

Journée ACOPHRA du 4 décembre 2003

« Techniques Réparatrices : de la Toxine Botulinique à la Chirurgie »

Conférence Docteur O. DAMOUR

Laboratoire des substituts cutanés - Hôpital E. Herriot

Génie tissulaire appliquée à la peau

La peau est un organe vital composé de deux tissus principaux, l'épiderme en surface et le derme en profondeur (fig. 1). L'épiderme est responsable de la fonction de protection de la peau. Il est majoritairement composé de cellules, les kératinocytes. Les kératinocytes sont en renouvellement constant et sont capables, en cas de blessure de l'épiderme, de le restaurer *ad-integrum*. L'épiderme contient également des cellules de Langerhans impliquées dans les phénomènes immunitaires, des mélanocytes assurant sa pigmentation et des cellules de Merkel en relation avec le système nerveux.

Le derme, quant à lui, est un tissu conjonctif vascularisé où la matrice extracellulaire est fortement majoritaire. Cette matrice macromoléculaire, dont la protéine principale est le collagène, est habitée par des fibroblastes, qui assurent son renouvellement en 1 à 5 ans. Contrairement à une blessure de l'épiderme, celle du derme induit des phénomènes inflammatoires qui aboutissent à une cicatrice.

L'épiderme est fortement ancré au derme par une structure complexe, la jonction dermo-épidermique.

Le LSC reconstruit *in vitro*, à partir de cellules cutanées humaines, l'épiderme et le derme seuls, ou unis en un complexe dermo-épidermique histologiquement proche de la peau humaine normale (fig. 1).

1.2. LES CULTURES D'EPIDERME

La technique de culture des kératinocytes a été décrite en 1975 par Rheinwald et Green. Elle est utilisée en routine pour les patients brûlés sur plus de 60% de la surface corporelle (Damour *et al* ; 1997). Le principe est de cultiver, à partir d'une biopsie de peau de quelques cm² réalisée à l'admission du patient, plusieurs milliers de cm² d'épiderme autologue.

Pour ce faire, les kératinocytes de la biopsie de peau sont isolés par traitement enzymatique. Ces kératinocytes sont ensuite ensemencés sur une couche nourricière de fibroblastes irradiés (l'irradiation des fibroblastes permet d'inhiber leur multiplication sans altérer leur sécrétion de facteurs de croissance). Des repiquages successifs permettent d'amplifier la culture. Le jour de la greffe, les feuillets épidermiques, qui se présentent comme des membranes translucides, sont transférés sur des gazes vaselinées qui permettent leur manipulation.

La préparation du patient pour la greffe est fondamentale pour obtenir une bonne prise des feuillets d'épiderme cultivé. La technique classique a été codifiée par Cuono en 1987 : le premier temps est l'excision précoce des tissus brûlés et l'application de peau de donneur obtenue lors des prélèvements d'organes. Le jour de la greffe, l'épiderme de la peau de donneur est abrasé et remplacé par l'épiderme cultivé du patient. Les feuillets de gaze portant les kératinocytes sont mis en place de façon jointive et fixés par des agrafes. Un "voile de mariée" agrafé peut compléter la fixation des feuillets (figure 2 = patient admission, biopsie, culture, boîtes contenant les FE, FE, greffe, résultat).

Pour pallier le manque de peau de donneur, cet épiderme cultivé peut également être utilisé en combinaison avec des auto-greffes du patient très largement expansées. Cette technique combinée permet d'apporter une trame de derme vivant et de membrane basale qui sont nécessaires à la prise des cultures (Braye *et al*, 2000a). Ces cultures d'épiderme peuvent également, chez les patients les plus sévères, être appliquées comme stimulant de la cicatrisation, pour des sites de prélèvement de greffe (Rivas Torres *et al*, 1996), ou des brûlures du deuxième degré très étendues (Braye *et al*, 2000b).

Dans tous les cas le contrôle de la prise de greffe s'effectue vers le sixième jour. L'ablation des gazes doit être prudente pour éviter l'arrachement du mince revêtement épidermique. La jonction dermo-épidermique met plusieurs mois à se reformer (Compton *et al*, 1989): l'amarrage du néo-épiderme à la plaie reste très fragile et les manipulations du patient doivent être extrêmement prudentes.

Une étude réalisée dans le service sur deux ans confirme l'intérêt des cultures d'épiderme pour les patients atteints sur plus de 70% de la surface corporelle (Braye *et al*, 2001a). En effet, pour ces patients, les cultures ont permis de recouvrir 21% de la surface corporelle totale. La durée d'hospitalisation moyenne est de 70 jours pour les brûlures supérieures ou égales à 70% de la surface corporelle. Cette étude confirme les limites de la technique : délai d'obtention, sensibilité à l'infection, importance de la préparation et du suivi du patient. Cependant la reconstruction de l'épiderme reste l'étape obligée qui seule permet, en rétablissant la fonction de barrière de la peau, la survie de patients atteints sur plus de 90% de la surface corporelle.

I.3. LES DERMES ARTIFICIELS

a- Les substrats dermiques acellulaires

Le principe des substrats dermiques est d'apporter une matrice de collagène qui va être revascularisée en trois semaines. Les fibroblastes du receveur la colonisent et synthétisent la matrice extracellulaire dans cette trame. Ceci aboutit à la reconstruction d'un tissu histologiquement proche du derme normal, au lieu de produire un tissu de granulation de structure anarchique. Une autogreffe ultra mince prélevée sur le patient est ensuite nécessaire pour remplacer l'épiderme. Le but final chez les grands brûlés est de remplacer le derme détruit, (ce que ne font ni les auto-greffes classiques ni les épidermes cultivés) pour obtenir un tissu proche de la peau normale au lieu d'un tissu cicatriciel (Damour *et al*, 1994). Les séquelles esthétiques et fonctionnelles des brûlures du troisième degré en seraient grandement diminuées.

Le LSC a breveté un substrat dermique composé de collagène bovin de qualité pharmaceutique, de glycosaminoglycanes composant essentiel du derme humain normal, réticulé par le chitosan (polysaccharide) pour le rendre insoluble et résistant (Collombel *et al.*, 1987) (fig.1). La capacité de ce substrat dermique à induire un néo-derme et à diminuer les rétractions cicatricielles chez l'animal est démontrée. Ce derme est actuellement en cours d'évaluation dans le cadre d'un protocole d'essai clinique selon la loi Hurriet. Le but de cette étude est de comparer les amplitudes articulaires et les résultats esthétiques de patients greffés d'un côté avec le substrat dermique et de l'autre côté de façon conventionnelle.

b- Les dermes vivants

Ils sont obtenus en cultivant in vitro des fibroblastes humains sur le substrat dermique. Les fibroblastes vont synthétiser dans cette trame de collagène bovin les différents types de collagènes, les glycoprotéines, les glycosaminoglycanes de la matrice extracellulaire humaine et induire un remodelage de la matrice de départ (Berthod *et al.*, 1993). Les fibroblastes synthétisent et libèrent des facteurs de croissance en quantité et en proportion physiologiques, ceci de façon continue. Ce derme équivalent vivant pourra donc être proposé comme tissu bioactif dans le traitement des plaies chroniques.

I.4. LES COMPLEXES DERMO-EPIDERMQUES

L'ensemencement des kératinocytes à la surface de ce derme équivalent permet d'obtenir un complexe dermo-épidermique. Pendant une semaine, le modèle est cultivé en immersion avant d'être élevé et cultivé à l'interface air-liquide (A/L) pendant 15 jours supplémentaires. Cette élévation A/L aboutit à la différenciation complète de l'épiderme caractérisée en histologie par la présence d'un épithélium pluristratifié et différencié présentant toutes les couches d'un épiderme normal de la couche basale jusqu'au stratum corneum. L'immunohistochimie révèle la présence des marqueurs de différenciation terminale des kératinocytes tels que les kératines K 10, la fillagrine, l'involucrine, les transglutaminases. Dans la partie dermique, les fibroblastes ont colonisé la matrice collagénique, se sont multipliés et ont synthétisé les protéines de la MEC du derme humain normal tels que les collagènes de type I, III, V, la fibronectine, l'élastine. La présence de fibroblastes vivants et de la matrice extracellulaire humaine qu'ils ont néosynthétisée est essentielle à la reconstruction et à l'organisation ultrastructurale de la jonction dermo épidermique (Sahuc *et al*, 1996).

Ces modèles de peau équivalente sont utilisés régulièrement en pharmaco-toxicologie comme alternative à l'expérimentation animale (Augustin *et al*, 1997). En effet, lorsqu'on applique par exemple une pommade irritante sur ces disques de peau reconstruite, les cellules vivantes qu'elle contient répondent à l'agression en relarguant des médiateurs de l'inflammation dosables dans le milieu de

culture. De même une crème anti-ride peut induire une synthèse de collagène, d'élastine (composant dermique responsable de l'élasticité de la peau) .

Ce sont également des outils pour la recherche fondamentale. En effet, cette peau simplifiée permet d'étudier les interactions entre les cellules de la peau et la matrice extra cellulaire du derme qui nous a permis de démontrer l'influence des kératinocytes sur la maturation du tissu élastique (Duplan *et al* ; 2000). Notre modèle est à notre connaissance le premier dans lequel des fibres élastiques matures sont détectées. Ce modèle, excellent outil pour étudier l'élastogénèse dont de nombreux mécanismes demeurent inconnus, nous a valu d'être intégrés dans un programme de recherche européen sur l'élastine.

Ces peaux reconstruites ont été greffées avec succès chez l'animal. Greffée chez la souris immunodéprimée, la peau reconstruite mature a un aspect morphologique et des caractéristiques histologiques très proches de la peau humaine. De plus elle s'est révélée pigmentée. En effet la technique de culture utilisée maintient le ratio kératinocytes/mélanocytes (fig.3). Une étude plus récente chez le porc immuno-déprimé a montré la faisabilité de greffes de grande surface avec ce complexe dermo-épidermique (Braye *et al*, 2001b). Ces résultats préliminaires permettent d'envisager l'utilisation de cette peau reconstruite en clinique humaine. Il s'agit à notre avis d'un produit trop complexe, trop coûteux et trop fragile pour avoir sa place dans le traitement de la brûlure à la phase aiguë. En revanche, il s'agit peut être du produit d'avenir pour la reconstruction des séquelles de brûlures. En effet les patients et en particulier les enfants qui ont survécu à des brûlures très étendues se trouvent, au stade des séquelles, prisonniers de placards cicatriciels inextensibles, qui s'aggravent avec la croissance. Alors, comme à la phase aiguë de la brûlure, la peau saine manque pour la chirurgie réparatrice. A ce niveau le développement d'équivalents de peau totale suscite de grands espoirs.