

Gabriel SABEH¹, Michel SABÉ¹, Salah ISHAK¹, Rodrigue SWEID², Mohamad AYOUBI³, Abdel Majid CHAHAL⁴

Sabeh G, Sabé M, Ishak S, Sweid R, Ayoubi M, Chahal AM. Greffes séquentielles de cellules cutanées : Premiers résultats d'un nouveau procédé et revue de la littérature. J Med Liban 2015 ; 63 (2) : 47-58.

Sabeh G, Sabé M, Ishak S, Sweid R, Ayoubi M, Chahal AM. Sequential grafts of cutaneous cells: First results of a new procedure and review of the literature. J Med Liban 2015 ; 63 (2) : 47-58.

RÉSUMÉ • Objectifs : Apporter aux grands brûlés d'autres choix pratiques que les greffes tissulaires et les substituts cutanés, et aux porteurs de plaies chroniques des greffes cutanées non invasives et répétitives jusqu'à la guérison. **Patients et méthode :** 39 patients dont 33 brûlés et 6 porteurs de plaies chroniques ont été traités entre février et septembre 2012. Un à 4 cm² de greffe mince de peau saine autologue ont été transformés par biodégradation des liaisons peptidiques dans le but d'avoir un soluté riche en moyenne de 1,5 million de cellules cutanées/cm². Cent minutes ont suffi. Une partie de ce soluté a été pulvérisée immédiatement sur les zones à traiter et le reste a été conservé par petites quantités dans des cryotubes à l'intérieur d'un conteneur d'azote liquide. D'autres pulvérisations successives ont été effectuées lors de chaque pansement. **Résultats :** Pour les II^e degrés profonds, bons dans l'ensemble aussi bien sur le plan esthétique que fonctionnel, ayant permis des guérisons dans les 10 à 12 jours. Quant aux brûlures de III^e degré et les plaies chroniques, les résultats ont été encourageants pour les petites superficies. **Discussion :** Technique originale répétitive, sans culture *in vitro* préalable, ayant apporté des cellules autologues – épidermiques, jonctionnelles et souches – nécessaires à la reconstruction cutanée. Ses contre-indications sont les plaies infectées, suintantes, hémorragiques et granulomateuses. **Conclusion :** C'est une technique qui mérite d'être pratiquée et qui devrait avoir sa place dans l'arsenal thérapeutique des brûlures et des plaies chroniques.

Mots-clés : greffes séquentielles, cellules, brûlés, plaies

ABSTRACT • Objective : A new choice for major burn wounds is presented. An alternative method for skin grafting and cutaneous substitute for burn victims and chronic non healing wounds. The new method of skin grafting is applied repetitively and non-invasively until healing is achieved. **Patients and procedure :** 39 patients including 33 burns victims and six with chronic wounds were treated between February and September 2012. One to four square centimeters of autologous skin graft were transformed with biodegradation of cellular peptic bonds with the goal of obtaining a rich solution of cutaneous cells (1.5 million skin cells/cm²). The process duration averaged 100 minutes. Part of the solution was sprayed immediately on the recipient skin zones. The remaining solution was divided up and kept in cryotubes inside a container of liquid nitrogen. Successive sprays were performed at each dressing. **Results :** Good esthetic results on the whole as well as functional for patients with deep 2nd degree burns; healing was achieved in 10-12 days. Third degree burns and chronic wounds showed encouraging results for small surfaces. **Discussion :** We present a new original technique without prior *in vitro* culture that gives autologous cellular grafts, including epidermal, junctional and stem cells that are necessary for skin regeneration. The contraindications to the technique are infected, oozing, hemorrhagic or granulomatous wounds. **Conclusion :** This is a technique that deserves to be practiced and should have its place in the therapeutic arsenal of burns and chronic wounds.

Keywords : sequential grafts, cells, burns, wounds

INTRODUCTION

Chez le grand brûlé, les greffes cutanées ont toujours été nécessaires. Or la peau saine manquait et le prix élevé des substituts cutanés les rendait inaccessibles à beaucoup de victimes dans beaucoup de pays, sans compter l'attente nécessaire à leur production. Nos recherches nous ont menés vers une technique de greffes cellulaires autologues que nous avons appelé 'greffes séquentielles de cellules cutanées' (GSCC).

Reverdin fut le premier en 1869 à décrire la greffe

Hôpital de la Paix, Tripoli, Liban, Services de Brûlologie¹, Laboratoire², Anesthésie et Réanimation³, Cytologie et Histopathologie⁴.

Correspondance : Docteur Gabriel Sabeh. Hôpital de la Paix. B.P. 1433. Tripoli. Liban.

e-mail: drgabrielsabe@hotmail.fr

'épidermique'. Depuis, beaucoup d'auteurs y ont contribué et ont décrit les différentes sortes de greffes que nous connaissons [1]. La culture cellulaire avait apparu à proprement parler depuis l'introduction de la trypsinisation par Moscona en 1952 [2]. Ce procédé permettait de détacher les tissus afin d'obtenir des cellules isolées ou des amas de cellules [3-4].

En 1975, Rheinwald et Green [5] ont démarré les cultures d'épiderme autologue (CEA) qui demandaient 21 jours au laboratoire, ouvrant ainsi la voie aux substituts cutanés [6].

Des progrès restaient à faire.

La GSCC apporterait-elle une contribution chez les grands brûlés ?

Quant aux plaies chroniques et récalcitrantes, la GSCC allait-elle permettre par sa répétition de vaincre le processus morbide qui empêchait la cicatrisation ?

PATIENTS

Entre février 2012 et septembre 2012 inclus, après consentement préalable du patient ou de son tuteur, nous avons pratiqué la GSCC chez 6 porteurs de plaies chroniques, tous des adultes (Tableau I), et 33 brûlés (Tableau II) dont 13 de sexe masculin (sexe-ratio 0,65) : 14 nourrissons (42,5%), 6 enfants (18%), 13 adultes (39,5%), tous porteurs de brûlures du II^e degré profond et 25 d'entre eux porteurs également de brûlures du III^e degré.

MÉTHODE (Figure 1)

1. Choix du moment

La première GSCC a été effectuée : **a)** vers le 3^e-4^e jour du début de la brûlure sur les II^e degrés profonds pour court-circuiter l'infection ; **b)** pour les brûlures du III^e degré et les plaies chroniques, il fallait attendre un sous-sol propre et vascularisé. Le prélèvement a été fait sous anesthésie locale, une minigreffe ayant été prise tangentiellement au bistouri froid.

2. La taille

De 1 à 4 cm² selon la superficie des aires à greffer. Il est à signaler qu'avec 1 cm² on pouvait préparer entre 5 et 20 ml de soluté cellulaire pouvant être pulvérisé sur 5000 cm² mais il fallait tenir compte des pulvérisations séquentielles et du fait que l'efficacité du soluté était proportionnelle à sa concentration.

3. L'épaisseur

Était celle d'une greffe mince de 0,2 à 0,4 mm, essentiellement épidermique et jonctionnelle et comportant

toutes les cellules épidermiques (CE) bien que cela soit un amalgame : kératinocytes, mélanocytes, cellules de Langerhans, cellules de Merkel et autres, surtout les cellules souches péri-pilaires et de la couche jonctionnelle [7] permettant de reconstruire un épiderme de qualité se rapprochant de l'épiderme normal. Le soluté cellulaire préparé comportait en moyenne 1,5 million de cellules avec des fonctions différentes pour chaque cm² de greffe.

4. Choix de la zone

La zone donneuse chez le grand brûlé ne pouvait pas toujours être similaire à la zone receveuse. Les cellules souches étant nombreuses au niveau de la membrane basale et au niveau des muscles érecteurs des poils, ces cellules se déversant à côté des poils [7], mieux vaut donc, si possible, choisir une zone riche en poils (aisselle, scalp). Une fois obtenue, la greffe devait être mise dans une boîte stérile, étiquetée et envoyée au laboratoire pour effectuer la transformation tissulaire.

5. La trypsinisation et le soluté qui en résulte

Elle permettait de détacher les cellules cutanées de leur support par hydrolyse des liaisons peptidiques grâce à la trypsine qui est le réactif principal; méthode décrite et facile pour un technicien de laboratoire entraîné, le temps de sa réalisation étant de l'ordre de cent minutes. L'essentiel des produits nécessaires est : l'EDTA, trypsine, carbonate d'ammonium, sérum de veau fœtal et sérum physiologique; quant au matériel il est simple aussi: une hotte à flux laminaire, un incubateur, un agitateur magnétique et un conteneur d'azote liquide pour le stockage.

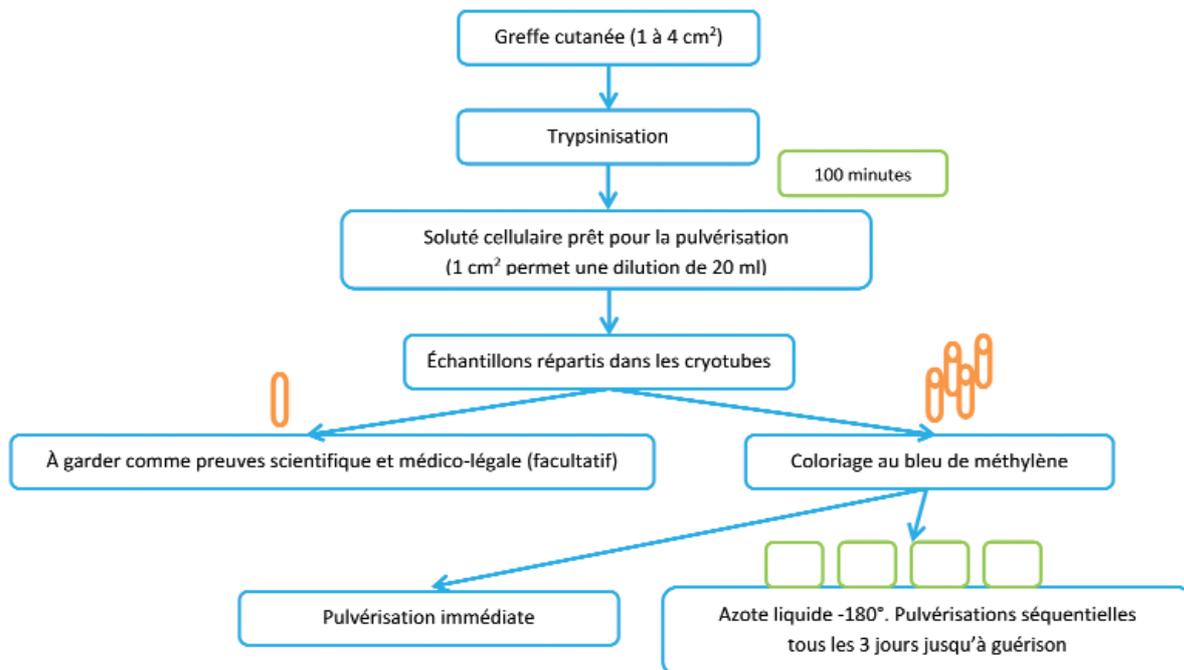


FIGURE 1. Procédé des greffes séquentielles de cellules cutanées.

Le liquide récolté était réparti comme suit : **a)** un échantillon pris pour étude cytologique, geste facultatif permettant d'avoir un document scientifique et médico-légal (Fig. 2) ; **b)** le reste teinté par une coloration vitale, le bleu de méthylène : en plus de sa propriété antiseptique sa couleur nous permettra au moment de la pulvérisation d'être sûrs de couvrir toute la zone à traiter. Le soluté est ensuite réparti en petites quantités de 2 à 3 ml dans des cryotubes étiquetés puis placés dans un conteneur d'azote liquide à -180°C, ce qui permettait de maintenir les cellules longtemps intactes et prêtes pour l'emploi.

6. La pulvérisation cellulaire et les pansements

Les cellules cutanées se grefferont sur leur milieu naturel qui leur assurera nutrition et protection, moyennant les précautions suivantes : **a)** Les *conditions inhérentes au lieu* : il doit être doté d'une asepsie draconienne. L'idéal est d'être dans un service de brûlologie, dans une grande chambre aseptique (à flux laminaire et « rideaux d'air ») équipée à la fois comme bloc opératoire, soins intensifs, salle de dialyse et bains stériles avec tout le matériel nécessaire pour ces fonctions. L'entrée et la sortie du personnel se faisant via des sas. **b)** Les *pansements avant la pulvérisation des zones brûlées* avec les soins classiques : débridement, aponévrotomie, dissection fine, parage, escarrectomie, lavage effectué à la chlorhexidine ou à l'eau oxygénée de 2 à 3%, etc. La photographie à chaque pansement permettra d'archiver sur ordinateur avec lecteur en 3D, de suivre l'évolution chez les brûlés et de réévaluer leurs degrés. **c)** La *pulvérisation* : Par le biais d'un tube stérile à pulvérisation ou d'une seringue montée sur une tête stérile à pulvérisation, elle sera effectuée à la fin du pansement sur une zone nettoyée, au sous-sol vascularisé. **d)** Pour éviter le dessèchement et la dessiccation nuisible de surface, la couverture sera assurée par des pansements en filet de tulle gras à l'antibiotique. Cela permettra de maintenir en place et de protéger les cellules greffées. Le tout sera couvert par un jersey tubulaire stérile.

Cette couverture est intéressante : légère, elle se maintiendra grâce à son élasticité, elle empruntera

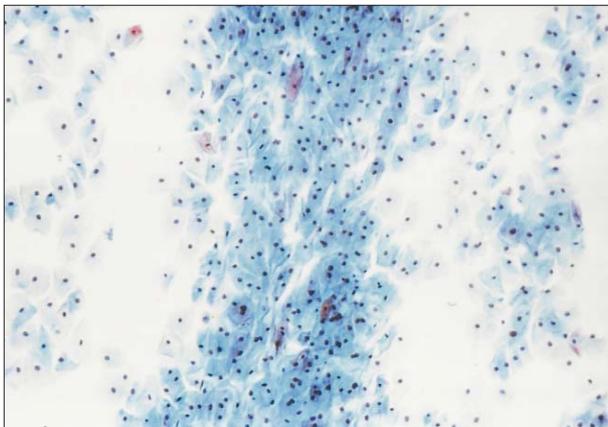


FIGURE 2. Cytologie GSCC. Prise d'une greffe mince. On voit surtout les kératinocytes à différentes étapes de leur évolution.



FIGURE 3. Brûlures II° degré profond et III° degré. **a.** (J3) après sa brûlure. **b.** (J6) après sa brûlure, soit (J3) après 1^{re} GSCC. Tapis blanchâtre épidermique. **c.** (J12) après sa brûlure, soit (J9) après 3 GSCC. Persistence d'îlots de III^e degré en cours de guérison.

selon son diamètre toutes les régions du corps et n'empêchera pas la sortie du suintement. Ces jerseys pourront être liés entre eux quand il s'agira de deux régions différentes, se comportant alors comme un vêtement moulant préfabriqué du corps entier. Le délai entre deux pansements pour les zones pulvérisées sera d'un minimum de 2 jours pour ne pas menacer la greffe cellulaire et d'un maximum de 3 jours pour limiter le risque infectieux. L'utilisation d'humidificateur au-dessus des zones greffées serait souhaitable. Toute précaution devrait être prise au moment du décollement du pansement en mouillant largement de sérum physiologique stérile pour ne pas décoller ces fines nouvelles lamelles d'épiderme.

RÉSULTATS (Figures 3 à 9)

Le nouvel épiderme apparaîtra dès le premier pansement au 3^e jour de la GSCC ; il sera uniforme, fin et fragile comme du papier à cigarettes de couleur blanc pâle par rapport à la peau saine donnant l'aspect d'un tapis blanchâtre (Fig. 3b), coloration qui tranchera avec

les zones avoisinantes. D'autres zones cutanées s'avèreront encore non épidermisées, deux à trois greffes cellulaires suffiraient à guérir les brûlures du II^e degré profond; la desquamation se fera vers le 10^e jour laissant place à l'épiderme définitif.

Une étude prospective transversale – recul compris entre 28 et 36 mois – a été effectuée chez ces 39 patients avec des résultats intéressants :

– Pour les **II^e degrés profonds** (Fig. 3 à 6) guérison entre le 9^e et 12^e jour de 23 brûlures parmi les 33 (70%) ; 8 brûlures (25%) ont nécessité une quatrième séquence de GSCC avec des pansements dirigés jusqu'à leur guérison entre le 15^e et 17^e jour.

– Pour les **brûlures du III^e degré** (Fig. 5 à 7) les bons résultats ont été inversement proportionnels à l'étendue des brûlures : **a)** Quand la zone brûlée était d'un diamètre inférieur à une quinzaine de cm, la GSCC a permis une guérison de 13/25 brûlures (52%) entre 18 et 23 jours, et 5/25 (20%) (Fig. 8) ont nécessité entre 5 et 7 séquences de GSCC et des pansements dirigés pour leur guérison entre 27 et 33 jours.



FIGURE 4. Brûlures II^e degré profond.

a. (J0) b. (J3) après sa brûlure. c. (J6) soit (J3) après 1 GSCC. d. (J9) soit (J6) après 2 GSCC.



FIGURE 5

a. b. c. Brûlures II^e degré profond et III^e degré.
d. e. Guérison au 25^e jour après 5 GSCC.



FIGURE 6

a. Arrivé au (J6) de ses brûlures du II^e degré profond et III^e degré.
b. (J15) Guérison après 5 GSCC, soit (J21) depuis la brûlure.

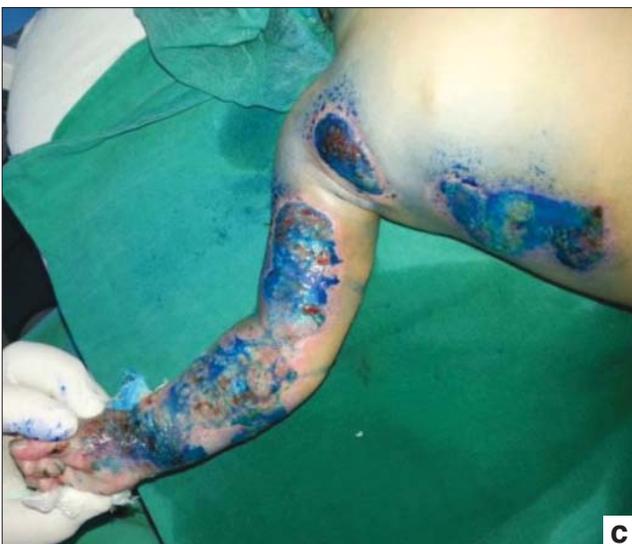


FIGURE 7. a. b. Brûlures III^e degré (J3). **c.** Guérison en cours. **d.** (J15) après 4 GSCC.

b) Chez 7 des 25 brûlés (28%) de III^e degré le diamètre de la zone brûlée était supérieure à une quinzaine de centimètres ; 5 parmi eux (20%) ont nécessité une greffe cutanée en filet associée à la GSCC ce qui a permis leur guérison entre 48 et 55 jours. Nous avons déploré 2 décès (8% ; cf. Tableau II, # 24 et 30) : le 27^e jour pour la victime 24 par choc septique, et le 10^e jour pour la victime 30 par défaillance multiviscérale. Les 31 brûlés restants sont tous sortis entre le 8^e et le 49^e jour de leur hospitalisation et ont été suivis en salle de pansements tous les 3 jours jusqu'à leur stabilisation vers la cinquième semaine. Ils ont ensuite été suivis en consultation tous les mois durant 6 mois et tous les 3 mois durant deux ans.

– Pour les **plaies chroniques** (Fig. 9) guérison en 7 à 21 jours moyennant le traitement du terrain. L'appréciation selon l'échelle de Vancouver (VSS/Vancouver Scar



Scale [8]) : la courbe est ascendante par rapport à la profondeur de la brûlure et le temps de la guérison (Fig. 10). Une amélioration en moyenne de 2 points sur cette échelle a été observée à partir du 6^e mois après les soins de kinésithérapie et la contention élastique. Pour les II^e degrés profonds, la sensibilité, explorée au doigt, à l'épingle et aux tubes de verre chauds et froids, confirme que les sensibilités tactile, thermique et douloureuse seront restaurées dans les deux semaines après l'épidermisation.

– Pour les **III^e degrés et les plaies chroniques** : Au début, seule la sensibilité profonde est présente, puis entre la 2^e et la 4^e semaine après la 1^{re} GSCC, les victimes traverseront une phase d'hyperesthésie au moindre contact ; ensuite dans les semaines qui suivront l'épidermisation, et selon l'importance et la nature de la brûlure, les victimes vont s'acheminer vers une bonne sensibilité superficielle sur une échelle d'appréciation (excellente - bonne - moyenne - acceptable - mauvaise).

En ce qui concerne le **fonctionnement et les zones fonctionnelles** : Résultat moyen pour les brûlures du II^e degré profond. Pour le III^e degré et les plaies chroniques le résultat est acceptable. Mais ces résultats pourraient être améliorés par la poursuite des soins de rééducation et le port de vêtements compressifs.



FIGURE 8 a. Brûlures du III^e degré (J3). b. Guérison en cours au (J12) après 4 GSCC, soit (J23) après sa brûlure. *Îlots d'épiderme* (↗) en bonne voie.

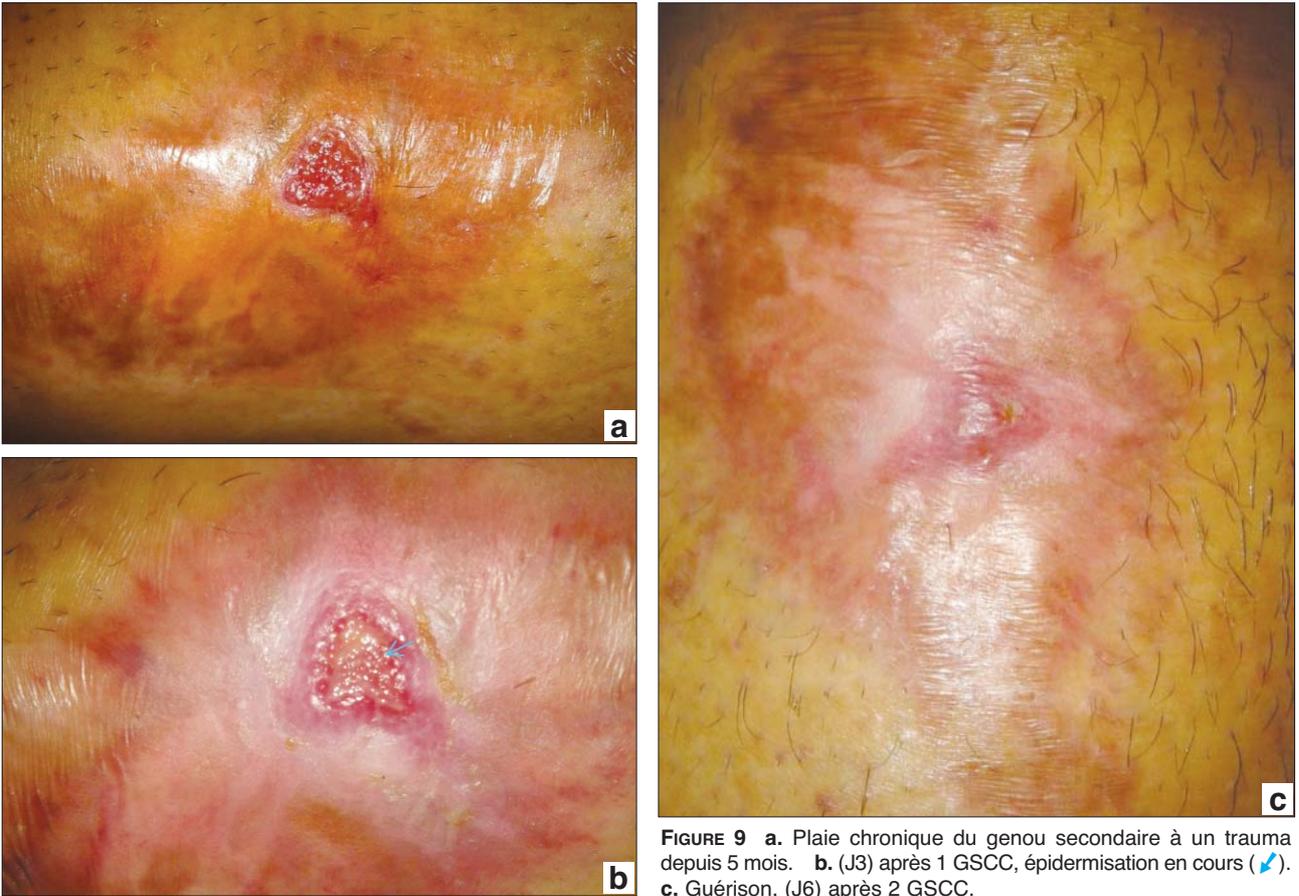


FIGURE 9 a. Plaie chronique du genou secondaire à un trauma depuis 5 mois. b. (J3) après 1 GSCC, épidermisation en cours (↔). c. Guérison, (J6) après 2 GSCC.

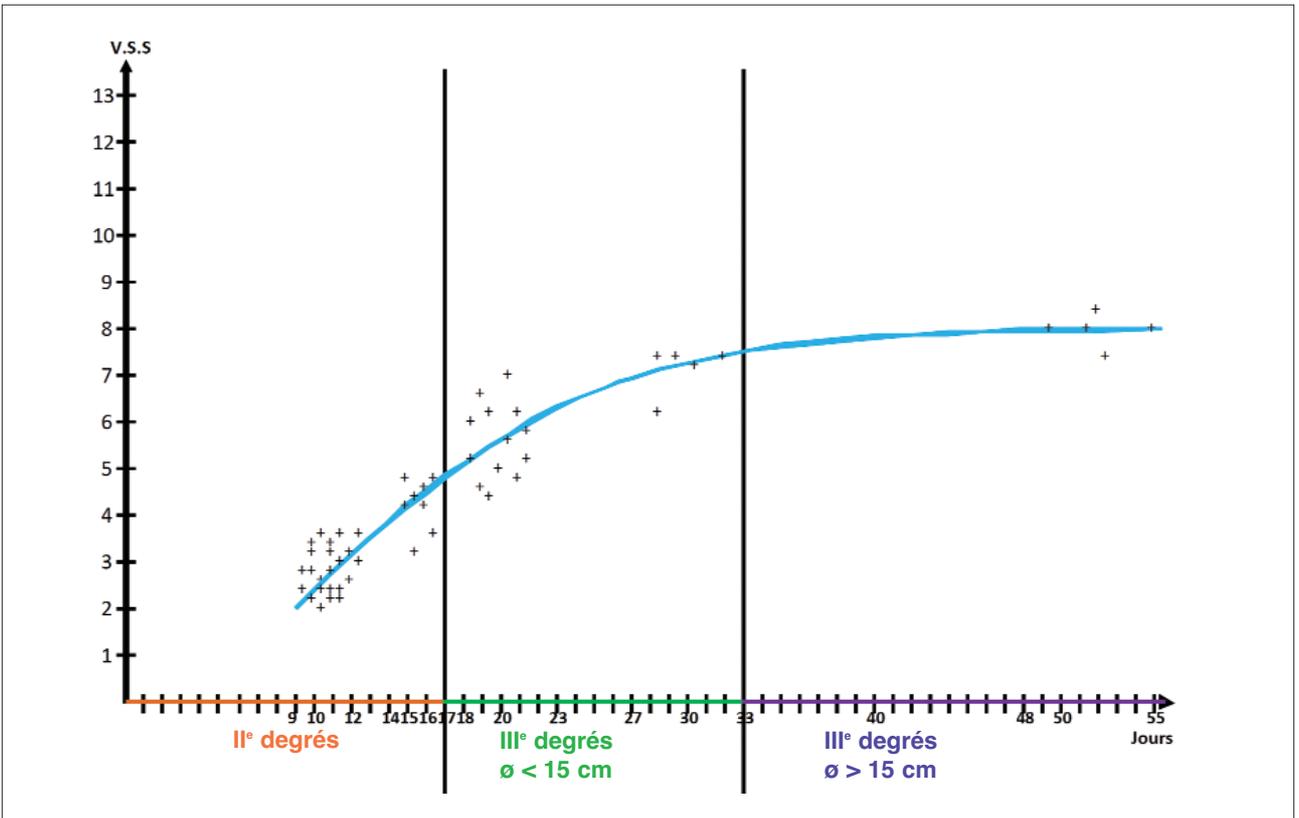


FIGURE 10. Corrélation entre l'échelle de Vancouver (V.S.S.) et les brûlures traitées par GSCC.

DISCUSSION

Le traitement des grands brûlés reste un défi important pour les soignants qui continuent à chercher de nouvelles technologies [9].

Les substituts cutanés temporaires sont toujours utilisés chez le grand brûlé pour diminuer les déperditions liquidiennes et les infections et pour préparer le terrain pour une greffe définitive [10]. La greffe de peau pratiquée précocement a permis une amélioration certaine [11] or la peau saine manque et la greffe mince, sans une partie plus ou moins profonde du derme, favorise la rétraction et l'instabilité de la peau. Les CEA [5] permettaient à partir d'un petit morceau de peau saine la culture d'un épiderme fin et des modifications avaient permis de les obtenir en 15 jours [12]. Le bénéfice est certain en matière de survie et d'économie 'relative' [13], mais durant l'attente de production du CEA la victime reste à la merci d'un sepsis [14] ; le coût 'absolu' reste élevé en plus des échecs de prise et des problèmes esthétiques et cicatriciels ainsi qu'une faible résistance à l'infection. La technique Sandwich [15], avec l'application de CEA entre les larges mailles d'une greffe en filet, avait permis d'obtenir de meilleures prises de greffe et une stabilité à long terme [16]. Les cultures bicouches de cellules cutanées kératinocytes/fibroblastes [17] avaient permis d'obtenir des greffes épaisses et robustes dont la prise était supérieure avec une diminution de la rétraction et d'aspect inesthétique mais c'était une méthode onéreuse et qui demandait cinq semaines de préparation.

Le derme étant capital pour l'aspect cosmétique et la stabilité de la peau, les substituts dermiques permanents ont été introduits, plusieurs produits existent sur le marché et sont souvent d'origine animale ; ces substituts nécessitent une couverture épidermique au-dessus qui peut être effectuée en deux temps [18] ou un temps [19]. La CEA ne prend pas au-dessus, par contre les cultures en bicouches seraient une bonne indication mais ces substituts présentent un risque infectieux et un coût élevé ce qui limite leur indication aux brûlures de la face et des zones fonctionnelles ainsi que pour le traitement des cicatrices hypertrophiques et chéloïdes [17].

Les travaux sur les cellules souches embryonnaires [20] puis ceux de Yamanaka *et al.* [21] qui ont découvert que les cellules adultes peuvent être rajeunies jusqu'au stade embryonnaire avec la possibilité de produire toutes les catégories cellulaires spécialisées, les premiers travaux expérimentaux précliniques s'annonçant très prometteurs [22-24], donnent l'espoir dans un futur proche d'une thérapie génétique cellulaire qui se propose de remplacer les greffes de tissus et d'organes. Des méthodes pratiques et cliniques existent aussi, Wood [25] prenait l'équivalent d'un timbre-poste d'épiderme autologue, le cultivait au laboratoire durant cinq jours puis le transformait en spray sur la peau brûlée. Gerlach [26] isolait les kératinocytes qu'il cultivait, puis sous contrôle d'un ordinateur, les pulvérisait sur les surfaces à traiter,

et installait un système d'irrigation pour améliorer les prises de greffes.

La GSCC est une méthode pratique et clinique et diffère des autres techniques par : **a)** son soluté d'amalgame cellulaire, sans culture *in vitro* préalable ; **b)** son côté séquentiel, permettant d'agir à la demande jusqu'à la guérison. Toutes les cellules constitutionnelles épidermiques, jonctionnelles et souches vont se greffer sur leur milieu naturel autologue reproduisant les tissus d'origine. À la vue de nos résultats esthétiques et fonctionnels et une comparaison avec les normes connues et les autres méthodes nous pouvons avancer quelques critères :

Avantages de la méthode : **a)** *Absence de problèmes d'éthique* – médicale ou légale – à sa pratique, étant une simple greffe cellulaire pratiquée à la place des greffes tissulaires. **b)** *Son gain de temps* : La GSCC est immédiatement prête et fait que les brûlures du II^e degré profond guérissent en un temps raccourci ; pour les brûlures du III^e degré, à petites superficies, elle leur offrira, dès que le sous-sol devient acceptable, une guérison rapide permettant de stopper le cercle vicieux infection, dénutrition et défaillance multiviscérale. Elle est intéressante pour les plaies chroniques moyennant les précautions de faire bourgeonner la plaie et d'agir ensuite sur le terrain : diabétique, variqueux, artéritique, infecté, etc. **c)** *Sa répétition successive sans aucune quelconque invasion*. **d)** *Son absence de risques* car elle utilise des cellules autologues du même individu et se sert des processus physiologiques de la victime ; les produits permettant la trypsinisation sont fort réduits et ne présentent quasiment pas de risques de transmission d'une pathologie animale comme dans les cultures *in vitro* ou le risque de xénotransplantation n'est pas absent. **e)** *Sa disponibilité* : Alors que la greffe en filet permettait une expansion six fois plus importante, la greffe cellulaire si elle est effectuée en trois séquences pourrait couvrir une superficie 1000 fois plus importante. **f)** *La réduction de l'infection* : Hormis deux décès, aucune infection majeure n'a été vue chez nos soignés ; en effet, après la GSCC, les cellules autologues une fois greffées se mettent à exercer leurs fonctions et à lutter contre l'infection. **g)** *Son gain pécuniaire* : En raccourcissant le séjour en milieu hospitalier, le faible coût de préparation des GSCC fait que le rapport efficacité-coût est de loin supérieur à toute autre méthode.

Limites de la méthode et propositions de solutions : Pour les brûlures du III^e degré, quand le diamètre de la zone à traiter est supérieur à une quinzaine de cm², les cellules greffées auront du mal à résister là où elles se trouveraient, l'évolution naturelle de ces brûlures favorisant les granulomes à partir des fibrocytes ou *fibroblasts like* d'origine hématopoïétique qui se multiplieront beaucoup plus rapidement que les CE empêchant la croissance de ces dernières, et bloquant l'avancée de l'épiderme (Fig. 11), tout se passerait comme si les CE avaient besoin de renfort par les fibroblastes venant des tissus sains de voisinage qui leur serviraient de support en restaurant le derme permettant au CE de résister et de

prospérer au-dessus ; dans ce cas il existe un **blocage de l'interaction kératinocytes/fibroblastes** ; en effet, les kératinocytes sont les premiers à promouvoir la réponse inflammatoire avec production de cytokines qui agissent sur les fibroblastes produisant des cytokines pro-inflammatoires et de facteurs de croissance qui, à leur tour, stimulent la prolifération des kératinocytes [27]. Pour les grandes surfaces de brûlures et de plaies chroniques, la GSCC telle qu'elle est pratiquée ne peut supplanter les indications de substituts cutanés et de greffes traditionnelles, mais nous avons démarré un nouveau processus :

un 1^{er} temps de GSCC à partir d'une préparation de cellules dermiques jusqu'à une restauration satisfaisante du derme et qui sera suivie dans un 2^e temps par la GSCC à partir de CE ; une publication relatara prochainement nos résultats. L'association des greffes en filet avec la greffe cellulaire accélérerait et améliorerait de la sorte les résultats par rapport à la greffe en filet seule ; d'où une **activation de l'interaction kératinocytes des GSCC avec les fibroblastes** sains des greffes en filet [28] ce qui va permettre une cicatrisation rapide des mailles diminuant aussi de la sorte le risque de rétraction secondaire.

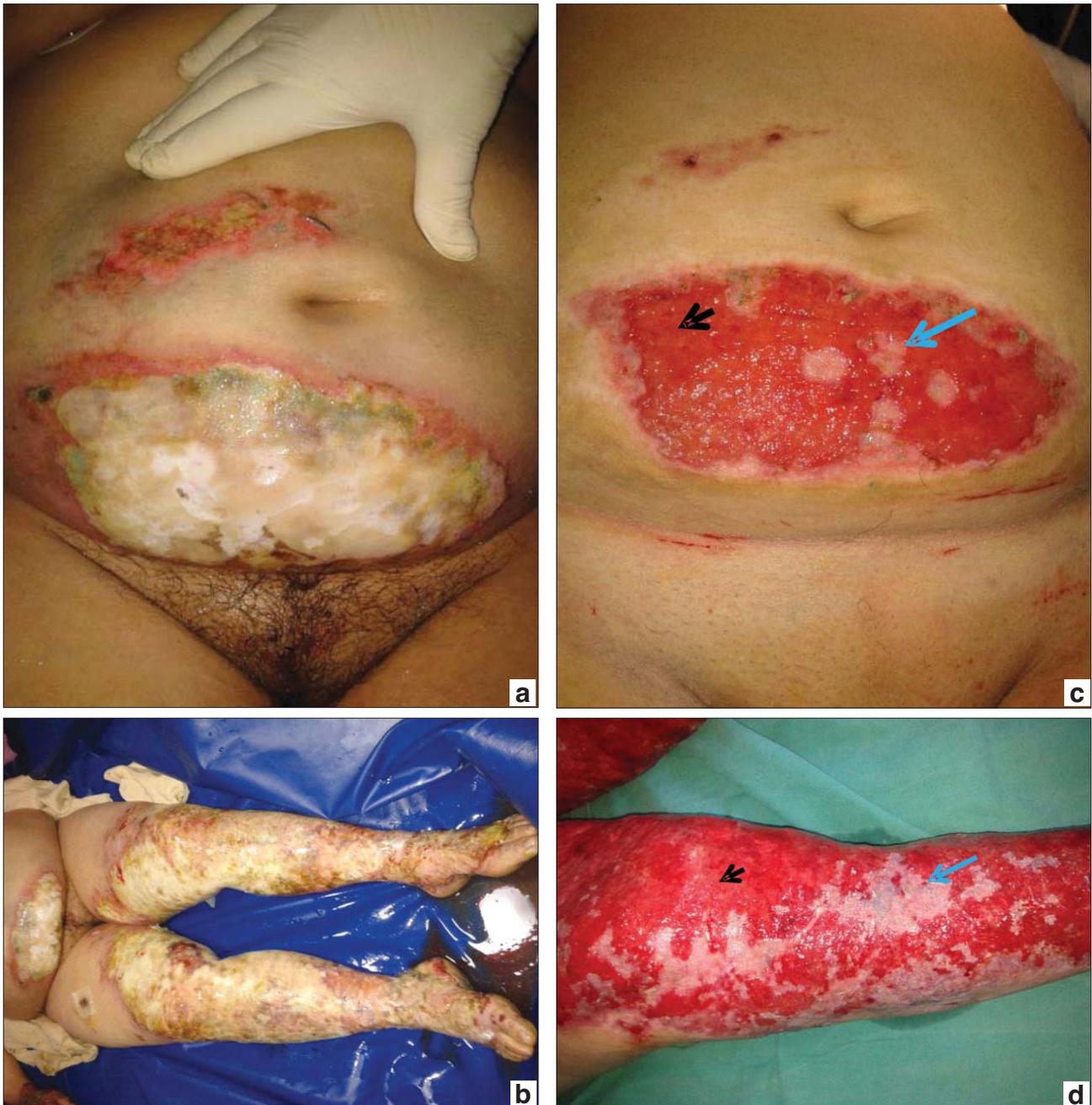


FIGURE 11 a. b. Brûlures au fuel du III^e degré. c. d. Îlots d'épiderme (↗) après 5 GSCC freinés par les granulomes charnus (↖).

CONCLUSION

Les bons résultats préliminaires des greffes séquentielles de cellules cutanées prouvent que c'est une alternative qui méritait d'être pratiquée et qui devrait avoir sa place dans l'arsenal thérapeutique des brûlures et des plaies chroniques.

RÉFÉRENCES

1. Revol M, Servant JM. Greffes cutanées. *Encycl Méd Chir* 2010; 45-070, 11 p.
2. Moscona A, Moscona H. The dissociation and aggregation of cells from organ rudiments of the early chick embryo. *J Anat* 1952; 86 (3): 287-301.
3. Walsh KA. Trypsinogens and trypsins of various species. *Meth Enzymol* 1970; 19: 41-63.
4. Massolini G, Calleri E. Immobilized trypsin systems coupled on-line to separation methods: recent development and analytical applications. *J Sep Sci* 2005; 28 (1): 7-21.
5. 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.
6. Lakhel-Le Coadou A, Carsin H, Cantaloube D. Indication des substituts cutanés chez le brûlé. *Encycl Méd Chir* 2000; 45-158, 6p.
7. 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 (4): 451-61.
8. Sullivan T, Smith J, Kermode J, McIver E, Courtemanche D. A review of scar scales and scar measuring devices. *J Burn Care Rehabil* 1990; 11: 256-60.
9. Atiyeh BS, Hayek SN, Gunn SWA. New technologies for burn wound closure and healing. Review of the literature. *Burns* 2005; 31: 944-56.
10. Saffle JE. Closure of the excised burn wound: Temporary skin substitutes. *Clin Plast Surg* 2009; 36: 627-41.
11. Burke JF, Bandoc CC, Quinby WC. Primary burn excision and immediate grafting: A method for shortening illness. *J Trauma* 1974; 14: 389-95.
12. Chester DL, Chester DS, Papini RPG. A review of keratinocyte delivery to the wound bed. *J Burn Care Rehabil* 2004; 25: 266-75.
13. Herndon DN, Barrow RE, Rutan RL et al. A comparison of conservative versus early excision: therapies in severely burned patients. *Ann Surg* 1989; 209: 547-53.
14. Paddel-Ledinek JE, Cruickshank DG, Masterton JP. Skin replacement by cultured keratinocyte grafts: An Australian experience. *Burns* 1997; 23: 204-11.
15. Braye F, Dumortier R, Bertin-Maghit M et al. Les cultures d'épiderme pour le traitement des grands brûlés. Étude sur deux ans (18 patients). *Ann Chir Plast Esthet* 2001; 46: 599-606.
16. Atiyeh BS, Costagliola M. Cultured epithelial autograft (CÉA) in burn treatment: Three decades later. *Burns* 2007; 33: 405-13.
17. Koch N, Erba P, Benathan M, Raffoul W. Nouveautés dans la reconstruction cutanée: cultures des cellules et substituts dermiques et revue de la littérature. *Ann Burn Fire Disasters* 2010 Sep 30; 23 (3): 131-6.
18. Kearney JN. Clinical evaluation of skin substitutes. *Burns* 2001; 27: 545-51.
19. Haslik W, Kamholz LP, Nathschläger G, Andel H, Meissl G, Frey G. First experience with the collagen-elastin matrix. Matriderm as a dermal substitute in severe burn injuries of the hand. *Burns* 2007; 33: 364-8.
20. Thomson JA, Itskavitz-Eldor J, Shapiro SS et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998 Nov 6; 282 (5391): 1145-7.
21. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M et al. Introduction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007; 31 (5): 861-72.
22. Akita S, Nakagawa H, Akino K, Pukui M, Fujii T. Cellules souches pour la cicatrisation des plaies cutanées. *Journal des Plaies et Cicatrisations* 2003; 36: 13-17.
23. Pravin JM, Prasun JM, Debabrata B. Cell free derivatives from mesenchymal stem cells are effective in wound therapy. *World J Stem Cells* 2012 May 26; 4 (5): 35-43.
24. Guenou H, Nissan X, Larker F et al. Human embryonic stem cell derivatives for full reconstruction of the pluristratified epidermis: a preclinical study. *The Lancet* 2009 Nov; 374: 1745-53.
25. Wood FM, Kolybaba ML, Allen P. The use of cultured epithelial autograft in the treatment of major burn wounds: Eleven years of clinical experience. *Burns* 2006; 32: 538-44.
26. Schlabe J, Johnen C, Schwartänder R et al. Isolation and culture of different epidermal and dermal cell types from human scalp suitable for the development of a therapeutic cell spray. *Burns* 2008; 34: 376-84.
27. Werner S, Krieg T, Smola H. Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing. *J Invest Dermatol* 2007; 127: 998-1008.
28. Goulet F, Poitras A, Rouabhia M. Stimulation of human keratinocyte proliferation through growth factor exchanges with dermal fibroblasts in vitro. *Burns* 1996; 22: 107-12.