

Université de Montréal

**L'utilisation de cultures épithéliales autologues
sur les sites donneurs des grands brûlés**

par
George Emmanuel Salib, M.D.

Programme Sciences biomédicales

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de M. Sc.

en Sciences biomédicales

Août 2009

© George Emmanuel Salib, 2009

Université de Montréal

Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**L'utilisation de cultures épithéliales autologues
sur les sites donneurs des grands brûlés**

présenté par

George Emmanuel Salib, M. D.

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Michel Alain Danino, M. D., Ph. D.
Président-rapporteur

Alexis Armour, M. D., M. Sc.
Directeur de recherche

Andreas Nikolis, M. D., M. Sc.
Membre du jury

RÉSUMÉ

INTRODUCTION. La guérison rapide des sites donneurs des greffes cutanées favorise la survie des victimes de brûlures graves (>50 % de superficie brûlée). La mortalité élevée de ces patients est attribuable au fait que la superficie des brûlures excède celle de la peau saine. Des cultures épithéliales autologues (CEA) sont des feuillets de kératinocytes produits en culture à partir de la peau du patient. Cette étude a évalué l'effet des CEA sur l'épithélialisation des sites donneurs chez les grands brûlés.

MÉTHODES. Tous les patients recevant des CEA ont été prospectivement inclus. Les plaies des sites donneurs ont été recouvertes de CEA, sauf pour une région contrôle randomisée de 7 x 7 cm. Des biopsies faites sur la greffe de peau ont permis de contrôler la profondeur des plaies sur les sites donneurs. Il y avait deux types de contrôles, avec gaze non adhérente trempée dans le milieu de culture ou dans le salin. L'épithélialisation était quantifiée globalement (% d'épithélialisation par photographie) et histologiquement (par biopsie au poinçon) à simple insu. La guérison des zones de contrôle et CEA était comparée par analyse de variance et par le test de Student.

RÉSULTATS. Entre 2008 et 2009, 6 patients furent recrutés avec un total de 11 sites donneurs. Ces patients avaient en moyenne 43.5 ans, 56 % de superficie brûlée, 45% de brûlure pleine épaisseur, 66% avaient une brûlure d'inhalation, 75 jours de séjour. Il n'y a aucune corrélation entre le pourcentage d'épithélialisation et l'épaisseur du prélèvement des greffes (Pearson 0.19). Le score photographique est significativement influencé par le traitement (CEA vs Contrôle; $p = 0,039$) et par le jour postopératoire ($p < 0,001$). Le temps moyen pour atteindre un score photographique de

guérison pour les zones contrôles fut de 10.2 jours contre 8.6 jours pour le CEA ($p = 0,021$). À l'évaluation histologique, les sites donneurs traités par le milieu de culture ont évolué aussi favorablement que ceux traités par des feuillets de CEA.

CONCLUSION. L'utilisation de CEA sur les sites donneurs semble accélérer leur épithélialisation chez les victimes de brûlures graves. Cet effet est probablement le résultat d'une stimulation de la réépithélialisation innée de la plaie, plutôt que par une adhérence des feuillets de kératinocytes cultivés à la surface de la plaie.

MOTS CLÉS :

Brûlures

Chirurgie

Greffes cutanées

Sites donneurs

Cultures Épithéliales Autologues

ABSTRACT

RATIONALE: Prompt healing of split thickness skin graft donor sites is primordial to the survival of severely burned patients. Increased mortality of patients with >50 % TBSA is attributable to the limited availability of donor sites. This study evaluated the effect of Cultured Epithelial Autograft (CEA) application on skin graft donor site healing.

METHODS: All burn patients receiving CEA were prospectively included. Donor site wounds were covered with CEA except a randomly designated 7x7 cm control region. Autograft biopsies were taken to document graft harvest thickness. One half of the controls were covered with non-adherent gauze soaked in the culture media and the other controls only received a non-adherent gauze dressing. Epithelialization was objectively evaluated by scoring blinded photographs with an analogue scale. Punch biopsies of the donor sites were evaluated histologically. Repeated measures ANOVA and T-test were used.

RESULTS: Between 2008 and 2009, 6 patients were enrolled for a total of 11 donor sites. The patients averaged 43.5 years, 56 % TBSA, 45 % FT-TBSA, 66 % had inhalation injury and mean length of stay was 75 days. As expected, dermatome settings and autograft thickness measured by microscope did not correlate (Pearson 0.19). There was no correlation between the percentage of epithelialization of the punch biopsies of the donor sites and the thickness of the harvest. Photographic score was significantly influenced by its treatment CEA vs Control ($p=0.039$) and by postoperative day ($p<0.001$). Mean time to healing was 8.6 days for CEA compared to 10.2 days for

controls ($p=0.021$). Infection was noted on only one donor site. On histologic analysis, the control sites dressed with gauze soaked in the culture media healed as nicely and promptly as the CEA sheet treated region.

CONCLUSION: Use of CEA on donor sites appears to stimulate epithelialization. This effect is probably mediated by stimulation of local wound healing processes rather than by engraftment of keratinocytes from the CEA sheets.

KEY WORDS :

Burns

Surgery

Skin Grafts

Donor Sites

Cultured Epithelial Autografts

Table des matières

Résumé	iii
Abstract	v
Liste des tableaux	ix
Liste des figures	x
Liste des abréviations	xi
Introduction	1
1. Contexte épidémiologique des brûlures graves	1
2. Guérison des plaies chez les grands brûlés	2
2.1 Physiologie de guérison des brûlures, des sites donneurs et des greffes de peau	2
2.2 Brève revue des effets systémiques d'une brûlure grave	8
2.3 Traitement chirurgical des brûlures	11
2.3 Complications des brûlures	14
3. Culture cellulaire chez les grands brûlés	16
3.1 Utilisation de CEA	16
3.2 Brève revue historique	16
3.3 Différents produits de culture disponibles commercialement	17
3.4 Facteurs impactant la guérison des sites donneurs	18
Hypothèse et objectifs de l'étude	21
Article	22
Abstract	23
Introduction	24
Materials and Methods	25
Retrospective Audit	25
Prospective trial	26
CEA production	26
Harvest and Donor Site Dressing	26
Evaluation of Donor Site Epithelialization	27
Histological Evaluation	27

Photographic scoring.....	28
Statistics	28
Results.....	28
Retrospective Audit.....	28
Prospective Trial	29
Donor Site Harvest and Epithelialization.....	29
Discussion.....	31
Tables and Figures.....	36
References.....	47
Discussion	49
Conclusion	55
Bibliographie.....	57

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I	Classification des brûlures	5
Tableau II	Produits disponibles sur le marché	18

ARTICLE

Table I	Patient characteristics for retrospective audit (demographic).....	36
Table II	Patient characteristics for retrospective audit (surgical).....	37
Table III	Patient characteristics for prospective trial (demographics, injury and treatment).....	38
Table IV	Autograft harvest thickness	39
Table V	Epithelialization on punch biopsies	46

LISTE DES FIGURES

Figure 1	Effets systémique des brûlures	8
Figure 2	Contracture du membre supérieur.....	14
 ARTICLE		
Figure 1	40
Figure 2	41
Figure 3	42
Figure 4	43
Figure 5	44
Figure 6	45

LISTE DES ABRÉVIATIONS

CEA	<i>cultured epithelial autograft</i> cultures épithéliales autologues
CES	capacitance électrique de surface
COX	cyclooxygénase
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
FT-TBSA	<i>full thickness total burn surface area</i>
HMGB1	<i>high mobility group box 1</i>
KGF	<i>keratinocyte growth factor</i>
MIF	<i>macrophage migration inhibitory factor</i>
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
TBSA	<i>total burn surface area</i>
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>

Introduction

1. Contexte épidémiologique des brûlures graves

Selon le National Burn Repository [1], une base de données regroupant les centres de grands brûlés des Etats-Unis et du Canada, il y a eu 126 000 admissions pour brûlures entre 1995 et 2005. 62 % de ces visites étaient pour des brûlures de moins de 10 % de surface corporelle (% TBSA). Au Canada seulement, 235 personnes sont mortes par le feu en 2004 par rapport à 644 en 1979 [2]. Les blessures par inhalation sont la plus grande cause de mortalité chez les victimes de brûlures. Il faut ensuite ajouter la défaillance d'organes multiple et le sepsis [1]. Les raisons pour ce déclin en mortalité sont une meilleure prévention et une meilleure prise en charge des victimes. Notons les changements suivants : excision précoce des escarres [3-5], le traitement par greffes de peau, la supplémentation nutritionnelle agressive et l'introduction de nouvelles technologies.

Plusieurs facteurs augmentant le risque de blessure par brûlure ont été identifiés dans des études épidémiologiques dont [6]: l'ethnicité (non caucasien), revenu socio-économique faible, famille de grande taille, famille monoparentale, l'analphabétisme, niveau de scolarité maternel, le chômage, conditions de vie inférieures aux normes, être locataire, ne pas posséder de téléphone et la promiscuité. Le niveau d'accès à la sécurité, la capacité d'éviter les risques et finalement un accès aux soins variable peuvent rendre les blessures par brûlures plus ou moins fréquentes dans des sous groupes de la population [7]. La mortalité dépend de trois facteurs de risque principaux soit l'âge, le % TBSA et la présence d'une blessure d'inhalation[8].

Au-delà de la mortalité, les brûlures sont une source de morbidité importante. Avec la diminution de la mortalité même pour les brûlures sévères, est apparu un besoin de trouver d'autres marqueurs de succès plus nuancés [9]. Différentes échelles de qualité de vie ont été adaptées pour les victimes de brûlures. Le *Burn Specific Health Scale* [10] développé en 1982 a permis une évaluation à plus long terme des résultats des patients. Ce questionnaire a été amélioré depuis avec l'introduction d'une version abrégée de 40 questions dans neuf échelles : habiletés simples, fonction des mains, travail, sensibilité à la chaleur, traitements, affect, image corporelle, relations interpersonnelles et sexualité [11]. Une association de plus en plus forte entre la qualité des traitements pendant l'hospitalisation et les résultats pour les patients à long terme est acceptée et influence les traitements aigus. Par exemple, la douleur ressentie pendant l'hospitalisation prédit les répercussions psychologiques [12]. Ainsi, le programme de réhabilitation est débuté très tôt après l'admission des patients. Malgré la sévérité de leur blessure, la majorité des individus réussissent à mener une vie heureuse et productive lors d'étude de suivi au long à long terme [13].

2. Guérison des plaies chez les grands brûlés

2.1 Physiologie de guérison des brûlures, des sites donneurs et des greffes de peau

Afin de placer le contexte du projet, un bref rappel des phases de guérison de plaies, la classification des brûlures, le mécanisme de guérison des brûlures, et la physiologie des brûlures seront présentées.

Étapes de guérison

Phase inflammatoire. La première étape de la guérison d'une plaie est la mise en marche d'une cascade inflammatoire ayant pour but d'amorcer la guérison. Les plaquettes, qui sont les premières à faire leur apparition, relâchent des cytokines et des facteurs de croissance. Les enzymes COX1 et COX2 sont activées à l'intérieur des plaquettes et de l'endothélium produisant des prostaglandines médiateurs de chemotaxisme. Les neutrophiles jouent par la suite un rôle antibactérien par le biais de leurs enzymes protéolytiques. Après environ 48 h, les macrophages sont la lignée dominante dans la plaie. Le rôle des macrophages est double : nettoyage de la plaie via la phagocytose des bactéries et débris cellulaires et stimulation des fibroblastes (via PDGF et TGF-Beta) et des cellules épithéliales (via EGF) [14]. Si la phase d'inflammation est prolongée au-delà d'un certain seuil, la guérison est retardée. La migration et la prolifération cellulaire sont amoindries; un arrêt de la guérison en résulte éventuellement. Avec un prolongement marqué de l'inflammation, la composition de la matrice extracellulaire change et on peut déceler des zones de nécrose [15]. Les patients brûlés présentent un tableau inflammatoire systémique médié par des cytokines, incluant le TNF-alpha, provoquant une consommation des plaquettes, une vasoconstriction périphérique et une immunosuppression qui affecte le potentiel de guérison des plaies[14].

Phase proliférative. Les fibroblastes maintenant activés produisent les fibronectines et protéoglycans qui forment la matrice extracellulaire. Les kératinocytes sont stimulés à se multiplier surtout par KGF-2 à partir de la périphérie afin de recouvrir

la plaie. Les fibroblastes présents dans la plaie et stimulés par TGF-Beta se différencient en myofibroblastes permettant ainsi la contraction de la plaie. D'autres fibroblastes migrent de la région périphérique et produisent du collagène [14]. Lorsque préservés par le traumatisme, les follicules pileux sont un réservoir important de cellules souches contribuant à prolifération de kératinocytes et accélérant le processus de réépithélialisation.

Phase maturation. Une fois la réépithélialisation complétée en une couche continue, normalement vers le 8^e jour, la phase de maturation et remodelage débute. Cette phase peut se poursuivre pendant près d'un an et consiste en la réorganisation des fibres de collagène et d'élastine. Lors de la phase proliférative, le collagène et la matrice sont orientés aléatoirement. La maturation de la cicatrice passe par la réorganisation du collagène. Par le biais de métalloprotéinases, l'ancien collagène est remplacé par des fibrilles plus épaisses et mieux orientées. Le collagène de la cicatrice ne retrouvera jamais la même structure et la même force tensile que la peau normale [14, 16]. Plus la phase proliférative est longue plus il y a recrutement de fibroblastes activés par les facteurs de croissance. Ces fibroblastes activés sont incapables de dégrader le collagène, étape nécessaire à la maturation, ouvrant la voie aux cicatrices hypertrophiques et aux chéloïdes [17].

Classification des brûlures

La classification des brûlures est basée sur la profondeur et l'étendue de l'atteinte cutanée. Cette classification est utile car elle aide à conceptualiser la physiologie de la guérison de l'insulte et à déterminer le traitement approprié pour la brûlure [18].

Plusieurs méthodes d'évaluation des brûlures sont décrites, la plus répandue étant l'évaluation clinique [18]. Il faut noter que la technologie pour l'imager laser Doppler s'améliore constamment depuis 1975. Son usage comme adjoint à l'évaluation clinique ne saurait tarder puisque sa validité ne cesse de s'améliorer [19].

Tableau I
Classification des brûlures

Degré	Signes	Structures atteintes	Mécanisme de guérison
1 ^{er} degré	Érythème	Épiderme sans atteinte de la couche basale	Épidermolyse et régénération de kératinocytes
2 ^e degré superficiel	Phlyctènes, peau rouge humide, bon pouls capillaire	Épiderme jusqu'au derme papillaire	Migration de kératinocytes à partir des appendices cutanées. Durée 2-3 semaines
2 ^e degré profond	Phlyctènes, peau rosée et blanche, pouls capillaire lent ou absent	Épiderme jusqu'au derme réticulaire	Migration de kératinocytes à partir des appendices cutanés et contraction. Durée >3 semaines
3 ^e degré	Anesthésie, aspect de cuir, vaisseaux thrombosés, aucune vascularisation	Toutes les couches de la peau	Guérit par contraction sur plusieurs semaines

Mécanisme de guérison des brûlures

Selon la surface et la profondeur de l'atteinte, le mécanisme de réparation de la brûlure variera entre une réépithélialisation et une guérison par cicatrisation. Pour les brûlures superficielles, c'est-à-dire du 1^{er} degré, la guérison s'effectue simplement par la

différentiation de kératinocytes à partir de la couche basale. Cette différenciation est un processus normal du cycle de vie des kératinocytes. En quatre jours, ce processus est complété et ne nécessite aucun traitement sauf des crèmes hydratantes. Pour les brûlures du 2^e degré et pour les sites donneurs de greffes de peau, il existe un important réservoir sous-cutané de cellules souches dans les follicules pileux ayant un grand potentiel de multiplication [20]. La vitesse de réépithélialisation sera plus rapide si le nombre de sources de kératinocytes est élevé et si la distance entre elles est courte, comme par exemple les zones hirsutes. Les brûlures du 3^e degré s'étendent au-delà de la membrane basale et du derme; ainsi il n'y a aucune cellule épithéliale localement disponible pour la guérison. Ces blessures guérissent par migration et prolifération des cellules à partir de la périphérie selon le modèle classique de guérison des plaies, ainsi que par contraction de la plaie [21]. Ces plaies peuvent prendre des mois pour guérir spontanément. Les patients ayant de grandes surfaces atteintes sont ainsi à haut risque de mortalité par infection. Plus les surfaces brûlées sont importantes, plus la phase inflammatoire sera longue et plus la cicatrice sera mauvaise [22, 23].

Physiologie des greffes de peau

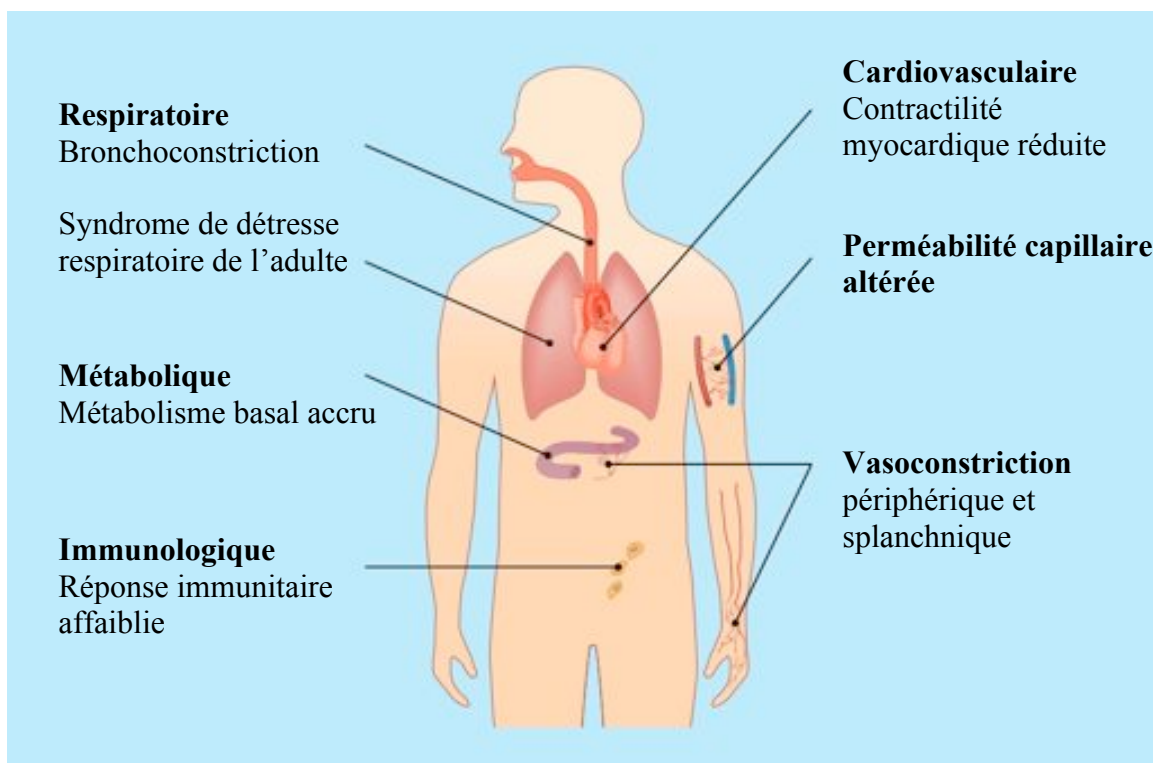
Les greffes de peau sont essentiellement une transplantation, car la peau est séparée de son apport vasculaire et doit le recréer dans son nouveau site. Ce phénomène est appelé *graft take* en anglais. Les greffes de peau d'épaisseurs partielles varient de 0,20 à 0,45 mm. Ces greffes comprennent tout l'épiderme et une épaisseur variable de derme. En contrepartie, les greffes de pleine épaisseur comprennent tout l'épiderme et le derme. Les greffes cutanées furent popularisées par des chirurgiens au début du siècle dernier [24-27]. La peau est prélevée à l'aide d'un dermatome mécanique, puis apposée

et fixée sur une plaie propre et fraîchement débridée. Un pansement compressif est ensuite laissé en place. Les phases classiques à la revascularisation d'une greffe sont : l'imbibition, l'inosculation, la néovascularisation et la maturation. Lorsqu'un greffon est déposé sur le site hôte, les capillaires dermiques s'imbibent passivement du sérum présent localement pour les 24 premières heures. À 48 heures, les capillaires du greffon sont vascularisés par l'inosculation entre les capillaires du greffon et du lit receveur qui s'alignent [28]. Dès 48 heures, il y a création d'un nouveau réseau capillaire provenant de la plaie vers l'intérieur de la greffe [29]. Cette néovascularisation permet la prise de la greffe et la microcirculation est rétablie vers le 5e jour [30]. La dernière étape est la maturation par contraction, effectuée par les myofibroblastes déjà présents dans la plaie [31]. Les sites donneurs guérissent par réépithélialisation tel que précédemment décrit puisqu'une épaisseur de derme et ses follicules pileux sont laissés en place [31].

2.2 Brève revue des effets systémiques d'une brûlure grave

Au-delà de la blessure cutanée, les brûlures graves entraînent des changements physiologiques importants. Tous les systèmes et organes sont atteints. La figure ci-dessous l'illustre bien. Plusieurs études démontrent que le meilleur traitement pour la réaction systémique post-brûlure est le débridement et la couverture précoce des plaies [3, 23]. Les principaux changements physiologiques seront résumés et présentés.

Figure 1. Effets systémiques des brûlures



Altération de la perméabilité membranaire

Les changements de perméabilité des membranes capillaires seraient la cause du choc initial post brûlure, tel qu'étudié et décrit depuis plusieurs années [32]. Le flux de fluide vers l'interstice est engendré par trois phénomènes principaux : une diminution de

la pression interstitielle, une diminution soudaine de la perméabilité membranaire aux protéines et un débalancement des forces oncotique et hydrostatique secondaires [33]. Il en résulte un œdème interstitiel important et diffus, causant une diminution du volume sanguin circulant et une hypoperfusion systémique, ce qui mandate une réanimation liquidienne agressive chez les grièvement brûlés. L'administration thérapeutique de grand volume liquidien n'est pas sans risque. En effet, jusqu'à 50 % de l'œdème se retrouve dans l'interstice de surfaces non brûlées, ce qui peut entraîner un syndrome de compartiment, par exemple des membres et de l'abdomen. Celui-ci causé par un œdème marqué de l'intestin qui est comprimé par la surface abdominale non extensible [34]. Dès l'admission, des escarrotomies sont faites pour décompresser les escarres circonférentiels des membres et du tronc avant leur évolution vers un syndrome de compartiment.

Effets cardiopresseurs

Des effets cardiopresseurs directs lors de la blessure sont une cause supplémentaire du choc chez les grands brûlés [35]. Plusieurs médiateurs précoces sont impliqués dont « p38 mitogen-activated protein kinase » et « nuclear factor kappa B ». Ces médiateurs induisent la sécrétion de TNF-alpha et cause une dysfonction myocardique post-brûlure. [36] Par contre la découverte de médiateurs tardifs de l'insulte cardiaque tels *high mobility group box 1* (HMGB1) and *macrophage migration inhibitory factor* (MIF)[37] ouvre la porte vers de nouvelles avenues thérapeutiques du choc [38]. Par contre, dans la pratique courante, seule la réanimation liquidienne est utilisée pour contrer la dépression myocardique [39].

Hypermétabolisme

Une brûlure est un traumatisme intense pour la physiologie humaine qui enclenche une série de mécanismes compensateurs. Un état dit hyperdynamique augmente le métabolisme de base proportionnellement à la sévérité de la brûlure. [40-43] L'hypothalamus augmente le point de normothermie [44]. Cet état de stress induit un état de catabolisme, avec une perte nette de protéines [42]. Cette perte de protéines est exacerbée par une résistance périphérique à l'insuline, effet diminué par l'administration exogène d'insuline et de metformin [45-49]. Des études sur l'oxandrolone, un analogue synthétique de la testostérone, démontre une réduction du catabolisme et une réhabilitation plus rapide [15, 50-52].

Réponse immunologique

Les brûlures graves sont souvent compliquées d'infections et de sepsis. L'insulte physiologique est telle que de multiples cytokines et médiateurs pro-inflammatoires sont relâchés dans la circulation. Une fois la phase aiguë passée, ce sont les médiateurs anti-inflammatoires qui sont dominants, entraînant alors un état d'immunosuppression. Il est clair que la barrière physique est atteinte par la blessure cutanée. La fonction des phagocytes, des neutrophiles et des lymphocytes est également altérée. Le patient est alors plus vulnérable aux infections opportunistes. Comme traitement, le retrait du stimulus inflammatoire par l'excision des escarres permet une récupération de l'immunocompétence et la prévention du sepsis [53]. La nutrition entérale précoce a été démontrée efficace pour lutter contre le sepsis causé par des entérobactéries [54]. L'immunomodulation par supplémentation entérale de glutamate est une autre intervention facile et souhaitable [55].

2.3 Traitement chirurgical des brûlures

Le changement important depuis l'introduction de la réanimation chez la prise en charge des grands brûlés est l'excision rapide des brûlures [4]. Le débridement des tissus dévitalisés et la couverture hâtive des brûlures améliore la survie, diminue les infections et raccourci le temps d'hospitalisation [3-5]. Autrefois, les brûlures étaient laissées en place jusqu'à ce que les bactéries provoquent une séparation de l'escarre et les surfaces greffées une fois recouvertes de tissus de granulation. Ce processus prenait des mois et les patients souffraient de complications systémiques et d'un taux d'échec élevé de prise de greffe.

De nos jours, il est accepté que le facteur primordial pour le développement de cicatrices hypertrophiques est le délai de traitement, surtout après 21 jours [22]. Le défi pour le chirurgien est de déterminer quelles brûlures vont se réépithélialiser spontanément et lesquelles vont nécessiter une intervention chirurgicale pour favoriser la guérison. Cette tâche est compliquée par le processus dynamique des brûlures, divisé conceptuellement en 3 zones d'hyperémie, de stase et de coagulation. Il est cliniquement plus facile d'identifier les brûlures superficielles du 1^{er} degré et les très profondes du 3^e. La difficulté réside dans la prise en charge de brûlures dites intermédiaires. L'étalon standard actuel est l'évaluation par un chirurgien expérimenté dans la prise en charge des brûlures mais le taux de validité rapporté dans la littérature n'est qu'entre 50-70% [56]. Les outils complémentaires à l'évaluation clinique des brûlures sont en développement mais pas encore au point [18]. Il est donc courant de nos jours

d'observer de façon serrée les brûlures intermédiaires jusqu'au jour 7 à 10 post brûlure avant de se prononcer sur un traitement chirurgical.

Une fois déterminées les brûlures à opérer, l'élaboration d'une stratégie personnalisée débute. La planification inclut le nombre de chirurgies, leur séquence, l'utilisation de tissus de culture, le recours à la banque de tissus pour des homogreffes et l'analyse des sites donneurs des greffes de peau utilisables. Le traitement chirurgical débute avec le débridement des brûlures par une excision tangentielle en salle d'opération [57].

L'excision tangentielle s'effectue dans le tissu sous-cutané ou dans le fascia musculaire. Peu importe le niveau d'excision, il est primordial de débrider tous les tissus dévitalisés. L'excision jusqu'au fascia suit un plan anatomique et est plus rapide mais laisse d'importantes déformations à la silhouette. Si possible le débridement est fait sous garrot afin de diminuer les pertes sanguines. D'autres manœuvres importantes sont la normothermie du malade, l'infiltration des tissus avec une solution d'adrénaline diluée et une bonne communication avec l'équipe anesthésique pour gérer les produits sanguins.

Une fois le débridement et l'hémostase terminée la plaie est fermée soit par un pansement temporaire si la surface est grande ou par des greffes de peau [57]. Ces patients sont immunosupprimés de sorte que des greffes de peau cadavérique peuvent être placées temporairement. Elles sont remplacées à mesure que les sites donneurs des greffes de peau guérissent et puissent être ainsi réutilisés pour réprélever des greffes de peau (autogreffes). Les greffes de peau introduites dans un « mesh graft » à un ratio de

1.5 :1 permettent d'augmenter la surface couverte et de réduire l'accumulation de liquides sous les greffes. Le désavantage principal est la persistance d'un treillis visible une fois la cicatrisation complétée. Cette technique n'est pas utilisée sur les zones sensibles tel que visage, cou, mains et pieds. Pour ces endroits, des greffes en feuillets sont appliquées selon le concept de zones esthétiques [58].

2.4 Complications des brûlures

La contracture cicatricielle est un dérivé du processus de cicatrisation et de contraction des plaies. Les myofibroblastes, des fibroblastes spécialisés dans la contraction, continuent de produire du collagène selon les lignes de stress. Ce phénomène induit des difformités chroniques telles la perte de l'extension du cou, l'éversion des lèvres ou des paupières. Au niveau du membre, la contracture cicatricielle atteint grandement leur fonction et la qualité de vie des patients. Un programme de réhabilitation incluant l'utilisation d'orthèses de positionnement et de vêtements compressifs vise à prévenir ce type de complications. Les physiothérapeutes et ergothérapeutes interviennent tôt et contribuent au succès des traitements [9].



Figure 2. Contracture du membre supérieur

Thomson A, Miles A, *Manual of Surgery*, 1921, Fig 63 (public domain)

Une cicatrice hypertrophique se définit comme une cicatrice plus surélevée, épaisse, dure, érythémateuse et/ou prurigineuse que la normale. Il faut la distinguer des

chéloïdes qui se caractérisent par une cicatrisation débordant de la bordure de la plaie, qui peuvent débiter sans chirurgie ou trauma local et qui prédominent chez les personnes d'origine africaine. Malgré certaines similitudes, les cicatrices hypertrophiques et les chéloïdes se distinguent par leurs caractéristiques cliniques et histopathologiques [59]. La physiopathologie de ce phénomène complexe et unique à l'humain est indéterminée en partie à cause de l'absence d'un modèle expérimental fiable [60]. Les facteurs de risque pour le développement de cicatrices hypertrophiques sont de mieux en mieux définis [60]. Le facteur le plus important est le temps requis pour la guérison. Au-delà de 21 jours, le taux de cicatrices hypertrophiques passe à 78 % [22].

L'infection bactérienne est, malgré l'avenue des antibiotiques et l'excision précoce des escarres, une problématique pour les plaies de brûlure. Les zones nécrotiques hypoperfusées sont un milieu de culture idéal pour les bactéries. On estime que 75 % de la mortalité chez les brûlés est reliée aux infections [61]. Une certaine controverse existe sur la méthodologie pour différencier la colonisation et la surinfection des plaies [62]. Des études classiques ont démontré qu'une charge bactérienne de $>10^5$ /g produit des effets délétères surtout au niveau de la survie des greffes cutanées. Pour les brûlés graves de plus de 50%, l'infection et la colonisation bactérienne des plaies deviennent problématiques. Plus les surfaces à traiter sont grandes, plus le risque d'échec et de surinfection est grand, entraînant un délai additionnel pour la fermeture. Les principes de prise en charge des infections sont l'utilisation d'antiseptiques topiques

et systémiques, des soins de plaies incluant un débridement des tissus non viables, une supplémentation nutritionnelle adéquate et une immunomodulation [55, 63].

3. Culture cellulaire chez les grands brûlés

3.1 Utilisation de CEA

L'avenue des CEA chez les grands brûlés a ouvert la porte à une couverture plus étendue de brûlures [64-68]. Par contre, avec l'expérience, on remarque que la prise des CEA sur les plaies de pleine épaisseur est inconstante [69, 70]. Leur succès est grandement dépendant de la qualité de la préparation de la plaie : elle doit être bien débridée et libre de colonisation bactérienne [68]. Même une fois prise, les greffes demeurent fragiles et forment des phlyctènes, car elles ne permettent pas la guérison avec une membrane basale adhérente [71-73]. C'est ce qui a motivé le développement de produits bilaminaires comprenant un équivalent dermique [74-76]. Un centre australien promeut l'utilisation d'une suspension de CEA pré-confluentes appliquée avec un vaporisateur, par opposition aux feuillets de CEA qui sont livrés sur des gazes. Une stratégie alternative est d'utiliser les CEA sur les plaies d'épaisseur partielle et les sites donneurs [77]. Puisque ce sont des blessures partielles de la peau, les kératinocytes peuvent s'ancrer et rétablissent rapidement la barrière cutanée.

3.2 Brève revue historique

La culture cellulaire est une technique qui progresse depuis plusieurs décennies. En 1975, Rheinwald et Green sont les premiers à décrire les conditions optimales pour la culture sériée de kératinocytes [78, 79]. La présence de fibroblastes murins irradiés

comme couche nourrice et l'ajout de facteurs de croissance augmentent le rendement [80, 81]. En sélectionnant les kératinocytes capables de mieux se différencier, le rendement des cultures s'est amélioré tout en diminuant la contamination par les fibroblastes [74, 82-85]. Ultimement, pour éviter la transmission de maladies, on aboutit à des techniques de cultures sans utilisation de cellules nourrices animales ou humaines [86, 87].

3.3 Différents produits de culture disponibles commercialement

Depuis 1981, alors que la *cultured epithelial autograft* (CEA) chez les grands brûlés a été utilisée pour la première fois [70], une plus grande variété de produits de culture cellulaire est disponible [57, 88-92].

Vous retrouverez au tableau II une liste non exhaustive de solutions de remplacement tissulaire pour la couverture de plaies.

Tableau II
Produits disponible sur le marché

<p><i>Produits de remplacement de l'épiderme</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Des keratinocytes autologues livrés sur la plaie selon un des moyens suivants : • Une feuille de keratinocytes confluents <i>Epicel</i> (Genzyme Biosurgery) ou CEA (Laboratoire d'Organogénèse Expérimentale) • Ce produit origine de la méthodologie de culture cellulaire, une biopsie du patient est cultivée en feuillet et détaché avec une enzyme avant d'être appliquée au patient [84, 93]. • <i>Myskin</i> (CellTran) est un produit de cellules pré confluente livré sur un pansement de polymères [94, 95]. • <i>CellSpray</i> (Clinical Cell Culture) est un pulvérisateur de cellules préconfluentes dans une suspension pour le transport. Les cellules sont pulvérisée directement sur la plaie [96].
<p><i>Produits de remplacement du derme</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Peau cadavérique : la peau provenant de banque de tissus est appliqué sur la plaie pour un recouvrement temporaire • <i>Integra</i> (Integra LifeSciences) est une matrice collagène bovine et de chondroïtine de requin recouvert d'une mince couche de silastic [97, 98]. Une fois la matrice incorporée par les cellules du patient, le silicone est retiré et une greffe de peau mince est appliquée. • <i>Alloderm</i> (Lifecell) est du derme humain allogénique cryopréservé qui sera recouvert par une greffe de peau mince [99, 100]. • <i>Dermagraft</i> (Advanced Biohealing) est un équivalent dermique allogénique cryopréservé produit à partir de fibroblastes humain [101]. • <i>Transcyte</i> (Advanced Biohealing) est un produit de remplacement temporaire contenant du derme humain allogénique cyopréservé sur du nylon [102] . • <i>Permacol</i> (Conviden) est un équivalent dermique d'origine porcine [103].
<p><i>Produits de remplacement complet de la peau</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Apligraf</i> (Organogenesis) est un produit qui combine des keratinocytes allogénique cultivés sur une couche de collagène bovin [104]. • <i>Orcel</i> (Ortec International) est un produit cryopréservé de co-culture de keratinocytes et fibrinoblastes allogéniques et sur une matrice de collagene bovin. Son utilisation est limité comme à un recouvrement temporaire des plaies [105]. • <i>Cininnati Skin Substitute</i> ou <i>Permaderm</i> (Cambrex) est un produit bilaminaire de keratinocytes et de fibroblastes autologues organisé sur une matrice de collagen bovin. Ce produit ce veut un remplacement permanent de la peau [75].

3.4 Facteurs impactant la guérison des sites donneurs

La guérison rapide des sites donneurs des greffes de peau est nécessaire pour permettre un recouvrement des plaies chez les grands brûlés. Les facteurs influençant la guérison par réépithélialisation des sites donneurs sont surtout intrinsèques au patient, de même, à un degré moindre, qu'à la technique de prélèvement et au pansement appliqué.

Le premier facteur intrinsèque aux patients est l'âge. La peau amincie par la vieillesse est à risque d'un prélèvement trop profond non intentionnel du dermatome. La pilosité et les annexes et, par conséquent, les réservoirs de kératinocytes sont moindres, surtout chez les patients atteints d'insuffisance vasculaire périphérique. De plus, avec le vieillissement, le potentiel de multiplication cellulaire est diminué [82, 106].

L'état nutritionnel des patients est un autre facteur primordial. Il est maintenant pratique courante de supporter de routine les besoins en calories et protéines. Certains centres préconisent l'utilisation d'hormones anabolisantes pour renverser le catabolisme intense des grands brûlés [107].

Certaines maladies pré-existantes vont nuire à la guérison des sites donneurs. Le diabète induit plusieurs changements néfastes dont une atteinte macro et microvasculaire diminuant l'apport des nutriments et de l'oxygène des plaies [108]. Les diabétiques sont également plus à risque d'infections. Les patients atteints de cancer métastatique sont accablés par la demande métabolique néoplasique et ne peuvent guérir leur plaies adéquatement. Il faut également compter les agents antinéoplasiques qui ont des effets toxiques directs sur la réparation tissulaire. Au niveau des médicaments, retenons surtout les stéroïdes qui produisent une baisse de synthèse de collagène dans les tissus.

Les infections locales et systémiques entraînent un retard dans la guérison des sites donneurs. Une charge bactérienne trop forte inhibe la guérison [109]. De plus, un état inflammatoire systémique change la biologie locale au niveau de la plaie et entrave également la guérison [110].

Les pansements les plus utilisés sur les sites donneurs sont la sulfadiazine d'argent à 1 %, la gaze imprégnée de gelée de paraffine, les alginates, les pansements hydrocolloïdes, les pansements en film et les pansements antibiotiques notamment l'argent [111, 112]. Cette liste n'est pas exhaustive mais tous ont comme buts le confort du patient et la protection de la plaie contre les pertes de chaleur et d'humidité et contre la croissance de bactéries à la surface.

Hypothèse et objectifs de l'étude

L'excès de mortalité chez les patients atteints à plus de 50 % de surface corporelle est relié au manque de peau saine pour recouvrir de façon définitive les plaies. Ainsi, les patients doivent subir des prélèvements sériés des mêmes sites donneurs. Au Centre des grands brûlés de l'Hôtel-Dieu du CHUM, on utilise des feuillets de CEA sur les sites donneurs des patients grièvement atteints depuis plus de 10 ans. Ces feuillets de CEA sont préparés et achetés du Laboratoire d'Organogénèse Expérimentale situé à Québec.

Le but de cette approche est de diminuer au minimum l'intervalle entre les sessions de débridement des brûlures et des greffes de peau, ainsi que la durée nécessaire à la couverture totale des plaies. Par extension les complications, infectieuses et autres, seront réduites entraînant une diminution de la durée de séjour et de la mortalité de nos patients.

Cette recherche revoit d'abord l'expérience de notre centre. Ensuite, un projet randomisé prospectif fut élaboré afin de valider l'effet des CEA sur les sites donneurs de patients grièvement brûlés.

Plus spécifiquement, nous avons cherché à démontrer objectivement que la guérison des sites donneurs était plus rapide et que le temps nécessaire entre les nouveaux prélèvements moindre.

À notre connaissance, aucune étude prospective répartie au hasard n'a démontrée l'efficacité des CEA sur les sites donneurs de grands brûlés.

Article

Use of Cultured Epithelial Autograft on Donor Sites of Burn Patients

Author : George Emmanuel SALIB

Co-Author : Alexis D ARMOUR

Centre d'expertise pour victimes de brûlures graves de l'Ouest du Quebec

Hôtel-Dieu du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal

3840, rue Saint-Urbain

Montreal, QC, Canada

H2W 1T8

514-890-8121

ABSTRACT

Prompt healing of donor sites is critical for the survival of severely burned patients. Increased mortality of patients with > 50 % TBSA is attributable to the small surface of donor sites. This study evaluated the effect of Cultured Epithelial Autograft (CEA) sheet application to skin graft donor sites. All patients receiving CEA were prospectively included. Each donor site wound was covered with CEA, except for a randomly designated 7 x 7 cm control region, and autograft biopsies were taken to document graft harvest thickness. One half of the controls were covered with paraffin gauze soaked in the culture media, while the remaining controls received a paraffin gauze dressing. Epithelialization was objectively evaluated by scoring blinded photographs using an analogue scale. Punch biopsies of the donor sites were evaluated histologically. Between 2008 and 2009, 6 patients were enrolled, resulting in a total of 11 donor sites. The patients averaged 43.5 years of age, had 56 % TBSA, 45 % FT-TBSA; 66 % had inhalation injury and mean length of stay was 75 days. As expected, dermatome settings and autograft thickness, measured microscopically, were not correlated (Pearson 0.19). There was no correlation between the percentage of epithelialization of the punch biopsies of the donor sites and the thickness of the harvest. Photographic score was significantly impacted by treatment (CEA vs control; $P=0.039$) and by postoperative day ($P<0.001$). Mean time to healing was 8.6 days for CEA compared to 10.2 days for controls ($P<0.05$). Infection was noted at only one donor site. On histological analysis, the control sites — dressed with gauze soaked in the culture media — healed as well and as quickly as the CEA sheet-treated region. Use of CEA on donor sites appears to stimulate epithelialization. This effect is likely mediated by

stimulation of local wound healing processes rather than by engraftment of keratinocytes from the CEA sheets.

INTRODUCTION

Once burn coverage is over 50 % of total skin surface area, mortality of burn victims increases dramatically [1]. This is, in part, attributable to the reduction in skin graft donor site surface area as total burn surface area (TBSA) increases. Rapid wound closure is necessary to reduce excess burn injury-related mortality and morbidity [2-4]. In this context, prompt reepithelialization of donor sites is crucial to permit reharvesting from donor sites and expedite burn wound closure. Wound dressing is an important aspect of donor site healing, and an ideal donor site dressing prevents infection, promotes reepithelialization and is painless [5]. Donor site dressings can be generally classified as non-occlusive, occlusive (moist) or biologic. Popular dressings currently in use are impregnated gauze, alginates and hydrocolloids [6], although biologic dressings, i.e. dressings comprised of tissue of human or animal origin, are gaining popularity as commercial products become more readily available.

Since the first use of cultured epithelial autografts (CEA) by O'Connor in 1981 [7], skin replacement technology has improved significantly [8], particularly in the development of bilayered skin substitutes with properties more closely resembling those of normal skin. However, poor take and persistent fragility of CEA used to cover burn wounds, in addition to high cost, has deterred its use [9-11]. Nevertheless, our unit has successfully used CEA as a biologic dressing for donor sites of extensively burned

patients for over 10 years. Our hypothesis is that CEA promotes reepithelialization of donor sites and permits earlier reharvesting. This study was designed to test this hypothesis.

MATERIALS AND METHODS

Retrospective Audit

Medical records for 242 acute burn patients admitted between January 2002 and October 2004 were reviewed. Selected patients underwent a skin biopsy soon after admission for preparation of CEA. Demographic and outcome data were obtained retrospectively from patient charts and from *Université Laval's Laboratoire d'Organogénèse Expérimentale* (LOEX, Quebec City, Quebec, Canada), the laboratory where CEA is produced for patients treated at our institution. Age, TBSA and inhalational injury status were noted for CEA-treated patients and compared with that of non-CEA-treated patients, using ANOVA. Surgical practice involving CEA in our burn center was analyzed with respect to date of biopsy, date of first CEA application and time to donor site reharvest. Matched comparisons were not possible due to a lack of donor site reharvesting in non-CEA-treated patients.

Prospective Trial

Subjects

Prospective recruitment began in April 2008, at the *Centre des grands brûlés du CHUM* (Montreal, Quebec, Canada). Inclusion criteria for patients in the study consisted of 1) consent, 2) patient age over 18 years, 3) deep burns requiring surgery and 4) a treatment plan that included use of CEA. Patients were all admitted to the same burn unit at the *Centre des grands brûlés du CHUM*. Initial resuscitation and stabilization was performed by a multidisciplinary team comprised of medical critical care specialists and plastic surgeons, according to established institutional protocols. Once patients were resuscitated and stabilized, patients were brought to the operating room for early wound excision, and wound coverage with autografts or cadaveric allografts, depending on donor site availability. Experienced burn care nurses changed dressings and carried out routine weekly wound infection monitoring via sample culture. Institutional ethics committee approval was obtained for all aspects of this study.

CEA Production

Biopsies taken for CEA preparation were sent to an external laboratory, LOEX (Quebec City, Quebec, Canada), where CEA production commenced. The methods used for CEA production have been described previously [12].

Harvest and Donor Site Dressing

Split thickness skin graft (STSG) donor sites were preoperatively randomized to include a 7 x 7 cm control region at either the proximal or distal end. The thickness

setting of the dermatome was recorded. After infiltration with an adrenaline solution, the donor sites were harvested using constant pressure. The harvested tissue was then punch biopsied 5 cm from from each of the proximal and distal ends to control for graft thickness. CEAs on Adaptic (Systagenix Wound Management, North Yorkshire, United Kingdom) backing were applied to all donor sites, leaving open the control region at either the proximal or distal end of each site (Figure 2). For 3 patients, the control region was dressed with Adaptic backing that was soaked in the culture media from the delivery petri dish. For the other 3 patients, the Adaptic was placed directly on the control region without soaking. All Adaptic was then glued and the wound was further dressed with moist, followed by dry, dressings as per unit protocol.

Evaluation of Donor Site Epithelialization

At the time of the first dressing change, at approximately day 6, the Adaptic backing was gently peeled from the donor site. Photographs were taken at the time of the first dressing change and repeated every 2 days until epithelialization. On one occasion per patient, the CEA and control regions of the donor site were punch biopsied under local analgesia (1 % xylocaine). The effect of one injection of less than 1 cc of 1% xylocaine was considered to be minimal.

Histological Evaluation

Hematoxylin and eosin stained slides of the autografts and punch biopsies were evaluated via light microscopy. The thickness of the autograft was measured using

AxioVision software (Carl Zeiss Canada, Ltd., Toronto, Canada). The donor site biopsies were evaluated for percentage of epithelium present at the surface of the biopsy.

Photographic Scoring

Photographs at the time of the first dressing change were displayed on a black background and randomized by postoperative day and treatment. The photographs were scored by experienced burn surgeons, who were blinded to post-operative day and treatment, on an analogue scale of 0-100 mm. Zero represents no epithelialization and one hundred represents a completely healed site.

Statistics

Statistical analysis was completed using SPSS software. The data were analyzed by multiple-factor repeated-measures ANOVA. Treatment, rater, time of measurement were factors. Means, standard error and correlations were calculated and reported.

RESULTS

Retrospective Audit

The medical records for 242 acute burn patients admitted between January 2002 and October 2004 were reviewed. Skin biopsies for CEA were collected from 36 acute burn patients. Eight of these patients died before receiving CEA, leaving 28 patients, or 12 % of all admissions having received CEA. Means (\pm SEM) for age and %TBSA, as well as inhalational injury status and burn mechanism for both CEA-treated and non-CEA-treated patients are shown in Table I. Patients who received CEA were

significantly older, were more severely burned (had greater TBSA) and were more frequently injured from smoke inhalation. Despite this, CEA-grafted donor sites healed quickly, enabling early and multiple reharvesting of the same sites (Table II). Matched comparisons were not possible due to a lack of donor site reharvesting in non-CEA-treated patients.

Prospective Trial

Patient Characteristics

From January 2008 to December 2008, 14 patients had greater than 50 % TBSA, out of a total of 147 burn patients admitted. Six patients were recruited in the prospective trial, for a total of 11 donor sites. The mean age of patients was 43.5 years (range 26-81 years), and patients had an average of 56 % TBSA, 45 % full thickness burns (FT-TBSA) and a 75-day hospital stay. Sixty-six percent of patients also suffered inhalation injury. There was no mortality among CEA-treated patients. Indications for use of CEA on autograft donor sites included extensive burns requiring multiple reharvests from donor sites, advanced age, comorbidities that affect wound healing, or planned harvest of thick autografts. Biopsies for skin culture were taken promptly, within the first 24 hours after admission. The CEA sheets were ready for use in an average of 16.8 days (Table III).

Donor Site Harvest and Epithelialization

As expected, dermatome settings and autograft thickness, measured microscopically, did not correlate (Pearson 0.19). Autografts were harvested at the same depth for both CEA and control sites; 356 μm and 339 μm , respectively ($P=0.84$) and

proximal and distal region had similar depth (Table IV). Randomization was considered adequate. There was no correlation between the percentage of epithelialization at the donor sites, calculated from punch biopsies, and the thickness of the harvested layer. Repeated measures ANOVA analysis of photograph evaluation scores, relative to treatment (CEA vs control) and postoperative day was performed. No interaction between the variables was noted and scoring was consistent between evaluators. Photographic score improved with CEA treatment compared to control ($P<0.05$, Figure 1) and with increased time after autograft placement ($P<0.001$, data not shown), highlighting the benefit of CEA-based treatment in the promotion of rapid wound healing.

The average time to autograft harvest site healing, defined as a photographic score of >90 , was calculated. There was a statistically significant difference in healing time between CEA and control regions (8.6 vs 10.2 days, respectively, $P<0.05$; Figure 1). Figures 2 and 3 show autograft harvest sites upon change of wound dressing on postoperative day 6. In each photograph, the control region on the left appears erythematous and at an earlier stage of healing, whereas the CEA region on the right appears well healed.

For 6 donor sites, the harvest site control region was dressed with Adaptic backing soaked in the culture media used for CEA delivery. For the remaining 5 donor sites, paraffin gauze was dipped in normal saline prior to dressing the control region. Comparing donor sites with these two types of controls, significant differences in healing time were noted (Figure 4). By separating the 2 groups of controls, the effect of

culture media on the dressing becomes apparent. On histological analysis, the control sites dressed with Adaptic backing that was soaked in culture media healed as well and as quickly as the CEA-treated region (Figure 5). A trend toward better epithelialization is perceptible with CEA when comparing to the saline only control (not soaked in media), as 70 % of the CEA-treated surface was covered by epithelium, compared with only 28 % ($P=0.080$, Table V).

Histological staining of postoperative donor site punch biopsies is shown in Figure 3 (lower panels). Patients 2 and 3 had their donor sites biopsied through the Adaptic backing of the CEA. On microscopic evaluation, it was evident that the biopsy procedure sheared the epithelium from the surface of the biopsy. For the remaining biopsies, the backing was peeled off carefully, using normal saline irrigation, thereby leaving the epithelial layer intact.

Infection occurred at only one donor site; a *Pseudomonas aeruginosa* infection was confirmed by culture. This donor site demonstrated poor healing upon histological analysis, as there were no signs of reepithelialization on either CEA or control biopsies (Figure 6). This deficit in healing was also observed on photograph evaluation.

DISCUSSION

The retrospective audit returned 28 acute burn patients with donor sites that were grafted with CEA. Their sizeable burns were completely covered with sheet autografts as per institutional protocols. Use of sheet autografts provides superior aesthetic results and reduces long term burn wound complications due to contraction of scars [13, 14].

Following this retrospective audit, the unit's burn surgeons reviewed clinical indications for CEA use. Retained indications included a predicted need to re-harvest donor sites in view of large burn size, doubt regarding timely donor site healing and the need to harvest thick autograft.

However by its retrospective nature, the audit could not argue convincingly that healing of donor sites covered with CEA was accelerated nor could it quantify the effect of this treatment. This led to the design of the prospective study to test our hypothesis that CEA coverage of donor sites accelerates reepithelialization and permits faster donor site reharvesting.

This prospective study used randomly assigned experimental and control treatments, as well as evaluators who were blinded to the treatments used on each sample. Although methods to minimize bias are not always employed in studies focused on wound healing and epithelialization [15, 16], our study was designed to minimize bias wherever possible. Photographic evaluation combined with histology allowed us to evaluate both global and microscopic reepithelialization, and randomization effectively distributed samples from donor sites of different depths between the two treatment groups.

Other studies have used subjective, direct evaluation of wounds, and in some reports, epithelialization is considered complete when the dressing can be peeled off without causing bleeding [17-19]. We feel that this is an important source of bias, as personnel are not blinded to dressing type. In still other studies, surface electrical capacitance (SEC) is used [20]. To conduct a study using SEC in a clinical setting is challenging, as temperature and humidity must be held constant. Furthermore, SEC is

affected by wet dressings and an SEC threshold permissive to donor site reharvest has not been established. Given that SEC can only be used as a point assessment, measurements obtained will not necessarily be an accurate indication of reharvestable donor sites. Use of photography in association with superimposed grids, predefined scores, or planimetry has been described [21-23]. We believe that photographic evaluation in our study permitted blinded, reproducible evaluation of donor site epithelialization.

The use of CEA had a significant benefit, compared to control, on wound healing at donor sites, as indicated by photographic evaluation. We used 90mm on the analogue scale as a threshold because it is the stage at which the donor site can be reharvested. The average of 10.2 days to healing (Figure 1) is in accord with values in the literature for time to healing with impregnated gauze [19, 24]. CEA use increased reepithelialization by an average of 1.6 days. This small difference is statistically and clinically significant, as it allows a faster recropping of donor sites for burn wound covering. Our retrospective series of 28 patients shows that patients received an average of 3 (and up to 7) sessions of donor site coverage with CEA. This permitted an average rate of donor site reharvests of 3 (and up to 5). The average interval to reharvest autografts from a donor site was 12.7 days. These numbers are relevant for the surgical planning required when dealing with large burns.

Microscopic evaluation contributed to reveal the role of culture media in promotion of wound healing. When comparing regions of Figure 5, the control region is more erythematous than the corresponding CEA-treated site. However on histological

analysis, both regions present a uniform epidermis of equal thickness and keratin layer. It is possible that the presence of keratinocytes and growth-promoting media modulates the effect on wound reepithelialization, rather than “graft take” of the CEA sheets. This hypothesis is supported by studies that document an absence of culture keratinocytes by day 7, despite complete epithelialization [25]. Others have studied the direct impact of CEA on growth factors and extracellular matrix proteins in the wound [26]. Accelerated donor site healing using allogeneic cultured epithelium has also been published [17, 18].

In our small series, *Pseudomonas* infection of one donor site occurred, leading to very poor healing, as determined by photographic evaluation and histology (figure 6). Unfortunately, topical antibiotics impair keratinocyte growth and are not used prophylactically for clinical CEA application [27]. Finally, to minimize trauma to the neoepidermis, the punch biopsies for two of the patients were done through the Adaptic backing. The result was shearing and loss of all epidermis on histology. Others have experienced this problem [28], and we modified our technique accordingly. Regrettably these events considerably reduced the number of donor site post operative biopsies available for analysis. Therefore, statistical observations could only be made on the photographic measure of donor site healing.

The reported delay to donor site reharvest and to first CEA use were overestimated by limitations in operating room access (once weekly). Fully epithelialized donor sites were not regularly reharvested as soon as possible, and therefore the impact on length of stay would be greater in centers with better operating room availability. Nevertheless, our patients received important benefits such as less donor site pain, lower infection risk

and lower overall open wound surfaces from this CEA treatment. Our unit received only 15 patients with >50 % TBSA. No adequate controls were available to compare global outcome measures, such as days to total wound cover, length of stay and mortality. Increased recruitment would be possible through a multicenter, fully randomized trial.

In conclusion, CEA application on donor sites appears to hasten reepithelialization and permit faster recropping.

Table I
Patient characteristics for retrospective audit (demographic)

		<i>Mean</i>	<i>SEM</i>
AGE *	No CEA	43,1	1,09
	CEA	53,6	3,47
	Total	44,6	1,08
TBSA*	No CEA	15,6 %	1,11
	CEA	45,9 %	3,45
	Total	19,8 %	1,25
Inhalation injury*	No CEA	14,2 %	0,02
	CEA	27,8 %	0,08
	Total	16,0 %	0,02
Male*	No CEA	80,7 %	0,03
	CEA	58,3 %	0,08
	Total	77,7 %	0,03
LOS*	No CEA	16,1	0,96
	CEA	54,3	4,74
	Total	21,2	1,31
Mortality*	No CEA	6,0 %	0,02
	CEA	27,8 %	0,08
	Total	8,9 %	0,02

* $P < 0.05$, No CEA vs CEA

No CEA = 233 patients treated without CEA

CEA = 36 patients treated with CEA

TBSA, Total Burn Surface Area; LOS, Length of Stay in days

Patients that received CEA treatment on donor sites were older, had bigger burns, more inhalation injury and had longer hospital stays and more mortalities were noted in this group.

Table II
Patient characteristics for retrospective audit (surgical)

Number of Surgeries for CEA patients (n=28)	Mean	Range
Debridement	6	1 – 15
Allograft	2	0 – 8
Autograft	4	1 – 7
CEA on Donor Site	3	1 – 7
Donor Site Reharvests	3	1 – 5
Days from admission to biopsy	5.8	1 – 27
Days from biopsy to first CEA grafting	16.5	12 – 27
Days to reharvest a donor site	12.7	7 – 18

Patients had an average of 3 operative sessions during which donor sites were covered with CEA. Donor sites were reharvested for autografts an average of 3 times after and average of 12.7 days. This permitted prompt burn wound coverage with sheet autografts in all CEA treated patients.

Table III
Patient characteristics for prospective trial (demographics, injury and treatment)

Patient #	1	2	3	4	5	6	Average
Age	81	53	26	28	35	38	43,5
Sex (Male = +)	-	-	+	+	+	-	50 %
%TBSA	37.5	60	55	52	50	81	55,9
%FT-TBSA	22	60	50	47	35	56	45
Inhalation	-	-	+	+	+	+	66 %
LOS (days)	40	57	59	43	81	171	75,1
Mortality	-	-	-	-	-	-	
Comorbidities	AD, HTN, AAA, DM	Obesity	-	Drug abuse	-	Trauma	
Days to Biopsy	2	1	1	1	0	0	0,8
Days to First CEA on Donor Site Session	17	16	16	24	14	14	16,8
Debridement	3	8	6	7	8	14	7,6
Homograft	1	3	3	3	5	10	4,1
Autograft	3	6	4	4	5	11	5,5
CEA on Donor Site Session	1	4	3	1	5	4	3,0
Frequency of Donor Site Reharvest	0	3 abdomen / 2 scalp	2 L thigh 2 R thigh	2 back / 2 arms R+L	3 thighs post leg R+ L / 2 ant thigh	4 vertex scalp / 3 abdomen / 5 ant thigh D	
Average Days to Reharvest site	x	14	14	21	19	17	17,0

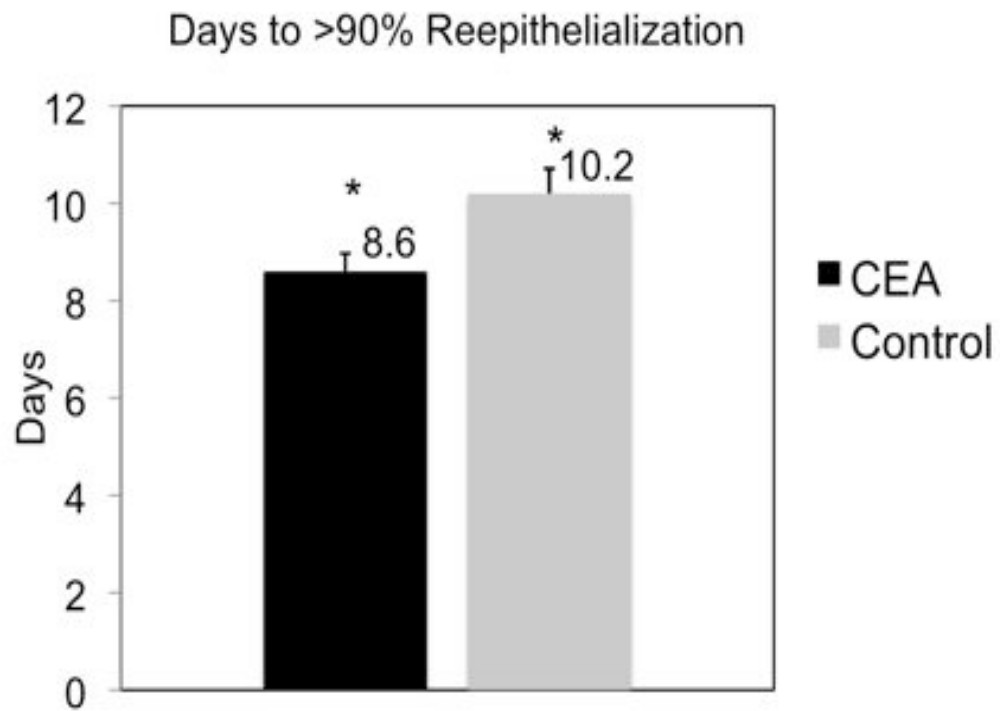
AAA, Aortic abdominal aneurysm; AD, Alzheimer's disease; BX, Biopsy; DM, Diabetes mellitus; HTN, Hypertension.

Table IV
Autograft harvest thickness

Donor Site Region	Randomized to CEA or Control	Autograft Thickness (μm)	Dermatome Setting (μm)
Distal	CEA	215	254
Distal	CEA	163	254
Distal	CEA	666	254
Distal	CEA	587	254
Proximal	CEA	416	254
Proximal	CEA	208	254
Proximal	CEA	231	254
Proximal	CEA	279	254
Proximal	CEA	316	254
Proximal	CEA	407	304.8
Proximal	CEA	347	304.8
Proximal	CEA	443	304.8
Proximal	CEA	301	203.2
Distal	CEA	401	304.8
Distal	Control	76	254
Distal	Control	74	254
Distal	Control	115	254
Distal	Control	242	254
Distal	Control	284	304.8
Distal	Control	251	304.8
Distal	Control	320	304.8
Distal	Control	472	254
Distal	Control	480	203.2
Proximal	Control	259	254
Proximal	Control	277	254
Proximal	Control	560	254
Proximal	Control	375	254
Proximal	Control	966	304.8
Average CEA Region Thickness		356	
Average Control Region Thickness		339	P=0.84
Average Proximal Region Thickness		340	
Average Distal Region Thickness		310	P=0.27

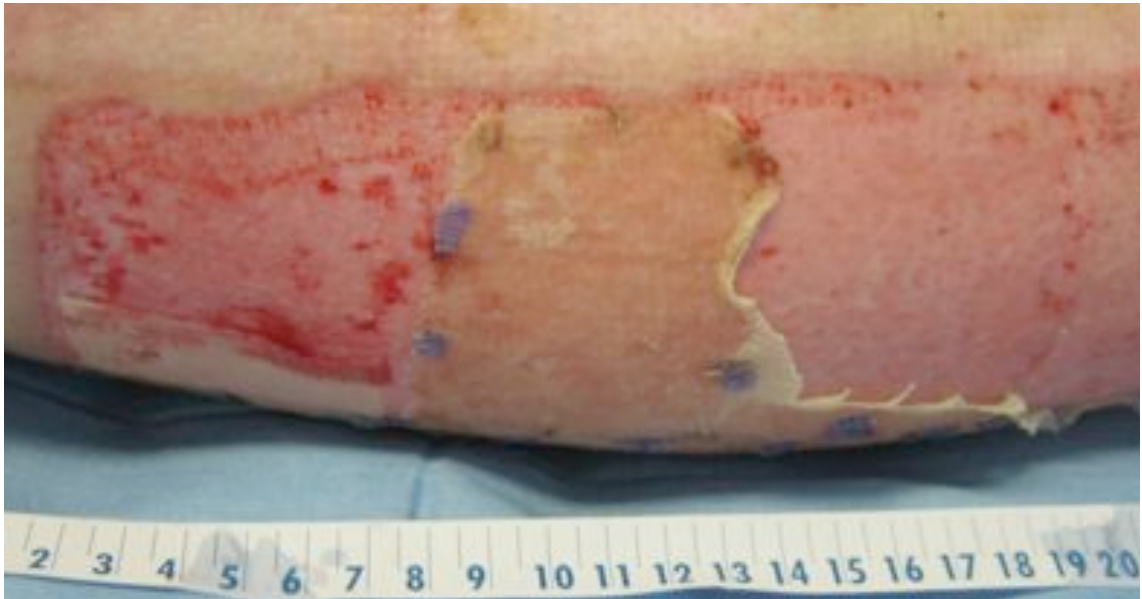
Autograft thickness was measured by a punch biopsy taken intra-operatively from the autograft at the proximal and at the distal zone. The corresponding donor site regions, either proximal or distal, had the same average depth. CEA and Control treatment was used on donor sites of equivalent depth. Therefore randomization should be considered adequate.

Figure 1



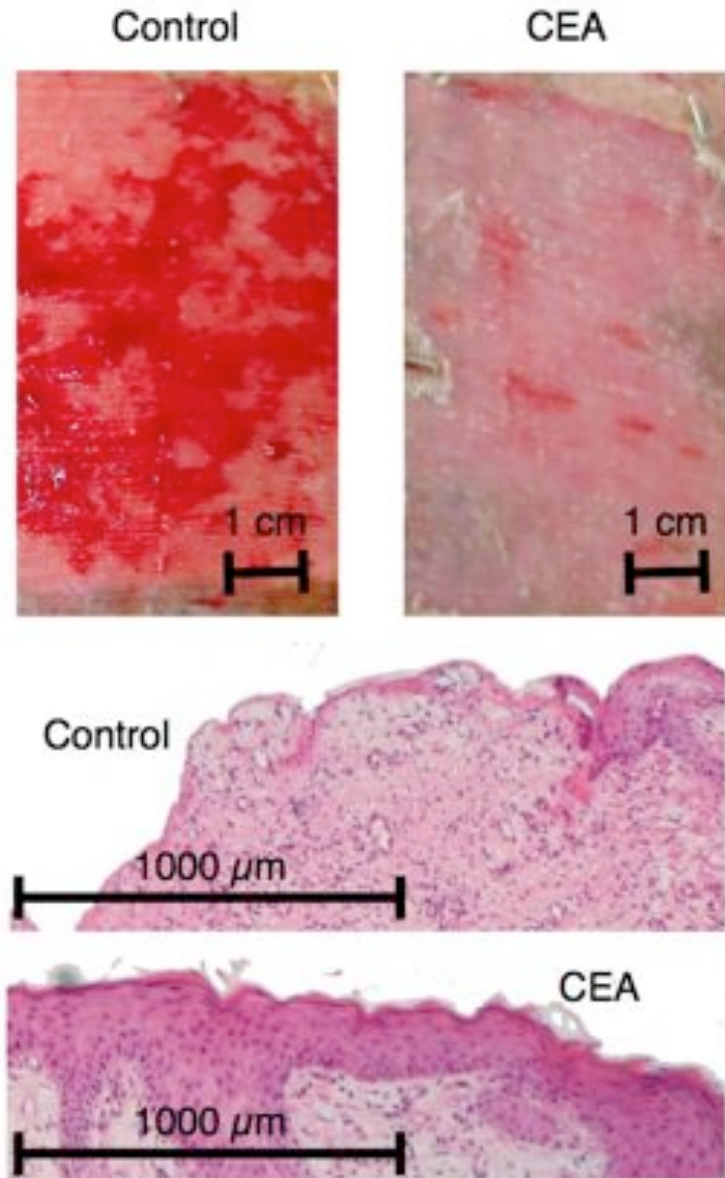
Data are expressed as means \pm SEM, $*P < 0.05$

This graph illustrates the minimum number of days to obtain >90 score on the photographs of donor site according to the evaluation of 2 blinded burn surgeons. The score of 90 was considered as the threshold because at this score donor sites can be reharvested for autografts. This difference is both statistically and clinically relevant to the care of burn patients.

Figure 2

Shown is a photograph of a donor site on post-operative day 6. On the right, the completely healed region was treated with CEA. On the left, the still open erythematous Saline Control treated region of the donor site is visible. The thickness of the autograft harvested from this donor site, as were all others, was measured by intra-operative biopsies of both regions. The CEA region depth was 0.41mm. The Control region depth was 0.44mm.

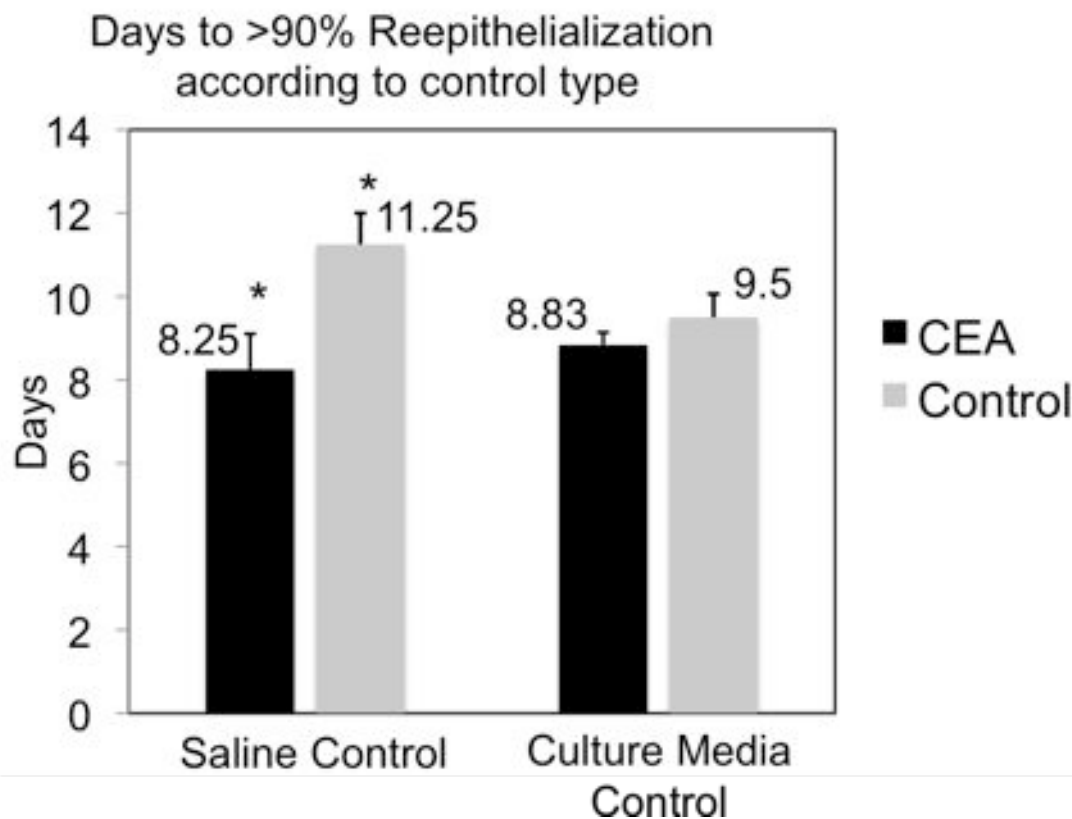
Figure 3



Upper panels: Photographs of another donor site on post-operative day 6 is shown. On the right, a completely healed CEA treated region is demonstrated. On the left, an unhealed erythematous zone representing a Culture Media Control treated region is shown. The depth of the CEA region was 0.61 mm as confirmed by intra-operative biopsy of the harvested autograft. The depth of control region was 0.54 mm.

Bottom panels: Low magnification micrographs of H&E staining of the punch biopsies taken from the same site shows the control region showing epithelium on 33 % of the surface the of biopsy while the CEA treated region shows 100 % epithelial coverage.

Figure 4



Data are expressed as means \pm SEM, * $P < 0.05$

This graph illustrates the minimum number of days to obtain >90 score on the photographs of donor site according to the evaluation of 2 blinded burn surgeons. The donor sites were subdivided according to the type of control. For 6 donor sites, the harvest site control region was dressed with Adaptic soaked in the culture media from the petri dish used for CEA delivery. For the remaining 5 donor sites, Adaptic was dipped in normal saline prior to dressing the control region. Comparing donor sites with these two types of controls, significant differences in healing time was shown. By separating the 2 groups of controls, the effect of culture media on the dressing becomes apparent.

Figure 5

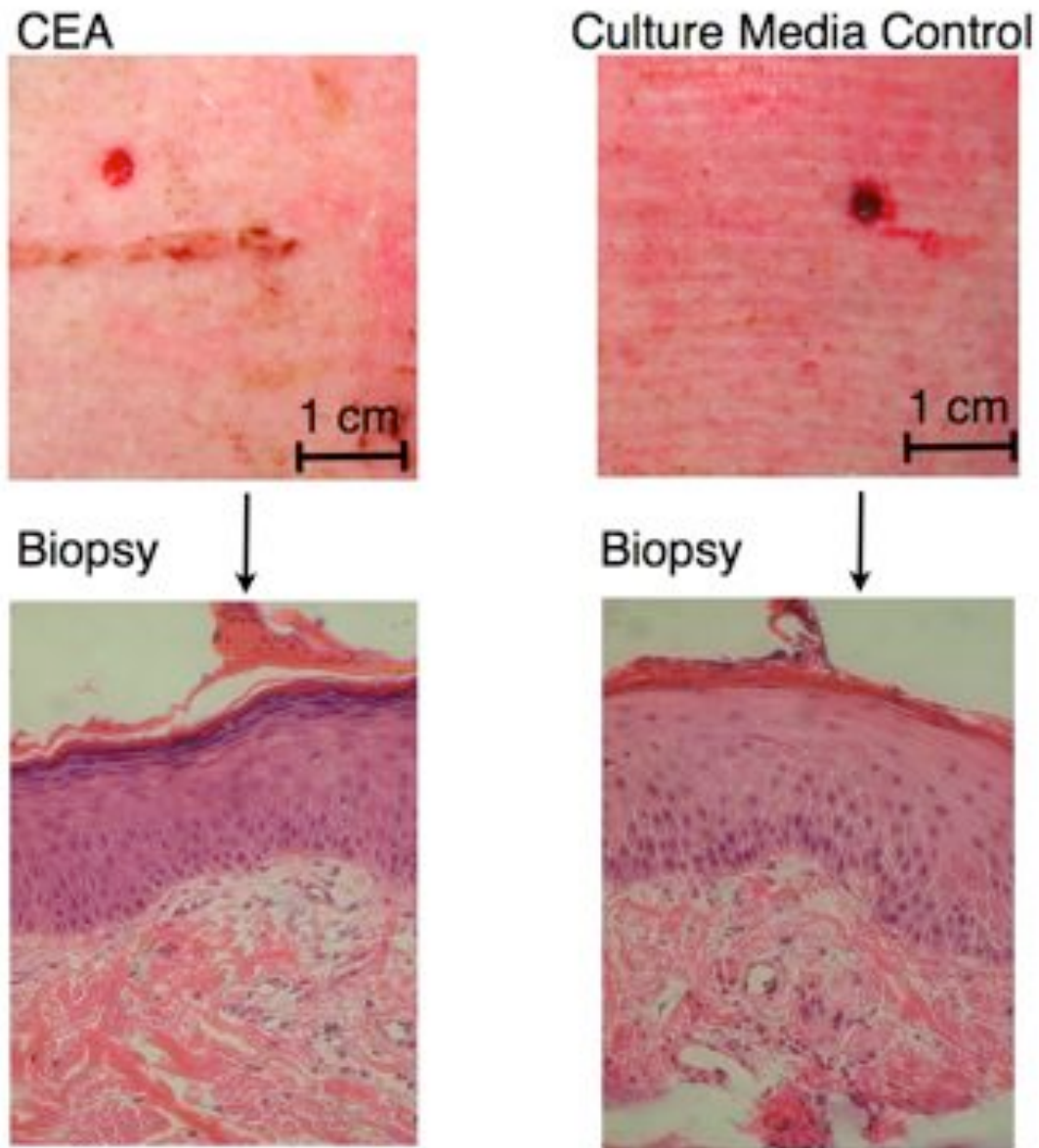
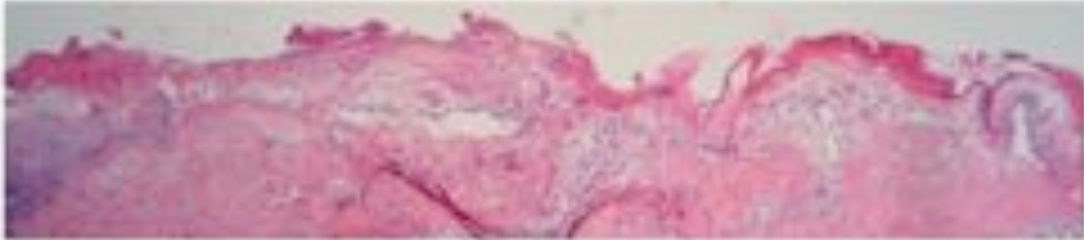
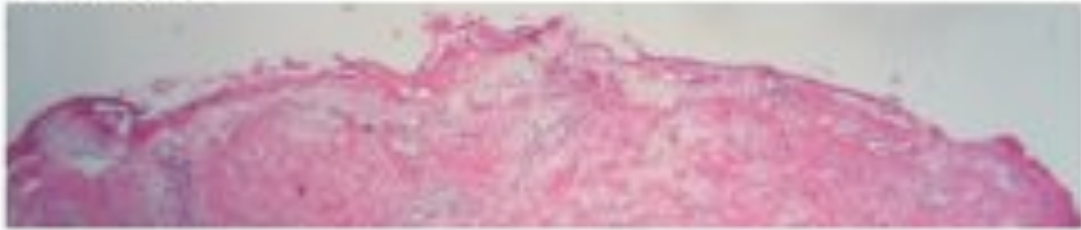


Photo of donor site and low magnification micrographs of H&E stained punch biopsies from CEA region and Culture Media Control region taken from patient 1 on postoperative day 8. These regions demonstrated equal epithelialization both macro and microscopically despite different treatment.

This is possibly due to the presence of keratinocytes and growth-promoting media in the which mediates the effect of wound reepithelialization, rather than simple “graft take” of the CEA sheets.

Figure 6**CEA****Control**

Low magnification micrographs of H&E stained punch biopsies taken from a *Pseudomonas aeruginosa* infected donor site at post-operative day 7. No epithelialization occurred in either the CEA or control regions. Unfortunately, topical antibiotics impair keratinocyte growth and cannot be used prophylactically for clinical CEA application.

Table V
Epithelialization on punch biopsies

Patient	1	2	3	4	5	6
Biopsy post-op day	8	5	5	6	7	6
% Surface of biopsy covered with epithelium						
CEA region biopsy (%)	100	0	100	100	20	100
Control region biopsy (%)	100	20	0	33	0	50
Control type	Media	Media	Media	Adaptic	Adaptic	Adaptic
Comments		sheared	sheared		infected	
Average of Media Controls (%)	40 ± 52.9*			<i>P</i> = 0.547**		
Average of Saline Controls (%)	27.7 ± 25.4*			<i>P</i> = 0.080**		
Average of CEA (%)	70 ± 46.9*					

*Mean ± standard deviation

**Compared with Average of CEA

For ethical reasons, postoperative donor site biopsies of CEA and Control regions were limited to one pair per patient for this study. Unfortunately, 2 punch biopsies specimens were sheared by technical errors. Another donor site was infected by *Pseudomonas aeruginosa* limiting the total number of donor site punch biopsies available for analysis. Nevertheless, CEA treated donor sites had a greater surface with epithelium when micrographs were evaluated.

There is better epithelialization with CEA when compared to the saline only control (not soaked in media), as 70 % of the CEA-treated surface was covered by epithelium, compared with only 28 %.

REFERENCES

1. *American Burn Association National Burn Repository 2007 Report*. 2008.
2. Xiao-Wu, W., et al., *Effects of delayed wound excision and grafting in severely burned children*. Arch Surg, 2002. **137**(9): p. 1049-54.
3. Deitch, E.A., et al., *Hypertrophic burn scars: analysis of variables*. Journal of Trauma-Injury Infection & Critical Care, 1983. **23**(10): p. 895-8.
4. Ong, Y.S., M. Samuel, and C. Song, *Meta-analysis of early excision of burns*. Burns, 2006. **32**(2): p. 145-50.
5. Birdsell, D.C., K.S. Hein, and R.L. Lindsay, *The theoretically ideal donor site dressing*. Ann Plast Surg, 1979. **2**(6): p. 535-7.
6. Hermans, M.H., *Results of an internet survey on the treatment of partial thickness burns, full thickness burns, and donor sites*. J Burn Care Res, 2007. **28**(6): p. 835-47.
7. O'Connor NE, M.J., Banks-Schlegel S, Kehinde O, Green H, *Grafting of burns with cultured epithelium prepared from autologous epidermal cells*. Lancet, 1981. **1**(8211): p. 75-8.
8. MacNeil, S., *Progress and opportunities for tissue-engineered skin*. Nature, 2007. **445**(7130): p. 874-80.
9. Desai, M.H., et al., *Lack of long-term durability of cultured keratinocyte burn-wound coverage: a case report*. J Burn Care Rehabil, 1991. **12**(6): p. 540-5.
10. Putland, M., et al., *Histologic comparison of cultured epithelial autograft and meshed expanded split-thickness skin graft*. J Burn Care Rehabil, 1995. **16**(6): p. 627-40.
11. Woodley, D.T., et al., *Burn wounds resurfaced by cultured epidermal autografts show abnormal reconstitution of anchoring fibrils*. Jama, 1988. **259**(17): p. 2566-71.
12. Germain, L., et al., *Improvement of human keratinocyte isolation and culture using thermolysin*. Burns, 1993. **19**(2): p. 99-104.
13. Archer, S.B., et al., *The use of sheet autografts to cover extensive burns in patients*. J Burn Care Rehabil, 1998. **19**(1 Pt 1): p. 33-8.
14. Petry, J.J. and K.A. Wortham, *Contraction and growth of wounds covered by meshed and non-meshed split thickness skin grafts*. Br J Plast Surg, 1986. **39**(4): p. 478-82.
15. Pham, C., et al., *Bioengineered skin substitutes for the management of burns: a systematic review*. Burns, 2007. **33**(8): p. 946-57.
16. Wiechula, R., *The use of moist wound-healing dressings in the management of split-thickness skin graft donor sites: a systematic review*. Int J Nurs Pract, 2003. **9**(2): p. S9-17.
17. Arambula, H., et al., *Frozen human epidermal allogeneic cultures promote rapid healing of facial dermabrasion wounds*. Dermatologic Surgery, 1999. **25**(9): p. 708-712.

18. Fratianne, R., et al., *Keratinocyte allografts accelerate healing of split-thickness donor sites: applications for improved treatment of burns*. J Burn Care Rehabil, 1993. **14**(2 Pt 1): p. 148-54.
19. Malpass, K.G., C.F. Snelling, and V. Tron, *Comparison of donor-site healing under Xeroform and Jelonet dressings: unexpected findings*. Plast Reconstr Surg, 2003. **112**(2): p. 430-9.
20. Magnusson, M., et al., *Cultured autologous keratinocytes in suspension accelerate epithelial maturation in an in vivo wound model as measured by surface electrical capacitance*. Plast Reconstr Surg, 2007. **119**(2): p. 495-9.
21. Duinslaeger, L., et al., *Lyophilized keratinocyte cell lysates contain multiple mitogenic activities and stimulate closure of meshed skin autograft-covered burn wounds with efficiency similar to that of fresh allogeneic keratinocyte cultures*. Plast Reconstr Surg, 1996. **98**(1): p. 110-7.
22. Innes, M.E., et al., *The use of silver coated dressings on donor site wounds: a prospective, controlled matched pair study*. Burns, 2001. **27**(6): p. 621-7.
23. Still, J., et al., *The use of a collagen sponge/living cell composite material to treat donor sites in burn patients*. Burns, 2003. **29**(8): p. 837-41.
24. Sawhney, C.P., G.V. Subbaraju, and R.N. Chakravarti, *Healing of donor sites of split skin grafts. An experimental study in pigs*. Br J Plast Surg, 1969. **22**(4): p. 359-64.
25. Brain, A., et al., *Survival of cultured allogeneic keratinocytes transplanted to deep dermal bed assessed with probe specific for Y chromosome*. BMJ, 1989. **298**(6678): p. 917-9.
26. Tamariz-Dominguez, E., F. Castro-Munozledo, and W. Kuri-Harcuch, *Growth factors and extracellular matrix proteins during wound healing promoted with frozen cultured sheets of human epidermal keratinocytes*. Cell Tissue Res, 2002. **307**(1): p. 79-89.
27. Cooper, M.L., et al., *Cytotoxicity to cultured human keratinocytes of topical antimicrobial agents*. J Surg Res, 1990. **48**(3): p. 190-5.
28. Danielsen, P., et al., *Effect of topical autologous platelet-rich fibrin versus no intervention on epithelialization of donor sites and meshed split-thickness skin autografts: a randomized clinical trial*. Plast Reconstr Surg, 2008. **122**(5): p. 1431-40.

Discussion

L'étude présentée comportait un recrutement prospectif, des zones contrôles distribuées au hasard et une évaluation à l'insu pour chaque mesure. Cette conception nous permet d'étudier avec le moins de biais possible l'effet des feuillets de CEA sur la réépithélialisation des sites donneurs. Dans les études publiées dans la littérature sur la guérison et l'épithélialisation, ce genre de manœuvres est l'exception plus que la règle [90, 113]. L'association de la photographie digitale et de l'histologie a permis de documenter la guérison d'un point de vue global et microscopique. Ces deux méthodes d'évaluation ont pu être reproduites à l'insu; « blinded » en anglais.

Une méthode fréquente pour documenter la guérison est l'évaluation directe de la plaie. Lorsque le pansement peut être changé sans saignement, on déclare la plaie guérie [114-116]. Cette méthodologie est une source importante de biais car l'évaluateur reconnaît le traitement reçu. D'autant plus que cette évaluation transforme en variable binaire (guérie ou non) un processus physiologique graduel qui évolue dans le temps. Il devient périlleux d'obtenir des moyennes de durée et de les comparer entre les traitements. Nous savons également que l'observation directe n'est pas reproductible. Par exemple, pour évaluer l'effet d'un traitement, on ne peut comparer la plaie A au moment X à la plaie B au moment Y. La généralisation des résultats devient très difficile.

Certains ont publié des études dont le critère d'efficacité est la capacitance électrique de surface (CES) [117]. La CES peut offrir l'avantage d'une mesure objective du rétablissement de la barrière épidermique. L'hydratation de la couche cornée diminue

avec la maturation des kératinocytes; cette différence est mesurée à l'aide de la sonde d'un appareil spécialisé. Envisager un protocole clinique avec un tel équipement est assez lourd. Ces équipements ne sont pas portatifs et sont très dépendants de la température et de l'humidité ambiante. Les mesures doivent être prises à plusieurs endroits sur la plaie après une calibration rigoureuse afin d'obtenir des valeurs valides. Même si la mesure de la CES se veut objective, elle demeure dépendante de l'opérateur [117]. Finalement, un dernier argument soulevé contre l'utilisation de la CES est que cette mesure n'est pas aveugle. L'opérateur est en contact avec la plaie et peut ainsi obtenir des indices vis-à-vis le traitement assigné.

L'utilisation de la photographie pour l'évaluation de l'épithélialisation fut retenue pour ce projet. C'est un moyen facile, peu coûteux, reproductible, facile à standardiser et qui permet une évaluation à l'insu par plusieurs évaluateurs pour la même observation. Pour faciliter l'évaluation des photographies, on peut leur joindre soit un carrelage, un score de guérison pré-établi, ou encore la planimétrie [105, 118, 119]. Nous avons choisi d'associer la photographie numérique à une échelle analogue de 100 mm. Cette échelle permet de représenter la réépithélialisation d'une plaie comme un processus continu par opposition à un statut binaire ou ordinal. L'évaluation peut alors devenir plus sensible aux différences subtiles entre les photographies. L'analyse est simplifiée car le traitement d'une mesure expérimentale continue permet de comparer des moyennes et de construire des modèles statistiques aisément. Un groupe a utilisé un score catégoriel associé à la photographie pour évaluer la guérison de sites donneurs [119]. L'emploi d'un score de type A, B, C, D correspondant à 100 à 75 %, 76 à 50%, etc de guérison nécessite une analyse statistiques non paramétrique ce qui en diminue la

puissance. Cette perte de puissance statistique est un problème difficile à surmonter pour un projet avec de petits échantillons. Un autre désavantage est qu'il existe une variation entre les évaluateurs de ce qui est un A; de sorte que le A d'un évaluateur peut devenir un B chez un autre. Encore, lorsque l'on travaille avec de petits échantillons ces problèmes sont difficiles à surmonter statistiquement.

L'application de CEA en feuillets sur les sites donneurs a démontré un effet bénéfique sur leur guérison selon l'évaluation photographique. Le seuil de 90 mm sur l'échelle analogue a été retenu car il correspond à un site donneur susceptible d'être prélevé à nouveau. Ceci est cliniquement pertinent. Le temps de guérison moyen de 10,2 jours pour les deux types de contrôles combinés et de 11,25 jours pour les régions traitées au salin est dans les limites acceptées dans la littérature [114, 120]. Les résultats démontrent que les CEA accélèrent l'épithélialisation de 1,6 jour en comparaison à toutes les zones contrôles. Cette différence atteint 3,0 jours si l'on ne compare le CEA qu'au zones traitées avec contrôle salin (Adaptic trempé dans du normal salin). Ces trouvailles sont cliniquement importantes dans un contexte de patients grièvement brûlés qui nécessitent de multiples prélèvements aux mêmes sites donneurs.

Ce projet a démontré un effet bénéfique des CEA mais n'a pu démontrer de différence au plan des variables globales telles que la mortalité et la durée de séjour. Il a été impossible de faire une étude rétrospective de cas-témoins, par manque de patients avec des brûlures similaires à celles du groupe contrôle. Il faut mentionner que dans le contexte actuel d'un accès limité au bloc opératoire, le temps entre les reprélèvements est augmenté. Cet effet est visible sur les valeurs de 17,0 jours en moyenne entre les reprélèvements et de 16,8 jours entre le délai de la biopsie de tissus sains et la première

livraison de CEA provenant de l'étude prospective. En contre partie, l'étude rétrospective a permis d'identifier 28 patients entre 2002 et 2004 qui ont eu des CEA sur leurs sites donneurs en moyenne 3 fois (mais jusqu'à 7). Les mêmes sites donneurs ont été réutilisés en moyenne 3 fois (mais jusqu'à 5). Dans cette série rétrospective, le délai avant de réutiliser un même site donneur était de 12.7 jours. Ces chiffres sont pertinents pour mener à terme un plan de traitement d'un grand brûlé.

Beaucoup d'efforts ont été déployés pour répartir au hasard les zones CEA et contrôles entre les régions proximales et distales d'un site donneur. La rationnelle est que parfois le début d'un prélèvement d'une greffe de peau peut être plus profond que sa fin. Si le traitement au CEA était systématiquement sur la zone la plus profonde du site donneur, l'effet thérapeutique en serait réduit. Les biopsies au poinçon effectuées sur les extrémités distales et proximales des greffes de peau lors de leur prélèvement en salle d'opération n'ont révélé aucune corrélation entre le réglage d'un dermatome et l'épaisseur. Aucune différence significative entre les zones proximales et distales n'a pu être démontrée. Ces faits ont été notés et lors d'études subséquentes, l'étude histologique de l'épaisseur des greffes ne sera pas effectuée. Le devis de l'étude en sera grandement simplifié, sans introduire de biais.

En 2008, sur 147 admissions totales, seulement 14 étaient éligibles à l'utilisation de CEA. De ces patients seulement 6 ont survécu jusqu'à l'utilisation de CEA. Ceci reflète la réalité que le Centre des grands brûlés de l'Hôtel-Dieu ne reçoit qu'un faible nombre de patients grièvement atteints. Cette contrainte limite la puissance de cette recherche clinique. Avec ces premiers résultats positifs, il sera plus facile de recruter d'autres centres pour la collaboration à un projet multicentrique.

Les résultats par rapport à l'effet du milieu de culture n'étaient pas prévus lors de la conception de l'étude. Ce n'est que lorsque nous avons fait une analyse préliminaire que nous avons décidé d'ajouter une comparaison avec le salin physiologique. En comparant l'histologie des biopsies des sites donneurs contrôles traités au milieu de culture, l'épithélialisation de certains de ces échantillons était identique à celle de sites traités par le CEA. Notre hypothèse pour expliquer ce résultat est que des cellules en suspension dans le milieu de culture ainsi que des facteurs de croissance secrétés lors de la culture dans ce milieu induisent le mécanisme de guérison physiologique local. Cette hypothèse est soutenue par des études qui montrent l'absence de kératinocytes de culture dans la plaie à 7 jours [121]. Les kératinocytes de cultures sécrètent des niveaux plus élevés de TGF-alpha et TGF-beta que ceux des plaies contrôles. Le TGF-alpha stimulent la migration et la prolifération de kératinocytes dans la plaie alors que le TGF-beta stimule la production de protéines de membrane basale telles que : collagène IV, laminine et tenascine par des cellules sous-épithéliales [122].

L'interaction entre le derme et les kératinocytes fait l'objet de plusieurs études [123]. Les kératinocytes ont une influence sur les fibroblastes qui eux-mêmes influencent les kératinocytes [124-126] par l'entremise de facteurs de croissance. Il devient raisonnable de croire que l'effet des CEA sur les sites donneurs va au-delà d'une simple couverture épidermique.

La présente recherche n'était pas conçue pour étudier en détail l'avenir des CEA appliqué sur les sites donneurs. Des techniques d'immunofluorescence pour marquer les kératinocytes des CEA permettraient de les détecter une fois le site donneur guéri. Un groupe a utilisé une méthodologie intéressante pour étudier in vivo chez l'humain la

persistance des cellules de CEA [127]. Ils ont prélevé de la peau glabre de la plante du pied pour débiter la production de CEA. La cytokératine 9 n'est détectée par marquage immunochimique que dans la peau glabre. Ainsi, chez un patient, le groupe a détecté la persistance de cellules d'origine CEA trois semaines après la guérison de la plaie chez un sujet par la présence de cytokératine 9 au niveau de la plaie traité par CEA. D'autres travaux sont à faire dans ce sens pour statuer sur l'avenir des cellules provenant des CEA à long terme.

Conclusion

L'utilisation de feuillets de CEA sur les sites donneurs des patients grièvement brûlés nous apparaît comme une option thérapeutique prometteuse. Bien que le mécanisme d'action des CEA et celui du milieu de culture sur la réépithélialisation ne soient pas encore complètement élucidés, nous avons démontré un effet bénéfique sur la vitesse de guérison des sites donneurs.

Une prochaine étude devra être multicentrique pour augmenter le recrutement de patients. Les patients seraient exposés aux deux types de contrôle, ce qui permettrait de comparer directement les deux traitements.

Compte tenu des sommes d'argent impliquées, il serait également souhaitable de mettre sur pied une analyse coûts-efficacité.

Bibliographie

1. Miller, S.F., et al., *National Burn Repository 2005: a ten-year review*. J Burn Care Res, 2006. **27**(4): p. 411-36.
2. WHO, http://www.who.int/whosis/database/mort/table1_process.cfm .
3. Herndon, D.N., et al., *A comparison of conservative versus early excision. Therapies in severely burned patients*. Annals of Surgery, 1989. **209**(5): p. 547-52; discussion 552-3.
4. Janzekovic, Z., *A new concept in the early excision and immediate grafting of burns*. Journal of Trauma-Injury Infection & Critical Care, 1970. **10**(12): p. 1103-8.
5. Ong, Y.S., M. Samuel, and C. Song, *Meta-analysis of early excision of burns*. Burns, 2006. **32**(2): p. 145-50.
6. Edelman, L.S., *Social and economic factors associated with the risk of burn injury*. Burns, 2007. **33**(8): p. 958-65.
7. Laflamme, L. and E. Eilert-Petersson, *Injury risks and socioeconomic groups in different settings. Differences in morbidity between men and between women at working ages*. Eur J Public Health, 2001. **11**(3): p. 309-13.
8. Osler, T., L.G. Glance, and D.W. Hosmer, *Simplified estimates of the probability of death after burn injuries: extending and updating the baux score*. J Trauma. **68**(3): p. 690-7.
9. Pereira, C., K. Murphy, and D. Herndon, *Outcome measures in burn care. Is mortality dead?* Burns, 2004. **30**(8): p. 761-71.
10. Blades, B., N. Mellis, and A.M. Munster, *A burn specific health scale*. Journal of Trauma-Injury Infection & Critical Care, 1982. **22**(10): p. 872-5.
11. Willebrand, M. and M. Kildal, *A simplified domain structure of the burn-specific health scale-brief (BSHS-B): a tool to improve its value in routine clinical work*. Journal of Trauma-Injury Infection & Critical Care, 2008. **64**(6): p. 1581-6.
12. Patterson, D.R., J. Tininenko, and J.T. Ptacek, *Pain during burn hospitalization predicts long-term outcome*. J Burn Care Res, 2006. **27**(5): p. 719-26.
13. Sheridan, R.L., et al., *Long-term outcome of children surviving massive burns*. Jama, 2000. **283**(1): p. 69-73.
14. Broughton, G., 2nd, J.E. Janis, and C.E. Attinger, *The basic science of wound healing*. Plast Reconstr Surg, 2006. **117**(7 Suppl): p. 12S-34S.

15. Braiman-Wiksmann, L., et al., *Novel insights into wound healing sequence of events*. Toxicol Pathol, 2007. **35**(6): p. 767-79.
16. Moulin, V., et al., *In vitro models to study wound healing fibroblasts*. Burns, 1996. **22**(5): p. 359-362.
17. Tredget, E.E., *The basis of fibrosis and wound healing disorders following thermal injury*. Journal of Trauma-Injury Infection & Critical Care, 2007. **62**(6 Suppl): p. S69.
18. Monstrey, S., et al., *Assessment of burn depth and burn wound healing potential*. Burns, 2008. **34**(6): p. 761-9.
19. Hoeksema, H., et al., *Accuracy of early burn depth assessment by laser Doppler imaging on different days post burn*. Burns, 2009. **35**(1): p. 36-45.
20. Rochat, A., K. Kobayashi, and Y. Barrandon, *Location of stem cells of human hair follicles by clonal analysis*. Cell, 1994. **76**(6): p. 1063-73.
21. Mansbridge, J.N. and A.M. Knapp, *Changes in keratinocyte maturation during wound healing*. J Invest Dermatol, 1987. **89**(3): p. 253-63.
22. Deitch, E.A., et al., *Hypertrophic burn scars: analysis of variables*. Journal of Trauma-Injury Infection & Critical Care, 1983. **23**(10): p. 895-8.
23. Xiao-Wu, W., et al., *Effects of delayed wound excision and grafting in severely burned children*. Arch Surg, 2002. **137**(9): p. 1049-54.
24. Blair, V.P., *The Full Thickness Skin Graft*. Ann Surg, 1924. **80**(3): p. 298-324.
25. Brown, J.B. and F. McDowell, *Massive Repairs of Burns with Thick Split-Skin Grafts: Emergency "Dressings" with Homografts*. Ann Surg, 1942. **115**(4): p. 658-74.
26. Brown, J.B. and F. McDowell, *Epithelial Healing and the Transplantation of Skin*. Ann Surg, 1942. **115**(6): p. 1166-81.
27. Padgett, E.C., *Skin Grafting and the "Three-Quarter"-Thickness Skin Graft for Prevention and Correction of Cicatricial Formation*. Ann Surg, 1941. **113**(6): p. 1034-49.
28. O'Ceallaigh, S., et al., *Quantification of total and perfused blood vessels in murine skin autografts using a fluorescent double-labeling technique*. Plast Reconstr Surg, 2006. **117**(1): p. 140-51.
29. O'Ceallaigh, S., et al., *Perivascular cells in a skin graft are rapidly repopulated by host cells*. J Plast Reconstr Aesthet Surg, 2007. **60**(8): p. 864-75.

30. Lindenblatt, N., et al., *A new model for studying the revascularization of skin grafts in vivo: the role of angiogenesis*. *Plast Reconstr Surg*, 2008. **122**(6): p. 1669-80.
31. Paletta, C.E., *Skin Grafts*, in *Plastic Surgery, 2nd Ed.*, S.J. Mathes, Editor. 2006, Eslevier: Philadelphia. p. 293-316.
32. Netsky, M.G. and S.S. Leiter, *CAPILLARY PERMEABILITY TO HORSE PROTEINS IN BURN-SHOCK*. *Am J Physiol*, 1943. **140**(1): p. 1-8.
33. Demling, R.H., *The burn edema process: current concepts*. *Journal of Burn Care & Rehabilitation*, 2005. **26**(3): p. 207-27.
34. Ivy, M.E., et al., *Abdominal compartment syndrome in patients with burns*. *J Burn Care Rehabil*, 1999. **20**(5): p. 351-3.
35. Horton, J.W., *Left ventricular contractile dysfunction as a complication of thermal injury*. *Shock*, 2004. **22**(6): p. 495-507.
36. Ballard-Croft, C., et al., *Role of p38 mitogen-activated protein kinase in cardiac myocyte secretion of the inflammatory cytokine TNF-alpha*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2001. **280**(5): p. H1970-81.
37. Willis, M.S., et al., *Macrophage migration inhibitory factor mediates late cardiac dysfunction after burn injury*. *American Journal of Physiology - Heart & Circulatory Physiology*, 2005. **288**(2): p. H795-804.
38. Carlson, D.L. and J.W. Horton, *Cardiac molecular signaling after burn trauma*. *Journal of Burn Care & Research*, 2006. **27**(5): p. 669-75.
39. Cioffi, W.G., J.E. DeMeules, and R.L. Gamelli, *The effects of burn injury and fluid resuscitation on cardiac function in vitro*. *J Trauma*, 1986. **26**(7): p. 638-42.
40. Smith, A., et al., *The bigger the burn, the greater the stress*. *Burns*, 1997. **23**(4): p. 291-4.
41. Hart, D.W., et al., *Determinants of skeletal muscle catabolism after severe burn*. *Ann Surg*, 2000. **232**(4): p. 455-65.
42. Jahoor, F., et al., *Dynamics of the protein metabolic response to burn injury*. *Metabolism*, 1988. **37**(4): p. 330-7.
43. Wilmore, D.W., et al., *Catecholamines: mediator of the hypermetabolic response to thermal injury*. *Ann Surg*, 1974. **180**(4): p. 653-69.
44. Wilmore, D.W., et al., *Alterations in hypothalamic function following thermal injury*. *J Trauma*, 1975. **15**(8): p. 697-703.

45. Pham, T.N., et al., *Impact of tight glycemic control in severely burned children*. J Trauma, 2005. **59**(5): p. 1148-54.
46. Gore, D.C., et al., *Influence of metformin on glucose intolerance and muscle catabolism following severe burn injury*. Ann Surg, 2005. **241**(2): p. 334-42.
47. Gore, D.C., et al., *Metformin blunts stress-induced hyperglycemia after thermal injury*. J Trauma, 2003. **54**(3): p. 555-61.
48. Thomas, S.J., et al., *The effect of prolonged euglycemic hyperinsulinemia on lean body mass after severe burn*. Surgery, 2002. **132**(2): p. 341-7.
49. Gauglitz, G.G., D.N. Herndon, and M.G. Jeschke, *Insulin resistance postburn: underlying mechanisms and current therapeutic strategies*. Journal of Burn Care & Research, 2008. **29**(5): p. 683-94.
50. Wolf, S.E., et al., *Effects of oxandrolone on outcome measures in the severely burned: a multicenter prospective randomized double-blind trial*. J Burn Care Res, 2006. **27**(2): p. 131-9; discussion 140-1.
51. Hart, D.W., et al., *Anabolic effects of oxandrolone after severe burn*. Ann Surg, 2001. **233**(4): p. 556-64.
52. Demling, R.H. and L. DeSanti, *Oxandrolone, an anabolic steroid, significantly increases the rate of weight gain in the recovery phase after major burns*. J Trauma, 1997. **43**(1): p. 47-51.
53. Yamamoto, H., et al., *Immediate Burn Wound Excision Restores Antibody Synthesis to Bacterial Antigen*. Journal of Surgical Research, 1996. **63**(1): p. 157-162.
54. Peng, Y.Z., Z.Q. Yuan, and G.X. Xiao, *Effects of early enteral feeding on the prevention of enterogenic infection in severely burned patients*. Burns, 2001. **27**(2): p. 145-9.
55. Garrel, D., et al., *Decreased mortality and infectious morbidity in adult burn patients given enteral glutamine supplements: a prospective, controlled, randomized clinical trial*. Crit Care Med, 2003. **31**(10): p. 2444-9.
56. Hlava, P., J. Moserova, and R. Konigova, *Validity of clinical assessment of the depth of a thermal injury*. Acta Chir Plast, 1983. **25**(4): p. 202-8.
57. Atiyeh, B.S., S.W. Gunn, and S.N. Hayek, *State of the art in burn treatment*. World J Surg, 2005. **29**(2): p. 131-48.
58. Archer, S.B., et al., *The use of sheet autografts to cover extensive burns in patients*. J Burn Care Rehabil, 1998. **19**(1 Pt 1): p. 33-8.

59. Burd, A. and L. Huang, *Hypertrophic response and keloid diathesis: two very different forms of scar*. *Plast Reconstr Surg*, 2005. **116**(7): p. 150e-157e.
60. van der Veer, W.M., et al., *Potential cellular and molecular causes of hypertrophic scar formation*. *Burns*, 2009. **35**(1): p. 15-29.
61. Revathi, G., J. Puri, and B.K. Jain, *Bacteriology of burns*. *Burns*, 1998. **24**(4): p. 347-9.
62. Bowler, P.G., B.I. Duerden, and D.G. Armstrong, *Wound microbiology and associated approaches to wound management*. *Clin Microbiol Rev*, 2001. **14**(2): p. 244-69.
63. MacMillan, B.G., *Infections following burn injury*. *Surg Clin North Am*, 1980. **60**(1): p. 185-96.
64. Still, J.M., Jr., H.K. Orlet, and E.J. Law, *Use of cultured epidermal autografts in the treatment of large burns*. *Burns*, 1994. **20**(6): p. 539-41.
65. Gallico, G.G., 3rd, et al., *Permanent coverage of large burn wounds with autologous cultured human epithelium*. *N Engl J Med*, 1984. **311**(7): p. 448-51.
66. Gobet, R., et al., *Efficacy of cultured epithelial autografts in pediatric burns and reconstructive surgery*. *Surgery*, 1997. **121**(6): p. 654-61.
67. McAree, K.G., R.L. Klein, and C.R. Boeckman, *The use of cultured epithelial autografts in the wound care of severely burned patients*. *J Pediatr Surg*, 1993. **28**(2): p. 166-8.
68. Munster, A.M., *Cultured skin for massive burns. A prospective, controlled trial*. *Ann Surg*, 1996. **224**(3): p. 372-5; discussion 375-7.
69. Sheridan, R.L. and R.G. Tompkins, *Cultured autologous epithelium in patients with burns of ninety percent or more of the body surface*. *J Trauma*, 1995. **38**(1): p. 48-50.
70. Williamson, J.S., et al., *Cultured epithelial autograft: five years of clinical experience with twenty-eight patients*. *J Trauma*, 1995. **39**(2): p. 309-19.
71. Putland, M., et al., *Histologic comparison of cultured epithelial autograft and meshed expanded split-thickness skin graft*. *J Burn Care Rehabil*, 1995. **16**(6): p. 627-40.
72. Woodley, D.T., et al., *Burn wounds resurfaced by cultured epidermal autografts show abnormal reconstitution of anchoring fibrils*. *Jama*, 1988. **259**(17): p. 2566-71.

73. Desai, M.H., et al., *Lack of long-term durability of cultured keratinocyte burn-wound coverage: a case report*. J Burn Care Rehabil, 1991. **12**(6): p. 540-5.
74. Caruso, D.M., et al., *Cultured composite autografts as coverage for an extensive body surface area burn: case report and review of the technology*. Burns, 1999. **25**(8): p. 771-9.
75. Boyce, S.T., et al., *Cultured skin substitutes reduce donor skin harvesting for closure of excised, full-thickness burns*. Ann Surg, 2002. **235**(2): p. 269-79.
76. Boyce, S.T., et al., *Comparative assessment of cultured skin substitutes and native skin autograft for treatment of full-thickness burns*. Ann Surg, 1995. **222**(6): p. 743-52.
77. Paddle-Ledinek, J.E., D.G. Cruickshank, and J.P. Masterton, *Skin replacement by cultured keratinocyte grafts: an Australian experience*. Burns, 1997. **23**(3): p. 204-11.
78. Rheinwald, J.G. and H. Green, *Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells*. Cell, 1975. **6**(3): p. 331-43.
79. Green, H., O. Kehinde, and J. Thomas, *Growth of cultured human epidermal cells into multiple epithelia suitable for grafting*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(11): p. 5665-8.
80. Frey, P., et al., *The biosynthetic precursor of epidermal growth factor and the mechanism of its processing*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(12): p. 6294-8.
81. Maciag, T., et al., *An endothelial cell growth factor from bovine hypothalamus: identification and partial characterization*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(11): p. 5674-8.
82. Youn, S.W., et al., *Cellular senescence induced loss of stem cell proportion in the skin in vitro*. J Dermatol Sci, 2004. **35**(2): p. 113-23.
83. Hybbinette, S., M. Bostrom, and K. Lindberg, *Enzymatic dissociation of keratinocytes from human skin biopsies for in vitro cell propagation*. Exp Dermatol, 1999. **8**(1): p. 30-8.
84. Germain, L., et al., *Improvement of human keratinocyte isolation and culture using thermolysin*. Burns, 1993. **19**(2): p. 99-104.
85. Gragnani, A., et al., *Flow cytometry of human primary epidermal and follicular keratinocytes*. Eplasty, 2008. **8**: p. e14.
86. Coolen, N.A., et al., *Culture of keratinocytes for transplantation without the need of feeder layer cells*. Cell Transplantation, 2007. **16**(6): p. 649-61.

87. Murakami, D., et al., *Fabrication of transplantable human oral mucosal epithelial cell sheets using temperature-responsive culture inserts without feeder layer cells*. Journal of Artificial Organs, 2006. **9**(3): p. 185-191.
88. Lineen, E. and N. Namias, *Biologic dressing in burns*. J Craniofac Surg, 2008. **19**(4): p. 923-8.
89. MacNeil, S., *Progress and opportunities for tissue-engineered skin*. Nature, 2007. **445**(7130): p. 874-80.
90. Pham, C., et al., *Bioengineered skin substitutes for the management of burns: a systematic review*. Burns, 2007. **33**(8): p. 946-57.
91. Atiyeh, B.S., S.N. Hayek, and S.W. Gunn, *New technologies for burn wound closure and healing--review of the literature*. Burns, 2005. **31**(8): p. 944-56.
92. Auger, F.A., D. Lacroix, and L. Germain, *Skin substitutes and wound healing*. Skin Pharmacol Physiol, 2009. **22**(2): p. 94-102.
93. Wright, K.A., et al., *Alternative delivery of keratinocytes using a polyurethane membrane and the implications for its use in the treatment of full-thickness burn injury*. Burns, 1998. **24**(1): p. 7-17.
94. Zhu, N., et al., *Treatment of burns and chronic wounds using a new cell transfer dressing for delivery of autologous keratinocytes*. European Journal of Plastic Surgery, 2005. **28**(5): p. 319-330.
95. Haddow, D.B., et al., *Plasma-polymerized surfaces for culture of human keratinocytes and transfer of cells to an in vitro wound-bed model*. J Biomed Mater Res A, 2003. **64**(1): p. 80-7.
96. Wood, F.M., M.L. Kolybaba, and P. Allen, *The use of cultured epithelial autograft in the treatment of major burn wounds: eleven years of clinical experience*. Burns, 2006. **32**(5): p. 538-44.
97. Heimbach, D., et al., *Artificial dermis for major burns. A multi-center randomized clinical trial*. Ann Surg, 1988. **208**(3): p. 313-20.
98. Stern, R., M. McPherson, and M.T. Longaker, *Histologic study of artificial skin used in the treatment of full-thickness thermal injury*. J Burn Care Rehabil, 1990. **11**(1): p. 7-13.
99. Wainwright, D.J., *Use of an acellular allograft dermal matrix (AlloDerm) in the management of full-thickness burns*. Burns, 1995. **21**(4): p. 243-8.
100. Wainwright, D., et al., *Clinical evaluation of an acellular allograft dermal matrix in full-thickness burns*. J Burn Care Rehabil, 1996. **17**(2): p. 124-36.

101. Marston, W.A., et al., *The efficacy and safety of Dermagraft in improving the healing of chronic diabetic foot ulcers: results of a prospective randomized trial.* Diabetes Care, 2003. **26**(6): p. 1701-5.
102. Amani, H., W.R. Dougherty, and S. Blome-Eberwein, *Use of Transcyte and dermabrasion to treat burns reduces length of stay in burns of all size and etiology.* Burns, 2006. **32**(7): p. 828-32.
103. Shevchenko, R.V., et al., *Use of a novel porcine collagen paste as a dermal substitute in full-thickness wounds.* Wound Repair Regen, 2008. **16**(2): p. 198-207.
104. Waymack, P., R.G. Duff, and M. Sabolinski, *The effect of a tissue engineered bilayered living skin analog, over meshed split-thickness autografts on the healing of excised burn wounds.* The Apligraf Burn Study Group. Burns, 2000. **26**(7): p. 609-19.
105. Still, J., et al., *The use of a collagen sponge/living cell composite material to treat donor sites in burn patients.* Burns, 2003. **29**(8): p. 837-41.
106. Thomas, D.R., *Age-Related Changes in Wound Healing.* SO - Drugs & Aging 2001;18(8):607-620.
107. Wanek, S. and S.E. Wolf, *Metabolic response to injury and role of anabolic hormones.* Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care, 2007. **10**(3): p. 272-7.
108. Greenhalgh, D.G., *Wound healing and diabetes mellitus.* Clin Plast Surg, 2003. **30**(1): p. 37-45.
109. Krizek T J, R.M.C., Kho E, *Bacterial growth and skin graft survival.* Surg Forum, 1967(18): p. 518–519.
110. Thornton, F.J., M.R. Schaffer, and A. Barbul, *Wound healing in sepsis and trauma.* Shock, 1997. **8**(6): p. 391-401.
111. Geary, P.M. and E. Tiernan, *Management of split skin graft donor sites - results of a national survey.* J Plast Reconstr Aesthet Surg, 2009.
112. Hermans, M.H., *Results of an internet survey on the treatment of partial thickness burns, full thickness burns, and donor sites.* J Burn Care Res, 2007. **28**(6): p. 835-47.
113. Wiechula, R., *The use of moist wound-healing dressings in the management of split-thickness skin graft donor sites: a systematic review.* Int J Nurs Pract, 2003. **9**(2): p. S9-17.

114. Malpass, K.G., C.F. Snelling, and V. Tron, *Comparison of donor-site healing under Xeroform and Jelonet dressings: unexpected findings*. *Plast Reconstr Surg*, 2003. **112**(2): p. 430-9.
115. Arambula, H., et al., *Frozen human epidermal allogeneic cultures promote rapid healing of facial dermabrasion wounds*. *Dermatologic Surgery*, 1999. **25**(9): p. 708-712.
116. Fratianne, R., et al., *Keratinocyte allografts accelerate healing of split-thickness donor sites: applications for improved treatment of burns*. *J Burn Care Rehabil*, 1993. **14**(2 Pt 1): p. 148-54.
117. Magnusson, M., et al., *Cultured autologous keratinocytes in suspension accelerate epithelial maturation in an in vivo wound model as measured by surface electrical capacitance*. *Plast Reconstr Surg*, 2007. **119**(2): p. 495-9.
118. Duinslaeger, L., et al., *Lyophilized keratinocyte cell lysates contain multiple mitogenic activities and stimulate closure of meshed skin autograft-covered burn wounds with efficiency similar to that of fresh allogeneic keratinocyte cultures*. *Plast Reconstr Surg*, 1996. **98**(1): p. 110-7.
119. Innes, M.E., et al., *The use of silver coated dressings on donor site wounds: a prospective, controlled matched pair study*. *Burns*, 2001. **27**(6): p. 621-7.
120. Sawhney, C.P., G.V. Subbaraju, and R.N. Chakravarti, *Healing of donor sites of split skin grafts. An experimental study in pigs*. *Br J Plast Surg*, 1969. **22**(4): p. 359-64.
121. Brain, A., et al., *Survival of cultured allogeneic keratinocytes transplanted to deep dermal bed assessed with probe specific for Y chromosome*. *BMJ*, 1989. **298**(6678): p. 917-9.
122. Tamariz-Dominguez, E., F. Castro-Munozledo, and W. Kuri-Harcuch, *Growth factors and extracellular matrix proteins during wound healing promoted with frozen cultured sheets of human epidermal keratinocytes*. *Cell Tissue Res*, 2002. **307**(1): p. 79-89.
123. Werner, S., T. Krieg, and H. Smola, *Keratinocyte-Fibroblast Interactions in Wound Healing*. *J Invest Dermatol*. **127**(5): p. 998-1008.
124. Smola, H., G. Thiekotter, and N.E. Fusenig, *Mutual induction of growth factor gene expression by epidermal-dermal cell interaction*. *J Cell Biol*, 1993. **122**(2): p. 417-29.
125. Waelti, E.R., et al., *Co-culture of human keratinocytes on post-mitotic human dermal fibroblast feeder cells: production of large amounts of interleukin 6*. *J Invest Dermatol*, 1992. **98**(5): p. 805-8.

126. Boxman, I.L., et al., *Role of fibroblasts in the regulation of proinflammatory interleukin IL-1, IL-6 and IL-8 levels induced by keratinocyte-derived IL-1*. Arch Dermatol Res, 1996. **288**(7): p. 391-8.
127. Stoner, M.L. and F.M. Wood, *Cultured epithelial autograft "take" confirmed by the presence of cytokeratin 9*. J Invest Dermatol, 1999. **112**(3): p. 391-2.