

Restauration de l'épithélium cornéen à partir des cellules souches limbiques

La surface oculaire est recouverte par deux types d'épithéliums malpighiens non kératinisés fonctionnellement et phénotypiquement différents l'un de l'autre. L'épithélium conjonctival repose sur un chorion vascularisé, et contient des cellules caliciformes sécrétant un mucus qui constitue la couche profonde du film lacrymal. Il est en continuité au niveau du limbe avec l'épithélium cornéen, transparent, dépourvu de cellules sécrétrices, reposant sur un stroma avasculaire et assurant, par l'étanchéité de ses jonctions intercellulaires, une forte cohérence et une surface cornéenne parfaitement lisse.

La zone de transition entre l'épithélium conjonctival et cornéen, appelée limbe, est fonctionnellement importante, puisqu'elle contient au niveau de sa couche basale, les cellules souches de l'épithélium cornéen [1]. Contrairement aux cellules souches hématopoïétiques, il n'existe à ce jour aucun marqueur spécifique des cellules souches limbiques. Néanmoins, leur existence et leur localisation exclusive au niveau du limbe, ont pu être mises en évidence par deux types de travaux expérimentaux. (1) L'étude de la différenciation cellulaire par marquage immuno-histochimique a montré que les cellules épithéliales cornéennes synthétisent des kératines différentes en fonction de leur degré de maturation. La synthèse de la kératine K3, témoin d'un phénotype cornéen différencié, est retrouvée sur l'ensemble de l'épithélium cornéen à l'exclusion de la couche basale de la région limbique [2]. En revanche, la kératine K19, largement exprimée sur l'épithélium cornéen fœtal, n'est retrou-

vée chez l'adulte qu'au niveau de la couche basale limbique qui abrite donc les cellules les plus indifférenciées. (2) L'étude du cycle et de la cinétique des cellules de l'épithélium cornéen a pu être réalisée grâce à l'incorporation péritonéale de thymidine tritiée chez la souris [3]. Sur la base de ces travaux, on peut proposer le modèle suivant pour expliquer le renouvellement épithélial (figure 1): les cellules souches, exclusivement localisées au niveau de la couche basale de la région limbique, ont un cycle cellulaire très lent, mais une durée de vie quasiment illimitée. Sous l'influence de stimulus biochimiques

ou mécaniques, elles se transforment en *cellules amplificatrices transitoires*. Ces cellules, douées d'une forte activité mitotique, mais n'ayant plus qu'un potentiel de vie limité, ont un mouvement de migration centripète le long de la couche basale, et sont d'autant plus différenciées qu'elles se rapprochent du centre de la cornée. En quittant la couche basale, et en se déplaçant vers la surface, elles perdent leur pouvoir mitotique avant de mourir et de desquamier.

Le caractère indifférencié et le cycle cellulaire lent, font partie des caractéristiques communes aux cellules souches. Ces deux propriétés ne sont

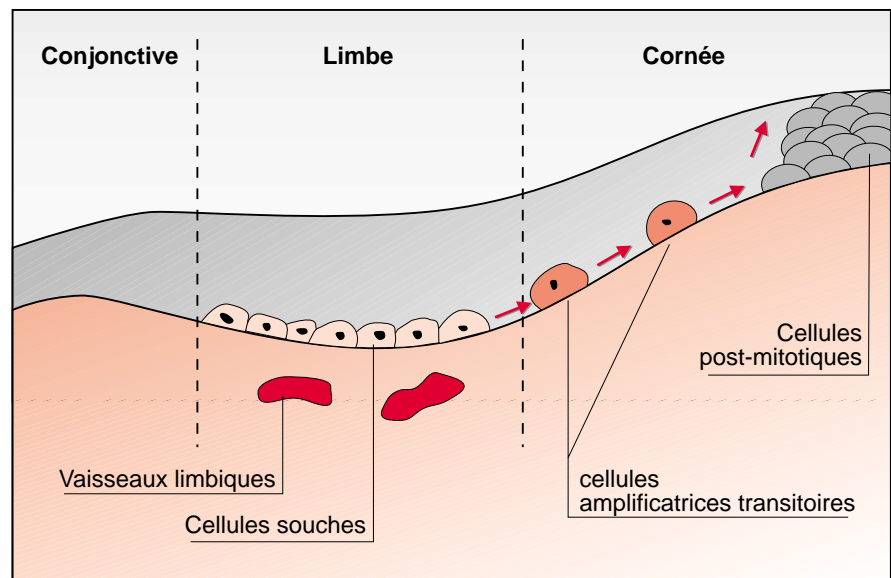


Figure 1. Les cellules souches, exclusivement localisées au niveau de la couche basale limbique, se différencient en cellules amplificatrices transitoires (CAT). Ces cellules douées d'une forte activité mitotique, ont un mouvement centripète le long de la couche basale de l'épithélium limbique puis cornéen, et se différencient d'autant plus qu'elles se rapprochent du centre de la cornée. En quittant la couche basale, elles évoluent vers un stade post-mitotique.

retrouvées qu'au niveau de la couche basale de la région limbique, qui est donc vraisemblablement la localisation exclusive des cellules souches de l'épithélium cornéen. Cette hypothèse est étayée par plusieurs arguments cliniques: (1) les néoplasies de l'épithélium cornéen prennent naissance à partir des cellules les moins différenciées, et sont presque toujours localisées au limbe; (2) les vaisseaux limbiques constituent un environnement nutritif plus favorable à l'homéostasie des cellules souches que le centre de la cornée qui est avasculaire; (3) la perte du phénotype cornéen épithélial après destruction du limbe, et sa restitution après greffe limbique, constituent les arguments cliniques les plus significatifs [4, 5].

Causes et conséquences cliniques des déficits en cellules souches limbiques

L'absence ou le dysfonctionnement des cellules souches limbiques entraîne une incapacité de l'épithélium cornéen de se régénérer, et un envahissement progressif de la surface cornéenne par un épithélium de type conjonctival. La cornée devient alors le siège d'une inflammation chronique et d'érosions récidivantes à l'origine de douleurs oculaires et de photophobie. Plus grave, l'induction d'une néovascularisation par l'épithélium conjonctival, et l'apparition de cicatrices cornéennes réduisent l'acuité visuelle, et peuvent conduire au maximum à la cécité. Enfin, la greffe de cornée est parfois la seule possibilité de rendre au malade une vision utile, mais les risques de rejet sont considérablement majorés par l'inflammation de la surface oculaire.

L'étiologie la plus fréquente des déficits en cellules souches limbiques est représentée par les brûlures thermiques ou chimiques de la surface oculaire, dont le pronostic est directement corrélé à l'importance de l'ischémie limbique. Le syndrome de Stevens-Johnson, les traumatismes chirurgicaux répétés (en particulier l'ablation itérative d'une néoplasie intra-épithéliale cornéenne) sont des causes iatrogènes secondaires possibles. Les causes congénitales (aniri-

die, kératodermie congénitale) sont beaucoup plus rares.

Implications thérapeutiques : greffes de limbe

La mise en évidence des cellules souches limbiques a permis de mettre au point différentes techniques de greffes de limbe. Elles ont pour principe d'apporter sur un œil déficient des cellules souches limbiques saines, qui sont capables de proliférer et de régénérer un épithélium cornéen normal et stable. Kenyon et Tseng ont publié en 1989 la première série d'autogreffes limbiques réalisées chez des patients souffrant d'une atteinte unilatérale [6]. La technique consiste à prélever sur l'œil sain deux greffons limbiques sur environ 2/3 de la circonférence (figure 2), et de les suturer au niveau de la région limbique de l'œil receveur après avoir retiré le pannus fibrovasculaire cornéen et excisé la conjonctive périlimbique. Cette technique est efficace puisqu'elle favorise la régression de la néovascularisation, la régénération d'un épithélium stable de phénotype cornéen, et améliore le pronostic d'une éventuelle greffe de cornée ultérieure. Elle est néanmoins réservée aux malades qui ne présentent qu'une atteinte unilatérale.

En cas d'atteinte bilatérale, seule une allogreffe limbique est réalisable, mais ses chances de succès sont limitées par les risques de rejet du greffon [7]. Le limbe est une région vascularisée, riche en cellules immunocompétentes. La confrontation des cellules de Langerhans de l'œil receveur avec celles du greffon favorise le rejet [8]. L'adjonction de traitements immunosuppresseurs semble améliorer le résultat des allogreffes, mais leurs effets secondaires en limitent l'utilisation.

Greffe d'épithélium cornéen cultivé *in vitro*

On a montré récemment que les cellules souches limbiques humaines, isolées à partir d'une petite biopsie limbique, peuvent être cultivées *in vitro* par passages sériés successifs sur des fibroblastes murins irradiés (cellules 3T3) [9]. Après plusieurs passages, l'épithélium néoformé est pluristratifié, de phénotype cornéen (synthétisant la kératine K3), et suffisamment cohérent pour être libéré de son support par l'enzyme Dispase II. Greffé sous le derme de souris athymiques, cet épithélium est capable de synthétiser une authentique membrane basale, comme le montre la présence par immunomarquage de collagène IV et VII.

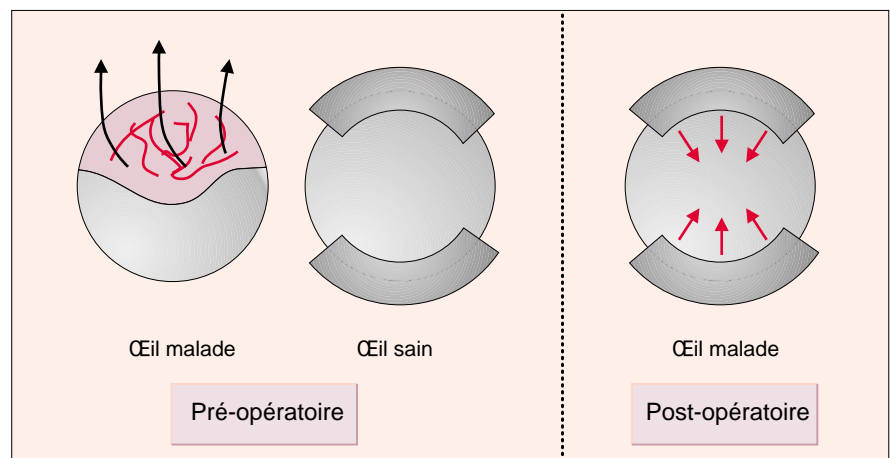


Figure 2. **Principe d'une autogreffe limbique : deux greffons limbiques prélevés sur l'œil sain sont suturés au niveau de la région limbique de l'œil atteint après que le pannus cornéen fibrovasculaire et la conjonctive périlimbique ont été excisés.** La prolifération des cellules souches du greffon va permettre la restitution d'un épithélium de type cornéen. La surface cornéenne de l'œil donneur peut tolérer un prélèvement ne dépassant pas 2/3 de la circonférence limbique.

Pour la première fois de l'épithélium cornéen cultivé *in vitro* à partir de cellules souches autologues limbiques a pu être récemment greffé chez deux patientes [10]. Celles-ci présentaient une destruction limbique unilatérale secondaire à une brûlure chimique ancienne. Un greffon épithélial cornéen a été synthétisé *in vitro* à partir d'une biopsie limbique d'environ 1 mm² prélevé sur l'œil sain, en suivant la technique décrite précédemment. Après avoir préparé la surface de l'œil receveur comme pour les greffes limbiques, l'épithélium cultivé a été simplement apposé sur la cornée et maintenu en place par une lentille souple pendant quelques jours. Le résultat semble comparable à celui d'une autogreffe de limbe. La surveillance à long terme (2 et 4 ans respectivement) a montré que l'épithélium reformé était stable et conservait un phénotype cornéen. Cette nouvelle procédure semble très séduisante. L'allogreffe de limbe était jusqu'à présent la seule méthode disponible pour traiter les atteintes sévères bilatérales. Elle s'accompagne d'un risque non seulement de rejet du greffon, mais également de transmission infectieuse, et

nécessite souvent le recours à un traitement immunosuppresseur. La possibilité de greffer un épithélium cornéen sain, synthétisé *in vitro* à partir de cellules souches autologues, représente une alternative thérapeutique particulièrement intéressante ■

RÉFÉRENCES

1. Kruse FE. Stem cells and corneal epithelial regeneration. *Eye* 1994 ; 8 : 170-83.
2. Schermer A, Galvin S, Sun TT. 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.
3. Cotsarelis G, Cheng SZ, Dong G, Sun TT, Lavker RM. Existence of slow-cycling limbal epithelial basal cells that can be preferentially stimulated to proliferate: implications on epithelial stem cells. *Cell* 1989 ; 57 : 201-9.
4. Huang AJW, Tseng SCG. Corneal epithelial wound healing in the absence of limbal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991 ; 32 : 96-105.
5. Tsai RJ, Sun TT, Tseng SCG. Comparison of limbal and conjunctival autograft transplantation in corneal surface reconstruction in rabbits. *Ophthalmology* 1990 ; 97 : 446-55.
6. Kenyon KR, Tseng SCG. Limbal autograft transplantation for ocular surface disorders. *Ophthalmology* 1989 ; 96 : 709-23.

7. Turgeon PW, Nauheim RC, Roat MI, Stopak SS, Thoft RA. Indications for keratoepithelioplasty. *Arch Ophthalmol* 1990 ; 108 : 233-6.

8. Thoft RA, Sugar J. Graft failure in keratoepithelioplasty. *Cornea* 1993 ; 12 : 362-5.

9. Lindberg K, Brown ME, Chaves HV, Kenyon KR, Rheinwald JG. *In vitro* propagation of human ocular surface epithelial cells for transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993 ; 34 : 2672-9.

10. Pellegrini G, Traverso CE, Franzi AT, Zingirian M, Cancedda R, De Luca M. Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium. *Lancet* 1997 ; 349 : 990-3.

Thanh Hoang-Xuan

Professeur des universités, praticien hospitalier, chef de service. Hôpital Bichat et Fondation Rothschild.
Fondation ophthalmologique Adolphe-de-Rothschild, 25, rue Manin, 75940 Paris Cedex 19, France.

Olivier Prisant

Chef de clinique-assistant des hôpitaux. Hôpital Bichat et Fondation Rothschild.

TIRÉS À PART

T. Hoang-Xuan.



GROUPE DE RÉFLEXION SUR LA RECHERCHE CARDIOVASCULAIRE

Sous le parrainage de l'INSERM et de la Société Française de Cardiologie

22-23 avril 1999

Deauville-Palais des Congrès

Secrétariat scientifique (Résumés)

Pr. C. Thuillez
Service Pharmacologie
CHU - Rouen
76031 Rouen Cedex
Fax : 02 32 88 90 49

e.mail : christianthuillez@chu.rouen.fr

Administration (Inscriptions et réservations hôtelières)

Deauville Organisation
Catherine Cutullic
BP 112 - 14800 Deauville
Tél : 02 31 98 54 44 - Fax : 02 31 88 65 76