



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Contribution à l'étude de l'épiderme humain reconstruit in vitro selon ses conditions d'utilisation clinique

Boucher, Françoise

Award date:
1990

Awarding institution:
Universite de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

150 690

Département d'Histologie-Embryologie
Promoteur : Prof. R. Leloup
Copromoteur : Dr. A. Degen

**Contribution à l'étude de l'épiderme humain
reconstruit *in vitro* selon ses conditions
d'utilisation clinique.**

Boucher Françoise
1989-1990

LISTE DES ABRÉVIATIONS

FCS : foetal calf serum

DMEM : milieu de Eagle modifié par Dulbecco

EDTA : éthylène-diaminetétraacétique acid

DNA : acide déoxyribonucléique

BrdU : 3-bromo-2'-déoxyuridine

PBS : phosphate buffer saline

LDH : lactate déshydrogénase

TCA : acide trichloroacétique

DAB : 3,3'-diaminobenzidine tétrahydrochloride

nb : nombre

t : temps

h : heure

G : greffon

RPM : round per minute

L.I. : labelling index

S.E. : seeding efficiency

N.C.G. : nombre de cellules constituant le greffon

C, C+2, C+4 : confluence, confluence + 2 jours, confluence + 4 jours

B.H.A.S. : bouin hollandais acétifié sublimé

$[Ca^{++}]_e$: concentration en calcium extracellulaire

$[Ca^{++}]_i$: concentration en calcium intracellulaire

C.P.A. : cellules présentatrices de l'antigène

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Rue de Bruxelles 61 - 5000 Namur
Tél. 081/72.41.11 - Télex 59222 Facnam-b - Telefax 081/23.03.91

Contribution à l'étude de l'épiderme humain reconstruit *in vitro* selon ses conditions d'utilisation clinique.

Boucher Françoise

Résumé

Les cellules épidermiques en culture peuvent s'associer pour former des feuillets épithéliaux appropriés dans le traitement clinique des grands brûlés.

Cela signifie qu'après confluence, les feuillets épithéliaux sont détachés de leur substrat par une incubation en présence de dispase et placés sur un support (N-terface). En pratique, ces feuillets sont parfois laissés en attente plusieurs heures dans une étuve avant leur utilisation clinique.

Dans ce travail, nous avons préparé et étudié des feuillets épithéliaux afin de répondre à une question essentielle portant sur leurs conditions d'utilisation clinique et qui est de savoir si l'attente plus ou moins longue que peut subir un épiderme de culture détaché de son support après incubation avec une solution de dispase et mis sur N-terface en vue d'une utilisation clinique ultérieure, peut altérer la capacité de cet épiderme à participer au processus de cicatrisation.

Afin d'aborder ce problème, nous avons réalisé l'étude de plusieurs paramètres propres aux cellules constituant ces feuillets détachés en vue de repérer l'une ou l'autre altération importante. Ce travail comprend une étude morphologique, l'estimation de la capacité d'adhérence cellulaire à un substrat ("seeding efficiency", dosage d'ADN et de protéines), l'estimation de la capacité de prolifération cellulaire (incorporation dans l'ADN de marqueurs radioactifs, marquage avec l'anticorps Ki67) ainsi que l'étude de la viabilité (exclusion de colorant vital, dosage de l'activité LDH libérée par les cellules).

Nos résultats tendent à démontrer une altération progressive des cellules du greffon au cours du temps de mise en attente. Altération résultant probablement d'une perturbation de l'environnement cellulaire des cellules basales suite au détachement qu'a subi l'épiderme de culture.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Juin 1990

Promoteur : R. Leloup

J'aimerais tout d'abord exprimer mes sincères remerciements au Professeur R. Leloup pour m'avoir accueillie dans son département.

Je tiens également à remercier:

Madame A. Degen, copromoteur de ce mémoire et Monsieur Y. Poumay pour leur compétence ainsi que pour les conseils judicieux et l'aide morale qu'ils m'ont apportés tout au long de cette année,

le centre des brûlés de l'hôpital de Neder-over-Heembeek pour avoir aimablement collaboré à la réalisation de ce mémoire. Je tiens tout particulièrement à remercier le Docteur A. Vanderkelen pour sa disponibilité et pour nous avoir permis de participer concrètement aux soins des grands brûlés ainsi que Monsieur M. Paye pour sa gentillesse et pour l'aide apportée à la mise en oeuvre de ce travail,

Madame F. Zune pour l'aide précieuse et l'intérêt constant qu'elle m'a témoigné durant cette année,

Monsieur M. Lombet pour son aide technique en microscopie optique et pour la qualité de son iconographie,

Monsieur R. Déom pour m'avoir initiée aux techniques de la microscopie optique,

Mesdames N. Fiévet-Henry et Ch. Devignon pour leur aide concernant la microscopie électronique,

Monsieur E. Feytmans pour ses conseils judicieux concernant l'analyse statistique des résultats.

Je voudrais également exprimer toute ma reconnaissance aux autres membres du département pour leur sympathie ainsi qu'au Docteur B. Bienfait pour nous avoir fourni des biopsies cutanées.

Je remercie les départements de Monsieur R. Wattiaux, de Madame M.F. Ronveaux et de Monsieur J. Remacle pour avoir mis leur matériel à notre disposition.

Je ne voudrais pas terminer sans avoir remercié toutes les personnes qui, de près ou de loin, m'ont aidée à réaliser ces quatre années d'études.

TABLES DE MATIERES

1. INTRODUCTION	1
1.1. LA BRULURE.....	1
1.1.1. POSITION DU PROBLEME.....	1
1.1.2. RAPPEL HISTOPHYSIOLOGIQUE DE LA PEAU.....	1
1.1.2.1. L'épiderme.....	2
1.1.2.2. Le derme.....	6
1.1.2.3. La jonction épidermo-dermique.....	7
1.1.2.4. L'hypoderme.....	8
1.1.3. CRITERES DE GRAVITE DES BRULURES.....	9
1.1.3.1. Evaluation de le profondeur.....	9
1.1.3.2. Evaluation de la surface.....	10
1.1.3.3. Retentissement sur l'état général.....	11
1.2. LES TECHNIQUES DE RECONSTRUCTION CUTANEE.....	12
1.2.1. POSITION DU PROBLEME.....	12
1.2.2. LES AUTOGREFFES.....	13
1.2.3. AUTRES TECHNIQUES.....	14
1.2.3.1. L'utilisation d'homogreffes et de xénogreffes.....	14
1.2.3.2. Utilisation de pansements semi-synthétiques.....	14
1.2.3.3. Utilisation de peaux artificielles vivantes.....	15
1.2.3.3.1. Reconstruction d'épiderme seul.....	16
1.2.3.3.2. Reconstruction d'une peau totale.....	21
1.2.4. TECHNIQUE UTILISEE A L'HOPITAL MILITAIRE DE NEDER-OVER-HEEMBEEK.....	23
1.3. METHODES D'EVALUATION DES EPIDERMES DE CULTURE.....	24
1.3.1. ETUDE MORPHOLOGIQUE.....	24
1.3.2. MESURE DE LA VIABILITE.....	24
1.3.2.1. Exclusion d'un colorant.....	25
1.3.2.2. Dosage de la lactate deshydrogénase (LDH).....	25
1.3.3. MESURE DE LA CAPACITE D'ADHERENCE.....	26
1.3.3.1. Le seeding efficiency (S.E.) ou efficacité d'ensemencement.....	26
1.3.3.2. Le dosage des protéines.....	26
1.3.3.3. Le dosage de l'ADN.....	26
1.3.4. MESURE DE PROLIFERATION CELLULAIRE.....	27
1.3.4.1. Le cycle cellulaire.....	27
1.3.4.2. Incorporation de ³ H-thymidine.....	29
1.3.4.3. Incorporation de BrdU.....	30

1.3.4.4. Marquage avec l'anticorps Ki67.....	31
2. BUT DU TRAVAIL	33
3. MATERIEL & METHODES	34
3.1. CULTURE.....	34
3.1.1. MATERIEL.....	34
3.1.1.1. Milieux de culture des cellules 3T3 et des kératinocytes humains.....	34
3.1.1.2. Divers.....	34
3.1.2. METHODES.....	35
3.1.2.1. Culture des cellules 3T3 et préparation du lit nourricier.....	35
3.1.2.2. Culture primaire des kératinocytes et congélation.....	35
3.1.2.3. Culture secondaire des kératinocytes.....	36
3.1.2.4. Détachement du feuillet épithélial et mise sur support.....	37
3.1.2.5. Dissociation du feuillet épithélial.....	37
3.2. TECHNIQUES ANALYTIQUES.....	38
3.2.1. DETERMINATION "DU SEEDING EFFICIENCY" (S.E.).....	38
3.2.2. DOSAGE DES PROTEINES.....	38
3.2.3. DOSAGE DE L'ADN.....	39
3.2.4. INCORPORATION DE 3-BROMO-2'-DEOXYURIDINE : MESURE DU "LABELLING INDEX".....	39
3.2.5. INCORPORATION DE ³ H- <i>methyl</i> -THYMIDINE.....	40
3.2.6. MARQUAGE A L'AIDE D'UN ANTICORPS : LE Ki67.....	41
3.2.7. INCORPORATION DE BrdU DANS LE FEUILLET EPITHELIAL.....	41
3.2.8. MESURE DE LA VIABILITE CELLULAIRE AU COURS DU STOCKAGE DES FEUILLETS EPITHELIAUX.....	42
3.2.9. OBSERVATION EN MICROSCOPIE OPTIQUE.....	43
3.2.10. OBSERVATION EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE.....	44
3.3. INTERPRETATION DES RESULTATS.....	45
4. RESULTATS & DISCUSSION.....	46
4.1. RESULTATS.....	46
4.1.1. DETERMINATION DU DEGRE DE CONFLUENCE.....	46
4.1.1.1. Observation morphologique.....	46
4.1.1.2. Observation quantitative.....	47

4.1.1.3. Discussion et conclusion.....	47
4.1.2. DETERMINATION DU TEMPS MAXIMAL DE MISE EN ATTENTE EVENTUELLE DE L'EPIDERME DE CULTURE AVANT SON UTILISATION CLINIQUE.....	48
4.1.2.1. Observation morphologique.....	49
4.1.2.2. Observation quantitative.....	51
4.1.3. COMPARAISON N-TERFACE & GAZE VASELINEE.....	55
4.1.4. EVALUATION DES EPIDERMES DE CULTURE APRES DES TEMPS DE MISE EN ATTENTE ALLANT DE 0 A 8 HEURES.....	56
4.2. DISCUSSION.....	59
4.2.1. ALTERATION CELLULAIRE DE L'EPIDERME DE CULTURE DETACHE DE SON SUBSTRAT ET MIS EN ATTENTE.....	59
4.2.1.1. Hypothèse concernant le processus de différentiation du kératinocytes <i>in vivo</i>	60
4.2.1.2. Hypothèse concernant les conséquences que peut avoir une mise en attente prolongée d'un épiderme de culture après détachement.....	64
4.2.2. PERSPECTIVES EXPERIMENTALES.....	67
4.2.2.1. Mesure de la variation de $[Ca^{++}]_i$	67
4.2.2.2. Etude simultanée du cytosquelette et de la prolifération cellulaire.....	68
4.2.2.3. Estimation du degré de différenciation.....	68
4.2.3. CONSIDERATIONS SUR LA TECHNIQUE DE CULTURE DE KERATINOCYTES SELON GREEN ET RHEINWALD (1977)....	69
5. CONCLUSIONS.....	74
6. BIBLIOGRAPHIE.....	75

INTRODUCTION

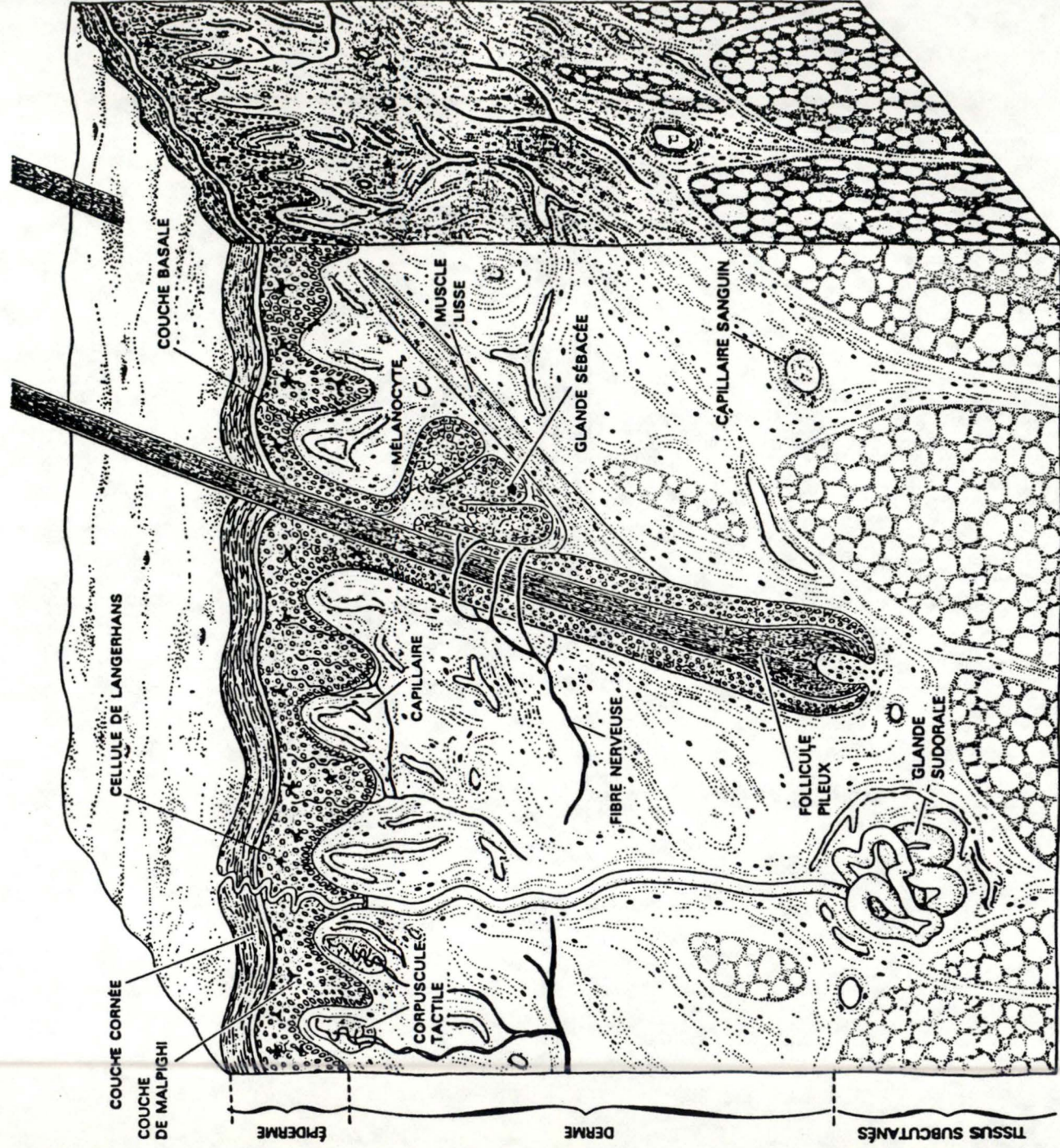


Fig. 1 : Structure de la peau (d'après Thivolet, 1986)

1. INTRODUCTION.

1.1. LA BRULURE.

1.1.1. POSITION DU PROBLEME.

La brûlure se caractérise par une destruction plus ou moins importante de notre revêtement cutané et parfois même des structures sous-jacentes provoquée par un agent thermique, chimique, électrique ou par des radiations ionisantes. Or, notre peau est un organe possédant une fonction essentielle, tellement évidente qu'elle en est presque oubliée, qui est celle d'une barrière interposée entre l'organisme et le milieu extérieur.

Ce n'est que dans le cas de grandes destructions cutanées comme, par exemple, celles observées lors de brûlures étendues que l'on prend conscience du rôle vital joué par notre peau. En effet, au-delà d'un certain pourcentage de destruction cutanée, le brûlé est en danger de mort et cela pour deux raisons essentielles. Tout d'abord, ne possédant plus sa barrière cutanée, les liquides circulant dans l'organisme vont s'écouler à l'extérieur entraînant d'importantes déperditions liquidiennes; d'autre part, les germes du milieu extérieur vont pouvoir pénétrer et proliférer dans l'organisme y créant de redoutables infections.

C'est donc le plus rapidement possible qu'il faut rétablir la barrière cutanée chez le grand brûlé.

1.1.2. RAPPEL HISTOPHYSIOLOGIQUE DE LA PEAU.

Pour comprendre l'évolution d'une brûlure et les problèmes posés par la reconstruction cutanée, il faut rappeler ici l'histophysiologie de la peau (fig.1).

La peau, loin d'être une simple enveloppe recouvrant notre corps, est un véritable organe, très complexe, constitué de deux couches très différentes en contact étroit l'une avec l'autre:

- une couche superficielle, l'épiderme, d'origine ectoblastique, constituée de cellules épithéliales spécifiques.
- une couche profonde, le derme, d'origine mésoblastique, constituée de tissu conjonctif et pénétrée jusqu'à une certaine profondeur par des inclusions épidermiques : (follicules pileux, glandes sébacées et glandes sudoripares), toutes trois tapissées de cellules

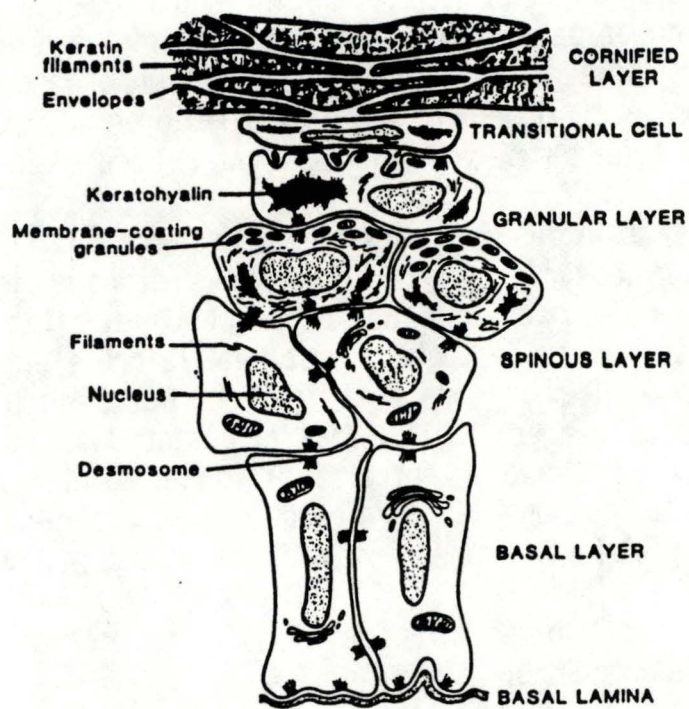


Fig. 2 : Schéma de la différenciation progressive du kératinocyte
(d'après Eckert, 1989)

épithéliales.

Sous le derme, s'étend l'hypoderme ou tissu sous-cutané constitué de tissu adipeux et qui relie étroitement la peau aux tissus sous-jacents.

1.1.2.1. L'épiderme.

Il s'agit d'un épithélium pluristratifié kératinisé constitué de 4 types cellulaires :

- les kératinocytes
- les mélanocytes
- les cellules de Langerhans
- les cellules de Merkel

Les keratinocytes, d'origine épiblastique, représentent 95% des cellules épidermiques. Ils se multiplient dans l'assise basale de l'épiderme puis migrent dans les couches suprabasales en subissant des modifications structurales en rapport avec leur différenciation, c'est-à-dire leur maturation kératosique.(fig 2).

Par ce processus, ils sont responsables de l'élaboration en surface d'une couche cornée imperméable, en contact direct avec le milieu extérieur.

Les mélanocytes, dérivés de la crête neurale, ont pour rôle principal de produire la mélanine. Ce pigment intervient dans la protection de la peau contre les ultraviolets (Junqueira & Carneiro, 1987).

Les cellules de Langerhans, originaires de la moëlle osseuse, jouent un rôle capital de reconnaissance des molécules étrangères à l'organisme qui ont traversé la couche cornée. Elles assurent la surveillance immunitaire de la peau (Edelson & Fink, 1985).

Les cellules de Merkel sont en relation avec des terminaisons nerveuses : leur rôle est encore assez peu connu.

En se basant sur l'observation de **l'évolution morphologique** des kératinocytes depuis l'assise basale de l'épiderme, zone où ils prolifèrent, jusqu'à la superficie, zone où ils desquament sous forme de cellules mortes, l'épiderme est conventionnellement subdivisé en quatre couches :

- le stratum basal
- le stratum spinosum
- le stratum granulosum
- le stratum corneum

Le stratum basal est constitué d'une seule assise de cellules palissadiques et cylindriques, orientées perpendiculairement à la surface de l'épiderme. Elles sont caractérisées par un cytoplasme basophile et un noyau ovoïde occupant presque tout le volume cellulaire. Elles sont reliées entre elles ainsi qu'à la couche supérieure par des desmosomes et à la membrane basale par des hémidesmosomes. Cette couche constitue le lieu principal de l'activité mitotique qui permet le renouvellement cellulaire (Junqueira & Carneiro, 1987).

Dans la couche basale s'observent des kératinocytes, des mélanocytes et des cellules de Merkel.

-Les kératinocytes ne représentent pas une population homogène. Récemment, il a été démontré que l'on pouvait distinguer morphologiquement deux types de cellules basales (Staquet, 1985) :

-des cellules "non dentelées", petites, cuboïdes, ayant, en volume, un rapport nucléo-cytoplasmique élevé avec des ribosomes et des mélanosomes concentrés autour du noyau et pauvres en filaments de kératine.

-des cellules "dentelées", plus grandes mais avec un rapport nucléo-cytoplasmique plus faible, contenant moins de mélanosomes et plus de filaments de kératine.

Les cellules "non dentelées" correspondraient aux cellules-souches appelées aussi "stem-cells" caractérisées par un potentiel de division élevé. Elles donnent naissance aux cellules suprabasales.

Les cellules "dentelées" correspondraient à des cellules qui auraient spécifiquement un rôle d'ancrage de l'épiderme au derme.

-Les mélanocytes possèdent un corps cellulaire arrondi pourvu de prolongements s'insinuant entre les cellules épithéliales du stratum basal et du stratum spinosum. Les tonofibrilles et les desmosomes y sont assez rares. Leur rôle principal est de produire de la mélanine, pigment stocké dans les kératinocytes du stratum basal et du stratum spinosum. Les grains de mélanine formés migrent dans les prolongements cellulaires pour être ensuite transférés dans les kératinocytes par un processus de sécrétion cytotrope (Junqueira & Carneiro, 1987).

-Les cellules de Merkel très semblables aux cellules épithéliales épidermiques, sont en relation avec des terminaisons nerveuses. Elles contiennent dans leur cytoplasme de petits grains denses. Ces observations ont fait émettre l'hypothèse que ces cellules seraient des récepteurs sensoriels mais qu'elles feraient également partie du système APUD (amine precursor uptake decarboxylation) qui produit des polypeptides de faible poids moléculaire et des amines biogènes (Junqueira & Carneiro, 1987).

Le stratum spinosum est constitué de cellules cuboïdes, polygonales, légèrement aplaties possédant un noyau central. Leur cytoplasme renferme de nombreux faisceaux de filaments convergeant vers de très nombreuses et petites expansions cellulaires se terminant sur des desmosomes. Les cellules de cette couche sont étroitement liées les unes aux autres par des systèmes d'attache leur donnant ainsi un aspect épineux en microscopie optique. La richesse du stratum spinosum en jonctions cellulaires assure une résistance relative vis-à-vis d'agents mécaniques externes comme la pression, la friction.

Parmi les cellules épineuses s'observent les cellules de Langerhans, cellules de forme étoilée, possédant un noyau indenté et un cytoplasme clair dépourvu de tonofilaments mais renfermant des inclusions caractéristiques ayant la forme de bâtonnets.

Ces cellules jouent un rôle essentiel dans la réaction immunitaire et donc dans le rejet possible des greffes. En fait, les cellules de notre organisme possèdent des antigènes dont la combinaison est propre à chaque individu. Ces antigènes sont déterminés par un ensemble de gènes formant le complexe majeur d'histocompatibilité ou CMH. Il existe des antigènes de classe I présents à la surface de toutes les cellules et des antigènes de classe II à distribution cellulaire restreinte : lymphocyte B, macrophage, monocyte, cellule dendritique, cellule épithéliale et cellule de Langerhans (Depelchin, 1987).

La présence d'antigènes de classe II permet aux cellules de Langerhans de jouer le rôle de cellules présentatrices de l'antigène ou CPA. Elles peuvent ainsi activer les lymphocytes T avec l'aide de l'interleukine I sécrétée par les kératinocytes. Ces lymphocytes T activés vont produire de l'interleukine II qui va agir sur d'autres lymphocytes T spécifiques de l'antigène. Ces derniers vont ainsi se multiplier et se spécialiser dans certaines fonctions comme la cytotoxicité. Les lymphocytes T peuvent également stimuler les lymphocytes B dans leur production d'anticorps. Il est important de noter l'existence des cellules de Grandstein qui activent les lymphocytes T suppresseurs (Edelson & Fink, 1985).

Le stratum granulosum est constitué de trois à cinq assises de cellules polygonales, aplaties, possédant un noyau central. Leur cytoplasme est riche en grains grossiers basophiles, appelés grains de kératohyaline. Ceux-ci contiennent de la profilagrine qui, lorsqu'elle se transforme en filagrine, aide à l'agrégation des filaments de kératine entre eux (Eckert, 1989).

On peut aussi observer dans les cellules de cette couche la présence de granules ovoïdes ou corps d'Odland formés au niveau de l'appareil de Golgi. Ces derniers se dirigent vers la membrane plasmique, fusionnent avec celle-ci et déversent leur contenu dans l'espace intercellulaire. Ce contenu est constitué de phospholipides et de mucopolysaccharides

acides dont la fonction serait celle d'un ciment intercellulaire assurant à l'épiderme un rôle d'étanchéité et empêchant la pénétration de particules étrangères (Junqueira & Carneiro, 1987).

Il est à noter qu'au niveau des épidermes épais s'observe une couche particulière appelée *stratum lucidum*. Celle-ci est formée d'une mince couche de cellules aplaties, éosinophiles dont les organites ne sont plus visibles et dont le cytoplasme est formé principalement de paquets de filaments enrobés dans une matrice dense aux électrons. On peut encore observer des desmosomes reliant les cellules entre elles ainsi qu'une activité enzymatique intense nécessaire à la destruction des organites (Eckert, 1989 ; Junqueira & Carneiro, 1987).

Le stratum corneum est formé d'éléments cellulaires anucléés, aplatis et kératinisés. La membrane plasmique est épaissie, atteignant une épaisseur de 15 nm au lieu des 7 à 10 nm habituels. On y observe un phénomène de desquamation continue (Junqueira & Carneiro, 1987).

Cette couche cornée peut être subdivisée en deux régions :

- une zone inférieure appelée *stratum compactum* où la kératine est sous forme de filaments et où les liaisons intercellulaires sont conservées.
- une zone superficielle ou *stratum disjunctum* caractérisée par l'absence de desmosomes et par une désorganisation de la kératine.

Au niveau physiologique, la couche cornée joue plusieurs rôles très importants (Schaefer, 1985) :

- elle constitue une barrière à la diffusion dans l'atmosphère de l'eau transépidermique.
- elle absorbe 30% des ultraviolets de type B et cela grâce à la présence d'acides aminés polaires et d'acide urocanique.
- elle empêche une déperdition trop importante de la chaleur corporelle.
- grâce à sa résistance à la friction et à sa dureté, elle protège des agressions mécaniques.
- elle constitue une barrière aux agressions microbiennes. Cette protection est le résultat d'un pH cutané acide et de la présence d'une flore résidente capable de produire des substances inhibitrices de la croissance des germes pathogènes.
- enfin, lors d'une absorption cutanée, la substance appliquée localement doit traverser le *stratum corneum*, les autres couches de l'épiderme et le derme avant d'être résorbée dans la microcirculation dermique. Or il semblerait que le *stratum corneum* soit l'étape limitante dans cette absorption. Cette fonction de barrière donnerait un rôle réservoir à la couche cornée.

D'un point de vue fonctionnel, en terme de cinétique, l'épiderme peut-être divisé en 2 compartiments (Heenen, 1987) :

- le compartiment prolifératif, zone où s'effectuent les mitoses. Il

correspond au stratum basal et aux couches inférieures du stratum spinosum,

-le compartiment différencié qui, alimenté par le premier est un compartiment de maturation que le kératinocyte traverse avant d'être éliminé en surface.

La desquamation de surface observée au niveau du stratum corneum élimine un nombre de cellules équivalent à celui qui résulte des mitoses basales maintenant l'épiderme dans un état d'équilibre permanent.

1.1.2.2. Le derme.

Le derme sur lequel repose l'épiderme, est un tissu conjonctif constitué de fibroblastes répartis au sein d'une matrice extracellulaire. Cette matrice extracellulaire, sécrétée par les fibroblastes, s'organise en un réseau tridimensionnel formé par différentes familles de macromolécules dont la plus abondante est représentée par la famille des collagènes (Thivolet, 1986).

Le derme superficiel, en contact avec l'épiderme, est appelé derme papillaire. Il est constitué d'un tissu conjonctif lâche (cellules et fibres en proportions plus ou moins égales) et forme des prolongements coniques s'enfonçant dans l'épiderme et appelés "papilles". Cette disposition "engrenée" renforce l'adhésion de l'épiderme au derme.

Le derme profond ou proprement dit est un tissu conjonctif fibreux, dense, irrégulier, caractérisé par une prédominance de fibres, essentiellement collagènes, organisées en faisceaux.

Le derme joue non seulement le rôle de support de l'épiderme mais aussi celui d'emballage d'une grande variété de structures : il contient notamment les annexes épidermiques c'est-à-dire les follicules pileux dont l'activité cyclique donne naissance aux poils, les glandes sébacées annexées aux poils et les glandes sudoripares, eccrines ou apocrines.

Les glandes sébacées assurent, par la sécrétion de sébum, une certaine souplesse à l'épiderme ainsi qu'une protection relative contre l'imbibition trop rapide de liquides. Les glandes sudoripares eccrines quant à elles assurent la thermorégulation au niveau de la peau par sécrétion de sueur (Junqueira & Carneiro, 1986).

Cette notion de l'origine épidermique des annexes est importante à souligner : en effet, elles pourront assurer une réépithélialisation en cas de destruction de l'épiderme.

Le derme joue également le rôle de tissu nourricier de l'épiderme car il renferme tout le réseau vasculaire de la peau qui apporte les éléments nutritifs indispensables. Enfin, c'est aussi à son niveau que l'on observe le réseau lymphatique, drainant les éléments du système immunitaire, ainsi que toutes les terminaisons nerveuses cutanées, d'une

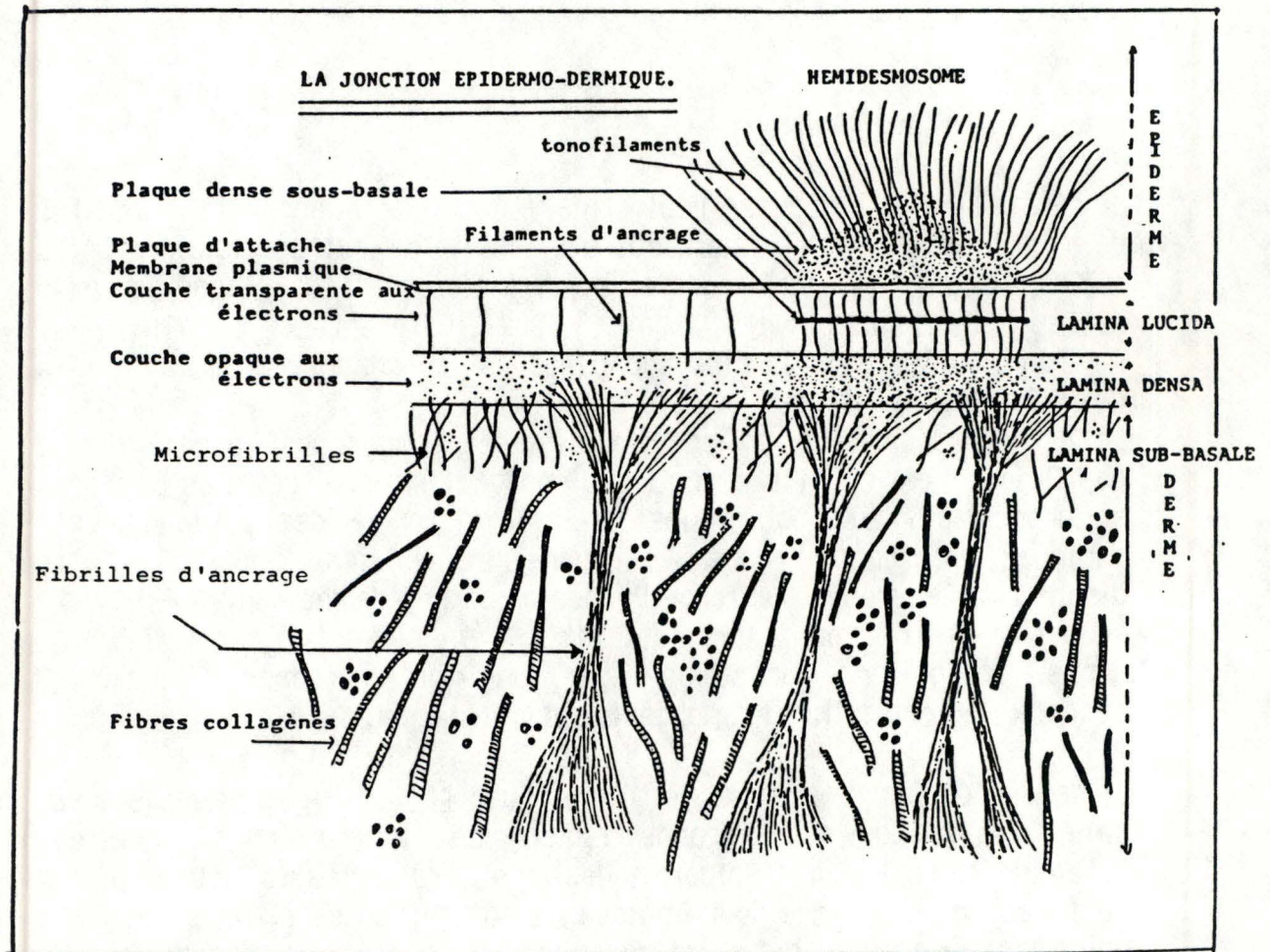


Fig. 3 : Structure de la jonction épidermo-dermique (d'après Leloup, 1985)

exceptionnelle variété et d'une densité très élevée (corpuscules nerveux spécialisés dans la sensibilité au froid, au chaud, aux pressions fortes ou faibles, au toucher léger ou soutenu) (Chevremont, 1966).

1.1.2.3. La jonction épidermo-dermique.

La microscopie optique met en évidence, à la jonction de l'épiderme et du derme, une fine couche anhyste appelée jonction épidermo-dermique. Celle-ci présente une structure complexe formée d'une matrice contenant des glycosaminoglycanes, des fibres réticuliniques parallèles entre elles et disposées perpendiculairement à la jonction ainsi qu'un réseau de fibres élastiques.

La microscopie électronique a permis de mieux comprendre l'architecture de cette jonction (Fig. 3).

Quatre zones s'y observent successivement depuis l'épiderme (Stenn, 1988; Leloup *et al*, 1985).

- la membrane plasmique des cellules basales
- la lamina lucida
- la lamina densa
- la lamina sub-basale

La membrane plasmique des cellules de l'assise basale porte, du côté dermique, des hémidesmosomes. Chaque hémidesmosome est constitué d'un épaissement opaque aux électrons : la plaque d'attache vers laquelle convergent les tonofilaments de kératine.

La lamina lucida est une couche transparente aux électrons de 30 nm d'épaisseur interposée entre les cellules et la lamina densa. Elle possède, face à chaque hémidesmosome, une ligne centrale dense aux électrons parallèle à la membrane plasmique ainsi que des filaments d'ancrage perpendiculaires à cette dernière. On a pu y mettre en évidence une protéine multimérique hautement glycosylée : la laminine qui assure une certaine adhésion des cellules à la lamina densa.

La lamina densa est une couche continue, dense aux électrons, d'une épaisseur de 50 à 80 nm contenant du collagène IV ainsi que de l'héparan sulfate.

La lamina sub-basale de 10 nm d'épaisseur se compose principalement d'un réseau fibrillaire dans lequel sont décrits trois types de fibres : les fibrilles d'ancrage, les microfibrilles ainsi que des fibres de collagène, toutes disposées perpendiculairement à la surface.

On a pu également mettre en évidence de la fibronectine au niveau de la

jonction épidermo-dermique. C'est une glycoprotéine assurant la liaison entre les kératinocytes et le collagène mais dont la localisation n'est pas encore bien déterminée.

Plusieurs rôles fondamentaux sont assurés par la jonction épidermo-dermique (Depelchin, 1989).

- un rôle de support et de soutien renforçant l'action mécanique du tissu conjonctif du derme
- un rôle d'attachement de l'épiderme au derme grâce à la laminine, la fibronectine et les hémidesmosomes
- un rôle de barrière sélective
- une influence dans la morphogenèse dermo-épidermique.

Il est à noter que les différents constituants de la jonction épidermo-dermique sont synthétisés à la fois par les fibroblastes du tissu conjonctif sous-jacent et par les kératinocytes de l'assise basale de l'épiderme (Uitto *et al.*, 1989).

1.1.2.4. L'hypoderme.

L'hypoderme est constitué d'un tissu conjonctif lâche contenant de nombreuses cellules adipeuses. Il a pour fonction de relier la peau aux organes sous-jacents tout en lui permettant un certain glissement vis-à-vis de ces organes. Les cellules adipeuses de ce tissu, quant à elles, remplissent plusieurs fonctions :

- une fonction d'amortisseur vis-à-vis des agressions externes
- une fonction de frein vis-à-vis de la déperdition de chaleur
- une fonction de barrière vis-à-vis des pertes d'eau.

On peut y remarquer la présence de corpuscules de Paccini qui sont des terminaisons nerveuses sensibles aux pressions élevées (Chevremont, 1966).

Après avoir envisagé les différentes structures de la peau et les fonctions qui leurs sont associées, il est facile de comprendre que toute destruction cutanée aura des répercussions plus ou moins importantes suivant l'étendue et la profondeur des lésions.

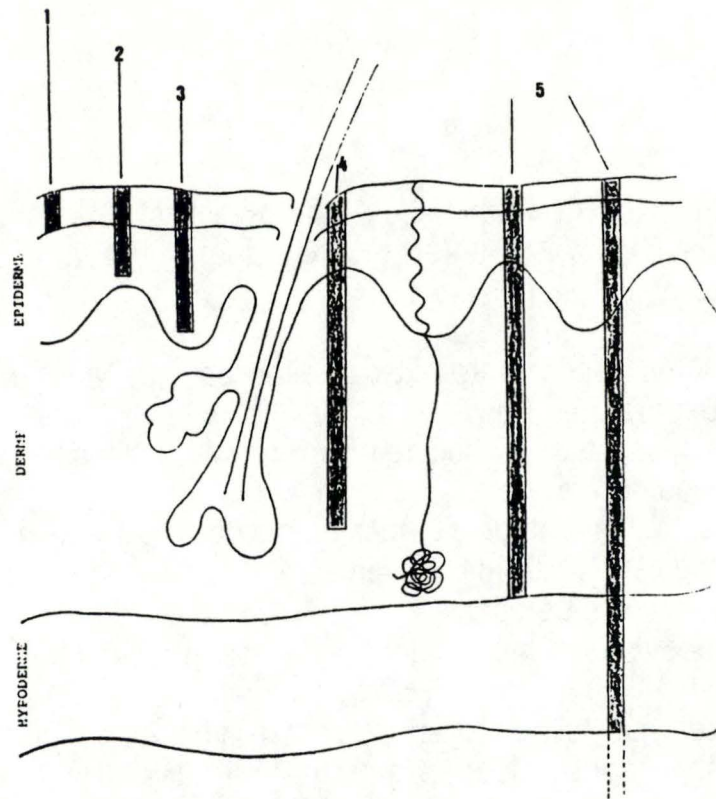


Fig. 4 : Schéma montrant les éléments cutanés intéressés par les brûlures selon leur degré

- 1 : 1^{er} degré
- 2 : 2^e degré superficiel
- 3 : 2^e degré profond : brûlure intermédiaire légère
- 4 : 2^e degré profond : brûlure intermédiaire profonde
- 5 : 3^e degré

Degré	Tissus détruits, Tissus respectés	Qualification
1 ^{er}	destruction des couches cornées et pavimenteuses respect des autres assises épidermiques	superficielle
2 ^e superficiel	destruction presque totale de l'épiderme respect de la seule assise génératrice	
2 ^e profond	destruction de l'épiderme dans son ensemble respect des seules crêtes épidermiques	intermédiaire légère
	destruction de l'épiderme destruction du derme superficiel respect des follicules pilosébacés et des glomérules sudoripares	intermédiaire profonde
3 ^e	destruction de toute structure épithéliale destruction du derme destruction éventuelle d'autres structures profondément situées	profonde

Tableau I : Répartition des brûlures en degrés et en qualifications (d'après Cabanne et Bonenfant, 1986)

1.1.3. CRITERES DE GRAVITE DES BRULURES.

En présence d'une brûlure, le médecin devra tenter d'en apprécier la gravité en se basant sur quelques critères essentiels à savoir l'étendue et la profondeur des lésions ainsi que leur retentissement sur l'état général du brûlé.

1.1.3.1. Evaluation de la profondeur (Cabanne & Bonnenfant, 1980).

Il existe différents types de classification dont la plus utilisée est la répartition des brûlures en degrés en fonction de la profondeur croissante des lésions (Fig. 4, tableau I).

La structure histologique de la peau permet de distinguer 3 degrés de brûlure :

- le 1er degré
- le 2ème degré subdivisé en superficiel, intermédiaire léger et intermédiaire profond
- le 3ème degré.

Le 1er degré est une brûlure ne dépassant pas les couches cornées de l'épiderme. Cliniquement, cette brûlure se traduit par la formation d'un érythème fugace et par une légère douleur. Elle correspond à un coup de soleil.

Le 2ème degré se caractérise par une destruction plus ou moins totale de l'épiderme.

Une distinction est faite entre

- le 2ème degré superficiel où est respectée l'assise basale de l'épiderme
- le 2ème degré dit intermédiaire léger où seules sont respectées les crêtes épidermiques
- le 2ème degré dit intermédiaire profond caractérisé par la destruction totale de l'épiderme et du derme superficiel mais où sont respectées les annexes cutanées (follicules pileux, glandes sébacées et glandes sudoripares).

Cliniquement, il se caractérise par l'apparition de phlyctènes (vésicules remplies d'une sérosité claire pouvant se rompre mettant à nu une surface rouge et très douloureuse.)

Le 3ème degré, quant à lui, se caractérise par la destruction de toute structure épithéliale, par la destruction du derme et éventuellement d'autres structures profondément situées avec production plus ou moins précoce d'escarres. La peau est devenue sèche, parcheminée et insensible

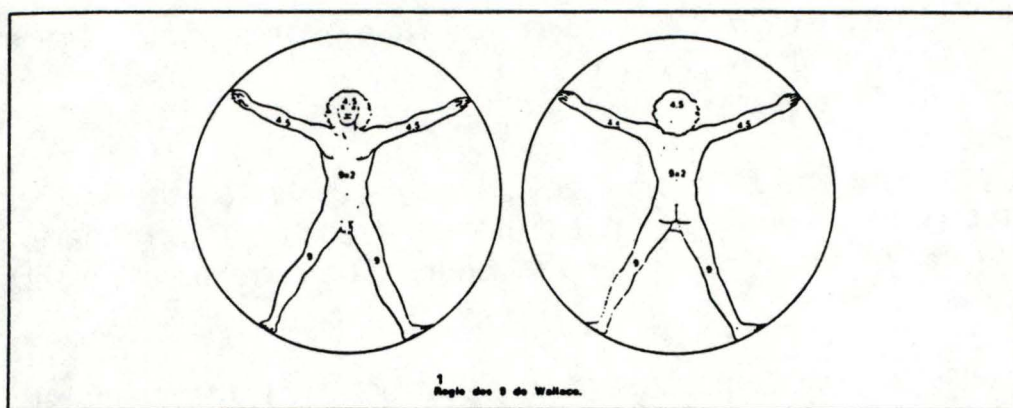


Fig. 5 : Schéma de base servant à établir la surface corporelle brûlée (Guilbaud & Perrot, 1988).

au toucher.

La profondeur des brûlures est souvent difficile à évaluer surtout au début et cela pour deux raisons : d'abord, parce que l'aspect est loin d'être toujours caractéristique, ensuite parce que les lésions sont loin d'être toujours uniformes. En effet, une telle gradation schématique ne rend qu'imparfaitement compte de la complexité des faits, de l'association courante de lésions du premier et du deuxième degré au pourtour d'un escarre du troisième degré et de l'irrégularité de la profondeur de nombreuses brûlures.

De plus, la brûlure n'est pas une lésion statique mais une lésion évolutive. L'absence ou la présence d'une infection peut soit permettre l'évolution vers la guérison ou, au contraire, aggraver les lésions.

Cependant, il sera primordial d'apprécier la profondeur d'une brûlure car de celle-ci dépendra son évolution : tant que les destructions tissulaires épargnent une partie des éléments épithéliaux, une cicatrisation spontanée sera possible.

C'est pourquoi, d'un point de vue évolutif, deux grands types de brûlure peuvent être distingués :

- les brûlures superficielles dont l'évolution en l'absence d'infection se fera vers la cicatrisation spontanée : celles-ci correspondent aux brûlures du 1er et 2ème degré
- les brûlures profondes qui, dès lors qu'elles sont étendues, n'ont aucune tendance à la cicatrisation spontanée et nécessiteront un recouvrement chirurgical : celles-ci correspondent aux brûlures du 3ème degré.

1.1.3.2. Evaluation de la surface (Guilbaud & Perrot, 1988).

Si l'appréciation de la profondeur exacte des brûlures est difficile, l'évaluation de la surface brûlée, par contre, est relativement aisée grâce à l'emploi de tables précises dont certaines comportent même des corrections en fonction de l'âge (règle de Lund et Browder utilisée chez l'enfant).

En pratique, l'estimation grossière de la surface brûlée se fait chez l'adulte en utilisant la "règle des 9" de Wallace où chaque partie du corps est exprimée en pourcentage : la tête ou chacun des membres supérieurs représentant 9 % de la surface du corps, la partie antérieure ou postérieure du tronc ou chacun des membres inférieurs 18 % et la paume de la main 1 % de la surface corporelle (Fig. 5).

Il est à noter que, chez l'adulte, une brûlure est grave si elle dépasse 10 à 15 % de la surface corporelle et que les chances de survie étaient à peu près nulles au-delà de 50 % (Cabanne & Bonnenfant, 1980). Cependant, les progrès médicaux réalisés ces dernières années permettent de maintenir

en survie, avec d'infinies précautions et de grandes souffrances, des brûlés à plus de 90% (Allain-Regnault, 1984)

1.1.3.3. Retentissement sur l'état général (Cabanne & Bonnenfant, 1980).

La destruction d'un grand nombre de cellules cutanées entraîne la libération dans l'organisme de produits de dégradation cellulaire, toxiques, vaso-actifs, à l'origine d'une réaction inflammatoire intense dont la principale conséquence est une hypovolémie pouvant aller jusqu'au choc hypovolémique.

La cause principale de cette hypovolémie est l'augmentation de la perméabilité capillaire entraînant une importante fuite d'eau, d'électrolytes et de protéines hors du secteur vasculaire à partir des zones brûlées ainsi que l'installation d'oedèmes dans les zones qui les entourent. L'issue en est soit la mort avec anurie soit la sédation en quelques jours avec une crise polyurique qui coïncide assez souvent avec le début de résorption des oedèmes.

Un autre phénomène observé au cours de l'évolution de brûlures graves est un amaigrissement progressif qui, si la perte pondérale est trop importante, peut aller jusqu'à un état de dénutrition s'expliquant en partie par la déperdition protéique et par les énormes besoins énergétiques de l'organisme qui doit faire face aux processus de réparation tissulaire.

Enfin, une des complications majeures des brûlures, responsable de plus de 60 % des décès est l'infection. La brûlure est une blessure ouverte baignant dans un liquide riche en protéines et en éléments tissulaires venant des zones endommagées ou mortes. Nous nous trouvons ainsi face à un milieu propice au développement de micro-organismes (Evans, 1965).

L'infection est toujours présente chez le brûlé mais tout est question de degré. Dans les cas favorables, en particulier quand l'état nutritionnel est satisfaisant, l'infection reste infraclinique, localisée et circonscrite. Mais cette infection peut déborder les défenses locales et se généraliser en septicémie dont l'issue sera alors souvent fatale.

D'autres facteurs cependant, conditionnent également le pronostic :

- la localisation des brûlures qui peut compromettre une fonction vitale (brûlure des voies respiratoires par exemple), augmenter le risque d'infection (brûlure du périnée par exemple) ou encore entraîner un risque fonctionnel (brûlure des paupières par exemple)
- l'âge du malade (les âges extrêmes étant les plus exposés)
- le terrain sur lequel elles surviennent (coexistence d'affection rénale, hépatique, cardio-vasculaire ou autre, alcoolisme...)
- l'existence de lésions associées comme chez les polytraumatisés

-le précocité de la mise en route d'un traitement approprié (Guilbaud & Perrot, 1988).

1.1.4. EVOLUTION DES BRULURES (Cabanne & Bonnenfant, 1980).

L'évolution d'une brûlure cutanée vers la cicatrisation va dépendre de la quantité de cellules épithéliales respectées, qu'elles soient d'origine épidermique ou annexielle. Elle va également dépendre de la qualité du sol conjonctif sur lequel ces cellules effectuent leur croissance.

C'est pourquoi, lorsque la nécrose cutanée n'est pas trop étendue et que le derme est peu touché (jusqu'aux deuxièmes degrés intermédiaires) on observe une activité prolifératrice importante à partir des îlots de cellules épithéliales conservés conduisant à la formation de foyers confluents d'épidermisation permettant une cicatrisation spontanée.

Par contre, lors de brûlures du troisième degré où toute cellule épithéliale est détruite ou lors de destructions cutanées étendues où le liseré périphérique d'épidermisation ne peut assurer le recouvrement de la surface brûlée, la cicatrisation spontanée n'est plus possible. Dans ces cas-là, il faudra recourir à un recouvrement chirurgical des surfaces brûlées au moyen de différentes techniques de reconstruction cutanée.

1.2. LES TECHNIQUES DE RECONSTRUCTION CUTANEE.

1.2.1. POSITION DU PROBLEME

L'évolution d'une brûlure profonde vers la cicatrisation se déroule suivant des séquences bien précises qui se passent en deux temps (Cabanne & Bonnenfant, 1986):

-le premier temps est celui de la détersion, c'est-à-dire l'élimination des tissus nécrosés : elle se fait soit spontanément par protéolyse d'origine macrophagique ou bactérienne soit, artificiellement, par excision chirurgicale, dans le cas de zones brûlées très étendues.

-le deuxième temps est celui de la reconstruction, reconstruction conjonctive d'abord suivie par la reconstruction épithéliale conduisant, en principe, à la cicatrisation des zones lésées.

La détersion permet, en effet, la constitution d'un tissu conjonctif nouveau, transitoire, appelé tissu de granulation dont le but est le comblement de la perte de substance : il comporte à la fois des fibroblastes et de nombreux capillaires sanguins néoformés, responsables de son aspect granuleux.

A propos de la régénération épithéliale, il est important de rappeler ici qu'en dehors des brûlures superficielles qui se réépithélialiseront spontanément ou des brûlures profondes dont la surface est si limitée que la réépithélialisation sera possible à partir des berges de la plaie, toutes les autres brûlures ne cicatriseront pas spontanément et nécessiteront obligatoirement le recours à un traitement chirurgical par utilisation d'autogreffes.

Mais, que faire lorsqu'il ne reste plus de peau disponible ?

Jusque récemment, le problème ne se posait pas : en effet, passé un certain pourcentage de destruction cutanée, il n'était pas possible de maintenir en survie les grands brûlés. Mais aujourd'hui, grâce aux énormes progrès réalisés dans le domaine de la réanimation, il est possible de maintenir en survie des brûlés de plus de 90 % (Allain-Regnault, 1984).

L'idéal serait alors de pouvoir fournir au chirurgien une "peau artificielle" comme peau de remplacement.

Celle-ci devrait répondre aux critères suivants (Jaksic & Burke, 1987) :

- permettre une réparation définitive (il faut donc pour cela utiliser du matériel vivant),
- être efficace sur le plan fonctionnel et satisfaisante sur le plan esthétique c'est-à-dire celui de la cicatrisation,
- être disponible en grande quantité pour tous les malades à un prix abordable,
- être applicable, d'urgence, dès l'arrivée du brûlé,
- enfin, que cette peau artificielle soit bien tolérée sur le plan immunologique sous peine de voir échouer le traitement.

Afin de répondre à ces exigences, différentes techniques ont été mises au point ces dernières années, à savoir :

- l'utilisation d'homogreffes et de xéno-greffes,
- la mise au point de peaux semi-synthétiques,
- la reconstruction de peaux artificielles vivantes constituées soit d'épiderme seul, soit de derme et d'épiderme.

1.2.2. LES AUTOGREFFES.

Les autogreffes, simples déplacements de tissu chez un même sujet et les isogreffes, réalisées entre organismes possédant le même capital génétique comme les jumeaux monozygotes, se réalisent en prélevant au dermatome des lambeaux de peau à partir de sites donneurs "sains" et en



Fig. 6 : Membre excisé sur lequel ont été déposées des autogreffes meshées.
(Document photographique de Marc Paye, Hôpital militaire de Bruxelles)

les réappliquant sur des sites receveurs "préparés".

Les auto-ou isogreffes ne déclenchent pas de réaction immunologique de rejet, sont parfaitement bien tolérées et permettent la cicatrisation en une dizaine de jours.

Ces greffes peuvent être utilisées telles quelles mais, le plus souvent, sont agrandies par une technique d'expansion appelée "meshage" après laquelle la peau prélevée est réappliquée sous forme de "filets" ce qui augmente de 3, 6 et même 9 fois la surface disponible (fig. 6).

Si l'autogreffe reste une des meilleures méthodes de reconstruction cutanée, il est à souligner qu'elle augmente encore la surface lésée à cicatrifier et qu'elle n'est praticable que s'il reste sur le brûlé des zones saines accessibles pour le prélèvement de ces greffes.

1.2.3. AUTRES TECHNIQUES.

1.2.3.1. L'utilisation d'homogreffes et de xéno greffes.

L'homogreffe (ou allogreffe) est une greffe effectuée entre deux individus de même espèce mais génétiquement différents. Elle s'opère via une banque de peaux prélevées sur des cadavres et conservées dans l'azote liquide. Leur utilisation se généralise de plus en plus dans les centres spécialisés de grands brûlés mais ce n'est qu'une solution provisoire, temporaire, car la peau humaine, caractérisée par un pouvoir antigénique important, est toujours rejetée par l'organisme receveur.

Des xéno greffes peuvent également être utilisées comme traitement provisoire : celles-ci consistent à greffer des peaux provenant d'espèces différentes telle la peau de porc utilisée dans certains services de grands brûlés (Compton *et al.*, 1989).

1.2.3.2. Utilisation de pansements semi-synthétiques.

Les pansements semi-synthétiques semblent également être une technique intéressante.

L'un des plus performants est celui développé par les américains J.F. Burke et I.V. Yannas (Burke *et al.*, 1981).

Celui-ci se compose de deux parties, une partie "dermique" et une partie "épidermique".

La partie "dermique" a pour but de former une membrane non-antigénique ressemblant au derme par sa structure anatomique et sa composition chimique. Il sert en fait d'échafaudage biodégradable pour la formation

d'un néoderme. La matière première utilisée dans la construction de ce derme est du collagène de peau d'origine bovine lié de manière covalente à de la chondroïtine-6-sulfate, un glycosaminoglycane isolé à partir de cartilage de requin. Les propriétés physiologiques, biochimiques et mécaniques vont dépendre du contenu en chondroïtine-6-sulfate, de la densité des liaisons entre les deux matériaux ainsi que de la taille moyenne des pores. La stérilité est assurée par un chauffage à 105°C et une immersion dans de la glutaraldéhyde. Ce derme est destiné à être colonisé par des cellules endothéliales et des fibroblastes qui synthétisent une nouvelle matrice tissulaire tandis que le matériel synthétique se dégrade : le néoderme est alors formé.

La partie "épidermique" simule la fonction barrière de la peau contrôlant les pertes de liquides et l'invasion de bactéries. Elle est formée d'une couche homogène de Silastic (élastomère de silicone) d'une épaisseur d'environ 100µm, formant un feuillet imperméable en surface.

Lorsque le néoderme est bien formé et que des autogreffes sont disponibles, cette couche de Silastic est ôtée afin d'être remplacée par ces autogreffes. Cette technique possède certains avantages non négligeables comme l'absence de rejet et sa disponibilité. Cependant, la nécessité de remplacer la couche de Silastic par des autogreffes n'en fait qu'un pansement provisoire (Jaksic & Burke, 1987).

Ce problème pourrait cependant être résolu par l'utilisation d'une nouvelle technique consistant à introduire, dans la couche dermique, des cellules épidermiques autologues (Jaksic & Burke, 1987).

1.2.3.3. Utilisation de peaux artificielles vivantes.

Les limitations évidentes dues au manque de peau saine disponible pour le prélèvement d'autogreffes chez des individus sévèrement brûlés et le phénomène de rejet observé par l'utilisation des homogreffes ont abouti ces dernières années au développement d'une recherche très active dans la reconstruction *in vitro* d'une "peau artificielle vivante" à partir des propres cellules du brûlé mises en culture ou, plus rarement, à partir des cellules d'un autre individu.

Cette reconstruction n'en est encore qu'à ses débuts et n'aboutit pour l'instant qu'à reproduire une peau simplifiée ne contenant aucun élément dermique. Elle offre cependant un réel espoir dans l'amélioration du traitement des grands brûlés.

Deux voies expérimentales permettent de reconstituer *in vitro* des peaux artificielles vivantes, soit en reconstituant l'épiderme seul, soit en reconstruisant une peau totale entière associant épiderme et derme.

1.2.3.3.1. Reconstruction d'épiderme seul.

Pour reconstruire *in vitro* un épiderme, il faut d'abord isoler les kératinocytes nécessaires à l'ensemencement d'une culture. Une des techniques les plus utilisées consiste à isoler les cellules épidermiques par trypsinisation de l'épiderme détaché du derme. Les kératinocytes isolés sont alors ensemencés sur un substrat où ils pourront s'attacher, proliférer et se différencier.

Divers substrats sont utilisés à savoir :

- les substrats inertes
- les matrices biologiques acellulaires
- les matrices biologiques cellulaires servant de lit nourricier

Cultures sur substrats inertes.

Le verre, le plastique, l'agar et la gélatine peuvent servir de substrat à des cultures de kératinocytes en vue de l'obtention d'un épiderme de culture. Cependant, la prolifération cellulaire est limitée et ne permet pas d'augmenter le nombre de cellules de façon suffisante (Alvarez & Biozes, 1984).

Cultures sur matrices biologiques acellulaires.

Ces matrices sont réalisées à partir des différents constituants de la jonction épidermo-dermique. Elles sont soit simples c'est-à-dire formées d'un seul élément de la jonction (collagène IV, laminine ou fibronectine), soit complexes, formées de plusieurs éléments provenant de cette jonction.

L'adhésion des kératinocytes à la matrice semble cependant demander un certain temps ce qui peut retarder considérablement la prolifération cellulaire (Murray *et al.*, 1979).

Cultures sur matrices biologiques cellulaires.

Une matrice biologique cellulaire appelée aussi "feeder layer" ou lit nourricier est constitué d'un tapis de cellules actives métaboliquement mais rendues incapables de se diviser par irradiation ou par traitement à la mitomycine, agent antimitotique empêchant la réplication de l'ADN. Les cellules les plus utilisées pour constituer ce feeder layer sont les cellules appelées 3T3 qui sont, en fait, des fibroblastes de souris embryonnaires transformés (c'est-à-dire capables de se multiplier indéfiniment) (Todaro & Green, 1963). Ce lit nourricier de 3T3 est utilisé pour la culture de kératinocytes dans la technique de Green (Green & Rheinwald, 1977) qui semble actuellement la meilleure technique si l'on veut produire dans les délais les plus courts avec une quantité limitée de

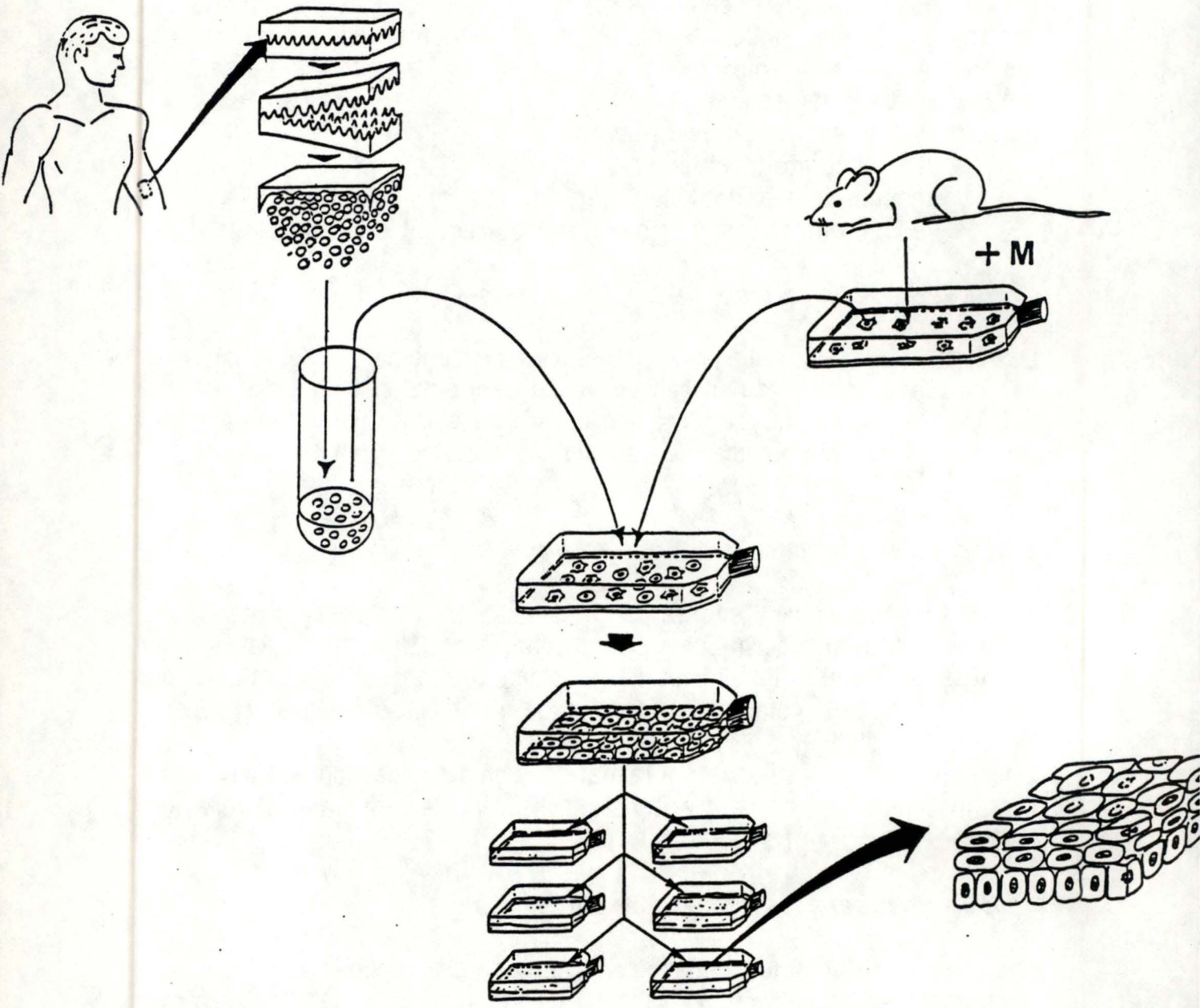


Fig. 7 : Technique de culture selon H. Green.

cellules disponibles de larges surfaces d'épiderme de culture (Fig. 7).

L'originalité de cette technique repose sur deux points :

- l'utilisation d'un lit nourricier de 3T3,
- l'amélioration du milieu de culture rendu particulièrement favorable à la fois à la prolifération et à la différenciation des kératinocytes.

Cette technique se réalise en deux temps : en un premier temps, il faut préparer les lits nourriciers de 3T3 dont les divisions sont bloquées par la mitomycine, sur lesquels, dans un deuxième temps, seront ensemencés les kératinocytes dispersés et en suspension.

Les kératinocytes ensemencés sur ces lits nourriciers de fibroblastes se multiplient formant ainsi des colonies de plus en plus grandes refoulant à la périphérie les 3T3 qui sont ainsi peu à peu éliminés (Fig. 8).

Par ce procédé, les boîtes de culture sont recouvertes en 10 à 15 jours d'un véritable tapis cellulaire qui constitue le feuillet épidermique : celui-ci est ensuite transféré sur un support (soit de l'N-terface, soit de la gaze vaselinée) afin de pouvoir être posé sur le brûlé. Détachés de la boîte, ces épidermes de culture ont l'aspect d'une membrane transparente (Fig. 9).

Celle-ci, observée au microscope optique, apparaît constituée de 2 à 8 couches cellulaires selon les endroits (Gangolphe *et al.*, 1987)(Fig. 10).

On peut également, au lieu de détacher le feuillet épidermique à la dispase (enzyme protéolytique agissant spécifiquement au niveau des protéines de la membrane basale), le redissocier par la trypsine et réensemencer les cellules dans d'autres boîtes de culture afin d'augmenter la surface d'épiderme de culture disponible. Par cette technique, il est ainsi possible d'obtenir en l'espace de trois semaines environ, au départ d'une biopsie cutanée de 2 cm², 1 m² d'épiderme de culture prêt à être greffé.

Le lit nourricier de 3T3 présente plusieurs avantages :

- il fournit des facteurs de croissance supplémentaires. On a pu mettre en évidence, par exemple, la sécrétion de FGF (fibroblast growth factor) dont le mode d'action ressemble à celui de l'EGF (epidermal growth factor) en ce sens qu'il stimule la croissance des cellules épidermiques (O'Keefe *et al.*, 1988),
- il inhibe la prolifération des fibroblastes humains qui, inévitablement, contaminent la suspension de cellules épidermiques suite à la dissociation épidermo-dermique (Thivolet, 1986)(en effet, sans 3T3, ces fibroblastes en prolifération finissent par étouffer la culture de kératinocytes),
- il produit des molécules, telles la laminine, la fibronectine et le collagène IV, molécules de la jonction épidermo-dermique qui favorisent l'adhésion des kératinocytes (Alitalo *et al.*, 1982),
- il permet également d'ensemencer les kératinocytes à des densités plus

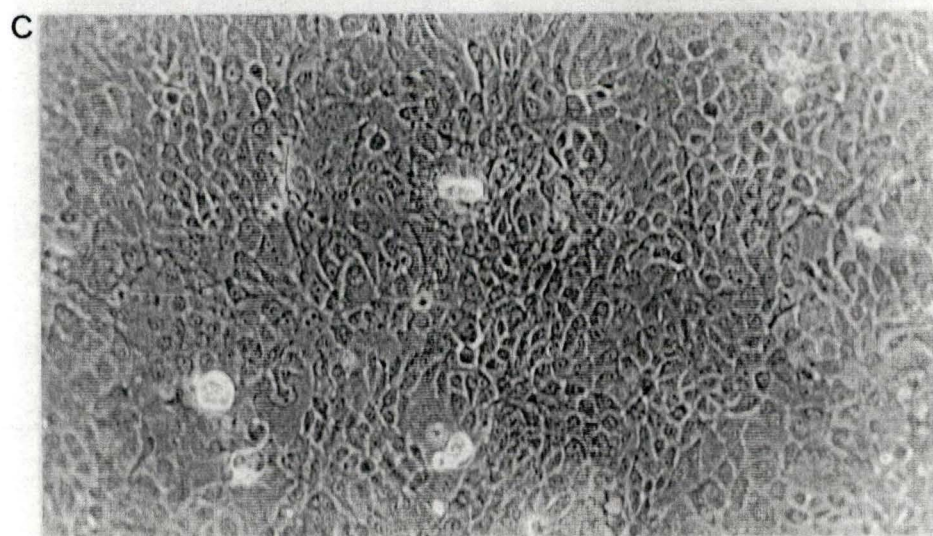
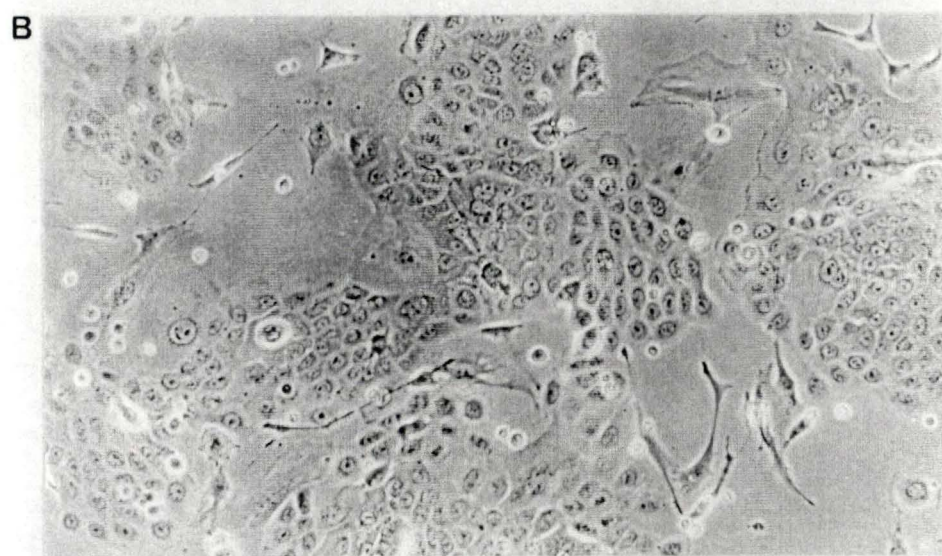


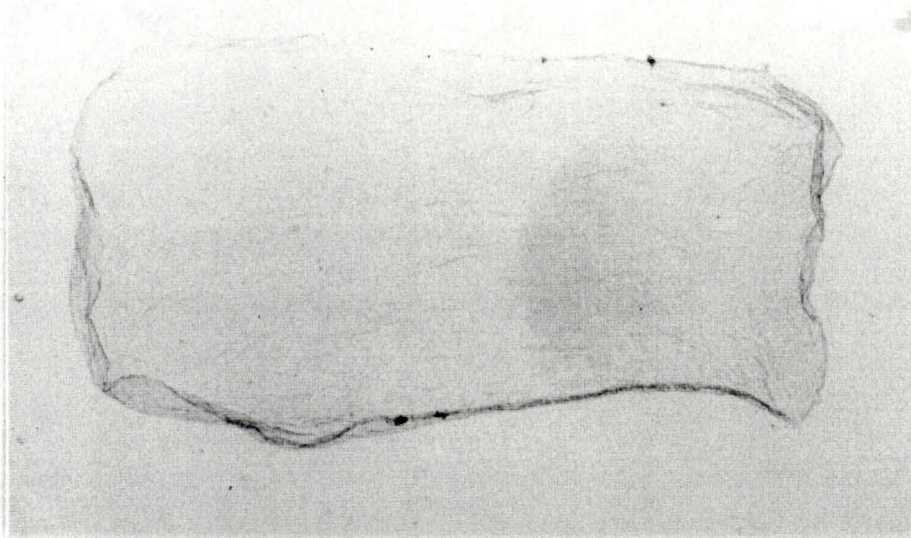
Fig. 8 : Evolution progressive d'une culture de kératinocytes réalisée selon la technique de Green (avec lit nourricier de 3T3) (gross. 330x)

A : culture de 3 jours

B : culture de 6 jours

C : culture de 9 jours

A



B



Fig. 9 : Photographies d'épidermes de culture obtenus après détachement à la dispase.

B : Notons la rétraction que subit le feuillet épidermique suite au détachement réalisé.

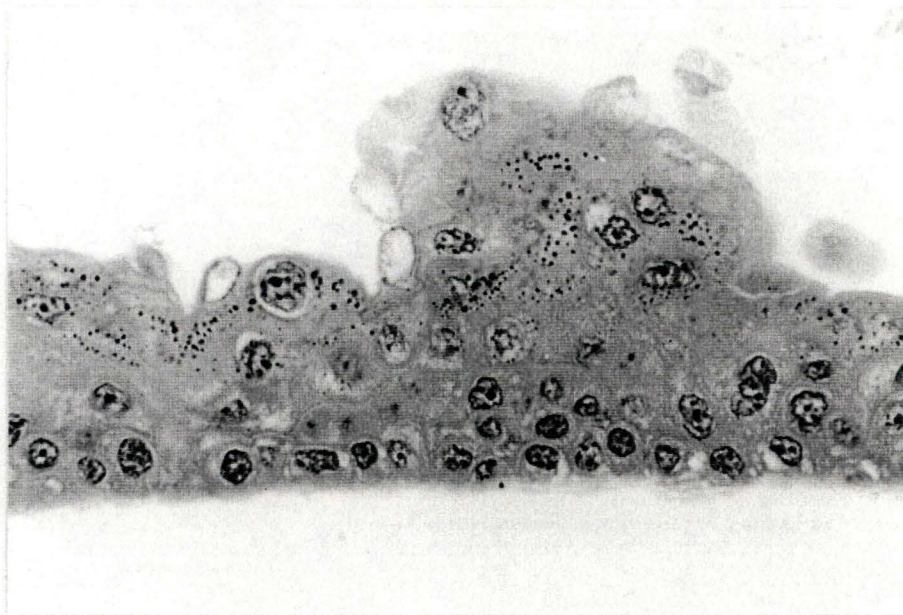


Fig. 10 : Coupe histologique d'un épiderme de culture obtenu par la technique de Green 10 jours après la mise en culture (gross. 570x)

faibles (Kondo *et al.*, 1979).

Quant au milieu nutritif utilisé dans la technique de Green, celui-ci s'est peu à peu amélioré par rapport aux milieux traditionnels utilisés en culture par l'ajout de plusieurs additifs qui favorisent à la fois la prolifération et la différenciation des kératinocytes.

Aux éléments de base qui sont le DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) et le HAM (Nutrient mixture HAM'S F12 avec L-Glutamine) sont ajoutées des hormones et autres molécules dont l'utilisation est relativement classique dans la mise au point de milieux de culture élaborés pour étudier l'un ou l'autre type cellulaire :

- du sérum de veau foetal apportant des facteurs de croissance,
- de l'EGF (Epidermal Growth Factor) stimulant actif de la prolifération des kératinocytes qui ont déjà commencé leur différenciation : il agit en ralentissant la maturation de ces derniers (Pruniéras, 1979),
- de la toxine cholérique qui augmente la concentration cellulaire en cAMP (Darnell *et al.*, 1988), or cet cAMP favorise la croissance cellulaire si la colonie prolifère et la différenciation cellulaire si la colonie est en pleine maturation (Karasek, 1983; Green, 1978),
- de l'hydrocortisone, glucocorticoïde favorisant la morphologie épithélioïde de la culture (Rheinwald, 1980) et augmentant la prolifération cellulaire (Rheinwald & Green, 1975; Karasek, 1983),
- de l'insuline favorisant l'entrée de glucose et d'acides aminés dans la cellule (Delcommenne, 1986) et pouvant jouer le rôle de facteur de croissance à concentration élevée (Darnell *et al.*, 1988),
- de l'adénine, base azotée intervenant entre autre dans la formation de l'ADN et de l'ARN (Darnell *et al.*, 1988),
- un mélange de transferrine et de triiodothyronine : la première molécule favorisant l'apport de fer au niveau de la cellule (Darnell *et al.*, 1988; Hammar *et al.*, 1990) alors que la deuxième molécule augmente le métabolisme général (Delcommenne M., 1986),
- des antibiotiques parmi lesquels, les plus utilisés sont la pénicilline et la streptomycine ainsi que la gentamycine.

Remarque : une nouvelle technique de mise en culture des kératinocytes en absence de sérum semble être vouée à un avenir intéressant. Cette méthode est une méthode en deux phases :

- la première phase, permettant une prolifération cellulaire importante, consiste à cultiver des kératinocytes dans un autre milieu nutritif contenant une faible concentration en calcium (0,1 mM), le MCDB 153, auquel sont ajoutées de fortes concentrations en acides aminés afin d'éviter tout manque nutritionnel,
- la deuxième phase, quant à elle, permet une différenciation cellulaire, elle se fait dans du DMEM auquel on ajoute 10 % de sérum de veau foetal ainsi que 1,8 mM de calcium (Pittelkow & Scott, 1986).

Cette technique semble donner des résultats similaires sinon meilleurs à ceux obtenus par la méthode de Green. De plus, elle possède trois avantages non négligeables :

- une dépendance moindre vis-à-vis du sérum,
- l'absence de fibroblastes murins transformés, car si les 3T3 sont rejetés hors de la culture lors de la prolifération cellulaire, il n'est pas impossible qu'il en subsiste quelques-uns à l'intérieur du greffon; de plus, lors d'études entreprises sur le kératinocyte obtenu *in vitro*, il est préférable de ne pas avoir d'interférence possible avec d'autres types cellulaires,
- le dernier avantage de cette technique est l'absence d'utilisation dans le milieu nutritif de plusieurs additifs utilisés par Green dont la toxine cholérique qui, malgré son retrait 24 heures avant l'utilisation clinique du greffon, reste liée de façon irréversible, continuant à augmenter l'AMPc dans ces cellules.

A l'heure actuelle, la technique de Green reste cependant la technique donnant les résultats les plus satisfaisants dans l'obtention d'épidermes de culture pouvant être utilisés dans le traitement des grands brûlés. Elle présente l'indéniable avantage de combiner à la fois une extension rapide de la surface des feuillets épidermiques obtenus ainsi qu'une certaine différenciation (Gallico *et al.*, 1984; Faure *et al.*, 1987).

L'épiderme de culture, observé en microscopie optique, montre en effet qu'il est constitué de 2 à 8 couches de cellules avec une assise basale d'allure cuboïdale et une différenciation progressive des cellules vers le haut du feuillet. Les cellules sont liées entre elles par des interdigitations et de nombreux desmosomes. Elles peuvent contenir des grains de kératohyaline. Les cellules les plus superficielles se caractérisent par l'absence de noyau et l'épaississement de leur membrane.

Par contre, on n'observe pas de membrane basale et les différentes kératines présentes ne se retrouvent pas en même proportion que celles rencontrées *in vivo*

En elle-même, la culture de kératinocytes présente un autre avantage non

négligeable à savoir l'absence des cellules de Langerhans dans les épidermes de culture obtenus (Faure *et al.*, 1987) Or, ces cellules sont responsables du caractère antigénique de la peau. En effet, en greffant une peau étrangère, on introduit chez le receveur des cellules dont la combinaison antigénique concernant le CMH est différente de celle des cellules du receveur. Cela va entraîner une présentation de l'antigène aux lymphocytes T par les cellules de Langerhans et donc un rejet probable (Roitt *et al.*, 1985).

Le non-rejet peut être expliqué de trois manières différentes :

- la greffe ne possède pas de cellules présentatrices de l'antigène nécessaires à l'initiation de la réponse immunitaire. Cependant, dès les premières semaines suivant la greffe, on peut observer une colonisation de cette dernière par les cellules de Langerhans du receveur. Néanmoins le rejet n'a pas lieu. Ce phénomène s'explique par le fait que les cellules épidermiques et les cellules de Langerhans doivent être syngéniques pour être capables d'activer le système immunitaire (Thivolet *et al.*, 1986),
- l'absence de CPA ne serait pas l'explication du non-rejet. En fait cette absence en même temps que l'immunosuppression vécue par le brûlé lors des premiers jours (Edelson & Fink, 1985) aide simplement à un non rejet temporaire de l'allogreffe. Mais, entre le dixième et le vingt-deuxième jour qui suivent la greffe, on assiste à un rejet c'est-à-dire une lyse des cellules du donneur qui sont progressivement remplacées par celles du receveur. Cette "substitution" cellulaire expliquerait le non rejet apparent (Auböck & Fritsch, 1987; Auböck *et al.*, 1988).
- Certains affirment (Gielen *et al.*, 1987) ne pas avoir mis de réaction de reconnaissance et de rejet du tissu étranger en évidence mais avoir observé un remplacement progressif des cellules du donneur par les cellules de l'hôte.

L'incompatibilité peut également être évitée par l'utilisation d'immunodépresseurs qui ont pour effet de diminuer la réponse de l'hôte contre le greffon. On peut citer pour exemple la cyclosporine qui interviendrait au niveau de la production et de la libération des interleukines. L'immuran, quant à lui, inhibe la synthèse d'anticorps et perturbe la mémoire immunologique.

Il ne faut cependant pas méconnaître les quelques désavantages inhérents à la technique de Green, à savoir :

- le délai de 3 semaines nécessaires à la formation de ces greffes de culture,
- le coût très élevé de la technique,
- la qualité fonctionnelle et esthétique de ces greffons à long terme,
- enfin, cet épiderme de culture ne représente qu'une partie de la peau et lui donner un support de tissu conjonctif vivant serait souhaitable, la

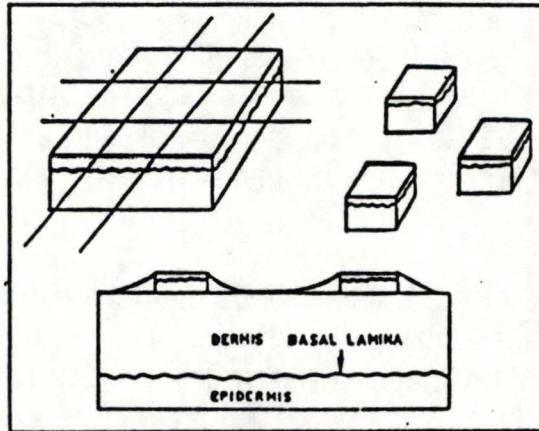


Fig. 11 : Schéma de la méthode proposée par Igel et Freeman.
 La peau humaine (split-thickness) est coupée en petits carrés qui sont mis en culture sur la face dermique de lambeaux de peau de porc (d'après Pruniéras et al., 1979)

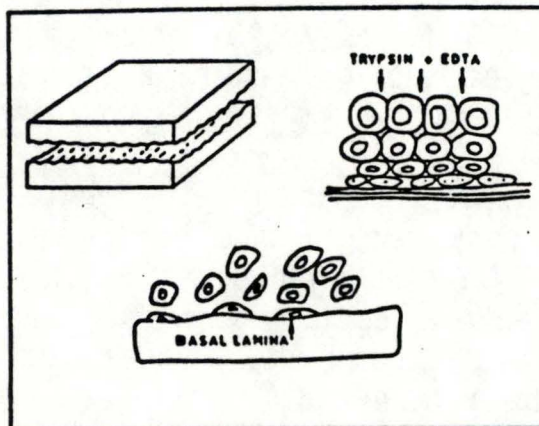


Fig. 12 : Schéma de la méthode proposée par Pruniéras et al.(1979).
 La suspension de cellules épidermiques est mise en culture sur un derme désépidermisé.

peau de cicatrice obtenue restant, en effet, mince et peu flexible.

1.2.3.3.2. Reconstruction d'une peau totale.

La reconstruction d'une peau totale consiste à associer un derme à l'épiderme reconstruit. Plusieurs dermes peuvent être utilisés :

- le derme de porc
- le derme humain
- le derme équivalent

-derme de porc ou derme humain

La technique actuellement utilisée est inspirée de la méthode proposée par Igel et Freeman qui consiste à cultiver des biopsies de peau humaine sur la face dermique de peau de porc (Fig. 11).

En fait, cette technique a été mise au point par Pruniéras *et al.* (1979) qui cultivent une suspension de cellules épidermiques sur un derme allo- ou xénogénique qui a été préalablement désépidermisé. Le processus de désépithélialisation préserve la membrane basale contenant le collagène IV et la laminine qui assure l'attachement d'un maximum de cellules épidermiques (Pruniéras & Regnier, 1987) (Fig. 12).

Cette technique semble être intéressante en plusieurs points :

- les dermes désépidermisés, après avoir été stérilisés dans des bains d'antibiotiques ou par irradiation gamma, peuvent être congelés dans de l'azote liquide puis conservés à -20°C, d'où la possibilité d'établir une banque de dermes
- le greffon recombinaisonnel ainsi obtenu est très proche de la structure cutanée rencontrée *in vivo* bien que les éléments dermiques soient devenus non fonctionnels
- de plus, ce greffon recombinaisonnel est relativement bien toléré : en effet, les éléments dermiques semblent moins immunoréactionnels que l'épiderme. Cela s'explique par une présence assez restreinte d'antigènes de classe II (sur les cellules endothéliales et les cellules épithéliales bordant les annexes) par la mort du derme ainsi que par une baisse d'activité antigénique suite à la congélation (Cuono *et al.*, 1986). Quant à l'épiderme, nous avons déjà signalé les hypothèses formulées concernant sa non-antigénicité suite à la culture.
- Nous assistons à une prolifération cellulaire assez rapide (Pruniéras *et al.* 1979).

-derme équivalent

Le derme équivalent est le nom donné au derme reconstruit en laboratoire.

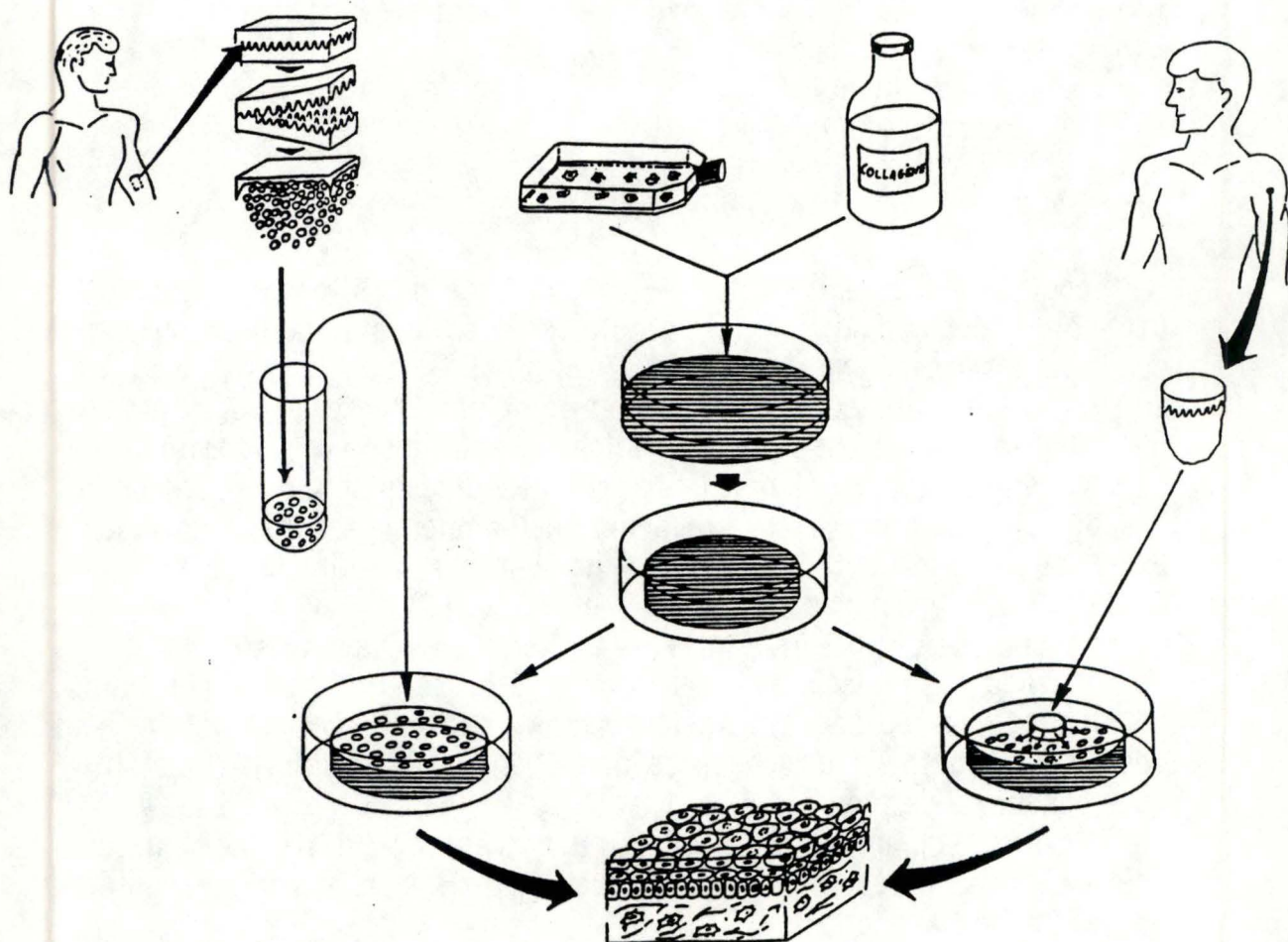


Fig. 13 : Techniques de culture de peau totale sur derme équivalent.
A gauche : utilisation d'une suspension de cellules épidermiques.
A droite : utilisation d'une biopsie cutanée.

Ce derme est réalisé en associant du collagène à des fibroblastes. Le collagène est obtenu par extraction acide douce à partir de queues de rat. Quant aux fibroblastes, ils sont obtenus par cultures successives à partir de biopsies cutanées humaines (Dubertret *et al.*, 1987).

Lorsque les deux constituants sont mis en présence, on observe la contraction du système suite à une interaction entre fibres et fibroblastes, ces derniers rassemblant le collagène en faisceaux. Ce phénomène donne une résistance de plus en plus grande à cette association et donne naissance au derme équivalent. Il est cependant bon de noter dès à présent que ce derme équivalent est en fait loin d'être semblable au derme rencontré *in vivo* car aucune des annexes cutanées ne s'y trouve.

Dans la perspective d'une reconstruction cutanée, il est nécessaire d'associer un épiderme à ce tissu. C'est pourquoi, avant que le derme équivalent ne se contracte, on y insère une petite biopsie cutanée de façon à ce que l'épiderme affleure à la surface du derme équivalent. On observe alors une prolifération radiale des cellules épidermiques autour de la biopsie et cela jusqu'à la formation d'un tissu recouvrant totalement le derme (Fig. 13).

Cette technique possède plusieurs avantages :

- fournir une structure cutanée très proche de celle observée *in vivo*, mais cependant dépourvue des annexes cutanées,
- réaliser des banques de derme équivalent car ceux-ci ne sont pas rejetés. Mais dans ce cas, l'insertion d'une biopsie cutanée n'est plus possible. On aura alors recours à une colle à base de fibrinogène humain pour assembler l'explant et le derme (Coulomb & Dubertret, 1987).

Mais cette technique a aussi ses inconvénients.

Tout d'abord, la liaison entre l'épiderme et le derme reste fragile. Même après plusieurs semaines, les éléments de la jonction épidermo-dermique ne sont pas totalement reconstitués et le tissu manque donc de cohésion (Thivolet, 1986).

Quand au second inconvénient, les avis divergent à son sujet. Thivolet semble penser que la prolifération épidermique est plus lente sur un derme équivalent que sur un lit de fibroblastes (Thivolet, 1986).

Or, la rapidité est le leitmotiv du chercheur dans la reconstruction cutanée en vue de son utilisation chez le brûlé. Coulomb, quant à lui, pense que si on utilise un derme équivalent stocké, deux semaines suffisent pour reconstruire la surface corporelle totale à partir de 0,5 % de cette surface (Coulomb *et al.*, 1986).

Le dernier inconvénient mais non le moindre est l'absence de toute annexe cutanée: glandes, poils,....

Ce dernier inconvénient peut cependant être évité par l'utilisation de la méthode de Neder-over-Heembeek qui associe autogreffes "meshées" et

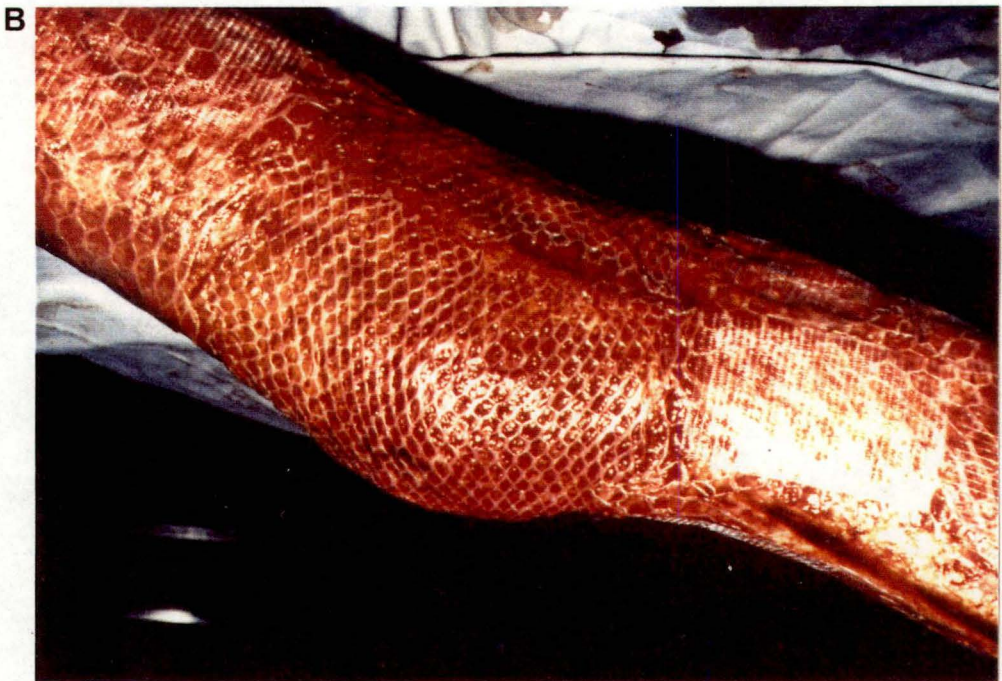


Fig. 14 : Technique proposée par l'équipe médicale de Neder-Over-Heembeek.
A : Membre excisé sur lequel ont été déposées des autogreffes meshées.
B : Ces mêmes autogreffes mais recouvertes d'épidermes de culture.
(Documents photographiques de Marc Paye, Hôpital militaire de Bruxelles)

épidermes de culture.

1.2.4. TECHNIQUE UTILISEE A L'HOPITAL MILITAIRE DE NEDER-OVER-HEEMBEEK.

Le centre des brûlés de l'Hôpital Militaire de Neder-Over-Heembeek utilise depuis ces dernières années, dans le traitement des brûlures du 2ème degré profond et du 3ème degré, des épidermes de culture préparés selon la technique de Green, au départ des propres cellules du brûlé (autogreffes de culture) ou au départ des cellules provenant d'un autre individu (allogreffes de culture).

Les premiers essais cliniques furent réalisés en appliquant "directement" les épidermes de culture posés sur N-terface, sur les sites receveurs "préparés".

Les résultats peu encourageants observés dans les brûlures du 3ème degré (destruction de toute structure épithéliale) par rapport à ceux plus positifs obtenus dans les brûlures du 2ème degré profond (persistance d'éléments épithéliaux appartenant aux annexes cutanées) poussèrent les chirurgiens à améliorer la technique.

Pour la réussite de l'intervention, il est primordial que les sites receveurs soit minutieusement nettoyés et préparés. Pour ce faire, dans un premier temps, les zones nécrosées sont excisées puis recouvertes d'homogreffes (peau de cadavre) pendant le temps nécessaire à la préparation des cultures.

Passé ce délai, les homogreffes sont détachées, le tissu de granulation formé dans le fond des plaies est raclé à la curette et une bonne hémostase est assurée. Le chirurgien procède alors à la pose des autogreffes "meshées" sur lesquelles il dépose les épidermes de culture, cellules basales du greffon en contact avec la surface lésée. Les autogreffes "meshées" sont parfois "attachées" par quelques points de suture avant la pose des épidermes de cultures (Fig. 14).

Cette technique utilisée à l'Hôpital Militaire de Neder-Over-Heembeek présente 2 grands avantages :

- elle réduit de moitié le temps de cicatrisation nécessaire aux autogreffes seules. La cicatrisation de cette manière est réalisé en l'espace de 5 jours, alors que la durée normale de cicatrisation d'une autogreffe seule est de l'ordre d'une dizaine de jours,
- elle permet d'obtenir une cicatrice plus souple ayant moins tendance à évoluer en chéloïde (cicatrice hypertrophique) par la suite.

Mais il faut bien se rendre compte des problèmes posés par cette technique utilisant à la fois des autogreffes prélevées en salle

d'opération et des épidermes de culture reconstruits en laboratoire et dont la préparation en vue d'une utilisation clinique demande un certain temps.

En effet, lorsque l'épiderme de culture est prêt, il doit être détaché de la boîte de culture par la dispase, ce qui prend environ 1 heure. Il est ensuite transféré sur un support afin d'être aisément manipulable (+/- 15 minutes de préparation par greffon). Ces opérations sont à répéter autant de fois qu'il y a de greffons à préparer. De ce fait, le délai entre la préparation du premier et du dernier greffon peut être important allant parfois jusque plusieurs heures sans compter un manque de coordination possible entre l'équipe chirurgicale et l'équipe préparant les greffons, allongeant encore ce délai d'attente.

Mais cette mise en attente quasi inévitable des épidermes de culture due aux contingences matérielles n'altère-t-elle pas la capacité de ces épidermes de culture à participer au processus de cicatrisation ?

Pour répondre à cette question, différentes voies expérimentales sont possibles et celles que nous avons retenues sont explicitées dans la troisième partie de cette introduction.

1.3. METHODE D'EVALUATION DES EPIDERMES DE CULTURE.

1.3.1. ETUDE MORPHOLOGIQUE.

En vue d'une caractérisation morphologique des épidermes de culture obtenus, nous avons utilisé les techniques appartenant à la microscopie optique (Dubois, 1989).

1.3.2. MESURE DE LA VIABILITÉ.

L'état vivant d'une cellule se traduit par certaines caractéristiques qui sont à la base de l'évaluation de la viabilité cellulaire (Combrier *et al*, 1988).

Ces caractéristiques sont :

- la taille, la forme et la réfringence de la cellule celles-ci sont déterminées par l'architecture interne (cytosquelette et organites) et par le niveau d'hydratation de la cellule,
- la perméabilité membranaire qui est responsable de la capacité que possède la cellule de concentrer des colorants dits supravitaux au niveau de certains organites ou, à l'inverse, d'empêcher la pénétration de colorants dits d'exclusion,

-la perte d'une molécule cytosolique révèle également une perte de viabilité.

Nous avons ainsi estimé la viabilité des kératinocytes provenant du greffon en nous basant sur l'intégrité membranaire. Pour cela nous avons utilisé deux techniques : l'exclusion d'un colorant (bleu trypan) et le dosage de la lactate déshydrogénase libérée par les cellules lysées.

1.3.2.1. Exclusion d'un colorant.

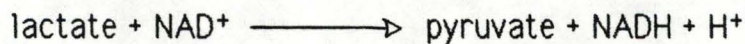
Lorsque l'intégrité de la membrane plasmique est respectée, celle-ci est capable d'empêcher la pénétration de colorants appelés colorants d'exclusion. C'est pourquoi cette propriété a été utilisée pour estimer la viabilité d'une suspension cellulaire. Les cellules non viables (dont la membrane est alors altérée) se colorent, tandis que les cellules intactes apparaissent non colorées.

Exemple de colorants d'exclusion : le bleu trypan, l'éosine Y, l'érythrosine B.

D'après Freshney (1987), cette technique présente l'avantage d'être rapide à mettre en oeuvre; cependant cette mesure tend à surestimer la viabilité : 90% de cellules décongelées de l'azote liquide peuvent exclure le bleu trypan alors que seulement 60 % ont été capables de s'attacher 24 heures plus tard.

1.3.2.2. Dosage de la lactate deshydrogénase (LDH.)

La lactate déshydrogénase est une enzyme cytoplasmique pouvant être libérée dans le milieu extérieur lors d'une altération de perméabilité membranaire. Cette enzyme est en fait une déshydrogénase à pyridine nucléotide qui catalyse la réduction suivante.



Cette libération est un test couramment utilisé en toxicologie. L'avantage par rapport à l'exclusion d'un colorant vital réside surtout dans le fait qu'il est possible de récolter la LDH libérée par le greffon dans les conditions réelles d'utilisation clinique puis de déterminer l'activité demeurée dans ce greffon sans devoir dissocier les cellules de ce feuillet épithélial.

Avec ces tests, nous pouvons donc estimer la proportion de cellules vivantes récoltées à partir de notre feuillet épidermique. Cependant, cette information relativement grossière peut être affinée par d'autres tests. En effet, parmi les cellules réellement vivantes deux populations cellulaires peuvent être distinguées :

- une population vivante, capable d'adhérer à un substrat mais qui ne prolifère plus
- une population cellulaire vivante, capable d'adhérer à un substrat mais également capable de proliférer.

En fait, il semblerait que toute cellule adhérente ne possède pas le potentiel prolifératif requis pour être capable de se multiplier (Woodley *et al.*, 1990).

Afin de réaliser cette distinction, nous avons donc entrepris des mesures de capacité d'adhérence et de prolifération cellulaire.

1.3.3. MESURE DE LA CAPACITE D'ADHERENCE.

Cette mesure a été réalisée à l'aide de trois techniques complémentaires.

Tout d'abord nous avons réalisé l'estimation du "seeding efficiency" qui est une mesure directe de la capacité d'adhérence cellulaire. Ensuite nous avons effectué les dosages d'ADN et de protéines qui nous renseignent sur le contenu en ces matériaux cellulaires totaux retrouvés dans la culture.

1.3.3.1. Le seeding efficiency (S.E.) ou efficacité d'ensemencement. (Freshney, 1987)

Cette mesure nous renseigne sur la proportion des cellules qui, à partir de l'ensemencement, ont été capables de s'attacher au substrat.

$$S.E. = \frac{\text{nombre de cellules récoltées}}{\text{nombre de cellules ensemencées}} \times 100$$

1.3.3.2. Le dosage des protéines.

Le contenu en protéines est largement utilisé dans l'estimation du matériel cellulaire total. A cette fin, nous utilisons un essai colorimétrique selon la méthode de Lowry *et al.*, (1951).

1.3.3.3. Le dosage de l'ADN.

Cette technique est également largement utilisée dans la quantification du contenu de la culture en matériel cellulaire.

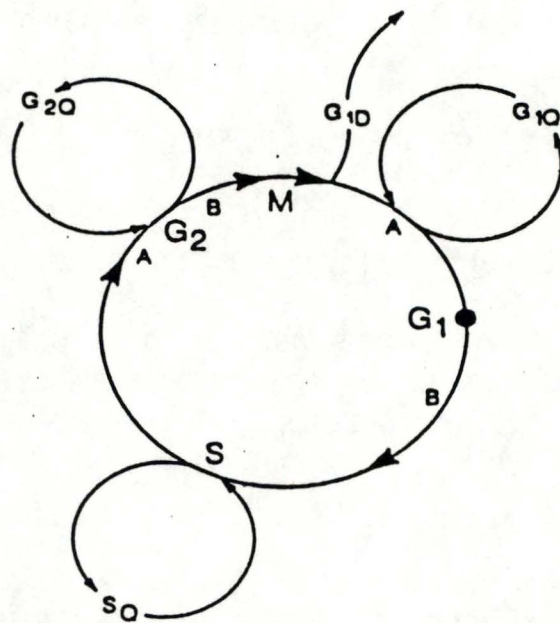


Fig. 15 : Schéma du cycle cellulaire.

On peut y distinguer quatre phases successives : G₁, S, G₂ et M. Les trois premières constituent l'interphase alors que la dernière est la division proprement dite. La cellule peut quitter le cycle cellulaire soit pour se différencier (G₁d) soit pour se mettre en repos et attendre ainsi une stimulation du milieu extérieur (G₁Q, SQ, G₂Q) (d'après Ronot et al., 1988)

Le dosage s'effectue généralement à l'aide de techniques faisant appel aux propriétés de fluorescence de certaines molécules. Parmi l'éventail de techniques, nous avons choisi le dosage de l'ADN par le Hoechst 33258 (2'-[4-hydroxyphenol]-5-[4méthyl-1-piperaziny]-2,5'-bi-1H-benzimidazole) et cela pour les différents avantages que présente cette technique (Labarca & Paigen, 1980) et qui sont :

- une grande sensibilité : cette méthode permet en effet de mesurer des concentrations allant jusque 10 ng/ml,
- une excellente spécificité de liaison à l'ADN (liaison A-T),
- une linéarité de la mesure obtenue à travers une large fourchette de concentrations.

Ces techniques ont, entre autres, été utilisées par Salzman (1959) lorsqu'il a étudié les fluctuations dans le taux de protéines cellulaires, d'ADN et de ARN durant la croissance de cellules Hela. A cette occasion, celui-ci observe une synthèse rapide de protéines et de l'ADN durant les deux premiers jours suivant la mise en culture (lag phase). Ensuite la concentration en ADN par cellule tend à rester constante après avoir chuté de moitié, alors que la quantité d'ARN et de protéines par cellule continue à décliner durant la phase logarithmique et stationnaire et cela sans aucun rapport avec le taux de division cellulaire (Parker, 1961).

On voit ainsi que les mesures de l'ADN et des protéines ne sont pas totalement équivalentes mais plutôt complémentaires.

1.3.4. MESURE DE PROLIFÉRATION CELLULAIRE.

Afin de mieux comprendre le principe des différentes techniques utilisées nous allons faire ici un bref rappel concernant le cycle cellulaire.

1.3.4.1. Le cycle cellulaire.

Le cycle cellulaire est l'ensemble des modifications qu'une cellule subit entre sa formation par division de la cellule-mère et le moment où cette cellule finit de se diviser en deux cellules, c'est-à-dire l'ensemble des événements morphologiques et biochimiques responsables de la prolifération cellulaire (Maillet, 1977) (Fig. 15).

On peut distinguer deux phases importantes dans ce cycle (Ronot *et al*, 1988) :

- l'interphase
- la mitose

L'interphase.

Durant cette période, la quantité de constituants cellulaires double et la multiplication du matériel génétique, ou ADN, a lieu. Elle est subdivisée en :

- phase G₁ qui correspond à la préparation des cellules à la réplication de l'ADN. Le métabolisme cellulaire consiste à accumuler les constituants (ARN, protéines.....) jusqu'à une concentration seuil,
- phase S ou phase de réplication de l'ADN proprement dite,
- phase G₂ correspondant à la préparation des cellules à la mitose. Elle est caractérisée par une augmentation de la teneur en ARN et en protéines ainsi que par l'initiation des modifications dans la conformation chromatiniennne précédant la mitose.

L'interphase englobe donc les événements nécessaires à l'initiation de la phase suivante qui est la mitose.

La mitose.

La mitose ou division cellulaire proprement dite constitue le stade final du cycle cellulaire.

Parallèlement à la subdivision du cycle cellulaire en différentes phases, une distinction en différents stades de la cinétique cellulaire peut également être faite selon les caractéristiques prolifératives. Ainsi, nous pouvons distinguer :

La prolifération.

Les cellules sont alors en multiplication active et traversent successivement les phases G₁, S, G₂ et la mitose de façon continue.

La quiescence.

Une cellule est dite quiescente lorsqu'elle quitte le cycle temporairement jusqu'à ce que l'environnement stimule son entrée dans le cycle. Ce phénomène est souvent appelé G₀ ou Q et peut avoir lieu en phase G₁, S ou G₂.

La différenciation.

La différenciation caractérise les cellules qui, ayant quitté définitivement le cycle cellulaire après un certain nombre de divisions, se différencient en accédant à un état mature.

Pour caractériser le cycle cellulaire, il existe plusieurs techniques, chacune donnant des informations plus ou moins précises sur les différents stades du cycle.

Parmi celles-ci, nous avons choisi : -l'incorporation de ^3H -thymidine
-l'incorporation de
bromodéoxyuridine (BrdU)
-le marquage au Ki67

1.3.4.2. Incorporation de ^3H -thymidine.

L'incorporation de thymidine tritiée est une méthode largement utilisée dans la détermination, tant *in vivo* que *in vitro*, de la prolifération cellulaire, puisqu'elle se déroule pendant la phase S du cycle cellulaire.

Le principe de cette technique est basé sur le fait que la thymidine est le seul des quatre nucléosides participant à l'élaboration de l'ADN à n'entrer que dans cette molécule. De ce fait, la thymidine radioactive fournie aux cellules ne sera incorporée que lors du doublement du matériel génétique de la cellule.

L'incorporation de ^3H -thymidine peut en fait être étudiée de deux manières différentes : soit par comptage au scintillateur, soit par autoradiographie

-La quantification par scintillateur de l'ADN radioactif est devenue une des techniques principales de détermination de la prolifération des kératinocytes *in vitro* (Schwartz *et al*, 1988).

Cette technique est par exemple utilisée dans l'étude de l'influence du TGF β (transforming growth factor β) sur l'évolution des cicatrices (Russel *et al*, 1988). Dans ce cas, elle a permis de démontrer la stimulation du TGF β sur l'action de l'EGF (epidermal growth factor) exercée au niveau des fibroblastes dans des cicatrices hypertrophiques (chéloïdes).

Un autre exemple d'application de cette technique a été de démontrer l'effet stimulateur du bFGF (basic fibroblast growth factor) sur la croissance des kératinocytes (O'Keefe *et al*, 1988).

-L'autoradiographie est essentiellement utilisée en vue de la localisation des cellules proliférantes dans le tissu étudié. Mais elle ne donne aucun renseignement concernant le taux d'incorporation du marqueur radioactif (Schwartz *et al*, 1988). En ce qui concerne les kératinocytes elle a ainsi été utilisée dans l'étude de la cinétique de certaines maladies cutanées tel le psoriasis (maladie chronique de la peau caractérisée par une hyperprolifération épidermique) ainsi que dans l'étude de la localisation des "stem cells".

L'autoradiographie peut également permettre la détermination d'une fraction cellulaire proliférante. Elle a ainsi permis de mettre en

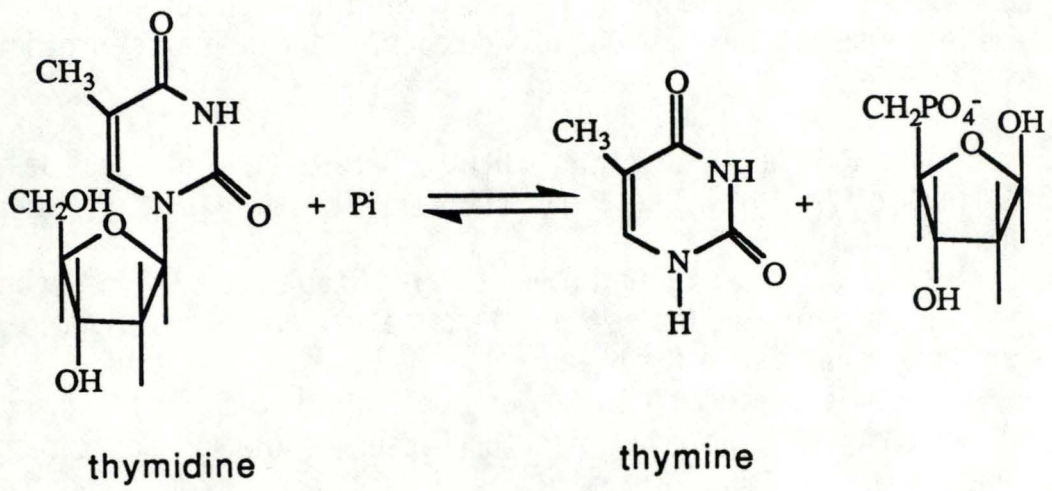


Fig. 16 : Réaction catalysée par la thymidine phosphorylase.

évidence l'influence de facteurs tel l'EGF ou l'insuline sur la prolifération des kératinocytes (O'Keefe & Chiu, 1988).

Deux remarques importantes sont à noter concernant l'étude de la prolifération cellulaire du kératinocyte humain (Schwartz *et al.*, 1988). En effet, le kératinocyte est capable de transformer la thymidine en thymine et cela par l'intermédiaire de la thymidine phosphorylase. Cela signifie qu'il est nécessaire de prévoir une concentration supraphysiologique de thymidine ainsi qu'un temps d'incubation relativement court (Fig. 16).

La seconde remarque à noter concerne l'autoradiographie. Les rayons β émis par la thymidine radioactive ont un rayon d'émission ne dépassant pas le μm (Prunières *et al.*, 1976). De ce fait, il est nécessaire d'être très prudent dans l'interprétation des photos obtenues car une culture cellulaire ne montre pas une épaisseur uniforme (les bords de la culture étant généralement plus minces).

Cet inconvénient peut être résolu soit en maintenant la culture en présence d'une faible concentration en calcium pour obtenir exclusivement une monocouche, soit par l'utilisation d'un autre nucléotide : la bromodéoxyuridine (BrdU) qui, de plus, présente l'avantage de ne pas devoir être radioactive pour être détectée.

1.3.4.3. Incorporation de BrdU.

La bromodéoxyuridine est analogue de la thymidine (Wolff & Gnas, 1989), c'est pourquoi elle peut être utilisée par la cellule en tant que substitut du nucléoside précité dans la synthèse de son ADN (Fig. 17).

Une fois la BrdU incorporée, celle-ci sera révélée grâce à un anticorps anti-BrdU puis détectée par un second anticorps couplé à une molécule fluorescente ou enzymatique (isothiocyanate de fluorescéine ou peroxydase).

L'anticorps utilisé est en fait un anticorps monoclonal spécifique de la 5-bromo-2-déoxyuridine, ainsi que de l'iododéoxyuridine mais qui ne réagit pas avec la thymidine (Gratzner, 1982).

Comme nous l'avons signalé précédemment la BrdU tend à remplacer la thymidine tritiée dans l'étude de la prolifération cellulaire. Cette technique permet en effet de ne pas manipuler de produits radioactifs tout en gardant une sensibilité au moins aussi importante que celle observée lors de l'utilisation de ^3H -thymidine (Wolff & Gnas, 1989). De plus, l'observation optique des noyaux marqués est indépendante de l'épaisseur de l'échantillon considéré (Oku *et al.*, 1987).

Il existe deux grandes voies d'analyse de l'incorporation de BrdU : le

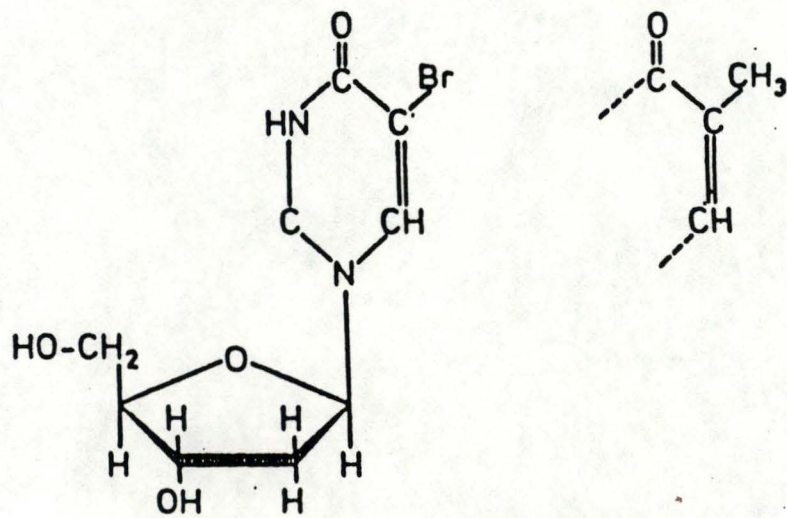


Fig. 17 : Structure chimique de la 5-bromo-2-déoxyuridine, un analogue de la thymidine (à droite) (d'après Wolff et Gnas, 1989).

marquage de cellules observées en microscopie optique et la cytométrie de flux.

-Le marquage des cellules, appartenant donc aux cellules en phase de synthèse d'ADN, permet une localisation des noyaux ayant incorporé le précurseur. Cette analyse demande une dénaturation partielle de l'ADN, dénaturation pouvant être évitée par l'emploi simultané de BrdU et de Hoechst, la fixation de ce dernier étant réduite suite à la présence de BrdU dans la molécule de ADN (Ronot *et al.*, 1988). Ce marquage permet également la détermination de la fraction cellulaire proliférante ou labelling index.

Cette technique a, entre autres, été utilisée dans la comparaison de la cinétique du cycle cellulaire entre des cellules épithéliales provenant d'un explant d'une peau normale et des cellules provenant d'une tumeur maligne cutanée (carcinome) ainsi que dans la cinétique du cycle cellulaire de fibroblastes provenant d'une peau normale et de fibroblastes faisant partie d'une cicatrice hypertrophique (Oku *et al.*, 1987). Les auteurs ont ainsi pu mettre en évidence une prolifération moins importante dans les cellules tumorales étudiées *in vitro* que dans les kératinocytes normaux, phénomène pouvant être dû à une absence de facteurs normalement présents dans le stroma.

-La cytométrie de flux, quant à elle, est une analyse plus quantitative concernant l'incorporation de précurseurs de l'ADN et certainement plus précise que l'analyse par la détermination du labelling index.

Elle est utilisée dans l'étude du cycle cellulaire en association avec des anticorps monoclonaux d'antigènes de membrane. Cela permet d'établir une relation entre la phase du cycle cellulaire et ses antigènes membranaires caractéristiques ainsi que la proportion de cellules en phase de synthèse (Cordier, 1988).

Il est également permis de faire une étude simultanée du contenu en ADN par incorporation d'iodure de propidium et du taux de synthèse en ADN par incorporation de BrdU (Dolbeare *et al.*, 1983). Cette technique permet donc une étude plus détaillée concernant la phase du cycle cellulaire dans laquelle se trouve les différentes cellules.

Les informations concernant le cycle cellulaire fournies par l'analyse de l'incorporation de BrdU peuvent être complétées par l'utilisation d'un marqueur nucléaire caractéristique des cellules en prolifération : le Ki67.

1.3.4.4. Marquage avec l'anticorps Ki67.

Ki67 est le nom donné à un anticorps monoclonal de souris dirigé contre un antigène spécifique des cellules en état de prolifération (Gerdes *et*

al., 1983). La nature de cet antigène est encore inconnue à l'heure actuelle. Cependant une hypothèse a été émise quant à ses propriétés : la sensibilité de l'antigène Ki67 à la Dnase I indiquerait une capacité de cet antigène à se lier à l'ADN. De plus, une activité inhibitrice contre la ADN polymérase α a été relevée (Landberg *et al.*, 1990). L'hypothèse, selon laquelle cet antigène Ki67 est spécifique des cellules en état de prolifération, est basée sur le fait que les cellules dont on sait qu'elles sont en état de repos ne montrent aucun noyau marqué. Par contre, si ces cellules sont stimulées *in vitro* (lymphocytes par exemple) ou si les cellules proviennent d'un tissu en voie de prolifération (épiderme par exemple) nous assistons à un marquage de ces cellules par le Ki67 (Gerdes *et al.*, 1983).

L'utilisation de cet anticorps monoclonal se fait essentiellement dans l'étude du cycle cellulaire ainsi que dans l'étude des tumeurs. Pour l'étude de cycle cellulaire, le Ki67 a été étudié en association avec l'antigène appelé "cycline" qui est spécifique de la phase de synthèse du matériel génétique et parfois même en combinaison avec la coloration de l'ADN total (Landberg *et al.*, 1990). L'intensité relative des différentes fluorescences mesurée au cytomètre de flux permet ainsi de déterminer à quelle phase du cycle appartient la cellule.

Dans l'étude des tumeurs, l'utilisation du Ki67 permet de déterminer la fraction cellulaire tumorale se trouvant en croissance (Burger *et al.*, 1986). Cet anticorps a également été étudié en association avec les oncogènes *c-myc* et *c-myb* afin de déterminer leur localisation cellulaire relative en vue de rechercher une éventuelle relation pouvant exister entre eux (Bading *et al.*, 1989).

Une étude de l'épiderme rencontré *in vivo* à l'aide de l'anticorps Ki67 a déjà été entreprise (Rijzewijk *et al.*, 1989). Elle a permis d'aboutir à différentes constatations. Tout d'abord, l'antigène Ki67 est principalement localisé au niveau du noyau des cellules basales, mais un marquage cytoplasmique n'est pas exclu. En fait, le marquage de cellules venant d'un épiderme psoriasique a tendance à montrer un pourcentage de noyaux marqués plus élevé que les cellules épidermiques normales alors que le marquage cytoplasmique tend à diminuer. Enfin, les observations faites lors de cette étude tendent à confirmer le fait que le taux de production cellulaire est contrôlé par le nombre de cellules parcourant le cycle cellulaire et non par la durée du cycle lui-même.

BUT DU TRAVAIL

2. BUT.

Les recherches entreprises concernant la mise au point de techniques de reconstruction cutanée connaissent un véritable essor. En effet, les progrès médicaux réalisés ces dernières années dans le domaine de la réanimation permettent de maintenir en survie des brûlés de plus de 90 % (Allain-Regnault, 1984). Il est donc indispensable chez ces grands brûlés de rétablir la barrière cutanée par une "peau de remplacement".

A l'heure actuelle, une technique de reconstruction d'épiderme très répandue en milieu hospitalier (Woodley, 1989) et notamment utilisée à l'Hôpital Militaire de Neder-Over-Heembeek, est la technique proposée par Green *et al.*, (1979).

Dans ce cadre nous avons choisi d'étudier ces épidermes de culture dans leurs conditions d'utilisation clinique, afin de répondre à une question essentielle posée par l'équipe de L'Hôpital Militaire :

"Peut-on laisser un épiderme de culture détaché, en attente sur l'N-terface, sans risquer de compromettre la capacité de cet épiderme à participer au processus de cicatrisation ?"

Pour cela , nous avons mis en oeuvre une série de techniques tant morphologiques que biochimiques afin de répondre à cette question dans la mesure de nos possibilités.

MATERIEL
&
METHODES

3. MATERIEL ET METHODES.

3.1. CULTURE

3.1.1. MATERIEL.

3.1.1.1. Milieux de culture des cellules 3T3 et des kératinocytes humains.

-Milieu de culture des cellules 3T3 (fibroblastes de souris) (Milieu 3T3). Le milieu de Eagle modifié par Dulbecco (DMEM, GIBCO) contenant 10 % de Fetal Calf Serum (FCS, GIBCO) ainsi que de la pénicilline (100 U/ml) et de la streptomycine (100 µg/ml) (GIBCO) est utilisé pour la culture des cellules 3T3.

-Milieu de culture des kératinocytes humains (Milieu CE). Pour la culture des kératinocytes nous utilisons un milieu de base composé de DMEM et du milieu nutritif F12 de Ham contenant de la L-glutamine (GIBCO) dans les proportions 3:1. Ce milieu est additionné de 10 % de FCS ainsi que du mélange pénicilline (100 U/ml) et streptomycine (100 µg/ml), et comprend en outre les additifs suivant : hydrocortisone (0,4 µg/ml, Calbiochem), toxine cholérique (10^{10} M, Sigma), insuline (5µg/ml, Sigma), adénine (20 µg/ml, Boehringer Mannheim), transferrine (5 µg/ml, Calbiochem) et triiodothyronine ($2 \cdot 10^{-11}$ M, Sigma). Lors du premier renouvellement de milieu suivant l'ensemencement des kératinocytes, on ajoute au milieu de culture le facteur de croissance épidermique (Epidermal Growth Factor, EGF) (10 µg/ml, GIBCO BRL).

-Milieu simplifié.

Au cours de nos expériences, nous avons également utilisé un milieu simplifié composé du milieu nutritif de base (DMEM : milieu nutritif F12 de Ham (3:1)) additionné des seuls antibiotiques.

-Une alternative au mélange des antibiotiques penicilline-streptomycine a également été utilisée: il s'agit de la gentamycine (50µg/ml).

3.1.1.2. Divers.

-Les cultures se déroulent dans une étuve Heraeus B5060 à 37°C en atmosphère humide et 10 % CO₂.

- Pour réaliser les repiquages, nous utilisons un tampon PBS (pH 7,4) sans calcium ni magnésium, ainsi qu'une solution trypsine 0,1 % (Difco Laboratories)-EDTA 0,02 % dans ce PBS.
- La solution de mitomycine-C (400µg/ml d'H₂O distillée, Kyowa) est diluée dans le milieu de culture des cellules 3T3 pour obtenir une concentration finale d'environ 25 µg/ml.
- La dispase (Grade II, Boehringer) est stockée à -20°C et diluée à 0,25 % (poids/volume) dans du DMEM.

3.1.2. METHODES.

3.1.2.1. Culture des cellules 3T3 et préparation du lit nourricier.

La culture des 3T3 est maintenue en permanence pour permettre la préparation des lits nourriciers nécessaires à la culture des kératinocytes.

Les cellules 3T3 sontensemencées à raison de 500.000 cellules dans une boîte de 75 cm² contenant le milieu 3T3. Lorsque la culture est confluente, on réalise un passage comme suit :

la monocouche est rincée deux fois par du tampon PBS puis incubée avec 4 ml de solution de trypsine-EDTA à température ambiante pendant quelques minutes. Lorsque les cellules sont détachées du substrat de culture, 6 ml de milieu 3T3 (contenant 10 % de FCS) sont ajoutés dans la boîte. La suspension est alors centrifugée à température ambiante pendant 5 minutes à 1000 RPM puis le culot est resuspendu dans le milieu de culture. On effectue alors un comptage des cellules pour réensemencer comme décrit ci-dessus.

Afin de préparer les lits nourriciers, les divisions des cellules 3T3 sont bloquées à la mitomycine-C. Celle-ci est ajoutée au milieu de culture de boîtes confluentes pour obtenir une concentration d'environ 25 µg/ml. Après deux heures d'incubation à 37°C, les cellules sont dissociées comme décrit ci-dessus puis réensemencées à raison de 20.000 cellules/cm² dans le milieu de culture des kératinocytes. Ces lits nourriciers ainsi préparés pourront recevoir les kératinocytes au minimum deux heures après leur ensemencement.

3.1.2.2. Culture primaire des kératinocytes et congélation.

Dès réception de la biopsie cutanée, celle-ci est lavée et placée dans une solution saline équilibrée de Hanks additionnée des antibiotiques. Des fragments d'environ 2 cm² sont alors découpés et placés à 37°C pendant

une heure dans une solution de Hanks contenant de la trypsine 0,25 %. Après ce délai, les fragments cutanés sont récoltés dans du milieu CE et le derme est alors séparé de l'épiderme au moyen de pinces. Les fragments d'épiderme sont triturés par plusieurs passages dans une pipette afin de dissocier les cellules, puis la suspension ainsi obtenue est filtrée sur une gaze stérile. Le filtrat est ensuite centrifugé pendant 5 minutes à température ambiante, à 1000 RPM et le culot cellulaire obtenu est resuspendu dans du milieu de culture des kératinocytes pour effectuer le comptage des cellules. Nous utilisons à cette fin la cellule de Neubauer. Un minimum de 100 cellules sont comptées. Ces cellules sont alorsensemencées à raison de $10 \cdot 10^6$ cellules par boîte de 175 cm^2 préparée au préalable et contenant un lit nourricier de 3T3. Le milieu de culture est renouvelé tous les 2-3 jours.

Lorsque les kératinocytes sont confluents, ceux-ci sont dissociés. Pour ce faire, les cultures sont rincées deux fois avec du tampon PBS puis incubées avec 8 ml de trypsine-EDTA pendant 15 minutes à 37°C .

Lorsque les kératinocytes sont détachés, l'action protéolytique de la trypsine est stoppée par l'addition de 12 ml de milieu CE. La suspension cellulaire est alors centrifugée à température ambiante pendant 5 minutes à 1000 RPM puis le culot est resuspendu dans du milieu de culture pour effectuer le comptage des kératinocytes au moyen de la cellule de Neubauer.

Une nouvelle centrifugation permet alors de resuspendre les cellules à raison de $2 \cdot 10^6$ cellules/ml dans un milieu prévu pour la congélation et composé de DMEM additionné d'antibiotiques (45%), de FCS (45%) et d'un cryoprotecteur, le diméthylsulfoxyde (DMSO, 10 %). Cette suspension est échantillonnée dans des cryotubes (NUNC) contenant chacun 1 ml ($2 \cdot 10^6$ kératinocytes), puis ceux-ci sont disposés dans une enceinte isolée que l'on place à -80°C afin d'obtenir une congélation lente et régulière des cellules. Le lendemain, les cryotubes sont stockés dans un container d'azote liquide à -195°C .

3.1.2.3. Culture secondaire des kératinocytes.

La décongélation des cellules se réalise en plaçant les cryotubes dans un bain d'eau à 37°C . Après décongélation, les ampoules sont lavées avec de l'alcool et le contenu est ensuite versé lentement dans 10 ml de milieu de culture. Après centrifugation comme ci-dessus, les cellules lavées sont comptées et réensemencées dans les boîtes préparées avec un lit nourricier de 3T3 à raison de 20.000 cellules/ cm^2 . Les milieux de cultures sont renouvelés tous les 2-3 jours.

3.1.2.4. Détachement du feuillet épithélial et mise sur support.

Pour détacher la culture des kératinocytes sous forme d'un feuillet épithélial, les cultures confluentes sont d'abord lavées deux fois avec du milieu simplifié puis sont incubées à 37°C avec la solution de dispase 0,25 %. Entre 45 et 75 minutes d'incubation sont nécessaires pour que le feuillet épithélial se détache.

Afin de réaliser nos manipulations dans les conditions aussi proches que possible des conditions d'un usage clinique, 24 heures avant leur détachement, les cultures sont mises en présence du milieu simplifié et les greffons obtenus sont transférés sur un support stérile (gaze vaselinée ou N-terface (polypropylène)).

Dans ce cas, après 30-60 minutes d'incubation avec la dispase c'est-à-dire lorsque la périphérie du feuillet épithélial commence à montrer des signes de détachement, on coupe la boîte de culture pour l'ouvrir complètement, puis le greffon est rincé deux fois avec du DMEM additionné des antibiotiques. On achève alors de décoller les bords à l'aide d'un "rubberpoliceman". Ensuite, on dépose le support stérile avant de rabattre les bords tout autour de ce dernier. L'ensemble support-greffon est alors repris avec des pinces (le feuillet épithélial se décolle sans la moindre résistance) et déposé dans une boîte de plastique stérile carrée (Falcon) contenant 8 ml de DMEM additionnés des antibiotiques, le greffon placé côté plastique. Les greffons ainsi préparés sont stockés pendant le temps nécessaire (de 0 à 24 h) dans l'étuve de culture.

3.1.2.5. Dissociation du feuillet épithélial.

Afin d'analyser les cellules faisant partie des greffons et ayant subi les manipulations et conditions de stockage décrites ci-dessus, les feuillets épithéliaux ont été dissociés pour réensemencer les kératinocytes ainsi récoltés. Pour ce faire, le greffon est lavé deux fois avec du PBS puis incubé avec 5 ml de la solution trypsine-EDTA pendant environ 15 min à 37°C. L'action de la trypsine est ensuite inhibée par l'addition de 5 ml de milieu CE et la suspension cellulaire est centrifugée pendant 5 min à 1000 RPM. Le culot est alors resuspendu dans le milieu de croissance des kératinocytes et la viabilité de la suspension cellulaire est estimée par le test d'exclusion d'un colorant vital, le bleu trypan. Les cellules sont enfin réensemencées à raison de 40.10^3 cellules viables/cm² dans des "multi-dish" (falcon) à 6 ou 24 puits selon les tests à réaliser.

3.2. TECHNIQUES ANALYTIQUES.

3.2.1. DETERMINATION DU "SEEDING EFFICIENCY" (S.E.) (FRESHNEY, 1987)

Après 48 h de prolifération dans les "multi-dish" 6 puits, les kératinocytes sont lavés 2 fois à l'aide de PBS.

On met 0,15 ml de trypsine-EDTA dans chaque puits et on incube environ 10 min à 37°C. Les cellules sont alors bien remises en suspension et sont comptées à l'aide de l'hémocytomètre de Neubauer.

$$\text{S.E.} = \frac{\text{nombre de cellules récoltées}}{\text{nombre de cellulesensemencées}} \times 100$$

3.2.2. DOSAGE DES PROTEINES (LOWRY ET. AL., 1951)

Après 48 h de prolifération dans les "multi-dish", les kératinocytes sont lavés 3 fois à l'aide de PBS puis incubés avec une solution de NaOH 0,5N durant 1 heure à 37°C. Les cellules sont dissoutes et la solution récoltée à l'aide d'une pipette de verre pour être placée dans un tube en plastique. A ce stade la préparation est congelée. Au moment du dosage, les tubes sont décongelés et réagités au vortex. Leur contenu est éventuellement dilué 2 fois.

Il faut prévoir 2 blancs contenant 0,5 ml d'H₂O distillée et 0,5 ml de NaOH 1N et 2 étalons contenant 0,5 ml d'albumine de sérum bovin (400 µg/ml) et 0,5 ml de NaOH 1N.

Après 30 minutes, on ajoute dans chacun des tubes 5 ml de la solution suivante :

- 10 ml de Na₂CO₃ 2%
- 0,1 ml de tartrate de NaK
- 0,1 ml de CuSO₄ 1%

Après 15 min 0,5 ml de réactif de Folin dilué 2 fois sont ajoutés dans chaque tube. On mesure 30 min plus tard l'absorbance de la solution à une longueur d'onde de 540 nm. La concentration en protéines ainsi mesurée est ensuite rapportée en la quantité totale de protéines (µg) présente dans la boîte de culture.

3.2.3. DOSAGE DE L'ADN (LABARCA & PAIGEN, 1980)

Après 48 heures de prolifération dans les "multi-dish", les kératinocytes sont lavés 1 fois à l'aide d'un tampon phosphate 0,05 M (pH 7,4) additionné de NaCl (2 M) et d'EDTA (2 mM). puis homogénéisés dans 1 ml de ce même tampon par 10 passages rapides dans une aiguille de calibre 0.45 x 22 mm.

A ce stade, la préparation est congelée.

Au moment du dosage, les échantillons sont décongelés et l'homogénat est resuspendu par passage dans un sonicateur durant 30 secondes.

200 μ l d'échantillon sont mélangés avec 2 ml d'une solution de Hoechst 33258 (1 μ g/ml) préparée dans le même tampon. Une droite-étalon (0-3000 ng/ml) est établie à partir d'une solution stock d'ADN (de thymus de veau Type I, Sigma à 500 μ g/ml).

Avant les mesures de fluorescence, les tubes peuvent être maintenus à l'obscurité, à température ambiante.

La fluorescence des échantillons est mesurée au spectrophotomètre (AMINCO SPF 500) avec une longueur d'onde d'excitation de 356 nm et une longueur d'onde d'émission de 458 nm. Les bandes passantes sont de 5 nm. L'établissement de la droite-étalon permet de convertir la fluorescence mesurée dans nos échantillons en une quantité totale d'ADN (ng) présente dans la boîte de culture.

3.2.4. INCORPORATION DE 3-BROMO-2'-DEOXYURIDINE : MESURE DU "LABELLING INDEX" (OKU *et al.*, 1987).

Afin de déterminer le "labelling index" (LI), c'est-à-dire la proportion de cellules parcourant la phase S du cycle cellulaire pendant une période donnée (Freshney, 1987), les cellules que l'on a récoltées à partir du greffon sontensemencées dans des "multi-dish" 6 puits au fond desquelles ont été déposées des lamelles couvre-objets en verre autoclavées.

Après 24 heures de prolifération, le milieu de culture est remplacé par ce même milieu mais auquel on a ajouté de la 3-bromo-2'-déoxyuridine (BrdU, Sigma) à une concentration de 10 μ M (la solution stock se trouvant à une concentration de 10mM).

Après 18 heures d'incubation à 37°C dans l'étuve de culture, les couvre-objets sont lavés trois fois dans du PBS, après quoi les cellules sont fixées par immersion des couvre-objets 5 minutes dans l'acétone. Ensuite les couvre-objets sont séchés à l'air. A ce stade, on peut les laisser en attente à 4°C.

On immerge alors les couvre-objets dans de l'HCl 3M durant 30 minutes puis ceux-ci sont lavés trois fois dans du PBS.

On place alors les couvre-objets 2 minutes dans une solution de Tween 20 0,5 % dans du PBS, puis on incube les cellules durant 1 heure à 37°C avec l'anticorps monoclonal Anti-BrdU (Becton Dickinson) dilué 30 fois dans le PBS-Tween 20.

Les couvre-objets sont lavés trois fois dans du PBS-Tween 20 et remis à 37°C pour une incubation d'une heure avec l'anticorps de mouton anti-immunoglobuline de souris couplé à la peroxidase de raifort (Horse Radish Peroxidase) et dilué 30x dans le PBS-Tween 20.

On lave de nouveau les couvre-objets dans le PBS-Tween 20 (3 lavages) puis la peroxidase est révélée par immersion dans une solution d'H₂O₂ (0,03 %) et de 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB)(0,6 mgr/ml) dans du PBS durant 15 minutes, puis les couvre-objets sont lavés avec de l'eau distillée. Ce marquage permet la distinction des noyaux ayant incorporé la BrdU. Afin d'obtenir un comptage total des noyaux, ceux-ci sont colorés par une incubation de 5 minutes des couvre-objets avec une solution d'1 µg/ml de Hoechst 33258 dans du PBS. Suit un rinçage rapide dans de l'eau distillée après quoi le couvre-objet est déposé sur une lame de microscopie sur laquelle se trouve une goutte d'un mélange glycérol (95%)-PBS (5%). L'observation des lames se réalise sur un microscope ZEISS (Photomicroscope I) équipé d'un épicondenseur RS III, en contraste de phase pour le comptage des noyaux ayant incorporé la BrdU, puis en épifluorescence avec filtre d'excitation ultra-violet pour le comptage des noyaux totaux. Les cellules sont observées avec un grossissement de 400x et on compte par lame un nombre de champs suffisant pour obtenir un minimum de 300 noyaux comptés en fluorescence.

3.2.5. INCORPORATION DE ³H- *methy*l-THYMIDINE.

Parallèlement à la détermination de labelling index, la mesure quantitative de la synthèse d'ADN a été réalisée au moyen de thymidine radioactive. Cette mesure est déterminée par la quantité de ³H-thymidine incorporée dans des molécules précipitables par l'acide trichloroacétique (TCA) (Russel *et al.*, 1988; McNeil *et al.*, 1989)

Après 24 heures d'attachement des kératinocytes, les puits des "multi-dish" 24 puits sont rincés 2 fois à l'aide de PBS, puis les cellules sont incubées avec du milieu contenant de la ³H- *methy*l-thymidine à raison de 2,5 µCi/puits (Amersham). La concentration finale en thymidine étant de 0,6µm. Après 18 heures d'incubation à 37°C, les puits sont lavés 2 fois avec du PBS. Suivent alors 2 incubations de 5 minutes en présence de TCA 5 %.

On rince alors les puits 2 fois avec de l'eau distillée, puis, pour solubiliser les substances précipitées, 200 µl de NaOH 0,5N sont ajoutés

à chaque puits. Les multi-dish sont alors mises à l'étuve durant 2 heures. On prélève 100 µl de chaque solution que l'on met dans une fiole de scintillation pour y être mélangés avec le scintillant (Aqua-Luma (Lumac)). Le nombre de coups par minute (cpm) de chaque échantillon est déterminé dans un compteur à scintillation Beckman et rapporté aux protéines correspondantes.

3.2.6. MARQUAGE A L'AIDE D'UN ANTICORPS : LE Ki67.

Cette méthode est donc complémentaire à la détermination du L.I. dans l'étude de la prolifération des kératinocytes.

Afin de déterminer le pourcentage de cellules marquées avec cet anticorps, celles-ci sontensemencées sur des couvre-objets en verre préalablement posés au fond d'une "multi-dish" 6 puits.

Après 48 heures de prolifération, les couvre-objets sont lavés trois fois dans du PBS, après quoi les cellules sont fixées par immersion durant 5 minutes dans l'acétone. Ensuite les couvre-objets sont séchés à l'air. A ce stade, on peut les laisser en attente à 4°C.

Ils sont ensuite placés 2 minutes dans du PBS-Tween 20 0,5 %. Suivent alors deux incubations d'une heure à 37°C. La première se fait dans l'anticorps monoclonal de souris anti-cellules humaines en prolifération (DAKOPATS) dilué 25 fois dans le PBS-Tween 20. La seconde se faisant dans l'anticorps de mouton anti-immunoglobuline de souris couplé à la peroxidase de raifort. et dilué 30 fois. Après chaque incubation, les lamelles couvre-objets sont lavées 3 fois dans le PBS-Tween 20.

Ensuite, le peroxidase est révélée dans une solution d'H₂O₂ (0,03%) et de DAB(0,6 mg/ml) dans du PBS durant 15 minutes. Les lamelles sont alors lavées avec de l'eau distillée.

La coloration de l'ensemble des noyaux se réalise par incubation des couvre-objets dans le Hoechst 33258 à raison d'1 µg/ml dans le PBS durant 5 minutes. Le montage des lamelles couvre-objets et l'observation des cellules se font alors selon la même technique que celle explicitée lors de l'incorporation de BrdU.

3.2.7. INCORPORATION DE BrdU DANS LE FEUILLET EPITHELIAL (Schutte *et al.*, 1987)

La proportion des cellules en phase S du cycle cellulaire a également été mesurée dans les feuillets épithéliaux non dissociés. Après les conditions de stockage appropriées le greffon est lavé 2 fois au PBS. Ensuite il est mis incubé 1 heure à 37°C dans 10 ml de milieu de culture

contenant de la BrdU à une concentration de 10 μ M. Suivent deux rinçages au PBS après quoi les greffons sont fixés par immersion dans de l'éthanol 70 % durant 3 heures à température ambiante.

La fin de la déshydratation, l'inclusion et l'enrobage en paraffine se déroulent de manière classique (cfr 3.2.9). Des coupes de 5 μ m sont réalisées, puis la paraffine est enlevée par 2 bains de 5 minutes dans le toluène avant de réhydrater le tissu.

Les cellules ayant incorporé la BrdU sont révélées en immunofluorescence.

Pour réaliser le marquage, 2 rinçages de 5 minutes à l'aide de PBS précèdent une incubation de 30 minutes des coupes à 37°C dans de l'HCl 2M.

Ensuite deux rinçages de 5 minutes dans une solution de Borax (0,1 M pH 8,5) ainsi que 2 rinçages de 5 minutes dans du PBS neutralisent l'acide chlorhydrique.

Les coupes sont alors recouvertes par 100 μ l d'une dilution 1:10 de l'anticorps monoclonal anti-BrdU (Becton Dickinson) dans une chambre humide à 37°C pendant 60 minutes. Après 2 rinçages dans le PBS, les coupes sont alors recouvertes avec 100 μ l d'une dilution de 1:20 de fragment Fab2 d'un anticorps de lapin anti-immunoglobuline de souris couplé à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) (Dako). Suivent 2 rinçages avec du PBS, après quoi les coupes sont incubées 5 minutes dans une solution d'iodure de propidium à une concentration de 0,5 μ g/ml du PBS.

Un rinçage rapide dans l'eau distillée précède alors le montage des coupes dans le glycergel (Dako). L'observation des coupes sur un microscope Zeiss (Photomicroscope I) équipé d'un épicondenseur RS III, en épifluorescence avec filtre d'excitation vert (filtres et miroir dichroïque adéquats pour le Texas Red) pour le comptage des noyaux totaux, puis avec filtre d'excitation bleu (filtres et miroir dichroïque adéquats pour la FITC) afin de repérer et de compter les noyaux ayant incorporé la BrdU. Les coupes sont observées avec un grossissement de 400x et on compte par coupe un nombre de champs suffisant pour obtenir un minimum de 500 noyaux colorés par l'iodure de propidium.

3.2.8. MESURE DE LA VIABILITE CELLULAIRE AU COURS DU STOCKAGE DES FEUILLETS EPITHELIAUX.

Pour estimer la viabilité des kératinocytes faisant partie des feuillets épithéliaux en fonction des conditions de stockage, nous avons mesuré la libération par ces cellules d'une enzyme cytoplasmique, la lactate déshydrogénase (LDH). Dans ce but, les greffons sont placés sur supports et stockés comme décrit précédemment pendant un délai allant de 0 à 24

heures dans l'étuve de culture, dans 8 ml de DMEM contenant les antibiotiques. A la fin du stockage, ce milieu est récupéré pour y doser l'activité LDH libérée par les kératinocytes pendant cette période. On le remplace alors par 8 ml de PBS contenant 1% de Triton X-100 afin de libérer l'activité LDH restant dans les cellules du greffon. Après 5 minutes à température ambiante, ce milieu est également récupéré pour doser l'activité LDH. En attendant le dosage, ces milieux sont placés à 4°C. Le pourcentage de lyse cellulaire estimé par la libération de la LDH est calculé selon la formule :

$$\% \text{de lyse cellulaire} = \frac{\text{Activité LDH libérée}}{\text{Activité LDH}_{\text{libérée}} + \text{Activité LDH}_{\text{non libérée}}} \times 100$$

L'activité LDH est déterminée en mesurant la vitesse de la diminution de l'absorbance à 340 nm de la nicotinamide-adénine dinucléotide réduite (NADH) produite par l'échantillon étudié en présence d'un excès de pyruvate (Wroblewski & LaDue, 1955). En pratique, 100 µl de l'échantillon sont ajoutés dans une cuvette à 2,9 ml de tampon phosphate 0,1 M pH 7,5 contenant du pyruvate de Na (730 µM; Boehringer Mannheim) en excès par rapport à la concentration de NADH (150 µM Grade I, Boehringer Mannheim)

3.2.9. OBSERVATION EN MICROSCOPIE OPTIQUE.

Après une incubation à la dispase, le greffon obtenu est lavé deux fois dans du PBS et mis dans un fixateur : le Bouin Hollande Acétifié Sublimé (BHAS) durant trois heures.

L'arrêt de la fixation est assuré par un rinçage de quelques minutes sous l'eau courante.

Fixation et enrobage :

- déshydratation : 3 x 15 min dans le méthanol absolu
- préinfiltration : 3 x 15 min dans le toluène
- Infiltration : 4 x 15 min dans le surgipath (Labonord)
- enrobage : on oriente le greffon dans une cassette contenant de la paraffine. On laisse refroidir sur une plaque réfrigérante puis on démoule.
- coupe : mollifex durant trois heures
coupe de 3µm au microtome American Optical type Spencer 820 à l'aide d'un couteau en acier type S35 (Feather)

- étalement : les coupes sont étalées sur une lame portant une goutte d'eau gélatineuse et se trouvant sur une plaque chauffante à 53°C. Ensuite, les lames sont mises à l'étuve durant une heure.

Coloration : on réalise un HE (Hémalun-Erythrosine)

- déparaffiner : 2 x 3 min dans le toluène
- réhydratation : 2 x 2 min dans le méthanol
1 x 2 min dans le méthanol 70°
- retrait du précipité mercurique : 5 min dans l'éthanol iodé 1%
quelques secondes dans Na₂ S₂O₅ 5%
- retrait de l'acide picrique : 1 min sous l'eau courante
- coloration des substances basophiles : 12 min dans l'hémalun
quelques secondes sous l'eau courante
- différenciation : 1,30 min dans l'éthanol-HCl
- rinçage : 10 min sous l'eau courante
- coloration des substances acidophiles : 8 min dans l'érythrosine
quelques secondes sous l'eau courante
- déshydratation : 3 x 1 min dans l'alcool isopropylique absolu
- imprégnation par le solvant du DPX : 3 x 1 min dans le toluol
- montage de la coupe au DPX (BDH)
- observation au microscope optique.

3.2.10. OBSERVATION EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE.

Le greffon obtenu après action de la dispase est coupé en fragments de 1 à 2 mm de côté qui sont immergés dans de la glutaraldéhyde durant deux heures 30 à 4°C. Ensuite :

- lavage dans du cacodylate 0,2 M 3 x 10 minutes à 4°C
- post-fixation : cacodylate 0,2M-OsO₄ 0,2% (V/V) 60 minutes à 4°C
- lavage dans du cacodylate 0,1M 3 x 10 minutes à 4°C
- déshydratation : éthanol 30° 2 x 5 minutes à 4°C
50° 2 x 5 minutes à 4°C
70° 2 x 5 minutes à 4°C
94° 2 x 10 minutes à 4°C
100° 3 x 10 minutes à 20°C.
- solvant de la résine : oxyde de propylène 4 x 5 minutes à 20°C
oxyde propylène/épon 1 nuit à 20°C sous vide

-polymérisation dans un "flat":

1 nuit à 37°C

12 heures à 45°C

72 Heures à 60°C

Une coupe semi-fine et ultra-fine des échantillons ainsi obtenus sont alors réalisées.

3.3 INTERPRETATION DES RESULTATS.

Afin de déterminer si les techniques analytiques utilisées ont pu mettre en évidence un effet significatif des différents traitements qu'ont subis les épidermes de culture, nous avons réalisé des tests statistiques.

Nous avons tout d'abord effectué une vérification de l'homogénéité des variances par le test de Hartley.

Ensuite deux tests ont été utilisés, chacun répondant à un schéma expérimental particulier.

1ère analyse : nous réalisons 3 greffons par temps testé. Le dosage se faisant directement au niveau du greffon.

	t1	t2	t3	t4
G ₁	-	-	-	-
G ₂	-	-	-	-
G ₃	-	-	-	-

Nous utilisons alors un test statistique de type Anova à un critère fixe : l'heure.

2ème analyse : nous réalisons également 3 greffons par temps testé mais ceux-ci sont dissociés et les cellules ainsi récoltées sont ensemencées dans des puits (3) de "multi-dish" avant d'effectuer le dosage.

t1			t2			t3			t4		
G ₁	G ₂	G ₃	G ₁	G ₂	G ₃	G ₁	G ₂	G ₃	G ₁	G ₂	G ₃
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Nous utilisons alors un test statistique de type Anova à deux critères hiérarchisés : le temps (critère fixe) et le greffon (critère aléatoire).

Chacune des valeurs obtenues lors de ces deux analyses de variance a été vérifiée selon la distribution F de Snedecor.

RESULTATS

&

DISCUSSION

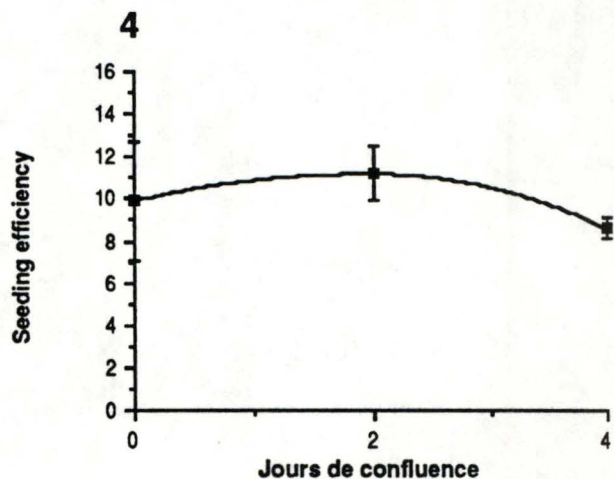
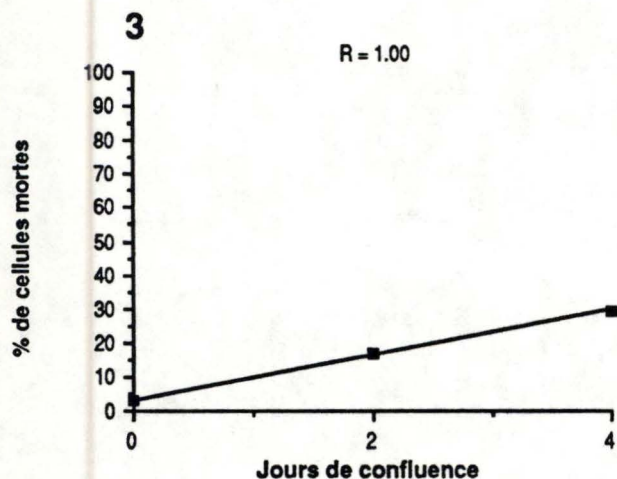
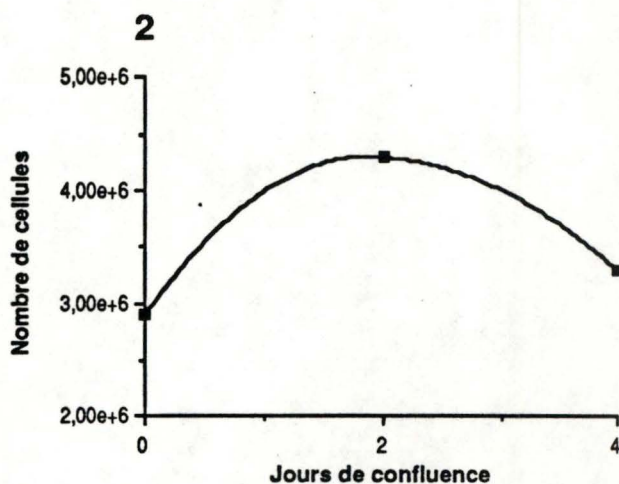
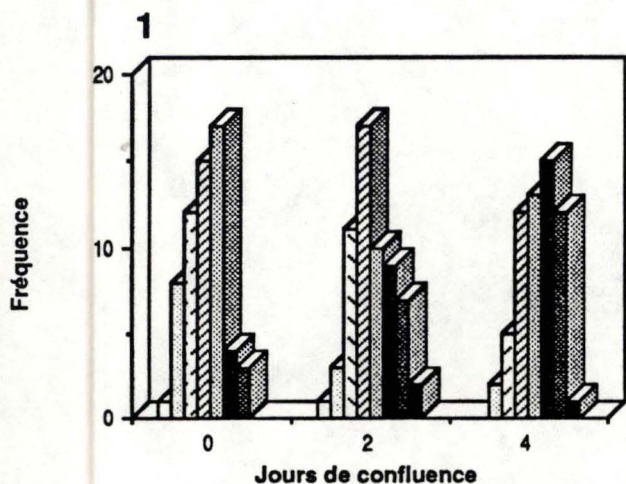


Fig. 1.1. : détermination du degré de confluence cellulaire nécessaire à l'obtention d'un épiderme de culture destiné à être greffé.

1.1.1. : fréquence du nombre de couches cellulaires observées à 30 endroits pris au hasard sur des coupes transversales d'épidermes obtenus en culture

1.1.2 : nombre moyen de cellules constituant le greffon déterminé après dissociation à la trypsine de 2 épidermes de culture

1.1.3 : pourcentage moyen de cellules mortes au niveau du greffon déterminé au niveau de 2 épidermes de culture après dissociation

1.1.4. : capacité d'adhérence cellulaire déterminée sur 3 cultures de kératinocytes obtenus après dissociation à la trypsine d'un greffon (moyennes et écarts-type)

4. RESULTATS & DISCUSSION.

4.1. RESULTATS.

4.1.1. DETERMINATION DU DEGRE DE CONFLUENCE.

Avant d'entreprendre toute manipulation concernant la préparation de l'épiderme de culture en vue de son utilisation en tant que "peau de remplacement", il était nécessaire de déterminer à quel stade de la confluence cellulaire le greffon devait être détaché de son support pour être transféré sur N-terface.

Pour cela, une série d'épidermes de culture ont été réalisés selon la technique décrite, épidermes que nous avons ensuite détachés à des stades successifs de confluence : soit le jour même de la confluence, soit deux jours ou soit quatre jours après confluence (C, C+2, C+4).

Quatre analyses ont alors été réalisées :

- l'observation morphologique,
- la détermination du nombre de cellules constituant le greffon (N.C.G.),
- la détermination du pourcentage de cellules mortes au sein du greffon,
- la détermination du seeding-efficiency (S.E.) après dissociation du greffon par la trypsine et réensemencement des cellules ainsi obtenues.

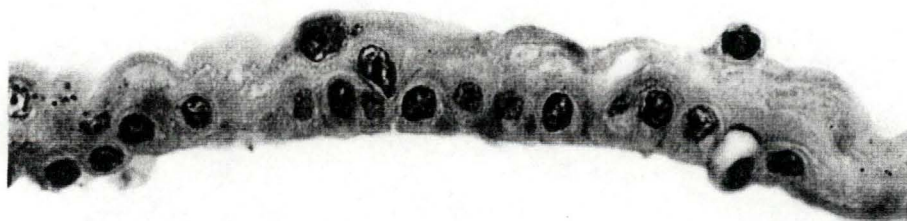
4.1.1.1. Observation morphologique.

Sur trois coupes optiques de greffons appartenant à chacun des stades de confluence testés, nous avons pris 10 endroits au hasard afin de compter le nombre de couches cellulaires observées (Figure 1.1.1.). Nous constatons une augmentation de la fréquence des nombres élevés de couches lorsque la confluence est dépassée de deux jours et de quatre jours. Cependant, il convient de faire attention lors de l'interprétation de ce résultat comme le démontre l'observation morphologique proprement dite.

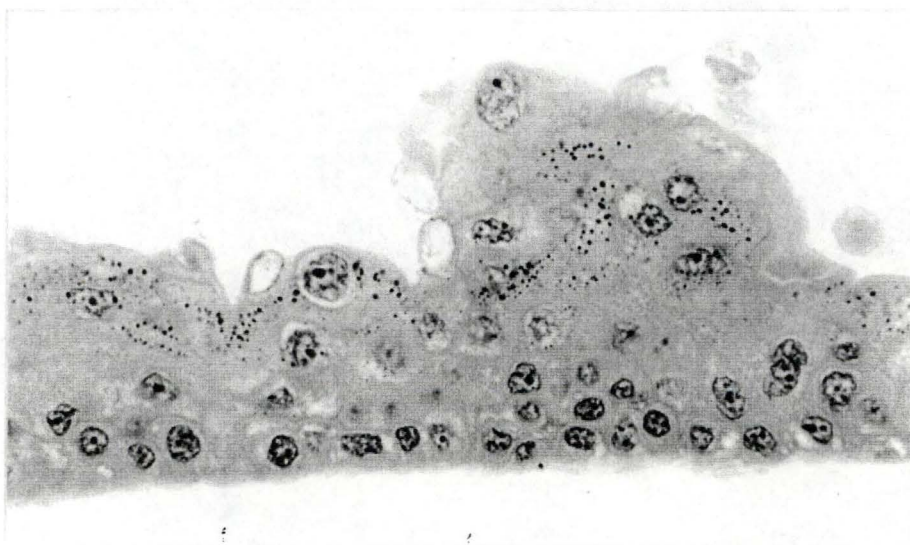
En effet, au stade de confluence et de confluence + 2 jours, nous constatons que la structure observée au microscope optique présente l'aspect typique d'épiderme reconstruit *in vitro* (Faure *et al*, 1987).

Notre greffon montre une épaisseur allant de 1 à 8 couches cellulaires, les cellules basales sont bien jointives, possèdent un noyau central et sont de forme polygonale. Les cellules des couches supérieures montrent un aspect progressivement plus aplati. La disparition du noyau dans les couches les plus superficielles de l'épiderme peut également être observée (fig.1.2.1. et 1.2.2.).

1



2



3

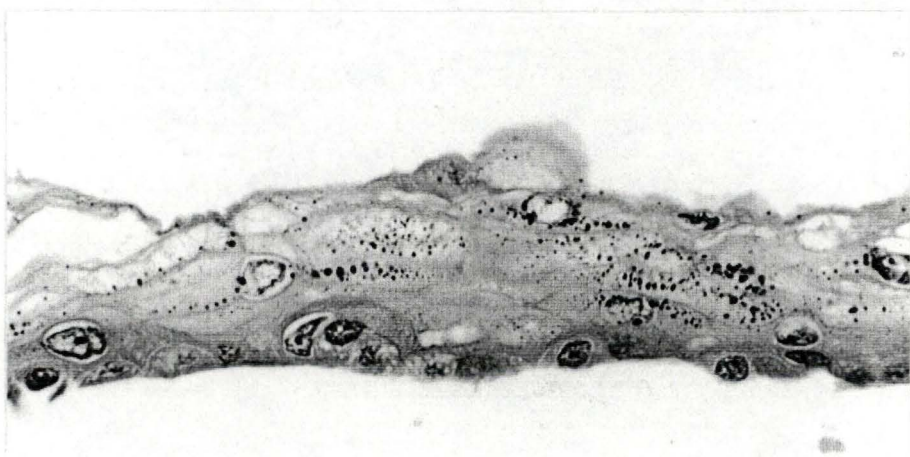


Fig. 1.2. : coupes transversales d'épidermes de culture. (gross. 570x)
1.2.1. : épiderme détaché lors de la confluence cellulaire
1.2.2. : épiderme détaché 2 jours après avoir atteint le stade de confluence
1.2.3. : épiderme détaché 4 jours après avoir atteint le stade de confluence

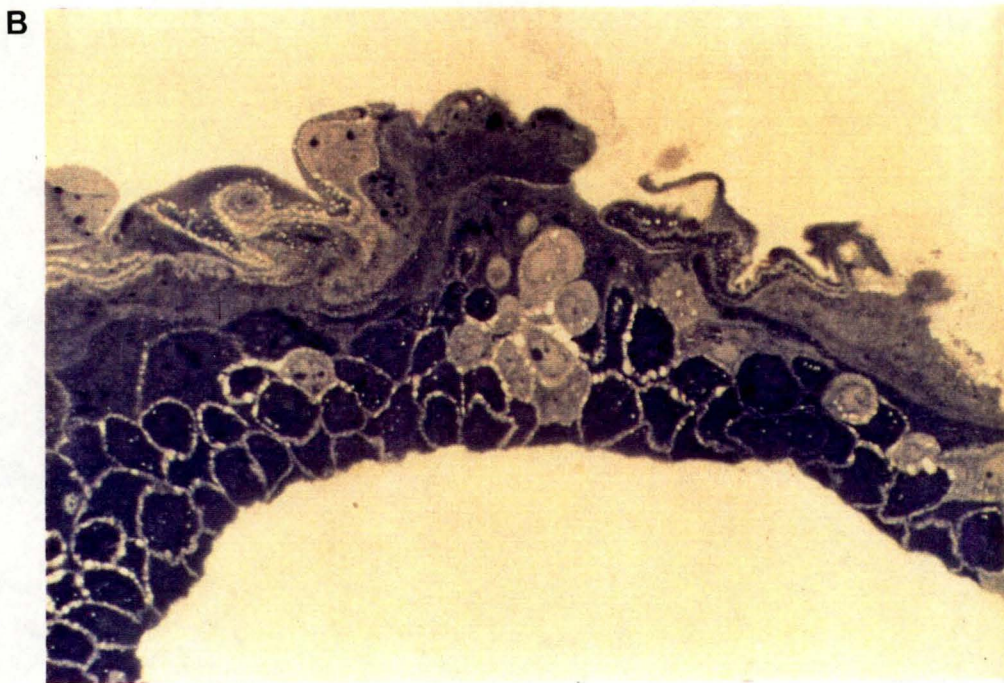
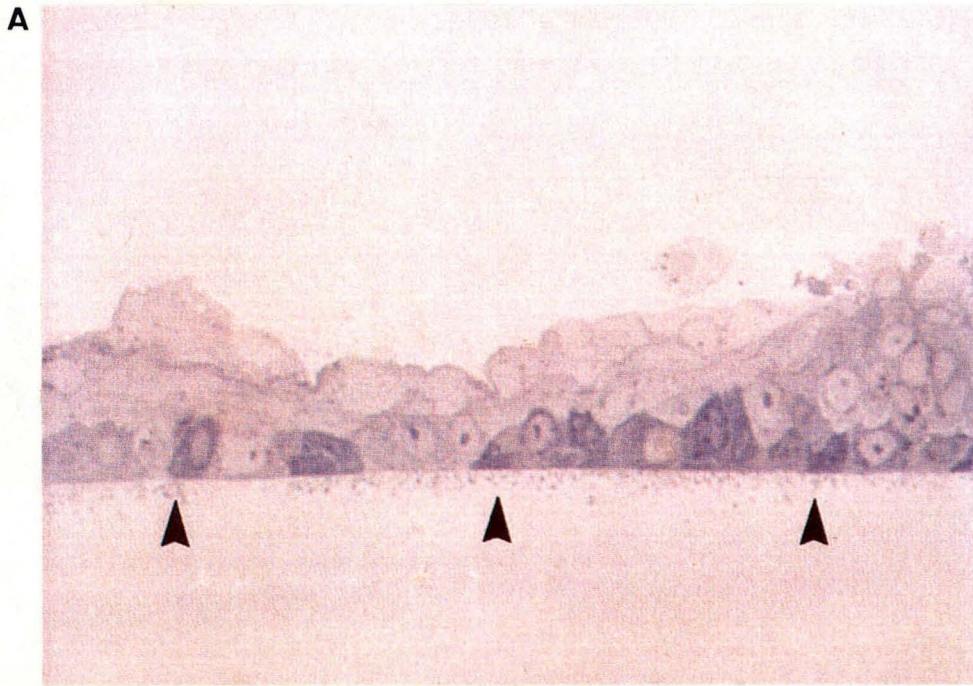


Fig. 1.3. : mise en parallèle d'une coupe ultra-fine d'épiderme de culture en vue transversale obtenue par Compton et al. (1989) en A et une coupe semi-fine d'un de nos épidermes de culture détaché à la dispase 2 jours après avoir atteint la confluence en B. (gross.540x)

La comparaison au niveau de la coupe ultra-fine de notre épiderme de culture avec celle obtenue par Compton *et al.* (1989) confirme ces observations : (fig. 1.3.A et B) c'est-à-dire :

- cellules basales polygonales plus basophiles que les cellules des couches supérieures
- présence de desmosomes et, par contre, absence d'hémidesmosomes,
- différenciation pas très poussée (cellules épineuses essentiellement).

En fait, il semblerait que l'aspect polygonal des cellules soit dû au détachement de l'épiderme de son substrat avant sa fixation dans le B.H.A.S.. Les cellules subirait ainsi une rétraction non observée lorsque la fixation a lieu dans la boîte de culture même (Compton *et al.*, 1989).

Par contre, lorsqu'on observe morphologiquement le feuillet épidermique obtenu après 4 jours de confluence la structure en est tout à fait altérée. En effet, une "altération" cellulaire peut y être observée. Elle se traduit par une vacuolisation de la cellule, une disparition du noyau de plus en plus précoce ainsi que par une desquamation observée tant au niveau macroscopique que microscopique (fig. 1.2 3).

4.1.1.2. Observation quantitative.

Le nombre des cellules constituant le greffon connaît une hausse en C+2 qui est suivie d'une baisse en C+4 (fig.1.1.2.) alors que le nombre des cellules mortes augmente progressivement depuis la confluence jusqu'à la confluence + 4 jours (fig. 1.1.3.).

Quant à la détermination du seeding efficiency, on peut observer une légère augmentation du pourcentage de cellules attachées dans la "multi-dish" en C+2 par rapport au pourcentage observé en C et C+4. Cependant, l'analyse statistique ne montre aucune différence significative dans la capacité d'adhérence des kératinocytes provenant des différents feuillets (fig. 1.1.4.)

4.1.1.3. Discussion et conclusion.

L'ensemencement des kératinocytes en boîte de culture se fait de manière homogène. Cependant, nous observons toujours de faibles variations dans la vitesse de croissance des cellules selon les plages considérées, variations pouvant être dues à la proximité plus ou moins grande des fibroblastes murins. De ce fait on est en droit de penser que lorsqu'on met un greffon en présence de dispase juste au moment de la confluence, celui-ci puisse présenter des plages où le tapis cellulaire n'est pas encore totalement constitué (cellules fort étalées et pas totalement jointives) ainsi que des endroits où les cellules n'ont pas encore eu l'occasion de se superposer. Il est donc probable que les zones

formées de cellules peu jointives soient victimes d'une perte de cellules due à la présence de peu de jonctions intercellulaires. Les zones monostratifiées montrent évidemment moins de cellules que les endroits où l'épiderme est totalement constitué (pluristratifié). Lorsque la culture se trouve au stade C+2, le feuillet épidermique est normalement constitué, montrant une stratification généralisée et donc une différenciation plus importante. Cela pourrait expliquer la hausse observée dans le N.C.G. ainsi que l'augmentation du pourcentage de cellules mortes. Par contre, lorsque la culture se trouve au stade C+4, le degré de stratification reste sensiblement le même qu'en C+2 alors que le nombre de cellules en état de "dégénérescence" augmente. Cela se traduit par une augmentation du pourcentage de cellules mortes et donc, inévitablement, par une chute du nombre de cellules constituant le greffon.

En conclusion, nous pouvons simplement dire qu'il est nécessaire d'attendre que la confluence soit atteinte quel que soit l'endroit considéré au niveau de l'épiderme afin d'éviter que celui-ci ne se déchire lorsqu'il sera placé sur son support ou, même simplement, lors de son détachement de la boîte de culture. Mais lorsque la confluence est atteinte, il est préférable d'utiliser le greffon dans les délais les plus brefs comme le confirment Matouskova *et al.* (1989).

Après avoir abordé ce problème préliminaire, nous nous sommes intéressés à la question principale de ce mémoire à savoir : puisque le détachement des épidermes de culture par la dispase est une étape inévitable, peut-on laisser les épidermes de culture en attente dans un milieu simplifié (aucun des additifs de Green) après les avoir détachés de leur support ?

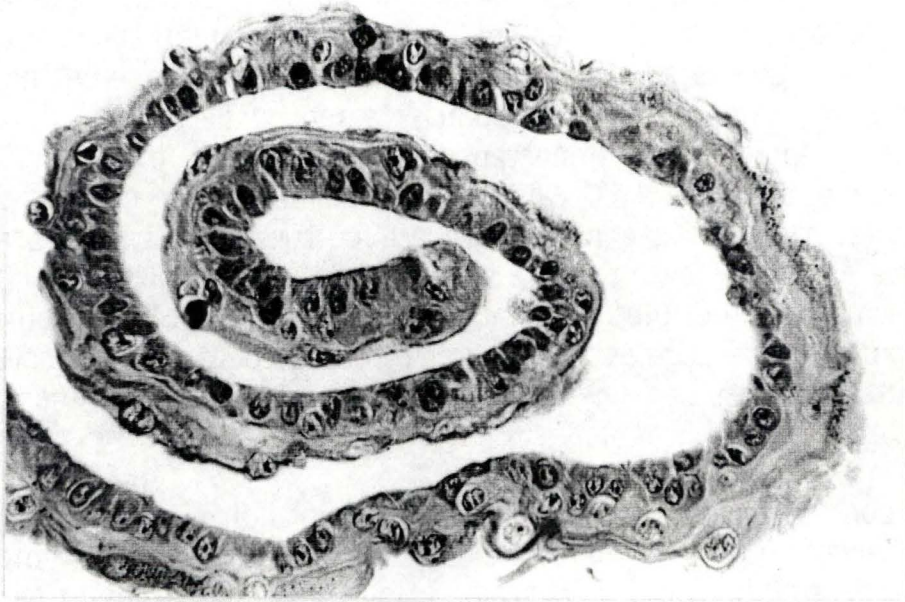
Dans ces conditions, comment les cellules qui constituent ces épidermes vont-elles évoluer si cette attente doit se prolonger ?

4.1.2. DETERMINATION DU TEMPS MAXIMAL DE MISE EN ATTENTE EVENTUELLE DE L'EPIDERME DE CULTURE AVANT SON UTILISATION CLINIQUE.

Afin d'étudier ce problème, nous avons réalisé une série d'expériences que l'on peut classer comme suit :

- caractérisation morphologique des épidermes détachés
- caractérisation quantitative des épidermes détachés se basant sur deux séries d'expérience.

A



B

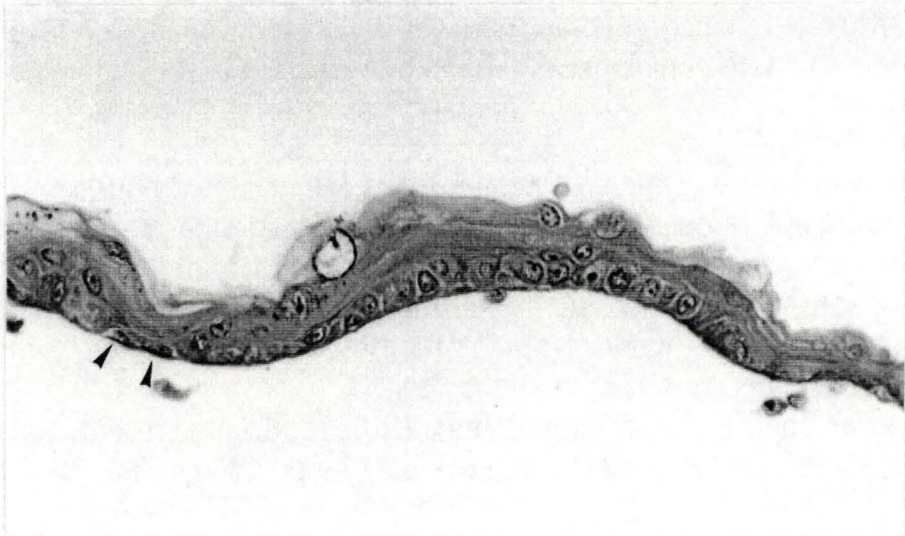


Fig. 2.1.: A : coupe transversale d'un épiderme de culture détaché à la dispase (gross.320x)
B : coupe transversale d'un épiderme de culture détaché et mis en attente 4 heures sur N-terface (gross.320x)

La première série s'effectue sur le greffon lui-même. Nous avons ainsi effectué la détermination de NCG ainsi que du pourcentage de cellules mortes au sein du greffon déterminé par le test d'exclusion du bleu trypan. Ce test de viabilité est confirmé par le dosage de la LDH que peuvent libérer les cellules constituant l'épiderme de culture suite à une variation de perméabilité membranaire. Enfin, nous avons réalisé la mesure du pourcentage de cellules en phase de synthèse du DNA par le test d'incorporation de BrdU.

La deuxième série d'expériences est réalisée sur les recultures de kératinocytes obtenues par dissociation à la trypsine de l'épiderme de culture. Nous réensemencions ainsi, pour chaque temps étudié et pour chaque quantification réalisée, 9 puits de "multi-dish" avec les cellules obtenues au départ de 3 greffons manipulés. Cela permet non seulement d'étudier l'effet dû à la mise en attente de l'épiderme détaché mais aussi d'étudier la variabilité inhérente à cet épiderme. Cette série d'expériences comprend les dosages de protéines et d'ADN présents au sein de la reculture, la détermination de la capacité d'adhérence des kératinocytes ou seeding efficiency ainsi que la mesure du pourcentage de cellules en phase de synthèse d'ADN réalisée par l'incorporation de BrdU.

Il est important de noter que plusieurs expériences ont été réalisées à partir des mêmes greffons:

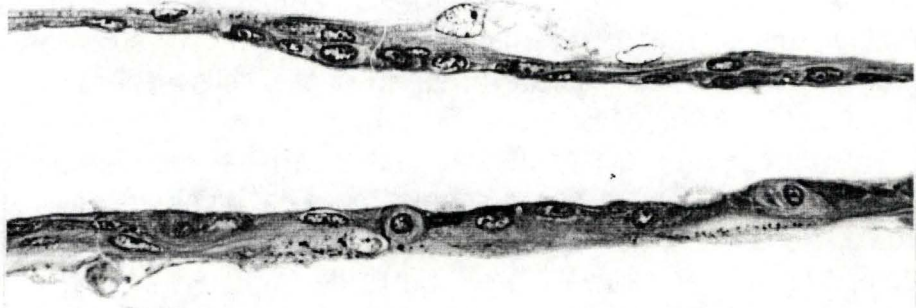
- la détermination du NCG
- le pourcentage de cellules mortes
- le dosage de DNA et des protéines
- le seeding efficiency
- le L.I. sur couvre-objets.

Ces études morphologiques et quantitatives ont été réalisées sur épidermes reconstruits selon la technique décrite puis détachés et mis en attente sur N-terface durant différentes périodes bien déterminées qui sont : 0 h d'attente afin de posséder un épiderme de culture témoin; 4h d'attente, période correspondant au temps minimal nécessaire à la préparation d'une série de greffons en vue de leur utilisation clinique; 14 h d'attente, délai correspondant à la préparation des épidermes de culture un soir en vue de leur utilisation le lendemain matin; et 24 heures d'attente correspondant à une journée complète de mise en attente des épidermes.

4.1.2.1. Observation morphologique.

Lorsque nous observons les coupes d'épidermes de culture obtenus après 0 et 4 heures de mise en attente (fig 2.1. A et B), nous observons une

A



B

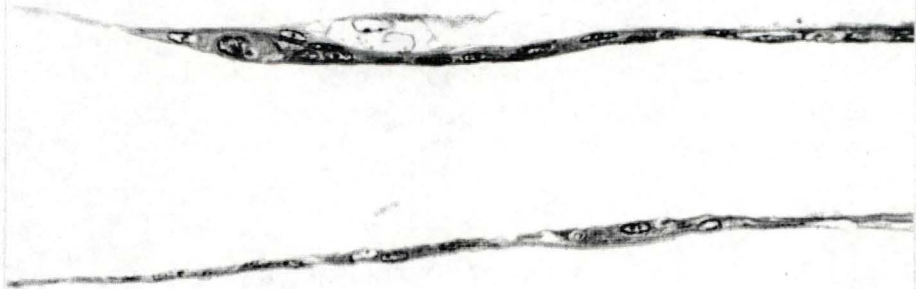


Fig. 2.2 : coupes transversales d'épidermes de culture détachés à la dispase et mis en attente sur N-terface durant des périodes variables (gross.320x)
A : épiderme de culture mis en attente 14 heures
B : épiderme de culture mis en attente 24 heures

morphologie identique à celle observée et décrite dans la littérature (Faure *et al.* 1987) et telle que nous l'avons déjà décrite au § 4.1.1.1.

C'est-à-dire, une assise de cellules basales surmontée de plusieurs couches constituées de cellules épineuses dont la forme tend à s'aplatir vers les assises supérieures et dont les noyaux sont absents au niveau des assises les plus superficielles. Une remarque cependant est à noter : les cellules basales du greffon fixé dès que le détachement a eu lieu sont cuboïdes (Fig.2.1.A) alors que certaines des cellules basales du greffon obtenu après 4h de mise en attente ont tendance à s'aplatir (fig. 2.1. tête de flèche).

Le feuillet épidermique obtenu après 14 h de mise en attente ne présente plus qu'une à deux assises cellulaires dont les cellules basales sont aplaties. Les autres cellules montrent une dégénérescence assez importante (vacuolisation, perte précoce du noyau) ainsi qu'une certaine tendance à la desquamation (fig. 2.2.A). Le greffon de 24 h ne montre souvent plus qu'une seule assise de cellules aplaties (fig 2.2.B).

La variation de forme des cellules basales est sans doute due au fait que le feuillet de 0 h est mis dans le fixateur sans avoir été préalablement placé sur N-terface alors que les greffons appartenant aux 3 autres temps testés le sont. Les cellules polygonales observées dans la coupe histologique réalisée au niveau de l'épiderme ayant subit 4 heures d'attente proviennent sans doute d'un endroit du greffon non attaché au support. En effet, lorsque les cellules n'ont aucun support auquel elles puissent adhérer, elles montrent une tendance à se rétracter et à faire perdre ainsi 50 à 60 % de sa surface au feuillet épithélial (Compton *et al.*, 1989; Green *et al.*, 1979). Par contre, si les cellules sont mises en contact avec un support auquel elles peuvent adhérer, aucune rétraction n'est observée.

L'épiderme se trouve en fait dans une situation tout à fait contraire à celle qu'il connaît tant *in vivo* qu'*in vitro*. En effet, lorsqu'on installe l'épiderme de culture sur N-terface, ce dernier est déposé sur les couches supérieures du feuillet épithélial, le tout étant ensuite transféré dans une boîte de Pétri en attente d'une utilisation clinique ultérieure. Cela signifie que l'assise basale se trouve sans aucun site d'attachement possible alors que les couches supérieures qui, normalement, sont tout-à-fait libres de desquamer, se voient mises en contact avec l'N-terface.

Cette situation particulière peut expliquer le peu de couches cellulaires observées après 14 et 24 heures de mise en attente. La dégénérescence est tellement importante que les cellules superficielles restent collées au support lorsqu'on sépare celui-ci de la culture après fixation du greffon dans le B.H.A.S.

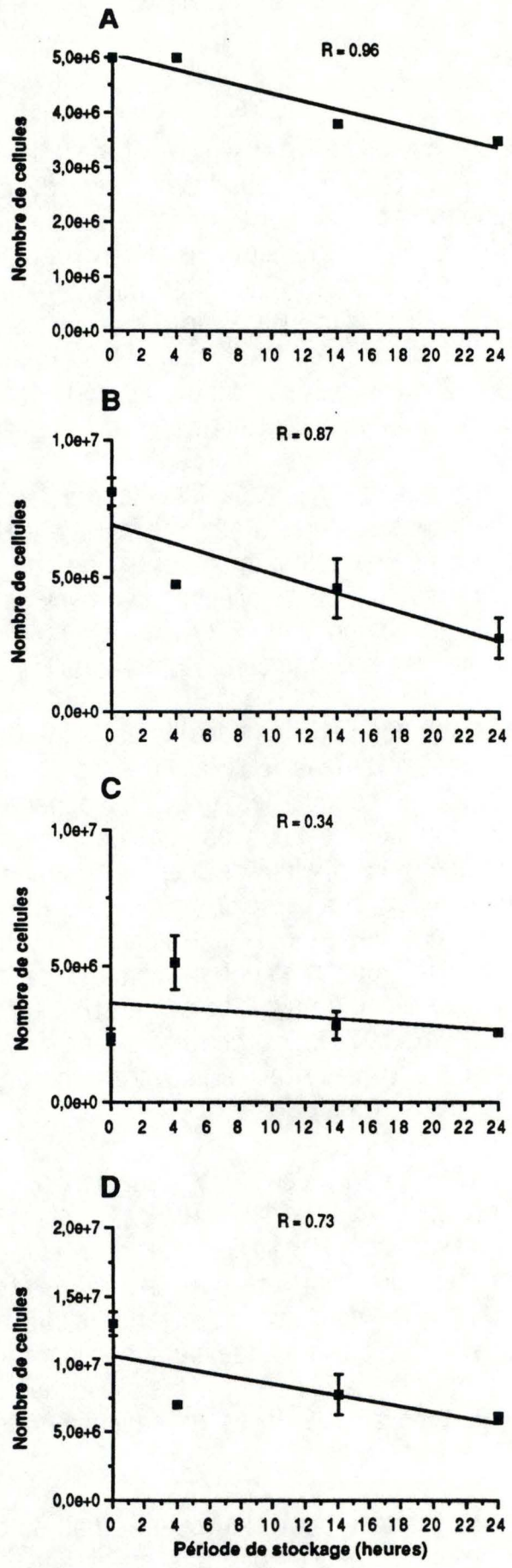


Fig. 2.3 : détermination du nombre de cellules constituant le feuillet épidermique obtenu après dissociation par la trypsine
 A : moyennes déterminées sur 2 greffons
 B, C, D : moyennes et écarts-type déterminés sur 3 greffons

4.1.2.2. Observation quantitative.

Les observations quantitatives décrites ci-dessous ont en fait été réalisées lors de 4 expériences (A, B, C, D) afin d'obtenir une certaine reproductibilité. Cependant le peu de disponibilité de matériel humain nous a obligé à utiliser une souche cellulaire différente pour chaque expérience, l'origine diverse de ces souches entraînant inévitablement une certaine variabilité de comportement des cellules en culture.

Le nombre de cellules composant le greffon est très variable, phénomène probablement dû à l'origine diverse des peaux utilisées (fig. 2.3.). Malgré cette variabilité, la relation linéaire établie entre le N.C.G. et la période de stockage que subissent les épidermes nous indique une baisse d'environ 50 % du nombre de cellules constituant le feuillet épithélial entre le moment de son détachement et l'attente de 24 heures qu'il a subie.

L'analyse statistique nous révèle une différence hautement significative entre les moyennes. Remarquons que dans les expériences B et D la différence se trouve essentiellement entre 0 et 4 heures de mise en attente alors que dans l'expérience A, la valeur obtenue après 4 heures de mise en attente doit avoir été surestimée au vu des résultats concernant les expériences envisagées ci-après. La valeur témoin (à 0 heure) obtenue par l'expérience C, quant à elle, est très basse car le greffon a été placé exceptionnellement sur N-terface (le greffon témoin ne l'étant jamais).

Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait que l'épiderme de culture est placé ou non sur N-terface. En effet, le greffon témoin (mis à part dans l'expérience C) n'est jamais placé sur un support par opposition à tous les autres greffons. De ce fait, la détermination de N.C.G. et du pourcentage de cellules mortes se fait au niveau du greffon entier.

Par contre, lorsque l'épiderme de culture est mis en attente, on le place sur N-terface. Or, lors de la dissociation du feuillet épidermique avec la trypsine, les bords de celui-ci ayant été ourlés autour du support ne se dissocient plus. De ce fait, le nombre de cellules obtenu est beaucoup moins important. De plus, toujours lors de cette dissociation, nous assistons à une "agrégation" des cellules mortes sous forme de filaments (ceux-ci resteront dans le surnageant après centrifugation) ainsi qu'à une certaine adhérence de ces cellules au niveau du support. Ces deux phénomènes peuvent ainsi expliquer la baisse du pourcentage de cellules mortes observées après 4 heures de mise en attente du greffon par rapport à l'épiderme témoin comme nous le montrons ci-après (fig. 2.4.).

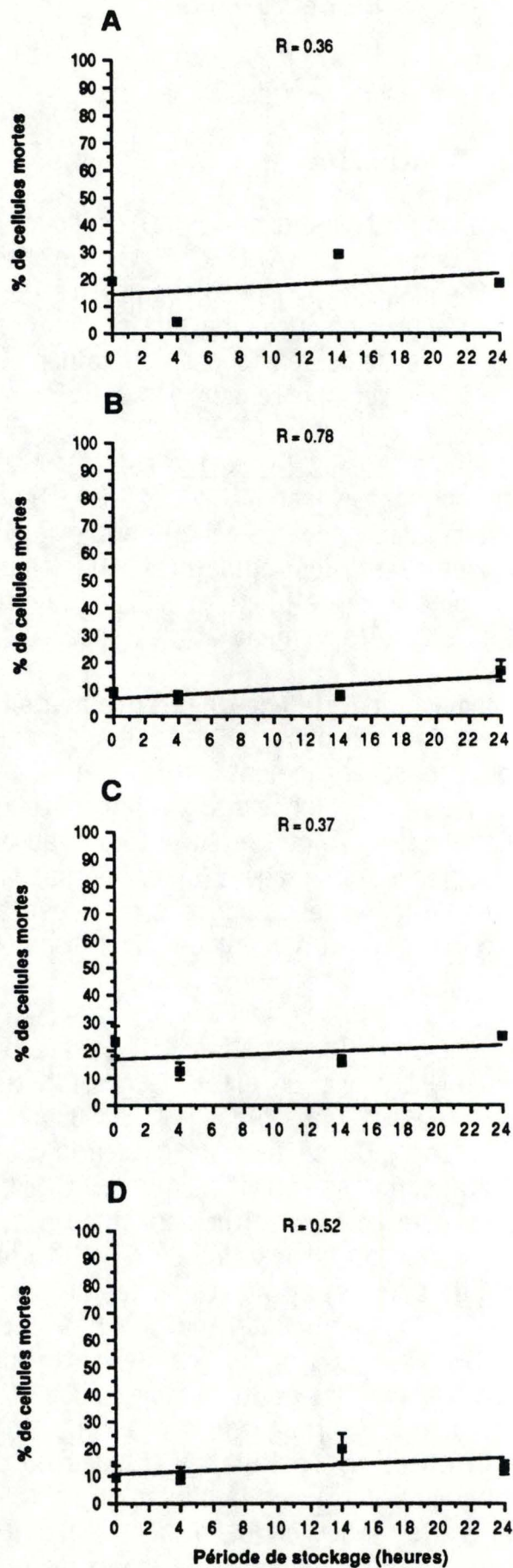


Fig. 2.4. : pourcentage de cellules mortes obtenues après dissociation du feuillet épidermique par la trypsine
 A : moyennes déterminées sur 2 greffons
 B, C, D : moyennes et écarts-type déterminés sur 3 greffons

Le pourcentage de cellules mortes montre une certaine variabilité dans la répartition des valeurs obtenues ce qui empêche de trouver une relation adéquate pour les 4 expériences (fig. 2.4.).

L'analyse statistique montre une différence significative entre les moyennes pour l'expérience D et hautement significative pour les expériences B et C. Or, on observe chaque fois une baisse plus ou moins importante du pourcentage de cellules mortes entre 0 et 4 h. Au-delà de 4 h d'attente, le taux de mortalité a tendance à augmenter.

La libération de lactate déshydrogénase semble plutôt suivre l'allure d'une courbe de saturation (fig. 2.5.).

Les statistiques nous montrent un effet hautement significatif du temps sur la viabilité de nos épidermes. En moyenne, les épidermes de culture voient leur pourcentage de lyse cellulaire passer de 10 à 60 % en l'espace de 24 h. La valeur de 0 h en B et C semble être basse par rapport à celle de l'expérience D. Cela peut s'expliquer par le fait que le greffon de 0 h n'a pas été mis sur N-terface lors des deux premières expériences.

Le seeding efficiency s'explique tout à fait par la relation linéaire (coefficient de corrélation variant entre 0,87 et 0,97). La baisse de capacité d'adhérence des kératinocytes au fur et à mesure que le délai de mise en attente augmente est tout à fait remarquable (fig 2.6.).

Les mesures ayant été estimées sur 9 recultures réalisées à partir de 3 greffons différents, nous avons pu calculé non seulement l'effet du temps mais aussi la variabilité pouvant exister parmi les greffons. L'analyse statistique nous informe qu'il existe une différence hautement significative concernant l'effet du temps alors que la variabilité entre les greffons ne l'est que peu ($F_{\text{observé}}=2,70$ contre un $F_{\text{théorique}}=2,36$).

Le dosage de l'ADN nous montre une relation linéaire entre la concentration en ADN des cultures et le temps de mise en attente (fig. 2.7.). Nous observons une baisse de 50 % de la concentration dans les expériences B et D alors que la pente est beaucoup plus faible en A.

L'analyse statistique nous montre une différence significative concernant l'effet du temps ainsi qu'une variabilité significative entre les greffons pour l'expérience B. La différence est hautement significative pour l'expérience A, différence que l'on pourrait attribuer à la baisse anormale de la concentration en ADN à 4 h résultat possible d'une surestimation accidentelle du NCG avant réensemencement des cellules du greffon dissocié.

Le dosage des protéines indique une baisse hautement significative dans la concentration en protéines des cultures étudiées au cours du temps (fig. 2.8.). De nouveau, la concentration en protéines concernant le délai

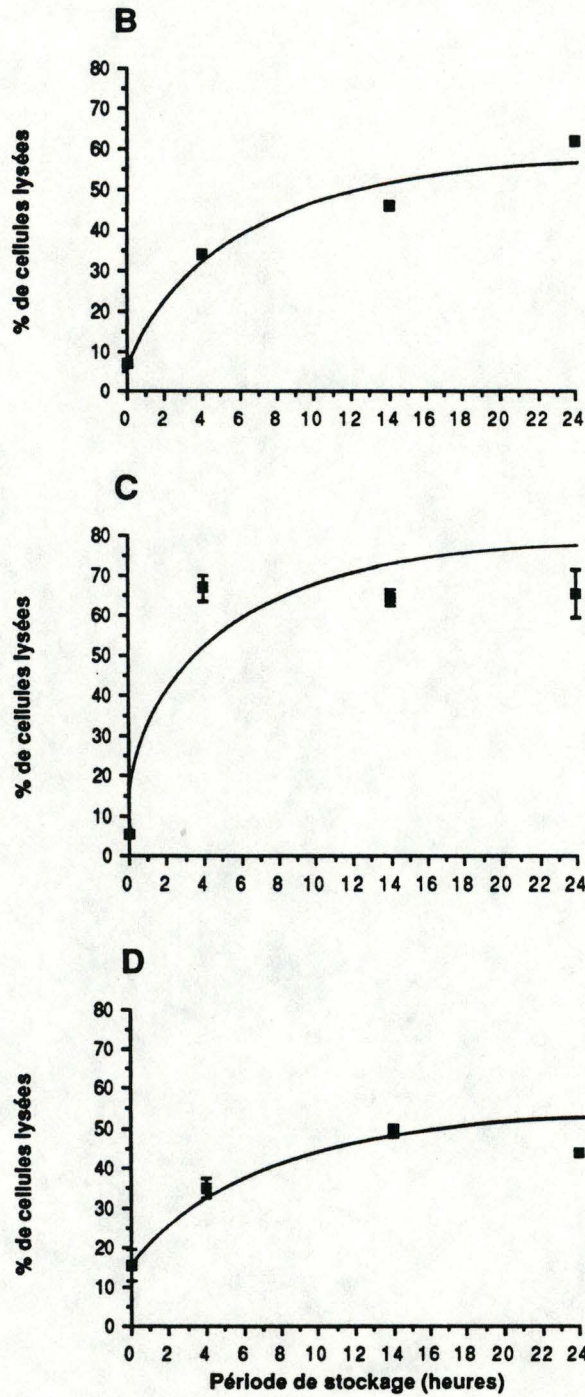


Fig. 2.5. : estimation du pourcentage de lyse cellulaire que subit le feuillet épithélial durant sa mise en attente
 B : valeurs obtenues sur un seul épiderme
 C, D : moyennes et écarts-type obtenus sur 3 épidermes

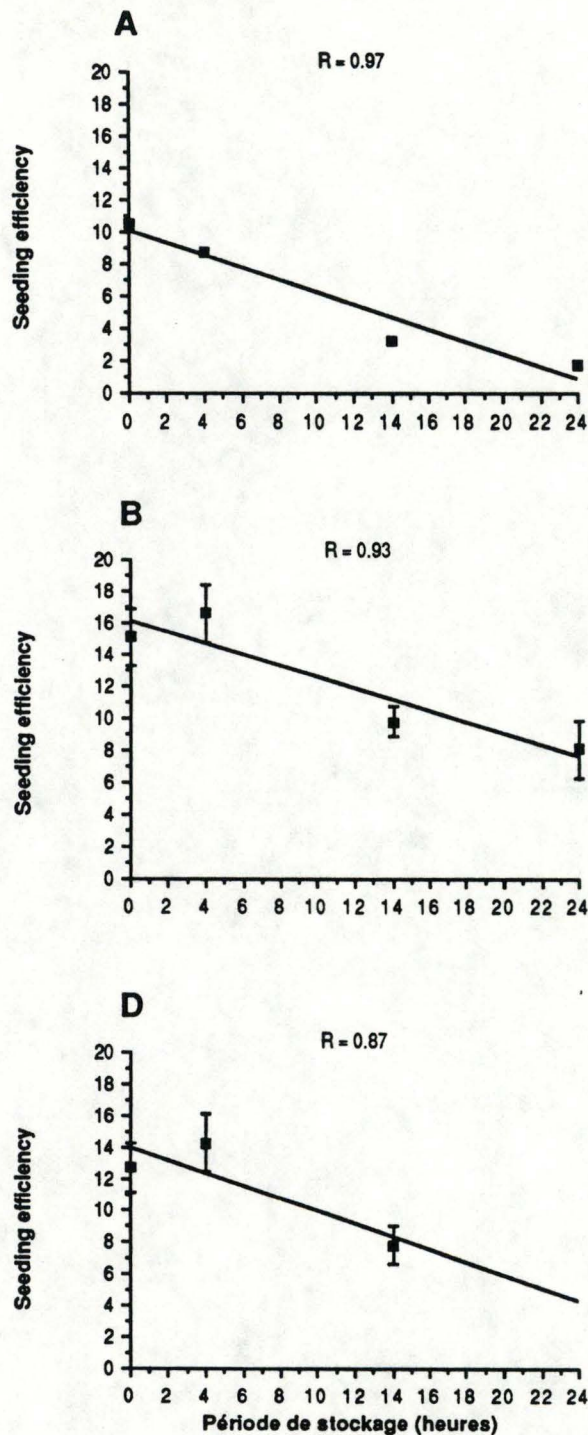


Fig. 2.6. : estimation de seeding efficiency sur des recultures des kératinocytes obtenus après dissociation par la trypsine de feuillets épidermiques

A : moyennes obtenues sur 2 cultures de kératinocytes provenant d'un seul épiderme de culture

B, D : moyennes et écarts-type obtenus, pour chaque temps testé, à partir de 9 recultures de kératinocytes réalisées au départ de 3 feuillets épidermiques différents.

Remarque : valeur du seeding efficiency après 24 heures de mise en attente non déterminée pour l'expérience D.

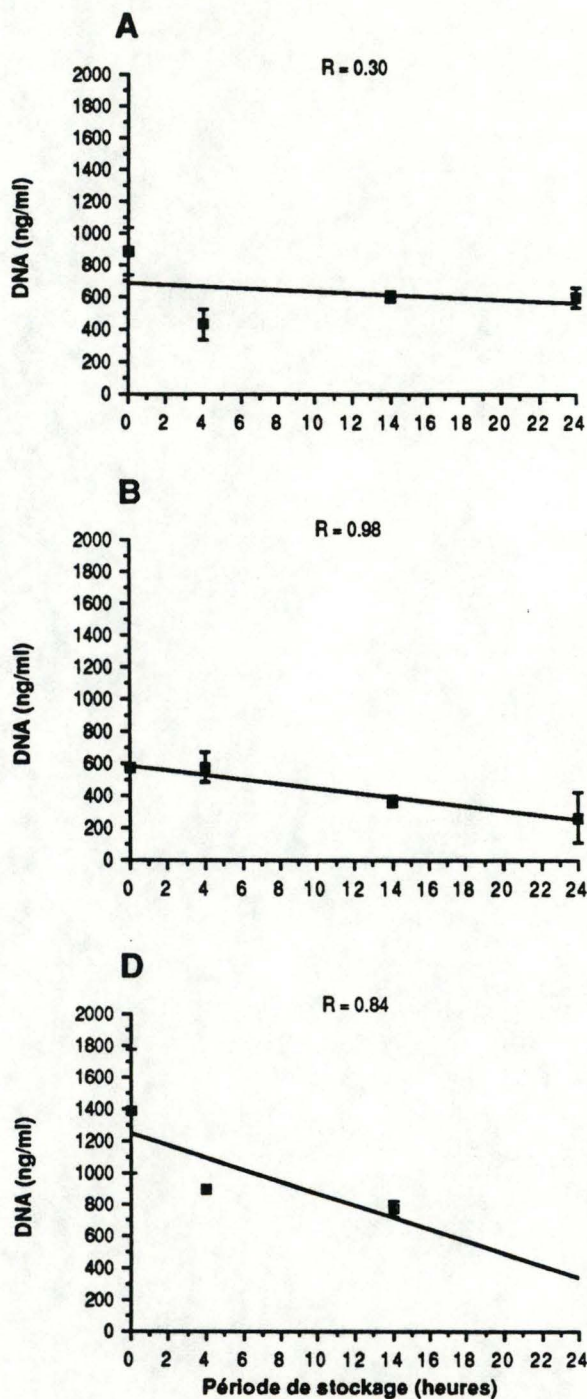


Fig. 2.7. : quantité de ADN cellulaire estimée sur des recultures de kératinocytes obtenus par dissociation du feuillet épidermique après dissociation à la trypsine
 A : moyennes et écarts-type évalués à l'aide de 3 recultures réalisées à partir d'un épiderme
 B et D : moyennes et écarts-type obtenus, pour chaque temps testé, à partir de 9 recultures réalisées au départ de 3 feuillets épidermiques différents.
 Remarque : valeur après 24 heures de mise en attente non déterminée dans l'expérience D

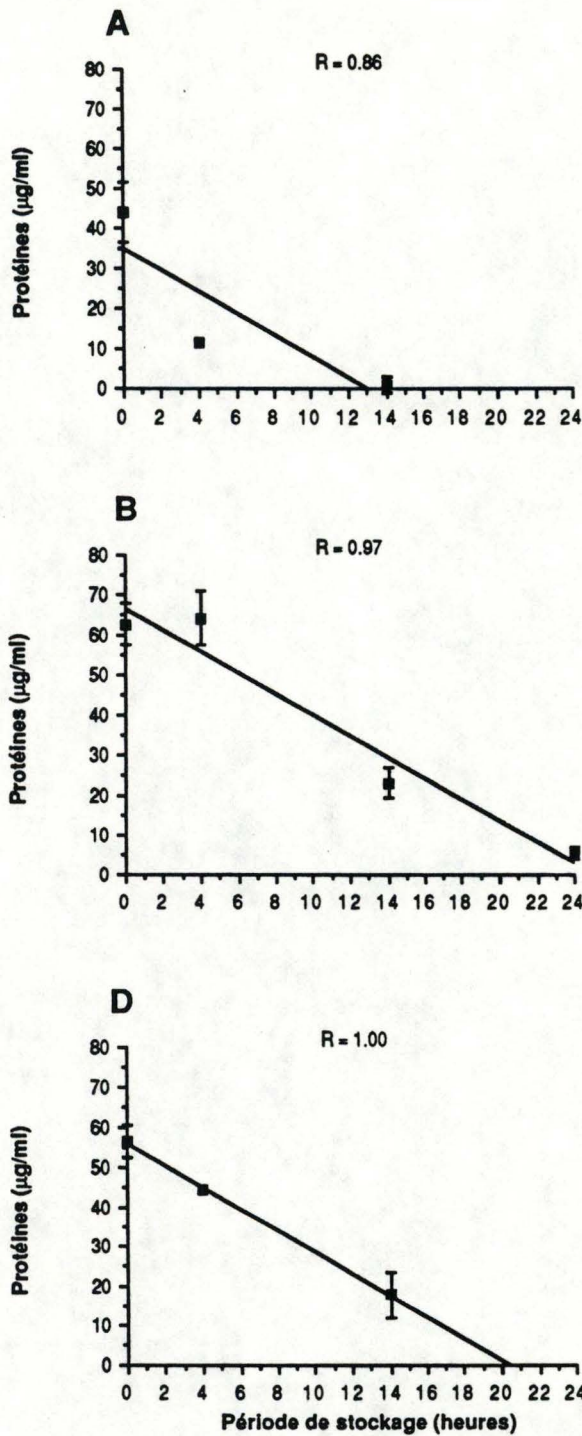


Fig. 2.8. : quantité des protéines cellulaires estimées sur des recultures de kératinocytes obtenus par dissociation du feuillet épidermique
 A : moyennes et écarts-type évalués à l'aide de 3 recultures réalisées à partir d'un épiderme
 B, D : moyennes et écarts-type estimés, pour chaque temps testé, à partir de 9 recultures réalisées au départ de 3 feuillets épidermiques différents.

Remarque : valeur après 24 heures de mise en attente non déterminée dans l'expérience D

de 4 h pour l'expérience A semble avoir été sous-estimée (suite à la surestimation de N.C.G probablement).

Remarque: nous n'avons pas de valeurs concernant le dosage après 24 h de mise en attente dans l'expérience D. Cette indétermination étant due à une contamination bactérienne de la reculture.

Le labelling index a été déterminé de deux manières différentes, soit par marquage à la BrdU des cellules provenant des greffons dissociés et réensemencés sur couvre-objets (fig. 2.9.), soit par marquage au niveau du greffon lui-même (fig. 2.10.).

Dans les deux cas, nous observons une baisse très importante dans le nombre de cellules marquées à la BrdU (aucune cellule positive après 24 h de mise en attente de l'épiderme) ainsi qu'une grande variation dans le nombre de kératinocytes ayant incorporé le marqueur suivant l'expérience envisagée. Cela est probablement la conséquence de l'utilisation de 4 souches cellulaires différentes.

La relation que l'on peut mettre en évidence entre le labelling index et la durée de stockage est de type logarithmique avec une baisse déjà très marquée entre 0 et 4 h au niveau de l'expérience C et D (baisse de 50%).

D'un point de vue morphologique, le marquage réalisé sur le greffon se localise essentiellement au niveau des cellules basales et parfois suprabasales avec une intensité dépendante du taux d'incorporation (fig.2.11.).

Au niveau des couvre-objets, le marquage est nucléaire et se localise non seulement sur les cellules faisant partie des colonies (fig. 2.12. B et C) mais également sur des cellules isolées (fig. 2.12. A) contrairement au fait observé par Karasek (1983). En effet, celui-ci estime que les cellules doivent se rassembler par 4 ou 5 avant que la réplication de l'ADN ne puisse devenir effective.

Remarque : nous n'avons envisagé que l'origine des souches cellulaires employées comme source de variabilité. Cependant, il est évident que le comptage des cellules composant le greffon à l'aide de l'hémocytomètre n'est pas une technique très précise (risque de compter plusieurs fois la même cellule, possibilité d'agrégats cellulaires où la distinction des différentes cellules n'est pas toujours possible, les 100 cellules/0,1 μ l requises en théorie afin que le comptage soit fiable ne sont pas toujours observables au niveau de l'hémocytomètre). Or, si la détermination du nombre de cellules constituant le greffon se réalise avec une certaine imprécision, il est possible que les résultats qui en découlent montrent une certaine variabilité, puisque ce comptage détermine la précision de la quantité de cellules à réensemencer avant nos différents tests.

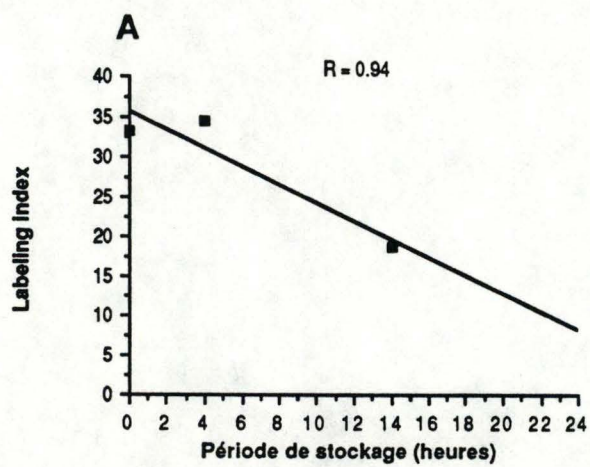


Fig. 2.9. : labelling index déterminé par l'incorporation de BrdU par des kératinocytes obtenus lors de la dissociation à la trypsine d'un seul feuillet épithélial et remis en culture sur couvre-objets.

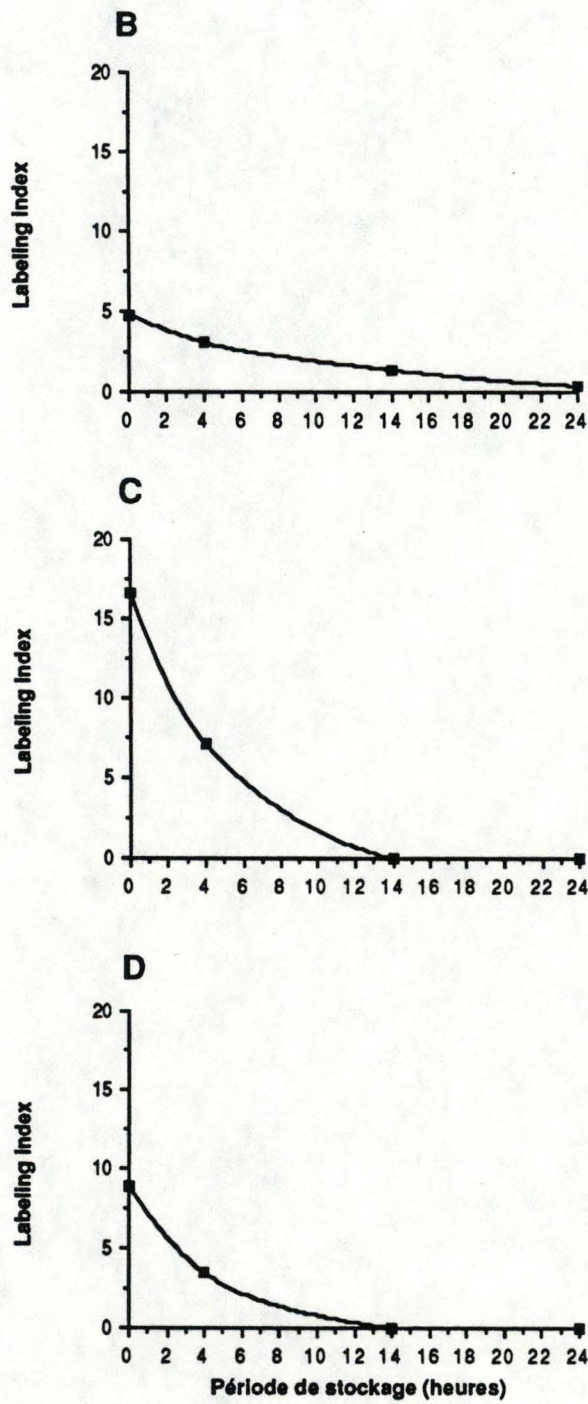


Fig. 2.10. : labelling Index déterminé lors de l'incorporation de BrdU par les cellules du feuillet épithélial non-dissocié



Fig. 2.11.: coupe transversale d'un épiderme de culture ayant incorporé de la BrdU (gross.540x)
Remarquons la localisation des cellules marquées au niveau de la couche basale et suprabasale.



Fig. 2.12 : photographie de cellules ensemencées sur couvre-objets :
 révélation en immunocytochimie de l'incorporation de BrdU
 et coloration nucléaire réalisée en présence de Hoechst
 33258.(gross. 570x)
 A et B : cellules observées au microscope à contraste de phase
 C : cellules observées au microscope à fluorescence (même plage
 que la photo B)

Après réalisation de ces différentes expériences, nous avons trouvé intéressant d'ouvrir une petite parenthèse dans ce travail afin d'envisager la possibilité une différence de comportement de l'épiderme de culture suivant que celui-ci ait été déposé sur un support fait d'N-terface ou de gaze vaselinée.

En fait, l'usage de la gaze vaselinée en tant que support des épidermes de culture est une pratique courante en milieu hospitalier (Gangolphe *et al.*, 1987; Faure *et al.*, 1987; Gallico *et al.* 1984).

Cependant, leur utilisation demande l'emploi d'agrafes qui vont se retrouver incrustées dans la peau du patient lors du processus de cicatrisation et qu'il sera ensuite nécessaire d'enlever. C'est pourquoi l'équipe médicale de l'Hôpital Militaire de Neder-over-Heembeek renonce tout à fait à l'emploi de ces gazes et cela en faveur de l'utilisation d'N-terface qui ne demande aucune technique de placement particulière et donc évite toute souffrance supplémentaire au patient.

4.1.3. COMPARAISON N-TERFACE & GAZE VASELINEE.

Afin de mettre en évidence une différence éventuelle entre ces 2 supports, nous avons réalisé le même type d'expérience que celles envisagées au paragraphe précédent. Cependant, nous avons déposé la moitié des épidermes réalisés sur N-terface alors que l'autre moitié est déposée sur gaze vaselinée.

Les résultats obtenus sont répertoriés dans les tableaux I A et B.

Nous ne pouvons mettre aucune différence significative en évidence concernant le type de support utilisé mise à part la détermination du nombre de cellules composant le greffon. Cela s'explique simplement par la présence, au niveau de la gaze, de vaseline qui a tendance à faire adhérer les cellules au support. De ce fait, nous récoltons beaucoup moins de cellules lors de la trypsinisation. Nous pouvons également observer une variation des valeurs obtenues suivant l'expérience envisagée. De nouveau cette variation est peut-être due à l'origine différente des souches utilisées. La variation observée entre les expériences au niveau du labelling index est simplement le résultat du fait que dans l'expérience A, le labelling index a été déterminé sur reculture de kératinocytes dissociés alors qu'il a été établi au niveau des cellules du greffon dans l'expérience B, ce qui représente 2 tests très différents.

On peut en déduire que le type de support utilisé, que ce soit gaze vaselinée ou N-terface, n'interfère donc en rien dans la "qualité" du greffon.

C'est pourquoi le choix du support devra se faire en fonction du bien-être désiré pour le patient.

Au vu des résultats précédents, les effets négatifs du stockage des greffons semblent réels et suggèrent que 14 et 24 heures d'attente produisent un "affaiblissement" important de la population cellulaire constituant les greffons. Par ailleurs, les effets produits après ces temps prolongés sont certainement prépondérants dans la signification observée par les tests statistiques.

Au cours des expériences suivantes, nous avons recherché si les mêmes effets existaient pour des temps de stockage plus courts correspondant à l'utilisation du greffon dans la journée de son détachement, c'est-à-dire 4, 6 et 8 h. Nous attendant à des différences moindres, nous avons ajouté à nos expériences 3 tests sensibles permettant d'estimer la prolifération des cellules composant les greffons : l'incorporation totale de thymidine tritiée, la détermination systématique du labelling index par incorporation de BrdU et le marquage immunocytochimique d'un

	DNA (ng/ml)	
	N-terface	Gaze vaselinée
0 h	885,16	885,16
4 h	431,26	1237,00
14 h	608,36	657,60
24 h	603,66	236,60

	Protéines (µg/ml)	
	N-terface	Gaze vaselinée
0 h	43,86	43,86
4 h	11,51	18,32
14 h	0,97	5,55
24 h	0,00	0,08

	Thymidine(CPM/µgprot.)	
	N-terface	Gaze vaselinée
0 h	242,99	242,99
4 h	314,99	370,23
14 h	207,48	151,78
24 h		

	nb. cellules/greffon	
	N-terface	Gaze vaselinée
0 h	9,8 10 ⁶	9,8 10 ⁶
4 h	4,8 10 ⁶	2,7 10 ⁶
14 h	3,9 10 ⁶	3,1 10 ⁶
24 h	4,0 10 ⁶	2,5 10 ⁶

	% cellules mortes	
	N-terface	Gaze vaselinée
0 h	7,5	7,5
4 h	7,0	19,0
14 h	23,0	19,0
24 h	19,0	33,0

	Labeling Index	
	N-terface	Gaze vaselinée
0 h	34,3	34,3
4 h	19,0	34,6
14 h	16,4	18,7
24 h	0,0	0,0

	seeding efficiency	
	N-terface	Gaze vaselinée
0 h	10,5	10,5
4 h	8,8	11,9
14 h	3,2	3,9
24 h	1,7	2,8

Tableau I : comparaison de résultats obtenus lors d'expériences réalisées sur des épidermes de culture mis en attente soit sur N-terface, soit sur gaze vaselinée
A : résultats exprimés en moyennes obtenues sur 3 épidermes de culture

	DNA (ng/ml)	
	N-terface	Gaze vaselinée
0 h	569,8	569,8
4 h	576,2	547,2
14 h	366,0	398,0
24 h	264,4	400,8

	Protéines (µg/ml)	
	N-terface	Gaze vaselinée
0 h	62,6	62,6
4 h	64,2	57,6
14 h	23,2	8,2
24 h	5,6	5,2

	nb cellules/greffon	
	N-terface	Gaze vaselinée
0 h	8,1 10 ⁶	8,1 10 ⁶
4 h	4,8 10 ⁶	4,4 10 ⁶
14 h	4,7 10 ⁶	2,9 10 ⁶
24 h	2,8 10 ⁶	1,5 10 ⁶

	% cellules mortes	
	N-terface	Gaze vaselinée
0 h	9,2	9,2
4 h	7,3	10,4
14 h	8,0	11,4
24 h	16,9	22,8

	Labeling Index	
	N-terface	Gaze vaselinée
0 h	4,8	4,8
4 h	3,1	2,6
14 h	1,4	0,4
24 h	0,4	0,4

	% cellules lysées	
	N-terface	Gaze vaselinée
0 h	6,8	6,8
4 h	33,9	37,5
14 h	46,2	75,0
24 h	61,9	38,9

	Seeding Efficiency	
	N-terface	Gaze vaselinée
0 h	15,1	15,1
4 h	16,6	15,0
14 h	9,8	6,9
24 h	8,1	6,2

Tableau I : comparaison de résultats obtenus lors d'expériences réalisées sur des épidermes de culture mis en attente soit sur N-terface, soit sur gaze vaselinée

B : résultats exprimés en moyennes obtenues, pour chaque temps testé, sur 9 recultures réalisées à partir de 3 feuillets épidermiques différents.

antigène nucléaire associé aux cellules en prolifération (Ki67), afin de déterminer la proportion des cellules exprimant cet antigène.

4.1.4. EVALUATION DES EPIDERMES DE CULTURE APRES DES TEMPS DE MISE EN ATTENTE ALLANT DE 0 A 8 HEURES.

Pour étudier cet aspect du problème, nous avons réalisé une série de greffons selon la méthode de Green sur lesquels nous avons réalisé, comme précédemment, deux types d'expériences :

La première série d'expériences est réalisée sur l'épiderme lui-même (N.C.G., pourcentage de cellules mortes, libération de LDH).

La deuxième série d'expériences est réalisée sur les recultures de kératinocytes obtenus par dissociation de l'épiderme de culture. Nous réensemencions ainsi, pour chaque temps étudié et pour chaque quantification réalisée, 9 puits de "multi-dish" avec les cellules obtenues au départ de 3 greffons. Cela permet à nouveau d'étudier l'effet de la mise en attente de l'épiderme de culture mais aussi d'étudier la variabilité inhérente à cet épiderme. Cette série d'expériences comprend le dosage de protéines, l'incorporation de ^3H -thymidine, la détermination du L.I. et le marquage avec l'anticorps Ki67.

Ici aussi, différentes expériences ont été réalisées à partir des mêmes greffons : -N.C.G.

- pourcentage de cellules mortes
- dosage de protéines
- L.I.
- marquage au Ki67
- incorporation de ^3H -thymidine.

Seule l'observation quantitative a été réalisée.

La détermination du nombre de cellules constituant le greffon montre une diminution de ce nombre au fur et à mesure que la mise en attente de l'épiderme devient plus importante (Fig. 3.1.).

L'analyse statistique nous indique une différence hautement significative entre les moyennes. En fait, on se trouve de nouveau face à une baisse plus importante du N.C.G. entre 0 et 4 h d'attente par rapport à celle observée entre 4 et 6-8 h.

Le pourcentage de cellules mortes quant à lui montre de nouveau une grande variabilité (fig. 3.2.) accompagnée d'écarts systématiques à la droite en F et I (coefficient de corrélation faible).

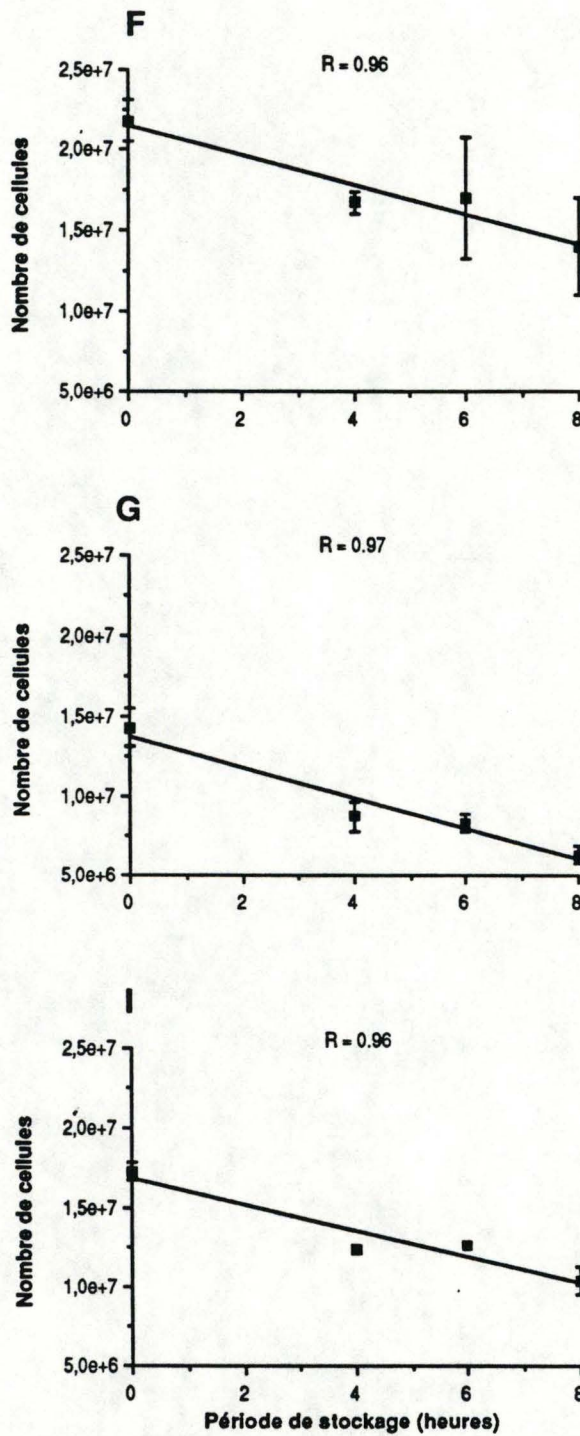


Fig. 3.1. : détermination du nombre de cellules constituant le feuillet épithélial après dissociation de ce dernier à la trypsine. Moyennes et écarts-type obtenus après dissociation de 3 épidermes de culture.

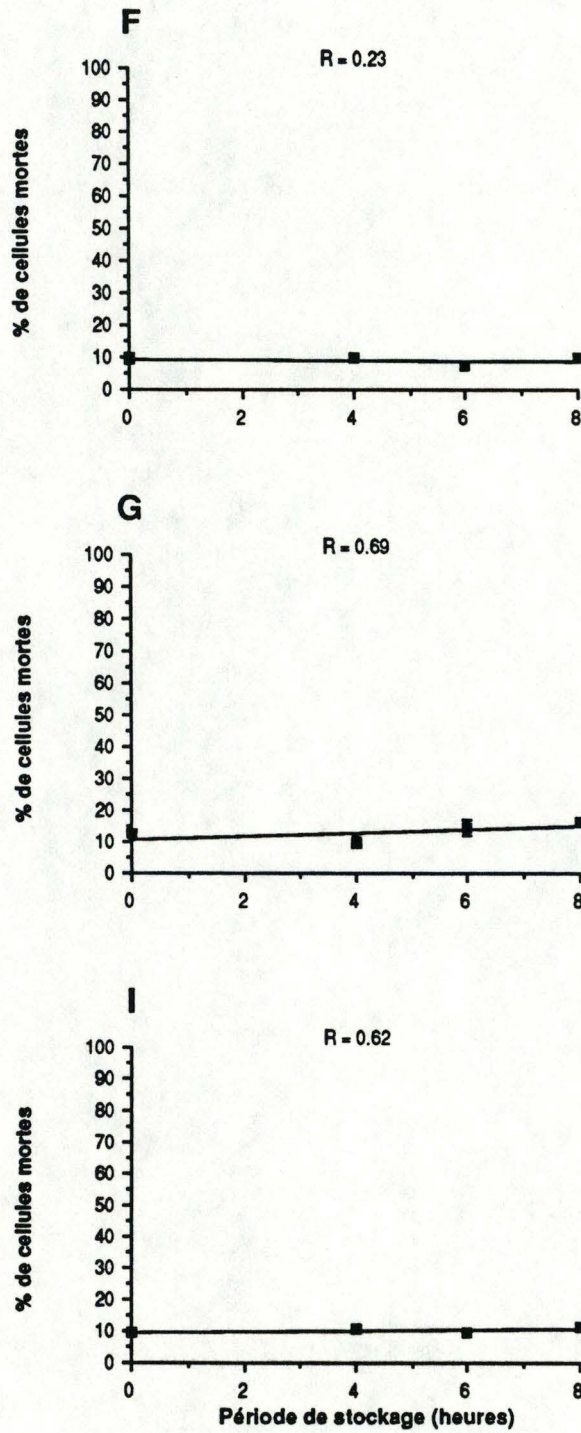


Fig. 3.2. : pourcentages de cellules mortes obtenues après dissociation à la trypsine de 3 épidermes de culture (moyennes et écarts-type)

L'analyse statistique révèle une action significative du temps dans l'expérience G alors qu'elle est non significative dans les expériences F et I.

Les graphiques de ces deux dernières expériences montrent en fait des écarts systématiques à la droite (fig. 3.2. F et I) alors que l'expérience G, où l'on a pu démontrer un effet du temps sur le pourcentage de cellules mortes, montre une baisse de ce pourcentage entre 0 et 4 h, pourcentage qui connaît ensuite une hausse jusque 8 heures (Fig. 3.2. G).

La libération de LDH se fait progressivement au cours du temps (on assiste en moyenne, entre 0 et 8 heures d'attente, à une hausse allant de 10 à 40 % de cellules lysées). Nous constatons donc une action hautement significative du temps sur la perméabilisation membranaire (Fig. 3.3.). La relation se présente ici sous forme linéaire alors que, lorsqu'on envisageait des durées de stockage allant jusqu'à 24 heures, nous nous trouvions face à une courbe de saturation. Nous nous situons donc probablement ici dans la phase ascendante du phénomène observé précédemment.

La pente de la droite représentant la concentration en protéines de la culture au cours du temps est quasiment nulle (Fig. 3.4.), des écarts systématiques à la droite peuvent être observés dans les différentes expériences.

L'analyse statistique nous révèle une action significative du temps sur le contenu en protéines des différentes cultures dans les expériences G et I alors qu'aucune action du temps n'a pu être mise en évidence dans l'expérience F. Elle nous révèle également l'existence d'une variabilité hautement significative inhérente aux greffons. Cela signifie que cette variabilité est susceptible de masquer l'éventuel effet du temps, trop faible dans ces conditions.

La détermination du L.I. nous montre une relation linéaire négative entre le pourcentage de cellules marquées et la durée de mise en attente du greffon (Fig 3.5.).

Les statistiques révèlent une action hautement significative du temps sur la capacité de prolifération des kératinocytes selon ce test.

Le marquage des cellules par le Ki67 montre le même type de relation que celui enregistré au niveau du L.I. mise à part une baisse du taux de marquage sensiblement plus importante entre 0 et 4 h de mise en attente qu'entre 4 et 6-8 h (Fig. 3.6.).

L'observation microscopique des marquages réalisés au Ki67 nous montre que celui-ci peut tout aussi bien avoir lieu au sein de cellules faisant partie d'une colonie qu'au niveau d'une cellule isolée (fig. 3.7.).

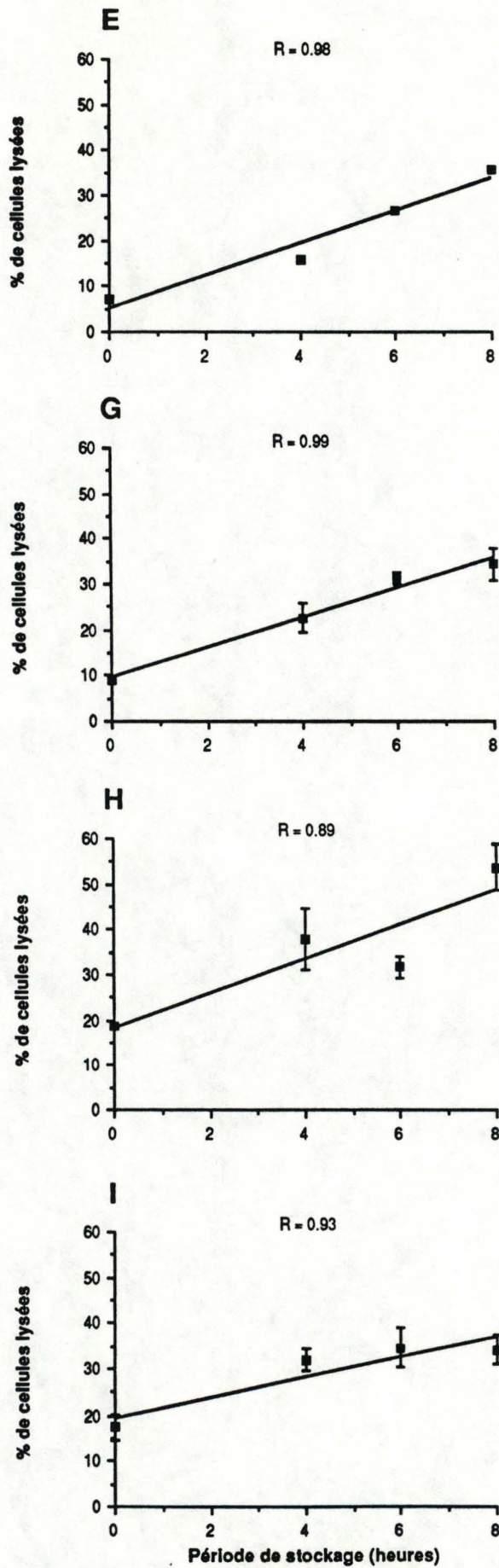


Fig. 3.3. : détermination du pourcentage de lyse cellulaire que subit l'épiderme durant sa mise en attente
 E : moyennes obtenues sur 2 épidermes de culture
 G, H, I : moyennes et écarts-type obtenus sur 3 feuillets épidermiques

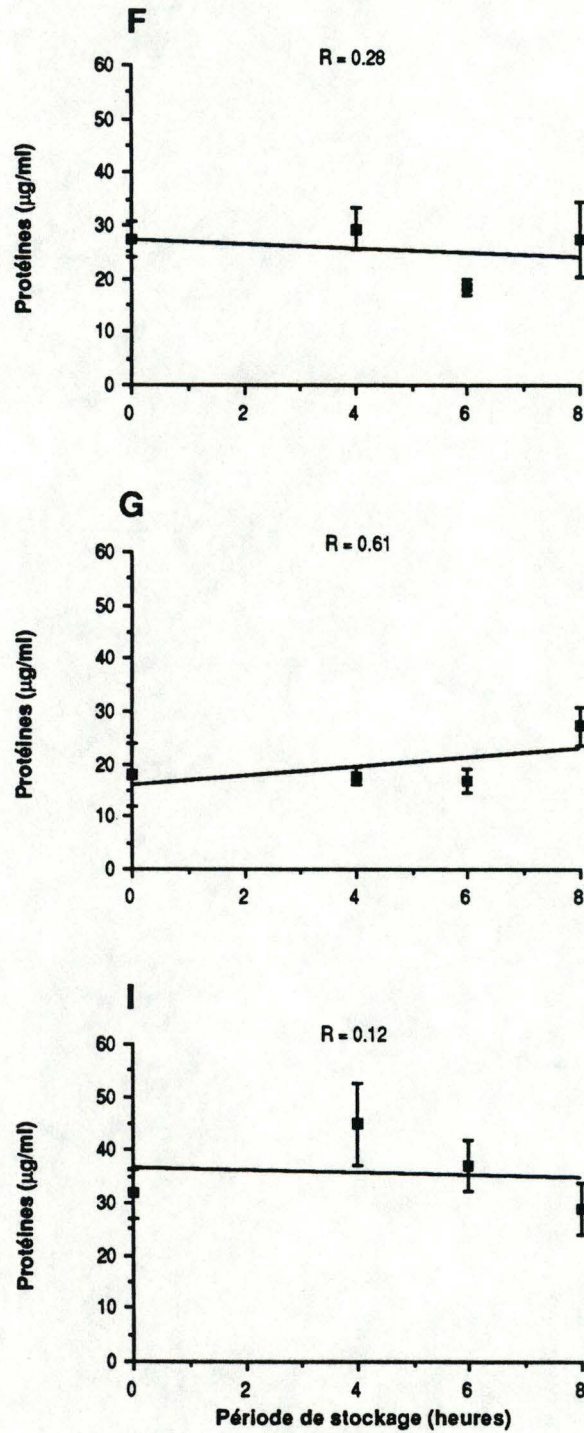


Fig. 3.4. : quantité de protéines cellulaires au sein des recultures de kératinocytes issus de la dissociation de feuillets épidermiques. Les résultats sont exprimés en moyennes et écarts-type obtenus, pour chaque temps testé, à partir de 9 recultures réalisées au départ de 3 feuillets épidermiques différents.

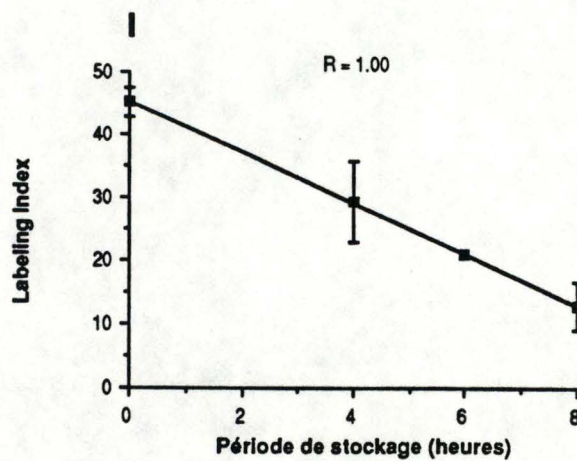
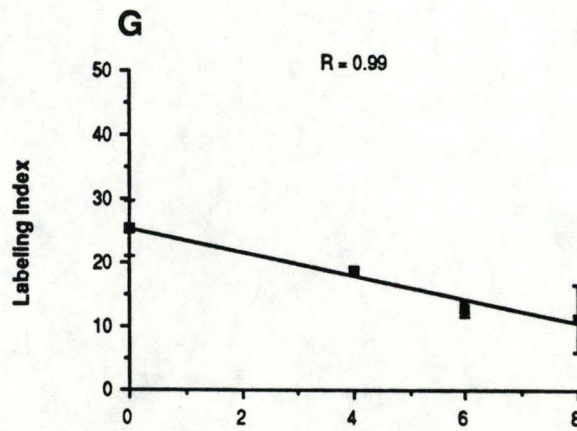
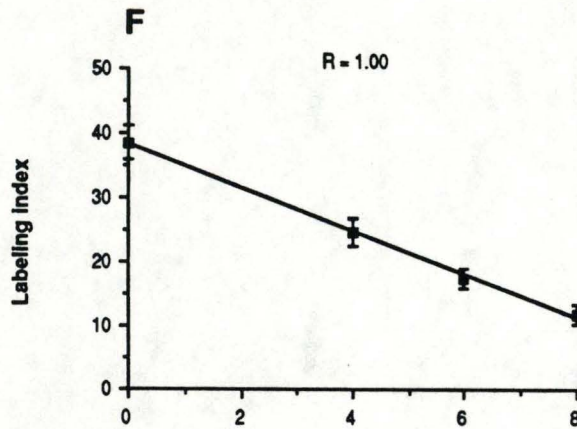


Fig. 3.5. : labelling index déterminé par incorporation de BrdU par des recultures de kératinocytes obtenus lors de la dissociation des feuillets épithéliaux, cultures réalisées sur couvre-objets. Les résultats sont exprimés en moyennes et écarts-type obtenus sur 3 épidermes de culture

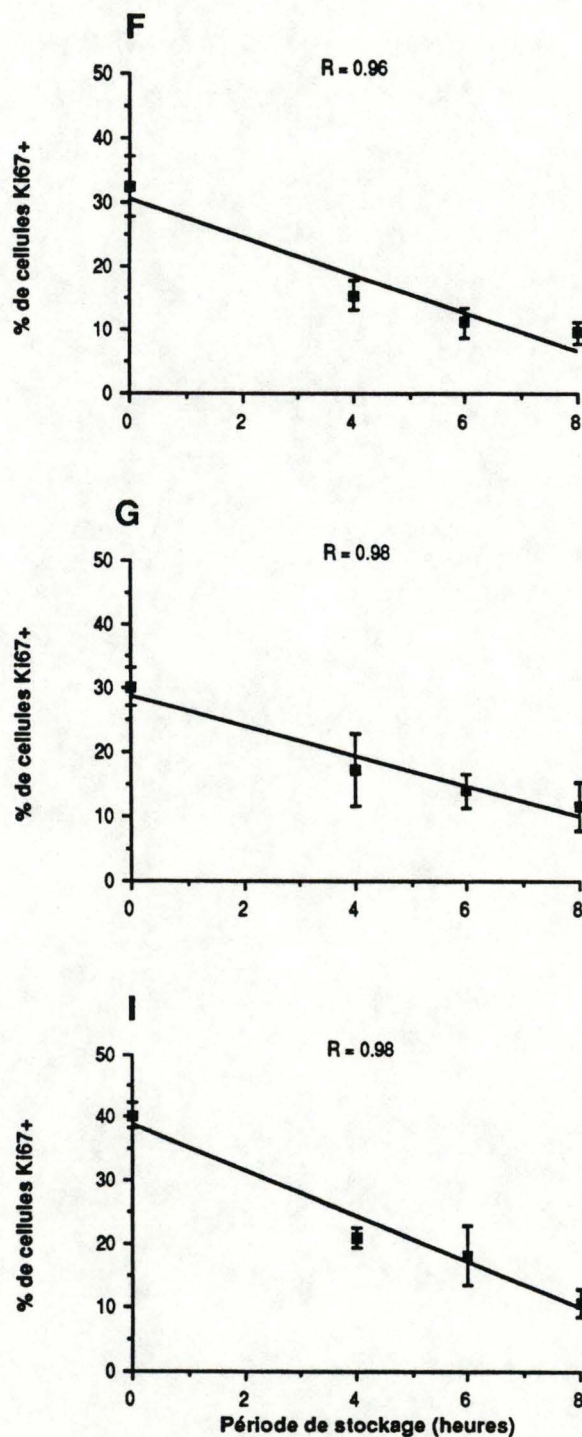


Fig. 3.6. : résultats concernant le marquage, à l'aide de l'anticorps Ki67, de kératinocytes réensemencés à partir du feuillet épidermique dissocié à la trypsine. Ils sont exprimés en moyennes et écarts-type obtenus, pour chaque temps sorti, à partir de 3 épidermes de culture.

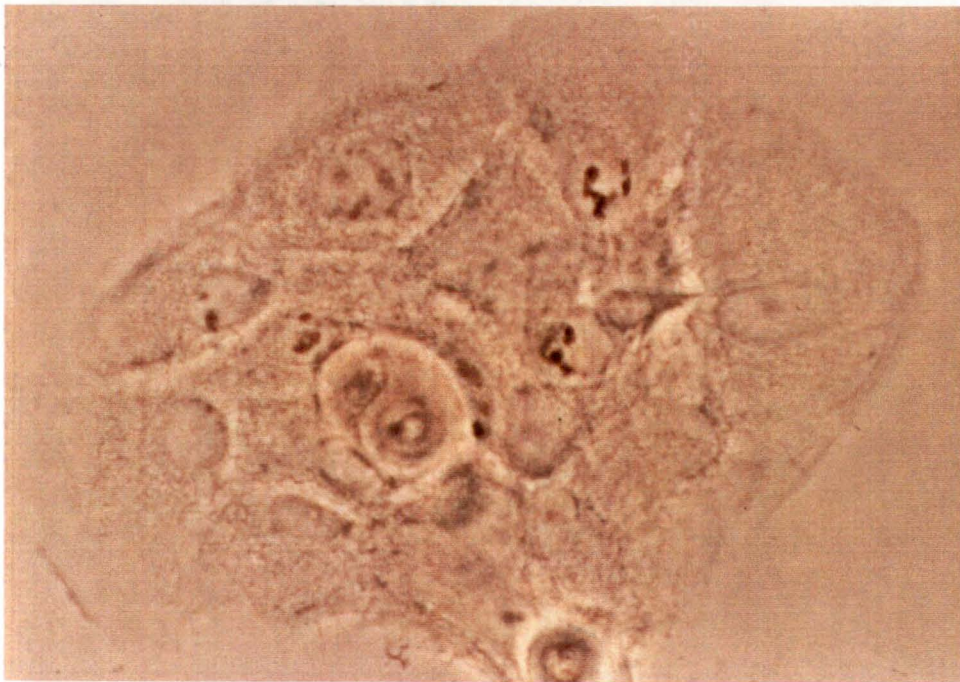
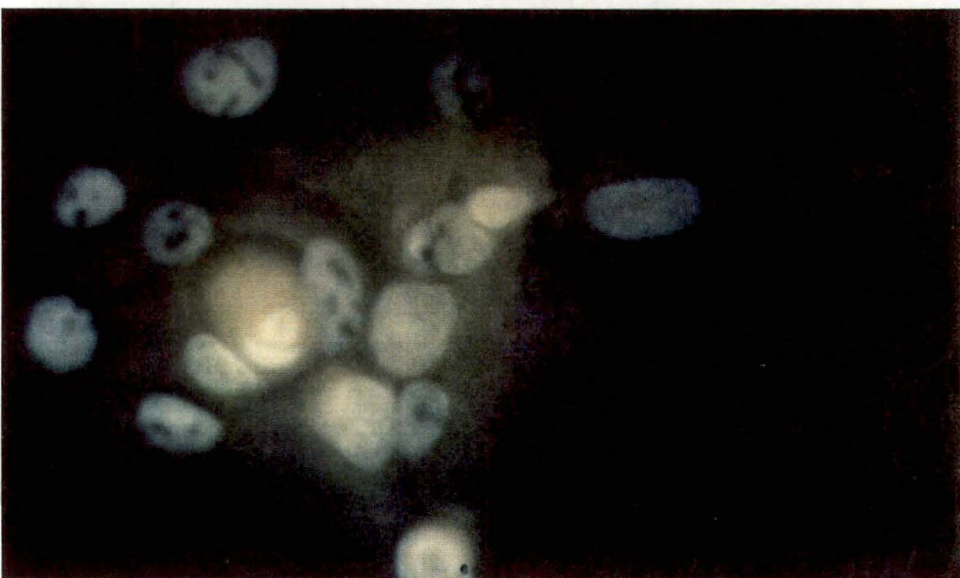
A**B****C**

Fig. 3.7. : colonie cellulaire : révélation en immunocytochimie du marquage réalisé à l'aide de l'anticorps ki67.et coloration nucléaire réalisée en présence de Hoechst 33258.(gross. 570x)
 A, B : observation au microscope à contraste de phase
 C : observation au microscope à fluorescence

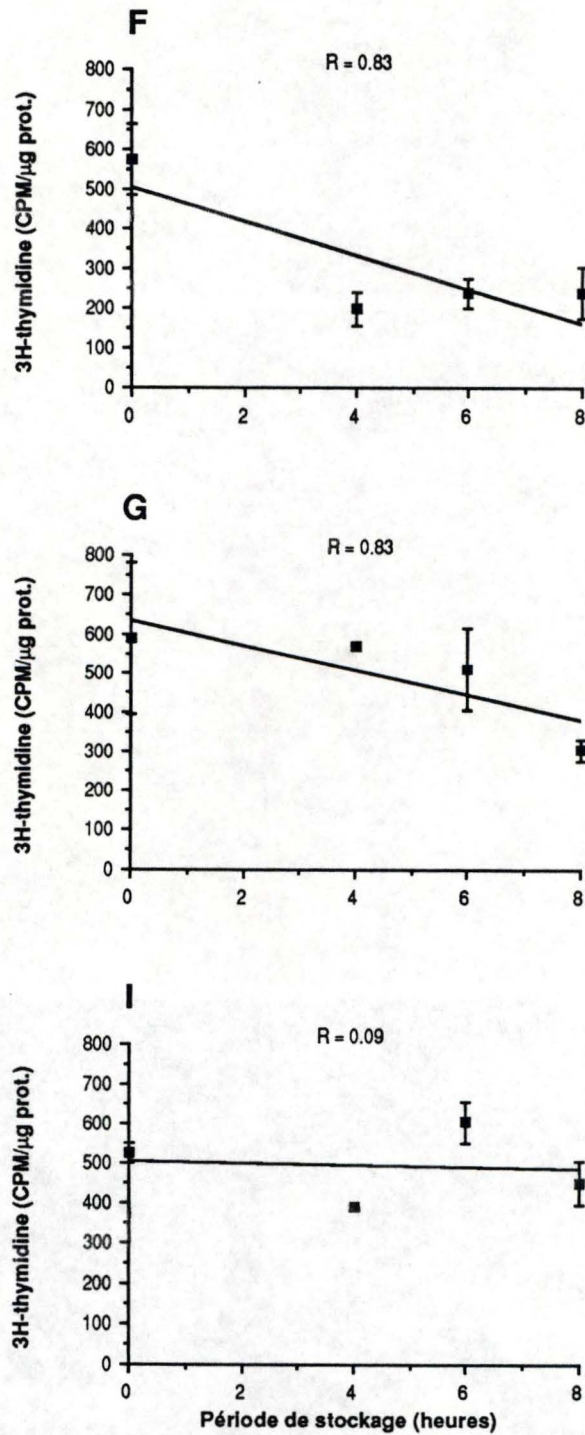


Fig. 3.8. : mesure du taux d'incorporation de thymidine tritiée par des kératinocytes obtenus par dissociation du feuillet épidermique et réensemencés.
 Les résultats sont exprimés en moyennes et écarts-type obtenus sur 9 recultures de kératinocytes réalisées au départ de 3 épidermes différents.

L'incorporation de BrdU se situe au niveau du noyau (fig. 2.12.) alors que le marquage par le Ki67 se fait principalement au niveau des nucléoles mais peut aussi, quoique très rarement, être distingué au niveau cytoplasmique (non illustré).

L'incorporation de ^3H -thymidine montre une très grande variabilité de résultat. L'effet du temps sur la capacité d'incorporation du marqueur par les kératinocytes est soit significatif dans l'expérience G (Fig. 3.8. G) soit hautement significatif dans les expériences F et I (Fig. 3.8. F, I). Cependant, la variabilité inhérente aux greffons est dans chaque expérience hautement significative. Donc, de nouveau ici, nous pouvons avoir un masquage de l'effet éventuel du temps par la variabilité concernant les greffons.

Cette indétermination nous semble assez logique car l'incorporation de ^3H -thymidine est exprimée en CPM/ μg prot.. Or, le dosage des protéines montre également une grande variabilité dans ces résultats.

Afin d'avoir une vue générale des résultats obtenus lors de l'évaluation des épidermes de culture mis en attente durant des périodes allant de 0 à 24 heures, nous avons réalisé 2 tableaux reprenant la moyenne des résultats obtenus dans les 2 séries d'expériences effectuées exprimées en comparaison des "valeurs contrôles" elles-mêmes fixées à 100 % (tableau II A et B)(Rem : % de viabilité = 100-% de cellules lysées)

Le tableau rassemblant les résultats obtenus après les temps d'attente allant jusque 24 heures nous montre une tendance à la baisse, que ce soit dans le contenu cellulaire de la reculture, dans la capacité à proliférer des cellules constituant le greffon ou dans la viabilité de ces mêmes cellules.

Le tableau concernant les temps d'attente allant jusque 8 heures montre également une tendance à la diminution des différentes propriétés cellulaires envisagées. Cependant, et fort naturellement, cette tendance est moins importante que pour les temps allant jusque 24 heures.

(Rappelons que les résultats obtenus pour les protéines dans le tableau B ne sont pas significatifs).

	0 h	4 h	14 h	24 h
nb cellules /greffons %	100	69	65	53
viabilité %	100	64	51	48
S.E.%	100	100	52	35
L.I.%	100	49	10	3
DNA %	100	72	63	57
Protéines %	100	69	24	23

	0 h	4 h	6 h	8 h
nb cellules /greffons %	100	77	76	61
viabilité %	100	83	79	69
Ki67%	100	52	42	31
L.I.%	100	67	43	34
³ H-Thymidine%	100	68	80	59
Protéines %	100	116	92	110

Tableau II : tableau récapitulatif de tous les résultats obtenus exprimés en pour-cent du résultat témoin
A : résultats concernant le délai de mise en attente allant de 0 à 24 h
B : résultats concernant le délai de mise en attente allant de 0 à 8 h

4.2. DISCUSSION

4.2.1. ALTERATION CELLULAIRE DE L'ÉPIDERME DE CULTURE DÉTACHÉ DE SON SUBSTRAT ET MIS EN ATTENTE.

La mise en attente d'épidermes de culture détachés de leur substrat par incubation avec la dispase et transférés sur N-terface semble conduire à une "dégradation" progressive du feuillet épithélial. Celle-ci se traduit, dans les premières heures de stockage du greffon, principalement par une baisse sensible de la capacité des cellules à proliférer ainsi que par un taux de mortalité croissant. Une mise en attente prolongée provoque quant à elle une véritable altération cellulaire remarquable tant au niveau de l'étude morphologique du greffon (pycnose, vasculisation...) qu'au niveau de son étude physiologique (diminution de la capacité d'adhérence et de prolifération, taux de mortalité cellulaire dépassant les 60 %,...).

Comment pourrait-on expliquer cette altération cellulaire ?

Lorsqu'un épiderme de culture est mis en attente en vue d'une utilisation clinique ultérieure, il se retrouve dans une situation tout-à-fait contraire à celle que nous lui connaissons "in situ".

En effet, après avoir incubé l'épiderme de culture avec la dispase, nous déposons l'N-terface sur les couches superficielles du greffon, les bords de celui-ci étant ourlés autour de ce support. Ensuite nous décollons délicatement l'ensemble "greffon-support" du fond de la boîte de culture afin de transférer le tout dans une boîte de Pétri contenant le DMEM additionné d'antibiotiques.

Le stratum basal de notre épiderme de culture se retrouve donc sans aucun substrat auquel il puisse adhérer alors que les couches superficielles, qui normalement sont libres de desquamer, se retrouvent accolées à l'N-terface

Quelles sont les conséquences de cette situation particulière au niveau cellulaire ?

Lors de nos expériences, nous avons pu mettre en évidence trois constatations importantes. Nous assistons tout d'abord à une diminution de la capacité à proliférer des cellules constituant le feuillet épithélial suite à une attente prolongée. Nous remarquons également une altération cellulaire précoce se traduisant non seulement au niveau morphologique mais aussi lors de la détermination du seeding efficiency ou du contenu en matériel cellulaire de la reculture (dosage de protéines et ADN). Enfin,

nous assistons à une lyse croissante mais limitée dans le temps (courbe de saturation) des cellules composant le greffon.

Afin de trouver une explication plausible à ces constatations, nous nous sommes basés sur un ensemble d'observations réalisées tant *in vivo* que *in vitro* lors de modifications de composition du milieu extracellulaire. Mais avant de nous étendre sur les conséquences d'une modification de l'environnement cellulaire des kératinocytes de la couche basale, modification qui implique des variations de la concentration extracellulaire apparente en calcium lors du détachement (nous allons y revenir), il nous faut avant tout évoquer la disparition du support rigide des cellules basales. Dès leur détachement, les feuillets épithéliaux se rétractent et s'enroulent sur eux-mêmes (Green *et al.*, 1979). Sans ancrage, les cellules prennent une forme sphérique (par exemple dans une suspension cellulaire après trypsinisation, lors d'un repiquage) et il semble que les kératinocytes de la couche basale cherchent, lorsque le feuillet cellulaire est détaché, à prendre une forme la plus symétrique possible autour de leur noyau plutôt que de rester étalés comme pendant leur ancrage au substrat. On sait à ce propos que les cellules 3T3 voient leur cycle cellulaire bloqué (notamment la phase S mesurée par incorporation de thymidine ou de BrdU), lorsque celles-ci sont détachées de leur substrat (Campisi & Medrano, 1983) et que de plus la grandeur de la surface d'attache de ces cellules peut moduler directement leur prolifération (O'Neill *et al.*, 1986). Il est possible que, de façon similaire, le détachement des kératinocytes perturbe complètement leur prolifération, conduisant aux résultats que nous avons obtenus, mais ceci est insuffisant pour expliquer les phénomènes de lyse cellulaire et de diminution du "seeding efficiency" observés dans nos expériences. On peut dès lors penser que d'autres phénomènes existent, plus complexes et qui sont le résultat des modifications de l'environnement des kératinocytes de la couche basale. La modification principale que nous envisagerons ici est la variation de concentration en calcium extracellulaire.

4.2.1.1. Hypothèse concernant le processus de différenciation du kératinocyte *in vivo*.

Les kératinocytes se multiplient dans l'assise basale de l'épiderme puis migrent dans les couches suprabasales en subissant des modifications structurales en rapport avec leur différenciation, c'est-à-dire leur maturation kératosique. Par ce processus, ils sont responsables de l'élaboration d'une couche cornée en surface à partir de laquelle ils desquament sous forme de lambeaux. De façon très schématique, le

kératinocyte est donc amené à proliférer pour ensuite, sous l'action d'un stimulus, se différencier et mourir.

Au vu de nos résultats nous pourrions nous demander si, en fait, nous n'assistons pas à un programme accéléré de différenciation et de mort cellulaire suite à la mise en attente de nos épidermes de culture détachés.

En fait la littérature s'est toujours beaucoup intéressée aux caractéristiques propres de la différenciation du kératinocyte (modulation des types de filaments intermédiaires exprimés, apparition de desmosomes, de grains de kératohyaline, épaissement de la membrane plasmique...), par contre la connaissance et la compréhension du processus enclenchant à la différenciation sont loin d'être élucidées.

Effet de la variation de concentration en calcium extracellulaire sur le processus de différenciation.

A l'heure actuelle, il est généralement admis que le taux de Ca^{++} extracellulaire $[Ca^{++}]_e$ est un facteur déterminant dans la mise en oeuvre du processus de différenciation bien qu'il ne soit certainement pas le seul à intervenir (Yuspa *et al.*, 1989).

En fait, un gradient de Ca^{++} libre tant intra- qu'extracellulaire a pu être mis en évidence, le stratum basal se trouvant au sein d'un milieu à faible concentration en Ca^{++} (Menon *et al.*, 1985) alors que les cellules les plus différenciées sont les plus riches en Ca^{++} intracellulaire $[Ca^{++}]_i$ (Yuspa *et al.*, 1989; Hennings *et al.*, 1989).

Cette constatation fut confirmée par les essais de mise en culture de kératinocytes à des taux variables de $[Ca^{++}]_e$. Une culture de kératinocytes réalisée à faible concentration en $[Ca^{++}]_e$ voit la formation d'une monocouche cellulaire proliférante alors qu'une augmentation du taux de $[Ca^{++}]_e$ provoque un aplatissement des cellules accompagné d'une augmentation de jonctions intercellulaires ainsi que d'une stratification, la $[Ca^{++}]_i$ devenant elle aussi plus élevée (O'Keefe & Payne, 1983; Hennings *et al.*, 1989; Sharpe *et al.*, 1989).

Il est à noter que Pittelkow & Scott (1986) ont mis cette constatation à profit afin de mettre en oeuvre un processus de mise en culture de cellules épidermiques en vue d'obtenir un feuillet épithélial le plus apte possible à être utilisé en tant que "peau de remplacement" chez le brûlé. Il faut pour cela obtenir une surface épidermique la plus grande possible et cela dans les délais les plus brefs (croissance en faible concentration de Ca^{++}) mais montrant cependant un degré de différenciation proche du degré de différenciation existant *in vivo* (ajout de Ca^{++} au milieu de culture).

Mise en place du gradient de concentration.

Le mécanisme pouvant expliquer l'existence du gradient de Ca^{++} au niveau de l'épiderme reste méconnu. Une hypothèse a été proposée, considérant que la membrane basale est composée de protéines anioniques dotées d'une certaine affinité pour les ions calcium. Cela pourrait réduire la concentration apparente de $[Ca^{++}]_e$ au niveau de la couche basale. Par contre, au niveau des couches les plus superficielles, les cellules approchant de leur mort peuvent relarguer le Ca^{++} emmagasiné et participent ainsi à l'établissement du gradient ionique observé (Menon *et al.*, 1985; Yuspa *et al.*, 1989).

Remarquons que la réalisation du gradient en $[Ca^{++}]_e$, suspecté d'être responsable du processus de différenciation, demande certainement l'intervention d'autres mécanismes encore inconnus à l'heure actuelle.

Les résultats obtenus *in vitro* suggèrent que lorsque la cellule basale ressent la moindre modification de concentration du calcium se trouvant dans le milieu extracellulaire, cette cellule programme alors son détachement de la jonction épidermo-dermique ainsi que sa migration progressive dans les couches supérieures de l'épiderme. De façon concomitante se déroule le processus de différenciation.

Comment cette variation extracellulaire de la concentration en calcium peut-elle induire ce processus de différenciation ?

On sait depuis peu de temps que lorsque la cellule basale enregistre une variation de $[Ca^{++}]_e$, elle voit la relocalisation d'au moins deux de ses intégrines (récepteurs intervenant dans la liaison de la cellule à la matrice extracellulaire) l' $\alpha_3 \beta_1$ spécifique de la liaison à la molécule de laminine ainsi que l' $\alpha_2 \beta_1$ intégrine spécifique du collagène IV. En fait, lorsque la cellule se trouve au niveau du stratum basal, diverses intégrines dont l' $\alpha_3 \beta_1$ et l' $\alpha_2 \beta_1$ participent à l'ancrage de la cellule à la jonction épidermo-dermique. Lorsqu'un stimulus quelconque, en l'occurrence l'augmentation de $[Ca^{++}]_e$, se fait sentir, ces intégrines migreraient de la membrane basale vers les points de jonction existant entre les différentes cellules. Cette relocalisation entraînerait un détachement de la cellule de son substrat et favoriserait le contact intercellulaire entre les cellules suprabasales. Ce contact contribuant à la stratification de l'épiderme (Carter *et al.*, 1990).

Dès que la cellule a perdu les liens l'unissant à la jonction épidermo-dermique, elle devient libre de migrer dans les couches successives de l'épiderme pour enfin desquamer en surface. Cette migration entraîne une augmentation progressive de $[Ca^{++}]_i$ suite à l'augmentation de Ca^{++} enregistrée dans le milieu interstitiel (Hennings *et al.*, 1989).

Dans ce cas, le calcium peut jouer son rôle de messenger secondaire intracellulaire activant probablement une série d'enzymes nécessaires à la mise en oeuvre du processus de différenciation. Au niveau extracellulaire, le calcium permet également la formation de desmosomes ainsi que la relocalisation de la vinculine, molécule intervenant au niveau des plaques d'attache existant entre la cellule et la membrane basale et redistribuée vers les jonctions de type adhérents (O'Keefe *et al.*, 1987).

L'augmentation de calcium extracellulaire entraîne également une diminution du taux maximal de fixation possible de l'EGF à son récepteur cellulaire (une diminution du taux de Ca^{++} présent dans le milieu de culture augmentant d'un facteur 5 le nombre de récepteurs à l'EGF présents) (O'Keefe & Payne, 1983).

Tous ces événements moléculaires sont donc le résultat d'une concentration croissante de Ca^{++} résultant de la migration progressive de la cellule vers le haut des couches cellulaires épidermiques.

Généralement, la cellule est capable de se protéger des variations de concentration en calcium du milieu externe grâce à des processus de régulation. Ces processus semblent cependant permettre des variations essentielles capables de contrôler la physiologie du kératinocyte comme des autres cellules de l'organisme. Celui-ci voit en effet sa concentration en Ca^{++} cytosolique augmenter suite à l'augmentation du taux de calcium extracellulaire (Sharpe *et al.*, 1989).

Nous pouvons donc imaginer, par analogie à ce qui se passe *in vivo* que lors du détachement de l'épiderme de culture par la dispase, les cellules basales de celui-ci se retrouvent brusquement au voisinage de leur face basale en présence d'une concentration apparente en calcium plus élevée que celle qu'elles connaissaient auparavant.

On peut également supposer que pour que la différenciation soit naturelle et progressive, il est nécessaire que le gradient de Ca^{++} le soit également.

Or, lors du détachement de notre épiderme de culture de son substrat, le stratum basal passe brusquement d'une concentration en Ca^{++} local probablement assez faible à une concentration beaucoup plus élevée. Il semble donc possible que le kératinocyte ainsi détaché subisse les modifications classiques accompagnant l'augmentation de Ca^{++} extracellulaire. Mais cette activation brutale, contrairement à ce qui se passe *in vivo*, n'entraîne-t-elle pas toute une série de modifications s'enclenchant en bloc de façon anarchique ? On peut le craindre.

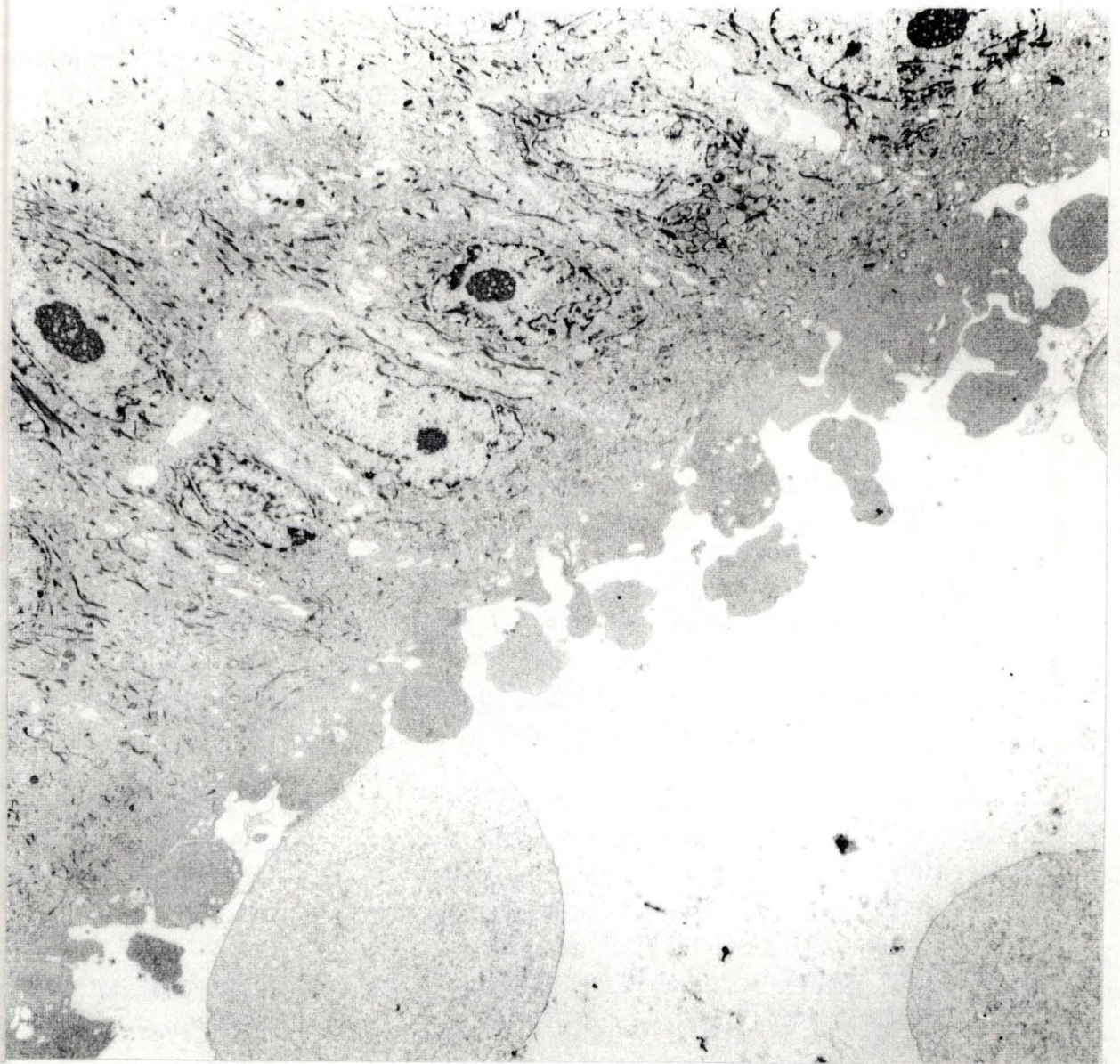


Fig. 3.9. : micrographie électronique réalisée au niveau de la couche basale de l'épiderme de culture après une mise en attente de 8 heures sur N-terface. (gross. 3300X)

4.2.1.2. Hypothèse concernant les conséquences que peut avoir une mise en attente prolongée d'un épiderme de culture après détachement.

Deux conséquences de cette brusque augmentation de $[Ca^{++}]_e$ sont à envisager : une augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ peut agir par une altération de composants du cytosquelette ainsi que par une modification de la constitution de la membrane cellulaire ou, comme nous l'avons déjà signalé, par une différenciation cellulaire provoquée peut-être trop brutalement.

Cytosquelette et intégrité membranaire.

Cytosquelette

En microscopie électronique nous avons pu mettre en évidence la formation de blebs au niveau de la membrane plasmique des cellules basales de l'épiderme (fig. 3.9). Ces blebs ont été également mis en évidence par Compton *et al.* (1989), blebs auxquels ils associent parfois de petites ruptures membranaires. Pour ces auteurs, ces évaginations membranaires sont des phénomènes réversibles apparus à la suite du détachement du feuillet épithélial de son substrat. Pour d'autres, le blebs serait un phénomène irréversible pouvant induire un dysfonctionnement voir même la mort de la cellule (Gipson *et al.*, 1983). Ces évaginations pourraient être en fait la conséquence d'une altération du cytosquelette, puisque la régulation structurale et fonctionnelle de ce dernier est elle-même dépendante de la présence de la $[Ca^{++}]$ (Sanderson, 1989).

On peut penser que si les filaments d'actine sont désorganisés comme le suggère la présence de blebs et si, de plus, le Ca^{++} active des enzymes protéolytiques peut-être capables d'agir sur des protéines comme la vinculine comme le suggèrent O'Keefe *et al.* (1987), la cellule ne pourra plus adhérer et ne pourra plus se multiplier. En effet, la division de la cellule dépend de son ancrage à un substrat, et cet ancrage se fait par l'intermédiaire de plaques d'attaches composées de protéines (fibronectine, taline, vinculine) auxquelles sont reliés les filaments d'actine (Alberts *et al.*, 1989).

Donc, si l'altération du cytosquelette est trop importante que pour être réversible, elle pourrait contribuer à l'explication de la diminution de capacité à proliférer des cellules provenant des épidermes dissociés lors de leur reculture, ainsi que de leur perte d'adhérence à un substrat (baisse sensible du seeding-efficiency).

Perméabilité membranaire.

L'entrée de calcium dans la cellule peut également activer les phospholipases, enzymes spécifiques des phospholipides membranaires. Nous pouvons alors assister à une déstabilisation éventuelle de la membrane cellulaire. L'activation spécifique de la phospholipase C quant à elle, conduit au clivage du phosphatidylinositol di-phosphate en inositol-triphosphate et diacylglycerol. L'inositol-triphosphate peut alors libérer le Ca^{++} contenu au niveau du réticulum endoplasmique et amplifier ainsi l'action du calcium d'origine extracellulaire.

La formation des blebs traduisant peut-être l'action des phospholipases sur les lipides membranaires prouvent la souffrance de la cellule. Il est donc très probable qu'une souffrance prolongée altère irrémédiablement la cellule et en provoque même la lyse. Cela expliquerait les résultats obtenus lors du dosage de l'activité LDH libérée par les cellules des feuillets épidermiques détachés.

D'autre part, nous avons remarqué lors de nos expériences que la viabilité cellulaire estimée par le dosage de la LDH diminuait moins rapidement au cours du temps que le pourcentage de cellules ayant incorporé la BrdU ou que le pourcentage de cellules présentant l'antigène nucléaire Ki67 (tests servant à estimer le taux de prolifération cellulaire). Cela peut suggérer que la souffrance cellulaire est ressentie d'une façon plus intense par les cellules capables de proliférer, c'est-à-dire par les cellules de la couche basale.

En effet, ces cellules encore non-différenciées sont à comparer avec les cellules des couches supérieures dont la membrane plasmique a déjà subi un épaississement caractéristique de leur différenciation (Faure *et al.*, 1987), cette dernière traduisant une augmentation préalable de la concentration en calcium cytosolique (Yuspa *et al.*, 1989). Ces cellules différenciées sont donc certainement peu perturbées par le détachement de la culture en comparaison des cellules basales.

Modification résultant d'une différenciation cellulaire trop brutale.

Comme nous l'avons signalé, l'augmentation de la concentration en $[\text{Ca}^{++}]_i$ semble être un événement décisif lors de l'initiation du processus de différenciation, cette augmentation devant être maintenue afin de permettre à la différenciation de se poursuivre.

Les caractéristiques morphologiques que présente une cellule lors de sa différenciation apparaissent progressivement, les premiers changements ayant lieu déjà 15 minutes après l'augmentation du taux de $[\text{Ca}^{++}]_i$, d'autres modifications apparaissant ensuite (O'Keefe *et al.*, 1987; Sharpe *et al.*, 1989).

Lorsque l'on reste dans des conditions semblables à celles rencontrées *in vivo* (épithélium adhérent à un substrat), l'augmentation "artificielle" *in vitro* de calcium du milieu extracellulaire reproduit plus ou moins fidèlement les conditions nécessaires à la différenciation observée *in vivo* (Yuspa *et al.*, 1989).

Par contre, si l'augmentation de calcium au niveau de la couche basale résulte du détachement de cette dernière par la dispase, le changement de concentration est peut-être trop brutal que pour permettre à la différenciation de se faire de façon adéquate.

Il est possible que la rupture de tout lien avec un substrat provoque une migration des intégrines au niveau des jonctions intercellulaires. Migration qui, si elle est irréversible, diminuera fortement la capacité de la cellule à adhérer de nouveau à un substrat. Ce phénomène, accompagné d'une protéolyse possible de la vinculine, notamment suite à l'activation de protéases calcium-dépendantes (O'Keefe *et al.*, 1987), peut expliquer la baisse du seeding-efficiency étudié sur les kératinocytes provenant de notre épiderme de culture après sa mise en attente.

De plus, ce détachement des cellules basales de tout support crée probablement un déséquilibre entre la différenciation provoquée par l'augmentation de Ca^{++} et la prolifération inhibée par le retrait de tout point d'attache à un substrat éventuel. Prolifération pouvant être également diminuée suite à une baisse de capacité de la cellule à répondre aux facteurs de croissance se trouvant dans le milieu. Rappelons qu'il a en effet été démontré qu'une faible concentration en calcium favorisait la mise en place des récepteurs à l'EGF au niveau de la membrane cellulaire (O'Keefe & Payne, 1983). Il est donc possible d'imaginer qu'une augmentation de la quantité de $[Ca^{++}]_e$ puisse diminuer la capacité de réponse des cellules à l'EGF et, pourquoi pas, à d'autres facteurs de croissance. Si, lors d'une mise en attente prolongée de notre épiderme de culture, ce phénomène devient irréversible cela peut expliquer, en accord avec la perturbation constatée au niveau du cytosquelette et discutée auparavant, la diminution de la capacité à proliférer de la cellule lors de sa remise en culture.

Toutes les constatations que nous avons faites suite à l'étude morphologique et quantitative de nos épidermes détachés et mis en attente durant des périodes variables pourraient donc s'expliquer par les conséquences que peut avoir une variation trop brutale de la concentration locale de calcium libre dans le milieu extracellulaire.

Cependant, il ne s'agit là que d'une hypothèse qui demande des confirmations expérimentales.

4.2.2. PERSPECTIVES EXPERIMENTALES.

4.2.2.1. Mesure de la variation de $[Ca^{++}]_i$

Puisqu'elle pourrait expliquer nos résultats, il serait intéressant à l'avenir de pouvoir confirmer l'hypothèse d'une variation de $[Ca^{++}]_i$ au niveau de la couche basale de l'épiderme de culture lors du détachement de ce dernier. La mesure directe du $[Ca^{++}]_i$ nous permettrait de détecter cette éventuelle augmentation au niveau des cellules basales de l'épiderme en effectuant des mesures avant et après le détachement de ce dernier. Cette mesure se réalise à l'aide de sondes fluorescentes dont la plus utilisée est le Fura-2 (Verhoeve, 1989) et est effectuée soit par la spectrofluorimétrie, soit par la microscopie couplée à un système d'analyse d'images.

Le spectrofluorimètre donne une mesure moyenne de la variation éventuelle de concentration en $[Ca^{++}]_i$ mais ne donne aucune indication concernant sa localisation, tandis que l'analyse de la fluorescence mesurée par l'intermédiaire d'un microscope donne une indication quantitative de la variation éventuelle de $[Ca^{++}]_i$ au cours du temps mais également une localisation de cette variation au niveau de la cellule. Notons cependant que la mesure de $[Ca^{++}]_i$ au niveau d'épidermes de culture pose cependant certains problèmes d'ordre pratique. La première technique demande en effet de pouvoir placer l'épiderme détaché dans la cuvette du spectrofluorimètre en position verticale ce qui, au premier abord, semble difficilement réalisable. La deuxième technique quant à elle, pourrait poser certains problèmes du fait que notre épiderme de culture est pluristratifié. Face à cela, on peut imaginer deux solutions. Soit l'utilisation d'une lignée cellulaire épithéliale, autre que le kératinocyte humain, qui proliférerait en une monocouche comme, par exemple, les cellules MDCK. Soit l'utilisation d'un autre milieu de culture comme le MCDB 153. Celui-ci donne en effet naissance en un premier temps à une monocouche de kératinocytes non jointifs, les jonctions intercellulaires et la stratification ne se réalisant qu'après une augmentation de la concentration en calcium extracellulaire. Il serait donc possible, en ajustant le taux de calcium présent dans le milieu de culture, d'obtenir une monocouche de kératinocytes jointifs (Pittelkow & Scott, 1986). Malheureusement avec l'une ou l'autre solution, nous ne nous trouverons plus dans les conditions d'utilisation clinique des épidermes de culture (utilisation de la technique d'H. Green).

4.2.2.2. Etude simultanée du cytosquelette et de la prolifération cellulaire.

Par ce travail, nous avons mis en évidence une diminution de capacité à proliférer des cellules constituant l'épiderme de culture après sa mise en attente. Il serait cependant important de voir si le maintien d'un état de prolifération est en relation étroite avec une bonne organisation ou une organisation particulière des filaments d'actine sur lesquels, en effet, une augmentation de la $[Ca^{++}]_i$ peut produire des perturbations. Pour cela, nous pouvons réaliser une incorporation de BrdU sur des cultures de kératinocytes dont la $[Ca^{++}]_i$ a été déterminée au préalable. De plus, sur le même culture, nous pouvons marquer les filaments d'actine par un dérivé fluorescent d'une phallotoxine (molécule se fixant spécifiquement sur les filaments d'actine afin d'inhiber leur dépolymérisation) (Sanderson, 1989). Cette technique permettrait donc de vérifier l'intégrité du cytosquelette en même temps que la mise en relation éventuelle de cette intégrité avec la capacité de prolifération de la cellule, le tout en rapport avec la $[Ca^{++}]_i$.

4.2.2.3. Estimation du degré de différenciation.

En troisième lieu, on peut noter qu'il serait intéressant de réaliser l'étude simultanée du degré de différenciation des cellules remises en culture à partir du feuillet épidermique dissocié, dissociation ayant eu lieu après la mise en attente du greffon détaché et mis sur N-terface, et la capacité proliférative de ces mêmes cellules.

Pour cela nous pouvons de nouveau utiliser le principe de l'incorporation de BrdU par la cellule mais cette fois, en collaboration avec des anticorps couplés à une molécule fluorescente et dirigés contre des kératines particulières et témoins du degré de différenciation de la cellule (Fuchs & Green, 1980). Il serait également très intéressant de pouvoir comparer les kératines présentes au niveau d'un épiderme de culture, d'un épiderme de culture détaché de son support à l'aide de dispase et mis sur N-terface ainsi que d'un épiderme "in situ" détaché du derme par cette même dispase. Ces comparaisons peuvent se réaliser aisément par électrophorèse après extraction des différentes kératines (Fuchs & Green, 1980) ou sur coupes réalisées au cryostat pour permettre un marquage immunofluorescent, par exemple. Ces comparaisons permettraient ainsi d'observer l'influence du détachement de l'épiderme de son substrat sur le processus de différenciation et de constater une différence éventuelle entre l'épiderme détaché *in vivo* et l'épiderme détaché *in vitro*.

4.2.3. CONSIDERATIONS SUR LA TECHNIQUE DE CULTURE DE KERATINOCYTES SELON GREEN ET RHEINWALD (1977).

La méthode utilisée pour réaliser nos expériences est la culture de kératinocytes selon la méthode établie par Green et ses collaborateurs (Green & Rheinwald, 1977; Green *et al.*, 1979). Le choix de cette technique repose sur le fait qu'elle constitue "LA" technique de référence dans la reconstruction d'épidermes de culture (Woodley, 1989; hôpital de Neder-over-Heembeek).

Celle-ci se caractérise par :

- l'utilisation d'un "feeder layer" constitué de 3T3
- l'utilisation d'un milieu de culture rendu particulièrement favorable à la prolifération et à la différenciation du kératinocyte.

Cette technique a effet été établie de manière à obtenir un épiderme de culture possédant les caractéristiques les plus proches possibles de l'épiderme rencontré *in vivo* (prolifération et différenciation) et cela dans les délais les plus brefs.

Si l'on observe les épidermes que nous avons obtenus en laboratoire et si l'on se réfère à la littérature, nous constatons que le feuillet épithélial issu de la mise en culture de kératinocytes possède une structure proche de ce que l'on observe *in vivo* sans pour cela en montrer toutes les caractéristiques. En effet, l'épiderme reconstruit *in vitro* présente une couche de cellules basales surmontée de 6 à 8 couches de cellules de plus en plus aplaties et dépourvues de noyau dans les 2-3 couches les plus superficielles. Ces cellules montrent les caractéristiques propres aux cellules du stratum spinosum, hormis la perte du noyau (Faure *et al.*, 1987). L'épiderme de culture semble donc dépourvu de stratum granulosum et de stratum corneum. On peut observer également la présence de desmosomes tandis que les hémidesmosomes sont absents ainsi que les cellules de Langerhans et de Merkel. L'avis concernant la présence éventuelle de mélanocytes est quant à lui plus controversé (Compton *et al.*, 1989). Les filaments de kératine sont présents aussi mais dans des proportions autres que celles rencontrées *in vivo* (Faure *et al.*, 1987). Il semblerait de plus qu'une enveloppe cellulaire dense aux électrons soit présente et que l'involucrine (protéine participant à l'élaboration de l'enveloppe cellulaire propre au stratum corneum), se situe au niveau des couches juste suprabasales (alors qu'*in vivo* elle se situe au niveau des couches les plus superficielles). Quant aux grains de kératohyaline, les avis divergent quant à leur présence éventuelle. Certains auteurs ont observé des grains de kératohyaline, petits et peu nombreux, dans les couches cellulaires superficielles de l'épiderme (Kanitakis *et al.*, 1987; Faure *et al.*, 1987) alors que d'autres nient

l'existence de ces grains au niveau des épidermes obtenus en culture (Compton *et al.*, 1989).

Toutes ces observations semblent donc démontrer une différenciation imparfaite de l'épiderme obtenu selon cette méthode. Cette différenciation incomplète est peut-être due au fait que l'on recherche à la fois une prolifération maximale et une différenciation optimale. Il est possible qu'un équilibre entre ces deux processus ne soit pas atteint. En réalité, ces observations suggèrent que nous nous trouvons face à un épiderme en état d'hyperprolifération.

C'est pourquoi, afin d'étudier la capacité de prolifération des cellules constituant nos épidermes de culture, nous avons réalisé un marquage avec l'anticorps Ki67 qui est dirigé contre un antigène nucléaire spécifique des cellules en prolifération (Gerdes *et al.*, 1983) ainsi qu'une incorporation de BrdU, un analogue de la thymidine (nucléoside participant à l'élaboration de la molécule d'ADN). Si l'on compare les graphiques concernant la détermination du labelling index (incorporation de BrdU) (fig. 3.5) et les graphiques concernant le marquage au Ki67 (fig. 3.6) nous constatons une symétrie tout à fait remarquable entre les deux expériences (pourcentage identique de cellules marquées au Ki67 et de cellules ayant incorporé la BrdU). Cela signifie que les cellules proliférantes sont passées par la phase de synthèse de l'ADN durant les 18 heures d'incubation avec la BrdU nécessaires à la réalisation de l'expérience. Il est donc très probable que le cycle cellulaire soit parcouru en un temps relativement court. Les phases G₂, M et S étant en général quasiment constantes, la phase G₁ doit donc se dérouler rapidement (Wright, 1983). Nous pouvons en déduire que la rapidité du cycle cellulaire constitue une indication d'un état d'hyperprolifération dans lequel se trouve l'épiderme de culture. Notons que ces dernières années ont cependant vu naître une hypothèse nouvelle, autre que celle concernant la vitesse du cycle cellulaire, en vue d'expliquer le taux de prolifération d'un tissu (Rijzewijk *et al.*, 1989). Cette hypothèse se base sur la proportion de cellules se trouvant au stade G₀. En effet, une cellule, lors du parcours du cycle cellulaire, traverse successivement 3 phases appelées G₁, S et G₂ l'amenant ainsi vers la quatrième phase du cycle qui est la mitose. Cependant, la cellule peut quitter ce cycle à tout moment pour se mettre en repos et arrêter ainsi son processus de division, on parle alors de phase G₀. Cette mise au repos est réversible et la cellule, sous l'action d'un stimulus du milieu extérieur, pourra quitter ce stade G₀ et reprendre le cours normal de sa division. Il est donc communément admis à l'heure actuelle que la proportion de cellules se trouvant en G₀ régule le taux de prolifération de l'épiderme.

Il aurait donc été très intéressant d'effectuer un marquage avec l'anticorps Ki67 sur un feuillet épithélial non dissocié afin de pouvoir

comparer notre pourcentage de cellules Ki67+ avec celui obtenu par Rijzewijk *et al.* (1989) sur un épiderme "in situ" et cela afin de constater si nous obtenions ou non une proportion de cellules au stade G₀ plus ou moins importante par rapport à un épiderme *in vivo*. Il aurait ainsi été possible de confirmer ou, au contraire, d'infirmer notre hypothèse concernant l'état d'hyper-prolifération de l'épiderme obtenu en culture.

En fait, cette hypothèse nous a également été suggérée par une autre observation supplémentaire concernant la localisation du marquage réalisé avec l'anticorps Ki67. Rappelons que l'anticorps Ki67 est spécifique d'un antigène se trouvant dans les cellules en état de prolifération. Cet antigène se localise au niveau du noyau bien que, dans le cas particulier de l'épiderme, le marquage se localise non seulement au niveau du noyau mais également au niveau du cytoplasme des cellules basales de l'épiderme *in vivo* (Gerdes *et al.*, 1983). Or, Rijzewijk et ses collaborateurs (1989) ont comparé la proportion de cellules Ki67+ ainsi que la localisation du marquage avec l'anticorps Ki67 au niveau d'un épiderme normal et d'un épiderme provenant d'une lésion psoriasique. Il semblerait que le marquage nucléaire soit proportionnel au degré de prolifération alors que le marquage cytoplasmique lui est inversement proportionnel. Or, les marquages que nous avons obtenus sur nos épidermes de culture sont essentiellement nucléaires, le marquage cytoplasmique étant un événement très rare. Ceci confirme un état hyperprolifératif des cultures. De plus, cette supposition est renforcée par l'observation de certains auteurs concernant le type de kératine rencontré *in vivo*. Ceux-ci ont en effet constaté *in vitro* la présence de kératines semblables à celles constituant l'épiderme *in vivo* quoique dans des proportions différentes, mais surtout, ils ont remarqué la présence de kératines spécifiques des épidermes en état d'hyperprolifération (Schweizer, 1985; Compton *et al.*, 1989).

Puisqu'il semble bien réel, cet état d'hyperprolifération peut certainement s'expliquer par le fait que le milieu dans lequel se trouve les kératinocytes est loin d'être semblable au milieu qu'ils connaissent "in situ" (absence de tissu sous-jacent, milieu contenant de nombreux facteurs de croissance, culture en milieu liquide alors que *in situ* l'épiderme se trouve en contact avec le milieu extérieur).

Ces constatations nous amènent donc à envisager que l'épiderme reconstruit selon cette technique n'est peut-être pas le meilleur outil de travail concernant l'étude de l'épiderme en tant que tel. Par contre, cela ne signifie pas que son utilisation n'est pas adéquate dans le cadre des essais de reconstruction d'une "peau de remplacement". Les résultats cliniques sont en fait très encourageants en ce qui concerne la pose d'épidermes de culture sur des brûlures du deuxième degré intermédiaire ou profond (persistance d'éléments épithéliaux) (Madden *et al.*, 1986),

ainsi que sur d'autres plaies provenant d'ulcère chronique ou d'épidermolyse bulleuse (Hancock & Leigh, 1989). L'épiderme, après avoir été greffé, semble en effet acquérir une structure semblable, sinon identique, à celle qu'il possède "in situ" (Compton *et al.*, 1989). Les résultats concernant la pose de greffes sur des brûlures du troisième degré sont, quant à eux, plus mitigés. Certains obtiennent des résultats encourageants (Gallico *et al.*, 1984; Compton *et al.*, 1989) alors que d'autres ne voient que peu ou pas de participation de la greffe au processus de cicatrisation ou alors une participation indirecte via la sécrétion de facteurs favorables à cette cicatrisation (Madden *et al.*, 1986; Hancock & Leigh, 1989).

En fait, lorsque l'épiderme de culture adhère à la plaie et est donc en position d'intervenir afin de faciliter la guérison du brûlé, certains assistent à un phénomène de rétraction lors de la cicatrisation (Madden *et al.*, 1986) alors que d'autres observent une hyperprolifération épidermique (Petersen *et al.*, 1990). Remarquons cependant que lorsqu'une équipe médicale fait connaître les résultats obtenus dans la cicatrisation des plaies à l'aide d'épidermes de culture, elle ne précise jamais le "timing" complet et précis de la préparation de ces épidermes. On peut dès lors imaginer que la variabilité des résultats, obtenus lors de traitements de brûlures du troisième degré avec des épidermes de culture pourrait être la conséquence de périodes d'attentes variables subies par le greffon avant son application.

D'autre part ces résultats mitigés ont toutefois encouragé les scientifiques à mettre en oeuvre une nouvelle voie de recherche concernant la reconstruction de "peau de remplacement". Ces recherches s'orientent vers la mise au point d'une peau totale associant derme et épiderme et contenant, si possible, des annexes cutanées. A ce sujet, quelques essais ont déjà été entrepris, citons Dubertret *et al.* (1987) pour la mise au point d'une "peau de remplacement" associant épiderme et derme équivalent ou Pruniéras et Regnier (1987) pour leur utilisation, comme soutien de l'épiderme, d'un derme de cadavre désépidermisé ou encore Hansbrough *et al.* (1989) qui ont utilisé une culture de cellules épidermiques sur une matrice formée de collagène et de glycosaminoglycanes.

Parallèlement à ce type de recherche, il serait très intéressant de pouvoir démontrer l'effet réel que peuvent avoir les allo-ou autogreffes de culture sur le processus de cicatrisation d'une brûlure du deuxième degré ou d'une autogreffe "meshée". En effet on a pu montrer que les épidermes de culture agissent en tant que "super-pansements". Cependant, on n'a aucune idée du mécanisme par lequel ces épidermes de culture favorisent le processus de cicatrisation.

On sait que les kératinocytes ainsi greffés peuvent produire des éléments de la matrice extracellulaire, des facteurs de croissance et que le feuillet épidermique sert de barrière au niveau de la plaie ouverte (Hancock & Leigh, 1989), ce qui conduit, à l'heure actuelle, à rechercher la sécrétion de certains facteurs par les kératinocytes ainsi greffés et qui favoriserait la cicatrisation. Mais, quels sont ces facteurs, quels sont leurs modes d'action ? Récemment, une possibilité avancée par Fibbi *et al.* (1990) évoque l'effet éventuel de l'activateur du plasminogène, sécrété par les kératinocytes mis en culture, sur la cicatrisation. Cet activateur du plasminogène peut se fixer en effet sur les récepteurs membranaires du kératinocyte, de façon auto-ou paracrine. Cette fixation stimule alors la propre production de l'activateur du plasminogène ainsi que les mouvements chémoattractifs du kératinocyte qui se dirige vers la source d'activation. L'épiderme de culture pourrait ainsi favoriser la migration des cellules bordant la plaie qu'il recouvre. Il est à noter de surcroît, que la sécrétion de l'activateur du plasminogène par le kératinocyte est favorisée en présence de facteurs de croissance comme l'EGF ou le TGF β .

Enfin, pour en revenir à nos résultats, on ignore pour l'instant si l'altération cellulaire, que subit un épiderme détaché durant sa période de mise en attente, interfère avec sa capacité à favoriser le processus de cicatrisation. En vue de rechercher les facteurs favorables, remarquons qu'il serait d'un intérêt non négligeable d'expérimenter cette question.

Pour ce faire, il serait nécessaire de relever le temps précis qui sépare le détachement d'une culture de son application sur une plaie, d'effectuer ensuite le relevé topographique de ces différents greffons, puis de faire apprécier par une tierce personne la qualité et la rapidité de la cicatrisation.

En conclusion, beaucoup d'inconnues demeurent présentes qui dépendent autant de la recherche en laboratoire que de la recherche en milieu hospitalier.

CONCLUSIONS

5. CONCLUSIONS.

L'utilisation d'épidermes de culture en tant que "peau de remplacement" chez le brûlé impose certaines contraintes d'ordre pratique, obligeant parfois le chirurgien à laisser les épidermes de culture, détachés de leur support par la dispase, en attente durant des périodes variables.

Nous avons cherché par ce travail à mettre en évidence une altération éventuelle de ces feuillets épithéliaux suite à leur mise en attente, attente s'échelonnant sur une période de 0 à 24 heures.

Pour cela, nous avons mis en oeuvre diverses techniques que l'on peut regrouper en quatre grands types d'études :

- une étude morphologique,
- une étude de viabilité cellulaire,
- une étude de capacité d'adhérence des kératinocytes,
- une étude de prolifération cellulaire.

Nous avons ainsi pu mettre en évidence une altération progressive de nos épidermes de culture au cours de leur mise en attente.

Au vu de nos résultats, on peut penser que plus on attend avant la pose sur une plaie d'un greffon détaché, plus les chances sont faibles de voir celui-ci adhérer à son substrat, de voir ses cellules se multiplier et sécréter les facteurs soupçonnés de favoriser la cicatrisation.

Ces constatations nous suggèrent les remarques suivantes.

En effet, une des observations les plus troublantes que l'on peut faire à propos de l'utilisation des épidermes de culture pour le traitement des grands brûlés est de remarquer les résultats contradictoires qu'ont obtenu les différentes équipes médicales suite à la pose d'épidermes de culture dans des conditions chirurgicales similaires. Ces contradictions ne seraient-elles pas la conséquence de périodes d'attente variables qu'ont peut-être subies ces greffons avant leur pose finale, amenant ces équipes à utiliser des greffons plus ou moins altérés d'après nos observations ?

Cette hypothèse est supportée par la constatation de Matouskova *et al* (1989) concernant l'utilisation clinique d'épidermes trop confluent (constatation renforcée par nos premières expériences recherchant la mise au point d'un stade de confluence "idéal") : ces épidermes trop confluent semblent en effet donner des résultats cliniques moins encourageants que ceux obtenus avec des épidermes juste confluent. On peut supposer que nos épidermes de culture, après avoir été détachés et mis en attente, montrent une altération comparable à celle de ces greffons "trop" confluent.

BIBLIOGRAPHIE

6 BIBLIOGRAPHIE.

- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Watson, J.D. (1989).
Molecular biology of the cell.
Garland Publishing Inc., London, 1219 p.
- Alitalo, K., Kuismanen, E., Myllylä, R., Kiistala, U., Asko-Seljavaara, S. & Vaheri, A. (1982).
Extracellular matrix proteins of human epidermal keratinocytes and feeder 3T3 cells.
J. Cell Biol., 94, 497-505.
- Allain-Regnault, M. (1984).
Les espoirs de la peau-éprouvette.
Sciences et Avenir, 452, 46-51.
- Alvarez, O.M. & Biozes, D.G. (1984).
Cultured epidermal allografts.
Clinics in Dermatol., 2, 54-67.
- Auböck, J. & Fritsh, P. (1987).
Epidermal allografts in humans : an unattainable dream?
Dermatologica, 175, 161-165.
- Auböck, J., Irschicl, E., Romani, N., Kompatscher, P., Höpfl, R., Herold, M., Schuler, G., Bauer, M., Huber, C. & Fritsh, P. (1988).
Rejection, after a slightly prolonged survival time, of Langerhans cell-free allogeneic cultured epidermis used for wound coverage in humans.
Transplantation, 45, 730-737.
- Bading, H., Rauterberg, E.W. & Moelling, K. (1989).
Distribution of c-myc, c-myb, and Ki-67 antigens in interphase and mitotic human cells evidenced by immunofluorescence staining technique.
Exp. Cell Res., 185, 50-59.
- Burger, P.C., Shibata, T. & Kiehues, P. (1986).
The use of the monoclonal antibody Ki-67 in the identification of proliferation cells.
Am. J. Surg. Pathol., 10, 611-617.

- Burke, J.F., Yannas, I.V., Quinby, W.C., Bondoc, C.C. & Jung, W.K. (1981).
Successful use of a physiologically acceptable artificial skin in the
treatment of extensive burn injury.
Ann. Surg., 194, 413-427.
- Cabanne, F. & Bonenfant, J.L. (1980).
Anatomie pathologique : Principes de pathologie générale et
spéciale.
Maloine S.A. Editeur, Paris, 1411p.
- Campisi, J. & Medrano, E.E. (1983).
Cell cycle perturbations in normal and transformed fibroblasts
caused by detachment from the substratum.
J. Cell. Physiol., 114, 53-60.
- Carter, W.G., Wayner, E.A., Bouchard, T.S. & Kaur, P. (1990).
The role of integrins $\alpha_2\beta_1$ and $\alpha_3\beta_1$ in cell-cell and cell substrate
adhesion of human epidermal cells.
J. Cell Biol., 110, 1387-1404.
- Chevremont, M. (1966).
Notions de cytologie et d'histologie, vol.2, Desoer, Liège, 569p.
- Combrier, E., Ronot, X. & Adolphe, M. (1988).
La viabilité cellulaire.
in La cytométrie en flux (Métézeau, Ph., Ronot, X., Le Noan-
Merdrignac, G. & Ratinaud, M.H., eds.), pp. 113-122,
Medsis/McGraw-Hill, Paris.
- Compton, C.C., Gill, J.M., Bradford, D.A., Regauer, S., Gallico, G.G. &
O'Connor, N.E. (1989).
Skin regenerated from cultured epithelial autografts on full-
thickness burn wounds from 6 days to 5 years after grafting.
Lab. Invest., 60, 600-612.
- Cordier, G. (1988).
Analyse des marqueurs cellulaires détectés par
immunofluorescence.
in La cytométrie en flux (Métézeau Ph., Ronot X., Le Noan-
Merdrignac G. & Ratinaud M.H., eds), pp.63-74,
Medsis/McGraw-Hill, Paris.

- Coulomb, B., Saiag, P., Bell, E., Breitbart, F., Lebreton, C., Heslan, M. & Dubertret, L. (1986).
A new method for studying epidermalization in vitro.
Br. J. Dermatol., 114, 91-101.
- Coulomb, B. & Dubertret, L. (1987).
Reconstruction de peau humaine in vitro.
Revue laryng., 108, 55-57.
- Cuono, C., Langdon, R. & Mc Guire, J. (1986).
Use of cultured epidermal autografts and dermal allografts as skin replacement after burn injury.
Lancet, i, 1123-1124.
- Darnell, J., Lodish, H. & Baltimore, D. (1988).
La cellule : biologie moléculaire.
Décarie, Vigot eds, Paris, 1160p.
- Delcommenne, M. (1986).
Etude des kératinocytes de rat en cultures : un modèle épithélial.
Mémoire, Facultés Universitaires ND de la Paix, Namur.
- Depelchin, A. (1987).
Immunologie.
Syllabus, Facultés Universitaires ND de la Paix, Namur.
- Depelchin, S. (1989).
Contribution à l'étude morphologique comparative de la prolifération et de la différenciation de kératinocytes humains cultivés sur chorion amniotique, derme équivalent et gel de collagène.
Mémoire, Facultés Universitaires ND de la Paix, Namur.
- Dolbeare, F., Gratzner, H., Pallavicini, M.G. & Gray, J.W. (1983).
Flow cytometric measurement of total DNA content and incorporated bromodeoxyuridine.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 5573-5577.
- Dubertret, L., Coulomb, B., Saiag, P. & Touraine, R. (1987).
Les peaux artificielles vivantes.
La Recherche, 185, 150-159.

- Dubois, C. (1989).
Mise au point d'une référence morphologique permettant le contrôle de la qualité d'épidermes obtenus en culture.
Mémoire, Facultés Universitaires ND de la Paix, Namur.
- Eckert, R.L. (1989).
Structure, function, and differentiation of the keratinocyte.
Physiol. Rev., 69, 1316-1346.
- Edelson, R. & Fink, J. (1985).
Le rôle immunitaire de la peau.
Pour la science, 59-67.
- Evans, A.J. (1965).
Burns.
in *Clinical surgery*, vol 4, (R.J.V. Battle, ed.),
pp.266-301, Butterworth & Co Ltd.
- Faure, M. (1987).
Facteurs de croissance des cellules épidermiques.
Séminaire INSERM, 148, 63-68.
- Faure, M., Mauduit, G., Schmitt, D., Kanitakis, J., Demidem, A. & Thivolet, J. (1987).
Growth and differentiation of human epidermal cultures used as auto- and allografts in human.
Br. J. Dermatol., 116, 161-170.
- Fibbi, G., Magnelli, L., Pucci, M. & Del Rosso, M. (1990).
Interaction of urokinase A chain with the receptor of human keratinocytes stimulates release of urokinase-like plasminogen activator.
Exp. Cell Res., 187, 33-38.
- Freshney, R.I. (1987).
Culture of animal cells. A manual of basic techniques.
Alan R. Liss Inc., New York, 397 p.
- Fuchs, E. & Green, H. (1980).
Changes in keratin gene expression during terminal differentiation of the keratinocyte.
Cell, 19, 1033-1042.

- Gallico, G.G., O'Connor, N.E., Compton, C.C., Kehinde, O. & Green, H. (1984).
Permanent coverage of large burn wounds with autologous cultured human epithelium.
N. Engl. J. Med., 311, 448-451.
- Gangolphe, M., Hezez, G., Latarjet, J., Masson, Ch.L., Foyatier, J.L., Faure, M. & Thivolet, J. (1987).
Culture d'épiderme humain : utilisation comme autogreffe chez le brûlé.
Ann. Chir. Plast. Esthét., 32, 38-41.
- Gerdes, J., Schwab, U., Lemke, H. & Stein, H. (1983).
Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation.
Int. J. Cancer, 31, 13-20.
- Gielen, V., Faure, M., Mauduit, G. & Thivolet, J. (1987).
Progressive replacement of human cultured epithelial allografts by recipient cells as evidenced by HLA Class 1 antigens expression.
Dermatologica, 175, 166-170.
- Gipson, I.K., Grill, S.M., Spurr, S.J. & Brennan, S.J. (1983).
Hemidesmosome formation in vitro.
J. Cell Biol., 97, 847-857.
- Gratzner, H.G. (1982).
Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine : a new reagent for detection of DNA replication.
Science, 218, 474-475.
- Green, H. (1978).
Cyclic AMP in relation to proliferation of the epidermal cell : a new view.
Cell, 15, 801-811.
- Green, H. & Rheinwald, J.G. (1977).
Process for serially culturing keratinocytes.
United States Patent , (4,016,036).
- Green, H., Kehinde, O. & Thomas, J. (1979).
Growth of cultured human epidermal cells into multiple epithelia suitable for grafting.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 5665-5668.

- Guilbaud, J. & Perrot, J. (1988).
Brûlures.
in Encyclopédie médico chirurgicale, vol.5, (édition techniques),
p15001-A10 (24p.), Paris 6°.
- Hammar, H., Acevedo, F. & Naito, S. (1990).
Transferrin and epidermal growth.
Acta. Derm. Venereol. (Stockh.), 70, 11-17.
- Hancock, K. & Leigh, I.M. (1989).
Cultured keratinocytes and keratinocyte grafts. Skin grafts from
the laboratory can supplement autografts.
Br. Med. J., 299, 1179-1180.
- Hansbrough, J.F., Boyce, S.T., Cooper, M.L. & Foreman, T.J. (1989).
Burn wound closure with cultured autologous keratinocytes and
fibroblasts attached to a collagen-glycosaminoglycan substrate.
JAMA, 262, 2125-2130.
- Heenen, M. (1987).
Cycle cellulaire. Cinétique des kératinocytes normaux.
Séminaires INSERM, 161, 19-28.
- Hennings, H., Kruszewski, F.H., Yuspa, S.H. & Tucker, R.W. (1989).
Intracellular calcium alterations in response to increased external
calcium in normal and neoplastic keratinocytes.
Carcinogenesis, 10, 777-780.
- Jaksic, T. & Burke, J.F. (1987).
The use of "artificial skin" for burns.
Ann. Rev. Med., 38, 107-117.
- Junqueira, L.C. & Carneiro, J. (1987).
Histologie.
Piccin Nuova Libreria S.p.A., Italie, 533p.
- Kanitakis, J., Mauduit, G., Faure, M., Schmitt, D. & Thivolet, J. (1987).
Ultrastructural studies of cultured human epithelial sheets used as
skin allografts.
Virchows Arch. A, 410, 523-530.
- Karasek, M.A. (1983).
Cell culture of human skin epidermal cells.
in Biochemistry and physiology of the skin, vol.1 (Lowell
A.Goldsmith, ed.), pp.230-240, Oxford University Press Inc.

- Kondo, S., Aso, K. & Namba, M. (1979).
Culture of normal human epidermal cells with 3T3 feeders on millipore filters.
J. Invest. Dermatol., 72, 85-87.
- Labarca, C. & Paigen, K. (1980).
A simple, rapid, and sensitive DNA assay procedure.
Anal. Biochem., 102, 344-352.
- Landberg, G., Tan, E.M. & Roos, G. (1990).
Flow cytometric multiparameter analysis of proliferating cell nuclear antigen/cyclin and Ki-67 antigen: a new view of the cell cycle.
Exp. Cell Res., 187, 111-118.
- Leloup, R., Leclercq-Smeckens, M., Saint-Guillain, M-L., Sartenaer-Meurisse, M-F. & Van-Reepinghen-Degen, A. (1985).
Tissu conjonctif.
in : *Histologie générale II, syllabus Facultés Universitaires ND de la Paix, Namur.*
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951).
Protein measurement with the Folin phenol reagent.
J. Biol. Chem., 193, 265-275.
- Madden, M.R., Finkelstein, J.L., Staiano-Coico, L., Goodwin, C.W., Shires, G.T., Nolan, E.E. & Hefton, J.M. (1986).
Grafting of cultured allogeneic epidermis on second- and third-degree burn wounds on 26 patients.
J. Trauma, 26, 955-962.
- Maillet, M. (1977).
Cytologie.
Masson, ed., Paris, 261 p.
- Matouskova, E., Vesely, P. & Konigova, R. (1989).
Modified method of in vitro cultivation of human keratinocytes suitable for grafting.
Folia Biologica (Praha), 35, 267-271.
- McNeil, P.L., Muthikrishnan, L., Warder, E. & D'Amore, P.A. (1989).
Growth factors are released by mechanically wounded endothelial cells.
J. Cell Biol., 109, 811-822.

- Menon, G.K., Grayson, S. & Elias, P.M. (1985)
Ionic calcium reservoirs in mammalian epidermis : ultrastructural localization by ion-capture cytochemistry.
J. Invest. Dermatol., 84, 508-512.
- Murray, J.C., Stingl, G., Kleinman, H.K., Martin, G.R. & Katz, S.I. (1979).
Epidermal cells adhere preferentially to type IV (basement membrane) collagen.
J. Cell Biol., 80, 197-202.
- O'Keefe, E.J. & Chiu, M.L. (1988).
Stimulation of thymidine incorporation in keratinocytes by insulin, epidermal growth factor, and placental extract : comparison with cell number to assess growth.
J. Invest. Dermatol., 90, 2-7.
- O'Keefe, E.J., Briggaman, R.A. & Herman, B. (1987).
Calcium-induced assembly of adherens junctions in keratinocytes.
J. Cell Biol., 105, 807-817.
- O'Keefe, E.J. & Payne, R.E. (1983).
Modulation of the epidermal growth factor receptor of human keratinocytes by calcium ion.
J. Invest. Dermatol., 81, 231-235.
- O'Keefe, E.J., Chiu, M.L. & Payne, R.E. (1988).
Stimulation of growth of keratinocytes by basic fibroblast growth factor.
J. Invest. Dermatol., 90, 767-769.
- O'Neill, C., Jordan, P. & Ireland, G. (1986).
Evidence for two distinct mechanisms of anchorage stimulation in freshly explanted and 3T3 swiss mouse fibroblasts.
Cell, 44, 489-496.
- Oku, T., Takigawa, M. & Yamada, M. (1987).
Cell proliferation kinetics of cultured human keratinocytes and fibroblasts measured using a monoclonal antibody.
Br. J. Dermatol., 116, 673-679.
- Parker, R.C. (1961).
Methods of tissue culture.
Hoerber P.B. Inc., ed, Toronto, Canada, 358p.

- Petersen, M.J., Lessane, B. & Woodley, D.T. (1990).
Characterization of cellular elements in healed cultured
keratinocyte autografts used to cover burn wounds.
Arch. Dermatol., 126, 175-180.
- Pittelkow, M.R. & Scott, R.E. (1986).
New techniques for the *in vitro* culture of human skin
keratinocytes and perspectives on their use for grafting of
patients with extensive burns.
Mayo Clin. Proc., 61, 771-777.
- Pruniéras, M. (1979).
Epidermal cell cultures as model for living epidermis.
J. Invest. Dermatol., 73, 135-137.
- Pruniéras, M., Delescluse, C. & Regnier, M. (1976).
The culture of skin a review of theories and experimental methods.
J. Invest. Dermatol., 67, 58-65.
- Pruniéras, M., Regnier, M. & Schlotterer, M. (1979).
Nouveau procédé de culture des cellules épidermiques humaines
sur derme homologue ou hétérologue : préparation de greffons
recombinés.
Ann. Chir. Plast., 24, 357-362.
- Pruniéras, M. & Regnier, M. (1987).
Epidermal keratinocyte cultures as experimental models.
Models in Dermatol., 3, 8-15.
- Rheinwald, J.G. (1980).
Serial cultivation of normal human epidermal keratinocytes.
Methods Cell Biol., 21A, 229-254.
- Rheinwald, J.G. & Green, H. (1975).
Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the
formation of keratinizing colonies from single cells.
Cell, 6, 331-344.
- Rijzewijk, J.J., Van Erp, P.E.J. & Bauer, F.W. (1989).
Two binding sites for Ki67 related to quiescent and cycling cells in
human epidermis.
Acta Derm. Venereol. (Stockh.), 69, 512-515.

- Roitt, I., Brostoff, J. & Male, D. (1985).
Immunologie fondamentale et appliquée.
Fridman W.H., Medsi, Paris, 254p.
- Ronot, X., Aubry, J.-P. & Banchereau, J. (1988).
Le cycle cellulaire.
in La cytométrie en flux (Métézeau, P., Ronot, X., Le Noan-
Merdrignac, G. & Ratinaud, M.H., eds.), pp. 77-87,
Medsis/McGraw-Hill, Paris.
- Russel, S.B., Trupin, K.M., Rodriguez-Eaton, S., Russel, J.D. & Trupin, J.S.
(1988).
Reduced growth-factor requirement of keloid-derived fibroblasts
may account for tumor growth.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 587-591.
- Salzman, N.P. (1959).
Systematic fluctuations in the cellular protein, RNA and DNA
during growth of mammalian cell cultures.
Biochim. Biophys. Acta, 31, 158.
- Sanderson, F. (1989).
Contribution à l'étude de l'athérogenèse : études morphologiques du
phénomène de "blebbing" observé au niveau de cellules
endothéliales en culture soumises à un stress oxydant.
Mémoire, Facultés Universitaires ND de la Paix, Namur.
- Schaefer, H. (1985).
La couche cornée.
Séminaires INSERM, 131, 15-22.
- Schutte, B., Reynders, M.M.J., Bosman, F.T. & Blijham, G.H. (1987).
Effect of tissue fixation on anti-bromodeoxyuridine
immunohistochemistry.
J. Histochem. Cytochem., 35, 1343-1345.
- Schwartz, P.M., Kugelmann, L.C., Coifman, Y., Hough, L.M. & Milstone, L.M.
(1988).
Human keratinocytes catabolize thymidine.
J. Invest. Dermatol., 90, 8-12.
- Schweizer, J. (1985).
La différenciation des kératinocytes *in vivo* et *in vitro*
Séminaires INSERM, 131, 9-12.

- Sharpe, G.R., Gillespie, J.I. & Greenwell, J.R. (1989).
An increase in intracellular free calcium is an early event during differentiation of cultured human keratinocytes.
FEBS Lett., 254, 25-28.
- Staquet, M.J. (1985).
Les cellules basales de l'épiderme humain.
Séminaires INSERM, 131, 47-52.
- Stenn, K.S. (1988).
The skin.
in Cell and tissue biology (Weiss L. ed.), pp.541-571, Urban & Schwarzenberg, Baltimore.
- Thivolet, J. (1986).
La peau de remplacement.
Pour la Science, 16-22.
- Thivolet, J., Faure, M., Demidem, A. & Maudit, G. (1986).
Les épidermes humains produits par culture *in vitro* sont pas rejetés et peuvent être utilisés comme allogreffes de peau.
Bull. Acad. Natle Med., 170, 557-562.
- Todaro, G.J. & Green, H. (1963).
Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines.
J. Cell Biol., 17, 299-313.
- Uitto, J., Olsen, D.R. & Fazio, M.J. (1989).
Extracellular matrix of the skin : 50 years of progress.
J. Invest. Dermatol., 92, 615-775.
- Verhoeve, F. (1989).
Contribution à l'étude de l'athérogenèse : Influence du stress oxydant sur les cellules endothéliales humaines en culture. Etude de l'homéostasie calcique.
Mémoire, Facultés Universitaires ND de la Paix, Namur.
- Wolff, H.H. & Gnas, W. (1989).
Immunocytochemical detection of *in vitro* incorporated 5-bromodeoxyuridine in paraffin sections of human skin.
Arch. Dermatol. Res., 281, 209-212.

- Woodley, D.T. (1989).
Covering wounds with cultured keratinocytes.
JAMA, 262, 2140-2141.
- Woodley, D.T., Wynn, K.C. & O'Keefe, E.J. (1990).
Type IV collagen and fibronectin enhance human keratinocyte
thymidine incorporation and spreading in the absence of soluble
growth factors.
J. Invest. Dermatol., 94, 139-143.
- Wright, N.A. (1983).
The cell proliferation kinetics of the epidermis.
in Biochemistry and physiology of the skin, vol.1, (Lowell
A.goldsmith, ed), pp.203-229, Oxford University Press Inc.
- Wroblewski, F. & LaDue, J.S. (1955).
Lactic dehydrogenase activity in blood.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 90, 210.
- Yuspa, S.H., Kilkenny, A.E., Steinert, P.M. & Roop, D.R. (1989).
Expression of murine epidermal differentiation markers is tightly
regulated by restricted extracellular calcium concentrations in
vitro.
J. Cell Biol., 109, 1207-1217.