

# MISE AU POINT/IN-DEPTH REVIEW

## UTILISATION DE LA MEMBRANE AMNIOTIQUE EN OPHTALMOLOGIE

Naji WAKED, Valia EL-KAZZI

Waked N, El-Kazzi V. Utilisation de la membrane amniotique en ophtalmologie. J Méd Lib 2005 ; 53 (1) : 39-44.

**ABSTRACT :** The amniotic membrane, which is the innermost layer of the fetal membranes, is composed of a single layer of epithelial cells that lie on a basement membrane, and of a non-vascular collagenous stroma. These three components give the amniotic membrane its beneficial properties. The first therapeutic application of the amniotic membrane was in 1910, when it was used in skin transplantation. Thereafter, it was used in surgical procedures related to the abdomen, genitourinary tract and to the head and neck. In ophthalmology, De Roth, in 1940, was the first to use the amniotic membrane for conjunctival reconstruction. However, it was only in 1995 that publications on the subject started appearing again, when Tseng and many others began using the amniotic membrane again in the treatment of ocular surface (cornea and conjunctiva) diseases. In cases of total stem cell deficiency, amniotic membrane transplantation has been shown to be very useful when used in conjunction with limbal autografts or allografts. At this stage, however, further studies are needed to elucidate the real potential of the amniotic membrane in the treatment of different ocular surface (and other) disorders, and its exact mechanism(s) of action. This will help establish the applications of such treatment in medicine, in general, and in ophthalmology, in particular.

### I. HISTORIQUE

La membrane amniotique (MA) humaine est utilisée en médecine depuis 1910 ; la première utilisation documentée était par Davis dans la transplantation cutanée (brûlures et ulcères) [1-3]. Puis son utilisation fut retrouvée dans la chirurgie générale (prévention des adhérences et des infections, diminution de la douleur et induction de l'épithélialisation), la reconstruction génito-urinaire, la reconstruction de l'otolarynx et d'autres parties de la tête et du cou [2]. En ophtalmologie, les essais

Service d'ophtalmologie, Université Saint-Joseph, Hôtel-Dieu de France, Beyrouth, Liban.

Tirés à part : Docteur Naji Waked. Service d'ophtalmologie. CHU Hôtel-Dieu de France. Rue Alfred Naccache. Beyrouth. Liban.

Tél : (961) 3 252552

E-mail : wakednaji@yahoo.com

de De Roth, en 1940, dans le traitement des symblépharons et ceux de Sorsby plus tard dans les brûlures caustiques de l'œil, n'eurent pas de suite en raison des limites techniques de l'époque [1]. Récemment (1995), Tseng et al. ont réintroduit la MA et l'ont utilisée d'abord comme substrat dans la reconstruction du limbe chez le lapin, puis chez l'homme dans le traitement des défauts épithéliaux réfractaires ainsi que dans la reconstruction de la surface conjonctivale. Et depuis, la greffe de MA suscite un intérêt grandissant et est utilisée par de nombreuses équipes qui continuent à l'évaluer dans les pathologies oculaires de surface [3].

### II. QU'EST-CE QUE LA MA ?

#### ABRÉVIATIONS

E	: epithelial
K	: keratocyte
H	: hepatocyte
bF	: basic fibroblast
T	: transforming
GF	: growth factor
AGL	: autogreffe limbique
CS	: cellules souches
CSL	: cellules souches limbiques
DCSL	: déficit en cellules souches limbiques
GMA	: greffe de membrane amniotique
MA	: membrane amniotique
MMP	: métalloprotéinase
TMA	: transplantation de membrane amniotique
SO	: surface oculaire

Chez la femme enceinte, la poche des eaux est recouverte de 2 membranes fœtales : la membrane interne constitue la MA, l'externe étant le chorion. Sa fonction est de protéger le fœtus des insultes maternelles durant la grossesse.

*Histologiquement*, la MA est constituée d'un *épithélium* cubique monostratifié qui repose sur une *membrane basale* composée de collagène type IV et VII, de laminine 1 et 5 et de fibronectine (retrouvés aussi au niveau de la membrane basale de la cornée et de la conjonctive) [1, 4-6], et d'un *stroma* collagène avasculaire et épais formé de 3 couches (la couche acellulaire compacte, la couche des fibroblastes et la couche spongieuse). Celui-ci est constitué de collagène I, III et VI [1, 3]. Par ailleurs, la MA contient un certain nombre de facteurs de croissance (EGF, KGF, HGF, bFGF) et de cytokines ainsi que différentes anti-protéases ( <sub>1</sub> anti-trypsine, <sub>2</sub> anti-chimotrypsine, <sub>2</sub> macroglobuline, inhibiteur de l' <sub>2</sub> plasmine) [5-7]. Enfin, l'expression de HLA est absente au niveau de la

MA [1-6]. De cette composition de la MA découlent ses différents mécanismes d'action et propriétés.

### III. MÉCANISMES D'ACTION ET PROPRIÉTÉS

Les propriétés thérapeutiques de la MA passent par des mécanismes d'action divers, bien documentés *in vitro* et chez l'animal, et qui convergent vers deux grands résultats :

- a. l'activation de l'épithélialisation
- b. l'inhibition de la fibrose.

On distingue principalement huit mécanismes qui peuvent être interdépendants :

- **1. Effet anti-fibrotique** qui passe par une inhibition de la voie de signalisation de TGF- $\beta$  (puissante famille de cytokines) responsable de l'activation des fibroblastes dans le processus de cicatrisation. Cet effet réduit donc les cicatrices fibreuses indésirables au niveau de l'œil [8].
- **2. Effet anti-inflammatoire** qui résulte de mécanismes complexes : suppression des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 et 1 $\beta$ ), up-régulation des cytokines anti-inflammatoires, présence au niveau de la MA de différentes anti-protéases (citées auparavant) qui la rendent capable d'inhiber beaucoup de protéases et de collagénases inflammatoires [7, 9], induction de l'apoptose des cellules inflammatoires [10], etc.
- **3. Effet anti-infectieux** contre un large spectre de bactéries : *Streptococcus A* hémolytique, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*. D'autre part, plusieurs facteurs anti-microbiens sont présents à son niveau [11].
- **4. Effet anti-angiogénèse** généré par différents messages anti-angiogéniques. La surface oculaire couverte par la MA ne montre pas de vascularisation, prévenant ainsi le risque de rejet [11].
- **5. Effet immunologique** : La MA semble être un tissu immunologiquement privilégié et contient certains facteurs immunorégulateurs (HLA-G et Fas ligand) [12]. Aucun phénomène de rejet n'a été observé dans son histoire.
- **6. Préservation du phénotype des cellules épithéliales limbiques** : L'expression des différents marqueurs spécifiques des cellules limbiques (p63, Ki-67, kératine, intégrine et connexine) au niveau d'un explant limbique cultivé sur MA ressemble à celle retrouvée au niveau d'un limbe fraîchement préparé. Ceci suggère que la MA est un substrat capable de supporter la propagation et la préservation des cellules limbiques qui retiennent leurs propriétés de cycle cellulaire lent, de la longue rétention de BrdU (bromodeoxyuridine monophosphate) et de leur non différenciation cellulaire, des propriétés que les cellules souches possèdent *in vivo* [12-16].

- **7. Préservation du phénotype conjonctival** : en effet, les cellules conjonctivales cultivées sur MA ainsi que les conjonctives lésées reconstruites par greffe de MA montrent un phénotype épithélial normal confirmé par immunohistochimie [16-19].

- **8. Facilitation de l'épithélialisation dans les cas d'ulcères cornéens neurotrophiques** : cet effet est expliqué par le fait que la MA soutient l'expression de NGF (*nerve growth factor*) facilitant ainsi la régénération du nerf lésé par ulcération (nerf V) [1-4, 20].

### IV. ÉTAPES DE L'UTILISATION DE LA MA

Pour des raisons de stérilité évidentes, le prélèvement d'annios ne peut être réalisé que dans les cas de grossesses non pathologiques pour lesquelles une *césarienne* est programmée. Les principales contre-indications comportent les femmes mineures, les pathologies infectieuses chez la mère, notamment génitales, tout événement susceptible de mettre en jeu la vie de l'enfant et celle de la mère et enfin toute sérologie positive HIV, HTLV-1 ou -2, hépatite B ou C, syphilis. Après accord de la patiente, des examens sont réalisés le jour de l'accouchement ainsi que 4 à 6 mois plus tard [21]. Après avoir examiné le placenta, et s'il est jugé convenable, le *prélèvement* est effectué et le placenta est ensuite conservé dans une banque d'organes. Quant à la *préparation*, elle consiste à rincer le placenta plusieurs fois avec une solution spécifique, sous un flux laminaire et dans un enceinte de hood, puis l'annios est disséqué du reste du chorion et déposé par son côté stromal sur un support de nitrocellulose. Des coupes de 4-5 cm de la MA avec son support sont ensuite conservées à -80 °C dans un mélange isovolumétrique de solution de Dulbecco et de glycérol pendant au moins 3 mois pour être décongelée après à la température ambiante avant son utilisation [21]. Lors de l'opération, et sous anesthésie locale ou générale, la MA est retirée du filtre de nitrocellulose et déposée en regard de la lésion à couvrir et suturée avec du Nylon 9/0 ou 10/0 selon les cas [1].

Par ailleurs, il existe différents moyens pour utiliser la MA ; celle-ci via sa matrice peut servir de substrat pour la culture *in vitro* des cellules conjonctivales et cornéennes [13-19] avec pour ces dernières, l'avantage de l'« *air lifting* » qui réduit les espaces intercellulaires et promeut la fonction barrière [22]. De même, elle peut être utilisée fraîche (conservée à +4 °C) ou congelée (à -80 °C) avec les avantages de cette dernière l'emportant sur la première [23]. Elle est aussi utilisée en multicouches pour le déficit stromal profond *v/s* monocouche pour le reste des utilisations [23-24]. Elle s'applique à l'intérieur de l'ulcère dans la technique d'« *inlay* » [3, 25] *v/s* la technique d'« *overlay* » [3, 26] où la surface cornéenne toute entière est recouverte par la MA. Enfin, l'épithélium peut être orienté vers le haut comme dans la plupart des cas, ou vers le bas quand il y a une inflammation aiguë [11].

## V. LA SURFACE OCULAIRE

Thoft et Friend ont défini, en 1997, le concept de la surface oculaire (SO) regroupant l'*épithélium cornéen* circonscrit par le *limbe* (où résident les cellules souches limbiques [CSL] responsables de la régénération de cet épithélium), l'*épithélium conjonctival* et le *film lacrymal* [1]. Ces 3 composantes sont toutes indispensables au maintien de l'homéostasie de la SO. Cette dernière maintient la transparence de la cornée, sert de première barrière contre les infections et assure un confort fonctionnel dans les conditions physiologiques normales [27].

## VI. PATHOLOGIES DE LA SURFACE OCULAIRE

Un dysfonctionnement de la SO est responsable de troubles dont la gravité s'étend d'une simple irritation pauci-symptomatique à des anomalies de la cicatrisation et de la croissance de l'épithélium qui nécessitent parfois le recours au difficile traitement chirurgical de la reconstruction de la SO. Les causes d'atteinte de la SO se divisent en *maladies systémiques* (syndrome de Stevens-Johnson, pemphigoïde oculaire, arthrite rhumatoïde, maladie de Sjögren, nécrolyse épidermique toxique) et *maladies et lésions oculaires* (kératoconjunctivites par infections ou par syndrome sec, brûlures chimiques et thermiques, chirurgies oculaires multiples) [3]. La destruction de la surface oculaire est caractérisée par la présence d'un épithélium de surface anormal. Ce dernier peut être absent, par exemple au cours des ulcères chroniques, comme il peut aussi changer de phénotype (*métaplasie épithéliale*) qui touche aussi bien la cornée que la conjonctive. On distingue :

– la métaplasie épithéliale *squameuse* caractérisée par la transformation pathologique de l'épithélium de surface non kératinisé en épithélium kératinisé.

– la métaplasie *conjonctivale* de la cornée (syndrome de déficit en CSL). Il est l'expression d'un double processus :

1. une régénération qualitativement et/ou quantitativement insuffisante de l'épithélium cornéen par insuffisance en CSL
2. l'invasion cornéenne par une prolifération fibrovasculaire d'origine conjonctivale [1].

## VII. UTILISATION DE LA MA EN CLINIQUE

L'utilisation clinique de la MA dans la reconstruction de la surface oculaire peut être divisée en catégories selon la pathologie en cause et selon le tissu atteint.

### 1. Cas d'atteinte cornéenne sans déficit en CSL

Cette entité comporte :

a. Les *ulcères cornéens* de différentes profondeurs, y compris la perforation, qui constituent un problème sérieux et urgent en ophtalmologie. Dans ces cas, quand les traitements conventionnels échouent, la transplantation de MA (TMA) vient offrir ses avantages ; elle évite

les complications potentielles de la greffe de cornée (surtout le rejet), régénère un tissu cornéen où celui-ci manque et préserve l'apparence cosmétique du patient [28]. Un total de 9 études existe dans la littérature [24, 26, 28-34]. Toutes ont noté que l'inflammation de la SO a diminué d'une façon marquée après TMA et le déficit couvert a cicatrisé rapidement en 1 à 4 semaines. Le pourcentage de cicatrisation était de 77% en moyenne (74/96 yeux).

b. La *kératopathie bulleuse symptomatique* : C'est un désordre dû à une décompensation de l'endothélium cornéen, caractérisé par un œdème du stroma avec ou sans bulle épithéliale. Sans traitement, cette maladie progresse vers une détérioration notable avec une gêne oculaire persistante. Comme la MA est un substrat idéal dans la restauration du stroma cornéen, Pires et al. [35] ont rapporté un succès général de 90% (43/48 yeux) avec une surface stable et une atténuation de la douleur, durant une période de suivi de 33,8 semaines.

c. La *kératopathie en bandelette* qui signifie la déposition de calcium au niveau de la cornée responsable d'une inflammation chronique. Sans traitement, la kératopathie en bandelette ne montre aucune rémission et progresse lentement. Anderson et al. [36] ont rapporté un succès parmi 14/15 yeux (93%) en utilisant la TMA pour diminuer la douleur et ont obtenu une épithélialisation dans 15/16 (94%) des cas en 15,2 jours durant une période de follow-up de 14,6 mois. L'amélioration de la vision est observée chez 5/9 (44% des yeux).

### 2. Cas d'atteinte cornéenne avec déficit en CSL (DCSL)

Le syndrome de DCSL peut être causé par un nombre de pathologies cornéennes comme les brûlures chimiques et thermiques, le syndrome de Stevens-Johnson, le pemphigoïde oculaire, les infections microbiennes sévères, la kératopathie par radiation, l'aniridie... Les patients atteints par ce syndrome se plaignent souvent d'une photophobie sévère (sensibilité à la lumière) et d'une baisse importante de l'acuité visuelle. Sans traitement, ce syndrome s'aggrave progressivement avec le temps [37-38]. Les études expérimentales [39-46] ont montré les résultats suivants : pour le déficit *partiel* en CS, la transplantation de MA sans CSL est suffisante pour restaurer la surface cornéenne et améliorer la vision chez la majorité des patients. Quand le déficit est *total*, mais *unilatéral*, l'autogreffe de CSL sera performée avec la greffe de MA. Ainsi, la MA augmente le succès de transplantation de CSL. Le succès global de cette procédure est très important. Quand le déficit est *total*, mais *bilatéral*, l'allogreffe de CSL serait nécessaire pour restaurer la surface cornéenne lésée. Le succès global est plutôt influencé par la survie de l'allogreffe.

### 3. Reconstruction de la surface conjonctivale par la MA

a. Dans les *maladies conjonctivales autres que le ptérygion* : qui comprennent les tumeurs, les cicatrices inesthétiques ou les symblépharons. L'échec des larges résections de la conjonctive dans ces cas est fréquem-

ment rapporté [47] alors qu'un total de 7 études [29, 31, 48-52] a montré que le large défaut conjonctival couvert par la MA cicatrise rapidement et que la surface résultante est moins enflammée avec un tissu moins fibreux. Le taux de succès global est de 89% (77/87 yeux).

**b. Après ablation du ptérygion :** ce dernier est une pathologie oculaire fréquente due à une exposition chronique à la lumière ultra-violette. Il est caractérisé par une prolifération fibrovasculaire progressive du stroma et par l'altération des CSL adjacentes. Le traitement du ptérygion demeure chirurgical, et la surface conjonctivale ainsi dénudée est laissée, soit non couverte et traitée par application locale de mitomycine C ou irradiée par des rayons  $\gamma$ , soit couverte par une autogreffe conjonctivale. Mais ces modalités thérapeutiques sont associées à des complications sérieuses. D'où la MA peut être utilisée comme une alternative de greffe [37]. Un total de six études a rapporté un taux moyen de récurrence de 3% seulement [53-55]. Il en est de même pour le ptérygion récurrent qui est encore plus agressif que le primaire. Les études faites [31, 53, 56-57] ont montré que la récurrence est presque nulle avec la TMA à condition d'injecter des corticoïdes ou de s'en servir en plus de l'autogreffe conjonctivale dans des cas spécifiques.

**c. Après glaucome et fonte sclérale :** la TMA paraît efficace dans le maintien du processus de filtration dans le traitement chirurgical du glaucome [58-60] (trabéculotomie). D'autre part, un seul cas de réussite a été documenté quand il existe un déficit scléral extensif [61].

### 3. Reconstruction des deux surfaces cornéenne et conjonctivale

Une des urgences les plus dévastatrices et exaltantes en ophtalmologie est la brûlure chimique des surfaces cornéenne et conjonctivale qui aboutit à une inflammation sévère qui peut devenir chronique. Par conséquent, la granulation et la nécrose mènent invariablement à des fibroses importantes. Les thérapies conventionnelles utilisent les traitements médicaux pour supprimer l'inflammation et favoriser la cicatrisation avec un succès limité. Par contre, les résultats étaient satisfaisants dans les cas où la TMA a été utilisée pour traiter les brûlures à la phase aiguë [62-66]. Les cas de brûlures plus importantes (grade 4) nécessitent en plus une transplantation de CS.

## VIII. COMPLICATIONS

Il n'existe dans la littérature aucun rapport qui parle des infections microbiennes liées à la TMA. Kim et al. [57] ont rapporté certaines complications comme :

- l'hémorragie sous-membraneuse (3/25 yeux, 12%)
- le détachement précoce de la membrane (1/25 yeux, 4%).

Ceci est plutôt en relation avec la chirurgie et non pas la MA elle-même. Gabler et Lohmann [67] ont rapporté un cas d'hypopion stérile (inflammation à l'intérieur de la chambre antérieure) suite à des transplantations itératives

de MA. Ils ont attribué ces complications aux effets immunologiques, toxiques ou hypersensitifs de la MA. Aucune complication similaire n'a été rapportée par d'autres.

## IX. CONCLUSION

La greffe amniotique est une technique chirurgicale prometteuse dans un certain nombre de pathologies de la surface oculaire. Ces bons résultats publiés, associés à l'abondance potentielle d'amnios, rendent cette greffe très attractive. Mais les techniques de prélèvement, de conditionnement et de stockage de la MA nécessitent un matériel assez lourd et cher, dans une structure appelée banque de tissus. Une fois ces conditions assurées, l'application de cette technique de TMA devient assez facile et rentable. Il existe plusieurs banques de tissus en Europe et aux Etats-Unis, mais pas encore au Liban et dans les pays arabes voisins. D'où le besoin d'encourager à tous les niveaux, toute équipe médicale qui vise à réaliser un tel projet sur le champ libanais, indispensable pour le progrès de la médecine au Liban et dans la région.

## RÉFÉRENCES

1. Ellies P, Anderson D, Dighiero P, Legeais JM, Renard G, Tseng SCG. Mise au point sur la membrane amniotique humaine dans la prise en charge des pathologies de la surface oculaire. *J Fr Ophtalmol* 2001 ; 24 : 546-56.
2. Prabhasawat P. Application of preserved human amniotic membrane for corneal surface reconstruction. *Conferences* Nov 1998, Jan 1999, May 1999.
3. Schwam LB. Human amniotic membrane transplantation for the treatment of ocular surface disease. *DCMS Medical Articles*, 2002
4. Fukuda K, Chikama T, Nakamura M, Nishida T. Differential distribution of subchains of the basement membrane components type IV collagen and laminin among the amniotic membrane, cornea and conjunctiva. *Cornea* 1999 ; 18 : 73-9.
5. Zito E, Boederie V, Touzeau O, Bourcier T, Allouch C, Laroche L. Greffe de membrane amniotique dans les pathologies sévères de l'épithélium cornéen. *J Fr Ophtalmol* 2002 ; 25 : 879-88.
6. Muraine M, Descargues G, Franck O et al. La greffe de membrane amniotique dans les pathologies oculaires de surface. *J Fr Ophtalmol* 2001 ; 24 : 798-812.
7. Dogru M, Yildiz M, Baykara M, Özçetin H, Ertürk H. Corneal sensitivity and ocular surface changes following preserved amniotic membrane transplantation for non-healing corneal ulcers. *Eye* 2003 ; 17 : 139-48.
8. Tseng SCG, Li D-Q, Ma X. Suppression of transforming factor isoforms, TGF- $\beta$  receptor II, and myofibroblast differentiation in cultured human corneal and limbal fibroblasts by amniotic membrane matrix. *J Cell Physiol* 1999 ; 179 : 325-35.
9. Solomon A, Rosenblatt M, Monroy D, Ji Z, Plugfelder SC, Tseng SCG. Suppression of IL1 and IL1 in human limbal epithelial cells cultured on the amniotic membrane stromal matrix. *Br J Ophthalmol* 2001 ; 85 : 444-9.
10. Heiligenhaus A, Bauer D, Meller D, Steuhl KP, Tseng SCG. Improvement of HSV-1 necrotizing keratitis with

- amniotic membrane transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001 ; 42 : 1969-74.
11. Dua HS, Gomes JAP, King JA, Maharajan S. The amniotic membrane in ophthalmology. *Surv Ophthalmol* 2004 ; 49 : 51-77.
  12. Kubo M, Sonoda Y, Muramatsu R, Usui M. Immunogenicity of human amniotic membrane in experimental xenotransplantation. *Invest Ophthalmol. Vis Sci* 2001 ; 42 : 1539-46.
  13. Meller D, Pires RTF, Tseng SCG. Ex vivo preservation and expansion of human limbal epithelial stem cells on amniotic membrane cultures. *Br J Ophthalmol* 2002 ; 86 : 463-71.
  14. Wang DY, Hsueh YJ, Yang CV, Chen JK. Propagation and phenotypic preservation of rabbit limbal epithelial cells on amniotic membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003 ; 44 : 4698-704.
  15. Grueterich M, Espana EM, Tseng SCG. Connexin 43 expression and proliferation of human limbal epithelium on intact and denuded amniotic membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002 ; 43 : 63-71.
  16. Grueterich M, Espana EM, Touhami A, Ti SE, Tseng SCG. Phenotypic study of a case with successful transplantation of ex vivo expanded human limbal epithelium for unilateral total limbal stem cell deficiency. *Ophthalmology* 2002 ; 109 : 1547-52.
  17. Espana EM, Grueterich M, Ti SE, Tseng SCG. Phenotypic study of a case receiving a keratolimbal allograft and amniotic membrane for total limbal stem cell deficiency. *Ophthalmology* 2003 ; 110 : 481-6.
  18. Meller D, Tseng SCG. Conjunctival epithelial cell differentiation on amniotic membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999 ; 40 : 878-86.
  19. Prabhasawat P, Tseng SCG. Impression cytology study of epithelial phenotype of ocular surface reconstructed by preserved human amniotic membrane. *Arch Ophthalmol* 1997 ; 115 : 1360-7.
  20. Touhami A, Grueterich M, Tseng SCG. The role of NGF signaling in human limbal epithelium expanded by amniotic membrane culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002 ; 43 : 987-94.
  21. Franck O, Descargues G, Menguy E, Courville P, Martin J, Brasseur G. Techniques de prélèvement et de préparation des membranes amniotiques. *J Fr Ophtalmol* 2000 ; 23 : 729-34.
  22. Ban Y, Cooper LJ, Fullwood NJ et al. Comparison of ultrastructure tight junction-related protein and barrier function of human corneal epithelial cells cultivated on amniotic membrane with and without air-lifting. *Exp Eye Res* 2003 ; 76 : 735-43.
  23. Addis JP, Hunt JC, Dart JKD. Amniotic membrane graft : "fresh" or frozen ? A clinical and in vitro comparison. *Br J Ophthalmol* 2001 ; 85 : 905-7.
  24. Kruse FE, Rohrschneider K, Völcker HE. Multilayer amniotic membrane transplantation for reconstruction of deep corneal ulcers. *Ophthalmology* 1999 ; 106 : 1504-11.
  25. Mejia LF, Santamaria JP, Acosta C. Symptomatic management of postoperative bullous keratopathy with non preserved human amniotic membrane. *Cornea* 2002 ; 21 : 342-5.
  26. Letko E, Stechschulte SU, Kenyon KR et al. Amniotic membrane inlay and overlay grafting for corneal epithelial defects and stromal ulcers. *Arch Ophthalmol* 2001 ; 119 : 659-63.
  27. Gatinel D, Hoang-Xuan T. Le déficit en cellules souches limbiques. *J Fr Ophtalmol* 2000 ; 23 : 718-28.
  28. Lee SH, Tseng SCG. Amniotic membrane transplantation for persistent epithelial defects with ulceration. *Am J Ophthalmol* 1997 ; 123 : 303-12.
  29. Azuara-Blanco A, Pillai CT, Dua HS. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction. *Br J Ophthalmol* 1999 ; 83 : 399-402.
  30. Chen H-J, Pires RTF, Tseng SCG. Amniotic membrane transplantation for severe neurotrophic corneal ulcers. *Br J Ophthalmol* 2000 ; 84 : 826-33.
  31. Gabric N, Mravicic I, Dekaris I, Karaman Z, Mitrovic S. Human amniotic membrane in the reconstruction of the ocular surface. *Doc Ophthalmol* 1999 ; 98 : 273-83.
  32. Hanada K, Shimazaki J, Shimmura S, Tsubota K. Multilayered amniotic membrane transplantation for severe ulceration of the cornea and sclera. *Am J Ophthalmol* 2001 ; 131 : 324-31.
  33. Su CY, Lin CP. Combined use of an amniotic membrane and tissue adhesive in treating corneal perforation. *Ophthalmic Surg Lasers* 2000 ; 31 : 151-4.
  34. Heiligenhaus A, Li H, Galendo EEH, Koch JM, Steuhl KP, Meller D. Management of acute ulcerative and necrotising herpes simplex and zoster keratitis with amniotic membrane transplantation. *Br J Ophthalmol* 2003 ; 87 : 1215-19.
  35. Pires RTF, Tseng SCG, Prabhasawat P et al. Amniotic membrane transplantation for symptomatic bullous keratopathy. *Arch Ophthalmol* 1999 ; 117 : 1291-7.
  36. Anderson DF, Prabhasawat P, Alfonso E, Tseng SCG. Amniotic membrane transplantation after the primary surgical management of band keratopathy. *Cornea* 2001 ; 20 : 354-61.
  37. Tseng SCG. Literature summary on uses of amniotic membrane in ocular surface reconstruction. *Conference Jan* 2003.
  38. Tseng SCG. Regulation and clinical implications of corneal epithelial stem cells. *Mol Biol Rep* 1996 ; 23 : 47-58.
  39. Kim JC, Tseng SCG. Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas. *Cornea* 1995 ; 14 : 473-84.
  40. Pires RTF, Chokshi A, Tseng SCG. Amniotic membrane transplantation or limbal conjunctival autograft for limbal stem deficiency induced by 5-FU in glaucoma surgeries. *Cornea* 1999 ; 19 : 284-7.
  41. Tseng SCG, Prabhasawat P, Barton K, Gray T, Meller D. Amniotic membrane transplantation with or without limbal allografts for corneal surface reconstruction in patients with limbal stem cell deficiency. *Arch Ophthalmol* 1998 ; 116 : 431-41.
  42. Anderson D, Ellies P, Pires RTF, Tseng SCG. Amniotic membrane transplantation for partial limbal stem cell deficiency. *Br J Ophthalmol* 2001 ; 85 : 567-75.
  43. Tsubota K, Satake Y, Ohyama M et al. Surgical reconstruction of the ocular surface in advanced ocular cicatricial pemphigoid and Stevens-Johnson syndrome. *Am J Ophthalmol* 1996 ; 122 : 38-52.
  44. Shimazaki J, Yang HY, Tsubota K. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction in patients with chemical and thermal burns. *Ophthalmology* 1997 ; 104 : 2068-76.
  45. Tsubota K, Satake Y, Kaido M et al. Treatment of severe ocular surface disorders with corneal epithelial stem-cell

- transplantation. *N Eng J Med* 1999 ; 340 : 1697-1703.
46. Shimazaki J, Shimmura S, Fujishima H, Tsubota K. Association of preoperative tear function with surgical outcome in severe Stevens-Johnson syndrome. *Ophthalmology* 2000 ; 107 : 1518-23.
  47. De Roth A. Plastic repair of conjunctival defects with fetal membrane. *Arch Ophthalmol* 1940 ; 23 : 522-5.
  48. Tseng SCG, Prabhasawat P, Lee SH. Amniotic membrane transplantation for conjunctival surface reconstruction. *Am J Ophthalmol* 1997 ; 124 : 765-74.
  49. Meller D, Maskin SL, Pires RTF, Tseng SCG. Amniotic membrane transplantation for symptomatic conjunctivochalasis refractory to medical treatments. *Cornea* 2000 ; 19 : 796-803.
  50. Mejia LF, Acosta C, Santamaria JP. Use of nonpreserved human amniotic membrane for the reconstruction of the ocular surface. *Cornea* 2000 ; 19 : 288-91.
  51. Honavar SG, Bansal AK, Sangwan VS, Rao GN. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction in Stevens-Johnson syndrome. *Ophthalmology* 2000 ; 107 : 975-9.
  52. Paridaens D, Beekhuis H, Bosch WVD, Remeyer L, Melles G. Amniotic membrane transplantation in the management of conjunctival malignant melanoma and primary acquired melanosis with atypia. *Br J Ophthalmol* 2001 ; 85 : 658-61.
  53. Prabhasawat P, Barton K, Burkett G, Tseng SCG. Comparison of conjunctival autografts, amniotic membrane grafts and primary closure for pterygium excision. *Ophthalmology* 1997 ; 104 : 974-85.
  54. Solomon A, Pires RTF, Tseng SCG. Amniotic membrane transplantation after extensive removal of primary and recurrent pterygia. *Ophthalmology* 2001 ; 108 : 449-60.
  55. Ma DHK, See LC, Liau SB, Tsai RJF. Amniotic membrane graft for primary pterygium : comparison with conjunctival autograft and topical mitomycin C treatment. *Br J Ophthalmol* 2000 ; 84 : 973-8.
  56. Shimazaki J, Shinozaki N, Tsubota K. Transplantation of amniotic membrane and limbal autograft for patient with recurrent pterygium associated with symblepharon. *Br J Ophthalmol* 1998 ; 82 : 235-40.
  57. Kim JC, Lee D, Shyn KH. Clinical uses of human amniotic membrane for ocular surface diseases. In : Lass JH, ed. *Advances in Corneal Research*. New York : Plenum Press, 1997 : 117-34.
  58. Barton K, Budenz D, Khaw PT, Tseng SCG. Glaucoma filtration surgery using amniotic membrane transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001 ; 42 : 1762-8.
  59. Fujishima H, Shimazaki J, Shinozaki N, Tsubota K. Trabeculectomy with the use of amniotic membrane for uncontrolled glaucoma. *Ophthalmic Surg Lasers* 1998 ; 29 : 428-31.
  60. Budenz DL, Barton K, Tseng SCG. Amniotic membrane transplantation for repair of leaking glaucoma filtering blebs. *Am J Ophthalmol* 2000 ; 130 : 580-8.
  61. Rodriguez-Ares MT, Tourino R, Capeans C, Sanchez-Salorio M. Repair of scleral perforation with preserved scleral amniotic membrane in Marfan's syndrome. *Ophthalmic Surg Lasers* 1999 ; 30 : 485-7.
  62. Sorsby A, Symons HM. Amniotic membrane grafts in caustic burns of the eye. *Br J Ophthalmol* 1946 ; 30 : 337-45.
  63. Sorsby A, Haythorne J, Reed H. Further experience with amniotic membrane grafts in caustic burns of the eye. *Br J Ophthalmol* 1947 ; 31 : 409-18.
  64. Kim JS, Kim JC, Na BK, Jeong JM, Song CY. Amniotic membrane patching promotes healing and inhibits protease activity on wound healing following acute corneal alkali burns. *Exp Eye Res* 1998 ; 70 : 329-37.
  65. Meller D, Pires RTF, Mark RJS et al. Amniotic membrane transplantation for acute chemical or thermal burns. *Ophthalmology* 2000 ; 107 : 980-90.
  66. Sridhar MS, Bansal AK, Sangwan VS, Rao GN. Amniotic membrane transplantation in acute chemical and thermal injury. *Am J Ophthalmol* 2000 ; 130 : 134-7.
  67. Gabler B, Lohmann CP. Hypopyon after repeated transplantation of human amniotic membrane onto the corneal surface. *Ophthalmology* 2000 ; 107 : 1344-6.