

Le déficit en cellules souches limbiques

D. Gatinel, T. Hoang-Xuan

Fondation ophtalmologique Adolphe de Rothschild, Service d'Ophtalmologie, 25 rue Manin, 75019 Paris.
Correspondance : T Hoang-Xuan, à l'adresse ci-dessus.
Reçu le 7 juin 1999. Accepté le 17 septembre 1999.

Limbal stem cell deficiency

CONTENTS

INTRODUCTION

PATHOPHYSIOLOGY OF THE OCULAR SURFACE

STATIC CONSIDERATIONS

DYNAMIC CONSIDERATIONS

ÉTIOLOGIES

CLINICAL course

THERAPY

TECHNIQUES WITHOUT TRANSPLANTATION

Principles

Indications

TECHNIQUES INVOLVING LIMBAL STEM CELL TRANSPLANTATION

Limbal autograft

Principles

Indications

Limbal allograft

Principles

Indications

AMNIOTIC MEMBRANE TRANSPLANTATION

Principles

Indications

CONCLUSION

Key-words: amniotic membrane transplantation, limbal allograft, limbal autograft, limbal stem cells, limbus, ocular surface.

PLAN

INTRODUCTION

RAPPELS PHYSIOPATHOLOGIQUES CONCERNANT LA SURFACE OCULAIRE

CONSIDÉRATIONS STATIQUES

CONSIDÉRATIONS DYNAMIQUES

ÉTIOLOGIES

SIGNES CLINIQUES

TRAITEMENT

TECHNIQUES SANS GREFFES

Principes

Indications

TECHNIQUES UTILISANT LA TRANSPLANTATION DE CELLULES SOUCHES LIMBIQUES

L'autogreffe de limbe

Principes

Indications

L'allogreffe de limbe

Principes

Indications

LA GREFFE DE MEMBRANE AMNIOTIQUE

Principes

Indications

CONCLUSION

Mots-clés : allogreffe de limbe, autogreffe de limbe, cellules souches limbiques, greffe de membrane amniotique, limbe, surface oculaire.

INTRODUCTION

Le limbe conjonctival remplit de multiples fonctions dont deux essentielles dans le maintien de l'intégrité de la surface cornéenne :

– il est le siège électif des cellules souches pour l'épithélium cornéen dont il permet la régénération,

– il représente une frontière non seulement anatomique mais également fonctionnelle entre la conjonctive et la cornée, la perte de son intégrité favorisant l'envahissement cornéen par une prolifération d'origine conjonctivale.

Le syndrome de déficit en cellules souches limbiques (DCSL) est une entité actuellement bien définie et individualisée en pathologie de la surface oculaire.

Il est l'expression d'un double processus :

– une régénération qualitativement et/ou quantitativement insuffisante de l'épithélium cornéen,

– l'invasion cornéenne par une prolifération fibrovasculaire d'origine conjonctivale.

Le terme « déficit » ne présume pas de son caractère congénital (agénésie ou dysgénésie du limbe), fonctionnel (dysrégulation neurologique ou endocrinienne), ou encore acquis (destruction par un mécanisme physique, infectieux, inflammatoire...). Il traduit l'incapacité des cellules souches limbiques (CSL) à assurer le renouvellement normal de l'épithélium cornéen, que ce soit à l'état physiologique ou lors de circonstances pathologiques. En effet, hormis

les étiologies comme les nécroses limbiques après brûlures chimiques et les limbites chroniques où l'atteinte du limbe est cliniquement évidente et une perte en CSL peut être suspectée, dans d'autres causes, telles les maladies endocriniennes ou lorsqu'aucune étiologie n'est retrouvée, il est plus judicieux d'invoquer un dysfonctionnement plutôt qu'un déficit.

La transplantation de CSL est le traitement logique du syndrome de DCSL. L'autogreffe de limbe suppose l'existence d'un contingent limbique sain suffisant (œil ipsilatéral en cas d'atteinte limitée, œil controlatéral en cas d'atteinte diffuse). Quand cette condition n'est pas réalisée, il est possible d'effectuer une allogreffe de limbe qui nécessite une thérapie immunosuppressive d'appoint. Récemment, le rôle bénéfique de la greffe de membrane amniotique seule ou en association avec une autogreffe ou allogreffe de limbe a été mis en évidence. La membrane amniotique aiderait à créer un micro-environnement favorable à la régénération du stroma limbique.

RAPPELS PHYSIOPATHOLOGIQUES

Thoft et Friend définissent en 1977 le concept de surface oculaire [1], regroupant au sein d'une même unité fonctionnelle l'épithélium conjonctival, l'épithélium cornéen, et le film lacrymal. Depuis, l'interdépendance de ces éléments n'a cessé d'être soulignée [2] permettant le regroupement de certaines affections sous la dénomination commune de pathologies de la surface oculaire [3] et, de ce fait, une nouvelle approche nosologique et thérapeutique.

Considérations statiques

L'épithélium cornéen est composé de cinq à six couches stratifiées de

cellules épithéliales. Ces cellules desquament en surface dans le film lacrymal, la durée de la période de turn-over étant d'environ 5 jours [4, 5]. L'assise cellulaire basale adhère fermement à une lame basale composée en grande partie de collagène de type IV, ainsi que de collagène de type I et III et de différentes protéines (héparine, laminine, fibrinogène, fibronectine...). Cet épithélium ne contient pas de cellules calciformes et n'est pas kératinisé, hormis dans certaines maladies [6]. Les cellules superficielles sont hyperdifférenciées, possèdent certaines particularités en rapport avec leur rôle de barrière (aplatissement cellulaire, zonulae occludentes, microvillosités apicales) ou leur faible durée de vie (pycnose nucléaire, faible nombre de mitochondries). En plus de son rôle important au niveau de l'optique du dioptré cornéen et dans la défense contre les agressions microbiennes, l'épithélium cornéen sécrète des facteurs régulant l'activité métabolique des kératocytes du stroma cornéen [7]. Par ailleurs, la matrice stromale et la lame basale épithéliale possèdent, outre leur rôle mécanique de soutien, un rôle trophique pour l'épithélium cornéen, par le biais de la sécrétion de cytokines et de facteurs de croissance [8].

L'épithélium stratifié du limbe cornéen s'épaissit pour former environ dix couches cellulaires [9, 10]. Il contient des mélanocytes, des cellules de Langerhans, mais pas de cellules calciformes [11]. Le stroma sous-jacent contient un réseau vasculaire dense et est organisé selon une série d'élévations radiaires centrées par un axe fibro-vasculaire appelées palissades de Vogt [9, 12]. Les cellules basales de cet épithélium limbique jouent un rôle capital dans le renouvellement et le maintien de l'épithélium cornéen, que ce soit dans des circonstances physiologiques ou pathologiques [13-15], et possèdent des propriétés analo-

gues à celles des cellules souches (CS) déjà identifiées pour d'autres épithéliums de l'organisme (moelle osseuse, épithélium intestinal...). Les CS ont une durée de vie prolongée, avec un cycle cellulaire long mais une phase S courte. Chaque division cellulaire est asymétrique, une cellule étant destinée à reconstituer le pool de cellules souches, l'autre se différenciant en acquérant graduellement les caractéristiques des cellules du tissu auquel elle est destinée [15-18].

L'épithélium conjonctival est stratifié et possède en moyenne deux à trois couches cellulaires contenant de nombreuses cellules calciformes (environ 7 % de la population cellulaire basale) impliquées dans la production du mucus essentiel à la stabilité du film lacrymal. Le stroma conjonctival est un tissu conjonctif lâche contenant des vaisseaux sanguins et lymphatiques, et différents contingents cellulaires : lymphocytes, mastocytes, polynucléaires neutrophiles [19, 20]... L'épithélium conjonctival est capable de coloniser la surface épithéliale cornéenne quand celle-ci est atteinte [21, 22]. Il joue également un rôle dans la suppléance vasculaire du limbe. Les cellules souches pour l'épithélium conjonctival n'ont pas été clairement identifiées, mais certains travaux récents désignent le fornix conjonctival comme leur localisation anatomique probable [23, 24].

Considérations dynamiques

L'épithélium cornéen se renouvelle rapidement ; son turn-over est compris entre 19 et 35 jours. Ce renouvellement suppose l'existence de phénomènes de divisions, migrations et différenciations cellulaires. Plusieurs théories ont été proposées sur la base d'observations cliniques et expérimentales [5, 25-28]... Shapiro *et coll.* [28] émettent l'hypothèse d'une origine conjonctivale de l'épithélium

cornéen, fondée sur l'observation des phénomènes de cicatrisation de la surface cornéenne après abrasion totale de l'épithélium cornéen chez le lapin.

Reprenant cette théorie, Thoft et Friend [29] suggèrent l'existence d'un renouvellement cellulaire obtenu par migration des cellules épithéliales de la conjonctive vers la cornée. Cette migration s'accompagne d'une transdifférentiation cellulaire ; les cellules perdent progressivement leurs caractéristiques de cellule épithéliale conjonctivale au profit de celles de cellule épithéliale cornéenne. L'existence d'un flux migratoire permanent des cellules épithéliales de la périphérie cornéenne vers l'axe visuel et des cellules basales vers la surface compense ainsi la perte épithéliale liée à la desquamation. Cette conservation permanente de la masse épithéliale est résumée par l'égalité $X + Y = Z$, où X représente la prolifération verticale des cellules épithéliales basales, Y le flux centripète des cellules, et Z la perte cellulaire à la surface cornéenne (fig. 1).

Cette théorie de la transdifférentiation conjonctivale est contestée par Kruse *et coll.* [30]. Ils observent une cicatrisation cornéenne normale après l'application de n-heptanol pendant deux minutes sur la surface oculaire du lapin. Or cet agent chimique détruit l'épithélium cornéen et conjonctival en

épargnant les cellules basales du limbe conjonctival, en raison de leur situation anatomique profonde au sein des palissades de Vogt et de leurs solides structures d'ancrage. Les résultats des travaux antérieurs seraient alors dus à une ablation incomplète de l'épithélium basal limbique. En effet, si la réépithélialisation de la surface cornéenne après ablation complète des cellules limbiques provient effectivement de la conjonctive, elle est anormale car s'accompagne toujours d'une vascularisation cornéenne et de la persistance de cellules calciformes.

L'absence de transdifférentiation complète d'origine conjonctivale a été confirmée par d'autres travaux [31-34].

La théorie actuellement retenue sur les CSL, a été proposée par Schermer *et coll.* [18] en 1986. Situées dans les couches profondes de la conjonctive limbique, les CSL adhèrent fortement à la lame basale. Certains travaux suggèrent une répartition inégale des cellules souches limbiques, qui seraient plus abondantes dans les quadrants supérieurs et inférieurs [35]. L'hypothèse de leur fonction régénératrice de l'épithélium cornéen, pressentie par certains auteurs [36] est étayée dans différentes publications ; l'étude biomicroscopique du remplacement de l'épithélium du donneur par celui du

receveur dans les greffes de cornée, l'analyse des phénomènes cicatriciels après ulcération épithéliale [37] et de nombreuses observations histologiques et ultrastructurales [38, 26] ont établi le caractère centripète de la migration de l'épithélium cornéen. Le potentiel prolifératif de l'épithélium limbique, évalué par incorporation de thymidine tritiée, a été trouvé égal au double de celui de l'épithélium cornéen, avec le marqueur radioactif présent dans 90 % des cellules basales limbiques contre seulement 20 % des cellules basales cornéennes [39, 23]. Les travaux en immunofluorescence chez le rat et le lapin constituent une avancée significative vers une mise en évidence directe des CSL, grâce au développement d'anticorps monoclonaux spécifiques des cellules basales de l'épithélium limbique [40-42].

Le renouvellement de l'épithélium cornéen peut donc être considéré comme un processus initié à partir de cellules souches indifférenciées situées dans les couches basales du limbe. Ces cellules se divisent et donnent naissance à des cellules épithéliales différenciées, les cellules amplificatrices transitoires, qui migrent vers le centre de la cornée pour y constituer une assise basale à activité mitotique intense et acquièrent progressivement, lors des cycles cellulaires successifs, les caractéristiques phénotypiques des cellules épithéliales cornéennes. Ces dernières migrent alors de façon verticale avec une activité mitotique décroissante, puis se transforment en superficie en cellules hyperdifférenciées ne se multipliant plus et disparaissent en desquamant dans le film lacrymal (fig. 2).

Ce mécanisme de régénération suppose l'existence de facteurs régulant l'expression de gènes responsables de la différenciation en épithélium de type cornéen. Contrairement aux cellules épithéliales de la cornée centrale, les cellules basales limbiques sont en contact étroit avec un réseau vas-

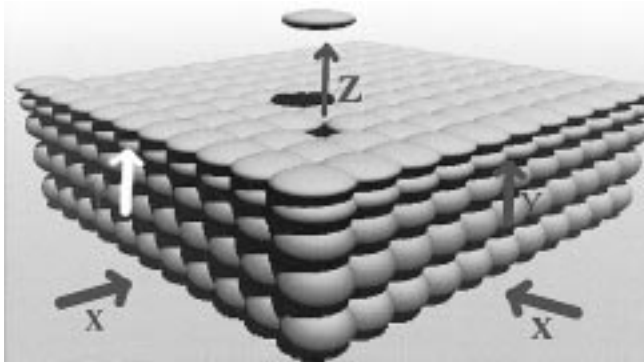


Figure 1 : (D. Gatinel) L'équilibre de la masse épithéliale cornéenne d'après Thoft et Friend (représentation schématique) : l'hypothèse X,Y,Z. X : mouvement centripète des cellules. Y : prolifération basale. Z : perte cellulaire à la surface.

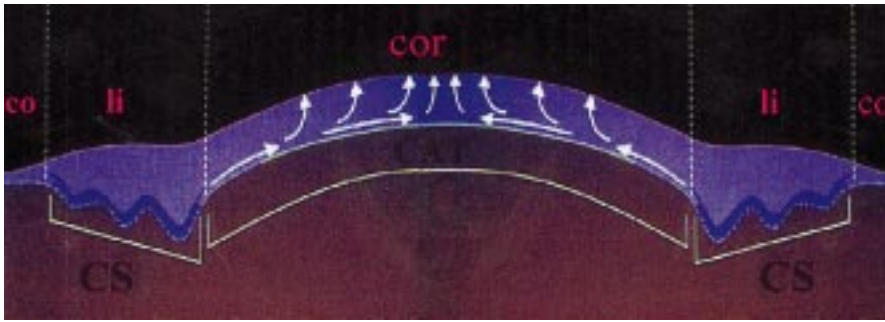


Figure 2 : (D. Gatinel) Modèle de régénération de l'épithélium cornéen, d'après Schermer *et coll.* Les cellules souches limbiques (CSL), situées dans la couche basale du limbe (li) donnent naissance aux cellules amplificatrices transitoires (CAT) qui migrent vers le centre et la surface de la cornée (cor).

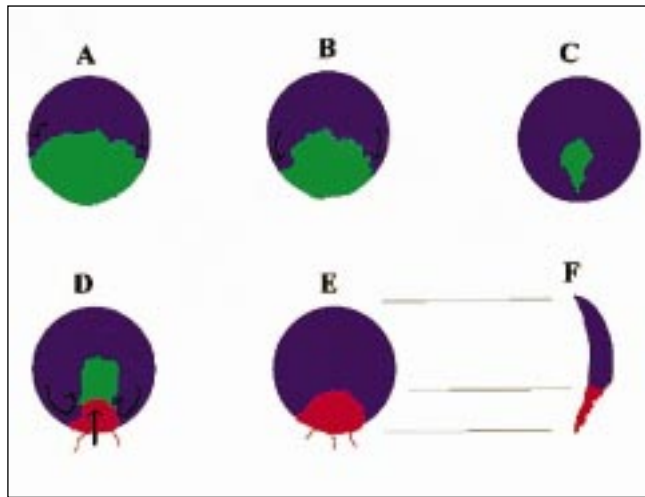


Figure 3 : (D. Gatinel) Représentation schématisée de la cicatrisation d'une lésion de la surface oculaire intéressant le limbe, d'après Dua *et coll.* **A :** formation de languettes épithéliales (flèches) à partir de l'épithélium cornéen résiduel sain (représenté en bleu), en regard des limites du limbe lésé. **B :** migration circconférentielle parallèle au limbe des languettes épithéliales (flèches). **C :** le recouvrement du centre de l'ulcération ne s'effectue qu'après coalescence des deux fronts de prolifération épithéliale en regard du limbe. **D :** dans certains cas, une prolifération épithéliale d'origine conjonctivale (rose) franchit le limbe et s'interpose entre les deux languettes épithéliales cornéennes, stoppant leur progression. **E :** la surface recouverte par cet épithélium d'origine conjonctivale induit l'apparition d'une néovascularisation et possède une épaisseur irrégulière et inférieure à celle de l'épithélium cornéen normal.

culaire dense, et leur lame basale est riche en collagène de type IV. Ces différences microenvironnementales jouent probablement un rôle dans la spécificité des CSL [17, 39, 43]. De plus, l'observation de dysfonctionnements limbiques au cours de certaines pathologies

endocriniennes ou neurologiques accrédite l'hypothèse de la présence de récepteurs pour des facteurs hormonaux et des neuromédiateurs sur les cellules souches du limbe [44].

En analysant chez l'homme les modes de cicatrisation de larges abrasions épithéliales intéressant à

la fois la surface cornéenne et le limbe conjonctival, Dua *et coll.* [45] ont distingué deux types de réépithélialisation cornéenne ; une bonne et une mauvaise (*fig. 3*).

La bonne réépithélialisation est faite d'un épithélium de phénotype cornéen. Elle est progressive, et s'effectue tout d'abord de manière concentrique à partir des berges saines de l'épithélium cornéen juxta-limbique. Elle aboutit à la coalescence des fronts de migration épithéliale au centre de l'ulcération.

La mauvaise réépithélialisation consiste en une prolifération épithéliale d'origine conjonctivale. Elle franchit le limbe et s'interpose entre les fronts de prolifération épithéliale cornéenne, empêchant ainsi leur fusion et résultant en une réépithélialisation partielle par un épithélium de phénotype conjonctival. Ce dernier est plus fin que l'épithélium cornéen, contient des cellules calciformes, stimule l'apparition de néovaisseaux et favorise les érosions épithéliales récidivantes. Il tend à persister, et ne se transdifférencie pas en épithélium de phénotype cornéen même après plusieurs mois [46]. Parfois cependant, on peut observer biomicroscopiquement de petits bourgeons d'épithélium cornéen au sein de l'épithélium conjonctival le long de la ligne de démarcation entre ces deux assises cellulaires. Leur constatation suggère une tentative de remplacement de l'épithélium conjonctival par un épithélium cornéen. Elle est à la base d'une approche thérapeutique n'utilisant pas la greffe de CSL [47] (cf. paragraphe « technique sans greffe »).

ÉTIOLOGIES

Une atteinte significative des CSL, compromettant la régénération des cellules épithéliales cornéennes, peut se rencontrer au cours de diverses situations pathologiques qui

répondent à différents mécanismes parfois intriqués [14, 44, 48, 49, 50]. Elle peut être unilatérale ou bilatérale, en fonction de l'étiologie :

■ pathologies liées à une atteinte directe des CSL :

- physiques : brûlures caustiques ou thermiques, traumatisme limbique étendu... ;

- anoxiques : complications liées au port prolongé de lentilles de contact ;

- infectieuses : trachome, herpès, kératite bactérienne sévère... ;

- immunologiques et/ou inflammatoires : syndrome de Stevens-Johnson, pemphigoïde oculaire cicatricielle, rejet épithélial de greffon cornéen, pathologies inflammatoires du limbe...

■ pathologies liées à une souffrance indirecte des CSL secondaire à une atteinte du stroma conjonctival limbique :

- tumorales bénignes : ptérygions ;

- tumorales malignes : carcinomes épidermoïdes du limbe ;

- héréditaires : aniridie ;

- endocriniennes : diabète, maladie d'Addison, hypoparathyroïdie ;

- idiopathiques.

SIGNES CLINIQUES

La disparition de la barrière limbique provoque dans certaines circonstances pathologiques la migration d'un épithélium conjonctival sur la surface cornéenne à l'origine du tableau clinique suivant :

- réépithélialisation retardée et/ou de mauvaise qualité : la surface épithéliale peut être irrégulière avec possibilité d'érosions épithéliales récidivantes, surtout en cas de disparition de la membrane basale épithéliale [31, 51-54] ;

- néovascularisation superficielle et/ou stromale, précédée d'un infiltrat inflammatoire [15, 33, 55] ;

- persistance de cellules calciformes [33] bien mises en évidence

par technique d'empreinte au niveau du limbe et de l'épithélium cornéen [49].

Outre les signes liés à la pathologie causale, les signes fonctionnels associent classiquement baisse d'acuité visuelle, photophobie, douleurs d'intensité variable, blépharospasme...

TRAITEMENT

Le pronostic fonctionnel d'une atteinte de la surface oculaire est essentiellement lié à la qualité de la restauration anatomique des différents contingents épithéliaux, et en particulier cornéen en regard de l'axe visuel en raison de son rôle important dans la constitution du dioptré optique.

En cas d'altération de la surface cornéenne secondaire à l'atteinte de la barrière limbique et de son réservoir en CS, le traitement doit atteindre trois objectifs principaux :

- 1 - prévenir l'envahissement conjonctival à partir du limbe et favoriser la prolifération, la migration et l'adhésion des cellules épithéliales cornéennes résiduelles sur la surface cornéenne ;

- 2 - suppléer le manque en CSL ;

- 3 - restaurer un microenvironnement stromal limbique qui remplisse son rôle de soutien pour les CSL résiduelles ou transplantées.

Techniques sans greffe

Principes

Dua *et coll.* [46] exposent dans une étude résumée au paragraphe 2.2 une stratégie thérapeutique basée sur l'observation de la cinétique de la réépithélialisation de la surface cornéenne après atteinte partielle de celle-ci et du limbe [44, 45, 56].

Ils se contentent de lutter contre l'envahissement conjonctival, afin de permettre à l'épithélium cornéen de proliférer, migrer et adhérer sur la totalité de la surface

lésée [46]. Leur traitement comprend l'exérèse d'un éventuel pannus d'origine conjonctivale quand celui-ci s'oppose à la coalescence des fronts de réépithélialisation épithéliaux, puis le grattage mécanique de tout front de prolifération conjonctivale menaçant de franchir le limbe et recouvrir la surface cornéenne.

Indications

Dua *et coll.* [46] ont appliqué cette technique dans 14 cas d'atteinte partielle de la surface cornéenne et limbique dont les étiologies comprenaient des brûlures chimiques (détergents), des complications de kératoplasties, un syndrome de Stevens-Johnson... Le suivi moyen était de 7 mois et demi. Dans dix cas il existait un pannus conjonctival recouvrant une partie de la surface cornéenne avec néovascularisation et érosions récidivantes. Dans les quatre autres cas pris en charge immédiatement (brûlure chimique), la prévention du franchissement du limbe par la prolifération conjonctivale était réalisée dès que celle-ci pénétrait de deux millimètres la cornée périlimbique. La technique employée était un débridement mécanique par grattage de manière centrifuge jusqu'à cinq à sept millimètres en arrière du limbe.

Chez tous les patients le recouvrement de la zone dénudée par un épithélium de phénotype cornéen a pu être observé avec pour résultats une amélioration de l'acuité visuelle et la disparition des signes fonctionnels

D'autres études sont cependant nécessaires afin d'établir le devenir de ces résultats à plus long terme et de déterminer si cette technique est à même d'induire une surface oculaire stable et de bonne qualité. Le pourcentage élevé de récurrences observées dans la chirurgie du ptérygion sans reconstruction incite à la prudence. Cette méthode représente cependant une alternative

intéressante à la transplantation limbique, en particulier pour les atteintes de faible étendue, ou quand la transplantation limbique est impossible.

Techniques utilisant la transplantation de CSL

Autogreffe de limbe

• Principes

Les premières techniques de transplantation épithéliale (kératoépithélioplastie, greffes conjonctivales) ont été développées avant l'établissement de la théorie des CSL et n'intéressaient pas le limbe. L'intérêt de la transplantation de tissu conjonctival (autogreffe) a été ainsi rapporté par Thoft en 1977 dans les brûlures chimiques unilatérales de la surface oculaire [57].

Kenyon et Tseng sont les premiers en 1989 à proposer une technique de transplantation conjonctivolimbique [58], inspirée des travaux de Thoft sur les greffes conjonctivales [57, 59, 60] et des expériences de Davanger et Schermer [36] sur les CSL.

L'autogreffe de limbe (AGL) suppose l'existence d'un contingent sain et suffisant de CSL, situé sur l'œil receveur ou sur l'œil controlatéral et s'adresse donc plus particulièrement aux déficits partiels et/ou unilatéraux en CSL.

La technique de prélèvement est actuellement relativement bien codifiée et n'a pas significativement évolué depuis la description princeps de Kenyon et Tseng [58]. Le greffon est obtenu après incision cornéenne non transfixiante située à un demi-millimètre du limbe, tunnellation centrifuge en direction de l'espace sous conjonctival et dissection d'un lambeau conjonctival adjacent. Le fragment ainsi obtenu est ensuite positionné au niveau du site receveur où il sera suturé par des points séparés de monofilament nylon 10-0 au niveau de la berge cornéenne et de monofilament à résorption rapide

sur le versant conjonctival. La taille du greffon sera déterminée en fonction de l'importance du déficit, en sachant qu'il n'est pas nécessaire de couvrir entièrement la zone lésée. La fréquence des complications sur l'œil donneur adelphe et les risques de voir apparaître une insuffisance limbique secondaire sont proportionnels à la taille du prélèvement. Sur un œil donneur sain, le risque est faible pour une taille de prélèvement n'excédant pas le quart de la circonférence limbique [61]. En revanche, certains auteurs ont montré sur l'œil de lapin qu'un syndrome de déficit limbique partiel pouvait être induit par le prélèvement des deux tiers de la circonférence limbique [62, 63]. Il convient dans tous les cas de garder à l'esprit que les complications du prélèvement sont rares mais toujours possibles, notamment en cas d'atteinte épithéliale ultérieure ou d'atteinte infraclinique de l'œil donneur [64].

• Indications

Kenyon et Tseng en 1989, rapportent des résultats concluants de l'AGL, dans une série de 26 patients victimes de brûlures chimiques ou thermiques, d'épithéliopathies cornéennes liées au port prolongé de lentilles de contact ou compliquant les suites d'interventions itératives sur le segment antérieur [58]. La démonstration expérimentale de la restauration d'un épithélium de phénotype cornéen à partir de l'autogreffe limbo-conjonctivale est apportée grâce aux techniques d'immuno-marquage par anticorps monoclonaux dirigés contre des marqueurs cellulaires cornéens spécifiques [65].

L'efficacité de l'AGL dans des indications similaires à celles de l'étude de Kenyon et Tseng est également confirmée par d'autres auteurs [64, 65]. Le champ d'application de l'AGL s'est ensuite élargi à la reconstruction de la surface oculaire chez des patients opérés

de carcinomes épidermoïdes extensifs du limbe [67] et de ptérygions récidivants ou étendus [68-72]. Dans les atteintes sévères de la surface oculaire, l'AGL occupe également une place importante au sein de stratégies thérapeutiques plus complexes, en étant utilisée en préambule à une kératoplastie transfixiante ou couplée à une greffe de membrane amniotique (GMA) comme chez les patients opérés de ptérygions récidivants et/ou associés à des symblépharons [73, 74]. (cf. chapitre « La greffe de membrane amniotique »).

Les brûlures chimiques de la surface oculaire, en particulier celles provoquées par des substances alcalines, entraînent souvent des complications oculaires sévères et extensives, et de lourdes séquelles [13, 75]. Même en cas de brûlure moyenne, le pronostic fonctionnel peut être compromis par la seule atteinte de la surface oculaire. La prise en charge des brûlures chimiques constitue un défi pour l'ophtalmologiste et l'intérêt de l'AGL n'est plus à démontrer. L'AGL permet, outre la régénération d'un épithélium cornéen de phénotype normal, d'enrayer l'évolution d'une ulcération cornéenne aseptique, très fréquente en cas de nécrose limbique extensive. En effet, l'épithélium greffé sécrète des cytokines qui inhibent la production de collagénases par les fibroblastes du stroma cornéen [7, 76, 77] et la prolifération des cellules inflammatoires.

Dans les brûlures oculaires graves avec perte totale de la vascularisation limbique, outre l'impossibilité prévisible de réépithélialisation secondaire, il existe un risque immédiat de nécrose du segment antérieur. Celui-ci implique parfois la nécessité de réaliser un lambeau conjonctivo-tenonien d'avancement au niveau du limbe [78], afin de rétablir une vascularisation limbique et enrayer l'évolution vers la

nécrose ou une ulcération cornéenne aseptique [79]. Cette technique ne permet cependant pas le recouvrement de la surface cornéenne par un épithélium cornéen de phénotype normal [79-81].

Des progrès doivent être encore réalisés dans les mesures thérapeutiques entourant l'AGL et dans la détermination du moment le plus propice pour réaliser ce geste. Ce dernier problème ne se pose que lorsque les patients sont pris en charge tôt et non tardivement au stade des séquelles. Plusieurs auteurs [82, 83], préconisent une AGL précoce pour une réhabilitation plus rapide et pour prévenir au mieux les séquelles éventuelles. Il faut évaluer la qualité de la sécrétion lacrymale résiduelle et contrôler la tension oculaire et les phénomènes inflammatoires initiaux, sans toutefois chercher à obtenir la complète rémission de ces derniers dans la mesure où ils favorisent un apport néovasculaire bénéfique au niveau du greffon. Il est également préférable d'intervenir avant la constitution d'un pannus néovasculaire d'origine conjonctivale, dont l'apparition est parfois précoce en cas d'atteinte limbique sévère [82].

Il s'avère donc utile d'établir une classification précise afin d'anticiper l'évolution de la brûlure oculaire. La classification de Wagoner [83], inspirée de celle de Hughes [84], repose sur l'évaluation de l'étendue de l'ischémie limbique, qui est proportionnelle à la perte en cellules souches et aide à poser l'indication de l'AGL avant même que n'apparaisse un pannus fibrovasculaire. Un bon choix stratégique permet une récupération rapide en cas d'absence d'atteinte stromale fonctionnelle significative, et une augmentation des chances de succès d'une kératoplastie transfixiante ultérieure éventuelle en cas d'atteinte stromale trop importante.

L'allogreffe de limbe

• Principes

Quand l'AGL n'est pas réalisable, soit à cause de lésions conjonctivales étendues bilatérales (brûlure chimique ou thermique, syndrome de Lyell, syndrome de Stevens-Johnson, aniridie ou toute autre pathologie diffuse de la surface oculaire), soit que le patient refuse le prélèvement, ou qu'on souhaite préserver la conjonctive saine pour une chirurgie filtrante ultérieure éventuelle, l'allogreffe de limbe constitue une alternative intéressante, le tissu provenant alors d'une banque de donneurs (prélèvement post-mortem) ou d'un parent génétique.

Le principe chirurgical est similaire à celui de l'autogreffe et consiste en l'apport d'un greffon de taille adaptée sur la surface de l'œil atteint. L'allogreffe de tissu limbique est une variante de la technique de kératoépithélioplastie définie par la greffe de lentilles cornéens provenant d'un donneur (prélèvement post-mortem) au niveau de la surface oculaire lésée [86]. Elle a été décrite initialement par Turgeon *et coll.* et repose sur la greffe de tissu limbique adjacent au lenticule cornéen [87].

Les greffons issus de donneurs vivants sont constitués de conjonctive et de tissu limbique [72, 88]. En revanche le transfert de CSL à partir d'un œil de cadavre peut utiliser différents supports :

- lenticule cornéen et limbe [47, 87, 89, 90],
- conjonctive et limbe [13, 72],
- conjonctive, limbe et lenticule cornéen [91].

Pour pratiquer le prélèvement sur œil de cadavre, une collerette limbique peut être obtenue simplement après réalisation de deux trépanations concentriques non transfixiantes de part et d'autre du limbe et dissection lamellaire suivie d'une découpe sectorielle en plusieurs fragments de taille adaptée.

La durée de vie des cellules souches dans les milieux de transport et de conservation n'est pas connue, et un délai le plus bref possible doit être observé entre le prélèvement et la greffe (24 heures semble être le temps maximal pour la plupart des auteurs) [72].

Une préparation du lit de l'allogreffe est nécessaire (péritomie, ablation du pannus fibrovasculaire d'origine conjonctivale, scléro-kératetectomie superficielle...).

L'allogreffe de limbe nécessite une thérapeutique immunosuppressive d'appoint contre les phénomènes de rejet inhérents à la greffe d'un tissu riche en cellules immunocompétentes [92]. En plus des corticoïdes en instillation locale, les corticoïdes par voie générale, l'azathioprine (voie générale) et surtout la ciclosporine A (voie locale et/ou générale) ont été utilisés dans un but préventif et/ou curatif, le plus souvent avec succès. [47, 72, 85, 91, 93]. Ces rejets surviennent essentiellement chez les patients ayant bénéficié d'une allogreffe à partir d'œil de cadavre (absence de compatibilité HLA).

• Indications

Les premières publications sur l'allogreffe de limbe [72, 87, 89] concernent les indications de brûlure oculaire sévère, dégénérescence de Terrien, sclérocornée congénitale, syndrome de Stevens-Johnson, kératoconjunctivite chronique récidivante, aniridie et kératopathie secondaire au port prolongé de lentilles de contact.

L'allogreffe de limbe s'inscrit souvent dans une stratégie médico-chirurgicale complexe de reconstruction de la surface oculaire qui fait appel à un greffon HLA compatible et/ou une thérapeutique immunosuppressive anti-rejet (ciclosporine) [47, 72].

En assurant un bon recouvrement épithélial, elle permet comme dans l'aniridie congénitale, les brûlures chimiques, la pemphigoïde oculaire cicatricielle et les trauma-

tismes étendus de la surface oculaire, de préparer le lit d'une kératoplastie transfixiante secondaire dont le pronostic est amélioré [47, 72, 90, 91].

En cas d'atteinte bilatérale étendue à toute la surface oculaire (Stevens-Johnson, brûlures extensives...), la greffe conjonctivo-limbique semble la mieux indiquée. En effet, en plus des CSL, elle apporte un contingent de cellules calciformes et de vaisseaux. Contrairement au lenticule cornéolimbique, son prélèvement à partir de parents génétiques vivants est aisé et semble minimiser les risques de rejet [88].

Combinée à la greffe de membrane amniotique, la tarsorrhaphie et l'instillation de sérum sanguin autologue modifié, l'allogreffe de limbe a montré récemment des résultats encourageants chez plusieurs patients atteints de graves séquelles de syndrome de Stevens-Johnson et de pemphigoïde oculaire cicatricielle [48].

La greffe de membrane amniotique

Principes

Constituée histologiquement d'un épithélium unistratifié, d'une lame basale, et d'un mésenchyme avasculaire, la membrane amniotique humaine est extraite de placentas obtenus après césarienne par séparation du chorion. Ses propriétés sont bien mises en évidence sur un modèle animal [94] et en font un adjuvant de choix pour la greffe de CSL, notamment dans les cas difficiles ou compliqués.

Appliquée directement sur la surface oculaire lésée, la membrane amniotique en facilite la réépithélialisation en réduisant les phénomènes inflammatoires et cicatriciels. Sa lame basale facilite la migration épithéliale [95], l'adhésion des cellules basales épithéliales [96, 97], et l'expression phénotypique épithéliale [98-100].

La membrane amniotique possède également des propriétés antiapoptotiques [101]. La greffe de membrane amniotique (GMA) a ainsi été utilisée seule ou associée à l'autogreffe et l'allogreffe de limbe dans diverses atteintes de la surface oculaire.

Indications

La membrane amniotique a été utilisée en chirurgie gynécologique et en dermatologie [102-104], avant qu'on en découvre son application en ophtalmologie et dans d'autres spécialités comme la gastro-entérologie [105, 106].

La première publication ophtalmologique, en 1940, fait état de l'usage de membrane fœtale (amnios et chorion) dans le traitement de symblépharons conjonctivaux [107].

La GMA est maintenant utilisée dans des indications plus larges: alternative aux lambeaux conjonctivaux dans la prise en charge des défauts épithéliaux réfractaires [108], reconstruction de la surface oculaire après exérèse de tumeurs, de tissu cicatriciel, de symblépharons [109]. Combinée à l'AGL; elle semble prévenir la fibrose sous-conjonctivale dans les suites opératoires de ptérygions récidivants et/ou associés à des symblépharons [73, 74].

Les résultats d'une étude portant sur 26 patients présentant un déficit en CSL d'importance variable et relevant de différentes étiologies (brûlure chimique, syndrome de Stevens-Johnson, pemphigoïde oculaire cicatricielle, kératopathie liée au port de lentilles de contact, aniridie, chirurgies oculaires multiples, atopie, idiopathique) [110] montrent que ceux avec atteinte limitée à une kératopathie superficielle peuvent bénéficier d'une GMA seule, alors que ceux avec atteinte stromale cornéenne profonde relèvent de préférence d'une indication de GMA couplée à une allogreffe de limbe et un traitement immunosuppresseur et, dans

certains cas, à une kératoplastie transfixiante réalisée secondairement. Dans les cas plus sévères, le succès de l'allogreffe de limbe semble avoir été favorisé par la réalisation préalable d'une GMA, par le biais d'une réduction de l'inflammation et de la néo-vascularisation.

Les dispositions légales d'utilisation de la GMA en France ne sont pas encore établies. Récemment, l'utilisation de tissu péricardique dans la reconstruction du segment antérieur a été rapportée avec des résultats encourageants [111].

CONCLUSION

Les deux dernières décennies ont vu l'essor d'une nouvelle approche thérapeutique des anomalies de la surface cornéenne. Le développement des techniques chirurgicales de transplantation visant à restaurer la population de CSL est le fruit d'une meilleure compréhension des mécanismes physiopathogéniques régissant le maintien de l'intégrité de la surface oculaire. La GMA représente une alternative prometteuse aux allogreffes dans certains cas peu sévères, et les progrès en matière de traitement immunosuppresseur devraient permettre prochainement d'étendre les indications de ces dernières, et d'en améliorer les résultats.

RÉFÉRENCES

1. Thoft RA, Friend J. Biochemical transformation of regenerating ocular surface epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1977;16:14-20.
2. Tseng SCG, Tsubota K. Important concepts for treating ocular surface and tear disorders. *Am J Ophthalmol*, 1997; 124:825-35.
3. Nelson JD, Havener VR, Cameron JD. Cellulose acetate impressions of the ocular surface: dry eye states. *Arch Ophthalmol*, 1983;101:1869-72.
4. Hanna C, O'Brien JE. Cell production and migration in the epithelial layer of

- the cornea. Arch Ophthalmol, 1960; 64:536-9.
5. Hanna C, Bicknell DS, O'Brien JE. Cell turnover in the adult human eye. Arch Ophthalmol, 1961;65:695-8.
 6. Tseng SCG, Hatchell D, Tierney N et al. Expression of specific keratin markers by rabbit corneal, conjunctival, and esophageal epithelium during vitamin A deficiency. J Cell Biol, 1984;99:2279-86.
 7. Strissel KJ, Rinehart WB, Fini ME. A corneal epithelial inhibitor of stromal cell collagenase synthesis identified as TGF-beta 2. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1995; 36: 151-62.
 8. Tseng SC. Regulation and clinical implications of corneal epithelial stem cells. Mol Biol, 1996;23(1):47-58.
 9. Golberg MF, Bron AJ. Limbal palisades of Vogt. Trans Am Ophthalmol Soc, 1982;80:155-71.
 10. Greiner JV, Covington HI, Allansmith MR. The human limbus. A scanning electron microscopy study. Arch Ophthalmol, 1979;97:1159-65.
 11. Bodaghi B, Paques M, Bertin V. Langerhans cells in human limbal conjunctiva. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1994; 35(suppl):167.
 12. Townsend WM. The limbal palisades of Vogt. Trans Am Ophthalmol Soc, 1991; 89:721-51.
 13. Pfister RR. Corneal stem cell disease: concepts, categorization, and treatment by auto-and homotransplantation of limbal stem cell. CLAO J, 1994;20: 64-72.
 14. Thoft RA, Wiley LA, Sundarraj N. The multipotential cells of the limbus. Eye, 1989;3:109-13.
 15. Tseng SCG. Concept and application of limbal stem cell. Eye, 1989;3:141-57.
 16. Hall Pa, Watt FM. Stem cells: the generation and maintenance of cellular diversity. Development, 1989;106: 619-33.
 17. Zieske JD. Perpetuation of stem cells in the eye. Eye, 1994;8:163-9.
 18. Schermer A, Galvin S, Sun TT. Differentiation-related expression of a major 64K corneal keratin *in vivo* and in culture suggests limbal location of corneal epithelial stem cells. J Cell Biol, 1986; 103:49-62.
 19. Kenyon KR. Anatomy and pathology of the ocular surface. In : Thoft RA, Friend J, eds. International ophthalmology clinics. Vol 19. The ocular surface. Boston: Little, Brown, 1979:3-36.
 20. Friend J, Kenyon KR. Physiology of the conjunctiva. In : Smolin G, Thoft RA, eds. The cornea, scientific foundations and clinical practice. 2nd ed. Boston: Little, Brown, 1987: 52.
 21. Danjo S, Friend J, Thoft RA. Conjunctival epithelium in healing of corneal epithelial wounds. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1987;28:1445-59.
 22. Friend J, Thoft RA. Functional competence of regenerating ocular surface epithelium. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1978;17:134-9.
 23. Lavker R. Clonal analysis of the *in vivo* differentiation potential of keratinocytes. Ocular surface and tear workshop, Bascom Palmer Eye Institute, Miami, Florida, April 20, 1996.
 24. Wei ZG, Wu RL, Lavker RM, Sun TT. In vitro growth and differentiation of rabbit bulbar, fornix and palpebral conjunctival epithelia: implications on conjunctival epithelial transdifferentiation and stem cells. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1993;34:1814-28.
 25. Bron AJ, Goldberg MF. Clinical features of human limbus, in Trevor-Roper PD (ed): The Cornea in Health and Disease: Vith Congress of the European Society of Ophthalmology. London, Grune and Stratton, 198:15-20.
 26. Kinoshita S, friend J, Thoft RA. Sex chromatin of donor corneal epithelium in rabbits. Inv Ophthalmol Vis Sci, 1981; 21:434-41.
 27. Buck RC. Cell migration in repair of mouse corneal epithelium. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1979;18:767-84.
 28. Shapiro MS, Friend J, Thoft RA. Corneal re-epithelialization from the conjunctiva. Invest Ophthalmol, 1981;21:135-42.
 29. Thoft RA, Friend J. The X,Y,Z hypothesis of corneal epithelial maintenance. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1983;24: 1442-3.
 30. Kruse FE, Chen JJY, Tsai RJF, Tseng SCG. Conjunctival transdifferentiation is due to incomplete removal of limbal basal epithelium. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1990;31:1903-13.
 31. Hirst LW, Fogle JA, Kenyon KR, Stark WJ. Corneal epithelial regeneration and adhesion following acid burns in the rhesus monkey. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1982;23:764-73.
 32. Kinoshita S, Friend J, Kiorpes TC, Thoft RA. Keratin-like proteins in corneal and conjunctival epithelium are different. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1983;24: 577-81.
 33. Tseng SCG, Hirst LW, Farazdaghi M, Green WR. Goblet cell density and vascularization during conjunctival transdifferentiation. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1984;25:1168-76.
 34. Zhu G, Ishizaki M, Hasaba T, et al. Expression of K12 keratin in alkali-burned rabbit corneas. Curr Eye Res, 1992; 33:143-52.
 35. Wiley L, Sunderraj N, Sun TT, Thoft RA. Regional heterogeneity in human corneal and limbal epithelia: an immunohistochemical evaluation. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1991;32:594-602.
 36. Davanger M, Evensen A. Role of the pericorneal peripapillary structure in renewal of corneal epithelium. Nature, 1971;229:560-1.
 37. Kaye DB. Epithelial response in penetrating keratoplasty. Am J Ophthalmol, 1980;89:381.
 38. Buck RC. Measurement of centripetal migration of normal corneal epithelial cell in the mouse. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1985;29:1296-9.
 39. Costarelli G, Cheng SZ, Dong G, Sun TT, Lavker RM. Existence of slow-cycling limbal epithelial basal cells that can be preferentially stimulated to proliferate : implications on epithelialstem cells. Cell, 1989;57:201-9.
 40. Zieske JD, Bukusoglu G, Yankauckas MA, Wasson ME, Keutmann HT. Alphaenolase is restricted to basal cells of stratified squamous epithelium. Dev Biol, 1992;33:143-52.
 41. Bukusoglu G, Zieske JD. Characterization of a monoclonal antibody that specifically binds basal epithelial cells in the limbal epithelium. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1988;29(suppl):92.
 42. Zieske JD, Bukusoglu G, Yankauckas MA. Characterization of a potential marker of corneal epithelial stem cells. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1992;33: 143-52.
 43. Kruse FE. Stem cells and corneal epithelial regeneration. Eye, 1994;8:170-83.
 44. Puangsricharern V, Scheffer CG, Tseng SC. Cytologic evidence of corneal diseases with limbal stem cell deficiency. Ophthalmology, 1995;102: 1476-85.
 45. Dua HS, Forrester JV. Clinical patterns of corneal wound healing. Am J Ophthalmol, 1990;110:646-56.
 46. Dua HS, Gomes JAP, Singh A. Corneal epithelial wound healing. Br J Ophthalmol, 1994;78:401-8.
 47. Dua HS. The conjunctiva in corneal epithelial wound healing. Br J Ophthalmol, 1998;82:1407-11.
 48. Tsubota K, Toda I, Saito H, Shinokazi N, Shimakazi J. Reconstruction of the cornea epithelium by limbal allograft transplantation for severe ocular surface disorders. Ophthalmology, 1995;102: 1486-96.
 49. Tsubota K, satake Y, Ohyama M, Toda I, Takano Y, Ono M, Shinozaki N, Shimazaki J. Surgical reconstruction of the ocular surface in advanced ocular cicatricial pemphigoid and Stevens-Johnson syndrome. Am J Ophthalmol, 1996; 122:38-52.
 50. Nishida K, Kinoshita S, Ohashi Y, Kuwayama Y, Yamamoto S. Ocular surface abnormalities in aniridia. Am J Ophthalmol, 1995;120:368-375.
 51. Chen JJ, Tseng SCG. Corneal epithelial wound healing in partial limbal deficiency. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1990; 31:1301-14.
 52. Huang AJW, Tseng SCG. Corneal epithelial wound healing in the absence of limbal epithelium. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1991;32:96-105.
 53. Kinoshita S, Kiorpes TC, Friend J, Thoft RA. Limbal epithelium in ocular surface

- wound healing. *Inv Ophthalmol Vis Sci*, 1982;23:73-80.
54. Saika S, Kobata S, Hashizume N, et al. Epithelial basement membrane in alkali-burned corneas in rats. *Immunohistochemical study*. *Cornea*, 1993;12:383-90.
 55. Geggel HS, Thoft RA, Friend J. Histology of human conjunctival transplantation. *Cornea*, 1984;3:11-5.
 56. Dua HS, Forrester JV, Cohen EJ, et al. Clinical observations on corneal epithelial cell migration in humans. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1993;34(suppl):1017.
 57. Thoft RA. Conjunctival transplantation. *Arch Ophthalmol*, 1977;95:1425-1427.
 58. Kenyon KR, Tseng SCG. Limbal autograft transplantation for ocular surface disorders. *Ophthalmology*, 1989;96(5):709-32.
 59. Thoft RA. Conjunctival transplantation as an alternative to keratoplasty. *Ophthalmology*, 1979;86:1084-92.
 60. Thoft RA. Chemical and thermal injury. *Int Ophthalmol Clin*, 1979;19:243-56.
 61. Holland JH, Schwartz GS. The evolution of epithelial transplantation for severe ocular surface disease and a proposed classification system. *Cornea*, 1996;15(6):549-56.
 62. Cheng JY, Tseng SCG. Corneal epithelial wound healing in partial limbal deficiency. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1990;31:1301-15.
 63. Cheng JY, Tseng SCG. Abnormal corneal wound healing in partial thickness removal of limbal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1991;32:96-105.
 64. Jenkins C, Thoft S, Liu C, Buckley R. Limbal transplantation in the management of chronic contact lens associated epitheliopathy. *Eye*, 1993;7:629-33.
 65. Tsai RJ, Sun TT, Tseng SCG. Comparison of limbal and conjunctival autograft transplantation in corneal surface reconstruction rabbits. *Ophthalmology*, 1990;97:446-55.
 66. Mashima Y, Yamada M, Yamada H, Tsunoda K, Arimodo M. Limbal autograft transplantations for chronic ocular surface failures. *Jpn J Clin Ophthalmol*, 1993;47:607-10.
 67. Copeland RA, Char DH. Limbal autograft reconstruction after conjunctival squamous cell carcinoma. *Am J Ophthalmol*, 1990;110(4):412-7.
 68. Adamis AP, Starck T, Kenyon KR. The management of pterygium. *Ophthalmol Clin North Am*, 1990;3:611-23.
 69. Guler M, Sobaci G, Ilker S et al. Limbal-conjunctival autograft transplantation in cases with recurrent pterygium. *Acta Ophthalmol*, 1994;72:721-7.
 70. Hara T, Shoji E, Obara Y. Pterygium surgery using the principle of contact inhibition and a limbal transplanted pedicle conjunctival strip. *Ophthalmic Surg*, 1994;24:25:95-103.
 71. Shimazaki J, Yang HY, tsubota K. Limbal autograft transplantation for recurrent and advanced pterygia. *Ophthalmic Surg Lasers*, 1996;27:917-23.
 72. Tan DTH, Ficker LA, Buckley RJ. Limbal transplantation. *Ophthalmology*, 1996;103:29-36.
 73. Prabbasawat P, Barton K, Burkett G, Tseng SC. Comparison of conjunctival autografts, amniotic membrane grafts, and primary closure for pterygium excision. *Ophthalmology*, 1997;104:974-85.
 74. Shimazaki J, Shinozaki N, Tsubota K. Transplantation of amniotic membrane and limbal autograft for patients with recurrent pterygium associated with symblepharon. *Br J Ophthalmol*, 1998;82:235-40.
 75. Brown SI, Wassermann HE, Dunn MW. Alkali burns of cornea. *Arch Ophthalmol*, 1969;82:91-4.
 76. Johnson-Wint B. Autocrine regulation of collagenase production by passaged corneal cells *in vitro*. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 28(suppl), 1987:230.
 77. Kenyon KR, Berman M, Rose J, Gaje J. Prevention of stromal ulceration in the alkali-burned rabbit cornea by glued-on contact lens. Evidence for the role of polymorphonuclear leukocytes in collagen degradation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1979;18:570-87.
 78. Teping C, Reim M. Tenoplasty as a new surgical principle in the early treatment of the most severe chemical eye burns. *Klin Monatsbl Augenheilkd*, 1989;194:1-5.
 79. Reim, Overkamping B, Kuckelkorn R. 2 years experience with Tenoplasty. *Ophthalmologie*, 1992;89:534-0.
 80. Kuckelkorn R, Schrage N, Rein M. Treatment of severe eye burns by tenoplasty (letter). *Lancet*, 1995;345:657-8.
 81. Reim M. A new treatment concept in severe caustic injuries and thermal burns of the eye. *Fortschr Ophthalmol*, 1989;86:722-6.
 82. Morgan S, Murray A. Limbal autotransplantation in the acute and chronic phases of severe chemical injuries. *Eye*, 1996;10:349-54.
 83. Wagoner MD. Chemical injuries of the eye: current concepts in pathophysiology and therapy. *Surv Ophthalmol*, 1997;41:275-313.
 84. Hughes WF. Alkali burns of the cornea. I. Review of the literature and summary of present knowledge. *Arch Ophthalmol*, 1946;35:423-6.
 85. Hughes WF. Alkali burns of the cornea. II. Clinical and pathologic course. *Arch Ophthalmol*, 1946;36:189-214.
 86. Thoft RA. Keratoepithelioplasty. *Am J Ophthalmol*, 1984;97:1-6.
 87. Turgeon PW, Nauheim RC, Roat MI, Stopak SS, Thoft RA. Indications for keratoepithelioplasty. *Arch Ophthalmol*, 1990;101:233-9.
 88. Kenyon KR, Rapoza PA. Limbal allograft transplantation for ocular surface disorders. *Ophthalmology*, 1995;102(suppl):101-2.
 89. Tsai RJF, Tseng SCG. Human allograft limbal transplantation for corneal surface reconstruction. *Cornea*, 1994;13:389-400.
 90. Coster DJ, Aggarwal RK, Williams KA. *Br J Ophthalmol*, 1995;79:977-82.
 91. Theng JTS, Tan DTH. Combined penetrating keratoplasty and limbal allograft transplantation for severe corneal burns. *Ophthalmic Surg Lasers*, 1997;28:765-8.
 92. Whitsett CF, Stulting RD. The distribution of HLA antigens on human corneal tissue. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1984;25:519-43.
 93. Tseng SCG, Tsai RJF. Limbal transplantation for ocular surface reconstruction: a review. *Fortschr Ophthalmol*, 1991;88:236-42.
 94. Kim JC, Tseng SCG. Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas. *Cornea*, 1995;14:473-84.
 95. Terranova VP, Lyall RM. Chemotaxis of human gingival epithelial cells to laminin: a mechanism for epithelial cell apical migration. *J Periodontol*, 1986;57:311-7.
 96. Khodadoust AA, Silverstein AM, Kenyon KR, Dowling JE. Adhesion of regenerating corneal epithelium: the role of basement membrane. *Am J Ophthalmol*, 1968;65:339-48.
 97. Sonnenberg A, Calafat J, Janssen H, et al. Integrin $\alpha 6/\beta 4$ complex is located in hemidesmosomes, suggesting a major role in epidermal cell-basement membrane adhesion. *J Cell Biol*, 1991;113:907-17.
 98. Guo M, Grinnell F. Basement membrane and human epidermal differentiation *in vitro*. *J Invest Dermatol*, 1989;93:372-8.
 99. Streuli CH, Bailey N, Bissel MJ. Control of mammary epithelial differentiation: basement membrane induces tissue-specific gene expression in the absence of cell-cell interaction and morphological polarity. *J Cell Biol*, 1991;115:1383-5.
 100. Kurpakus MA, Stock EL, Jones JCR. The role of the basement membrane in differential expression of keratin proteins in epithelial cells. *Dev Biol*, 1992;150:243-55.
 101. Boudreau N, Sympson CJ, Werb Z, Bissel MJ. Suppression of ICE and apoptosis in mammary epithelial cells by extracellular matrix. *Science*, 1995;267:891-3.
 102. Brindeau A. Création d'un vagin artificiel à l'aide des membranes ovulaires d'un œuf à terme. *Gynecol Obstet*, 1934;29:385.
 103. Stern M. The grafting of human preserved amniotic membrane to burned and ulcerated surfaces, substituting skin grafts. *JAMA*, 1916;60:973.
 104. Sabella N. Use of fetal membranes in skin grafting. *Med Rec NY*, 1913;83:478-80.
 105. Sheashore TH, Mac Naughton RJ and Talbert JR. Treatment of gastroschisis

- and omphalocele with biological dressings. *J Pediatr Surg*, 1975;10:9.
106. Tomokori K, Ohkura M, Kitano Y, Hori T, Nakajo T. Advantages and pitfalls of amnion inversion repair for the treatment of large unruptured omphalocele: results of 22 cases. *J pediatr Surg*, 1992;27:882-4.
107. De Rotth A. Plastic repair of conjunctival defects with fetal membrane. *Arch Ophthalmol*, 1940;23:522-5.
108. Lee S, Tseng SCG. Amniotic membrane transplantation for persistent epithelial defects with ulceration. *Am J Ophthalmol*, 1997;123:303-312.
109. Tseng SCG, Prabhasawat P, Lee S. Amniotic membrane transplantation for conjunctival surface reconstruction. *Am J Ophthalmol*, 1997;124:765-74.
110. Tseng SCG, Prabhasawat P, Barton K, Gray T, Meller D. Amniotic membrane transplantation with or without limbal allografts for corneal surface reconstruction in patients with limbal stem cell deficiency. *Arch Ophthalmol*, 1998;116:431-41.
111. Schein OD. The use of processed pericardial tissue in anterior ocular segment reconstruction. *Am J Ophthalmol*, 1998;125:549-52.