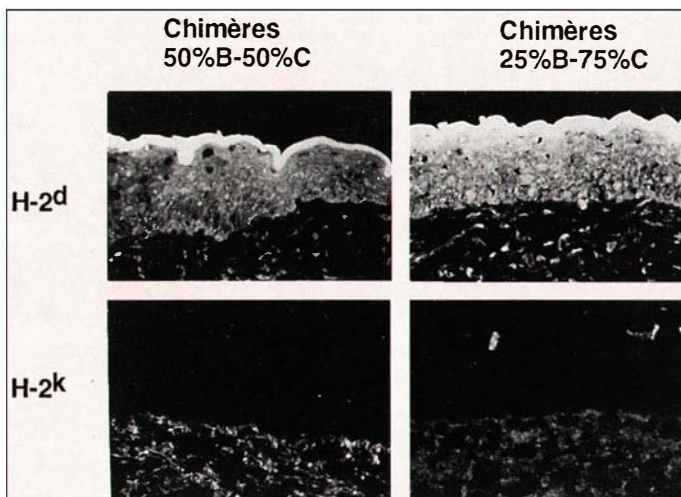


Figure 5. **Recherche de cellules allogéniques dans les structures cutanées nouvellement formées.** Après la transplantation des feuillets chimères sur des receveurs BALB/c adultes, des biopsies ont été prélevées à partir des greffons après 30 jours, enrobées dans l'OCT, puis des coupes de 4 μ m ont été effectuées. Ces coupes ont été marquées avec un anticorps anti-CMH de classe-I spécifique des kératinocytes de Balb/c (anti-H-2^d) ou C3H/HeN (anti-H-2^k). L'analyse de ces coupes montre que l'épiderme régénéré n'est composé que de kératinocytes syngéniques après la greffe de feuillets chimères 50%B-50%C et 25%B-75%C.

composé de plusieurs couches de cellules. Ces structures nouvellement formées sont comparables à celles obtenues après isogreffes (figure 3A, B, C). Plus spécifiquement, on peut observer une couche basale, formée de cellules cuboïdes prolifératives, une couche suprabasale, formée de cellules de plus en plus pavimenteuses, et enfin une couche cornée. Cependant, aucune structure cutanée organisée n'a été obtenue après l'allogreffe de feuillets épidermiques (résultats non montrés). Nos analyses immunohistochimiques confirment (figure 4) la formation d'un nouvel épiderme comparable à celui obtenu avec les greffons syngéniques. Le caractère fonctionnel de ces nouvelles structures épidermiques est attesté par la présence de protéines (laminine et de collagène IV) impliquées dans la formation de la membrane basale qui assure une coopération étroite entre les deux structures cutanées (épiderme-derme).

Devenir des kératinocytes allogéniques

Après ces analyses histologiques et immunohistochimiques révélant une régénération de structures cutanées bien organisées à partir des greffons chimères, la question se pose de savoir si la nouvelle structure cutanée contient des kératinocytes allogéniques d'origine. Pour répondre à cette question, des biopsies des greffes chimériques (50%B-50%C et 25%B-75%C) ont été effectuées 30 jours après les greffes, puis soumises à des analyses immunohistochi-

miques utilisant des anticorps monoclonaux du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I spécifique de chaque génotype cellulaire [37]. Ces analyses révèlent (figure 5) qu'après 30 jours de greffe, la nouvelle structure épidermique n'est composée que de kératinocytes syngéniques. Les kératinocytes allogéniques des greffons chimères ont donc été éliminés de façon sélective. La littérature scientifique et nos expériences précédentes nous ont enseigné que les greffons cutanés allogéniques sont rejetés environ 9 à 11 jours après l'opération. Il reste donc à évaluer le rôle des kératinocytes allogéniques contenus dans les greffons chimères avant leur élimination sélective (sans rejet complet du greffon chimère).

Conclusions et perspectives

Les pertes cutanées massives qui font suite à des brûlures sont parmi les traumatismes cutanés les plus fréquents et les plus sévères en Amérique du Nord et ailleurs dans le monde. Recouvrir ces écorchés vifs est une priorité majeure et un défi de taille.

Comme nous l'avons vu précédemment, la seule possibilité thérapeutique actuelle pour recouvrir de façon permanente une personne souffrant d'une perte cutanée massive en superficie (plus de 50 %) et en profondeur (3^e degré) est la greffe autologue d'équivalents épidermiques cultivés *in vitro*. Cependant,

cette technique nécessite un délai de 4 à 5 semaines avant de pouvoir réaliser une greffe. Sachant que chaque journée gagnée dans le traitement d'un grand brûlé améliore grandement ses chances de survie, la réduction du délai nécessaire à la transplantation de ces patients revêt donc une importance clinique primordiale. L'utilisation de cette nouvelle méthode de culture qui consiste à produire des feuillets chimères propres à être greffés réduira le temps de culture, contribuera à sauver un plus grand nombre de patients brûlés, et raccourcira leur séjour hospitalier. De plus, cette approche thérapeutique réduira le nombre des prélèvements de peau saine puisqu'il sera possible de produire des feuillets d'épiderme en utilisant un pourcentage considérable de cellules allogéniques. Deux questions se posent alors ; (1) quelles cellules non autologues utiliser pour produire ces épidermes chimères ? et (2) quel est l'impact clinique (facteur temps) de cette méthodologie ? Pour répondre à la première question, les cellules non autologues (allogéniques et xénogéniques) peuvent provenir des biopsies de peau de donneurs sains lors de réductions mammaires ou de circoncisions. En disposant à l'avance de ces biopsies, on peut isoler les kératinocytes et rechercher les agents infectieux graves (VIH, hépatites, etc.) et moins graves. Les évaluations cliniques se feront en collaboration étroite avec les donneurs sains (consentement), et nous assureront de l'absence de

toute maladie génétique pouvant être transmise *via* les kératinocytes allogéniques. Des précautions de même nature seront prises avec les kératinocytes xénogéniques. Une fois vérifiées, ces cellules non autologues seront conservées congelées dans des banques de cellules au laboratoire et seront prêtes à être utilisées; ce qui nous amène à notre deuxième question. En effet, lors de l'admission d'un grand brûlé (perte cutanée importante en profondeur et en surface) on prélève un morceau de peau saine (< à 4 cm²), puis on isole les cellules et on les met en culture. Par la méthode classique, il faut entre 4 et 5 semaines avant la première transplantation de feuillets épidermiques autologues. Lors de cette période de culture, et comme les cellules non autologues sont disponibles, la culture chimère peut être démarrée après la première étape de culture des cellules autologues (début de la multiplication *in vitro*) qui dure environ 10 jours. Après cette courte période de culture, les cellules autologues seront mêlées à un nombre significatif de cellules non autologues permettant ainsi d'obtenir des feuillets épidermiques propres à la greffe après environ 10 jours de culture. Comparée à la méthode de culture n'utilisant que les kératinocytes autologues, la méthode de culture chimérique peut réduire de moitié, et même plus, le temps nécessaire à la croissance des kératinocytes et à l'obtention des feuillets propres à la greffe. Cette réduction de la période de culture raccourcira le temps d'attente des patients en vue d'une greffe cutanée, permettant ainsi une réduction significative du coût de leur traitement.

La deuxième application clinique concerne le traitement des autres maladies dermatologiques (psoriasis, ulcères variqueux, défaut de cicatrisation, etc.). L'utilisation de greffons allogéniques d'équivalents épidermiques sur des sites variqueux ou dans le cas d'une perte cutanée massive de second degré profond s'avère prometteuse pour la régénération des structures épidermiques [38, 39]. Dans ce contexte, l'utilisation de greffons chimères pourrait (1) améliorer la qualité de traitement de ces traumatismes cutanés et (2) nous permettre d'élucider les phéno-

mènes physiologiques et immunitaires observés lors du traitement de traumatismes cutanés par des greffons allogéniques. Finalement, cette technique nous sera probablement d'un grand apport pour approfondir nos connaissances fondamentales, concernant notamment les mécanismes de tolérance lors de la trans-

plantation cutanée, pour revenir ensuite à une application thérapeutique et biomédicale ■

TIRÉS À PART

M. Rouabhia.

Summary

Skin replacement using chimeric (allogeneic-syngeneic) cultured epidermal sheets

Skin is the main interface between the organism and the environment. This organ is only a few millimetres thick, but still constitutes the body's largest organ. It is particularly vulnerable to environment-induced traumas. Extensive skin loss such as in burns causes serious complications and may lead to death if not prevented by early wound closure. In extensively burned patients, donor site availability for meshed skin autografting remains the limiting factor for wound coverage and skin replacement. The concept of using allogeneic skin for burn treatment remains an interesting one. However, full engraftment does not occur since these grafts remain immunogenic. Recently, cultured epithelial sheets have been used as an adjunct therapy. Human epidermal cells have been grown *in vitro* and successfully used for grafting onto skin defects and extensive burn wounds. However, this new therapeutic approach has the disadvantage of requiring delays of up to 4 to 5 weeks to allow epithelial cells to grow *in vitro*. Some research groups have tried to overcome this drawback by grafting allogeneic epidermal sheets devoid of Langerhans cells. However, strong arguments based on immunological mechanisms have prompted doubts about the permanent survival of these cultured epidermal allografts. Since cultured epithelium allografting proved impossible, as well as the fact that the cutaneous tissues of extensively burned patients have to be replaced quickly and permanently, using an experimental model, we devised, a new culture technology using allogeneic and syngeneic epithelial cells for chimeric graftable sheet production. Indeed, 14 days postgrafting, chimeric implants (50 % Balb/c-50 % C3H/HeN, 25 % Balb/c-75 % C3H/HeN grafted onto Balb/c adult mice) showed the same percentages of implantation success (> 80 %) as for isografts. Histological studies revealed a well-organized cutaneous tissue containing basal and suprabasal cell layers. These histological observations were confirmed by results showing the presence of basement membrane proteins (laminin, and type IV collagen). The chimeric results were comparable to those obtained with isografts, meanwhile allografts showed complete degradation, indicating implant rejection. Thirty days postgrafting, immunohistological studies revealed that chimeric implants allowed epidermis regeneration, and that these chimeric epithelial sheets showed no sign of rejection over time, while their allogeneic keratinocytes seemed to be passively « removed » from the implants. Clinically, the use of this chimeric culture method (mixture of allogeneic and autologous keratinocyte populations) for large burn wound treatment could be a significant therapeutic advance. It may reduce by at least 50 % the previously described delay for epidermal culture, and significantly lower the cost of burn management during patient hospitalization. Also, since the ultimate aim in allogeneic transplantation is to achieve immunological tolerance between donors and recipients, this chimeric culture approach may provide ways to study tolerance phenomena in cutaneous tissues.