THÈSE

Pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE POITIERS
UFR de médecine et de pharmacie
Laboratoire Inflammation, tissus épithéliaux et cytokines - LITEC (Poitiers)
(Diplôme National - Arrêté du 7 août 2006)

École doctorale : Biologie-santé - Bio-santé (Limoges)
Secteur de recherche : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Présentée par :
Jiad Mcheik

Études phénotypiques et fonctionnelles des capacités régénératives des kératinocytes humains Application à l'autogreffe

Directeur(s) de Thèse :
Jean-Claude Lecron, François-Xavier Bernard

Soutenue le 17 décembre 2013 devant le jury

Jury :

Président	**Vincent Praloran**	Professeur des Universités, Université de Bordeaux
Rapporteur	**Ali Turhan**	Professeur des Universités, Université de Paris 11
Rapporteur	**Pierre Vergnes**	Professeur des Universités, Université de Bordeaux
Membre	**Jean-Claude Lecron**	Professeur des Universités, Université de Poitiers
Membre	**François-Xavier Bernard**	Président de "BIOalternatives", CRO sise à Gençay
Membre	**Guillaume Levard**	Professeur des Universités, Université de Poitiers

Pour citer cette thèse :
Jiad Mcheik. *Études phénotypiques et fonctionnelles des capacités régénératives des kératinocytes humains - Application à l'autogreffe* [En ligne]. Thèse Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie. Poitiers : Université de Poitiers, 2013. Disponible sur Internet <http://theses.univ-poitiers.fr>

THESE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE POITIERS

Faculté de Médecine et Pharmacie

(Diplôme national-Arrêté du 7 août 2006)

Ecole Doctorale : BioSanté N°524

Champ disciplinaire : Biologie, Médecine, Santé

Secteur de Recherche : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Présenté par :

Jiad MCHEIK

ETUDES PHENOTYPIQUES ET FONCTIONNELLES DES CAPACITES REGENERATIVES DES KERATINOCYTES HUMAINS – APPLICATION A L'AUTOGREFFE

Directeurs de Thèse : **Dr François-Xavier Bernard Pr Jean-Claude Lecron**

Soutenue le mardi 17 décembre 2013, devant la commission d'examen :

Jury

Rapporteurs	**Ali Turhan**	Professeur des universités, Paris 11
	Pierre Vergnes	Professeur des universités, Bordeaux
Examinateurs	**François-Xavier Bernard**	Docteur ès sciences, Poitiers
	Jean-Claude Lecron	Professeur des universités, Poitiers
	Guillaume Levard	Professeur des universités, Poitiers
	Vincent Praloran	Professeur des universités, Bordeaux

THESE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE POITIERS

Faculté de Médecine et Pharmacie

(Diplôme national-Arrêté du 7 août 2006)

Ecole Doctorale : BioSanté N°524

Champ disciplinaire : Biologie, Médecine, Santé

Secteur de Recherche :

Présenté par :

Jiad MCHEIK

ETUDES PHENOTYPIQUES ET FONCTIONNELLES DES CAPACITES REGENERATIVES DES KERATINOCYTES HUMAINS – APPLICATION A L'AUTOGREFFE

Directeurs de Thèse : **Dr François-Xavier Bernard et Pr Jean-Claude Lecron**

Soutenue le mardi 17 décembre 2013, devant la commission d'examen :

Jury

Rapporteurs	**Ali Turhan**	Professeur des universités, Paris 11
	Pierre Vergnes	Professeur des universités, Bordeaux
Examinateurs	**François-Xavier Bernard**	Docteur ès sciences, Poitiers
	Jean-Claude Lecron	Professeur des universités, Poitiers
	Guillaume Levard	Professeur des universités, Poitiers
	Vincent Praloran	Professeur des universités, Bordeaux

REMERCIEMENTS

Je remercie vivement et avec toute ma gratitude le Professeur Ali Turhan et le Professeur Vincent Praloran pour avoir consacré le temps et accepté d'être parmi nous pour juger notre travail.

Au Professeur Pierre Vergnes, quoi dire devant un parcours dans lequel nous ne comptons plus les années... Pendant mes stages de sémiologie, d'externe, d'interne et de mon clinicat à Bordeaux ; merci de m'avoir aidé, conseillé et accompagné… Amitiés

Monsieur le Professeur Levard, je vous remercie de m'avoir ouvert la porte de votre service et permis de développer une activité chirurgicale plastique pédiatrique au CHU de Poitiers. Votre aide et vos conseils sont précieux pour renforcer la place hospitalière et universitaire de notre activité. Je remercie toute l'équipe dans le département de pédiatrie pour la qualité et l'excellente prise en charge de nos petits patients.

Ces quelques lignes n'exprimeront pas toute ma reconnaissance à François Xavier Bernard et à Jean-Claude Lecron qui m'ont accueilli dans leurs équipes du laboratoire BIO*alternatives* et du LITEC. Vous m'avez guidé, conseillé et aidé à finaliser des travaux fondamentaux pour notre activité et notre pratique clinique. Grand merci et sincères amitiés.

Grand merci à Christine Barrault du laboratoire BIO*alternatives* de me donner l'occasion de m'imbiber de cette grande expérience que le laboratoire possède et un grand respect pour la haute expertise de toute une équipe. Je remercie également toute l'équipe du LITEC pour les échanges tout au long de la préparation de mon travail.

Aux amis qui sans cesse m'ont encouragé

A ma famille et sa confiance sans limites

A Leila, merci pour ton soutien, ta compréhension, ta tolérance et ton aide pour finaliser mon travail et mes projets

A Waël et Wassim, merci de m'avoir prêté votre bureau pour travailler les soirs et les WE

ABREVIATIONS

A

ABCS: Autologous Bioengineered

Composite Skin.

aFGF: acid Fibroblast Growth Factor

AHR: Aryl Hydrocarbon Receptor

B

bFGF: basic Fibroblast Growth Factor

BP230 (BPAG1): Bullous Pemphigoid Antigen1

BMP4: Bone Morphogenetic Protein 4

C

CCR7: C-C Chemokin Receptor 7

CD71: Transferrin receptor protein 1

CEA: Cultured Epithelial Autograft

CLA : Cutaneous Lymphocyte Antigen

CMH : Complexe

Majeur d'Histocompatibilité

CSS: Cultured Skin Substitutes

CXCL5: C-X-C motif chemokine 5

D

DAPI: 4', 6-Diamidino-2-Phenylindole

DAMPs: Damage-Associated Molecular Patterns

E

ECM: ExtraCellular Matrix

EGF: Epidermal Growth Factor

ESC: Embryonic Stem Cell

F

FGF: Fibroblast Growth Factor

FLT-3L: FMS-related tyrosine

kinase ligand

FoxP3: Forkhead transcriptional repressor

G

GAG: Glycosaminoglycanes

GM-CSF: Granulocytes Macrophage-Colony Stimulating Factor

H

HB-EGF: Heparin-Binding EGF-like Growth Factor

HLA: Human Leucocyte Antigen

I

IFAP 300: Intermediate Filament-Associated Protein

IGF: Insulin-like Growth Factor

IFN: Interferon

IRF: IFN-Regulatory Factor

J

JAK/STAT: Janus kinase/ Signal Transducer and Activator of Transcription

JNK: C-Jun N-terminal Kinase

K

K-CSEh : kératinocytes dérivés de cellules souches embryologiques humaines

KGF: Keratinocyte Growth Factor

KLF4: Kruppel Like Factor 4

KRT: cytokératine

L

Lag: Langerhans-associated granule

LL37: Cathelicidin

LTA: Lipoteichoic Acid

MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase

MDC: Myeloïd Dendritic Cell

MMP-1: Matrix MetalloProteinase-1

MyD88: Myeloid differentiation primary response gene 88

N

NGF: Nerve Growth Factor

O

OCT4: Octamer-binding

Transcription Factor 4

ORS: Outer Root Sheath

OSM: Oncostatin M

P

p63: Tumor protein p63

PAMPS: Pathogen-Associated

Molecular Patterns

PDC: Plasmacytoide Dendritic Cell

PDGF: Platelet-Derived Growth Factor

PSM: Phenol-Soluble Modulin

R

Rac-1: Ras-related C3 botulinum

toxin substrate 1

rhGH: recombinant human

Growth Hormone

rhPDGF: recombinant Platelet-Derived Growth Factor

RoRγ : orphan retinoid receptor

RT–PCR: Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction

S

SC : Surface Corporelle

SCB : Surface Corporelle Brûlée

Shh: Sonic Hedgehog

SIS: Skin Immune System

STAG**:** Split-Thickness Skin AutoGrafts

STAT: Signal Transducers and Activators of Transcription

STDG: Split-Thickness Dermal Graft

T

T-bet: Tbox expressed in T cell

TBSA: Total Body Surface Area

TGF: Transforming Growth Factor

TLR: Toll-Like Receptor

TNF: Tumor Necrosis Factor

TRAF: Tumor necrosis factor Receptor-Associated Factor

TRIF: TIR-domain-containing adapter-inducing

V

VSS: Vancouver Scar Scale

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

W

Wnt: Wingless integration site

PLAN

AVANT PROPOS 8

INTRODUCTION 10

1. Généralités sur la peau 10

2. L'épiderme 10
2.1 Les kératinocytes 10
2.1.1 Les cellules basales 11
2.1.2 La différenciation kératinocytaire 16
3. Le derme 19

4. Les cellules immunitaires et les cytokines dans la peau 20
4.1 Les cellules dendritiques de la peau 23

4.2 Les lymphocytes résidents de la peau 24

4.3 Les facteurs de croissance et les cytokines de la peau 25

5. La peau de l'enfant 27

5.1 Le prépuce 28

5.2 Les brûlures de l'enfant 29

6. Les moyens thérapeutiques pour une cicatrisation dermo épidermique chez

les enfants brûlés 34

- Article 1: Wound healing in children burns. Update and perspectives

OBJECTIFS 59

RESULTATS 60

1. Etudes *in vitro* phénotypiques et fonctionnelles des capacités régénératives des kératinocytes 60
- Article 2: Quantitative and qualitative study in keratinocytes from foreskin in children: Perspective application in paediatric burns. Burns 2010

2. Transplantation kératinocytaire autologue en suspension chez les enfants brûlés 61
- Article 3: Foreskin-isolated keratinocytes provide successful extemporaneous autologous paediatric skin grafts. J Tissue Eng Regen Med 2013

3. Données complémentaires 64

DISCUSSION ET PERSPECTIVES 68

BIBLIOGRAPHIE 74

AVANT PROPOS

La peau est un organe complexe qui enveloppe la surface du corps et se continue au niveau des orifices naturels par une muqueuse. Elle est l'organe le plus lourd du corps humain, représente 16 % du poids pour une surface de 1,2 à 2,3 m^2 et comprend 3 millions de cellules par cm^2 environ. La peau forme une barrière physique et physiologique active de protection de notre organisme. La perte de l'intégrité d'une grande surface de peau à la suite de brûlures entraîne une invalidité grave et même le décès, d'où l'importance vitale de la restauration rapide de la barrière épidermique.

Les brûlures sont la conséquence d'une agression thermique, électrique ou chimique. Elles sont particulièrement graves chez l'enfant qui est victime de nombreux accidents domestiques. Les brûlures de l'enfant arrivent en troisième position après les traumatismes et les intoxications, mais elles occupent le deuxième rang de la mortalité accidentelle (environ 80 décès/an en France), et le premier rang de la morbidité accidentelle en raison de la longueur des hospitalisations, de l'importance des séquelles et des handicaps.

Ces brûlures provoquent des séquelles lourdes, fonctionnelles et esthétiques, des douleurs physiques intenses, une culpabilité chez les parents, une angoisse et du stress non seulement pour l'enfant mais aussi pour la famille et les amis proches. Les cicatrices de la brûlure et du site donneur d'une greffe de peau fine restent présentes tout au long de la vie. Pour cette raison le choix approprié d'un traitement est essentiel pour minimiser la douleur dans les phases aiguës et améliorer les résultats des cicatrices sur le long terme. Ainsi, le traitement approprié des plaies est obligatoire ; diverses modalités thérapeutiques ont été utilisées pour améliorer et accélérer la cicatrisation.

Le traitement des patients avec une brûlure grave reste un problème clinique difficile, non seulement en raison de l'ampleur des lésions induites, mais aussi en raison de la petite surface de peau saine disponible pour le remplacement d'une large zone cutanée détruite. Des progrès substantiels dans les unités de réanimation pour la gestion d'un état de choc, du risque infectieux et des troubles métaboliques ont considérablement amélioré la prise en charge des brûlures aiguës. Toutefois, les procédures thérapeutiques en vue du remplacement de la peau détruite ont peu évolué. Si les brûlures ne sont pas rapidement fermées, la malnutrition, les déperditions hydro électrolytiques et l'invasion bactérienne ouvriront la voie à des complications importantes.

La transplantation de kératinocytes a marqué un tournant dans la greffe de peau, et avec une transplantation autologue les tissus blessés peuvent être restaurés sans encourir le risque d'un rejet.

Initialement, notre projet a commencé avec la société BIO*alternatives* qui cherchait des pièces opératoires pour disposer des kératinocytes. Ces cellules permettent *in vitro*, de construire un épithélium en 3 dimensions (3D) et de tester l'activité de différentes molécules, dont les cytokines identifiées dans la peau inflammatoire. Le LITEC (Laboratoire Inflammation Tissus Epithéliaux et Cytokines) de l'université de Poitiers, qui travaille en étroite relation avec BIO*alternatives*, est associé à ce projet. Grâce à une évaluation quantitative et qualitative *in vitro,* nous nous sommes rapidement rendu compte que les kératinocytes de prépuce de l'enfant ont une forte capacité de prolifération et de différenciation, bien supérieure à celle des kératinocytes issues du tronc chez l'adulte.

Ces observations nous ont incités à proposer l'utilisation des kératinocytes de prépuce comme une source potentielle pour assurer la couverture épidermique des brûlures chez les garçons. Il reste à trouver un site donneur adéquat pour une transplantation autologue chez les filles : un tel site pourrait être la région auriculaire constituée d'une peau fine et qui laisserait une cicatrice cachée…

INTRODUCTION

1. GENERALITES SUR LA PEAU

La peau comporte un épithélium de revêtement, l'épiderme, d'origine ectodermique et une couche de tissu conjonctif d'origine mésodermique, le derme. L'épaisseur cutanée (derme et épiderme) varie en fonction de la localisation: 0,6 mm pour le pavillon de l'oreille et le pénis, 0,7 mm pour une paupière supérieure, 1,6 mm pour une peau rétro auriculaire, 1,9 mm pour la région inguinale, 2 mm pour le cuir chevelu et 3,2 mm pour le dos. Sous la peau se trouve l'hypoderme, tissu sous cutané. C'est un tissu conjonctif associé à des amas d'adipocytes (pannicule adipeux), qui relie de façon souple la peau aux organes sous jacents. Dans la peau, des cellules épithéliales mais aussi des cellules immunitaires, conjonctives, musculaires, vasculaires et nerveuses sont présentes à coté de nombreuses annexes : poils, ongles et glandes exocrines (Harvey 2005, Della Volpe et al 2012).

2. L'ÉPIDERME

Du grec epi (sur) et derma (peau) désigne la couche superficielle qui assure la fonction de protection et recouvre le derme. Il est constitué d'un épithélium malpighien kératinisé organisé en couches successives (basale, épineuse, granuleuse et cornée). L'épaisseur de l'épiderme varie en fonction de la localisation : de 0,05 mm au niveau de la paupière supérieure ou la région inguinale, 0,07 mm dans la région rétro auriculaire et du cuir chevelu, 0,08 mm pour le pavillon auriculaire, 0,16 mm pour le pénis et 0,9 mm pour la région plantaire (Della Volpe et al 2012).

2.1 LES KERATINOCYTES

Les kératinocytes représentent la population majoritaire de l'épiderme (90 à 95%) et assurent la cohésion de par leur cytosquelette et les systèmes d'adhésion qu'ils établissent entre eux et la matrice extracellulaire (desmosomes et hémidesmosomes). Ils forment une barrière entre le milieu extérieur et le milieu intérieur, et protègent l'organisme des agressions externes et des radiations lumineuses grâce aux mélanosomes. Au delà d'une protection mécanique,

l'épiderme est un organe immunitaire majeur et intervient dans une fonction sensorielle essentielle, le toucher. Les autres types cellulaires épidermiques sont les mélanocytes, les cellules de Langerhans et les cellules de Merkel. L'épiderme ne contient ni vaisseau sanguin ni vaisseau lymphatique, mais renferme de nombreuses terminaisons nerveuses libres (Heath et al 2013). Chaque population cellulaire du revêtement cutané exerce un rôle clé. Dans cette introduction, nous évoquerons plus particulièrement la place des kératinocytes et des cellules immunitaires.

2.1.1 LES CELLULES BASALES

Séparé du derme par une lame basale, l'épiderme se régénère continuellement. Ce « turnover » constant est réalisé à partir de cellules de la couche basale. Cette couche basale contient les cellules souches épidermiques, de 2 à 3 μm, qui expriment des marqueurs membranaires comme l'integrine α6, et des marqueurs de cytokératine comme la K19. Ces cellules souches sont présentes chez l'enfant et l'adulte, et des cellules souches équivalentes ont été identifiées dans la plupart des organes : la peau, l'intestin, l'os, la moelle osseuse, le foie, le cœur, le cerveau, le pancréas… Au niveau de la peau, ces cellules représenteraient 0,01% de la population cellulaire épidermique et elles s'organisent par unité proliférative dans laquelle une cellule souche est entourée par une dizaine de cellules basales (figure 1). Trois compartiments cutanés les abritent : la membrane basale dans un foyer inter folliculaire, le follicule pileux et la glande sébacée. Les kératinocytes de la couche basale de l'épiderme au contact de la jonction dermo-épidermique forment une seule assise de cellules cylindriques de 6 à 10 μm à noyau allongé, dont le grand axe est perpendiculaire à la membrane basale. Ces cellules ont une forte adhérence avec le collagène IV (Fortunel et al 2003, Schneider et al 2003, Kaur 2006, Doma et al 2013). Une cellule souche présente un haut potentiel prolifératif, une grande capacité à s'auto-renouveler et peut se diviser d'une manière symétrique ou asymétrique (figure 2). Lors d'une division symétrique, (20% des cas) la cellule souche donne 2 cellules souches semblables ou 2 cellules progénitrices semblables « transit amplifying». En revanche, lors d'une division asymétrique (80% des cas), la cellule souche se divise en une cellule souche et une autre cellule qui va se différencier. Les cellules filles progénitrices vont entamer un processus de différenciation terminale vers des cellules différenciées. Ce processus est dénommé kératinisation ou cornification (Lavker at al 2000, Potten et al 2002, Kulukian et al 2013).

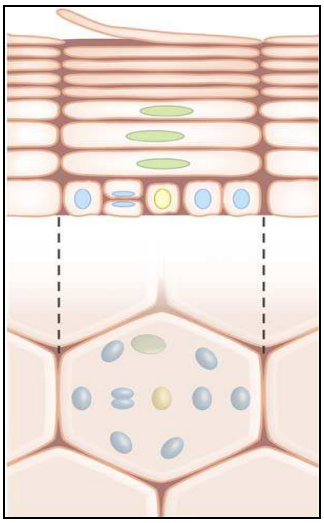
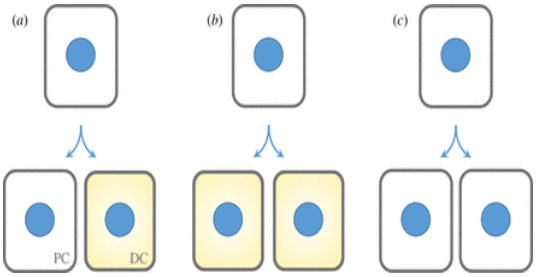
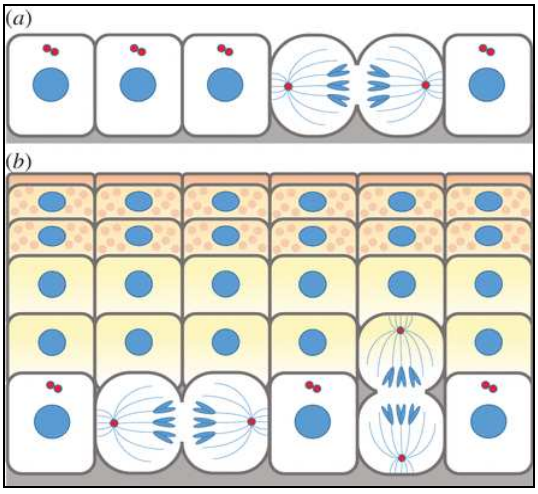


Figure 1.Organisation d'un épiderme murin avec une cellule souche (en jaune) pour 10 kératinocytes basaux. (Kulkian et al 2013).

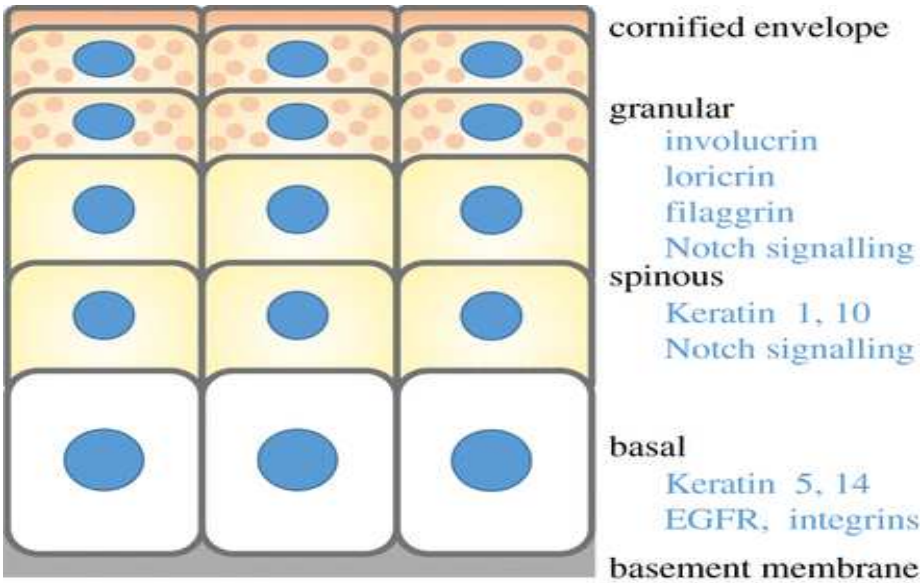
A



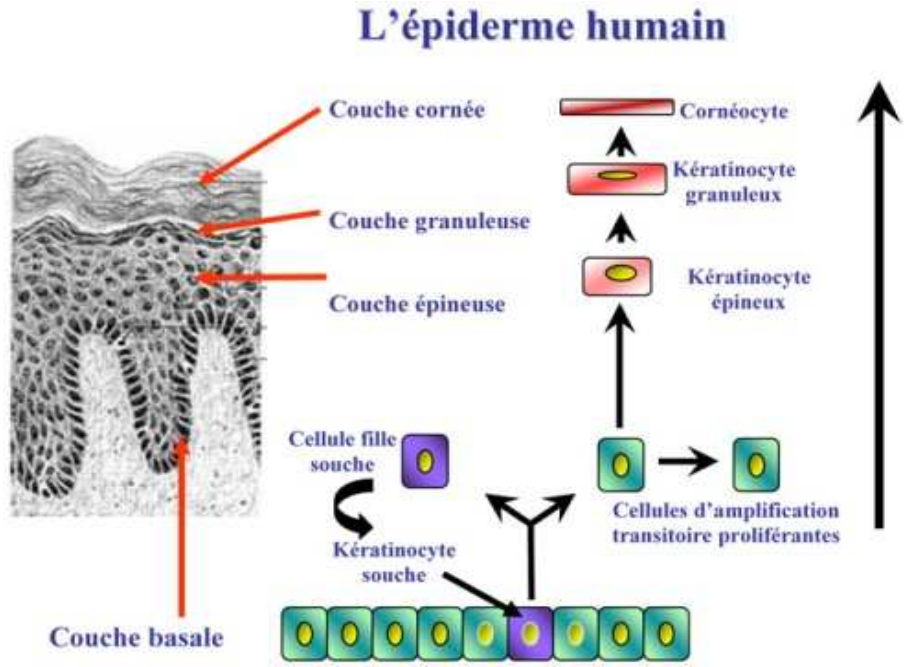
B



C-a



C-b



(b)

Figure 2. A Le renouvellement de l'épiderme est assuré par les kératinocytes souches. Ces derniers possèdent deux propriétés : celle de se diviser activement et celle de se différencier. (a) Lors d'une division asymétrique, une cellule reste sur place (PC : progenitor cell) tandis que l'autre migre vers la couche supérieure (DC : differentiated cell), où elle va donner les différents types de cellules épidermiques. (b, c) Lors d'une division symétrique, chaque kératinocyte donne naissance à deux cellules filles identiques. B (a) au stade embryonnaire, les divisions symétriques le long de la membrane basale sont fréquentes pour former la première assise. (b) Ensuite les divisions asymétriques deviennent prépondérante pour la stratification cutanée. Ces divisions horizontales ou parallèles à la membrane basale sont sous le contrôle des protéines et du micro environnement cellulaires (Kulkian et al 2013). C (a, b) Lors de la stratification, les kératinocytes n'expriment plus les marqueurs type integrines et expriment les marqueurs de différenciation épidermique (filaggrine, loricrine et involucrine) (I-STEM : Institut des cellules souches pour le traitement et l'étude des maladies monogéniques. Inserm, Université d'Evry-Val-d'Essonne).

Les cellules souches quiescentes n'expriment pas les gènes marqueurs de la prolifération et de la différentiation épidermique, et elles expriment des gènes bloquant la voie *NOTCH*, la voie *WNT*, la voie *SHH*, la voie de l'insuline, la voie du *FGF*, la voie *JAK/STAT*, *BMP* et *TGF-β* (Schluter et al 2011). Des études in vivo montrent que des facteurs de transcription exprimés au niveau des cellules souches sont importants pour une prolifération épidermique normale. Ainsi, la perte tissulaire épidermique est importante chez les souris déficitaires en p63 (Mills et al 1999, Yang et al 1999, Koster et al 2004). Également, la surexpression de *C-myc* conduit à une hyper prolifération inter folliculaire épidermique avec une perte de la différentiation des kératinocytes (Waikel et al 2001, Frye et al 2003). Enfin, la délétion de *Rac-1* est responsable d'une réduction importante de tissu inter folliculaire (Benitah et al 2005) et celle de *C-jun* et *Junb* conduit à la dérégulation de la régénération épidermique médiée par *Fgf7* (Szabowski et al 2000).

La membrane basale assure le support mécanique pour l'adhésion de l'épiderme et détermine l'organisation spatiale des kératinocytes. C'est une barrière sélective permettant le contrôle des échanges moléculaires et cellulaires entre les deux compartiments, et qui joue un rôle fondamental lors de la cicatrisation.Quatre zones sont classiquement distinguées dans la jonction dermo-épidermique, de l'épiderme vers le derme :

1. La membrane plasmique des cellules de la couche basale de l'épiderme.

2. La lamina lucida d'une épaisseur de 20 à 40 nm qui est traversée par des filaments d'ancrage de diamètre 5 à 7 nm, riches en laminine 332 (anciennement laminine 5) et311 (anciennement laminine 6) qui se lient à la portion extracellulaire de l'intégrine α6β4 à la surface des kératinocytes. Entre les hémidesmosomes, les filaments d'ancrage sont moins abondants et leur composition est différente, puisque c'est l'intégrine α3β1 qui est alors associée au complexe laminine332-laminine 311 ou 321(anciennement laminine 7).

3. La lamina densa, d'une épaisseur de 30 à 60 nm, est majoritairement constituée de collagène IV mais également de laminines 511 (anciennement laminine 10) et 321, de nidogène, et de protéoglycannes, en particulier, le perlecane. Elle constitue une zone d'ancrage intermédiaire pour les filaments issus de l'épiderme et les fibres issues du derme papillaire.

4. La zone fibrillaire, la plus profonde, comprend des fibres d'ancrage de collagène VII, d'une épaisseur de 20 à 60 nm, qui s'élargissent à leur extrémité et présentent sur leur partie médiane des bandes de périodicité irrégulière, soit denses et épaisses, soit fines et claires. Ces

fibres font le lien entre la lamina densa et les plaques d'ancrage dans le derme papillaire (figures 3, 4) (Watt et al 1994).Les hémidesmosomes qui relient la cellule basale à la jonction dermo épidermique en ancrant le cytosquelette de kératines, se composent de trois plaques denses.Une plaque interne à laquelle sont reliée des filaments intermédiaires des cytokératines (K5 et K14) par l'intermédiaire de la plectine et de l'antigène de la pemphigoïde bulleuse (BP230 ou BPAG1). Ensuite, une plaque externe accolée à la membrane cytoplasmique qui contient les parties cytoplasmiques de BP180 et de la sous unité b4 de l'intégrine α6β4. Enfin, une plaque sous-basale dans la lamina lucida, formée par la jonction entre les deux protéines transmembranaires, l'intégrine α6β4 et l'antigène de la pemphigoïde bulleuse BP180 (BPAG2 ou collagène XVII) et la laminine-332 (Villone et al 2008, Breitkreutz et al 2009).

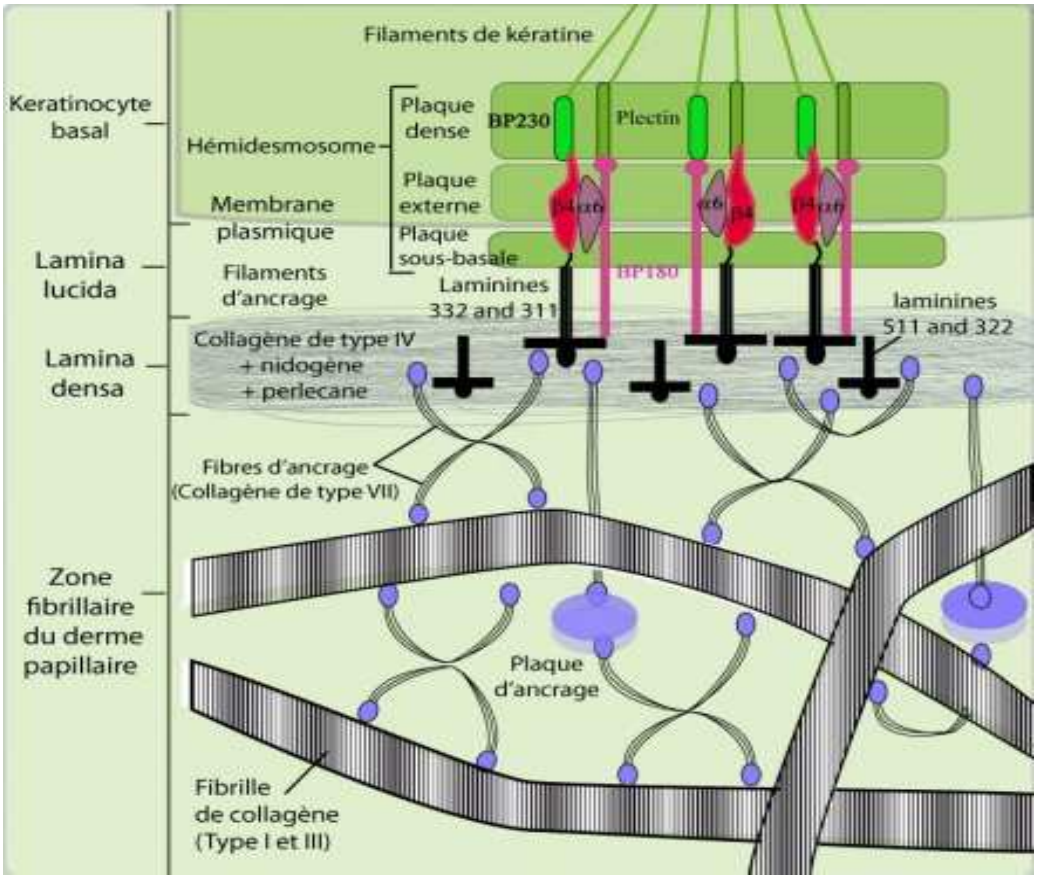


Figure 3. Représentation schématique de la jonction dermo-épidermique. E Burty, biologie de la peau.

Les filaments d'ancrage constitués de la laminine 332 et de la partie extracellulaire de BP180 partent de la plaque sous-basale, traversent la lamina lucida pour se connecter aux fibrilles d'ancrage au sein de la lamina densa. La fonction d'adhésion des hémidesmosomes est donc assurée par des interactions entre les filaments intermédiaires de kératines (K5 et K14), la plaque dense (BPAG1 et plectine), les fins filaments d'ancrage (intégrines et BPAG2), la

lamina densa (laminines 332 et 311), les fibrilles d'ancrage (collagène VII) et les fibrilles de collagène (type I et III) du derme papillaire.

2.1.2 LA DIFFERENCIATION KERATINOCYTAIRE

Les cellules souches sont dénommées selon leur tissu d'origine : cellules souches de la moelle osseuse, hématopoïétique, endothéliales, dermiques, épidermiques, etc... Le passage des kératinocytes de la couche basale à la couche épineuse est caractérisé par un changement d'expression des kératines (K5, K14, K15, K19) vers celle de kératines épidermiques supra basales (K1, K10) et par la production des marqueurs de différenciation (figure 4). Les kératinocytes différenciés s'engagent à former les couches supra basales et les premières couches sont spineuses. Les cellules épineuses forment 3 à 4 assises en peau fine et 5 à 6 en peau épaisse. Elles sont polyédriques à noyau arrondi et semblent, sur les préparations où il existe une certaine rétraction du cytoplasme, accrochés entre elles par des épines. Cet aspect épineux est du à la présence des desmosomes. Dans le cytoplasme des cellules épineuses, les trousseaux des tonofilaments en kératine sont tendus entre les plaques denses des desmosomes et participent au maintien de la cohésion de l'épiderme (Blitterswijk et al 2008).

Dans la couche granuleuse, les kératinocytes allongés atteignant 25 µm de grand axe et forment une à deux assises de cellules en peau fine, trois à quatre en peau épaisse. Les cellules sont aplaties, leur noyau est parallèle à la jonction dermo-épidermique et possède un cytoplasme rempli de granulations. Ces grains de kératohyaline sont des plages étoilées, sans membrane limitante, très denses aux électrons, intimement associées aux tonofilaments. La molécule de kératohyaline est la profilaggrine. Il y a également dans le cytoplasme des kératinosomes qui sont petits, ovalaires, entourés d'une membrane et présentent une striation périodique où alternent des bandes sombres fines et des bandes claires plus larges. A la jonction entre la couche granuleuse et la couche cornée, au niveau du pôle apical des kératinocytes, les corps lamellaires fusionnent avec la membrane plasmique et déversent leur contenu lipidique dans les espaces inter-cornéocytaires. Les lipides présents dans les corps lamellaires sous la forme de structures discoïdales, une fois libérés, fusionnent pour constituer d'amples lamelles qui se superposent parallèlement à la surface des cornéocytes et forment un ciment intercornéocytaire compact qui joue un rôle clé dans la fonction « barrière » de l'épiderme et assure l'étanchéité. Les lipides des granules lamellaires vont être modifiés dans

les espaces intercornéocytaires en céramides, sulfate de cholestérol et acides gras libres par des enzymes spécialisées.

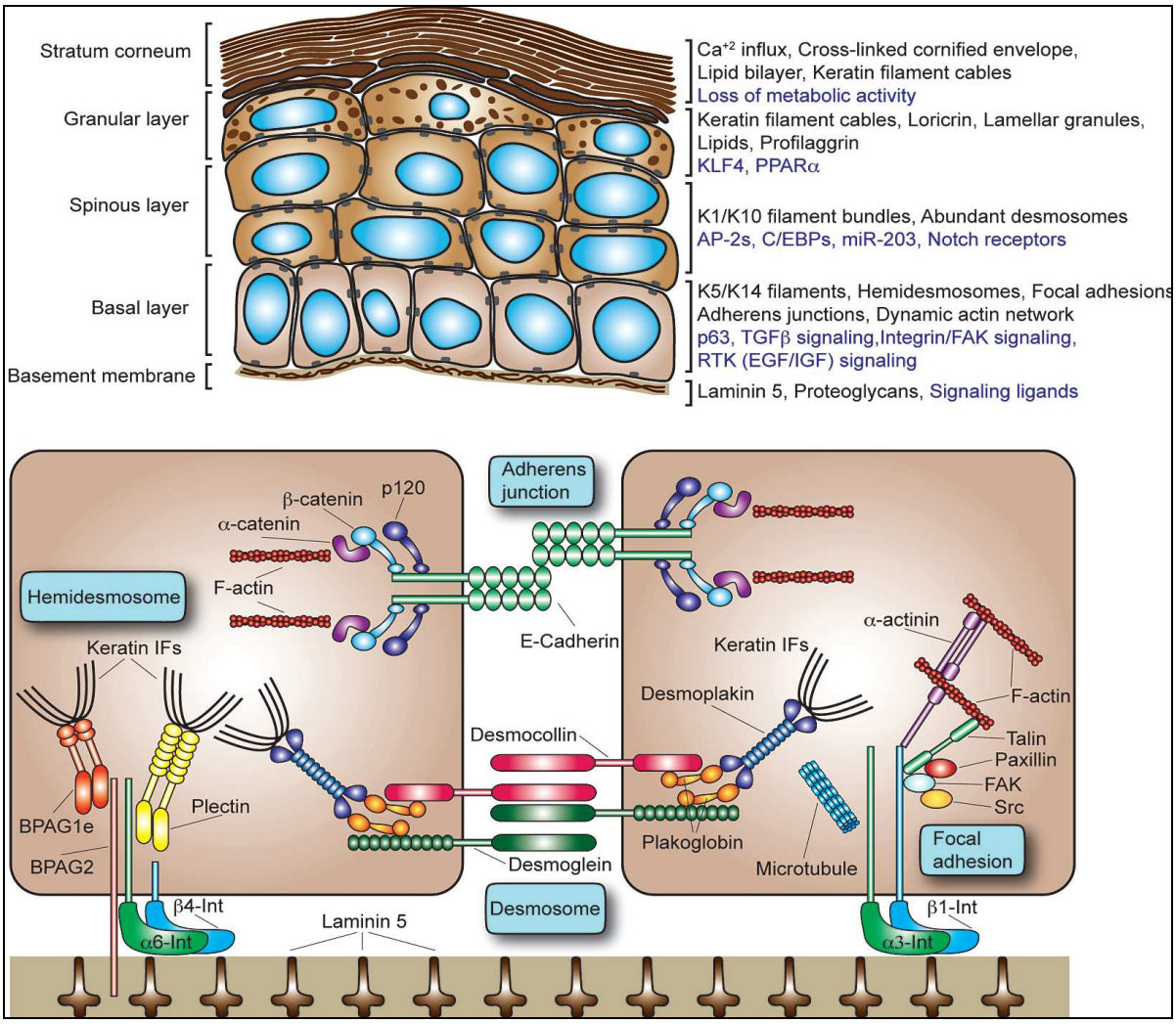


Figure 4. Architecture cellulaire de l'épiderme et les principaux composants du cytosquelette épidermique. (A) marqueurs moléculaires kératinocytaires clés (en noir) et mécanismes de régulation et de l'activité de signalisation (en bleu). (B) Principaux éléments du cytosquelette dans les kératinocytes et moyens de la cohésion épidermique. Fuchs et al. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 2008.

Dans la couche cornée, la profilaggrine se transforme en filaggrine pour former la matrice cytoplasmique des cornéocytes très allongés de 30 à 40 µm. Comme son nom l'indique, la filaggrine est capable d'agréger des filaments. Elle est responsable du passage de l'organisation en trousseaux à une organisation en réseau. Ensuite, la filaggrine est protéolysée en acides aminés polaires libres, en acide urocanique et en acide pyrrolidone carboxylique qui constituent les facteurs hydratants naturels en surface. L'enveloppe cornée contient d'autres molécules, parmi lesquelles les plus connues et les plus étudiées sont la loricrine et l'involucrine. La desquamation, qui correspond à la libération des cornéocytes, résulte de l'activité d'enzymes de la famille de la trypsine et chymotrypsine qui sont

responsables de la destruction des attaches inter-cornéocytaires et de la desquamation (Boutonnat 2007). Normalement, une cellule kératinocytaire met un mois pour passer de la couche basale à la couche cornée lors d'un processus de différenciation. Au dernier stade, les kératinocytes ne sont plus vivants : ce sont des cellules mortes par apoptose. Pour obtenir des kératinocytes à partir des cellules souches, des travaux *in vitro* ont été réalisés en employant un cocktail de cytokines exogènes, de facteurs de croissance, de produits chimiques et une matrice extracellulaire (ECM), qui exerceraient une action non spécifique pléiotropique sur la différenciation de cellules souches en plusieurs lignées. En utilisant une telle approche, Coraux et al en 2003 ont obtenu l'engagement des cellules souches murines dans la lignée kératinocytaire en présence d'un cocktail combinant la protéine morphogénétique osseuse 4 (*Bmp 4*), de l'ascorbate et des fibroblastes humains et murins NIH-3T3. Néanmoins, les auteurs ont signalé un degré élevé (80%) de différenciation non spécifique en plusieurs lignées non caractérisées. Récemment, des kératinocytes humains ont été obtenus à partir des cellules souches en modifiant le protocole de culture pré existant. En 2009, Guenou et al ont obtenu des kératinocytes humains (K-CSEh) issus des lignées souches (ESC) H9 (Wicell, Madison, Etats-Unis) et SA01 (Cellartis, Götenborg, Suède) mises en culture avec BMP4 et l'acide ascorbique pendant 40 jours. Cette étude montre une perte progressive des gènes *OCT4* et *NANOG*, marqueurs des cellules pluripotentes en culture, puis une expression transitoire des cytokératines K8 et K18, suivie de l'induction et du maintien de K5 et K14. Ces kératinocytes possèdent tous les marqueurs normaux de la différenciation et produisent en culture un épiderme pluristratifié qui a pu être greffé avec succès chez des souris immunodéficientes. En outre, les K-CSEh ont montré une faible expression des antigènes HLA (figure 5).

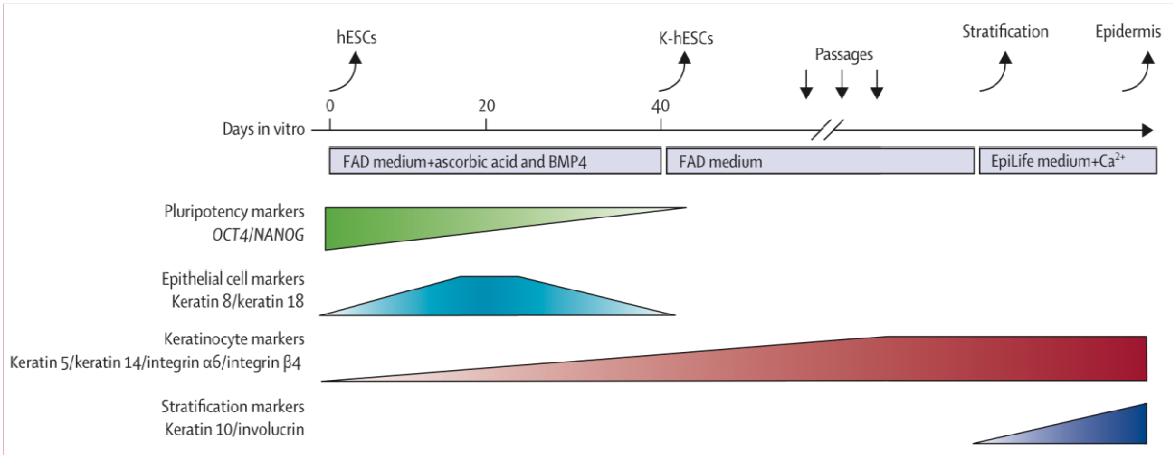


Figure 5. hESCs: human embryonic stem cells. K-hESCs: keratinocytes derived from hESCs. BMP4: bone morphogenetic protein 4. Guenou et al. Lancet 2009.

Nous avons cité les travaux et les procédures qui mènent une cellule souche vers le stade ultime de la différenciation, mais le schéma inverse est aussi décrit. *In vitro,* des cellules matures peuvent engendrer des kératinocytes sous certaines conditions de culture. Les progrès récents dans ce domaine sont saisissants, Yamanaka en 2008 (co-récipiendaire du Prix Nobel 2012 avec John Gurdon) a montré que l'introduction de quatre gènes (*Oct-3/4, Sox2, c-Myc et Klf4*) dans une cellule fibroblastique pouvait reprogrammer la cellule vers un état embryonnaire. Le défi dans les années à venir consistera à transférer effectivement toutes ces avancées à la pratique clinique de routine (figure 6) (Uitto 2011). Dans notre pratique chirurgicale quotidienne, nous avons choisi de récupérer les cellules souches épidermiques à l'aide d'une biopsie cutanée de faible surface. L'objectif étant d'employer ces cellules dans la cicatrisation des plaies et des brûlures chez les enfants.

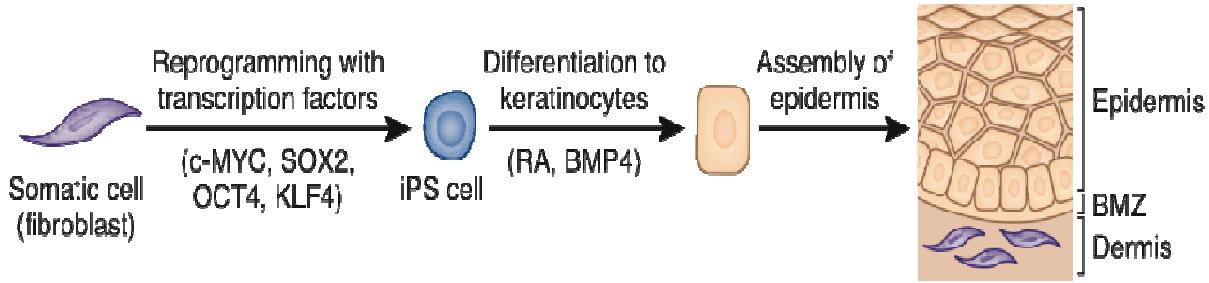


Figure 6. iPS: induced pluripotent stem, RA: retinoic acid, BMP4: bone morphogenic protein-4, BMZ : basement membrane zone. (Uitto 2011).

3. LE DERME

D'origine mésoblastique, le derme est le tissu conjonctif qui soutient l'épiderme et le rattache au tissu cellulaire sous cutané. La surface du derme est très irrégulière; elle présente de nombreuses projections (papilles dermiques) qui s'imbriquent avec des projections épidermiques (crêtes épidermiques). Ces papilles, plus nombreuses dans la peau souvent soumise à des pressions, augmentent et renforcent la jonction dermo-épidermique. Les cellules dermiques sont plus abondantes dans le derme papillaire que dans le derme réticulaire. Elles forment deux populations : une population comprenant les fibroblastes et fibrocytes qui, en produisant la matrice extracellulaire, fournissent la structure de base du derme, et une population de cellules d'origine hématopoïétique faisant partie intégrante du système immunitaire (les cellules dendritiques dermiques, les cellules plasmacytoïdes dendritiques dermiques, les lymphocytes, les mastocytes et les macrophages) que nous allons

évoquer dans les paragraphes suivants. Le derme est formé d'une couche papillaire superficielle et fine, tissu conjonctif lâche, riche en cellules, et d'une couche réticulaire plus épaisse, dense, irrégulière, contenant surtout des fibres de collagène I et des glycosaminglycanes (GAG) et moins de cellules. Dans le derme sont également présentes des fibres élastiques, les plus épaisses dans la couche réticulaire profonde et les plus fines situées vers la surface. Au cours du vieillissement, les fibres de collagène s'épaississent et se fragmentent; les fibres élastiques augmentent d'abord en nombre et en épaisseur, puis disparaissent ce qui entraîne la perte de la souplesse et l'apparition des rides. Enfin, le derme contient un important réseau vasculaire et lymphatique, des glandes sudoripares et sébacées, des follicules pileux, et une riche innervation. Les vaisseaux n'existent que dans le derme et l'hypoderme; l'épiderme est un épithélium non vascularisé dont la nutrition s'effectue à travers la lame basale par diffusion. Il existe deux plexus artériels: le plexus superficiel est situé entre la couche papillaire et la couche réticulaire; le plexus profond entre le derme et l'hypoderme. De fines branches quittent ces plexus et vascularisent les papilles dermiques. Ce réseau est complété par 3 plexus veineux, deux correspondent aux artérioles et un se situant au milieu du derme. Les anastomoses artério-veineuses y sont fréquentes surtout dans la peau épaisse: elles ont l'aspect d'un canal tortueux unissant l'artériole à la veinule et faisant communiquer les plexus profonds et superficiels. Elles constituent un court-circuit possible qui permet la variation du débit sanguin et participent à la régulation thermique. Les lymphatiques sont des sacs borgnes situés au niveau dermique; ils forment deux réseaux parallèles aux plexus artériels, superficiel et profond. Il est intéressant de signaler une riche vascularisation et innervation du bulbe folliculaire et plus particulièrement d'une zone élargie sous la glande sébacée, le « bulge » (Boutonnat 2007).

4. LES CELLULES IMMUNITAIRES ET LES CYTOKINES DANS LA PEAU

Longtemps, la peau a été décrite comme une simple barrière de protection physique. Cette notion a été complètement bouleversée par les connaissances actuelles qui démontrent un puissant pouvoir immunitaire inné et adaptatif de la peau. C'est depuis les années 80 que la notion de SIS « Skin Immune System » s'impose, système qui présente la première ligne de défense face aux agressions extérieures (Nestle et al 2009).

Ce système englobe une composante cellulaire formée par les kératinocytes, les cellules dendritiques, les monocytes/macrophages, les granulocytes, les mastocytes, les lymphocytes et enfin les cellules endothéliales (figure 7).

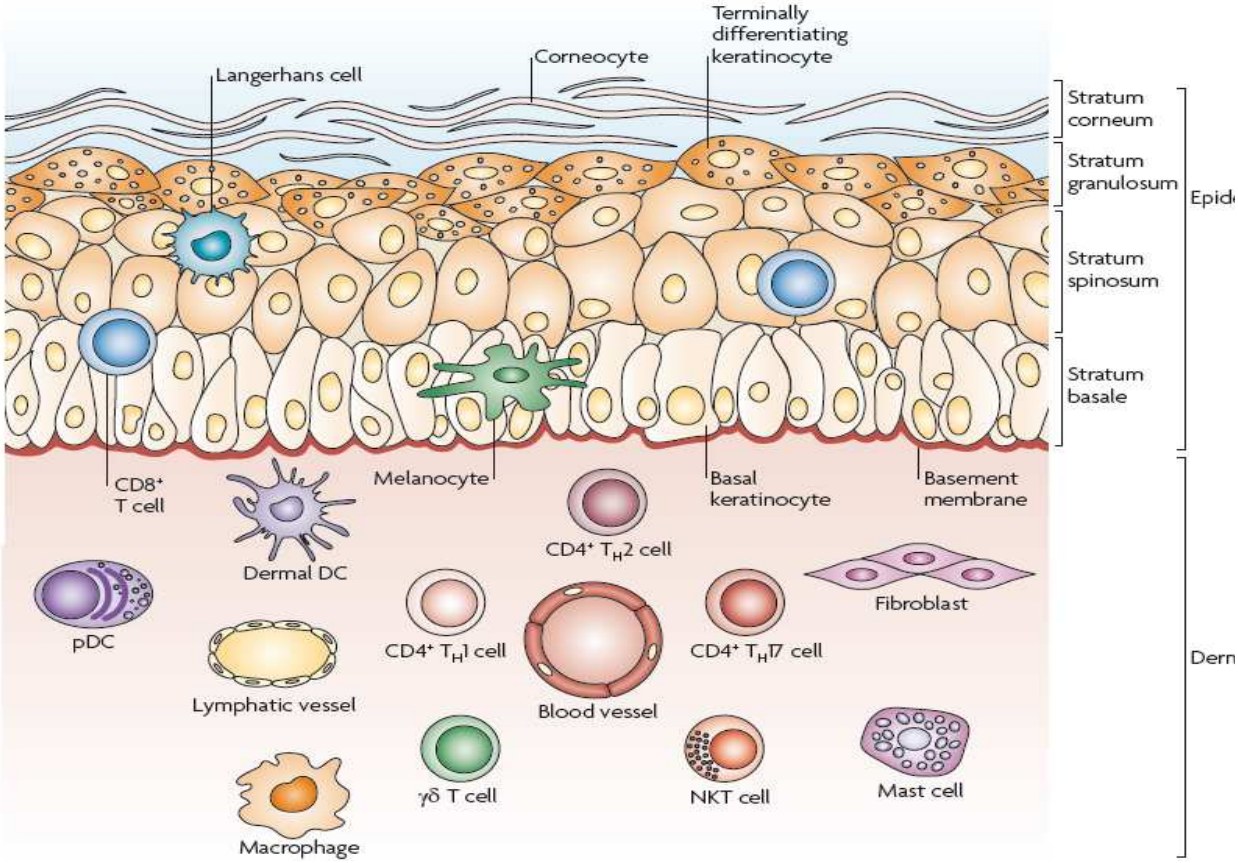


Figure 7. Présentation schématique des populations cellulaires dermo-épidermiques. Bos et Luiten. Springer 2009.

Outre cette composante cellulaire, il existe une composante humorale liée aux réponses immunes innées et acquises formée des β defensines, des cathelicidines (LL37), des molécules du complément, des immunoglobulines, des cytokines, des chimiokines, des prostaglandines, des neuropeptides et des radicaux libres. Avant d'évoquer rapidement les cellules immunitaires, nous commencerons par citer la place des kératinocytes dans la défense de l'organisme. Les kératinocytes, majoritaires au niveau épidermique échangent avec toutes les populations cellulaires et avec leur environnement. Ils sont sensibles à de nombreuses cytokines et en produisent un grand nombre, avec des implications importantes anti microbiennes et inflammatoires. Ils sont capables de secréter des cytokines, des nombreuses chimiokines et des protéines anti infectieuses (S100A7, S100A8, S100A9, β-defensines 1 et

2…) induites par les cytokines (IL-22, IL-17A et F et l'OSM). Egalement, ces cellules secrètent les facteurs nécessaires à une régénération tissulaire (MMP-1 et 2, CXCL5) induits par les cytokines IL-22, OSM et TNF (Boniface et al 2005, 2007, Guilloteau et al 2010, Sonnenberg et al 2010). Ce système cutané immunitaire travaille en symbiose avec le micro environnement. Dans les conditions normales, les bactéries saprophytes de la peau telle S. Epidermidis, par leur sécrétion PSM « phénol-soluble modulin » collaborent avec les kératinocytes qui sécrètent les β défensines pour la lutte contre l'infection (figure 8).

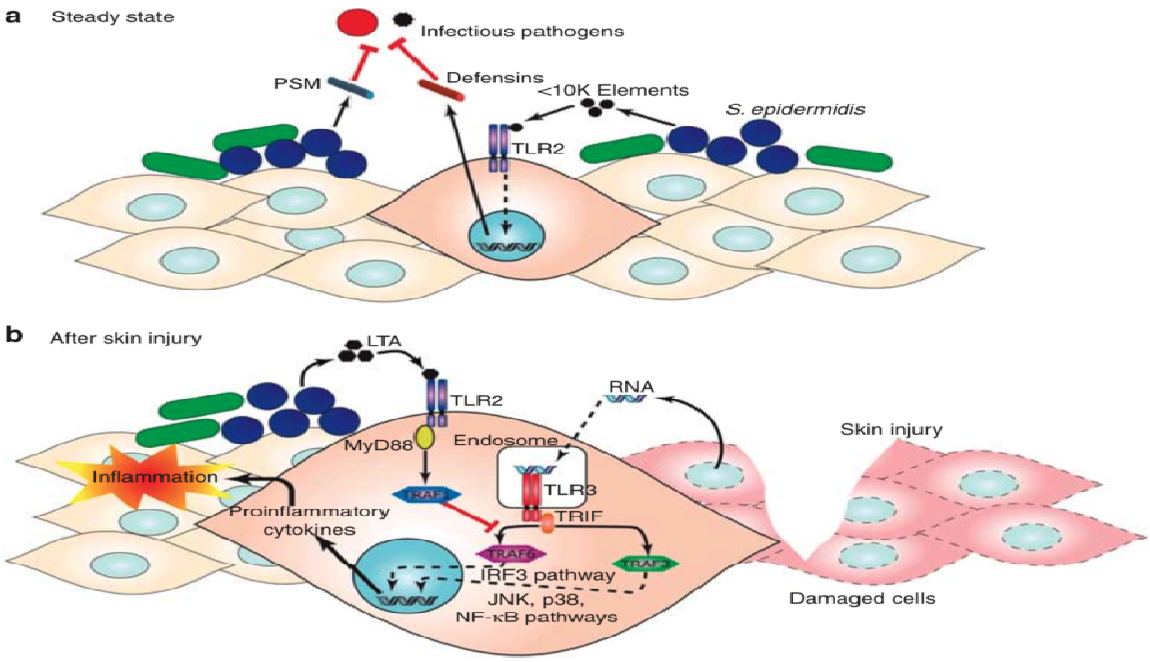


Figure 8. PSM: phénol-soluble modulin, IRF: IFN-regulatory factor, JNK: C-JunN-terminal kinase, LTA: lipoteichoic acid, MyD88: myeloid differentiation primary response gene 88, TLR: Toll-like receptor, TRAF: tumor necrosis factor receptor-associated factor, TRIF: TIR-domain-containing adapter-inducing IFN-β.
Gallo et al. J Invest Dermatol 2011.

Cette coordination devient plus sophistiquée lors d'une effraction cutanée. Par la sécrétion de LTA « lipoteichoic acid », le rôle du germe saprophyte devient essentiel pour éviter un processus inflammatoire exagéré source d'une cicatrisation néfaste et de très mauvaise qualité (Gallo et al 2011). Ces données nous mènent en pratique clinique à employer avec parcimonie les antiseptiques et les désinfectants cutanés lors des soins des plaies pour épargner les saprophytes. Par ailleurs, au cours d'une atteinte cutanée et une lyse cellulaire, les kératinocytes libèrent aussi certaines cytokines IL-1α, IL-33… (DAMPs : Damage-associated molecular patterns) qui serviront d'alarmines au système immunitaire (Chen et al 2010). Egalement, sous certaines conditions et après l'activation de l'inflammasome par les UVB, la

caspase-1 va cliver le pro IL1-β et libérer l'IL-1β dans sa forme mature par les kératinocytes. Ce phénomène expliquerait l'apparition d'une réaction inflammatoire, lors d'une brûlure superficielle en absence d'infection (Yazdi et al. 2010). Enfin, les kératinocytes activées, en particulier par l'IFNγ peuvent jouer le rôle de cellule présentatrice de l'antigène.

4.1 LES CELLULES DENDRITIQUES DE LA PEAU

Les cellules dendritiques d'origine hématopoïétique sont des cellules spécialisées présentatrices de l'antigène. Elles englobent de nombreuses populations cellulaires avec des phénotypes et des fonctionnalités complexes (cellules de Langerhans, cellules dendritiques dermiques, cellules plasmacytoïdes dermiques…). Les cellules dendritiques de Langerhans représentent la troisième population cellulaire de l'épiderme en composant (5%). *In vitro*, les cellules dendritiques peuvent être produites à partir de précurseurs CD34+ de la moelle. Ces cellules migrent vers la peau, s'y installent et y acquièrent leur morphologie dendritique et un phénotype spécifique. Ainsi, au niveau épidermique, les cellules de Langerhans possèdent l'E-cadhérine et l'antigène Lag (associé aux granules de Birbeck). Elles expriment également beaucoup d'autres marqueurs, au premier rang desquels les molécules de classe II (et I) du CMH et le CD1a, utilisés en routine pour les identifier. Elles se caractérisent par un réseau peu dense de filaments intermédiaires (vimentine), un reticulum endoplasmique et un appareil de Golgi très développés et surtout par la présence pathognomonique de granules de Birbeck en raquettes. Ces granules disparaissent quand les cellules de Langerhans migrent dans le derme, si bien que ni les cellules voilées dermiques, ni les cellules interdigitées dans le cortex lymphatiques n'en contiennent. Une des fonctions principales de ces cellules dendritiques immatures est de capturer les exoantigènes par la voie des endosomes, de les apprêter et de les réexprimer en surface avec les molécules de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) et des marqueurs de co-stimulation (CD80-CD86). Elles deviennent alors matures et expriment le récepteur de chémokine CCR7 pour migrer vers les zones riches en cellules T et former avec elles une « synapse immunologique » (Randolph et al 2008, Colonna et al 2010).

Sous l'influence d'IL-1, TNF, IFN et TSLP ces DC activées vont sécréter des combinaisons de cytokines (IL-1, IL-6, TNF, IL-12 et IL-23) et dans ce contexte, des lymphocytes Th1, Th2 ou Th17 seront induits. En outre, les macrophages résidents en synthétisants de l'IL-10,

maintiennent l'expression du facteur FoxP3 (forkhead box P3) au niveau des T régulateurs. Ces macrophages favorisent la réparation épithéliale en exprimant le HB-EGF et la prolifération fibroblastique par la sécrétion de TGFβ et de PDGF.

4.2 LES LYMPHOCYTES RESIDENTS DE LA PEAU

Nous savons aujourd'hui que les lymphocytes sont présents à l'état normal dans le tissu cutané et sont détectables grâce au marquage CD3. Le compartiment lymphocytaire cutané a été évalué à 1 million de cellules par cm^2, ce qui représente le double des cellules T circulantes (Clark et al 2006). Les lymphocytes mémoires de la peau expriment majoritairement l'antigène cutané lymphocytaire (CLA) qui est un ligand pour les sélectines P et E. Les cellules T exprimant CLA, expriment également le CD45R0 et n'expriment que peu le CCR7. Dans un environnement cytokinique spécifique, les cellules dendritiques évoquées dans le paragraphe précédent jouent un rôle majeur dans la stimulation et la différentiation orientée des T naïfs (figure 9).

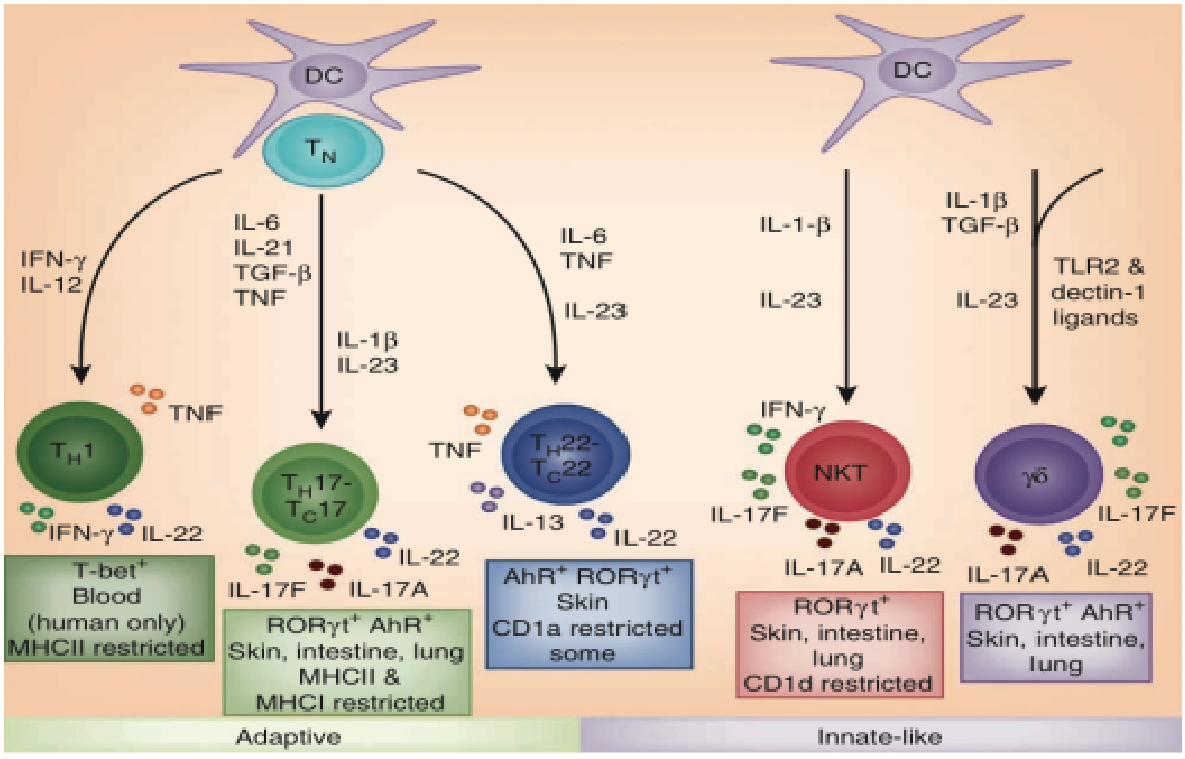


Figure 9. TN: naive T cell, TLR2: Toll-likereceptor 2. Sonnenberg et al. Nature Immunology 2011.

Initialement, deux phénotypes cellulaires T ont été décrits : les cellules Th1 (STAT4, T-bet : Tbox expressed in T cell) qui produisent principalement de l'IFNγ et les cellules Th2 (STAT6, GATA3) qui produisent l'IL-4, IL-5 et IL-31 et expriment CCR4 et CCR8 (Clark et al 2010). Ensuite, les cellules T régulatrices (iTreg : CD4+, CD25+) qui expriment FoxP3 (Forkhead transcriptional repressor) sont venues étoffer le groupe au niveau périphérique (Josefowicz et al 2009). En 2006 les TH17 qui expriment CCR6 (RoRγ : orphan retinoid receptor) ont été identifiés (Bettelli et al 2006). Enfin, les Th22 (AHR : aryl hydrocarbon receptor) qui produisent l'IL-22, jouent également un rôle dans l'inflammation cutanée (Duhen et al 2009). Notons au passage que les Th17 produisent aussi de l'IL-22 (Bernard et al 2012, Lecron et al 2013).

4.3 LES FACTEURS DE CROISSANCE ET LES CYTOKINES DE LA PEAU

Les connaissances des mécanismes moléculaires et cellulaires dans la cicatrisation des plaies et la régénération tissulaire ont conduit à l'utilisation des facteurs de croissance dans le traitement des lésions cutanées. L'identification des polypeptides connus comme facteurs de croissance et/ou cytokines et leur rôle dans la cicatrisation datent de plusieurs décennies. Toutefois, leur potentiel comme agents thérapeutiques dans la cicatrisation n'est pas encore clairement élucidé. L'epidermal growth factor (EGF) constitue l'un des premiers facteurs de croissance décrits, dont l'identification a apporté le Prix Nobel à Stanley Cohen en 1962. L'EGFest un mitogène pour les cellules épithéliales, mésothéliales et endothéliales. Il accélère la ré-épithélialisation, la prolifération et la résistance du derme. Il intervient favorablement dans la cicatrisation endothéliale par le biais du vascular endothelial growth factor (VEGF), médiateur primordial de l'angiogénése. Ce dernier stimule également l'épithélialisation et la déposition du collagène dans le derme. Le Platelet-derived growth factor (PDGF) est un médiateur clé dans la cicatrisation des plaies, a été le premier facteur de croissance recombinant (rh PDGF) approuvé pour une application topique visant à accélérer la fermeture des plaies. Le PDGF est libéré par les plaquettes et sécrété par les macrophages activés. Sa production est importante dans les premiers stades de la réponse inflammatoires, avec un pic important au 3° jour. Dés le début de la cicatrisation, le PDGF a un rôle chimiotactique et mitogène pour les fibroblastes. Ensuite, il stimule la différenciation des fibroblastes, puis est impliqué dans la phase de remodelage. Dans la grande famille du fibroblaste growth factor (FGF), le rôle du basicFGF (bFGF) dans la cicatrisation des plaies a

été démontré *in vitro* et *in vivo*. Il active les macrophages, augmente la production de composants de la matrice extracellulaire, stimule la prolifération des fibroblastes, la prolifération des cellules endothéliales et l'angiogenèse. L'acideFGF (aFGF), analogue par ses propriétés biologiques au bFGF, stimule également la prolifération des fibroblastes et des cellules endothéliales et accélère la cicatrisation et l'angiogenèse. Ainsi, l'utilisation de l'aFGF recombinant (rh aFGF) sur un site donneur et du rh bFGF bovin sur une greffe de peau fine induit l'accélération de la cicatrisation (Fu et al 2000, Ma et al 2007). Le kératinocyte growth factor1 (KGF-1 : FGF7), un autre membre de la famille FGF, favorise la ré-épithélialisation par ses effets sur la prolifération et la différenciation des cellules épithéliales et l'inhibition de l'apoptose. KGF-2 stimule également la réépithélialisation, la formation de tissu de granulation et le dépôt de collagène dans la plaie. L'administration par voie intra musculaire de rhGH (growth hormon) accélère la cicatrisation des sites donneurs (Herndon et al 1990). Le même résultat est observé quand on administre le rhGH par voie sous cutanée chez les patients brûlés à 40% de surface corporelle (SC). Chez les patients traités par GH, les auteurs ont noté un taux systémique élevé d'IGF1 et une augmentation de l'expression locale des récepteurs d'IGF-1 (Herndon et al 1995). De la même manière, ce type de traitement a démontré sa fiabilité et son efficacité chez les enfants brûlés (Ramirez et al 1998). L'Insulin-like growth factor (IGF) II et I sont des agents pro-anaboliques et anti-cataboliques qui agissent sur de nombreux types de cellules. Le nerve growth factor (NGF) pourrait aussi avoir des effets prolifératifs et anti-apoptotiques sur les kératinocytes et les cellules endothéliales et promouvoir la migration des fibroblastes (Radtke et al 2013). D'autres facteurs interviennent dans la cicatrisation cutanée. Les différentes isoformes du transforming growth factor TGF-β1, TGF-β2 et TGF-β3 partagent un certain nombre de fonctions telles que la stimulation de la prolifération des fibroblastes, la production de composants de la matrice extracellulaire et des molécules d'adhésion. Le Granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) stimule la ré-épithélialisation en favorisant la migration et la survie kératinocytaire, la néo vascularisation, et améliore la qualité et la quantité de tissu de granulation à travers la prolifération des cellules endothéliales (Ching et al 2011).

Différents auteurs ont étudié la présence de ces facteurs *in vivo* chez les patients brûlés, et *in vitro* dans les cultures cellulaires. Ainsi, dans la sérosité des 24 sites donneurs de peau fine, Ono et al en 1995 ont montré la présence constante de grandes quantités de PDGF, d'IL-6, de TGFα, de TGFβ et de faibles quantités d'EGF et de bFGF. Les kératinocytes sécrètent une multitude de molécules biologiques actives qui contribuent à la réaction inflammatoire et à la

guérison des plaies. Outre leur interaction intime avec les cellules immunitaires, ils contrôlent le comportement des fibroblastes au cours de la cicatrisation par la sécrétion, l'activation ou l'inhibition des cytokines et des facteurs de croissance. Les kératinocytes sont aussi activés par des cytokines comme l'OSM qui dispose du récepteur du type 2 et induit une phosphorylation de STAT3 (Boniface et al 2007). L'OSM augmente la prolifération, la motilité, l'expression des défensines et de la psoriasine avec une altération de la différenciation kératinocytaire. De même, *In vitro,* les kératinocytes soumis à l'IL-22 acquièrent un phénotype de psoriasis. L'étude du transcriptome montre que l'IL-22 et l'OSM augmentent l'expression des protéines de la famille S100, du PDGFA, de CXCL5 et diminuent l'expression des protéines de la différenciation. Si nous considérons en plus l'hyperplasie épidermique et l'augmentation de la mobilité, il s'avère que l'effet de l'IL-22 est proche de celui de l'OSM, et d'autant plus que les voies de signalisation pour les 2 cytokines sont presque équivalentes (STAT1, STAT3 et MAPK) (Boniface et al. 2005, 2007).

5. LA PEAU DE L'ENFANT

Notre étude sur les kératinocytes s'est principalement focalisée sur la peau de l'enfant. La peau de l'enfant possède un épithélium pluri stratifié dés la 21eme semaine gestationnelle. L'organisation cutanée en monocouche s'étale de la 6eme semaine et jusqu'à la 9eme semaine, où l'ectoderme avec sa simple couche monocellulaire recouvre le mésenchyme (figure 10 a-d). A la 10eme semaine de gestation, une deuxième couche devient visible (figure 10 e) et le tissu conjonctif et les vaisseaux commencent à se différencier au niveau du mésoderme. Puis, à la 21eme semaine, la membrane basale est bien individualisée, les mélanoblastes migrent dans l'épithélium, le derme se distingue par un tissu conjonctif lâche qui surmonte un tissu dense et l'ensemble couvre un autre tissu lâche qui est l'hypoderme. Enfin, les annexes commencent à être visibles. La matrice extra cellulaire dermique fœtale est formée principalement de collagène I avec un ratio collagène III / collagène I supérieur à celui de l'adulte. Les taux des glycosaminoglycanes, d'acide hyaluronique et de chondroitine sulfate sont élevés également. Enfin, le *vernix caseosa* se développe avec la pluristratification de l'épiderme. Il est formé principalement d'eau (80%), de sébum et des cellules détachées de la couche externe épidermique (Johnen et al 2013). La peau de l'enfant né à terme est donc assez mature anatomiquement et fonctionnellement. Néanmoins, elle possède quelques particularités. Après l'élimination du *vernix caseosa* présent à la naissance, la peau du

nouveau-né reste volontiers rouge pendant le 1er mois. Le film hydrolipidique est insuffisant pour protéger la peau de toutes les agressions extérieures. Cette peau devient par conséquent plutôt sèche et sujette aux irritations, notamment au niveau des plis.

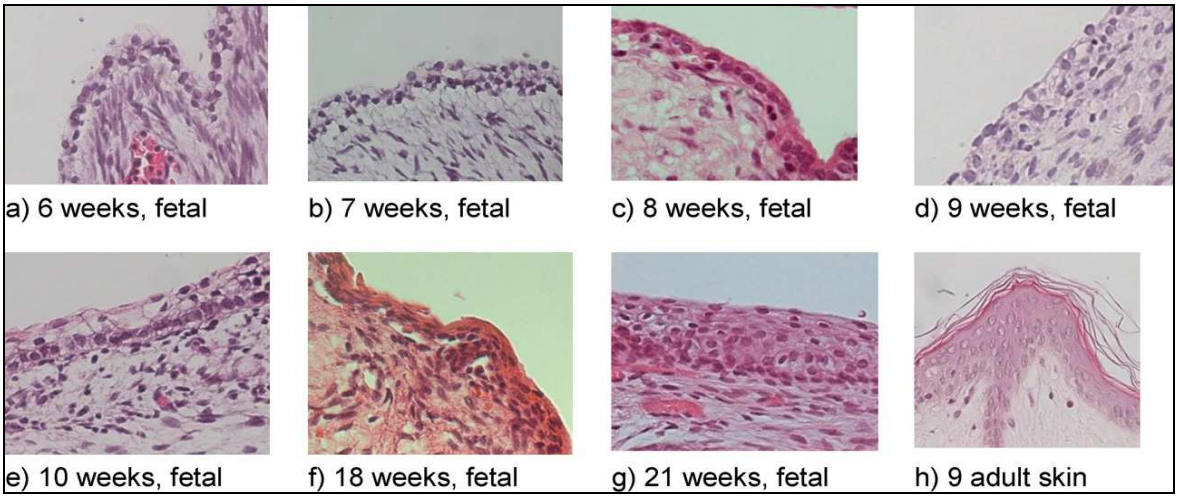


Figure 10. a-d Une assise cellulaire épidermique monocouche couvre le mésenchyme sous jacent. e les cellules commencent la stratification, une deuxième couche commence à être visible. g épithélium fœtal pluri stratifié. Johnen, Burns 2013.

5.1 LE PREPUCE

Comme nous le verrons ultérieurement, nous utiliserons les kératinocytes préputiaux pour des greffes de peau chez l'enfant. En théorie, toutes les zones anatomiques cutanées peuvent servir comme un site donneur, source de kératinocytes. Cependant, la qualité des cellules est loin d'être comparable d'un site à l'autre et nous allons aborder ce sujet plus en détail lors de notre exposé. Pour notre pratique clinique, nous cherchons le plus souvent à dissimuler les cicatrices pour éviter les séquelles esthétiques chez les enfants. Notre expérience nous montre qu'une cicatrice au niveau balano-préputial reste assez discrète, bien cachée (figure 11). La peau préputiale est fine, disponible, simple à obtenir et facile à manipuler. Selon l'OMS, plus de 70 % de la population masculine mondiale possède un prépuce, les 30 % restants ayant fait l'objet d'une circoncision. La circoncision, du latin *circumcisio,* signifiant découper autour, représente l'ablation du prépuce. Cette pratique existe depuis l'antiquité, le geste chirurgical consiste dans sa forme la plus répandue, en l'ablation totale ou partielle du prépuce**,** laissant ainsi le gland à découvert. Ce prépuce est un résidu de peau embryonnaire, un reste de la formation de la verge, qui persiste à la naissance. Il est constitué d'un repli cylindrique de

peau qui présente sur la face externe un épithélium kératinisé et sur sa face interne un épithélium non kératinisé. Le prépuce et le gland sont unis entre eux sur la face antérieure du pénis par un repli de forme triangulaire appelé frein de prépuce et sur toute la circonférence par le sillon balano-préputial qui épouse par sa forme la couronne du gland. La circonférence antérieure correspond au bord libre du prépuce et s'appelle orifice ou anneau préputial. Les premières années de la vie, cet anneau préputial est souvent étroit chez l'enfant et ne permet pas un décalottage facile source de « phimosis ». Ceci représente un motif de consultation très fréquent en chirurgie pédiatrique.

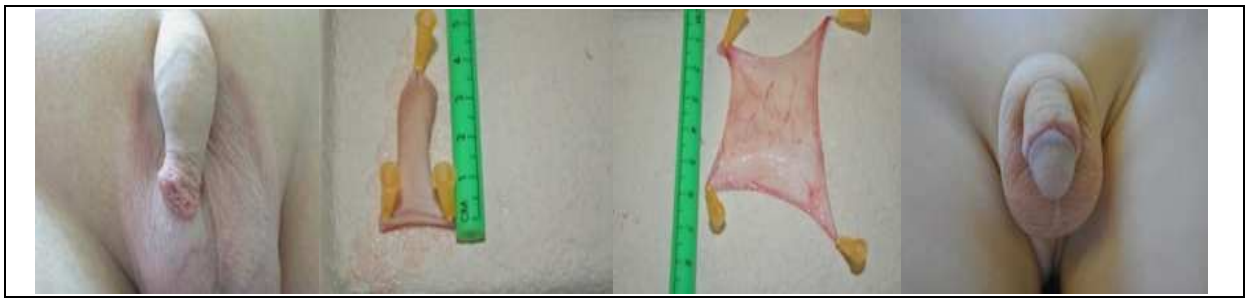


Figure 11. piéce opératoire suite à une circoncision d'un garçon de 4 ans.

5.2 BRULURES CHEZ L'ENFANT

Les données épidémiologiques indiquent qu'en France, chaque année, environ 40 000 enfants sont victimes de brûlures nécessitant des soins médicaux et 4 000 d'entre eux dont 1 500 nourrissons sont hospitalisés (Latarjet et al 1995). Dans la région Poitou-Charentes, l'incidence des brûlures est de 16 pour 100 000 habitants, dont 0,45/100 000 sont graves. Ces brûlures graves nécessitent une réanimation longue et complexe, à côté de brûlures moins sévères traitées lors d'une hospitalisation ordinaire ou en ambulatoire.

5.2.1 GÉNÉRALITÉS

Épidémiologie

La société française pour l'étude et le traitement des brûlures a publié en 1995 les résultatsd'une enquête nationale sur les brûlures de l'enfant (Mercier et al 1995). Une enquête prospective a été réalisée sur 12 mois sur une population d'enfants brûlés âgés de 0 à 15 ans, hospitalisés soit dans les centres de brûlés recevant des enfants, soit dans des services de chirurgie pédiatrique. Neuf cent trente-sept patients ont été répertoriés, et cette population a été comparée à la population générale des enfants vivant en France (recensement de 1990).

L’analyse descriptive a fait apparaître que l’enfant le plus habituellement victime de brûlures en France est : un petit garçon (62 %) âgé de moins de 37 mois (59 %), sans antécédent (88 %) ni notion de maltraitance, qui se brûle à son domicile (87 %). La brûlure est occasionnée par la projection d’un liquide chaud (53 %), les flammes (17 %), l’immersion dans l’eau chaude sanitaire (12 %), le contact des mains avec un objet chaud (9 %), les brûlures électriques (7 %) et les brûlures chimiques (1 %). La lésion qui en résulte est dans 50 % des cas d’une surface limitée inférieure à 9 % de la surface corporelle (SC), elle peut être profonde, et nécessite une greffe dans 41 % des cas (figures 12).

A B C D

Figure 12. A Brûlure profonde par l’eau chaude chez un enfant de 18 mois. B Brûlure du deuxième degré par une flamme d’essence chez une fille de 4 ans. C Brûlure du deuxième degré par immersion dans l’eau chaude chez un garçon de 7 mois. D Brûlure de deuxième degré chez un enfant de 1 an sur l’insert d’une cheminée.

Critères de gravité

L’âge : La règle de Baux [âge + surface brûlée (%) >100 = décès] reste le meilleur critère pronostique chez l’adulte. Il est strictement inversé chez l’enfant. À étendue équivalente, plus un enfant est jeune, plus le pronostic vital est grave. Les séquelles cicatricielles sont à l’inverse moins importantes chez le nourrisson. Au-delà de 18 mois, l’évolution des cicatrices de brûlures profondes se fait sur un mode hypertrophique et entraîne des séquelles esthétiques et fonctionnelles, en particulier à cause du retentissement sur la croissance (Haller et al 2009).

L’étendue : Il est possible d’évaluer l’étendue de la brûlure, en sachant que la règle de Wallace ou règle des 9, la plus employée, n’est pas applicable chez les petits enfants. Il est indispensable de disposer de schémas et de tables adaptés.

Profondeur : On retient actuellement la classification suivante : premier degré, deuxième degré, intermédiaire superficielle, intermédiaire profonde et enfin troisième degré.

L’évaluation de la profondeur se fait sur l’aspect de la brûlure. Seule l’analyse du sous-sol, dans les 24 premières heures, surtout la présence ou l’absence de douleur qui permet de classer les brûlures en superficielles ou profondes. En pratique, les brûlures superficielles (premier degré, deuxième degré et intermédiaire superficiel), se caractérisent par des douleurs, une cicatrisation spontanée à partir du fond de la brûlure et une absence de séquelles ;les brûlures profondes (intermédiaire profond et troisième degré) sont strictement opposables : elles sont indolores et ne peuvent cicatriser qu’à partir des berges de la brûlure. Les brûlures de premier degré cicatrisent en 48 heures, celles du deuxième degré en 10 jours, et les brûlures intermédiaires superficielles en 21 jours. Les problèmes des brûlures profondes sont très différents : l’évolution spontanée de telles lésions est supérieure à 21 jours et les séquelles sont majeures (figure 13)

A B C D

Figures 13. A Brûlure du deuxième degré par eau chaude. B Brûlure profonde par un feu de vêtement en jouant avec le briquet. C Brûlure profonde par une flamme suite à une explosion d’un bidon d’essence dans une cheminée. D évolution cicatricielle hypertrophique d’une brûlure profonde non traitée chez un enfant de 14 mois.

Siège : Les brûlures les plus graves atteignent les orifices naturels (voies respiratoires), les mains, les plis de flexion et le visage. Les brûlures du périnée posent des problèmes de cicatrisation en raison des fréquentes surinfections (figures 14).

A B C D

Figure 14. A brûlure du deuxième degré par l’eau chaude. B brûlure profonde sur l’insert d’une cheminée. C brûlure profonde par immersion dans l’eau chaude. D Brûlure électrique profonde du pouce en jouant avec une lampe.

La brûlure thermique est la cause quasi exclusive des admissions dans les services de soins intensifs des brûlures de l'enfant (Linblad et al 1990, Marsol 1996). Les projections de liquide aqueux bouillant intéressent le visage, le tronc et les membres supérieurs. Elles sont d'étendue moyenne (11 % de SC) et touchent les enfants de moins de 3 ans. Les brûlures par immersion siègent sur les membres inférieurs, le périnée et l'abdomen. Dans ce cas, les brûlés sont souvent d'âge inférieur à 3 ans, victimes de l'eau sanitaire délivrée par des robinets non thermostatés, provoquant des lésions plus étendues (16 % de SC en moyenne) et significativement plus profondes du fait de la durée de l'immersion.

Les brûlures par flamme sont observées chez les enfants les plus âgés (âge moyen : 89 mois), plutôt de sexe masculin. Elles sont les plus graves, plus étendues (moyenne : 18 % de SC), plus profondes, parfois associées à des lésions d'inhalation et associées à un plus grand risque de décès (huit fois supérieur aux autres mécanismes). La brûlure électrique est définie par le passage du courant d'un orifice d'entrée à un orifice de sortie (électrocution).

5.2.2 PRISE EN CHARGE DES ENFANTS BRULES

La brûlure est un phénomène local et général, aboutissant à la création d'un œdème majeur au niveau des tissus. Ce phénomène entraîne l'installation d'un choc hypovolémique responsable d'une ischémie rénale, cutanée, mésentérique et gastrique. De nombreux organes peuvent être la cible des médiateurs de l'inflammation. Une défaillance multiviscérale de très mauvais pronostic peut alors apparaître. Ces dernières décennies, les stratégies de traitement des brûlures étendues ont changé. Une approche chirurgicale avec une exérèse précoce des escarres et couverture cutanée de la plaie est prônée pour une meilleure survie des patients (Atiyeh 2007). L'excision précoce avec greffe devient une étape clé, avec la suppression des tissus nécrosés brûlés et la préservation des tissus sous-jacents autant viable que possible. Ce traitement non seulement diminue la libération de médiateurs de l'inflammation, mais aussi permet de réduire la colonisation bactérienne, de soulager le syndrome inflammatoire systémique et de réduire la fréquence des infections systémiques. Par conséquent, cette stratégie de l'excision précoce est efficace si le dommage n'est pas trop vaste et s'il y a suffisamment de sites donneurs intacts disponibles. Dans cette situation, la transplantation kératinocytaire peut avoir une place décisive dans l'arsenal thérapeutique des enfants brûlés.

Si l'enfant est brûlé grièvement à la face, l'intubation immédiate est indispensable (Lavaud et al 1995). Les victimes d'incendie sont menacées par les fumées toxiques et les intoxications par le monoxyde de carbone et les produits cyanhydriques (caisson d'oxygénothérapie hyperbare, hydroxycobalamine). Comme l'eau totale représente 75 % du poids du corps chez un nouveau-né, la compensation hydroélectrolytique et volémique doit être très précoce et adaptée. Le recours initial à un cathéter central doit être très rapidement envisagé, parfois même à travers une zone brûlée. Mettre en œuvre un traitement antalgique fait partie de la prise en charge en réanimation de l'enfant brûlé dès son admission et le traitement des douleurs prolongées spontanées par nociception relève principalement de la morphine délivrée 24 heures sur 24 (Latarjet et al 1995, Mercier et al 1995, Sharar et al 1998). Enfin, la cicatrisation dépend aussi de l'état nutritionnel, et un régime hypercalorique et hyperprotidique doit être mis en œuvre pour compenser l'important catabolisme protidique (Ramirez et al 1998). Il faut obtenir le plus rapidement possible une cicatrisation de bonne qualité chez un enfant en bon état général. Lutter contre la surinfection de la plaie, c'est préserver non seulement le capital de cicatrisation, mais aussi le bon état général. Dans certains services (Marsol 1996), le bain est pratiqué quotidiennement chez tous les enfants, même chez les grands de 15 ans, et pendant les 10 premiers jours, la plaie est exposée à l'air, avec des pulvérisations de chlorhexidine à 0,6 ‰ toutes les 2 heures. Des centres comme le nôtre, optent pour les pansements fermés avec réfection tous les 2 jours sous anesthésie générale. Le lavage à l'entrée dans le service est l'étape indispensable.

Prise en charge chirurgicale

La détersion des brûlures élimine les zones nécrosées et si la détersion naturelle stagne malgré les lavages, il faut y associer une détersion chimique par des enzymes protéolytiques et/ou mécanique chirurgicale. Après la détersion, il faut obtenir un bourgeon propre et plat qui favorise l'épidermisation. Durant cette phase, il faut éviter les infections qui ralentissent le bourgeonnement, ou au contraire lutter contre un hyperbourgeonnement néfaste. Pour une brûlure profonde, l'épidermisation ne se fait que par les berges. Seules des brûlures de petite surface peuvent s'épidermiser spontanément entièrement ; si la surface est trop importante, il faut recourir à une greffe épidermique (Blitterswik et al 2008).

Parmi les multiples calendriers appliqués pour une greffe de peau, il y a l'excision/greffe précoce. Le principe consiste à exciser chirurgicalement des plages de brûlures profondes et à les couvrir par une greffe de peau fine dans le même temps (Marsol 1996). Pour certaines

équipes, le recours à cette pratique est moins systématique pour plusieurs raisons. Il faut que l'enfant soit en bon état hémodynamique, car une greffe en phase précoce est traumatisante. Il faut que l'on dispose de sites donneurs en quantité suffisante. Par exemple, pour couvrir une main complète, il faut une cuisse. La principale difficulté réside dans l'appréciation de la profondeur, même pour des spécialistes confirmés (Baux et al 1987). Le risque est de greffer des zones qui doivent cicatriser spontanément. Excision précoce ou non, un principe reste immuable : « toute brûlure doit être cicatrisée au 21eme jour » (Cubison et al 2006). Dans notre centre, nous préférons respecter la phase de détersion naturelle, accélérée au besoin par une détersion chimique ou chirurgicale.

6. LES MOYENS THÉRAPEUTIQUES POUR UNE CICATRISATION DERMO EPIDERMIQUE CHEZ LES ENFANTS BRULES

La cicatrisation d'une plaie par brûlures est classiquement obtenue par l'autogreffe d'une peau fine (0,2 mm), une technique très ancienne, déjà développée en Inde dans la période pré chrétienne, à condition de trouver un site donneur sain disponible. Le cuir chevelu et les faces internes des cuisses étant les zones le plus souvent prélevées. Dans les cas où les surfaces cutanées brûlées (SCB) dépassent 30 %, les greffes autologues ne sont plus suffisantes pour couvrir les plaies et anticiper une cicatrisation.

Depuis des années, la question de savoir comment couvrir les grandes surfaces brûlées est devenue l'un des principaux champs de recherche clinique dans ce domaine. De nombreuses équipes ont recherché la meilleure façon d'étendre la peau à greffer chez les patients avec des brûlures graves. La technique de greffe cutanée en pastille est proposée comme une solution possible. Bien que cette technique rende service, les résultats esthétiques et fonctionnels restent inconsistants, et cette procédure doit être associée à une allogreffe. Pour remédier à ce manque criant d'épiderme dans les brûlures extensives, l'utilisation des cultures épithéliales autologues (CEA) a été proposée. Les CEA sont disponibles comme une alternative aux autogreffes et leur utilisation est devenue pratique clinique courante. Par contre, les facteurs potentiellement limitant l'utilisation de culture CEA étaient le long délai nécessaire à la culture, la faible fiabilité de la prise de greffe, la vulnérabilité face aux infections, la fragilité des cicatrices au long terme et les conséquences financières lourdes. Finalement, l'optimisme initial pour les CEA a progressivement diminué et l'utilité réelle des CEA pour traiter les brûlures est actuellement mise en défaut par de nombreux chirurgiens. On pense actuellement

que les CEA sont valables en tant que mesure de sauvetage, mais ne conviennent pas comme une couverture permanente.

Avant 1994, l'utilisation des kératinocytes a été limitée aux cultures confluentes ; dans cette procédure, les feuilles confluentes sont classiquement détachées des flasques de culture par l'action d'enzymes. Toutefois, le traitement par les enzymes lèse les protéines nécessaires à l'adhérence des cellules aux tissus. Pour remédier à ces inconvénients, des cellules épithéliales cultivées mais non confluentes ont été utilisées. En 2005, le kit Recell a été introduit dans la pratique clinique humaine, permettant d'obtenir immédiatement une suspension kératinocytaire à partir d'une biopsie cutanée. Chez les patients souffrant de brûlures étendues, toutes les zones saines peuvent en théorie être utilisées comme sites donneurs pour une transplantation kératinocytaire. Les différentes procédures employées dans le traitement des brûlures sont détaillées dans une revue présentée ci-dessous.

6.1 ARTICLE 1. WOUND HEALING IN CHILD BURNS: UPDATE AND PERSPECTIVE

(à soumettre)

Jiad. N. Mcheik*†, Christine. Barrault‡, Guillaume. Levard, François-Xavier. Bernard†‡, Jean-Claude. Lecron†[a].

*Service de chirurgie pédiatrique, CHU de Poitiers, 2, rue de La Milétrie, BP 577, 86021 Poitiers, France. † LITEC, Laboratoire Inflammation, Tissus Epithéliaux et Cytokines EA 4331, Université de Poitiers, B36, PBS, 2 rue Georges Bonnet, 86022 Poitiers, France. ‡ BIO*alternatives*, 1 bis rue des Plantes, 86160 Gençay, France. [a]Laboratoire d'immunologie et inflammation, CHU de Poitiers, 2, rue de La Milétrie, BP 577, 86021 Poitiers, France.

Abstract

Treatment of extensively burned patients is a tricky clinical problem not only because of the extent of the physiologic abnormalities caused by the burn itself, but also because of the limited area of normal skin available to provide the replacement of a large skin destruction. Severe burns in children are conventionally treated with split-thickness skin autografts (STAG). To cover large burn areas with a limited donor site, the technique of meshed STAG could be performed. But, when the burns are extensive, there are usually not enough skin donor sites. For years, the question of how cover surface wounds became one of the major

challenges in clinical research and several procedures were purposed. The microskin graft technique is one of the oldest methods to cover extensive burns. This technique of skin expansion is efficient and effective, but functional and aesthetic results remain inconsistent. An alternative is to graft cultured human epidermal keratinocytes in stratified and coherent layers (CEA). However, because of several complications, the initial optimism for CEA has gradually declined. It is currently believed that CEA is valuable as a life saving measure but is not suitable as permanent coverage. In an effort to solve these drawbacks, isolated epithelial cells were introduced in transplantation. Cell suspensions are transplanted directly to the wound, removing the need for attachment to a membrane before transfer, avoids one potential source of inefficiency. Colony-forming efficiency of keratinocytes freshly isolated from biopsies is usually low and the number of clonogenic keratinocytes per cm^2 of skin varies greatly according to patients, donor age and site. Choosing an optimal donor site containing cells with high proliferative capacity is essential for graft success.

Introduction

Scald is the most common cause of burn in children in many countries. An appropriate choice of treatment following injury is essential to minimise pain in the acute stages and to improve scar outcomes in the long term. Loss of the integrity of large portions of the skin as a result of burn injury may lead to major disability or even death. As the skin forms an active barrier protecting our organism from the outside environment rapid restoration of the epidermal barrier is of vital relevance after acute injury. Intensive care management of burn shock has considerably improved acute burn patients. However, the replacement process of destroyed skin has not kept pace with the progress of resuscitation and various treatment modalities have been employed to improve and accelerate wound healing (Table 1). Methods for handling extensive burn wounds have changed in recent decades and an increasingly surgical approach with early excision and wound closure is being applied for patient survival. Early excision with grafting is a key step, involving removal of necrotic burned tissue and preservation of as much underlying viable tissue as possible. This treatment reduces bacterial colonisation of wounds and systemic sepsis. The problem is how limited donor-site skin can be used to cover large surface wounds (Atiyeh et al 2007).

Knowledge of basic epidermal stem cell biology and the mechanisms governing the multipotency of these cells, together with an understanding of the genetic basis of various

skin diseases, are crucial for the development of therapeutic strategies for clinical application. Over the past 15 years, great strides have been made in the identification, isolation, and characterization of epidermal stem cells (Papini et al 2003, Fuchs 2008). Although skin biopsies are a regular source of keratinocytes and epidermal stem cells, recent research suggests that the generation of keratinocytes from human embryonic stem cells could be a useful technique (Guenou et al 2009).

1. Skin graft

For years, how to cover large surface wounds has been one of the major questions in clinical research.

1.1 Split-thickness grafts

Treatment of severe burns is conventionally achieved by the use of skin grafts for coverage and split-thickness autologous grafts (STAG) are still the gold standard of care (Andreassi et al 2005). The technique of skin harvesting and transplantation was initially described approximately 3000 years ago with Hindou Tilemaker Caste in which skin grafting was used to reconstruct noses that were amputated as a mean of judicial punishment. The grafted tissue in burn patients consists of the epidermis and a variable thickness of the underlying dermis. These grafts are generally harvested using a powered dermatome. Depth graft is usually limited to the upper third of the dermis, leaving sufficient number of epidermal cells in skin appendages. The donor sites heal via re-epithelialisation from the remaining skin appendage epidermal elements within 7–14 days. Currently, a nearly 95% success rate is the standard of care for skin grafting.

1.2 Meshed split-thickness grafts

To cover extensive burn areas regarding the limited availability of donor sites, the technique of meshed STAG was employed. The functional result from grafting with 1.5:1 meshed autograft is equivalent to that obtained by sheet graft (Tanner et al 1964). However, the meshed pattern is permanent, and the scar is not as cosmetically appealing as sheet autograft. Furthermore, hypertrophic scarring and pigmentation changes are not uncommon in donor sites, especially in Black, Hispanic and Oriental children. In addition, donor sites are painful.

When burns are larger than 30% of total body surface area (TBSA) there are usually not enough donor sites to use 1.5:1 mesh. In this circumstance, widely spread meshed autografts (3:1 or 6:1) are commonly used, providing less engraftment and rarely an acceptable cosmetic or functional cover. When the burn area exceeds 40% TBSA, it is not usually possible to cover the entire burns with autologous grafts and another alternative cover is needed.

1.3 Microskin autologous graft

Microskin graft technique is a solution for treating major burns (Gabarro 1943). Small pieces of 200 x 200 µm ‘‘diced’’ skin grafts were obtained with a histological tissue slicer and expansion ratio is more than 10:1. Successful microskin graft was reported in rabbit and pig with expansion ratios from 7:1 to 26:1 and the healing time from 19 to 35 days (Zhang et al 1986, Blair et al 1987). In clinical practice, several authors suggested this procedure for grafting on granulating wounds under poor conditions (Inoue et al 1994, Lai et al 1994 and Kreis et al 1994). Microskin grafting is one of the technical options to achieve permanent skin replacement; many authors suggested that it has value if integrated in a whole treatment concept for management of severely burned patients (Hsieh et al 2008, Lumenta et al 2009). Such procedure allowed early excision and graft thus reducing morbidity and mortality in 31 of 54 patients with extensive burns (80% TBSA). In this study, the expansion ratio was 15:1 and the wound can be completely resurfaced in 45 days (Guo et al 2009). As well, in 63 severely burned patients (85% TBSA), microskin autografting yielded an overall survival rate of 64% and the wound-healing rate was 75% between 35 to 55 days (Chen et al 2011).This procedure remains a lifesaving technique, requiring allograft in the first days of management but cosmetic and functional results are not consistent.

1.4 Dermal graft

To cover extensive burns after debridement, application of human cadaver skin with subsequent removal of alloepidermis is effective (Cuono et al 1987). This procedure suffers from the immunological mechanism provoking transplant rejection in two weeks that creates a temporarily ungraftable bed subject to infection (Burke et al 1974). Despite research effort, there are limits to cadaver allograft as ultimate skins (Achauer et al 1986). Nevertheless, frozen allograft remains the most commonly used temporary cover and a number of tedious combinations allograft-autograft techniques have been used (See et al 2001). For a short time (7 days), pig xenografts could be employed as well as allograft in preparing a wound bed, but

they offer little resistance to infection if left in place for more than a few days (Wang et al 1984).

The autologous dermal graft has been employed in reconstructive plastic surgery for almost 80 years. Rubis et al explored the use of the split-thickness dermal graft (STDG) as an alternative to the STAG, comparing their ability to resurface full thickness skin defects in a pig model. Epithelialisation of the STDG and STAG was complete at 4 weeks and graft biopsies in scar STAG were significantly thinner than STDG. Authors concluded that STDG like STAG may provide definitive coverage of full thickness skin deficits in a pig wound model (Rubis et al 2002). In burn patients, the use of dermis grafts associated to immediate or delayed coverage with STAG has been described (Hynes in 1954, Fratila et al 1997). Querings et al 2002 noted that the meshed dermal graft is an appropriate technique for reconstruction of large defects of sole and scalp and excellent long-term functional results were reported. Moreover, Han et al 2007 also noted that dermis graft technique for wound coverage in 53 patients was superior both aesthetically and functionally to the regular skin graft technique in both the recipient and donor sites. Coruh et al 2012 applied STDG along with STAG in 11 deep partial- and full-thickness burns without significant donor site morbidity and dermal take was complete in all but one patient. In their study, donor site epithelisation was completed generally 1 week later than STAG. Also, Zakine et al 2012 showed the efficacy of dermal graft from the scalp. Finally, Lindford et al 2012 performed 16 dermis grafts harvested from the back of 9 burn-patients (TBSA 24%). A control donor site consisted of an adjacent area. Dermis engraftment was complete in 15/16 cases by 4 weeks. No significant difference in donor site healing times was reported. Despite these good results, the problem with extensive deep burns remained, because epidermis and dermis are both affected.

From the artificial dermal structures, 0.1 mm thick homogeneous layers of silastic and porous collagen–chondroitin 6-sulphate have been successfully used to cover excised burns. The artificial dermis was easily sterilized and stored at room temperature, capable of large scale production, and immediately available for grafting. This dermal substitute supports STAG available, giving faster healing and less hypertrophic scarring. This bilayer artificial skin was shown to close up to 60% of the body surface following prompt excision of burn wounds in 10 patients (50-95% TBSA) (Burke et al 1981). Heimbach, et al presented an 11-centre prospective randomized trial using the artificial dermis. Patients who underwent primary excision and grafting within 7 days of injury had comparable randomized sites to receive

either the artificial dermis (study site) or the usual skin grafting material (control site). Control materials were autograft, allograft, xenograft, or a synthetic dressing. One hundred thirty-nine sites on 106 patients were studied and 25% of patients were younger than 15 years. The mean burn size was 46% TBSA, overall mortality was 14%, and mean hospital stay was 68 days. Median artificial dermis engraftment was 80% compared with 95% for all comparative sites, but the take graft was equivalent to that of all non autograft control materials. Thickness skin graft for the study site was 1.5mm compared to 3.3mm for control, and the epidermal donor site healed sooner (10 vs. 14 days). After one year of follow up, both patients and surgeons felt that both sites became comparable in function. There was less hypertrophic scarring of the artificial dermis and more patients preferred the artificial dermis to the control graft. Authors highlighted that the artificial dermis makes a better-appearing wound than widely meshed autograft. Compared to allograft, it is easier to use, "takes" as well, does not carry the risk of viral infection, does not reject, and does not need to be removed (Heimbach, et al 1988). Despite advances in tissue engineering and high quality of dermal substitute, we need an epidermal graft in burn patients. In that event, keratinocyte graft associated to dermal substitute could be the optimal choice for transplantation.

1.5. Cultured epithelial autograft (CEA)

CEA is an alternative approach to obtain an epidermal graft with a reliable method of culturing human epidermal keratinocytes in stratified and coherent layers. The use of CEA was first reported in the treatment of major burns in 1981 (Rheinwald et al 1975). Currently, the most practical option in extensive burns is the two-step Cuono technique in which the burn is excised and covered by allogenic skin that dermabraded after a period of 4 weeks, and finally, covered by CEA sheets. This requires autologous keratinocyte culture facilities and a skin bank capable of providing allografts, which is limited to referral and research centres. A 4-cm^2 sample of unburned skin is harvested usually from the axilla or pubic area at the same time as initial debridement. Epidermal cells are isolated by double enzymatic digestion from the biopsy and plated onto a mitotically inactivated and lethally irradiated layer (fibroblast 3T3). Cells grow into colonies ultimately forming a stratified squamous epithelium in which the dividing cells are confined to the basal layer (Green et al 1979). CEA has become available as an alternative measure to the use of expanded skin autografts and epidermal sheets have been used in treating major burns (O'Connor et al 1981, Gallico et al 1984, Donati et al 1992).

Thereby, at the end of the 80th, using of CEA in clinical practice has become common (Bettex-gallant et al 1988, Langdon et al 1988, Compton et al 1993, Boyce et al 1999). Its experimentation, from 1991 to 1996, in a large, single centre of severely burned patients was reported. In this study, CEA were applied to 30 patients (78% TBSA), survival was 90% and final CEA take was 69%. Younger age was significantly associated with better CEA success graft (Carsin et al 2000). In a large study, Sood et al presented their 18-year experience concerning 88 patients from 6 months to 73 years (including 20 children) and from 28 to 98% TBSA. The mean final CEA engraftment was 73%, and the overall patient survival rate was 91%. Complications were classified as early and late, including: blistering and shearing (31%), pruritus (5%), and wound contractures (66%) (Sood et al 2010). These results demonstrated that CEA is an adjunct to achieve a high survival rate in children and adult burn patients having a poor prognosis.

On the other hand, several centres reported disappointing results with CEA grafts. Such grafts were more susceptible to mechanical loss, sepsis and were very expensive (Still et al 1994). Thereby, the widespread use of these CEA has been hampered by the long *in vitro* expansion times, and the sensitivity to infection (Paddle-Ledinek et al 1997). In addition, manufacturing of CEA needs a labour-intensive process of preparing grafts associated with the requirement of a relevant laboratory expertise (Jackson 1991, Haris et al 1998), and clinical results reported occurrences of blistering, hyperkeratosis and contracture scarring (Desai et al 1991, Donati et al 1992). In 32 children burns (90% TBSA) from 1988 to 1998, CEA graft allowed a survival rate of 60%. But, authors noted that children had longer hospital stay and required more reconstructive procedures during the first 2 years (Barret et al 2000). Critical review of the literature, studying issues associated with CEA pointed out the factors potentially limiting this procedure: the time necessary to expand cells before transplantation, the reliability and vulnerability of grafts on the newly healed surface, the long-term durability and the high cost implications of such treatment. They concluded by the question 'does CEA have a role in the treatment of major burns?' (Wood et al 2006).Taken together, the initial optimism for CEA has gradually declined. Nowadays, we could consider that CEA is valuable as a life saving measure for early closure and it is not suitable as permanent coverage. A number of burn centres had the ambition to possess their own unit for epithelial culture production, but the financial, organizational and work-force burden have forced some of these CEA facilities to be closed.

2. Isolated keratinocyte grafts

Cytotherapy is a process of introducing cells in suspension into injured tissues to be restored. Epidermis is a tissue where the self-regeneration of epithelial cells takes place continuously. Transplantation with keratinocytes marks a turning point in skin grafting (Gage 1998). Human keratinocytes appear to have a finite culture lifetime, and the plating efficiency of the epidermal cells isolated directly from skin newborns is 1-5% (De Corte et al 2012). Patients attending plastic surgery/burns were questioned to assess willingness to accept a tissue-engineered skin. Levels of acceptance for the use of progenitor cells for treatment across a range of disease states were also assessed. Overall, 80% would accept a tissue-engineered product, and autologous cells were the preferred choice. Allogenic cells were still widely accepted (Clover et al 2012).

Before 1994, keratinocyte graft was restricted to confluent cell CEA sheets that were conventionally detached from culture vessels by the action of enzymes before graft. However, this enzymatic treatment injures cellular proteins, necessary for the attachment of cells to tissues and decreasing the survival rate of graft (Green et al 1979, Stenn et al 1989). In an effort to solve these drawbacks, epithelial cells in a pre-confluent state were introduced in cell transplantation before they form a sheet and thus differentiation and fusion processes *in vivo*. This method has the advantages of reducing culture period before clinical use, minimising the enzymatic degradation of cell surface proteins or cellular basal membranes (Barlow et al 1992, Dvorankova et al 1998), allowing the transplanted cells to more actively proliferate and to produce a more developed and robust dermal epithelialisation (Adams et al 1990, Poumay et al 1995). Keratinocyte graft in suspension is effective even without a complex delivery system. Various delivery systems of preconfluent keratinocytes are promising ways of transferring epidermal elements to a wound. Matrices can be made from various materials including human fibrin, bovine or human collagen, shark proteoglycans, hyaluronic acid, acellular porcine dermis, and synthetic polymers such as polyurethane, polymeric Film, Teflon Film and poly-hydroxyethyl methacrylate. Although some clinical studies using these various delivery systems have been undertaken, no substantial publications prove their clinical value. A clinical audit of two-week cultured keratinocyte suspensions from abdominal skin biopsies preceded by allograft and combined with 6:1 meshed skin grafts in 16 patients (TBSA 51%) was performed. For transplantation, 30 10^6 keratinocytes per ml/ 500 cm^2 of burn surfaces were applied, and the engraftment was 90% on average 8 weeks after treatment. Authors stated that the use of a sprayed epithelial cell autograft in severely burned patients

results in favourable quality of scars and also good potential to save lives by providing epidermal cover (Lee 2012).

2.1 Keratinocyte allografts

Transplanted organs contain resident leucocytes, which include cells such as Langerhans that initiate the rejection of a transplant by expressing foreign class II histocompatibility molecules. *In vitro*, after culture, the Langerhans cells are lost in about 7-10 days (Rheinwald et al 1975, Morhenn et al 1982, Hefton et al 1984). To determine the survival of cultured allogeneic keratinocytes transplanted to a deep dermal bed, cultured allogeneic keratinocytes from donors of the opposite sex were used. If all wounds heal by 3 weeks, no male cells were identified in biopsy specimen from female patients transplanted with boy cultured keratinocytes (Brain et al 1989). By further *in vivo* study, they concluded that allogeneic keratinocytes temporarily 'take' to the wound and contribute to rapid wound closure, being replaced by the patient's epidermal cells after about one week. Cultured male keratinocytes were grafted onto donor sites of female patients. On day 4 a large proportion of cells were of donor origin as indicated by the presence of Y chromosomes that was absent at day 9. From day 6, the new epidermis acquired an ordered stratification and keratin 10 presented normal distribution in suprabasal layers (Pokorna et al 2001). More recently, Haslik et al noted that allogeneic keratinocytes are a suitable armamentarium for the treatment of deep dermal hand burns. If used correctly, they can induce a healing rate comparable to STAG. However, a tendency to higher Vancouver Scar Scale (VSS) scores and impaired aesthetic results is pointed out in the allogeneic keratinocyte group (Haslik et al 2010). These results indicate that allokeratinocytes have a transient function in wound healing and keratinocyte transplantation is a promising strategy in burn treatment. After graft, keratinocytes interact with the other cell populations and accelerate wound healing by expressing favourable keratinocyte derived cytokines and growth factors. Thus, Kirsner et al reported that venous leg ulcers can be healed with a spray of allogeneic neonatal foreskin keratinocytes and fibroblasts. Authors enrolled 205 adult outpatients from 28 centres in the USA and Canada with persistent ulcer. The primary outcome analysis showed a significantly greater mean reduction of wound area associated with active treatment compared to vehicle and the dose of $0.5\ 10^{6}$ cells/mL every 14 days showed the largest improvement (Kirsner et al 2012).

2.2 Keratinocyte autografts

Few burn units implement the graft of freshly isolated autologous keratinocytes for adult patients, and quite rarely for children. However, this approach has been initiated 60 years ago in rabbits and a comparative study was performed in pigs (Billingham et al 1952). After a period of neglect, this procedure raises and became trendy. Indeed, the grafting of freshly dissociated keratinocytes on prepared burned skin presents the major advantages of simple handling of the keratinocyte suspension and of a drastic reduction in the cost (Hunyadi et al 1988, Kaiser et al 1994, Fraulin et al 1998, Wood et al 2007, Hartmann et al 2007, Atiyeh et al 2007, Gerlach et al 2008, Navarro et al 2000, Gerlach et al 2011). In 2005, the use of the standardized Recell device was introduced into human clinical practice, allowing the immediate processing of small split-thickness biopsies to isolate keratinocytes. This technology permitted grafting 80 cm^2 of burned skin from 1 cm^2 healthy tissue and led to high quality scars as compared to conventional skin grafting (Gravante et al 2007). Also, Zweifel et al reported the treatment of three burned patients by suspension of an autologous non-cultured keratinocytes applied using an aerosol system. Burns healed rapidly and no signs of hypertrophic scarring were observed 6 months later (Zweifel et al 2008).

Autologous noncultured epidermal cell suspension transplantation seems to be an effective method to treat nonhealing wounds. Shukla et al 2010 enrolled 15 patients with chronic wounds of more than 6 weeks. Autologous epidermal cell suspensions from skin thigh biopsies were grafted on the ulcer beds. Six patients completely healed at 12 weeks, 1 at 16 weeks and 2 at 20 weeks after treatment. Recently in our department, 11 burns in boys were grafted by suspension of autologous foreskin isolated keratinocytes. Epithelialisation and accelerated wound healing was obtained, and the quality of scarring and pigmentation was improved compared to classical skin grafts (Mcheik et al 2013). We emphasized the aesthetic and high quality of the skin: vascularity, pigmentation and pliability without hypertrophy or pruritus, as reflected by a reliable Vancouver scar scale (VSS).

3. Donor sites: a critical choice for successful grafting

The comparison of the characteristics of donor sites and their ability to regenerate 3D epithelia *in vitro* has been poorly studied. In adult patients, human scalp appears a promising suitable keratinocyte donor site for the development of therapeutic cell transplantation

(Schlabe et al 2008). In 1986, a method was developed for the isolation of outer root sheath keratinocytes (ORS) from human hair follicles for their subsequent cultivation (Limat et al 1986). Taylor et al demonstrated that hair follicular stem cells, located in the bulge region, could give rise to several cell types. They showed that the hair follicle represents a major repository of keratinocyte stem cells in the skin of mouse, and that follicular bulge stem cells are potentially bipotent, giving rise to hair follicle, and epidermis (Taylor et al 2000, Blanpain et al 2007). However, it appears difficult at the present time to extract the epithelial cell population from the hair follicles for clinical practice. These stem cells are deeply located in the basal layer of the ORS, at the level of the hair follicle bulge. Searching for alternative sites, Lavoie et al compared hairy skin sites for their capacity to generate high quality keratinocyte cultures. Anatomic sites from adult were compared: scalp and auricular (pre-auricular and post-auricular) skin after face-lift surgery and chest skin after breast surgery. The proportion of K19-positive cells harvested from auricular skin was about twice that of the scalp and surprisingly, the number of K19-positive cells estimated *in situ* on skin sections was about double in scalp than in auricular skin. Chest skin had the lowest number of K19-positive cells. These results indicate that in addition to the choice of an adult anatomic site featuring a high number of stem cells *in situ*, the quality of the cultures greatly depends on the ability to extract stem cells from the skin biopsy. By monitoring, the expression of terminal differentiation marker keratin 10 (K10) showed no significant difference between scalp and auricular skin. The skin from chest had the highest level of K10 expression level (Lavoie et al 2011).

Preputial skin is a thin full-thickness and expandable skin that can be easily harvested. Given the difficulties to harvest deep keratinocyte scalp in children and given our *in vitro* results on foreskin keratinocyte regenerative capacities, we have proposed to graft foreskin keratinocytes (Mcheik et al 2009, 2010). The use of foreskin keratinocytes for transplantation has also been proposed by De Corte et al 2012. After demonstrating high *in vitro* proliferative capacities for these cells, they have proposed *in vitro* expanded-foreskin keratinocytes for allograft transplantation. Regarding the irregular, unpredictable growth and variable end points with the culture of adult human epidermal keratinocytes, they showed that foreskin keratinocytes displayed regular and consistent growth. In the boy group of our study, at least regular and consistent growth for up to 10 population doublings was shown.

4. Tissue engineering and cell grafts

As previously discussed, attempts to improve CEA include incorporated fibroblasts and a dermal layer as essential elements for improving wound regeneration and functionality of the substitutes. Adult cells in fibrin spray, and various engineered tissue formats have been used, including allogeneic fibroblasts in fibrin-based matrix (Intercytex, Manchester, UK), allogeneic fibroblasts in a polygalactin mesh scaffold (Shire, Dublin, Ireland), and combined allogeneic fibroblasts and keratinocytes in a bovine collagen sponge (OrCel, Ortec International, Atlanta, GA, USA). Questions related to the optimal cell type for culture, culture techniques, transplantation of confluent sheets or non-confluent cells, immediate and late final take, carrier and transfer modality, as well as final outcome, ability to generate an epithelium after transplantation, and scar quality are still not fully answered. Designed as a skin substitute, both epidermal and dermal equivalents have been under investigation. A novel bi-layered living skin equivalent, Apligraf, has been approved in several countries. Derived from foreskin, cultured neonatal fibroblasts are combined with bovine type I collagen to form a neodermis, over which cultured neonatal keratinocytes are placed, proliferate and differentiate. Apligraf as an allograft has been used in acute wounds such as surgical excision sites and partial thickness donor sites (Kirsner 1998). Cultured autologous fibroblasts and keratinocytes onto collagen-glycosaminoglycan constitute another skin substitute (CSS) (Boyce et al 1995). CSS had a general organization into a stratified epithelium and a connective tissue compartment, and total thickness was similar to STAG. After graft in 17 patients, authors noted that CSS prepared from autologous skin cells might be a safe and efficacious alternative to classical skin autograft for life-threatening burns. However, multiple early deficiencies of this cell-biopolymer graft were observed, including: slower vascularisation, slower keratinisation, greater graft loss from microbial contamination, and greater mechanical fragility. So in these cases, we could conclude that drawbacks with CSS are comparable to CEA! After initial encouraging animal experiments, Sheridan et al proposed a pilot trial of a composite skin replacement in patients with massive burns by cultured autologous keratinocytes on acellular allogenic dermis. This material was grafted in 7 children with massive burns (76% TBSA) and compared to a matched wound covered with STAG. All children survived and successful engraftment at 14 days averaged 46% in the studied wounds. The reduced composite skin intake seemed to be correlated with wound infection (Sheridan et al 2001).

A systematic review of the literature assessed the safety and efficacy of bioengineered skin substitutes in comparison with standard methods in the management of burns. Twenty randomised controlled trials were included in this review, but the numerous sub-group analyses and the diversity of skin substitutes limited the ability to draw conclusions. However, they suggested that bioengineered skin substitutes, namely Biobrane (composed of a knitted nylon mesh that is bonded to a thin, silicone membrane and coated with porcine polypeptides), TransCyte (composed of a semi-permeable silicone membrane and human newborn fibroblast cells cultured on a porcine collagen coated nylon mesh), Dermagraft (polygalactin mesh seeded with allogeneic neonatal fibroblasts), Apligraf (composed of type I bovine collagen and allogeneic keratinocytes and fibroblasts obtained from neonatal foreskin) and CEA were at least as safe as the classical skin replacements or topical agents/wound dressings. For partial thickness burns (less than 15% TBSA), Biobrane and TransCyte appeared to be more effective than silver sulfadiazine, avoiding the need for painful daily dressing changes and long stay in hospital. TransCyte appeared to be effective for facial burns, providing good adherence to the contours of the face. For burns between 20 and 50% TBSA, CEA, Dermagraft and Apligraf combined with autograft appear to be effective. Integra may be better suited in patients with limited burns (45% TBSA). Taken together, authors concluded that additional method logical and rigorous randomised controlled trials with long-term follow-up would strengthen the evidence base for the use of bioengineered skin substitutes (Pham et al 2007).

Bannasch et al 2008 assessed the feasibility of combined keratinocyte and dermal scaffold transplantation performed in a single step for treatment of full-thickness wounds. Two weeks cultured autologous keratinocytes were suspended in fibrin and grafted together with acellular human dermis (Alloderm) in a porcine animal model; the results showed both successful histo-integration of the *in vivo* composite grafts and reduced wound contraction, compared to with epithelial grafts. For sophisticated skin substitute, human preadipocytes were isolated from subcutaneous adipose tissue and seeded onto the scaffold (Matriderm®) directly after isolation. Keratinocytes were isolated from fresh human split-thickness skin harvests and seeded onto the surface of the scaffold after 4 days of proliferation. Three weeks later, a simultaneous growth of keratinocytes and preadipocytes is observed: keratinocytes adhered to the surface of the matrix and formed a confluent epidermis-like layer; preadipocytes adhered and penetrated into the deeper layers of the matrix. This approach towards a multi-layered skin substitute could be a useful asset for

future reconstructive surgery (Keck et al 2011). To obtain an inexpensive substitute, another evaluation strategy was to graft an autologous bioengineered composite skin (ABCS) (autologous fibroblasts and keratinocytes with plasma from blood bank (Gomez et al 2011). In this study, 25 burned patients (74% TBSA) were treated and final successful engraftment was 49%. In subset analyses, less infections concomittent to graft were significantly associated with better ABCS engraftement. In terms of patient satisfaction 4 years later, cosmetic and functional outcomes were satisfactory.

5. Growth factors, cytokines in wound healing and skin grafts.

In the past decades, the increasing knowledge of the molecular and cellular mechanisms underlying wound repair and regeneration has led to usage of growth factors and cytokines in wound care. Their role in wound healing has been reported since 1950; in elegant experiments Cohen S et al showed that purified sub-maxillary gland extracts led to earlier eyelid separation and eruption of the incisor in mice. So, the epidermal growth factor (EGF) was discovered and deserved the 1986 Nobel Prize in medicine. The use of growth factors and cytokine agents in accelerating wound healing remains a promise in burn wound care. Platelet-derived growth factor (PDGF) appears to be a key mediator in wound healing, serving as chemoattractant and mitogen for fibroblasts. It stimulates their differentiation and remodelling. It was the first recombinant growth factor approved for topical application to accelerate wound closure (rhPDGF-BB, becaplermin). However, studied in animal models for wound heals, growth factors such as VEGF, EGF, KGF, and PDGF have not shown expected results. Also, multiple studies investigated without much success the effect of hyaluronidase, nitric oxide, cytokines, and thrombin to enhance diabetic wound healing and to promote closure of chronic venous leg ulcers. Akita et al 2006 reported improved functional and aesthetic outcome of burn wound scars in burn children treated by bFGF spray (Trafermin, Fiblast, Kaken Pharmaceutical, Tokyo, Japan). Ching et al 2011 performed a comprehensive literature search using the MEDLINE, Ovid, and Web of Science databases to identify pertinent articles regarding growth factors and other cytokines in burns and wound healing. Experimental and clinical evidence suggest that there are therapeutic advantages to the wound healing process when these agents are utilized and positive effects have been reported in burn patients. PDGF, FGF, EGF, TGF, VEGF, IGF-I, NGF and GM-CSF have been suggested to enhance rate and quality of healing in burn care. Although extensive human clinical data are

lacking, concerning especially the factors as adjuvant in skin graft. Further clinical trials are requested and considerations for sequential growth factor application and/or growth factor cocktails may prove to be more efficacious than the application of a single growth factor (Pierce et al 1995).

Conclusion

Finally, deep burns in children are treated with split-thickness skin autografts that could be painful and source of unsightly scars in donor and grafted areas. Moreover, when the burns are extensive, there are usually not enough skin donor sites. Currently, we can consider that microskin graft and CEA are valuables as life saving measures but are not suitable as permanent coverage. In this procedure, functional and aesthetic results remain inconsistent. A myriad of "plastic" synthetic materials for dermal substitution have been developed. For brief periods, they appear to work as well as allograft as a temporary wound cover. However, they do not vascularise, their conformability varies, they have little resistance to infection, and they often do not adhere to the wounds. Advances in the development of tissue-engineered skin have led to several new products aimed to improve wound healing. Designed as a skin substitute, dermal equivalents have been investigated for over a decade. Although dermal substitutes may provide wound coverage and reduce pain, they still require an epidermal component. In this case, adjuvant keratinocyte transplantation could have a prominent place. Furthermore, cell suspensions can be transplanted directly into the wound. However, questions related to optimal cell type for culture, carrier and transfer modality, as well as final outcome, ability to generate an epithelium after transplantation, and scar quality are still not fully answered. For this reason, choosing an optimal donor site possessing cells with high proliferative capacity is essential for wound healing success. Our *in vitro* studies demonstrated the high yield of living keratinocyte recovery from foreskin and the quality of regeneration and differentiation. A high number of keratinocytes can be harvested in a few hours and the graft can be extemporaneously considered as soon as the wound surface is optimally prepared. Large injured-areas can be successfully grafted in a few days after burns, while a common skin graft is insufficient. Keratinocyte graft in suspension also allows the harvesting and grafting of the entire epithelial cell population, including melanocytes (Mulekar et al 2008, Cervelli et al 2009). Successful clinical results and the easy management of the keratinocyte isolation procedure in the operating room allowed us to design the

autologous keratinocyte transplantation as a standard procedure, which can be added to the arsenal of therapies for burned children in surgical units everywhere.

References

Achauer BM, Hewitt CW, Black KS, Martinez SE, Waxman KS, Ott RA. Long-term skin allograft survival after short term cyclosporine treatment in a patient with massive burns. Lancet 1986, 8471:14-5.

Adams JC, Watt FM. Changes in keratinocyte adhesion during terminal differentiation: reduction in fibronectin binding precedes alpha 5 beta 1 integrin loss from the cell surface. Cell 1990, 63:425-35.

Akita S, Akino K, Imaizumi T, Tanaka K, Anraku K, Yano H, Hirano A. The quality of pediatric burn scars is improved by early administration of basic fibroblast growth factor. J Burn Care Res. 2006, 27:333-8.

Andreassi A, Bilenchi R, Biagioli M, D'Aniello C. Classification and pathophysiology of skin grafts. Clin. Dermatol 2005, 332-37.

Atiyeh BS, Costagliola M. cultured epithelial autograft (CEA) in burn treatment: three decades later. Burns 2007, 33:405-13.

Bannasch H, Unterberg T, Fohn M, Weyand B, Horch RE, Stark GB. Cultured keratinocytes in fibrin with decell ularised dermis close porcine fullthickness wounds in a single step. Burns 2008, 34:1015-21.

Barlow YM, Burt AM, Clarke JA, McGrouther DA, Lang SM. The use of a polymeric film for the culture and transfer of sub-confluent autologous keratinocytes to patients. J Tissue Viability 1992, 2:33-6.

Barret JP, Wolf SE, Desai MH, Herndon DN. Cost-efficacy of cultured epidermal autografts in massive pediatric burns. Ann Surg 2000, 231:869-76.

Bettex-Galland M, Slongo T, Hunziker T, Wiesmann U, Bettex M. Use of cultured keratinocytes in the treatment of severe burns. Z kinderchir 1988, 43:224-8.

Blair SD, Nanchahal J, Backhouse CM, Harper R, McCollum CN. Microscopic split-skin grafts: a new technique for 30-fold expansion. Lancet 1987, 2:483-4.

Blanpain C, Horsley V, Fuchs E. Epithelial stem cells: turning over new leaves. Cell 2007, 128, 44558.

Billingham RE, Reynolds J. Transplantation studies on sheets of pure epidermal epithelium and on epidermal cell suspension. Br J PlastSurg1952, 5:25-36.

Boyce ST, Goretsky MJ, Greenhalgh DG, Kagan RJ, Rieman MT, Warden GD. Comparative assessment of cultured skin substitutes and native skin autograft for treatment of full-thickness burns. Ann Surg 1995, 222:743-52.

Boyce ST, Kagan RJ, Greenhalgh DG, Warner P, Yakuboff KP, Palmieri T, Warden GD. Cultured skin substitutes reduce requirements for harvesting of skin autograft for closure of excised, full-thickness burns. J. Trauma 2006, 60: 821-29.

Boyce ST, Kagan RJ, Meyer NA, Yakuboff KP, Warden GD. The 1999 clinical research award. Cultured skin substitutes combined with integra artificial skin to replace native skin autograft and

allograft for the closure of excised full-thickness burns. J Burn Care Rehabil 1999, 20: 453-6.

Brain A, Purkis P, Coates P, Hackett M, Navsaria H, Leigh I. Survival of cultured
allogeneic keratinocytes transplanted to deep dermal bed assessed with probe specific for Y chromosome. BMJ 1989, 298:917-9.

Broughton G II, Janis JE, Attinger CE. Wound healing: an overview. Plast Reconstr Surg 2006, 117:1s-32s.

Burke JF, May JWJ, Albright N, Quinby WC, Russell PS. Temporary skin transplantation and immunosuppression for extensive burns. NEJM 1974, 290:269-71.

Burke JF, Yannas IV, Quinby WC, Bondoc CC, Junk WK. Successful use of a physiologically acceptable artificial skin in the treatment of extensive burn injury. Ann Surg 1981, 194:413-28.

Carsin H, Ainaud P, Le Bever H, Rives J, Lakhel A, Stephanazzi J, Lambert F, Perrot J. Cultured epithelial autografts in extensive burn coverage of severely traumatized patients: a five year single-center experience with 30 patients. Burns 2000, 26:379-87.

Cervelli V, De Angelis B, Spallone D, Lucarini L, Arpino A, Balzani A. Use of a novel autologous cell-harvesting device to promote epithelialization and enhance appropriate pigmentation in scar reconstruction. Clin Exp Dermatol 2009, 35:776-80.

Chen XL, Liang X, Sun L, Wang F, Liu S, Wang YJ. Microskin autografting in the treatment of burns over 70% of total body surface area: 14 years of clinical experience. Burns 2011, 37:973-80.

Ching YH, Sutton TL, Pierpont YN, Robson MC, Payne WG. The use of growth factors and other humoral agents to accelerate and enhance burn wound healing. E Plasty 2011, 11:41.

Clover AJ, O'Neill BL, Kumar AH. Analysis of attitudes toward the source of progenitor cells in tissue-engineered products for use in burns compared with other disease states. Wound Repair Regen 2012, 20:311-6.

Compton CC, Hickerson W, Nadire K, Press W. Acceleration of skin regeneration from cultured epithelial autografts by transplantation to homograft dermis. J Bum Care Rehabil 1993, 14:653- 62.

Coruh A, Yontar Y. Application of split-thickness dermal grafts in deep partial- and full-thickness burns: a new source of auto-skin grafting. J Burn Care Res 2012, 33:94-100.

Cuono C, Langdon R, Birchall N, Barttelbort S, McGuire J. Composite autologous-allogeneic skin replacement: development and clinical application. Plast Reconstr Surg 1987, 80:626-35.

De Corte P, Verween G, Verbeken G, Rose T, Jennes S, De Coninck A, Roseeuw D, Vanderkelen A, Kets E, Haddow D, Pirnay JP. Feeder layer- and animal product-free culture of neonatal foreskin keratinocytes: improved performance, usability, quality and safety. Cell Tissue Bank 2012, 13: 175-89.

Desai MH, Mlakar JM, McCauley RL, Abdullah KM, Rutan RL. Lack of long-term durability of cultured keratinocyte burn-wound coverage: a case report. J Burn Care Rehabil 1991, 12:540-5.

Donati L, Magliacani G, Bormioli M, Signorini M, Preis FW. Clinical experiences with keratinocyte grafts. Burns 1992, 18:19-26.

Dvorankova B, Smetana Jr K, Konigova R. Cultivation and grafting of human keratinocytes on a poly (hydroxyethyl methacrylate) support to the wound bed: a

clinical study. Biomaterials 1998, 19:141-6.

Eisenbud D, Huang NF, Luke S, Silberkang M, skin substutes and wound healing. Current status and challenges. Wounds 2004, 16:2-17.

Falanga V, Iwamoto S, Chartier M, Yufit T, Butmarc J, Kouttab N, Shrayer D, Carson P. Autologous bone marrow-derived cultured mesenchymal stem cells delivered in a fibrin spray accelerate healing in murine and human cutaneous wounds. Tissue Eng 2007, 13:1299-312.

Fratila AA, Bertlich R. The reversed dermal graft: surgical procedure and clinical applications. Facial Plast Surg 1997, 13:93-9.

Fraulin FO, Bahoric A, Harrop AR, Hirruki T, Clarke HM. Autotransplantion of epithelial cells in the pig via an aerosol vehicle. J Burn Care Rehabil1998, 19: 337-45.

Fuchs E. Skin stem cells: rising to the surface. J Cell Biol 2008, 180:273-84.

Gabarro P. A new method of grafting. British Medical Journal 1943, 1:723-4.

Gage FH. Cell therapy. Nature 1998, 392:18-24.

Gallico GG, O'Connor NE, Compton CC, Kehinde O, Green H. Permanent coverage of large burn wounds with autologous cultured human epithelium. N Engl J Med 1984, 311: 448-51.

Gerlach JC, Johnen C, Mc Coy E, Brautigam K, Plettig J, Corcos A. Autologous skin cell spray-transplantation for a deep dermal burn patient in an ambulant treatment room setting. Burns 2011, 37:19-23.

Gerlach J, Wolf SE, Johnen C, Hartmann B. Innovative regenerative medicine approaches to skin cell-based therapy for patients with burn injuries, principles of regenerative medicine, 76. Elsevier/Academic Press, 2008, 1298–321.

Gomez C, Galan JM, Torrero V, Ferreiro I, Perez D, Palao R, Martinez E, Llames S, Meana A, Holguin P. use of an autologous bioengineered composite skin in extensive burns: clinical and functional outcomes. A multicentric study. Burns 2011, 37: 580-9.

Gravante G, Di Fede MC, Araco A, Grimaldi M, De Angelis B, Arpino A, Cervelli V, Montone A. A randomized trial comparing Recell system of epidermal cells delivery versus classic skin grafts for the treatment of deep partial thickness burns. Burns 2007, 33: 966-72.

Green H, Kehinde O, Thomas J. Growth of cultured human epidermal cells into multiple epithelia suitable for grafting. Proc Natl Acad Sci 1979, 76: 5665-8.

Guo F, Chen XL, Wang YJ, Wang F, Chen XY, Sun YX. Management of burns over 80% of total body surface area: a comparative study. Burns 2009, 35:210-4.

Guenou H, Nissan X, Larcher F, Feteira J, Lemaitre G, Saidani M, Del Rio M, Barrault C, Bernard FX, Peschanski M, Baldeschi C, Waksman G. Human embryonic stem-cell derivatives for full reconstruction of the pluristratified epidermis: a preclinical study. Lancet 2009, 374: 1745-53.

Han SK, Yoon TH, Kim JB, Kim WK. Dermis graft for wound coverage. Plast Reconstr Surg 2007, 120:166-72.

Harris PA, Leigh IM, Navsaria HA. Pre-confluent keratinocyte grafting: the future for cultured skin replacements? Burns 1998, 24: 591-3.

Hartmann B, Ekkernkamp A, Johnen C, Gerlach JC, Belfekroun C, Kuntscher MV. Sprayed cultured epithelial autografts for deep dermal burns of the face and neck. Ann PlastSurg 2007, 58:70-3.

Haslik W, Kamolz LP, Lumenta DB, Hladik M, Beck H, Frey M. The treatment of deep dermal hand burns: How do we achieve better results? Should we use allogeneic keratinocytes or skin grafts? Burns 2010, 36:329-34.

Hefton JM, Amberson JB, Biozes DG, Weksler ME. Loss of HLA-DR expression by human epidermal cells after growth in culture. J Invest Dermatol 1984, 83:48-50.

Heimbach D, Luterman A, Burke J, Cram A, Herndon D, Hunt J, Jordan M, McManus W, Solem L, Warden G. Artificial dermis for major burns. A multi-center randomized clinical trial. Ann Surg 1988, 208:313-20.

Hsieh CH, Schuong JY, Huang WS, Huang TT. Five years' experience of the modified Meek technique in the management of extensive burns. Burns 2008, 34:350-4.

Hunyadi J, Farkas B, Bertenyi C, Olah J, Dobozy A. Keratinocyte grafting: a new means of transplantation for full-thickness wounds. J Dermatol Surg Oncol 1988, 14: 75-8

Hynes W. The skin-dermis graft as an alternative to the direct or tubed flap. Br J Plast Surg 1954, 7: 97-107.

Inoue Y, Tanabe H, Tai Y. A method for the preparation of microskin grafts using skin-graft meshers. Plast Reconstr Surg 1994, 94:890.

Jackson DM. The evolution of burn treatment in the last 50 years. Burns 1991, 17: 329-34.

Jones V, Grey JE, Harding KG. wound dressings. BMJ 2006, 332: 777-80.

Kaiser HW, Stark GB, Kopp J, Balcerkiewicz A, Spilker G, Kreysel HW. Cultured autologous keratinocytes in fibrin glue suspension, exclusively and combined with STS allograft (preliminary clinical and histological report of a new technique). Burns 1994, 20: 23-9.

Keck M, Haluza D, Lumenta DB, Burjak S, Eisenbock B, Kamolz LP, Frey M. Construction of a multilayer skin substitute: simultaneous cultivation of keratinocytes and preadipocytes on a dermal template. Burns 2011, 37: 626-30.

Kirsner RS, Marston WA, Snyder RJ, Lee TD, Cargill I, Slade HB. Spray-applied cell therapy with human allogeneic fibroblasts and keratinocytes for the treatment of chronic venous leg ulcers: a phase 2, multicentre, double-blind, randomised, placebo-controlled trial. Lancet 2012, 15:977-85.

Kirsner RS.The use of Apligraf in acute wounds. J dermatol 1998, 25:805-11.

Kreis RW, Mackie DP, Hermans RP, Vloemans AR. Expansion technique for skin grafts: comparison between mesh and Meek island (sandwiched-) grafts. Burns 1994, 20:39-42.

Lai CS, Lin SD, Tsai CC, Tsai CW, Chou CK. An easy way to prepare microskin grafts. Burns 1994, 20:151-3.

Langdon RC, Cuono CB, Birchall N, Madri JA, Kuklinska E, McGuire J, Moellmann GE. Reconstitution of structure and cell function in human skin grafts derived from cryopreserved allogeneic dermis and autologous cultured keratinocytes. J Invest Dermatol 1988, 91:478-85.

Lavoie A, Fugere C, Fradette J, Larouche D, Paquet C, Beauparlant A, Gauvin R, Tetub FA, Roy A, Bouchard M, Genest H, Auger FA, Germain L. Considerations in the choice of a skin donor site for harvesting keratinocytes containing a high proportion of stem cells for culture in vitro. Burns 2011, 37:440-7.

Lee H. Outcomes of sprayed cultured epithelial autografts for full-thickness

wounds: a single-centre experience. Burns 2012, 38:931-6.

Limat A, French LE, Blal L, Saurat JH, Hunziker T, Salomon D. Organotypic cultures of autologous hair follicle keratinocytes for the treatment of recurrent leg ulcers. J Am Acad Dermatol 2003, 48: 207-14.

Limat A, Noser FK. Serial cultivation of single keratinocytes from the outer root sheath of human scalp hair follicles. J Invest Dermatol 1986, 87: 485.

Lindford AJ, Kaartinen IS, Virolainen S, Kuokkanen HO, Vuola J. The dermis graft: another autologous option for acute burn wound coverage. Burns 2012, 38:274-82.

Lumenta DB, Kamolz LP, Frey M. Adult burn patients with more than 60% TBSA involved-Meek and other techniques to overcome restricted skin harvest availability-the Viennese Concept. J burn care res 2009, 30:231-42.

Mcheik JN, Barrault C, Bernard FX, Levard G. Quantitative and qualitative study in keratinocytes from foreskin in children. Perspective application in paediatric surgery. Burns 2010, 36:1277-82.

Mcheik JN, Barrault C, Vincent G, Grammatico F, Peci S, Garnier J, Bernard FX, Deguercy A, Levard G. Modèles de cultures cellulaires kératinocytaires de prépuce. Possibilité d'application chez les enfants brûlés. Ann Chir Plast Esthet 2009, 54 : 528-32.

Mcheik JN, Barrault C, Pedretti N, Garnier J, Juchaux F, Levard G, Morel F, Lecron JC, Bernard FX. Foreskin-isolated kératinocytes provide successful extemporaneous autologous paediatric skin grafts. J Tissue Eng Regen Med 2013 Mars 14.

Morhenn VB, Benike CJ, Cox AJ, Charron DJ, Engelman EG. Cultured human epidermal cells do not synthesise HLA-DR. J Invest Dermatol 1982, 78:32-7.

Moustafa M, Bullock AJ, Creagh FM, Heller S, Jeffcoate W, Game F, Amery C, Tesfaye S, Ince Z, Haddow DB, MacNeil S. Randomized, controlled, single-blind study on use of autologous keratinocytes on a transfer dressing to treat nonhealing diabetic ulcers.Regen Med. 2007, 2:887-902.

Mulekar SV, Ghwish B, Al Issa A, Al Eisa A. Treatment of Vitiligo lesions by ReCell1 vs. conventional melanocyte–keratinocyte transplantation: a pilot study. Br J Dermatol 2008, 158: 45-9.

Navarro FA, Stoner ML, Park CS, Huertas JC, Lee HB, Wood FM, Orgill DP. Sprayed keratinocyte suspensions accelerate epidermal coverage in a porcine microwound model. J Burn Care Rehabil 2000, 21: 513-18.

Navsaria HA, Ojeh NO, Moiemen N, Griffiths MA, Frame JD. Reepithelialization of a full-thickness burn from stem cells of hair follicles micrografted into a tissue-engineered dermal template (Integra). Plast Reconstr Surg. 2004, 113:978-81.

O'Connor N, Mulliken J, Banks-Schlegel, Kehinde S, Green H. Grafting of burns with cultured epithelium prepared from autologous epidermal cells. Lancet 1981, 1:75-8.

Paddle-Ledinek JE, Cruickshank DG, Masterton JP. Skin replacement by cultured keratinocyte grafts: an Australian experience. Burns 1997, 23:204–11.

Papini S, Cecchetti D, Campani D, Fitzgerald W, Grivel JC, Chen S, Margolis L, Revoltella RP. Isolation and clonal analysis of human epidermal keratinocyte stem cells in long-term culture. Stem Cells 2003, 21:481-94.

Pham C, Greenwood J, Cleland H, Woodruff P, Maddern G. Bioengineered skin substitutes for the management of burns: a systematic review. Burns 2007, 33:946-57.

Pierce GF, Mustoe TA. Pharmacologic enhancement of wound healing. Annu Rev Med 1995, 46: 467–81.

Pokorna E, Broz L, Vesely P, Matouskova E. Y chromosome and vimentin used to trace the fate of allogeneic keratinocytes delivered to the wound by the recombined human/pig skin. Folia boil (praha) 2001, 47:128-34.

Poumay Y, Pittelkow MR. Cell density and culture factors regulate keratinocyte commitment to differentiation and expression of suprabasal K1/K10 keratins. J Invest Dermatol 1995, 104:271-6.

Querings K, Bachter D, Balda BR. Meshed reversed dermal graft in patients with surgical defects of sole and scalp: technique and long-term results. Dermatol Surg 2002, 28:122-6.

Rheinwald JG, Green H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. Cell 1975, 6: 331-43.

Rubis BA, Danikas D, Neumeister M, Williams WG, Suchy H, Milner SM. The use of split-thickness dermal grafts to Re surface full thickness skin defects. Burns 2002, 28:752-9.

Schlabe J, Johnen C, Schwartlander R, Moser V, Hartmann B, Gerlach JC, Kuntscher MV. Isolation and culture of different epidermal and dermal cell types from human scalp suitable for the development of a therapeutical cell spray. Burns 2008, 34: 376-84.

Schurr MJ, Foster KN, Centanni JM, Comer AR, Wicks A, Gibson AL, Thomas-Virnig CL, Schlosser SJ, Faucher LD, Lokuta MA, Allen-Hoffmann BL.Phase I/II clinical evaluation of StrataGraft: a consistent, pathogen-free human skin substitute.J Trauma 2009, 66:866-73.

See P, Phan TT, Chua JJ, Song C, Tan KC, Lee ST. Our clinical experience using cryopreserved cadaveric allograft for the management of severe burns. Cell Tissue Bank 2001, 2:113-7.

Sheridan R, Morgan J, Cusick J, Petras L, Lydon M, Tompkins R. Initial experience with a composite autologous skin substitute. Burns 2001, 75:421-4.

Shevchenko RV,James SL, James SE. A review of tissue-engineered skin bioconstructs available for skin reconstruction**.** J R Soc Interface 2010, 7: 229-58.

Shukla VK, Tiwary SK, Barnwal S, Gulati AK, Pandey SS. Effect of autologous epidermal cell suspen sion transplantation in chronic nonhealing wounds: a pilot study. Can J Surg 2010, 53:6-10.

Sood R, Roggy D, Zieger M, Balledux J, Chaudhari S, Koumanis DJ, Mir HS, Cohen A, Knipe C, Gabehart K, Coleman JJ. Cultured epithelial autografts for coverage of large burn wounds in eighty-eight patients: the Indiana University experience. J burn care res 2010, 31:559-68.

Still J, Glat P, Silverstein P, Griswold J, Mozingo D. 2003. The use of a collagen sponge/living cell composite material to treat donor sites in burn patients. Burns 2003,29: 837-41.

Still JM Jr, Orlet HK, Law EJ. Use of cultured epidermal autografts in the treatment of large burns. Burns, 1994, 20:539-41.

Stenn KS, Link R, Moellmann G, Madri J, Kuklinska E. Dispase, a neutral protease

from Bacillus polymyxa, is a powerful fibronectinase and type IV collagenase. J Invest Dermatol 1989, 93:287-90.

Tanner JC, Vabdeput JF, Olley JF. The mesh skin graft. Plast Reconstr Surg 1964, 34:287-92.

Taylor G, Lehrer MS, Jensen PJ, Sun TT, Lavker RM. Involvement of follicular stem cells in forming not only the follicle but also the epidermis. Cell 2000, 102: 451-61.

Wang XW, Sun YH, Zhang GZ, Zhang ZM, Davies JW. Tangential excision of eschar for deep burns of the hand: analysis of 156 patients collected over 10 years. Burns Incl Term Inj 1984, 11:92-8.

Wood FM, Kolybaba ML, Allen P. The use of cultured epithelial autograft in the treatment of major burn injuries: a critical review of the literature. Burns 2006, 32: 395-401.

Wood FM, Stoner ML, Fowler BV, Fear MW. The use of a non-cultured autologous cell suspension and Integra dermal regeneration template to repair full-thickness skin wounds in a porcine model: a one step process. Burns, 2007, 33:693-700.

Zhang ML, Chang ZD, Han X, Zhu M. Microskin grafting. I. Animal experiments. Burns Incl Therm Inj 1986, 12:540-3.

Zakine G, Mimoun M, Pham J, Chaouat M. Reepithelialization from stem cells of hair follicles of dermal graft of the scalp in acute treatment of third-degree burns: first clinical and histologic study. Plast Reconstr Surg, 2012, 130:42-50.

Zweifel CJ, Contaldo C, Kohler C, Jandali A, Kunzi W, Giovanoli P. Initial experiences using non-cultured autologous keratinocyte suspension for burn wound closure. J Plast Reconst Aesthet Surg 2008, 61:1-4.

Wound healing	Structure	Advantage	Disadvantage	References
Skin grafts				
Split-thickness autologous graft	Autologous dermo-epidermal skin	Expansion 2 to 6	Painful process, limited in extensive burns	Tanner 1964
Microskin autologous graft	Autologous dermo-epidermal skin	Expansion 7 to 26	Cosmetic and functional results not consistent. Need allograft	Chen 2011
Dermal graft				
Autologous dermal graft	Dermis	Definitive dermo epidermal healing.	Dermis is affected with epidermis in deep burns	Zakine 2012
Allograft	Skin	Coverage in extensive burns	Rejection by 2 weeks	Achauer 1986
Dermal substitutes				
Integra	*Collagen1, chondroitin 6 sulfate, silicone*	*Immediate coverage.26 children of 106 patients*	*Epidermal graft 2 weeks later. Infections*	*Heimbach 1988*
Alloderm	Acellular human allograft skin	Immediate coverage	Contraindicated in wound infections or nonvascular wounds	Bannasch 2008
Biobrane	Porcine collagen, nylon, silicone	Immediate coverage	Temporary coverage	Pham 2007
Oasis	Porcine collagen	Scaffold for growth of tissue		Wang 1984
Tissue engineering and cell grafts				
Cultured epithelial autograft CEA (Epicel)	Confluent autologous keratinocytes	Large burned area *17 children of 30 patients* *32 children* *20 children of 88 patients*	Fragility, infection, scarring, contraction *Longer hospital stay, more reconstructive surgery*	Rheinwald 1975 *Carsin 2000* *Barret 2000* *Sood 2010*
Celaderm	Living foreskin-derived allogenic keratinocytes	6-months shelf life		Haslik 2010
Cellspray	Subconfluent keratinocytes	Spray at earlier stages	Need dermal element	Gravante 2007
Foreskin-derived keratinocytes	*Autologous keratinocytes in suspension*	*No rejection*	*Allograft for girls*	*Mcheik 2013*
Bioseed-S	Autologous keratinocytes, fibrin glue	Simple handling		Shevchenko 2010
MySkin	Living autologous keratinocytes cultured on a silicone support layer	No rejection	Delay in preparation. Need dermal substitute	Moustafa 2007
Dermagraft	polygalactin membrane with cultured neonatal foreskin fibroblasts	Lower infections, 6 months shelf life	Contraindicated in wound infections Similar to allograft	Pham 2007
Hyalograft 3D	Hyaluronic acid with autologous fbroblats and keratinocytes		Complicated clinical use	Shevchenko 2010
TransCyte	Biobrane with cultured allogenic human fibroblasts	1.5 year life frozen	Temporary coverage	Pham 2007

Cultured skin substitute CSS	Autologous fibroblasts and keratinocytes in collagen	Life-threatening burns	Slower vascularisation and keratinisation Fragility and infections	Boyce 1995
Composite skin replacement CSR	*Cultured autologous keratinocytes in acellular allogenic dermis*	*Extensive burns. 7 children*	*Infections*	*Sheridan 2001*
Composite skin	Autologous keratinocytes and preadipocytes in matriderm			Keck 2011
Autologous bioengineered composite skin ABCS	Autologous keratinocytes and fibroblasts in allogenic plasma from blood bank	Extensive burns		Gomez 2011
Apligraf	Bovine collagen1 and allogenic keratinocytes and fibroblasts from neonatal foreskin	Immediate availability	Short shelf-life, expensive, temporary	Kirsner 1998 Wood 2007
OrCel	Allogenic neonatal fibroblasts and keratinocytes from foreskin cultured onto matrix of bovine collagen	9-mo shelf life available.	Temporary	Still 2003
PermaDerm	Collagen sponge with autologous keratinocytes and fibroblasts			Boyce 2006
Stem cell-based therapy				
Hair follicle graft with integra				Navsaria 04
Hair follicle stem cells	Epithelial sheet			Limat 2003
Autologus BM-MSC	Spray cell with fibrin and thrombin	Accelerated wound closure	Healing by 16-20 weeks	Falanga 07
Neonatal immortalized keratinocytes with biological skin substitute		Healthy bed for autograft	Comparable as cadaver allograft	Schurr 2009
Keratinocytes from human embryonic stem cells		Living basal keratinocytes, good multilayered epidermal human differentiation		Guenou 2009
Induced pluripotent cells (iPS) from somatic cells				Yamanaka 2008 Raya 2009
Keratinocytes from fibroblasts	(iPS) from somatic cells (fibroblasts) induced to keratinocytes			Uitto 2011
Growth factors				
rhPDGF-BB			Malignancy	Broughton 2006
bFGF		*20 children*		*Akita 2006*

Table 1. Therapeutic means for burn wound healings.

OBJECTIFS

Les brûlures profondes chez l'enfant sont traitées classiquement par une autogreffe de peau fine expansée en filet. Cependant, dans les cas de brûlures de grande surface, les sites donneurs d'une peau saine manquent, en engageant le pronostic vital des patients.

Notre objectif est de pouvoir couvrir une grande surface cutanée brûlée grâce à une transplantation kératinocytaire, autologue, en suspension et préparée à partir d'une biopsie cutanée de faible surface. Pour le choix d'un site donneur optimal chez les enfants, nous allons comparer les capacités des kératinocytes issus de prépuce et ceux des divers sites anatomiques.

Nous étudierons les capacités prolifératives et régénératives de plusieurs sites donneurs chez l'enfant. *In vitro,* les capacités prolifératives et de reconstructions épidermiques 3D des kératinocytes isolés seront étudiées ; grâce à l'analyse transcriptomique et à l'immunomarquage nous préciserons leur état de différenciation. En fonction de résultats *in vitro,* le site donneur sera choisi et nous réaliserons *in vivo* la transplantation kératinocytaire autologue en suspension.

RESULTATS

1. ETUDES *IN VITRO* PHENOTYPIQUES ET FONCTIONNELLES DES CAPACITES REGENERATIVES DES KERATINOCYTES HUMAINS.

Nous avons réalisé une étude quantitative et qualitative *in vitro* des propriétés des kératinocytes préputiaux obtenus suite à une circoncision chez les enfants. Une double digestion enzymatique par la trypsine et la dispase nous a permis de récupérer une quantité importante de kératinocytes par pièce opératoire (2,5 10^6 kératinocytes /cm^2 de peau), supérieure à celle que nous obtenions à partir d'une peau d'adulte (seins, abdomen). Ensuite, nous avons réalisé les cultures cellulaires jusqu'au stade confluent, permettant de réaliser dix passages successifs en partant de la même population cellulaire. Enfin, les cultures kératinocytaires préputiaux sur les treillis de collagène permettaient une reconstruction épithéliale 3D de grande qualité (RHE). Au niveau de l'épithélium reconstruit, les kératinocytes exprimaient les marqueurs de la différenciation épidermique (filaggrine, loricrine et transglutaminase) d'une manière appropriée et nous avons pu detecter les marqueurs de la jonction dermo épidermique (laminine 5, collagène IV et collagène VII). Ces résultats nous ont menés à proposer d'utiliser les cellules kératinocytaires préputiales en suspension pour les transplantations extemporanées autologues chez les enfants brulés. L'article ci-dessous rapporte nos premiers résultats *in vitro.*

Article 2. Quantitative and qualitative study in keratinocytes from foreskin in children: Perspective application in paediatric burns. Burns 2010.

J.N. Mcheik, C. Barrault, F.X. Bernard, G. Levard.
Service de Chirurgie Pédiatrique, CHU de Poitiers, France.
Laboratoire Inflammation, Tissus Epithéliaux et Cytokines (LITEC), Université de Poitiers, France.
BIOalternatives, Gençay, France. Laboratoire d'Immunologie et Inflammation, CHU de Poitiers, France

2. TRANSPLANTATION CHIRURGICALE KERATINOCYTAIRE AUTOLOGUE EN SUSPENSION CHEZ LES ENFANTS BRULES.

In vitro, nous avons montré le grand pouvoir productif et régénératif des kératinocytes préputiaux, et nous avons opté *in vivo* pour une transplantation kératinocytaire préputiale autologue chez les garçons brûlés. Pour traiter les filles et trouver un site donneur équivalent au prépuce, nous avons étudié *in vitro* la peau de la face postérieure du pavillon auriculaire obtenue suite à une otoplastie. Le pouvoir productif des kératinocytes auriculaires était deux fois plus faible que les kératinocytes préputiaux, mais leur pouvoir prolifératif était comparable. Devant ces résultats, nous avons opté pour une transplantation kératinocytaire auriculaire autologue chez les filles. Les enfants ont été admis pour une brulure profonde dans le service de chirurgie pédiatrique du centre hospitalier universitaire de Poitiers. Les critères d'inclusion étaient les brulures profondes du deuxième degré.

Cinq à dix jours après l'accident selon l'état du patient, les circoncisions chez les garçons et les biopsies auriculaires chez les filles ont été effectuées et les suspensions kératinocytaires ont été obtenues suite à une double digestion enzymatique. Les procédures d'isolement et de préparation des kératinocytes ont eu lieu au bloc opératoire dans le service de chirurgie pédiatrique.Une seringue de 1 ml de la suspension cellulaire a été employée sur environ 2,5% de SCB, soit 2 10^6 kératinocytes pour 1 % SCB (figure 15). Chez tous les patients, un parage adéquat a été obtenu et la transplantation autologue a été réalisée par la suspension kératinocytaire en goutte-à-goutte déposée d'une manière homogène sur la surface des brûlures. Chez 8 garçons sur 9, la cicatrisation complète a été obtenue entre 5 et 30 jours. Pour un patient, la cicatrisation par greffe kératinocytaire représentait 80% de la surface brûlée, et les surfaces restantes ont été fermées par une greffe de peau fine standard. Nous n'avons pas observé de cicatrisation pour les 2 filles où une transplantation de kératinocytes auriculaires a été réalisée. Ces deux patientes ont eu besoin d'une greffe de peau fine standard. Chez les garçons, la qualité esthétique et fonctionnelle des cicatrices évaluée selon le score de Vancouver un, trois, six et douze mois après la greffe, était excellente. L'article suivant rapporte les résultats *in vitro* et *in vivo.*

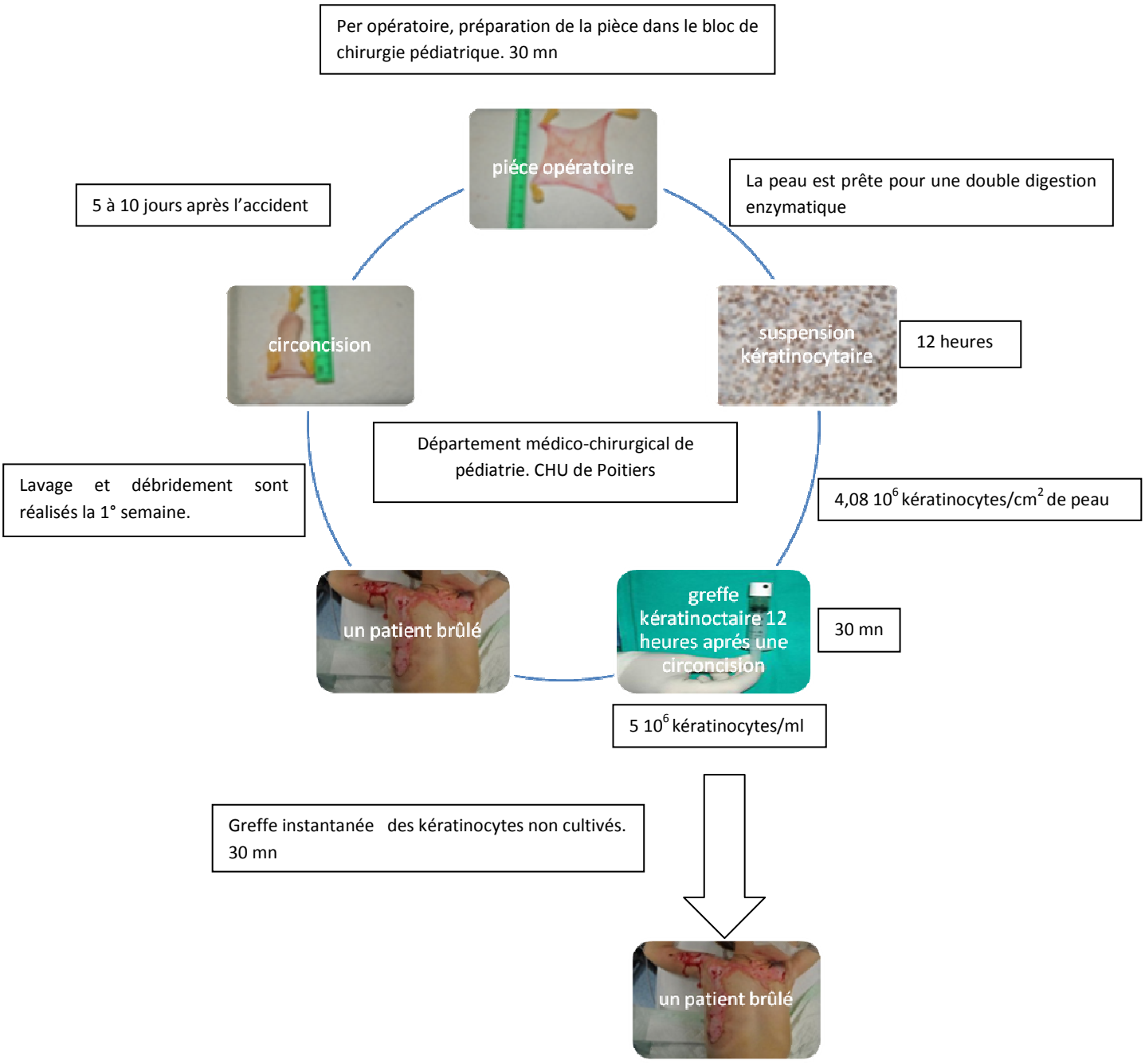


Figure 15. Schéma du protocole d'une greffe kératinocytaire.

ARTICLES 3. Foreskin-isolated kératinocytes provide successful extemporaneous autologous paediatric skin grafts. J Tissue Eng Regen Med 2013.

Jiad N. Mcheik, Christine Barrault, Nathalie Pedretti, Julien Garnier, Franck Juchaux, Guillaume Levard, Franck Morel, Jean-Claude Lecron and François-Xavier Bernard.

Service de Chirurgie Pédiatrique, CHU de Poitiers, France.
Laboratoire Inflammation, Tissus Epithéliaux et Cytokines (LITEC), Université de Poitiers, France.
BIOalternatives, Gençay, France. Laboratoire d'Immunologie et Inflammation, CHU de Poitiers, France

3. DONNEES COMPLEMENTAIRES

Face à l'échec des cultures kératinocytaires auriculaires *in vitro* associé aux mauvais résultats *in* vivo chez les filles, nous poursuivons nos travaux pour évaluer les capacités productives et régénératives des différents sites donneurs chez les enfants et les adultes. La reconstruction RHE 3D *in vitro* nous semble un bon indicateur prédictif de la capacité régénérative kératinocytaire *in vivo.* Nous souhaitons étudier les capacités kératinocytaires en fonction de l'âge, en collaboration avec le service d'urologie (Pr Doré) et de chirurgie plastique (Dr Huguier), nous comparerons les kératinocytes préputiaux enfants et adultes. Les résultats présentés ci-dessous sont préliminaires, car la collecte des différents sites n'est pas encore terminée. Ces résultats nous montrent toujours le haut pouvoir productif de la peau préputiale par rapport aux autres sites. Malgré le faible nombre de prélèvements préputiaux chez l'adulte (n=3), nous notons une capacité productive 2 fois supérieure dans un prépuce d'enfant par rapport au prépuce d'adulte (4,08 *vs* 2.52 10^6 kératinocytes/cm^2 de peau). Cette supériorité persiste après une première culture. Chez l'enfant, la région inguinale a la plus faible productivité kératinocytaire (1,29 10^6 kératinocytes/ cm^2 de peau) et une capacité proliférative 2 fois plus faible qu'un tissu préputial. Par contre, nous avons relevé que le temps de génération est relativement constant pour les kératinocytes des prépuces enfants et adultes, et que la région inguinale a le temps de génération le plus court (26,19 heures) (tableau 2, figures 16-20).

R0 : kératinocytes $10^6/cm^2$ R1 : cellules/cm^2/jourGénération en heures : R1-R2									
Sites donneurs	**moyenne**	**sd**	**sem**	**moyenne**	**sd**	**sem**	**moyenne**	**sd**	**sem**
Prépuce enfant	4,08	2,88	0,32	494355	440593	48955	29,66	8,74	0,97
Pavillon auriculaire	2,79	2,81	0,56	170971	165210	33042	30,45	5,43	1,09
Pli inguinal	1,29	0,38	0,14	233639	176939	62557	26,19	3,55	1,25
Autres	1,60	1,40	0,29	322046	273092	55745	27,77	4,33	0,88
Prépuce adulte	2,52	1,27	0,74	101811	11210	6472	29,41	1,15	0,81
Plastie mammaire	1,09	0,93	0,23	34242	29222	7087	32,74	9,05	2,20

Tableau 2. R0 : nombre de kératinocytes obtenus après une double digestion enzymatique. R1 : nombre de kératinocytes obtenus après une première culture en fonction de la surface de tissu et du nombre de jours en culture. R1-R2 : temps de génération en heures.

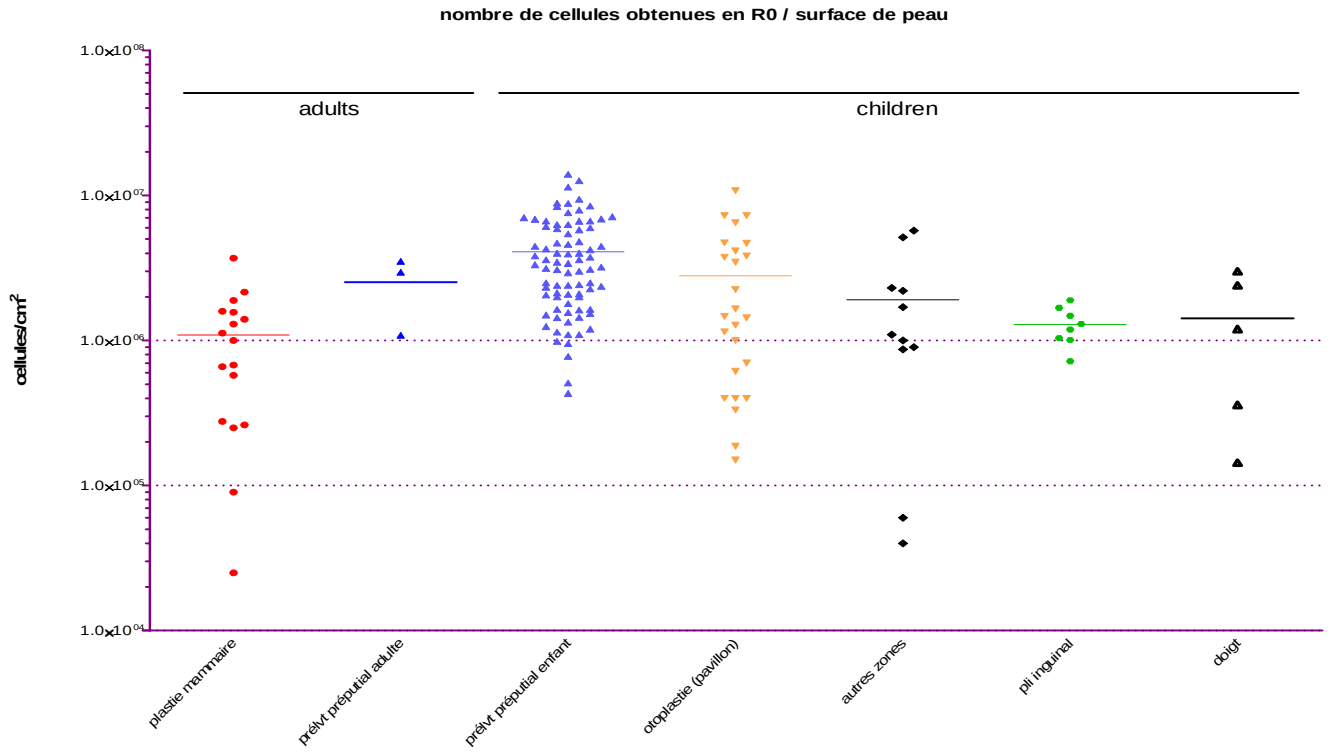


Figure 16. A Nombre de kératinocytes obtenus suite à une double digestion enzymatique (R0). Les autres zones sont : 3 prélèvements ombilicaux, 4 du tronc, 2 organes génitaux externes, 1 occipital et 1 au niveau du pied. Les prélèvements des doigts sont des polydactylies.

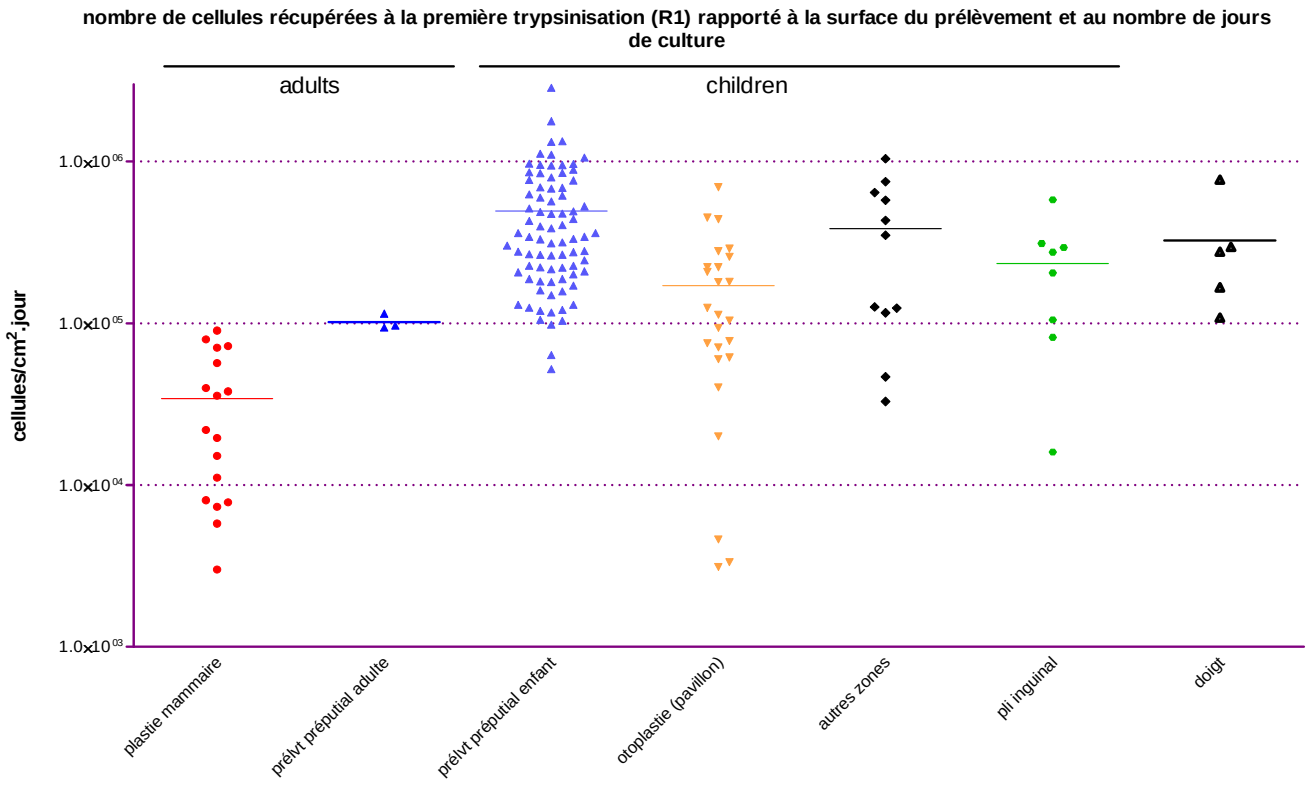


Figure 17. B nombre de cellules récupérées après une première culture rapporté à la surface du tissu et au nombre de jours de culture (R1).

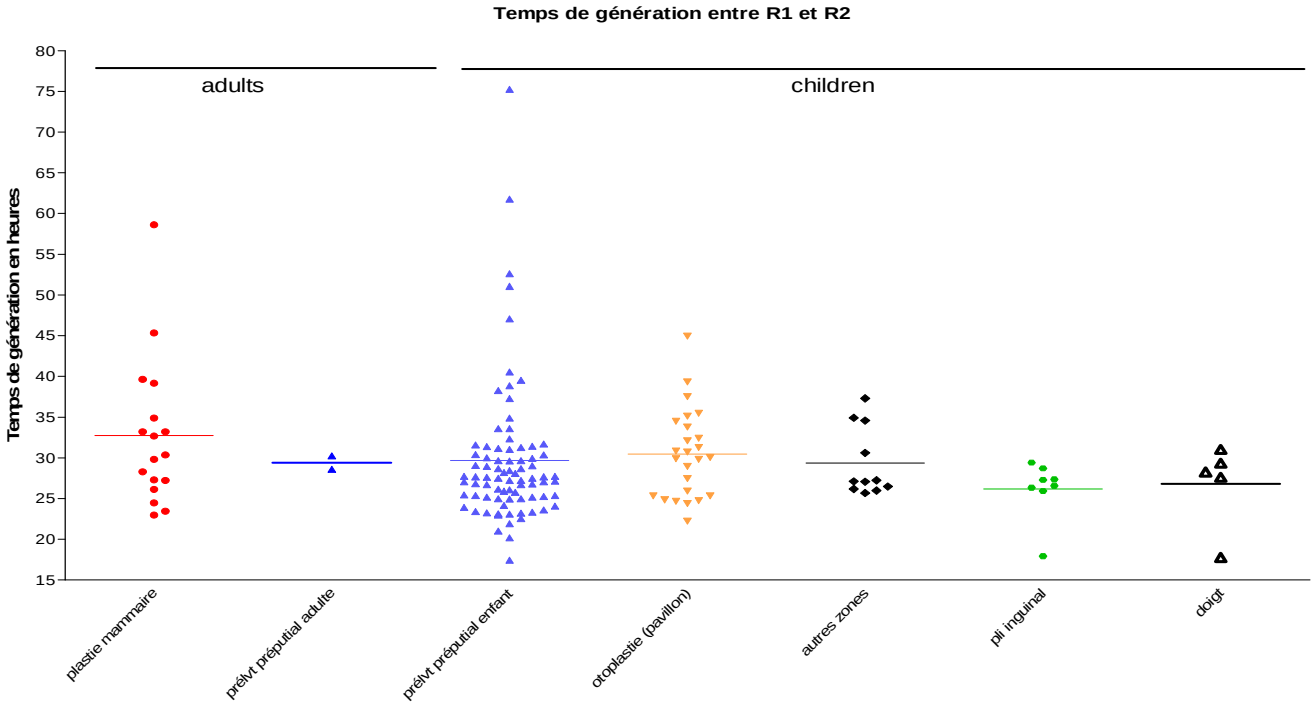


Figure 18. Temps de génération entre R1 et R2.

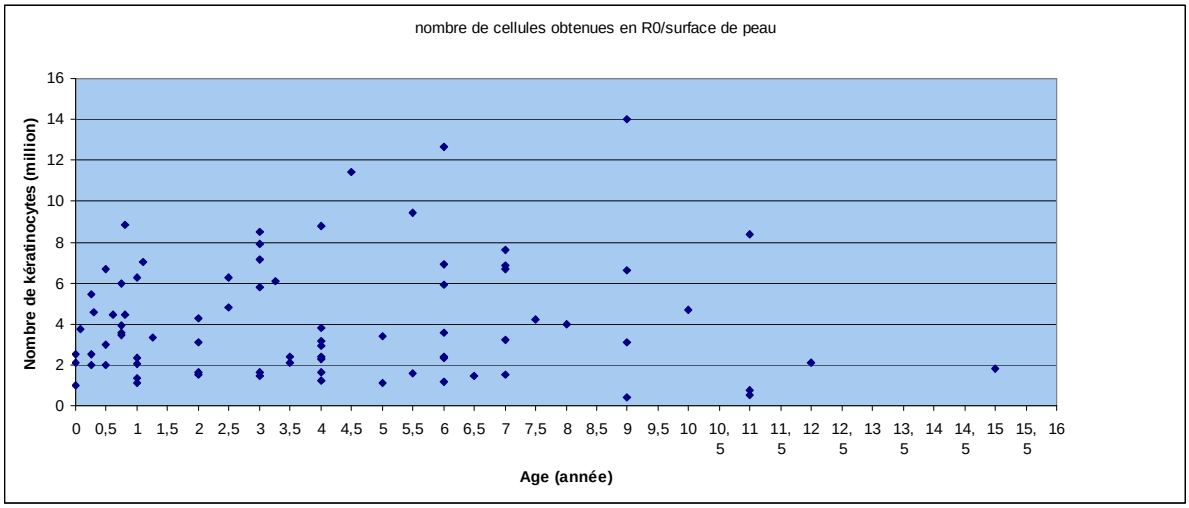


Figure 19. Nombre de kératinocytes préputiaux obtenus en R0 suite à une double digestion enzymatique en fonction de l'âge.

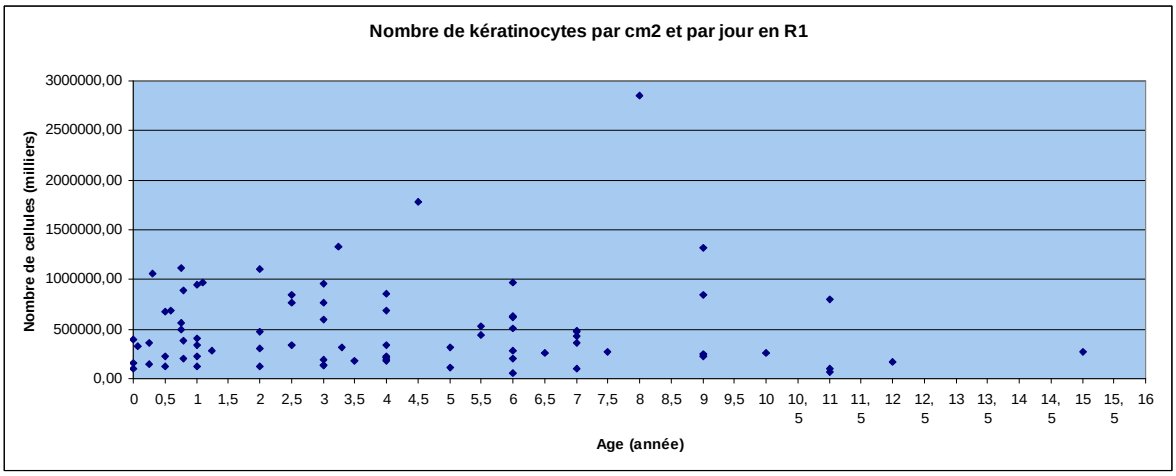


Figure 20. Nombre de kératinocytes préputiaux obtenus en R1 par cm^2 et par jour de culture en fonction de lâge.

DISCUSSION

L'épiderme se régénère en continu à travers la prolifération des cellules souches, qui est une sous-population localisée dans la membrane basale (Alonso et al 2003). La compréhension de la biologie des cellules souches épidermiques et des mécanismes régissant leur multipotence est un élément essentiel dans le développement des stratégies thérapeutiques possibles pour une application clinique. Au cours des 15 dernières années, de grands progrès ont été accomplis dans leurs identification, isolement et caractérisation (Papini et al 2003, Fuchs 2008). Des recherches récentes suggèrent la production de kératinocytes à partir de cellules souches embryonnaires. En 2009, Guenou et al ont obtenu des kératinocytes humains (K-CSEh) issus de cellules souches embryonnaires mises en culture avec du BMP4 et de l'acide ascorbique pendant 40 jours. L'étude *in vitro* montre une perte progressive des gènes caractéristiques des cellules pluripotentes, puis une expression transitoire de cytokératines marqueurs d'une différenciation épidermiques. Ces kératinocytes produisent en culture un épiderme pluri stratifié qui a été greffé avec succès chez les souris immunodéficientes. Ces K-CSEh peuvent être repiqués et congelés plus de neuf fois sans perte de potentiel prolifératif. En outre, la démarche dans le sens inverse est également décrite, puisque des cellules pluripotentes ont été obtenues (Yamanaka 2008, Raya et al en 2009). Aussi, les progrès dans ce domaine sont considérables, et le défi dans les années à venir consistera à transférer effectivement toutes ces avancées de la biologie cellulaire et moléculaire à la pratique clinique de routine. Dans ce cadre, Leonardi et al en 2012 ont réalisé une transplantation des cellules souches mésenchymateuses murines chez les souris porteuses d'une brûlure dorsale, en employant l'intégra comme moyen de transfert. Les études immuno histochimiques ont démontré la prolifération cellulaire dans l'intégra chez les souris greffées. L'idée d'utiliser les cellules souches épidermiques pour traiter les enfants brûlés en pratique courante nous a séduits, et notre pratique chirurgicale quotidienne nous a rapidement orientés vers une transplantation autologue des kératinocytes en suspension.

Peu de centres utilisent la transplantation kératinocytaire chez les adultes brûlés et encore moins chez les enfants. *In vitro*, nous avons étudié les capacités productives et prolifératives des tissus cutanés des enfants et des adultes et nous avons constaté rapidement la supériorité de kératinocytes issus de prépuce. *In vitro*, les kératinocytes préputiaux prolifèrent 15 fois plus que ceux issus d'une peau adulte. Dans notre quête de trouver le site optimal donneur des kératinocytes, en particulier en vue de greffer chez la petite fille, nous avons comparé

différentes régions anatomiques cutanées pédiatriques : prépuce, oreilles et autres sites donneurs...

Le cuir chevelu humain semble être un site intéressant. Plusieurs équipes ont démontré que les cellules souches folliculaires de cheveux, situés dans la région de renflement « bulge », peuvent donner lieu à plusieurs types de cellules du follicule pileux ainsi que des cellules épidermique (Limat al 1986, Taylor et al 2000). Cependant, il nous semble difficile en pratique clinique chez l'enfant d'extraire ces cellules des follicules pileux, profondément situées. Dans ce cadre, une étude comparative des sites donneurs chez les adultes réalisée par Lavoie et al en 2011, étudiait le cuir chevelu, la région auriculaire (pré-auriculaire et post-auriculaire) et du tronc. La peau du cuir chevelu, la peau auriculaire ont été obtenues suite à un lifting et la peau du tronc suite à une chirurgie mammaire. L'expression de la kératine K19 a été utilisée pour évaluer la proportion de cellules souches. La proportion de cellules K19+ auriculaire était le double de celles du cuir chevelu et du tronc, et cette supériorité d'expression se maintenait en cultures. Par contre, l'expression K19 s'est avérée plus importante *in situ* dans la peau du cuir chevelu. Ces résultats indiquent que, en plus du choix d'un site donneur riche en cellules souches, la qualité des cultures dépend fortement de la capacité à extraire ces cellules à partir de la biopsie cutanée. Par ailleurs, l'expression de K10, marqueur de différenciation terminale, était nettement supérieure au niveau du tronc. Au passage notons que, la densité des cheveux variait de 170 à 430cheveux/cm^2 pour le cuir chevelu, et de 220-1130cheveux/cm^2 pour une peau de la région auriculaire, tandis que le diamètre moyen des follicules pileux du cuir chevelu était le double de celle des follicules auriculaires. En dépit des différences dans la taille et la densité des follicules pileux, le rendement total des kératinocytes/cm^2 a été similaire pour les 2 sites.

Compte tenu des difficultés à récolter les cellules souches en profondeur dans le cuir chevelu, nous avons étudié les différents sites donneurs chez l'enfant à la recherche d'une peau fine et facile à prélever sans laisser une cicatrice disgracieuse. Les données acquises en chirurgie plastique pédiatrique nous ont orientés vers la peau préputiale obtenue suite à une circoncision et auriculaire obtenue suite à une otoplastie. Les kératinocytes de prépuce ont une plus grande capacité régénérative que les kératinocytes auriculaires, ils expriment peu les marqueurs de différenciation (filaggrine, loricrine et transglutaminase), et plus les marqueurs de cellules souches (K19, p63). Contrairement aux kératinocytes auriculaires, les kératinocytes de prépuce ont de grandes capacités pour la reconstruction épidermique, menant à bien la reconstruction 3D d'un épithélium multicouche (RHE), dans lesquelles les

marqueurs de différenciation ont été progressivement et de manière appropriée exprimés. Ces résultats indiquent que les kératinocytes préputiaux présentent un phénotype initial indifférencié, favorable à une haute capacité régénérative. A la lumière de nos constations *in vitro,* nous avons proposé d'utiliser les kératinocytes préputiaux non cultivés en suspension pour une transplantation extemporanée autologue chez les enfants porteurs d'une brûlure profonde (Mcheiket al 2009, 2010).

L'utilisation avec succès de la transplantation kératinocytaire autologue a été décrite la première fois par Hunyadi et al en 1988. Ces auteurs ont obtenu la cicatrisation chez 25 patients suivis pour une brûlure ou une ulcération veineuse. Depuis, les succès avec la transplantation kératinocytaire autologue chez des patients brûlés ont été rapportés dans des petites séries (Zweifel et al 2008, James et al 2010, Gerlach et al 2011). Chez 13 enfants atteints d'une brûlure profonde avec une SCB de 4%, Wood et al en 2012 ont mené une étude randomisée dans 3 groupes: le premier groupe avec un pansement standard (IntrasiteTM, Acticoat TM et Duoderm tous les 3 jours), le deuxième groupe avec Biobrane® et le dernier avec Biobrane®et greffe cellulaire autologue, en utilisant le kit Recell. Les enfants du dernier groupe ont cicatrisé rapidement et d'une manière satisfaisante : les patients ont eu moins de pansements, un temps de guérison plus court et des niveaux de douleur plus faibles. Devant ces résultats, il était évident que cette procédure peut être intégrée à l'arsenal thérapeutique existant chez les patients gravement brûlés. Dans une autre étude de 16 adultes brûlés (SCB de 51%), Lee en 2012 a décrit la greffe d'une suspension de kératinocytes abdominaux cultivés 16 jours, combinée à une greffe de peau fine en filet expansée 6:1. En attendant la transplantation, une allogreffe d'une peau de cadavre a été employée. Une prise de greffe était constatée sur 90% de surface en 8 semaines. Ce dernier travail a eu le mérite de montrer que cette transplantation kératinocytaire peut s'intégrer dans les procédures existantes dans la prise en charge des brûlés. Une transplantation en suspension peut être employée également pour les plaies chroniques (insuffisance vasculaire et diabète), Shukla et al en 2010 ont greffé des kératinocytes de la cuisse chez 15 patients adultes. Six patients ont cicatrisés complètement en 12 semaines, 1 patient en 16 semaines et 2 patients en 20 semaines.

Dans notre étude, les garçons brûlés et greffés avec des kératinocytes autologues isolés du prépuce conduit à une épithélialisation accélérée avec une qualité améliorée par rapport à des greffes de peau classiques. Nous avons obtenu une cicatrice de très bonne qualité: coloration, pigmentation et souplesse sans hypertrophie ou prurit (Mcheik et al 2013). En outre, la transplantation de kératinocytes en suspension s'était avérée indispensable lorsque de vastes

zones brûlées ne peuvent pas être couvertes par une greffe de peau standard. Cette transplantation kératinocytaire représente une technique facilement applicable pour un grand nombre d'équipes de chirurgie pédiatrique et permet une organisation optimale pour réaliser une greffe au temps adéquat (la circoncision est réalisée 12 heures avant la procédure de greffe), en évitant les longues et laborieuses cultures, difficilement compatibles avec la pratique clinique.

A ce stade, nos résultats nous ont encouragés à réaliser la transplantation kératinocytaire autologue préputiale en suspension chez les garçons brulés. De suite, la première question qui se posait : « que faisons-nous pour les filles ?». Suite à la digestion enzymatique, la peau auriculaire était initialement moins productive que la peau préputiale. Le pouvoir prolifératif des kératinocytes auriculaires *in vitro* était 2 fois inferieur à celui des kératinocytes préputiaux, mais avec un temps de doublement identique. Nous avons finalement opté pour une transplantation kératinocytaire auriculaire autologue chez deux patientes brûlées. En sachant qu'en cas des difficultés, nous pouvions toujours proposer une greffe de peau fine en filet. Rapidement, nous avons constaté l'échec de greffe cellulaire chez les filles et nous avons opté pour une greffe d'une peau fine. *A posteriori*, Les résultats cliniques obtenus chez les filles sont bien corrélés aux résultats de culture *in vitro* 3D, qui montrent bien la mauvaise qualité des RHE issus des kératinocytes auriculaires.

Une deuxième option pour les filles serait l'allogreffe kératinocytaire préputiale? Une transplantation allogénique à travers la barrière d'histocompatibilité est habituellement rejetée en 10 à 14 jours, sauf si le système immunitaire de l'hôte est inhibé. Le tissu cutané contient des cellules immunitaires présentatrices de l'antigène, pouvant engager le rejet du greffe par l'expression des molécules d'histocompatibilité de classe II. Néanmoins, l'utilisation de kératinocytes de prépuce est proposée pour l'allogreffe kératinocytaire ou les reconstructions épithéliales (De Corte et al 2012). Ainsi, récemment et lors d'une large étude multicentrique, Kirsner et al en 2012 ont greffé les ulcères de jambe veineux chroniques par une suspension kératinocytaire et fibroblastique allogénique issue du prépuce néonatal et administrée par spray. Ces résultats étaient concordants avec les travaux réalisés par Haslik et al en 2010, où les résultats de la cicatrisation entre une greffe kératinocytaire allogènique et une greffe de peau fine étaient comparables chez 27 patients. Dans les 2 séries, les cellules étaient irradiées et seul l'effet sécrétoire de la greffe était recherché. Vu les résultats, nous retiendrons qu'au delà d'une prise de greffe kératinocytaire, il est supposé que la greffe kératinocytaire allogénique accélère la cicatrisation par l'expression de cytokines et de facteurs de croissance.

Cependant, les mécanismes de la cicatrisation des brûlures après transplantation d'allogreffe ne sont pas encore bien caractérisés. La barrière cutanée épidermique est formée en majeure partie par les kératinocytes qui sécrètent une multitude de molécules biologiques actives, en particulier cytokines et facteurs de croissance, qui contribuent aux réactions inflammatoires et la guérison des plaies. Ce sujet présente une place privilégiée dans nos perspectives : nous souhaitons évaluer le rôle des facteurs cytokiniques au cours de la greffe dans la réaction inflammatoire et la cicatrisation.

Pour revenir aux enfants brûlés de sexe féminin, nous souhaitons continuer nos travaux comparatifs *in vitro* et plus particulièrement les cultures RHE 3D, que nous considérons comme un élément prédictif de la réussite d'une transplantation. Nous étudierons comparativement *in vitro* la région inguinale, la région rétro auriculaire et d'autres sites chez l'enfant et chez l'adulte en vue d'identifier des sites donneurs.

In vitro, nous souhaitons approfondir l'étude des marqueurs au niveau membranaire ainsi que l'analyse transcriptomique kératinocytaire. L'objectif étant de tenter d'affiner notre procédure de transplantation en utilisant une population cellulaire souche homogène, avec la concentration cellulaire adéquate pour la réussite d'une greffe. Et cette greffe peut être menée dans une étude multicentrique dans le cadre d'un PHRC. Dans ce cadre, nous pouvons étudier l'association d'une transplantation kératinocytaire et d'un derme artificiel pour la greffe d'une brûlure profonde du 3eme degré.

Enfin, nous proposons une technique facile et applicable pour la greffe ce qui est essentiel lorsque les ressources d'un pays en développement ne permettent pas de faire face aux dépenses dans le traitement des plaies comme les brûlures, génératrices d'une mortalité élevée chez les enfants. Dans ce cadre, nos projets d'avenir est de travailler en collaboration avec les centres de chirurgie pédiatriques (Burkina Fasso, Cote D'ivoire) prenant en charge les enfants brûlés pour étudier la possibilité de mettre en place les procédures d'une transplantation kératinocytaire.

En conclusion, grâce à des travaux de recherche fondamentaux, nous avons démontré que la transplantation des kératinocytes fraîchement isolés du prépuce accélère la cicatrisation avec une haute qualité fonctionnelle et esthétique. Un grand nombre de kératinocytes peuvent être récoltés en quelques heures et la greffe peut être réalisée extemporanément. Appliquer directement les cellules sur la plaie à l'aide d'un dispositif de suspension, tel qu'un aérosol ou une seringue en goutte à goutte, supprime l'utilisation d'une membrane de transfert, ce qui

élimine une source potentielle d'inefficacité. Cette procédure permet de greffer une grande surface brûlée à partir d’une faible surface cutanée prélevée quelques jours après l’accident. Elle permet également la récolte et la transplantation de toute la population cellulaire épidermique. Nos succès cliniques et la facilité de la procédure dans la salle d'opération nous permettent de proposer la greffe autologue kératinocyataire comme une procédure standard, qui peut être ajoutée à l'arsenal thérapeutique des équipes prenant en charge les enfants brûlés.

La transplantation kératinocytaire autologue en pratique clinique chez les enfants brûlés était fondée et soutenue par les travaux fondamentaux. Cette collaboration nous encourage à renforcer les liens entre les cliniciens et les chercheurs pour optimiser nos actions.

BIBLIOGRAPHIE

Alonso L, Fuchs E. Stem cells of the skin epithelium. Proc Natl Acad Sci USA 2003, 100: 11830-5.

Atiyeh BS, Costagliola M. cultured epithelial autograft (CEA) in burn treatment: three decades later. Burns 2007, 33:405-13.

Barlow YM, Burt AM, Clarke JA, Mc Grouther DA, Lang SM. The use of a polymeric film for the culture and transfer of sub-confluent autologous keratinocytes to patients. J Tissue Viability 1992, 2:33-6.

Barret JP, Wolf SE, Desai MH, Herndon DN. Cost-efficacy of cultured epidermal autografts in massive pediatric burns. Ann Surg 2000, 231:869-76.

Baryza MJ, Baryza GA. The Vancouver Scare Scale: an administration tool and its interrater reliability. J Burn Care Rehabil 1995, 16: 535-38.

Baux S, Mimoun M, Kirsch JM, Guero S, Faivre JM, Spagnoli AM. Brûlures récentes des mains. Excision-greffe précoce contre traitement conventionnel. Étude rétrospective sur deux années. Ann Chir Main1987, 6 : 276-81.

Benitah SA, Frye M, Glogauer M, Watt FM. Stem cell depletion through epidermal deletion of Rac1. Science 2005, 309:933-5.

Bernard FX, Morel F, Camus M, Pedretti N, Barrault C, Garnier J, Lecron JC. Keratinocytes under fire of proinflammatory cytokines: bonafide innate immune cells involved in the physiopathology of chronic atopic dermatitis and psoriasis. J Allergy 2012, 718725.

Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, Weiner HL, Kuchroo VK. Reciprocal developmental pathways for the génération of pathogenenic effector TH17 and reulatory Tcells. Nature 2006, 441: 235-8.

Bettex-Galland M, Slongo T, Hunziker T, Wiesmann U, Bettex M. Use of cultured keratinocytes in the treatment of severe burns. Z kinderchir 1988, 43:224-8.

Blair SD, Nanchahal J, Backhouse CM, Harper R, Mc Collum CN. Microscopic split-skin grafts: a new technique for 30-fold expansion. Lancet 1987, 2:483-4.

Blitterswijk CA, Thomsen P. Tissue engineering. 1. Amsterdam; Boston: Elsevier/Academic Press; 2008.

Boniface K, Bernard FX, Garcia M, Gurney AL, Lecron JC, Morel F. IL-22 inhibits epidermal différentiation and induces proinflammatory gene expression and migration of human keratinocytes. J Immunol 2005, 174: 3695-702.

Boniface K, Diveu C, Morel F, Pedretti N, Froger J, Ravon E, Garcia M, Venereau E, Preisser L, Guignouard E, Guillet G, Dagregorio G, Pène J, Moles JP, Yssel H, Chevalier S, Bernard FX, Gascan H, Lecron JC. Oncostatin M secreted by skin infiltrating T lymphocytes is a poten keratinocyte activator involved in skin inflammation. J Immunol 2007, 178: 4615-22.

Bos JD, Luiten RM. Skin immun system. Cancer Treat Res 2000, 146 : 45-62.

Boutonnat J. Histology - étude des tissus. Chapitre 1, la peau. Faculté de médecine de Grenoble UJF. 2007.

Boyce ST, Kagan RJ, Meyer NA, Yakuboff KP, Warden GD. The 1999 clinical research award. Cultured skin substitutes combined with integra artificial skin to replace native skin autograft and allograft for the closure of excised full-thickness burns. J Burn Care Rehabil 1999, 20: 453-46.

Breitkreutz D, Mirancea N, Nischt R. Basement membranes in skin: unique matrix structures with diverse functions? Histochem Cell Biol 2009, 132:1-10.

Canady J1, Arndt S, Karrer S, Bosserhoff AK. Increased KGF expression promotes fibroblast activation in a double paracrine manner resulting in cutaneous fibrosis. J Invest Dermatol 2013, 133: 647-57.

Carsin H, Ainaud P, Le Bever H, Rives J, Lakhel A, Stephanazzi J, Lmabert F, Perrot J. Cultured epithelial autografts in extensive burn coverage of severely traumatized patients: a five year single-center experience with 30 patients. Burns 2000, 26:379-87.

Chen XL, Liang X, Sun L, Wang F, Liu S, Wang YJ. Microskin autografting in the treatment of burns over 70% of total body surface area: 14 years of clinical experience. Burns 2011, 37:973-80.

Chen YG, Nunez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. Nature 2010, 10: 826-37.

Ching YH, Sutton TL, Pierpont YN, Robson MC, Payne WG. The use of growth factors and other humoral agents to accelerate and enhance burn wound healing. Eplasty 2011, 11:e41.

Clark RA, Chong B, Mirchandani N, Brinster NK, Yamanaka K, Dowgiert RK, Kupper TS. The vast majority of CLA+T cells are resident in normal skin. J Immunol 2006, 176: 2574-9.

Clark RA. Skin résident Tcell: the ups and downs of onsite immunity. J Invest Dermatol 2010, 130: 362-70.

Colonna M. Skin function for human CD1a-reactive T cells. Nature immunology 2010, 11:1079-80.

Compton CC, Hickerson W, Nadire K, Press W. Acceleration of skin regeneration from cultured epithelial autografts by transplantation to homograft dermis. J Bum Care Rehabil 1993, 14:653- 62.

Coraux C, Hilmi C, Rouleau M, Spadafora A, Hinnrasky J, Ortonne JP, Dani C, Aberdam D. Reconstituted skin from murine embryonic stem cells. Curr Biol 2003, 13:849-53.

Cubison TC, Pape SA, Parkhouse N. Evidence for the link between healing time and the development of hypertrophic scars (HTS) in paediatric burns due to scald injury. Burns 2006, 32: 992-99.

Davis JS. Address of the president: the story of plastic surgery. Ann Surg1941, 113:641-56.

De Corte P, Verween G, Verbeken G, Rose T, Jennes S, De Coninck A, Roseeuw D, Vanderkelen A, Kets E, Haddow D, Pirnay JP. Feeder layer- and animal product-free culture of neonatal foreskin keratinocytes: improved performance, usability, quality and safety. Cell Tissue Bank 2012, 13: 175-89.

Della Volpe C, Andrac L, Casanova D, Legré R, Magalon G.La diversité de la peau : étude histologique de140 résidus cutanés, adaptée à la chirurgie plastique. Ann Chirur Plast esthét 2012, 57 : 423-49.

Desai MH, Mlakar JM, McCauley RL, Abdullah KM, Rutan RL. Lack of long-term durability of cultured keratinocyte burn-wound coverage: a case report. J Burn Care Rehabil 1991, 12:540-5.

Doma E, Rupp C, Baccarini M.EGFR-Ras-Raf Signaling in Epidermal Stem Cells:Roles in hair follicle Development, Regeneration,Tissue Remodeling and Epidermal Cancers. Int. J. Mol. Sci.2013, 14: 19361-84.

Donati L, Magliacani G, Bormioli M, Signorini M, Preis FW. Clinical experiences with keratinocyte grafts. Burns 1992, 18:19-26.

Duhen T, Geiger R, Jarrossay D, Lanzavecchia A, Sallusto F. production of IL22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing Memory T cells. Nat Immunol 2009, 10: 857-63.

Dvorankova B, Smetana Jr K, Konigova R. Cultivation and grafting of human keratinocytes on a poly (hydroxyethyl methacrylate) support to the wound bed: a clinical study. Biomaterials 1998, 19:141-6.

Fortunel NO, Hatzfeld JA, Rosemary PA, Ferraris C, Monier MN, Haydont V, lonquet J, Brethon B, Limb B, Schmidt R, Hatzfeld A. Long-term expansion of human functional epidermal precursor cells: promotion of extensive amplification by low TGFb1 concentrations. J Cell Sci 2003, 116:4043-52.

Fredriksson C, Kratz G, Huss F. Transplantation of cultured human keratinocytes in single cell suspension: a comparative in vitro study of different application technique. Burns 2008, 34: 212-19.

Frye M, Gardner C, Li ER, Arnold I, Watt FM. Evidence that myc activation depletes the epidermal stem cell compartment by modulating adhesive interactions with the local microenvironment. Development 2003, 130:2793-808.

Fu XB, Sun TZ, Yang YH. Characteristics of bFGF and TGF-beta expression in dermal chronic ulcers and hypertrophic scars and their effects on tissue repair. Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi2000, 14:271-4.

Fuchs E. Skin stem cells: rising to the surface. J Cell Biol 2008, 180:273-84.

Guenou H, Nissan X, Larcher F, Feteira J, Lemaitre G, Saidani M, Del Rio M, Barrault C, Bernard FX, Peschanski M, Baldeschi C, Waksman G. Human embryonic stem-cell derivatives for full reconstruction of the pluristratified epidermis: a preclinical study. Lancet 2009, 374: 1745-53.

Guero S. Brûlures de l'enfant. Quelle attitude pratique ? Réal Pédiatr1996, 15 : 31-5.

Gabarro P. A new method of grafting. British Medical Journal 1943, 1:723-4.

Gallico GG, O'Connor NE, Compton CC, Kehinde O, Green H. Permanent coverage of large burn wounds with autologous cultured human epithelium. N Engl J Med 1984, 311: 448-5.

Gallo RL, Nakatsuji T. Microbial symbiosis with the innate immune defense system of the skin. J Invest Dermatol 2011, 131:1974-80.

Gerlach J, Wolf SE, Johnen C, Hartmann B. Innovative Regenerative Medicine Approaches to skin cell-based therapy for patients with burn injuries, Principles of Regenerative Medicine, 76. Elsevier/Academic Press 2008, 1298-321.

Gravante G, Di Fede MC, Araco A, Grimaldi M, De Angelis B, Arpino A, Cervelli V, Montone A. A randomized trial comparing Recell system of epidermal cells delivery versus classic skin grafts for the treatment of deep partial thickness burns. Burns 2007, 33: 966-72.

Green H, Kehinde O, Thomas J. Growth of cultured human epidermal cells into multiple epithelia suitable for grafting. Proc Natl Acad Sci 1979, 76: 5665-8.

Guenou H, Nissan X, Larcher F, Feteira J, Lemaitre G, Saidani M, Del Rio M, Barrault C, Bernard FX, Peschanski M, Baldeschi C, Waksman G . Human embryonic stem-cell derivatives for full reconstruction of the pluristratified epidermis: a preclinical study. Lancet 2009, 1745-53.

Guero S. Brûlures de l'enfant. Encycl Méd Chir, Editions Scientifiques et Médicales Elsevier, Paris, Pédiatrie, 4-113-D-10, 2000, 13 p.

Guilloteau K, Paris I, Pedretti N, Boniface K, Juchaux F, Huguier V, Guillet G, Bernard FX, Lecron JC, Morel F. Skin inflammation induced by the synergistic action of IL-17A, IL-22, Oncostatin M, IL-1α, and TNFα recapitulates some features of psoriasis.J Immunol. 2010 Mar 24**.**

Guo F, Chen XL, Wang YJ, Wang F, Chen XY, Sun YX. Management of burns over 80% of total body surface area: a comparative study. Burns 2009, 35:210-4.

Haller HL, Dirnberger J, Giretzlehner M, Rodemund C, Kamolz L. Understanding burns: research project BurnCase 3D--overcome the limits of existing methods in burns documentation. Burns 2009, 35:311-7.

Harris PA, Leigh IM, Navsaria HA. Pre-confluent keratinocyte grafting: the future for cultured skin replacements? Burns 1998, 24: 591-3.

Harvey C. Wound healing. Orthop Nurs 2005, 24:143-57.

Haslik W, Kamolz LP, Lumenta DB, Hladik M, Beck H, Frey M.The treatment of deep dermal hand burns: How do we achieve better results? Should we use allogeneic keratinocytes or skin grafts? Burns 2010, 36:329-34.

Heath W, Carbonne F. The skin-resident and migratory immune system in steady state and memory: innate lymphocytes, dendritic cells and T cells. Nature immunologie 2013, 14:978-984.

Herndon DN, Barrow RE, Kunkel KR, Broemeling L, Rutan RL. Effects of recombinant human growth hormone on donor-site healing in severely burned children. Ann Surg1990, 212:424-9.

Herndon DN, Hawkins HK, Nguyen TT, Pierre E, Cox R, Barrow RE. Characterization of growth hormone enhanced donor site healing in patients with large cutaneous burns. Ann Surg1995, 221:649-56.

Hunyadi J, Farkas B, Bertenyi C, Olah J, Dobozy A. Keratinocyte grafting: a new means of transplantation for full-thickness wounds. J Dermatol Surg Oncol 1988, 14: 75-8.

Hsieh CH, Schuong JY, Huang WS, Huang TT. Five years'experience of the modified Meek technique in the management of extensive burns. Burns 2008, 34:350-4.

Inoue Y, Tanabe H, Tai Y. A method for the preparation of microskin grafts using skin-graft meshers. Plastic and Reconstructive Surgery 1994, 94:890.

Jackson DM. The evolution of burn treatment in the last 50 years. Burns 1991, 17: 329-34.

James SE, Booth S, Dheansa B, Manna DJ, Reid MJ, Shevchenko RV, Philip M. Gilbert PM. Sprayed cultured autologous keratinocytes used alone or in combination with meshed autografts to accelerate wound closure in difficult-to-heal burns patients. Burns 2010, 36: 10-20.

Johnen C , Chinnici C, Triolo F, Plettig J, Brautigam K, Amico G, Young M, Over P, Vives RE, Schmelzer E, Conaldi PG, Turner M, Thompson R, Zeilinger K, Rubin P, Vizzini G, Gridelli B, Gerlach J. Phenotypical characterization of 6-21-week gestational age human dermis and epidermal cell isolation methods for in vitro studies on epidermal progenitors. Burns 2013, 39: 300-10.

Josefowicz CZ, Rudensky A. Control of regulatory cell lineage commitment and maintenance. Immunity 2009, 30: 616-25.

Kaur P. Interfollicular Epidermal Stem Cells: Identification, Challenges, Potential. J Invest Dermatol 2006, 126: 1450-8.

Kirsner RS, Marston WA, Snyder RJ, Lee TD, Cargill I, Slade HB. Spray-applied cell therapy with human allogeneic fibroblasts and keratinocytes for the treatment of chronic venous leg ulcers: a phase 2, multicentre, double-blind, randomised, placebo-controlled trial. Lancet 2012, 12: 60644-8.

Koster MI, Kim S, Mills AA, De Mayo FJ, Roop DR. p63 is the molecular switch for initiation of an epithelial stratification program. Genes Dev 2004, 18:126-31.

Kreis RW, Mackie DP, Hermans RP, Vloemans AR. Expansion technique for skin grafts: comparison between mesh and Meek island (sandwiched-) grafts. Burns 1994, 20:39-42.

Kulukian A, Fuchs E. Spindle orientation and epidermal morphogenesis. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci2013, 23: 368.

Lai CS, Lin SD, Tsai CC, Tsai CW, Chou CK. An easy way to prepare microskin grafts. Burns 1994, 20:151-3.

Langdon RC, Cuono CB, Birchall N, Madri JA, Kuklinska E, McGuire J, Moellmann GE. Reconstitution of structure and cell function in human skin grafts derived from cryopreserved allogeneic dermis and autologous cultured keratinocytes. J Invest Dermatol 1988, 91:478-85.

Lavker RM, Sun TT.Epidermal stem cells: properties, markers, and location. Proc Natl Acad Sci USA2000, 97:13473-5.

Latarjet J, Robert A, Pommier C, Comparin JP, Foyatier JL. Douleur de l'enfant brûlé. In : Brûlures. Actualités de la société française d'étude et de traitement des brûlures. Paris : Masson, 1995 : 29-38.

Lavaud J, Haegel A, Chavin G. Enfants victimes d'un incendie d'habitation In : Brûlures. Actualités de la société française d'étude et de traitement des brûlures. Paris: Masson, 1995: 103-6.

Lavoie A, Fugere C, Fradette J, Larouche D, Paquet C, Beauparlant A, Gauvin R, Tetub FA, Roy A, Bouchard M, Genest H, Auger FA, Germain L. Considerations in the choice of a skin donor site for harvesting keratinocytes containing a high proportion of stem cells for culture in vitro. Burns 2011, 37:440-7.

Lecron JC, Paris I, Bernard FX, Morel F. Contribution of IL-22 to experimental skin inflammation In Progress in Inflammation Research. IL-17, IL-22 and their producing cells: role in inflammation and autoimmunity, Quesniaux et al editors, 305-317, 2013.

Lee H. Outcomes of sprayed cultured epithelial autografts for full-thickness wounds: a single-centre experience. Burns 2012, 38:931-6.

Leonardi D, Oberdoerfer D, Fernandes MC, Meurer RT, Pereira-Filho GA, Cruz P, Vargas M, Chem RC, Camassola M, Nardi NB. Mesenchymal stem cells combined with an artificial dermalsubstitute improve repair in full-thickness skin wounds. Burns 2012, 38:1143-50.

Limat A, Noser FK. Serial cultivation of single keratinocytes from the outer root sheath of human scalp hair follicles. J Invest Dermatol 1986, 87: 485.

Linblad BE, Jenkelson CJ. Domestic burns among children. Burns 1990, 16: 254.

Lugo LM, Lei P, Andreadis ST. Vascularization of the Dermal Support Enhances Wound Re-Epithelialization by In Situ Delivery of Epidermal Keratinocytes. Tissue engineering: Part A 2011, 17: 665-75.

Lumenta DB, Kamolz LP, Frey M. Adult burn patients with more than 60% TBSA involved-Meek and other techniques to overcome restricted skin harvest availability-the Viennese Concept. J burn care res 2009, 30:231-42.

Ma B, Cheng DS, Xia ZF, Ben DF, Lu W, Cao ZF, Wang Q, He J, Chai JK, Shen CA, Sun YH, Zhang GA, Hu XH. Randomized, multicenter, double-blind and placebo-controlled trial using topical recombinant human acidic fibroblast growth factor for deep partial-thickness burns and skin graft donor site. Wound Repair Regen 2007, 15:795-9.

Marsol P. Anesthésies générales itératives chez l'enfant brûlé pour bains et pansements quotidiens. In : Brûlures 96. Actualités de la société française d'étude et de traitement des brûlures. Montpellier : Sauramps médical, 1996 : 38-44.

Mcheik JN, Barrault C, Vincent G, Grammatico F, Peci S, Garnier J, Bernard FX, Deguercy A, Levard G. Modèles de cultures cellulaires kératinocytaires de prépuce. Possibilité d'application chez les enfants brûlés. Ann Chir Plast Esthet 2009, 54 : 528-32.

Mcheik JN, Barrault C, Bernard FX, Levard G. Quantitative and qualitative study in keratinocytes from foreskin in children. Perspective application in paediatric surgery. Burns 2010, 36:1277-82.

Mcheik JN, Barrault C, Pedretti N, Garnier J, Juchaux F, Levard G, Morel F, Lecron JC, Bernard FX. Foreskin-isolated kératinocytes provide successful extemporaneous autologous paediatric skin grafts. J Tissue Eng Regen Med 2013 Mars 14.

Mercier C, Blond MH, Demont F. Résultats d'une enquête nationale sur l'épidémiologie de la brûlure de l'enfant. In : Brûlures. Actualités de la société française d'étude et de traitement des brûlures. Paris: Masson, 1995: 1-13.

Mills AA, Zheng B, Wang XJ, Vogel H, Roop DR, Bradley A. p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis. Nature 1999, 398:708-13.

Nestle FO, Di Meglio P, Qin JZ, Nickoloff BJ. Skin immune sentinels in health and disease. Nat Rev Immunol 2009, 9: 679-91.

O'Connor N, Mulliken J, Banks-Schlegel, Kehinde S, Green H. Grafting of burns with cultured epithelium prepared from autologous epidermal cells. Lancet 1981, 1:75-8.

Ono I, Gunji H, Zhang JZ, Maruyama K, Kaneko F. Studies on cytokines related to wound healing in donor site wound fluid. J Dermatol Sci. 1995, 10:241-5.

Paddle-Ledinek JE, Cruickshank DG, Masterton JP. Skin replacement by cultured keratinocyte grafts: an Australian experience. Burns 1997, 23:204-11.

Papini S, Cecchetti D, Campani D, Fitzgerald W, Grivel JC, Chen S, Margolis L, Revoltella RP. Isolation and clonal analysis of human epidermal keratinocyte stem cells in long-term culture. Stem Cells 2003, 21:481-94.

Potten CS, Booth C. Keratinocyte stem cells: a commentary. J Invest Dermatol 2002 119: 888-99.

Poumay Y, Pittelkow MR. Cell density and culture factors regulate keratinocyte commitment to differentiation and expression of suprabasal K1/K10 keratins. J Invest Dermatol 1995, 104:271–6.

Radtke C, Rennekampff HO, Reimers K, Vogt PM, Kocsis JD. Paracrine loop of keratinocyte proliferation and directed neuritic outgrowth in a neuroepithelial coculture. Ann Plast Surg 2013, 70:162-7.

Ramirez RJ, Wolf SE, Herndon DN. Is there a role for growth hormone in the clinical management of burn injuries? Growth Horm IGF Res1998, 8:99-105.

Randolph GJ, Ochando J, Partida-Sanchez S. migration of dendritic cell subsets and their precursors. Ann Rev Immunol 2008, 26: 293-316.

Raya A, Rodriguez-Piza I, Guenechea G, Vassena R, Navarro S, Barrero MJ, Consiglio A, Castella M, Rio P, Sleep E, Gonzalez F, Tiscornia G, Garreta E, Aasen T, Veiga A, Verma IM, Surralles J, Bueren J, Izpisua Belmonte JC. Disease-corrected haematopoietic progenitors from Fanconi anaemia induced pluripotent stem cells. Nature 2009, 460:53-9.

Rheinwald JG, Green H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. Cell 1975, 6: 331-43.

Sharar SR, Bratton SL, Carrougher GJ, Edwards WT, Summer G, Levy FH, Cortiella J. Comparison of oral transmucosal fentanyl citrate and oral hydromorphone for inpatient pediatric burn wound care analgesia. J Burn Care Rehabil 1998, 19: 516-21.

Schlabe J, Johnen C, Schwartlander R, Moser V, Hartmann B, Gerlach JC, Kuntscher MV. Isolation and culture of different epidermal and dermal cell types from human scalp suitable for the development of a therapeutical cell spray. Burns 2008, 34: 376-84.

Schneider TE, Barland C, Alex AM Mancianti ML, Lu Y, Cleaver JE, Lawrence HJ, Ghadially R. Measuring stem cell frequency in epidermis: A quantitative in vivo functional assay for long-term repopulating cells. Proc Natl Acad Sci USA 2003, 100: 11412-7.

Schluter H, Paquet-Fifield S, Gangatirkar P, Li J, Kaur P. functional characterization of quiescent keratinocyte stem cells and their progeny reveals a hierarchical organization in human skin epidermis. Stem cells 2011, 29:1256-68.

Shukla VK, Tiwary SK, Barnwal S, Gulati AK, Pandey SS. Effect of autologous epidermal cell suspension transplantation in chronic nonhealing wounds: a pilot study. Can J Surg 2010, 53:6-10.

Sonnenberg GF, Lynette A Fouser LA, Artis D**.** Border patrol: regulation of immunity, inflammation and tissue homeostasis at barrier surfaces by IL-22. Nature immunology 2011, 10:383-90.

Sood R, Roggy D, Zieger M, Balledux J, Chaudhari S, Koumanis DJ, Mir HS, Cohen A, Knipe C, Gabehart K, Coleman JJ. Cultured epithelial autografts for coverage of large burn wounds in eighty-eight patients: the Indiana University experience. J burn care res 2010, 31:559-68.

Stenn KS, Link R, Moellmann G, Madri J, Kuklinska E. Dispase, a neutral protease from Bacillus polymyxa, is a powerful fibronectinase and type IV collagenase. J Invest Dermatol 1989, 93:287-90.

Still JM, Orlet HK, Law EJ. Use of cultured epidermal autografts in the treatment of large burns. Burns, 1994, 20:539-41.

Szabowski A, Maas-Szabowski N, Andrecht S, Kolbus A, Schorpp-Kistner M, Fusenig NE, Angel P. c-Jun and JunB antagonistically control cytokine-regulated mesenchymal-epidermal interaction in skin. Cell 2000, 22:745-55.

Tanner JC, Vabdeput JF, Olley JF. The mesh skin graft. Plast Reconstr Surg 1964, 34:287-92.

Taylor G, Lehrer MS, Jensen PJ, Sun TT, Lavker RM. Involvement of follicular stem cells in forming not only the follicle but also the epidermis. Cell 2000, 102:451-61.

Uitto J. Regenerative Medicine for Skin Diseases: iPS Cells to the Rescue. J Invest Dermatol 2011 131, 812–14.

Villone D, Fritsch A, Koch M, Bruckner-Tuderman L, Hansen U, and Bruckner P. Supramolecular interactions in the dermo-epidermal junction zone: anchoring fibril-collagen VII tightly binds to banded collagen fibrils. J Biol Chem 2008, 283: 24506-13.

Waikel RL, Kawachi Y, Waikel PA, Wang XJ, Roop DR. Deregulated expression of c-myc depletes epidermal stem cells. Nat Genet 2001, 28:165-8.

Watt FM, Hertle MD. Keratinocyte integrins. In the keratinocyte handbook (ed. I.M. Leigh, E.B. Lane & F.M. Watt), pp.153-164. Cambridge university press. 1994.

Wood FM, Kolybaba ML, Allen P. The use of cultured epithelial autograft in the treatment of major burn injuries: a critical review of the literature. Burns 2006, 32: 395-401.

Wood F, Martin L, Lewis D, Rawlins J, McWilliams T, Burrows S, Rea S. A prospective randomised clinical pilot study to compare the effectiveness of Biobrane® synthetic wound dressing, with or without autologous cell suspension, to the local standard treatment regimen in paediatric scald injuries. Burns 2012, 38:830-9.

Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse fibroblasts by four transcription factors. Cell Prolif 2008, 1:51-6.

Yang A, Schweitzer R, Sun D, Kaghad M, Walker N, Bronson RT Tabin C, Sharpe A, Caput D, Crum C, McKeon F. p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. Nature 1999, 398:714-8.

Yazdi AS, Guarda G, Riteau N, Drexler SK, Tardivel A, Couillin I, Tschopp J. Nanoparticles activate the NLR pyrin domain containing 3 (Nlrp3) inflammasome and cause pulmonary inflammation through release of IL-1α and IL-1β. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010, 107: 19449-54.

Zhang ML, Chang ZD, Han X, Zhu M. Microskin grafting. I. Animal experiments. Burns Incl Therm Inj 1986, 12:540-3.

Zweifel CJ, Contaldo C, Kohler C, Jandali A, Kunzi W, Giovanoli P. Initial experiences using non-cultured autologous keratinocyte suspension for burn wound closure. J Plast Reconst Aesthet Surg 2008, 61:1-4.

Résumé

In vivo, l'épiderme se régénère en continu à travers la prolifération des cellules souches basales. Celles-ci, obtenues à partir d'une biopsie cutanée, peuvent être greffées pour régénérer la peau. En vue de la transplantation kératinocytaire, nous avons étudié *in vitro* leur capacité à régénérer un épithélium en fonction de leur origine anatomique, et précisé leur phénotype. Par rapport aux différents sites étudiés, nous montrons que les kératinocytes issus de prépuce ont la plus grande capacité prolifératives et régénérative, associée à une expression exacerbée de marqueurs d'immaturité, la p63 et la kératine 19 et une faible expression des marqueurs de la différenciation (involucrine et filaggrine). Ces résultats nous ont amené à utiliser ces kératinocytes préputiaux en suspension pour transplanter les enfants brûlés, ce qui évite l'utilisation d'une membrane de transfert, source potentielle d'inefficacité. La transplantation des brulures avec ces cellules autologues conduit à une épithélialisation accélérée avec une cicatrice de grande qualité. Ces résultats et la facilité de la procédure nous permettent de proposer la greffe autologue kératinocytaire de prépuce comme une procédure standard, qui peut être ajoutée à l'arsenal thérapeutique des équipes prenant en charge les enfants brûlés.

Mots clés : brûlures, enfants, kératinocytes préputiaux, transplantation autologue.

In vivo, the skin regenerates continuously through the proliferation of basal stem cells. That can be obtained from a skin biopsy and may be grafted to regenerate skin. *In vitro*, we studied the regenerative keratinocyte capacities according to site donors, and we noted that keratinocytes from foreskin have the greatest proliferative and regenerative capacities, combined with expression of progenitor cell markers (p63 and keratin 19) and low expression of epidermal differentiation markers (involucrin and filaggrin). These results led us to use these preputial keratinocytes in suspension for graft in burned children. Apply directly cells with a suspension device, eliminates the use of a transfer membrane and a potential source of inefficiency. In our study, boys grafted with autologous keratinocytes isolated from foreskin leads to epithelialization with a high quality of scar. This technique is easily applicable to a large number of pediatric surgery teams. Our clinical success and the safety of the procedure in the operating room enable us to propose the kératinocyataire autologous transplantation as a standard procedure, which can be added to the therapeutic armamentarium in burns.

Keywords: burns, children, preputial keratinocytes, autologous transplantation.