

## Où en est-on de la greffe de cellules souches limbiques ?

Vincent Borderie, Cristina Georgeon



**L**e déficit complet en cellules souches limbiques reste une des pathologies cornéennes les plus graves et les plus difficiles à traiter. Néanmoins les progrès des connaissances sur le renouvellement des cellules épithéliales cornéennes réalisés au cours des 20 dernières années ont permis d'apporter à un certain nombre de patients aveugles par insuffisance limbique une solution thérapeutique leur permettant de recouvrer une vision utile. Ces approches thérapeutiques sont le premier pas de la thérapie cellulaire en ophtalmologie et constituent un saut qualitatif majeur dans la prise en charge de ces patients. Comparée à la greffe de tissu cornéen, la greffe de cellules souches limbiques cultivées au laboratoire est en effet une révolution en ophtalmologie.

Le déficit complet en cellules souches limbiques est une pathologie cornéenne très sévère. Elle peut compliquer de nombreuses affections cornéennes traumatiques, inflammatoires, infectieuses, iatrogènes ou génétiques. Mais la première cause reste la brûlure oculaire grave. Elle entraîne une perte de l'homéostasie cornéenne avec des troubles du renouvellement de l'épithélium cornéen – source d'ulcères cornéens chroniques allant jusqu'à la perforation et un envahissement de la surface cornéenne par l'épithélium conjonctival qui est opaque et néovascularisé – et s'accompagne d'une fibrose stromale. Cette pathologie engendre une baisse de la vision au-delà du seuil légal de la cécité. Elle est source d'une symptomatologie fonctionnelle floride : photophobie, irritation, rougeur, larmolement, brûlure, douleur, blépharospasme. Tous ces symptômes altèrent profondément la qualité de vie des patients.

### Comment évoquer le diagnostic d'insuffisance limbique ?

Le diagnostic de l'insuffisance limbique est actuellement bien codifié. Il a récemment fait l'objet d'une conférence de consensus internationale [1]. L'examen de la surface cornéenne après instillation de fluorescéine est essentiel au diagnostic. En cas d'insuffisance limbique,

l'épithélium cornéen est irrégulier et anormalement perméable à la fluorescéine (figure 1). Cette imprégnation de l'épithélium par le colorant est à distinguer de la prise de fluorescéine observée dans les defects épithéliaux et les ulcères (qui peuvent être également présents au cours de l'insuffisance limbique). Il s'agit d'une imprégnation tardive, globale et diffuse de l'épithélium cornéen et non d'une coloration immédiate de la couche de Bowman mise à nu au cours d'un ulcère ou d'un defect épithélial.



**Figure 1.** Aspect pré- et postopératoire d'un œil présentant une insuffisance limbique complète secondaire à une brûlure par la chaux et traité par une autogreffe de cellules souches limbiques cultivées. L'acuité visuelle a progressé de 19 lignes sans autre intervention.

Centre hospitalier national d'ophtalmologie des Quinze-Vingts, Paris

Observée au fort grossissement en lumière blanche, la surface cornéenne est grisâtre et opacifiée. Elle est le siège d'une néovascularisation superficielle à partir du limbe. Au niveau du limbe, les palissades de Vogt ne sont plus visibles. Un aspect en tourbillon centré sur le vertex cornéen est observé dans les insuffisances limbiques complètes. Les signes cliniques se développent d'abord dans la région limbique puis progressent vers le centre de la cornée. C'est l'atteinte de la zone optique centrale qui entraîne la baisse de vision profonde. À un stade évolué, une fibrose sous-épithéliale se développe, qui opacifie le stroma cornéen (figure 1).

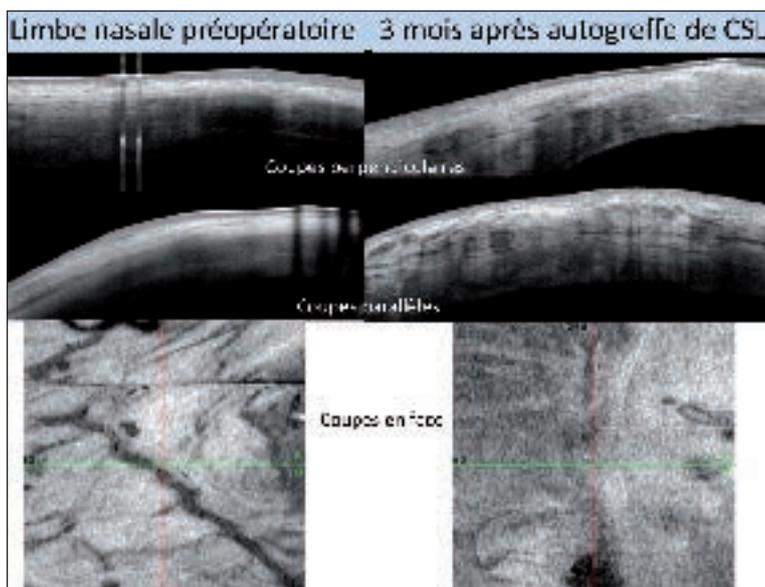
## Comment affirmer le diagnostic d'insuffisance limbique ?

L'examen le plus simple pour affirmer le diagnostic est l'OCT *spectral domain* [2,3]. Il présente l'avantage d'être assez rapide à réaliser et non invasif. Il faut débiter par un *mapping* épithélial qui montre une grande variabilité de l'épaisseur épithéliale cornéenne, avec typiquement un aspect en rayons de roues du *mapping* épithélial. Les coupes cornéennes montrent un épithélium cornéen aminci et hyperréfléctif. La membrane basale épithéliale n'est pas individualisable et une hyperréfléctivité du stroma antérieur est présente en présence d'une fibrose sous-épithéliale. Le bilan est complété par des coupes transversales et parallèles au limbe ainsi que des coupes en face du limbe (figure 2). Sur ces images du limbe, on observe une disparition de la transition normale entre

l'épithélium conjonctival hyperréfléctif et l'épithélium cornéen hyporéfléctif dans la région limbique (coupes perpendiculaires au limbe), ainsi qu'une disparition des palissades de Vogt hyperréfléctives et des cryptes limbiques hyporéfléctives normalement visibles sur les coupes parallèles au limbe et sur les coupes en face.

Ce bilan OCT peut être complété par une étude en microscopie confocale. Celle-ci permet de visualiser la présence de cellules caliciformes dans l'épithélium cornéen, signe pathognomonique mais inconstant de l'insuffisance limbique. Elle montre une perte de l'architecture normale de l'épithélium cornéen (avec une organisation en 3 couches : superficielle, intermédiaire et basale) et de la niche limbique (palissade de Vogt, cryptes limbiques, transition nette entre l'épithélium conjonctival et l'épithélium cornéen). Les autres signes de l'insuffisance limbique sont l'atteinte du plexus nerveux sous-basal et la diminution de la densité cellulaire basale épithéliale.

La cytologie cornéenne est une technique plus invasive que les 2 précédentes. Elle est réalisée habituellement avec la technique des empreintes cornéennes qui consiste à appliquer sur la cornée un papier filtre permettant de prélever des cellules superficielles. Les cellules prélevées sont ensuite colorées (coloration HES ou PAS) ou marquées en immunofluorescence ou immunohistochimie. Elles peuvent également être étudiées en biologie moléculaire (RT-PCR). Le diagnostic repose sur la mise en évidence de cellules épithéliales conjonctivales à la surface de la cornée : cellules caliciformes marquées par le PAS ou exprimant MUC1 ou MUC5AC, cellules épithéliales conjonctivales exprimant CK19, CK7 ou CK13.



**Figure 2.** Aspect pré- et postopératoire en OCT *spectral domain* du limbe du patient de la figure 3.

En préopératoire, la coupe perpendiculaire au limbe ne montre qu'un seul épithélium hyperréfléctif (conjonctival) qui recouvre toute la surface oculaire. Les coupes parallèles au limbe et en face ne montrent pas de palissades de Vogt ni de cryptes limbiques. Seuls des troncs vasculaires sont visibles sur la coupe en face. En postopératoire, la coupe perpendiculaire au limbe révèle un épithélium hyperréfléctif qui recouvre la conjonctive et un épithélium hyporéfléctif qui recouvre la cornée. L'épithélium limbique est plus épais que l'épithélium cornéen. Les coupes parallèles au limbe et en face montrent un début de reconstruction de la niche limbique.

# Greffes et thérapeutiques innovantes de la cornée

## Quelles sont les thérapeutiques actuellement disponibles ?

La première approche thérapeutique a fait suite à la découverte du rôle du limbe dans le renouvellement de l'épithélium cornéen. Il s'agissait de la greffe de tissu limbique autologue. Cette autogreffe de limbe, proposée par Kenyon en 1989 et toujours pratiquée par certaines équipes, est une intervention assez invasive pour l'œil controlatéral sain [4]. En effet, environ un tiers du limbe de l'œil sain est prélevé et greffé sur l'œil pathologique. La littérature ne mentionne pas de décompensation épithéliale de l'œil donneur après une autogreffe de limbe mais un prélèvement plus petit paraît souhaitable. Comme il s'agit d'une autogreffe, il n'y a pas de rejet du tissu limbique greffé. La greffe n'est réalisable que s'il existe un œil donneur controlatéral sain.

Dans les suites du développement de l'autogreffe de limbe, l'allogreffe de tissu limbique a été proposée pour traiter les pathologies bilatérales ou sur œil unique. Cette allogreffe peut être réalisée à partir d'un greffon cornéen ou d'un prélèvement de limbe réalisé chez un donneur vivant apparenté au patient. Comme le donneur et le receveur n'ont pas les mêmes antigènes d'histocompatibilité, le tissu limbique greffé, qui est très immunogène – le limbe est la région où résident les cellules immunitaires de la cornée –, est l'objet d'une forte réaction de rejet de la part du système immunitaire du receveur. Une immunosuppression systémique lourde est nécessaire pour que la greffe soit acceptée. Ce traitement comporte des risques importants.

Parallèlement à la greffe de tissu limbique, la greffe de membrane amniotique a été développée pour traiter de nombreuses pathologies de la surface oculaire. Elle ne permet pas de reconstituer les cellules souches limbiques détruites mais elle peut être combinée à la greffe de limbe pour favoriser la cicatrisation épithéliale.

La révolution technologique a été réalisée il y a 20 ans par des équipes italienne, asiatique et américaine qui ont transposé les techniques de culture *in vitro* des cellules souches limbiques à la greffe de limbe. L'épopée a débuté par la greffe de cellules souches limbiques autologues cultivées [figures 1-3] [5]. Cette technique consiste à prélever un petit fragment de limbe (1 à 2 mm) sur l'œil sain, extraire et cultiver les cellules souches limbiques au laboratoire, puis greffer sur l'œil pathologique les cellules cultivées. Deux grandes techniques de culture ont été développées : la culture de cellules dissociées avec des cellules nourricières d'origine animale (fibroblastes murins 3T3) et celle de la biopsie limbique sur une membrane amniotique humaine sans fibroblastes murins.



**Figure 3.** Aspect pré- et postopératoire d'un œil présentant une insuffisance limbique complète secondaire à une brûlure sévère et traité par une autogreffe de cellules souches limbiques cultivées. On constate une disparition des néovaisseaux cornéens superficiels, une régularisation de l'épithélium cornéen, une disparition de l'hyperperméabilité épithéliale et une régression des symptômes. Du fait de l'opacification du stroma cornéen, une greffe de cornée sera nécessaire dans un deuxième temps pour améliorer l'acuité visuelle.

Quelle que soit la technique de culture des cellules souches limbiques, la thérapie cellulaire autologue s'est rapidement montrée efficace chez un grand nombre de patients. Commercialisée sous le nom « Holoclar », elle est actuellement disponible en dehors des études cliniques sous la forme d'un produit de thérapie cellulaire. La procédure est organisée et contrôlée par le laboratoire Chiesi. Une biopsie de petite taille est réalisée sur l'œil sain et envoyée en Italie à l'unité de culture cellulaire. Après plusieurs mois, si la culture a permis l'expansion des cellules souches limbiques, un greffon est acheminé vers le centre greffeur pour être transplanté sur l'œil pathologique.

Il restait le problème des atteintes bilatérales ou sur œil unique pour lequel la thérapie cellulaire autologue n'était pas utilisable. Comme pour la greffe de tissu limbique, un œil donneur (greffon cornéen ou parent) a été

utilisé pour développer des techniques de thérapie cellulaire allogénique. Là encore, le problème du rejet des cellules cultivées a limité le développement des technologies. Des greffes de cellules souches de la muqueuse buccale autologue ont été proposées pour pallier le problème du rejet. Néanmoins, bien que transdifférenciées lors de la culture, les cellules cultivées n'ont probablement pas toutes les caractéristiques des cellules souches limbiques.

La dernière évolution chirurgicale est la SLET (*Simple Limbal Epithelial Transplantation*) développée en Inde [6]. Cette technique vise à réaliser une thérapie cellulaire autologue sans la phase de culture en laboratoire. Le prélèvement de limbe réalisé sur l'œil sain est découpé en petits fragments qui sont appliqués avec une colle biologique sur une membrane amniotique humaine suturée sur la cornée de l'œil pathologique. Une seule intervention est nécessaire et le coût est inférieur à celui de la thérapie cellulaire. Néanmoins la prise des petits greffons n'est pas constante.

Le traitement de l'insuffisance limbique complète est donc actuellement chirurgical et fait appel à des biotechnologies avancées. Le collyre au sérum autologue est néanmoins souvent utilisé comme adjuvant de la greffe de cellules souches pour apporter des facteurs de croissance utiles à leur maintien et à leur développement.

## Quels sont les résultats de ces diverses techniques ?

Les greffes autologues affichent globalement un bon pronostic, avec un taux de succès proche de 70 à 80%. La définition du succès d'une greffe de limbe reste sujet à débat. Elle est habituellement clinique. On considère que la greffe est un succès lorsqu'il n'y a pas de récurrence des signes de l'insuffisance limbique au niveau de la zone centrale de la cornée. Lorsque ces signes récidivent dans la zone optique de la cornée, on estime alors que la greffe est en échec. Ce critère d'évaluation est en grande partie subjectif. Il est utilement complété par le pourcentage de patients dont la vision s'améliore après la chirurgie. À moyen terme (3 à 5 ans), la probabilité de survie des cellules greffées en autologue est proche de 70% quelle que soit la technique utilisée (greffe de tissu limbique, greffe de cellules souches cultivées ou SLET). On ne retrouve pas de différence entre les techniques de culture cellulaire pour la greffe de cellules souches limbiques cultivées. La technique de la SLET comporte un risque spécifique : la perte des petits fragments de limbe greffés que

la colle biologique a parfois du mal à maintenir en place. En termes d'amélioration de l'acuité visuelle, les résultats sont proches du taux de survie des cellules greffées ou légèrement inférieurs. Globalement, à moyen terme, 60 à 70% des patients gagnent au moins 2 lignes d'acuité visuelle.

En termes de sécurité, les greffes autologues ont peu d'effets secondaires. Le prélèvement du greffon est sans danger pour l'œil donneur, ce d'autant qu'on utilise une technique de thérapie cellulaire ou la SLET. Néanmoins, même après le prélèvement d'un tiers de la circonférence limbique pour la greffe de tissu limbique, il n'a pas été rapporté de décompensation de l'œil donneur.

Pour les allogreffes, les résultats sont moins bons. Beaucoup d'études montrent des succès à court terme, puis une diminution importante de la survie des cellules greffées à moyen terme. Cette survie est principalement limitée par la réaction de rejet. Le taux de succès est plus important lorsque les patients sont traités par des immunosuppresseurs par voie systémique au long cours, mais le risque d'effets secondaires graves liés à l'immunosuppression n'est pas négligeable. Le nombre de patients traités par une allogreffe de cellules souches limbiques est beaucoup moins important que celui de patients ayant reçu une autogreffe. Une des raisons pour expliquer cette différence est probablement la plus faible efficacité de l'allogreffe comparée à celle de l'autogreffe. Il ne semble pas y avoir de différence majeure entre une greffe de tissu limbique et une greffe de cellules souches limbiques cultivées. Pour la greffe de cellules souches de la muqueuse orale, les résultats rapportés sont souvent à court terme et l'amélioration n'est habituellement pas spectaculaire. L'avantage évident reste l'absence de rejet des cellules greffées.

Le niveau de sécurité des allogreffes est inférieur à celui des autogreffes. Parmi les effets secondaires rapportés, on note des perforations du globe oculaire, des kératites infectieuses parfois sévères, des infections du segment antérieur ou du segment postérieur favorisées par l'immunosuppression, des effets secondaires systémiques des immunosuppresseurs. Globalement, le traitement idéal de l'insuffisance limbique sévère bilatérale ou sur œil unique reste à développer. La kératoprothèse peut être discutée dans ces cas sévères avec un taux de succès souvent supérieur à celui de la greffe de cellules souches.

# Greffes et thérapeutiques innovantes de la cornée

## Quelle technique choisir pour traiter un patient présentant une insuffisance limbique complète en 2019 ?

Lorsqu'il existe un œil donneur, les 3 techniques de greffe de cellules souches limbiques autologues (greffe tissulaire, greffe de cellules cultivées et SLET) peuvent être utilisées. Le niveau d'efficacité est similaire entre les 3 techniques. Dans notre expérience, la greffe de cellules souches limbiques cultivées offre un niveau de sécurité supérieur à celui de l'autogreffe de tissu limbique. Cette constatation demande à être confirmée par d'autres études. Le choix entre les 3 techniques peut être guidé par des arguments économiques. Les techniques de thérapie cellulaire sont plus onéreuses que les techniques de greffe de tissu limbique ou que la SLET. Le rapport entre sécurité et coût est donc *in fine* l'argument du choix.

Pour les atteintes bilatérales ou sur œil unique, plusieurs options sont envisageables : l'abstention thérapeutique, l'allogreffe de tissu limbique sous immunosuppresseurs,

la greffe de cellules souches de la muqueuse buccale autologues cultivées, et la kératoprothèse. Il est actuellement difficile de préciser un arbre décisionnel fondé sur la médecine par les preuves. Lorsqu'un donneur vivant est disponible dans la famille, l'allogreffe de tissu limbique ou de cellules souches limbiques cultivées sous immunosuppresseurs a un pronostic proche de celui des autogreffes. Cette situation suppose qu'un des parents accepte le prélèvement d'une partie du limbe d'un de ses yeux.

## Conclusion

Les progrès des connaissances fondamentales sur la physiologie de l'épithélium cornéen et ceux des biotechnologies ont permis le développement de la thérapie cellulaire pour le traitement des insuffisances limbiques graves. Ces nouvelles technologies constituent un espoir majeur pour nos patients atteints d'une pathologie cécitante incurable jusqu'à une date encore récente.

## Références bibliographiques

- [1] Deng SX, Borderie V, Chan CC *et al.* Global consensus on definition, classification, diagnosis and staging of limbal stem cell deficiency. *Cornea*. 2019;38(3):364-75.
- [2] Banayan N, Georgeon C, Grieve K, Borderie VM. Spectral-domain optical coherence tomography in limbal stem cell deficiency. A case control study. *Am J Ophthalmol*. 2018;190:179-90.
- [3] Banayan N, Georgeon C, Grieve K, Ghoubay D, Baudouin F, Borderie V. In vivo confocal microscopy and optical coherence tomography as innovative tools for the diagnosis of limbal stem cell deficiency. *J Fr*

*Ophthalmol*. 2018;41(9):e395-e406.

[4] Kenyon KR, Tseng SC. Limbal autograft transplantation for ocular surface disorders. *Ophthalmology*. 1989;96(5):709-22.

[5] Rama P, Matuska S, Paganoni G *et al.* Limbal stem-cell therapy and long-term corneal regeneration. *N Engl J Med*. 2010;363(2):147-55.

[6] Basu S, Sureka SP, Shanbhag SS *et al.* Simple limbal epithelial transplantation: long-term clinical outcomes in 125 cases of unilateral chronic ocular surface burns. *Ophthalmology*. 2016;123(5):1000-10.