

Pour une nouvelle peau: bases de la biologie cellulaire, tissue engineering et substitut cutané

Sophie Böttcher-Haberzeth, Thomas Biedermann, Ernst Reichmann

Tissue Biology Research Unit, Chirurgische Klinik, Universitäts-Kinderkliniken, Zürich

Traduction: Rudolf Schlaepfer, La Chaux-de-Fonds

L'objectif du tissue engineering est de développer des tissus et des organes à des fins cliniques et thérapeutiques. Ainsi, depuis 30 ans environ, on essaye de reproduire de la peau humaine *in vitro*. La solution la plus prometteuse nous paraît être la fabrication d'un substitut ressemblant au plus près à la peau sur le plan structurel et fonctionnel. La «Tissue Biology Research Unit» (TBRU) de la Clinique chirurgicale des cliniques pédiatriques universitaires de Zurich s'est donné pour but de développer un substitut de peau entière d'un nouveau type, en collaboration avec le Centre pour enfants brûlés, de chirurgie plastique et reconstructive (également un département de la Clinique chirurgicale des cliniques pédiatriques universitaires de Zurich). Ce substitut cutané devrait rendre possible la couverture de lésions dermo-épidermiques étendues après brûlure, accident, infection ou aussi congénitales, de façon fiable et avec un excellent résultat fonctionnel et cosmétique. Nous présentons ici un aperçu de nos efforts et progrès.

d'un être humain, peut avoir des conséquences dangereuses voire mortelles. La reconstruction de la peau est actuellement réalisée par des greffes de peau entière ou mince, par des «keratinocyte sheets» ou par un substrat dermique acellulaire (p.ex. Integra®, Matriderm®)^{1), 2)} recouvert ensuite par une greffe de peau mince. Malgré de grands progrès pendant les trente dernières années persistent souvent des cicatrices gênantes du point de vue fonctionnel, cosmétique et psychique³⁾ (fig. 1a). Ce résultat est insatisfaisant; nous cherchons aujourd'hui une peau sans cicatrice, ressemblant à la peau avoisinante. Un fardeau supplémentaire pour le patient pédiatrique sont les multiples opérations correctives jusqu'à l'âge adulte, rendues nécessaires par l'ablation répétée de tissu cicatriciel gênant. Ce sont donc surtout les jeunes patients qui profiteraient de la greffe d'un substitut cutané autologue dermo-épidermique réalisé en une seule fois.

l'expansion de kératinocytes humains *in vitro*, à l'aide de cellules dermales murines dont on inhibe la croissance. La culture simultanée de kératinocytes cutanés et de fibroblastes du mésenchyme a constitué un pas décisif, soulignant l'importance de l'interaction entre derme et épiderme. À partir de ces progrès, il a été possible de greffer pour la première fois des équivalents d'épiderme autologue sur un patient humain⁵⁾. Bien que des patients brûlés soient traités encore aujourd'hui avec des tels équivalents épidermiques (appelés aussi «Cultured epidermal autografts» CEA), ces greffes présentent certaines limites. La manipulation des feuillets de kératinocytes est très délicate, la méthode est grevée d'un risque infectieux important, il manque la composante dermique de la greffe et la proportion de prise de la greffe est de 60%⁶⁾.

Aujourd'hui on cherche généralement la réalisation de substituts dermo-épidermiques complexes. Le matériel de départ est une matrice biodégradable, acellulaire qui peut avoir l'aspect d'un filet ou d'une éponge (p.ex. Integra®, Matriderm®). Mais il peut aussi s'agir d'un hydrogel, formé de collagène du type I, un élément essentiel de la matrice dermique extracellulaire. Dans cet hydrogel de collagène sont introduits des fibroblastes cutanés autologues qui prolifèrent dans le gel et le colonisent. La deuxième étape consiste à déposer des kératinocytes cutanés autologues sur l'hydrogel; ceux-ci prolifèrent aussi massivement et forment une couche unicellulaire homogène (monolayer). La communication entre kératinocytes et fibroblastes, par des «messagers» comme des facteurs

Quand faut-il un substitut cutané?

La perte d'une surface importante de peau, donc de la protection extérieure

Substituts dermo-épidermiques

Une étape importante pour le développement d'un substitut d'épiderme a été

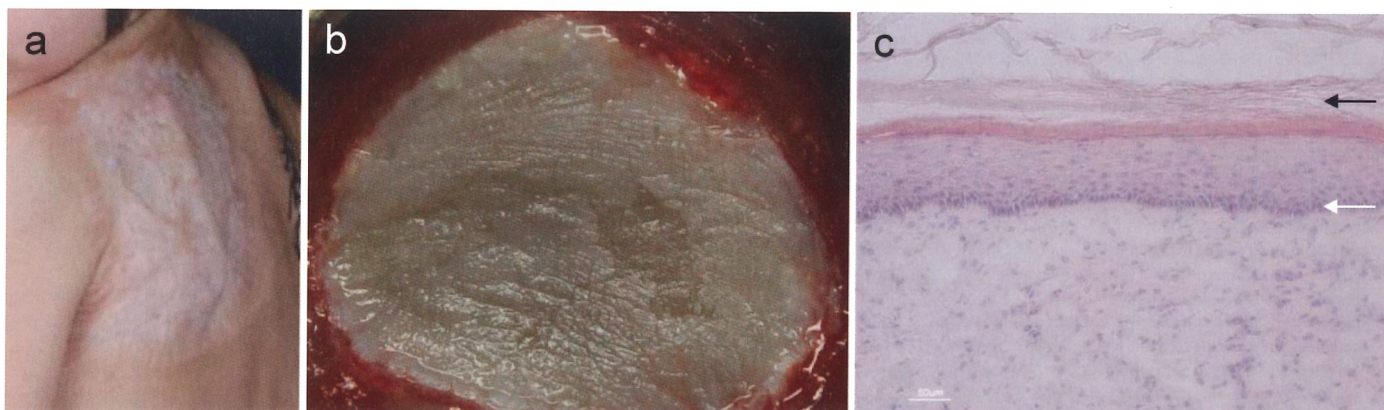


Figure 1: Nouveaux substituts évitant la formation de cicatrices. **a)** Cicatrice après utilisation de Integra Artificial Skin®. La peau reconstruite se différencie encore nettement de la peau avoisinante. **b)** Substitut dermo-épidermique humain sur un rat nu immuno-incompétent. **c)** La coupe histologique à travers la peau représentée en fig.1b montre le développement d'une barrière efficace (épiderme) avec un stratum basale (flèche blanche) et un stratum corneum (cellules rouges). Les cellules mortes du stratum corneum sont rejetées sous forme de squames (flèche noire).

de croissance, des cytokines, des morphogènes et des composants de la matrice extracellulaire (éléments de la membrane basale p.ex.), est essentielle. Cette interaction dermo-épidermique favorise la prolifération et la différenciation des kératinocytes. Ils forment finalement un épithélium de plusieurs couches, stratifié et à la surface cornée qui représente une protection efficace vers l'extérieur (*fig 1b et c*).

Mais ces hydrogels connaissent aussi des limites. Leur manque de stabilité mécanique doit être compensée par des mesures adjuvantes. L'absence d'un réseau capillaire limite l'épaisseur de ce substitut cutané, la(les) couche(s) de kératinocytes étant nourries exclusivement par diffusion à partir du tissu sous-jacent du receveur. En outre, la régénération de l'épiderme dépend de façon décisive de la présence de kératinocytes souches.

Identification de kératinocytes souches

Les cellules souches régénèrent un tissu et en garantissent l'authenticité. En tant que cellules non différenciées, elles produisent de nouvelles cellules qui se différencient et accomplissent des tâches précises, sans perdre les propriétés de la cellule souche. L'épiderme se régénère complètement en quatre semaines environ. Les kératinocytes les plus différenciés et morts sont finalement éliminés sous forme de squames (*fig. 1c, flèche noire*). Les cellules souches forment par contre la couche basale de l'épiderme (*fig. 1c, flèche blanche; fig 2a, cellules rouges*), se multiplient et produisent des cellules filles qui à leur tour se divisent encore activement. Ainsi la régénération de la peau est garantie. De nombreux groupes de chercheurs partout dans le monde sont à la recherche de marqueurs caractérisant les kératinocytes souches. Nous avons trouvé le marqueur d'une protéine structurale (cytokératine 19) du cytoplasme des kératinocytes (*fig. 2a*). La cytokératine 19 ne se trouve que dans la peau de très jeunes enfants (<2 ans)⁷. Par ailleurs elle s'exprime plus souvent dans des kératinocytes extraits de leur formation tissulaire et cultivés séparément ou dans un substitut dermo-épidermique. Dans les substituts greffés, les cellules cytokératine 19-positives se concentrent avec le temps dans la couche basale de l'épiderme⁸. Il est possible que ce marqueur soit aussi l'expression d'une croissance latérale de l'épiderme qui gagne

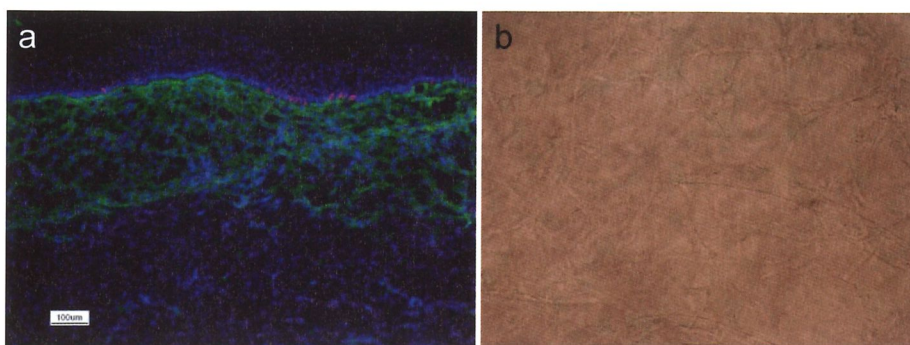


Figure 2: Population de kératinocytes basaux spécifiques et réseau de capillaires produit en laboratoire. **a)** Les anticorps spécifiques K 19 reconnaissent un type particulier de kératinocytes dans le stratum basale d'un substitut cutané humain produit en laboratoire. Les kératinocytes basaux K 19-positifs indiquent un épiderme intact, en voie de formation. **b)** Cellules endothéliales humaines microvasculaires organisées en un réseau tridimensionnel d'authentiques capillaires.

en surface, suivant la croissance de l'enfant. Dans tous les cas K 19 est un marqueur témoin d'une structure épidermale intacte en voie de formation. K 19 est ainsi un indicateur précieux d'un substitut cutané réussi.

Pré-vascularisation d'un substitut cutané

Etant très minces, les substituts cutanés (Cultured Epidermal Autografts), sont facilement approvisionnés en aliments, facteurs de croissance et oxygène par diffusion à partir d'une lésion vascularisée. Des substituts dermo-épidermiques réalisés en laboratoire et mesurant >1 mm d'épaisseur, ne seront par contre pas vascularisés assez rapidement pour garantir l'approvisionnement de la composante épidermique⁹. Cela souligne l'importance d'une vascularisation rapide et efficace d'un substitut cutané.

Une solution pourrait être un substitut tissulaire pré-vascularisé en laboratoire. Nous avons cherché à le réaliser à l'aide de cellules endothéliales humaines microvasculaires. Contrairement aux résultats scientifiques actuels, utilisant généralement des cellules endothéliales animales ou des cellules endothéliales humaines ombilicales, l'utilisation de cellules endothéliales humaines cutanées pour la production d'un substitut cutané est une nouveauté. Isolées à partir d'une biopsie cutanée et par expansion en culture, nous avons obtenu une culture pratiquement pure de cellules endothéliales microvasculaires¹⁰. Nous avons réussi à créer des conditions permettant aux cellules endothéliales de s'organiser, dans un hydrogel biodégradable, en un tissu tridimensionnel

d'authentiques capillaires (*fig. 2b*). Nous avons également démontré qu'un tel substitut pré-vascularisé est stabilisé par les cellules murales du receveur (péricytes, cellules de musculature lisse). Ce modèle représente une approche intéressante pour la confection d'un nouveau type de substitut dermo-épidermique.

Résumé et perspectives

Par la définition d'un nouveau marqueur de cellules souches et de l'homéostasie et par le développement d'un réseau capillaire dans une matrice cutanée, ont été franchies de nouvelles étapes en vue de la confection d'un nouveau type de substitut cutané.

La production d'un substitut cutané utilisable cliniquement et sans difficultés par le chirurgien, réalisable en quantités raisonnables, exempt de risques médicaux et reconnu pour le traitement clinique par la Confédération et les assureurs, demandera pourtant encore de nombreux efforts^{11, 12}.

Références

Voir texte allemand.

Correspondance

PD Dr Ernst Reichmann
Tissue Biology Research Unit
Department of Surgery
University Children's Hospital
Steinwiesstrasse 75
CH-8032 Zurich, Switzerland
Tel. +41 44 266 74 93
Fax +41 44 266 71 70
ernst.reichmann@kispi.uzh.ch