

MARIÈVE GIROUX-TALBOT

**ÉTUDE DE LA GUÉRISON D'UNE DÉFICIENCE EN  
CELLULES SOUCHES DANS LA CORNÉE DE LAPIN  
À L'AIDE DE CELLULES ÉPITHÉLIALES  
CULTIVÉES SUR UN GEL DE FIBRINE**

Mémoire présenté  
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval  
dans le cadre du programme de maîtrise en biologie cellulaire et moléculaire  
pour l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

FACULTÉ DE MÉDECINE  
UNIVERSITÉ LAVAL  
QUÉBEC

AVRIL 2004

## RÉSUMÉ

Une déficience en cellules souches épithéliales mène à une conjonctivalisation progressive de la cornée se traduisant par une perte de vision. Nous nous sommes attardés à l'étude de la régénération de l'épithélium cornéen initiée par une greffe de cellules épithéliales de cornée de lapin (CECL) cultivées sur un gel de fibrine. À confluence des cellules, le gel est greffé de façon autologue sur une cornée de lapin déficiente en cellules souches et la guérison est observée par rapport à un contrôle non-greffé. À différents temps, les cornées sont prélevées et utilisées pour une analyse histologique ou par immunomarquage. Nos résultats démontrent qu'en seulement deux semaines, nous pouvons préparer un greffon d'épithélium cornéen autologue qui est sans risque de rejet. Après un mois, les lapins ayant reçu une greffe montrent un phénotype cornéen normal comparé aux témoins non-greffés. Ces résultats indiquent que la greffe de CECL autologues permet d'aider à la guérison d'un déficit en cellules souches.

---

Mariève Giroux-Talbot

---

Dre Lucie Germain

## **AVANT-PROPOS**

La réalisation de ces travaux n'aurait été possible sans l'aide de nombreuses personnes. Je tiens à remercier tous mes collègues de travail qui ont su rendre ces deux années si intéressantes. Plus particulièrement, je souhaite souligner l'implication de ma directrice, Dre Lucie Germain, de qui mon esprit scientifique et critique a pu s'inspirer. Ensuite, je remercie mes deux comparses de l'équipe des yeux, Patrick Carrier et Alexandre Deschambeault, qui ont su me guider et m'encourager avec une exceptionnelle complicité. Merci Patrick pour m'avoir tout enseigné. Merci Alexandre pour tous tes conseils et pour la révision scientifique et linguistique de ce mémoire. Merci également à Éric Grandbois pour son assistance technique.

La complexité des chirurgies oculaires chez les lapins a fait en sorte de réunir une équipe extraordinaire : Dr Richard Bazin, chirurgien-ophtalmologiste, Dr Claude Giasson, chercheur en optométrie ainsi qu'Anne-Marie Moisan et Mario Mercier, techniciens en santé animale. Ils ont accompli un travail exceptionnel dans des conditions de travail souvent difficiles.

Enfin, comment passer sous silence le travail incroyable et inestimable des assistants de recherche et stagiaires du LOEX. Ils sont le cœur même de notre laboratoire de recherche et leur aide est précieuse.

Je tiens à remercier le Fond de Recherche en Santé du Québec (FRSQ) pour le soutien financier de ces travaux.

*À Mathieu, pour ses encouragements, son  
aide et son amour.*

*« Celui qui ne sait pas, et ne sait pas qu'il ne  
sait pas, est un fou : fuis-le.  
Celui qui ne sait pas, et sait qu'il ne sait pas,  
est un enfant : éduque-le.  
Celui qui sait, et ne sait pas qu'il sait, dort :  
réveille-le.  
Celui qui sait, et sait qu'il sait, est un sage :  
suis-le. » [1]*

## TABLE DES MATIÈRES

Résumé.....	i
Avant-Propos.....	ii
Table des matières.....	iv
Liste des tableaux et figures.....	vii
Liste des abréviations.....	viii
1. Revue de la littérature.....	2
1.1 Introduction.....	2
1.2 Histologie générale.....	2
1.2.1 Cornée humaine.....	3
1.2.1.1 Endothélium.....	4
1.2.1.2 Stroma.....	6
1.2.1.3 Épithélium.....	8
1.2.2 Sclérotique et conjonctive.....	12
1.2.3 Limbe.....	14
1.3 Cellules souches.....	16
1.3.1 Propriétés des cellules souches.....	16
1.3.2 Localisation des cellules souches.....	18
1.3.3 Marqueurs des cellules souches.....	21
1.3.4 Conservation des cellules souches en culture.....	22
1.4 Déficience en cellules souches.....	22
1.4.1 Apparence clinique.....	23
1.4.2 Causes.....	23
1.4.3 Traitements.....	24
1.5 Modèle animal.....	27
1.5.1 L'utilisation du modèle de lapin dans les études sur la cornée.....	27
1.5.2 Histologie de la cornée de lapin et particularités.....	28
1.5.3 Induction d'une déficience en cellules souches.....	29
1.6 Gel de fibrine.....	29
1.6.1 Utilisations possibles.....	30
1.6.2 Principe de polymérisation.....	30
1.6.3 Propriétés du gel.....	31
1.6.4 Utilité pour les greffes dans cette étude.....	32
1.7 Marqueurs utilisés.....	32
1.7.1 Kératines.....	32
1.7.1.1 Kératine 3.....	34
1.7.1.2 Kératine 12.....	34
1.7.1.3 Kératine 4.....	34
1.7.1.4 Kératine 19.....	35
1.7.2 Facteurs de transcription.....	35
1.7.2.1 P63.....	35
1.7.3 Les mucines.....	35
1.7.3.1 MUC5AC.....	36
1.7.3.2 Cellules globulaires.....	37
1.8 Objectifs.....	37

2. Matériel et Méthodes .....	40
2.1 Fournisseurs .....	41
2.2 Analyses préliminaires .....	41
2.2.1 Prélèvement des cornées de lapin pour les tests de culture .....	41
2.2.2 Culture cellulaire .....	42
2.2.2.1 Isolement et culture des CECL .....	42
2.2.2.2 Culture de CECL sur gel de fibrine .....	42
2.3 Gels de fibrine .....	42
2.3.1 Fibrinogène .....	42
2.3.2 Thrombine .....	43
2.3.3 Mélange .....	43
2.4 Procédure chirurgicale .....	43
2.4.1 Prélèvement des biopsies pour la culture et la greffe .....	43
2.4.2 Transplantation des CECL cultivées sur gel de fibrine .....	45
2.4.3 Approche expérimentale .....	45
2.5 Analyses .....	45
2.5.1 Analyses histologiques .....	45
2.5.2 Immunomarquage .....	46
2.6 Les solutions .....	46
Milieu SHEM modifié .....	46
Dispase 0,25% .....	46
PBS IF 1X .....	47
PBS pour culture 10X .....	47
Trypsine .....	47
Tampon Hepes 10X .....	47
Tampon Hepes 1X .....	47
Milieu de transport pour biopsie .....	47
Milieu de montage .....	47
Milieu DMEM .....	48
Milieu F12 .....	48
Solution de blocage .....	48
Saline 1 .....	48
Saline 2 .....	48
2.7 Anticorps utilisés .....	49
3. Résultats .....	51
3.1 Culture des CECL .....	51
3.1.1 Isolement des CECL .....	51
3.1.2 Aspect morphologique des cellules en culture .....	51
3.1.3 Culture sur gel de fibrine et fibrinolyse .....	52
3.2 Greffe des CECL cultivées sur gel de fibrine .....	53
3.2.1 Induction d'une déficience en cellules souches .....	53
3.2.2 Analyse du greffon de CECL sur gel de fibrine .....	54
3.2.3 Observations <i>in situ</i> post-greffe .....	56
3.3 Origine de l'épithélium sur les cornées traitées .....	56
3.3.1 Immunomarquage avec les marqueurs spécifiques de la cornée et de la conjonctive .....	57
3.3.2 Observation des cellules globulaires .....	60

4. Discussion et conclusion.....	64
4.1 Isolement et culture.....	64
4.2 Greffe.....	65
4.3 Origine de l'épithélium sur les cornées traitées.....	67
4.3.1 Cornées non-greffées.....	68
4.3.2 Cornées greffées.....	69
4.4 Conclusion.....	71
5. Bibliographie.....	73

## LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

Figure 1. L'œil humain .....	3
Figure 2. La cornée humaine .....	4
Figure 3. L'endothélium humain .....	5
Figure 4. Organisation des lamelles de collagène.....	7
Figure 5. Schéma de l'activation des kératocytes en situation de blessure .....	8
Figure 6. Morphologie des cellules épithéliales selon leur niveau de différenciation.....	9
Figure 7. Attachement des cellules épithéliales à la membrane basilaire via les hémidesmosomes .....	11
Figure 8. Composition des larmes .....	12
Figure 9. La conjonctive humaine .....	13
Figure 10. Le limbe humain.....	15
Figure 11. Schéma de la différenciation cellulaire .....	17
Figure 12. Schéma de la niche microenvironnementale .....	19
Figure 13. Procédure chirurgicale pour une greffe de limbe .....	26
Figure 14. Histologie de la cornée humaine et de la cornée de lapin .....	28
Figure 15. Schéma de la polymérisation du gel de fibrine .....	31
Figure 16. Structures tertiaires et quaternaires des kératines.....	33
Figure 17. Schéma expérimental de la greffe de cellules autologues cultivées sur gel de fibrine.....	40
Figure 18. Les étapes pour la greffe de CECL cultivées sur gel de fibrine .....	44
Figure 19. Aspect morphologique des CECL en culture .....	52
Figure 20. Apparence du gel de fibrine dégradé par les CECL .....	53
Figure 21. Kératectomie du limbe pour l'induction d'une déficience en cellules souches ..	54
Figure 22. CECL cultivées à confluence sur gel de fibrine marquées avec la kératine 3.....	55
Figure 23. Aspect du gel de fibrine à différentes étapes expérimentales. ....	56
Figure 24. Cornée normale de lapin marquée avec les kératines 3 et 4.....	57
Figure 25. Cornées de lapin après la plaie marquées avec la kératine 3.....	58
Figure 26. Cornées de lapin après la plaie marquées avec la kératine 4.....	59
Figure 27. Présence des cellules globulaires dans la cornée normale de lapin.....	60
Figure 28. Histologie des cornées de lapin après la plaie .....	61
Figure 29. Cornées de lapin après la plaie marquées avec la mucine MUC5AC .....	62
Figure 30. Schéma de l'expression précoce des kératines chez les cornées déficientes en cellules souches.....	70
Tableau 1. Caractéristiques des mucines les plus connues.....	36

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	Acide déoxyribonucléique
BrdU	5-bromo-2'-deoxyuridine
CAT	Cellule amplificatrice transitoire
CDT	Cellule en différenciation terminale
CECL	Cellule épithéliale de cornée de lapin
CPM	Cellule post-mitotique
DMEM	<i>Dulbecco's Minimum Essential Medium</i> (Milieu essentiel minimal de Dulbecco)
DMSO	Diméthylsulfoxyde
EGF	<i>Epidermal growth factor</i> (Facteur de croissance épidermique)
FXIIIa	Facteur XIII activé
K	Kératine
MEC	Matrice extracellulaire
OCT	<i>Optimal Cutting Temperature</i> (Température optimale de coupe)
P	Passage
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (Tampon phosphate)
UV	Ultraviolet

## *Chapitre 1 - Revue de la littérature*

# **1. REVUE DE LA LITTÉRATURE**

## **1.1 Introduction**

Il s'effectue environ 200 greffes de cornées chaque année dans la région de Québec. Malgré l'avancement des progrès médicaux dans ce domaine, certaines pathologies ne peuvent être traitées adéquatement avec les techniques conventionnelles. La déficience en cellules souches épithéliales, dont il sera question dans ce manuscrit, fait partie de ces pathologies dont les options de traitements sont peu satisfaisantes. Il importe alors de continuer les recherches en laboratoire afin de développer de nouveaux outils pour le traitement des patients. La culture de cellules autologues combinée avec une greffe, déjà pratiquée pour les grands brûlés, est une méthode dont le potentiel est en plein développement. Cette méthode consiste à cultiver en laboratoire les cellules du patient pour les réimplanter chez ce dernier quand leur nombre en culture est suffisant. Les objectifs de ce mémoire portent sur l'étude de la guérison d'une déficience en cellules souches épithéliales dans la cornée de lapin à l'aide de cellules cultivées en laboratoire sur un gel de fibrine.

Afin de mettre en relation les différentes parties de l'œil et l'importance de chaque structure, quelques notions d'histologie seront décrites. Cette section sur l'histologie sera spécifique à l'œil humain. Mon projet portant sur un modèle animal, les spécificités de ce modèle seront discutées dans une section subséquente. Ensuite, les propriétés des cellules souches seront décrites ainsi que les caractéristiques de la déficience en cellules souches. Enfin, ce chapitre de revue de la littérature se terminera par la présentation du gel de fibrine et des différents marqueurs utilisés dans cette étude. Les chapitres suivants expliqueront en détail les travaux effectués lors de mes études de maîtrise. Plus particulièrement, j'aborderai le matériel et les méthodes employées, suivi d'une présentation des résultats et d'une discussion.

## **1.2 Histologie générale**

L'œil humain possède une enveloppe externe, nommée tunique fibreuse, qui se compose de deux parties : la cornée et la sclérotique (Figure 1). La cornée représente le sixième de la circonférence de l'œil. Elle est transparente et présente une courbure beaucoup plus

prononcée que la sclérotique. Cette dernière recouvre la majeure partie du globe oculaire. La sclérotique est très facile à observer chez l'humain par sa couleur blanche qui entoure la cornée [57]. À la périphérie de la cornée se trouve une zone de transition nommée le limbe.

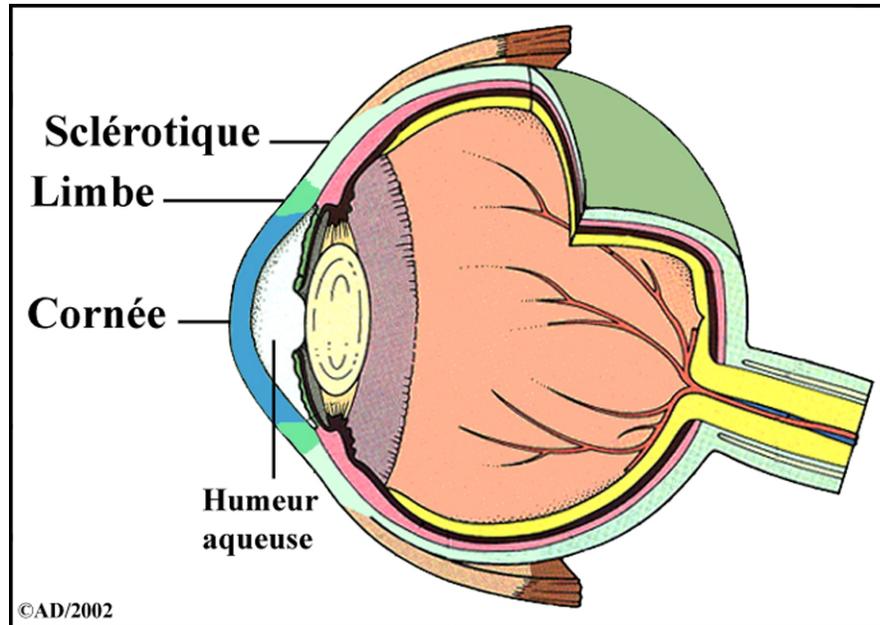


Figure 1. L'œil humain

La partie de l'œil laissant pénétrer la lumière, la cornée (en bleu), ne représente qu'une faible proportion de la circonférence de l'œil. Le reste du globe oculaire est protégé par la sclérotique (en vert pâle). La mince jonction entre les deux se nomme le limbe (en vert). Gracieuseté de A. Deschambeault, modifié de Stevens, 1993 [93].

### 1.2.1 Cornée humaine

La cornée constitue la première lentille du système optique de l'œil. Sa transparence est donc la caractéristique essentielle qui lui permet de bien jouer son rôle. Au niveau microscopique (Figure 2), la cornée humaine se divise en 5 couches distinctes : l'endothélium, la membrane de Descemet, le stroma, la membrane de Bowman et l'épithélium [21].

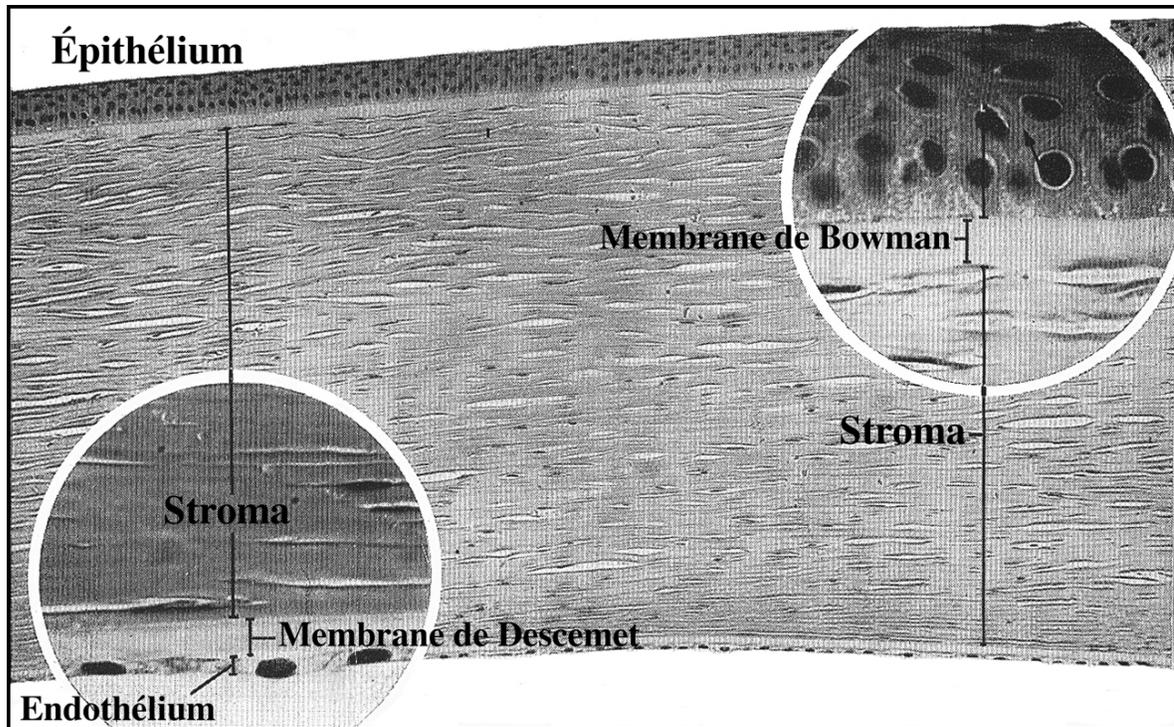


Figure 2. La cornée humaine

La cornée est constituée de 5 couches : l'endothélium, la membrane de Descemet, le stroma, la membrane de Bowman et l'épithélium. L'endothélium, reposant sur sa membrane basilaire, la membrane de Descemet, tapisse la face interne de la cornée. Le stroma est la partie la plus épaisse de la cornée et est constitué en majeure partie de matrice extracellulaire. Les cellules peuplant le stroma se nomment kératocytes. La membrane de Bowman est acellulaire et origine du stroma. L'épithélium se situe sur la face externe de la cornée et comporte de 4 à 6 couches de cellules. Tiré de Hogan, 1971 [33].

#### 1.2.1.1 Endothélium

L'endothélium se situe sur la face postérieure de la cornée (Figure 2). Il est constitué d'une monocouche de cellules aplaties de  $5\mu\text{m}$  d'épaisseur. Les cellules sont de forme hexagonale (Figure 3) et forment un pavé qui repose sur leur membrane basilaire, la membrane de Descemet [21]. Le nom endothélium origine de l'aspect morphologique de ses cellules mais, fonctionnellement, il se rapproche beaucoup plus des couches cellulaires tapissant les cavités internes de l'organisme que d'un véritable endothélium. De plus, ces cellules contiennent les kératines 8 et 18, typiques des cellules mésothéliales. C'est pourquoi le nom

de mésothélium a été proposé pour ce type cellulaire [74]. Néanmoins, l'appellation endothélium reste la plus utilisée et la plus répandue.

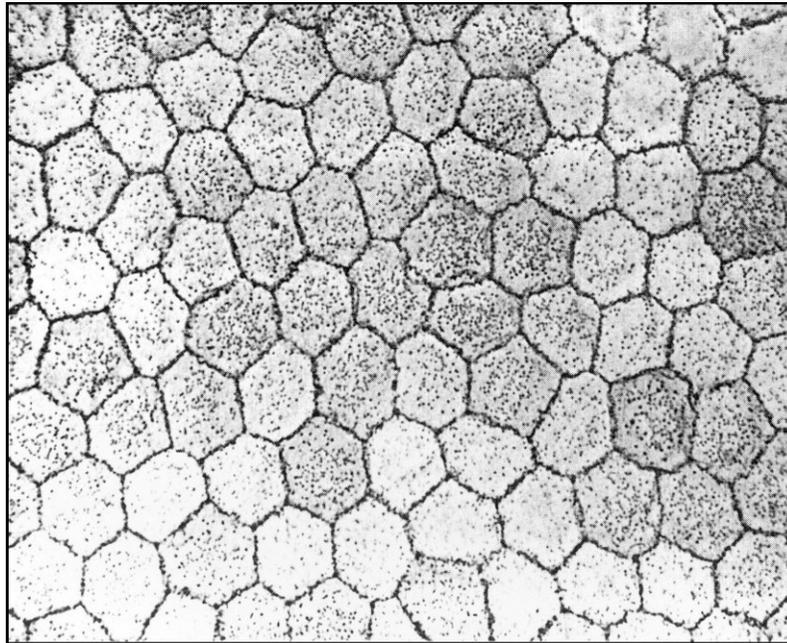


Figure 3. L'endothélium humain

L'endothélium tapisse la face postérieure de la cornée. Il est constitué d'une monocouche de cellules hexagonales et aplaties. Tiré de Hogan, 1971 [33].

La fonction de l'endothélium est de maintenir le taux d'hydratation de la cornée et par conséquent, sa transparence. En effet, le niveau d'hydratation de la cornée maintient la distance entre les fibres de collagène constante [74]. En absence d'endothélium, l'eau présente dans l'humeur aqueuse s'infiltré dans la cornée provoquant un œdème du stroma. Une trop faible densité cellulaire au niveau de l'endothélium, comme dans la dystrophie de Fuchs, donne le même résultat. L'enflure de la cornée empêche la lumière de pénétrer adéquatement dans l'œil et compromet la vision [43].

L'endothélium régule l'hydratation de la cornée par un mécanisme de pression osmotique [32]. Par l'intervention de pompes sodium/potassium, des ions bicarbonates et sodium sont pompés vers l'humeur aqueuse. Ce système de transport crée un gradient qui permet le transfert de l'eau du stroma par osmose [43].

### *1.2.1.2 Stroma*

Situé entre l'endothélium et l'épithélium, le stroma constitue environ 90% de l'épaisseur de la cornée (Figure 2). Il se compose majoritairement de collagène. Les fibres de collagène sont alignées en lamelles et chaque lamelle est empilée sur la suivante de façon perpendiculaire (Figure 4). Cet arrangement des lamelles de collagène permet une bonne transparence de la cornée et une résistance mécanique à la pression intraoculaire [43].

Les kératocytes peuplant le stroma se retrouvent éparpillés entre les lamelles de collagène (Figure 4). Ils sont normalement quiescents et synthétisent le collagène à un taux très lent. Malgré la faible densité cellulaire des kératocytes dans le stroma, ils forment un réseau complexe connecté par des extensions cytoplasmiques [37, 64].

La membrane de Bowman est une composante acellulaire du stroma. Elle est localisée sous la membrane basilaire de l'épithélium (Figure 2). Très développée chez les primates, elle est absente ou peu développée chez les autres espèces [89]. La membrane de Bowman est constituée de fibres de collagène non-alignées. Elle n'est pas régénérée après une blessure [43].

En situation de blessure au stroma, les kératocytes quiescents sont activés en fibroblastes (Figure 5). Ces fibroblastes synthétisent une nouvelle matrice extracellulaire (MEC), de composition différente du stroma normal [79]. De plus, la MEC ne se dépose pas de façon organisée comme dans un stroma normal. Les fibroblastes peuvent, à leur tour, se différencier en myofibroblastes qui permettent la contraction de la plaie. Bien que les myofibroblastes puissent revenir à l'état de fibroblastes, les fibroblastes ne peuvent jamais revenir à leur état de kératocyte normal (Figure 5). Tous ces facteurs contribuent à la formation de cicatrices opaques, fréquentes dans des cas de blessures au stroma [24].

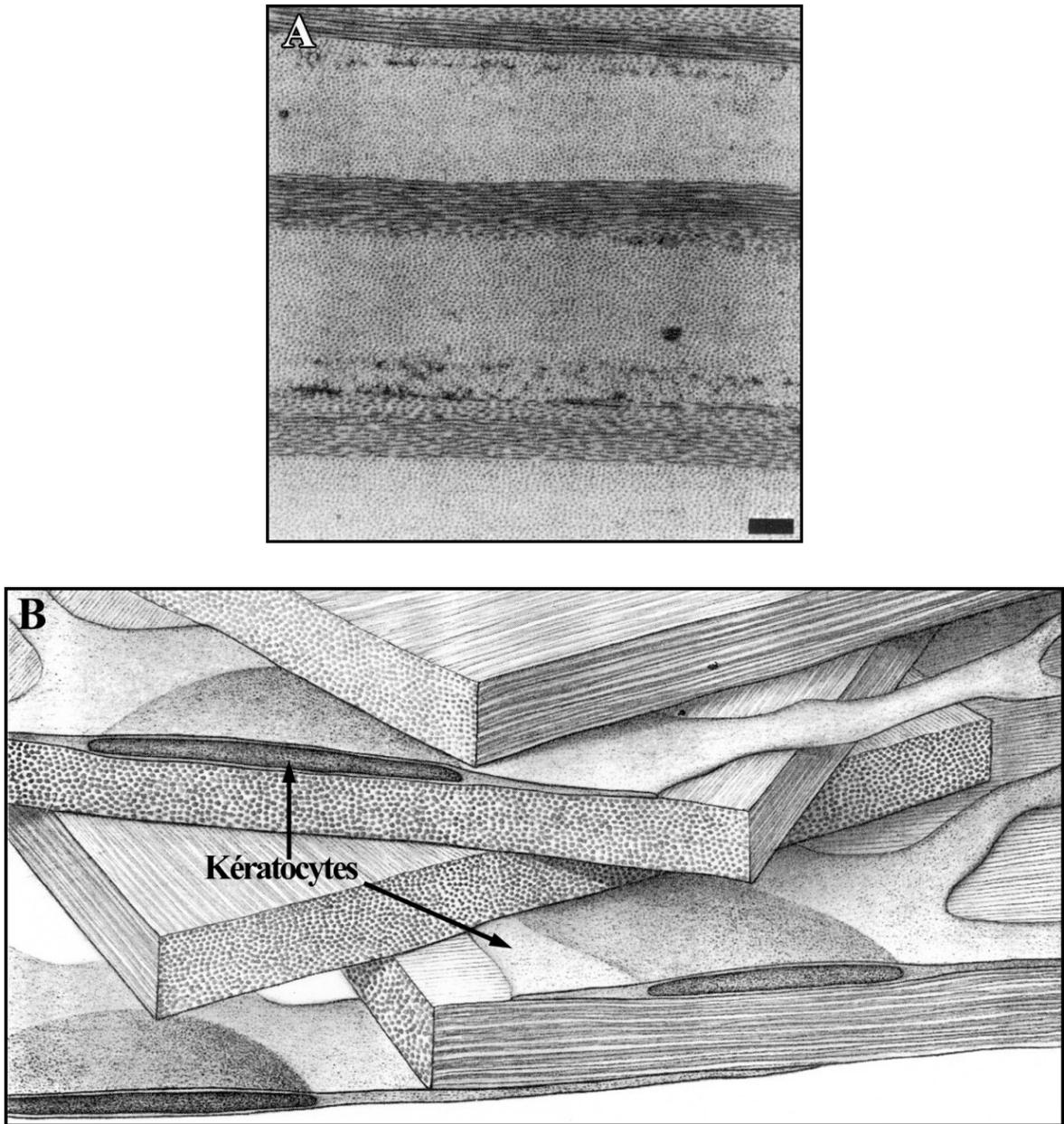


Figure 4. Organisation des lamelles de collagène

Les kératocytes du stroma sont situés entre les lamelles de collagène. Ces dernières sont orientées dans des plans perpendiculaires les uns aux autres. A) Stroma vu en microscopie électronique. Les lamelles de collagène sont visibles par l'alternance des couches foncées et claires. Les couches foncées sont des fibres de collagène parallèles au plan de coupe. Les couches claires, parsemées de points, sont des fibres de collagène vues « en face ». Tiré de Klyce, 1998[43]. B) Stroma vu de façon schématique montrant l'organisation des lamelles de collagène et des kératocytes. Tiré de Hogan, 1971 [33].

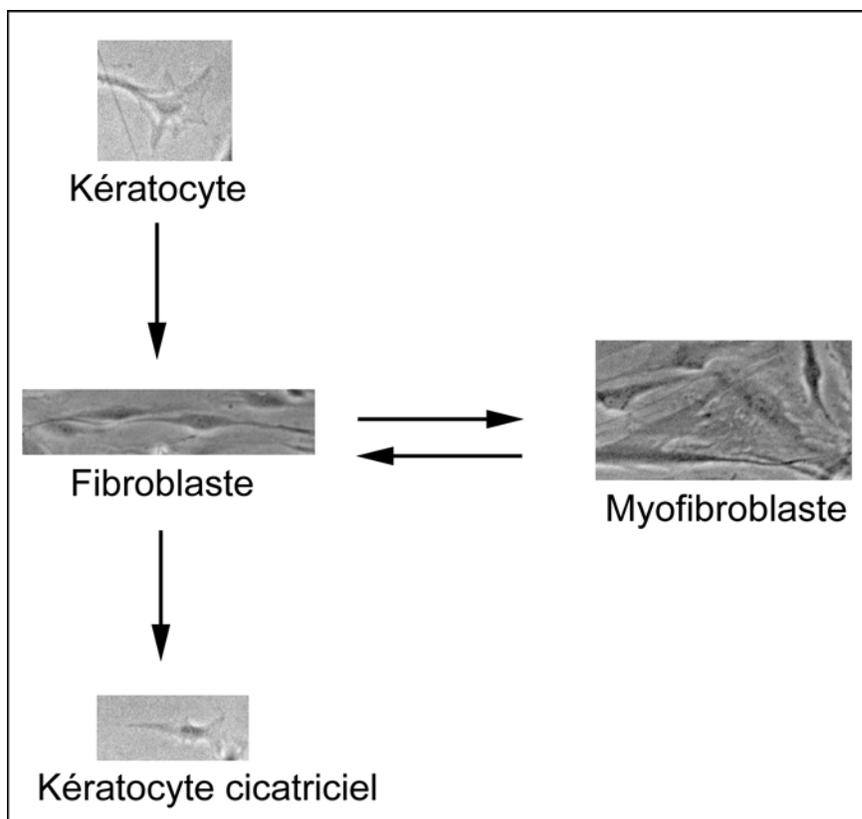


Figure 5. Schéma de l'activation des kératocytes en situation de blessure

Les kératocytes sont activés en fibroblastes qui peuvent à leur tour se différencier en myofibroblastes. Le phénotype de myofibroblaste est réversible et les cellules activées peuvent retourner à leur état de fibroblastes. Avec le temps, les fibroblastes reprennent leur forme originale de kératocyte mais continuent de ressembler au point de vue biochimique à des fibroblastes : ce sont les kératocytes cicatriciels. Inspiré de Fini, 1999 [24].

### 1.2.1.3 Épithélium

L'épithélium cornéen étant au cœur du sujet sur lequel les travaux de ce mémoire ont été effectués, il sera donc l'objet d'une plus grande attention et d'une description plus détaillée.

La cornée possède un épithélium stratifié mais non-kératinisé. Cet épithélium représente environ 10% de l'épaisseur de la cornée avec 4 à 6 couches de cellules et une épaisseur totale d'environ 50 $\mu$ m (Figure 2) [33, 43]. L'épithélium du centre de la cornée est très uniforme pour ce qui est de l'épaisseur et de l'arrangement cellulaire. Il peut être divisé en trois types d'après la morphologie des cellules (Figure 6) : les cellules basales, les cellules

ailées et les cellules superficielles. Les cellules épithéliales subissent une maturation et une différenciation de la couche basale vers les couches superficielles. Après la différenciation terminale, les cellules mortes sont évacuées dans les larmes par desquamation [33, 43].

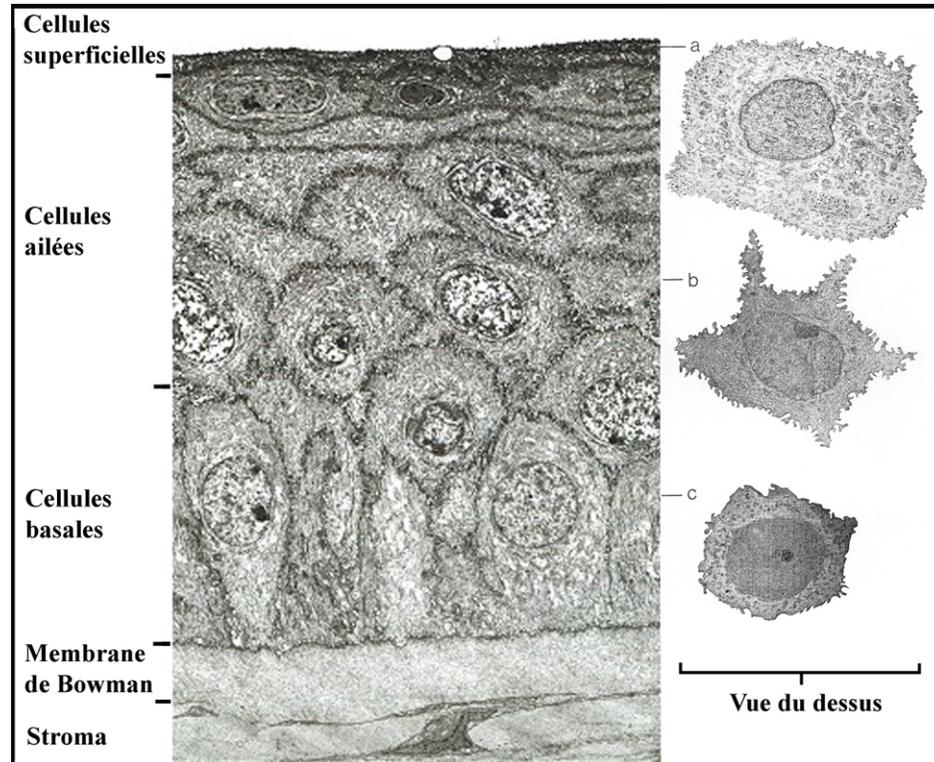


Figure 6. Morphologie des cellules épithéliales selon leur niveau de différenciation

Les 4 à 6 couches de cellules épithéliales de la cornée peuvent être classées en trois types morphologiques. Les cellules de la couche basale sont les moins différenciées et se situent sur la membrane basilaire de l'épithélium. Les cellules ailées se situent à mi-chemin entre les cellules basales et les cellules superficielles qui sont les plus différenciées. Gracieuseté de A. Deschambeault, modifié de Hogan, 1971 [33].

Les cellules de la couche basale sont cuboïdales avec un noyau légèrement décentré vers l'apex de la cellule (Figure 6). Elles sont plus hautes que larges avec des mesures de  $18\mu\text{m}$  pour la hauteur et  $10\mu\text{m}$  pour la largeur [33]. Leur réticulum endoplasmique n'est que peu développé et les mitochondries sont peu nombreuses [74]. Les cellules basales sont les seules qui entrent en mitose et elles permettent de remplacer les cellules des couches superficielles. Leur cytoplasme contient des granules de glycogène qui jouent un rôle de

réserve énergétique pour des situations de stress [43]. Elles sont attachées à leur membrane basilaire par une série d'hémidesmosomes (Figure 7). À leur face antérieure, les cellules basales sont en contact étroit avec les cellules ailées grâce aux desmosomes et à de nombreuses interdigitations [33].

Les cellules ailées font la transition entre les cellules basales et superficielles (Figure 6). Elles sont plus aplaties et ont une forme courbée caractéristique qui leur a valu ce nom [21]. Elles sont également appelées cellules à facette ou cellules à ailes de Ranvier [74]. Leur noyau est allongé de façon parallèle à la cellule. Leur cytoplasme présente des filaments intermédiaires. Ces tonofilaments permettent aux cellules de conserver leur forme et aident à la structure de l'épithélium par leur association aux desmosomes [43]. Les cellules ailées sont étroitement connectées entre elles par des desmosomes et des jonctions lacunaires (gap junctions) [33, 43].

Les cellules de la couche superficielle, ou cellules squameuses, sont beaucoup plus aplaties et plus denses (Figure 6) [21]. Ces cellules, très minces (entre 2 et 4 $\mu$ m), sont très étendues avec des longueurs allant de 40 $\mu$ m à 60 $\mu$ m [43]. Ces cellules hautement différenciées perdent progressivement leurs différentes organelles [21]. Elles présentent à leur surface des « formations digitées [74]» qui permettent une bonne adhérence du film lacrymal. Les cellules superficielles contiennent également des jonctions serrées (tight junctions) et des desmosomes permettant la stabilité mécanique latérale. Les cellules superficielles subissent une desquamation après leur mort pendant laquelle les desmosomes sont brisés et dissous. La desquamation crée des dépressions à la surface de l'épithélium que les larmes doivent combler. Une desquamation anormale est associée avec des problèmes de sécheresse cornéenne due à la difficulté de maintenir l'intégrité du film lacrymal [43]. Les cellules superficielles qui meurent sont remplacées par les cellules des couches sous-jacentes [32].

L'épithélium cornéen est ancré au stroma sous-jacent par une membrane basilaire composée principalement de collagène, de fibronectine et de laminine [45, 56]. L'expression de certains collagènes, entrant dans la composition de la membrane basilaire, est différente selon l'emplacement sur la cornée. Au niveau du limbe, contrairement au centre de la cornée, le collagène de type IV est présent alors que le collagène de type XII en est absent [45, 111].

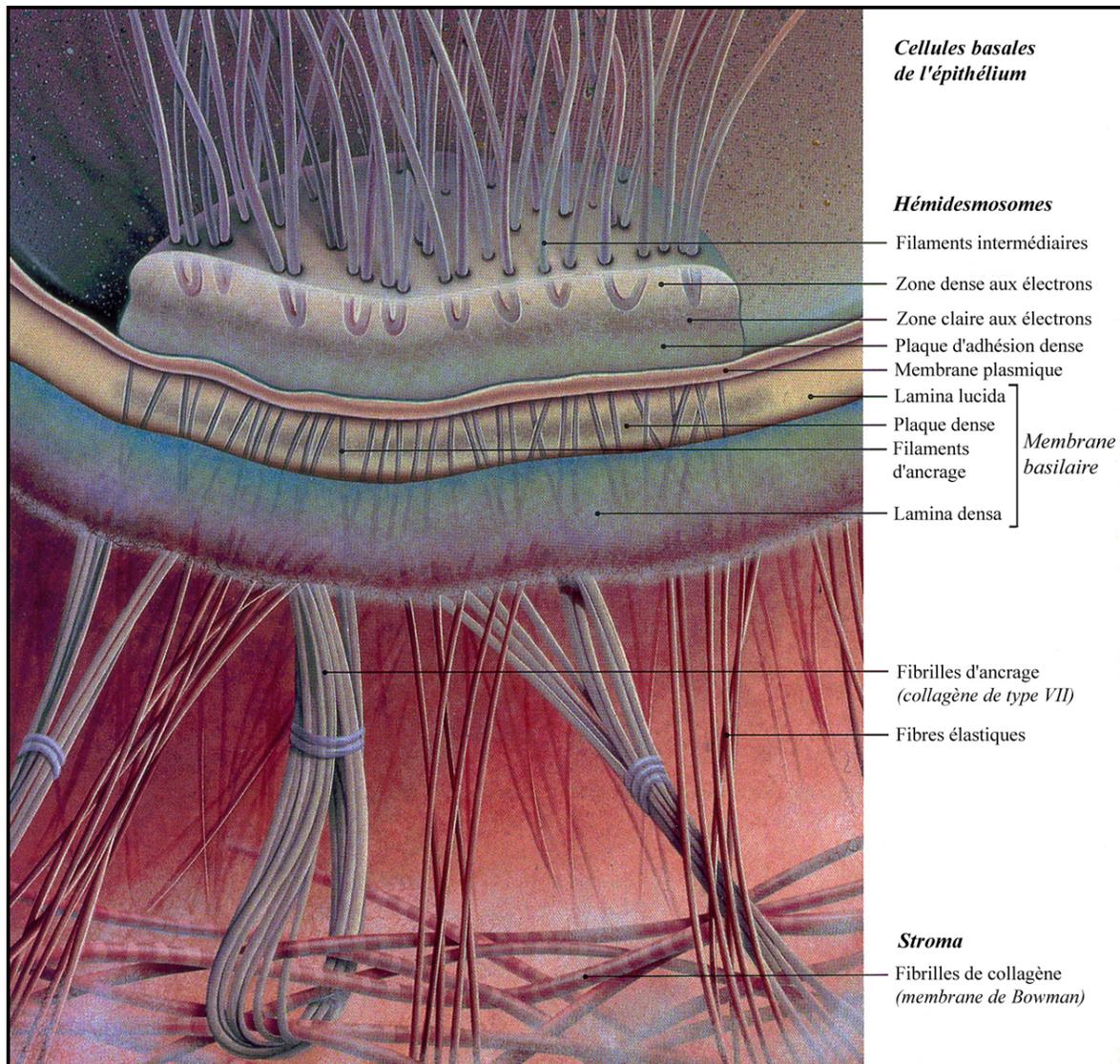


Figure 7. Attachement des cellules épithéliales à la membrane basilaire via les hémidesmosomes

Les hémidesmosomes sont des points d'ancrage des cellules épithéliales à la membrane basilaire. Du côté intracellulaire, des filaments intermédiaires viennent s'y attacher. Du côté extracellulaire, les fibrilles d'ancrage permettent l'attachement aux fibres de collagène du stroma. Tiré de Geras, 1990 [25].

Pour prévenir les dommages à l'épithélium de la cornée, celle-ci doit être gardée humide par l'entremise du film lacrymal. Les larmes ne font pas partie de la cornée mais y sont intimement associées [43]. En effet, les cellules superficielles présentent des projections microscopiques qui permettent l'attachement de la couche muqueuse des larmes qui

contient diverses mucines (Figure 8). Les mucines sont sécrétées en grande partie par les cellules globulaires de la conjonctive et sont dispersées sur la cornée dans la phase aqueuse par le mouvement des paupières. Le film lacrymal est complété par une très fine couche lipidique qui diminue le taux d'évaporation de l'eau [108].

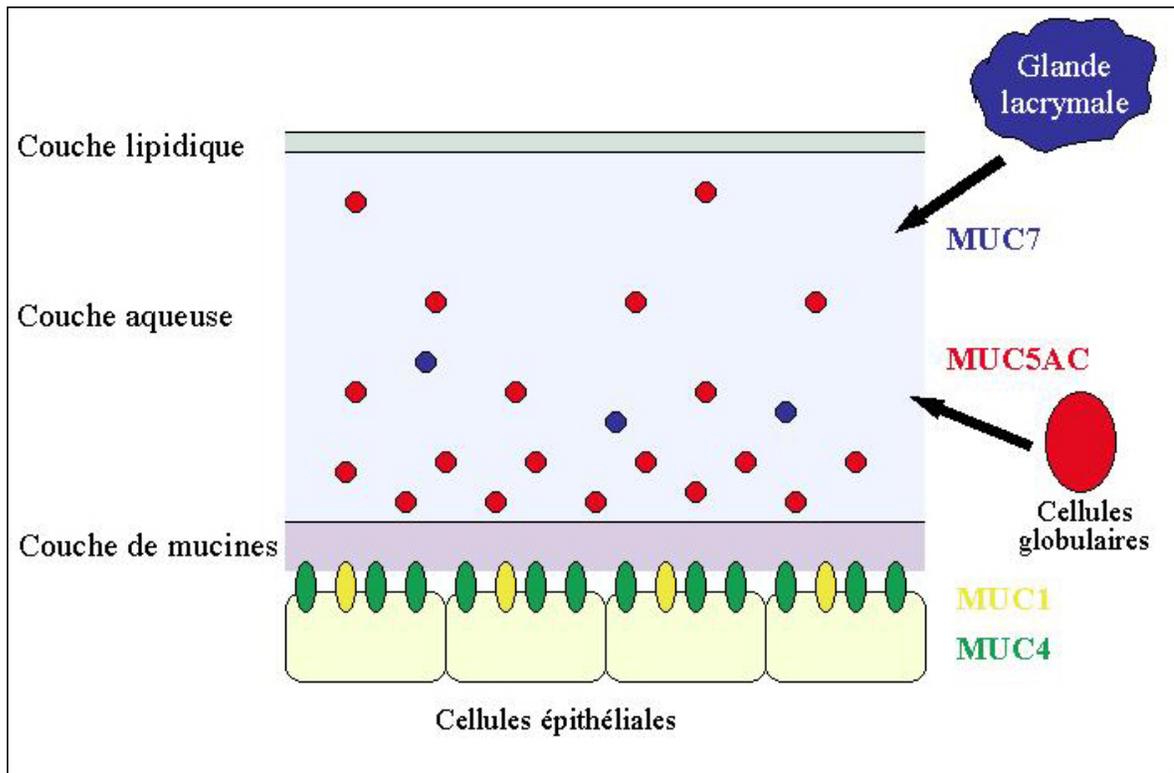


Figure 8. Composition des larmes

Les larmes sont composées d'une couche lipidique qui prévient l'évaporation de la couche aqueuse sous-jacente. Une couche de mucines fait le lien avec la surface oculaire. La couche de mucines est principalement composée de mucines sécrétées ou membranaires. La mucine la plus abondante des larmes est la MUC5AC, sécrétée par les cellules globulaires et présente dans la couche aqueuse. Modifiée de Watanabe, 2002 [108].

### 1.2.2 Sclérotique et conjonctive

Tout comme la cornée, la sclérotique est composée en majeure partie de MEC [21]. Par contre, l'organisation des structures de ce tissu diffère sensiblement de celle de la cornée. La sclérotique est blanche, opaque et bien vascularisée. Son stroma est composé de fibres

de collagène désorganisées. Les fibres de collagène sont de diamètres irréguliers, qui peuvent varier de 280 à 3300Å, et sont assemblées en faisceaux hétérogènes [74].

La sclérotique est recouverte d'une muqueuse délicate qui se prolonge jusque sur la face interne des paupières : la conjonctive [57]. L'épithélium de la conjonctive diffère de l'épithélium cornéen de plusieurs façons. Stratifié et non-kératinisé, il est composé de cellules épithéliales dont l'origine est différente de celle des cellules épithéliales de la cornée.

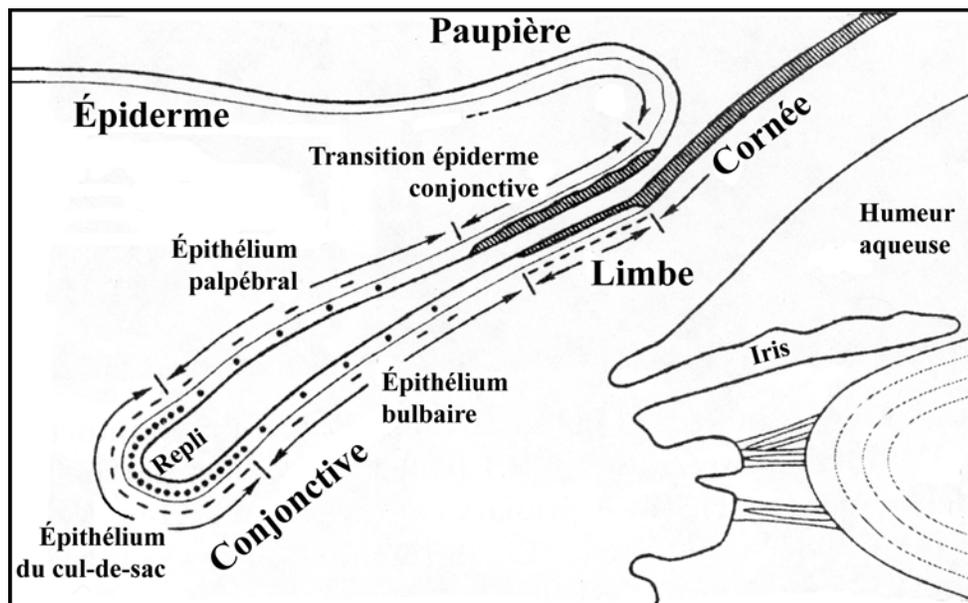


Figure 9. La conjonctive humaine

La conjonctive est en continuité avec la cornée et l'épithélium des paupières. L'épithélium conjonctival bulbaire touche celui du limbe, l'épithélium du cul-de-sac se situe dans le repli de la paupière tandis que l'épithélium conjonctival palpébral recouvre la face interne de la paupière. Tiré de Wei, 1993 [109].

L'épithélium conjonctival peut être divisé en trois régions (Figure 9). La région adjacente à la cornée se nomme épithélium bulbaire. La région du cul-de-sac, aussi appelée fornix, se situe à la jonction entre le globe oculaire et les paupières. Cette région comprend l'épithélium du même nom. L'épithélium conjonctival palpébral recouvre la face interne de la paupière. Il est en continuité avec l'épiderme recouvrant l'extérieur de la paupière [68, 109].

Il existe trois différences histologiques majeures entre l'épithélium de la conjonctive et celui de la cornée. Premièrement, son épaisseur est variable et l'arrangement des cellules est irrégulier [33]. Les cellules épithéliales de la conjonctive forment une couche de quelques cellules d'épaisseur seulement [32, 102]. Deuxièmement, les cellules souches de la conjonctive sont disséminées sur toute la surface de l'épithélium conjonctival, contrairement à la cornée où les cellules souches sont compartimentées au limbe [68]. Troisièmement, il contient plusieurs types cellulaires différents [53].

L'épithélium de la conjonctive contient, en plus des cellules épithéliales, des cellules globulaires (goblet cells), des mélanocytes, des cellules de Langerhans et des lymphocytes [53]. Les cellules globulaires représentent environ 10% de la population de l'épithélium de la conjonctive. Ces cellules, présentes exclusivement dans la conjonctive (Figure 27), ont pour fonction de sécréter les mucines nécessaires au maintien du film lacrymal [53]. Les cellules épithéliales de la conjonctive et les cellules globulaires dérivent d'un même précurseur [68].

### **1.2.3 Limbe**

Le limbe est la zone de transition entre la cornée et la conjonctive (Figure 1 et Figure 10). Il se distingue en histologie grâce à différents critères. En premier lieu, l'épithélium s'épaissit au limbe pour atteindre environ 10 couches de cellules [32]. Les fibres de collagène du stroma perdent de leur régularité. Des vaisseaux sanguins apparaissent dans le stroma et se logent dans des structures appelées palissades de Vogt. La vascularisation du limbe permet l'apport de nutriments qui diffuseront vers le centre de la cornée [34]. Ensuite, des repères histologiques peuvent être utilisés pour déterminer la transition entre le limbe et la cornée tels que la fin des membranes de Bowman et de Descemet [34]. Enfin, la jonction limbosclérale permettant de situer la transition entre le limbe et la conjonctive est plus difficile à déterminer avec précision. Elle peut être estimée par la jonction de l'iris et du stroma. De plus, contrairement à la conjonctive, l'épithélium du limbe ne contient aucune cellule globulaire [34].

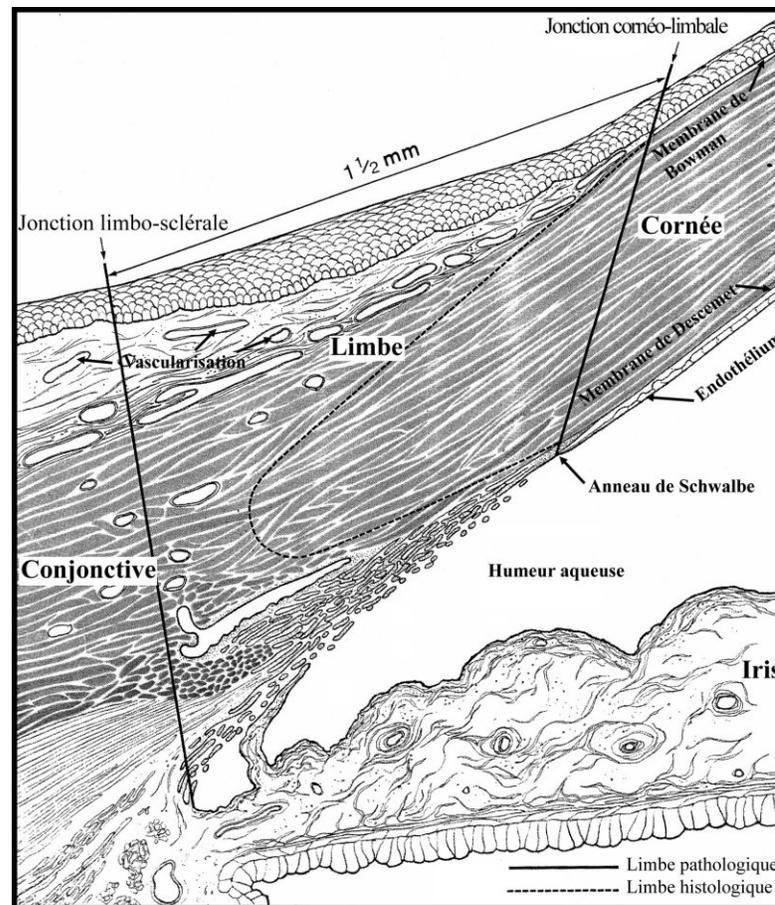


Figure 10. Le limbe humain

Les différents critères histologiques pour l'identification du limbe sont représentés sur cette figure. L'épithélium limbique possède environ 10 couches de cellules. Les vaisseaux sanguins commencent à apparaître dans le stroma sous-jacent. La fin des membranes de Bowman et de Descemet borne la jonction cornéo-limbale, tandis que le point d'attachement de l'iris délimite la jonction limbo-sclérale. Tiré de Hogan, 1971[34].

L'intégrité de l'épithélium cornéen est conservée grâce à sa régénération constante. Les cellules les moins différenciées, les cellules souches, sont présentes au niveau du limbe pour pourvoir la cornée en cellules de remplacement. Plusieurs caractéristiques propres au limbe permettraient la conservation des cellules souches. Par exemple, la vascularisation serait un élément important pour la présence des cellules souches [102, 116].

## **1.3 Cellules souches**

Une cellule souche est définie comme étant une cellule apte à maintenir sa propre population, non seulement en fournissant des cellules filles capables de remplacer les cellules perdues, mais également en se régénérant elle-même [83]. En 1990, Potten et Loeffler ont défini la cellule souche comme une cellule indifférenciée capable de prolifération, d'auto-renouvellement, de produire une progéniture nombreuse, fonctionnelle et différenciée, de régénération après un dommage tissulaire et de flexibilité quant au choix de ces différentes options [73]. L'étude des cellules souches de la cornée a largement été inspirée par les études antérieures sur les cellules souches de la peau et les cellules souches hématopoïétiques [18].

### **1.3.1 Propriétés des cellules souches**

Les cellules souches permettent le remplacement cellulaire et la régénération des tissus. On évalue la population des cellules souches entre 0,5% et 10% de la population cellulaire totale [39, 81]. Bien que peu nombreuses dans les tissus, elles possèdent des caractéristiques propres qui les rendent si singulières.

Les cellules souches ont un très haut potentiel de régénération, traduit en culture par de nombreuses divisions cellulaires [18]. La division des cellules souches donne naissance à deux cellules-filles. Le sentier classique implique une division asymétrique où une des cellules-filles retournera à l'état de cellule souche et l'autre empruntera le sentier de la différenciation et donnera naissance à toute une lignée clonale (Figure 11) [116]. Cette dernière est appelée cellule amplificatrice transitoire (CAT) et acquiert les fonctions nécessaires au maintien d'un épithélium différencié. Les CAT sont prolifératives mais elles possèdent une espérance de vie limitée et ne peuvent effectuer qu'un nombre limité de divisions cellulaires [116]. Seules les cellules en contact avec la membrane basilaire peuvent entrer en mitose [52, 81]. Après sa dernière division cellulaire, une CAT devient une cellule post-mitotique (CPM) qui migre vers les couches superficielles de la cornée. Cette cellule continuera à se différencier pour devenir une cellule en différenciation terminale (CDT) dont l'étape ultime sera la desquamation [102].

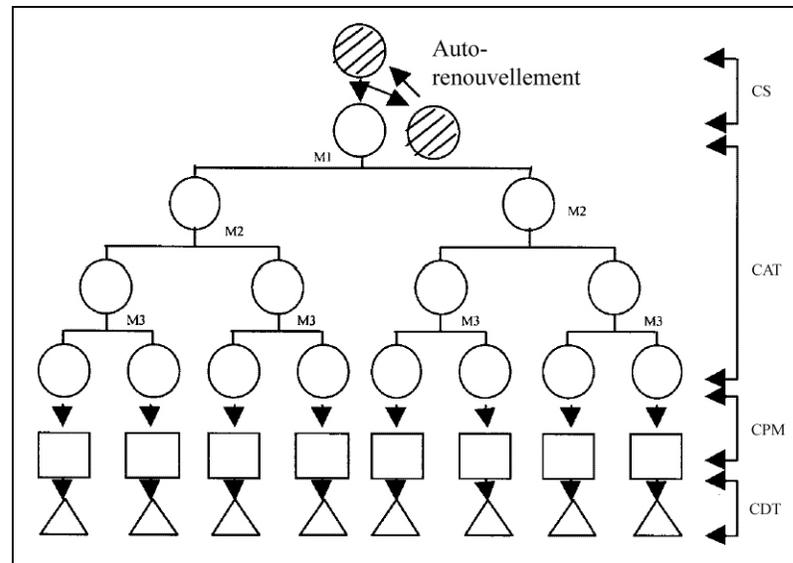


Figure 11. Schéma de la différenciation cellulaire

L'épithélium cornéen est composé de cellules plus ou moins avancées dans la voie de la différenciation. Dans le limbe, les cellules souches (CS) sont à la base du renouvellement des tissus. Les cellules amplificatrices transitoires (CAT) sont les cellules qui amplifient la population cellulaire. Les cellules post-mitotiques (CPM) ne se divisent plus mais ont un métabolisme encore très actif. Les cellules en différenciation terminale (CDT) sont proches de la mort et de la desquamation. Tiré de Sangwan, 2001 [81].

Les cellules souches sont peu différenciées. Leur cytoplasme semble rudimentaire et elles ne présentent pas de marqueur de différenciation [18]. Un autre sentier de différenciation des cellules souches a été proposé. Il implique une division symétrique de la cellule souche qui devient deux CAT. De ce fait, la cellule souche manquante peut être remplacée par une cellule souche qui effectue une division symétrique, mais cette fois, les deux cellules-filles redeviennent des cellules souches [102]. Les cellules souches ont une espérance de vie illimitée, au moins équivalente à la durée de la vie de l'organisme où elle se trouve [18].

Une autre caractéristique des cellules souches : elles possèdent des mécanismes de prolifération afin de réduire les erreurs. En effet, une seule erreur au niveau d'une cellule souche et c'est toute sa progéniture qui en sera affectée [18]. Plusieurs mécanismes existent pour prévenir les erreurs. Premièrement, les cellules souches sont généralement quiescentes, laissant le travail d'amplification aux CAT (Figure 11). Puisque les CAT ont

une durée de vie limitée, une erreur à ce niveau aura de moindres répercussions. Ensuite, les cellules souches ont un cycle cellulaire lent, qui peut être observé par la rétention de 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) ou de thymidine tritiée. Ces observations suggèrent que les cellules souches prolongeraient leur séjour dans la phase  $G_0$  du cycle cellulaire afin de réparer les bris s'il y en a. Enfin, certaines études ont démontré que l'ADN subit une ségrégation asymétrique lors de la division cellulaire, laissant la nouvelle copie entièrement à la CAT [71, 102].

### **1.3.2 Localisation des cellules souches**

Disséminées à travers tout le corps pour la régénération des divers organes, les cellules souches sont d'une importance vitale. De ce fait, elles doivent se situer dans des endroits offrant un bon niveau de protection [15]. Les cellules souches se retrouvent donc dans les endroits les plus protégés. Par exemple, il est connu que dans l'épithélium du petit intestin, elles se situent dans les cryptes, ces dernières s'enfonçant profondément dans le tissu conjonctif sous-jacent [72].

En 1983, Schofield proposa un modèle qui expliquerait la conservation de l'état indifférencié des cellules souches. Selon cette hypothèse de la « niche microenvironnementale », la cellule souche serait maintenue dans un état indifférencié grâce à son association avec le microenvironnement (Figure 12). Ce dernier préviendrait sa maturation en la protégeant des influences permettant sa différenciation. À chaque division cellulaire, une seule cellule aurait accès à la niche, tandis que l'autre serait confrontée aux différents stimuli enclenchant la différenciation [83].

Très étudiée dans le cas des cellules souches hématopoïétiques, l'hypothèse largement acceptée de la niche cadre bien avec la réalité des cellules souches cornéennes. En effet, le limbe réuni toutes les caractéristiques idéales pour la conservation des cellules souches. Notamment, la présence de vaisseaux sanguins, l'environnement protecteur des palissades de Vogt ainsi que la situation anatomique privilégiée protégée par les paupières [102, 116]. Les vaisseaux sanguins permettent une meilleure diffusion des nutriments dans le limbe.

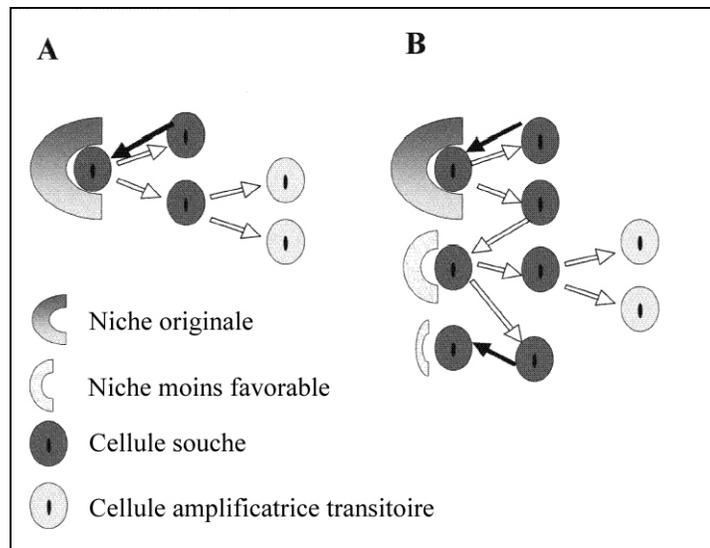


Figure 12. Schéma de la niche microenvironnementale

A) Division asymétrique des cellules souches. Après la division cellulaire, une des deux cellules-filles retourne dans la niche tandis que l'autre s'engage dans la voie de la différenciation. B) Hypothèse des niches successives. Les cellules-filles peuvent retourner dans la niche originale ou aller dans une niche moins favorable au maintien des caractéristiques de cellules souches. C'est une étape intermédiaire vers la voie de la différenciation terminale. Tiré de Daniels, 2001 [15].

La proximité de vaisseaux sanguins dans leur environnement serait d'ailleurs une des particularités des cellules souches [13]. De plus, contrairement aux autres cellules de la cornée, les cellules du limbe sont dépourvues de connections intercellulaires comme les jonctions lacunaires. Ces connections permettent normalement aux cellules d'un tissu de communiquer entre elles pour réguler la croissance, le développement et la différenciation cellulaire. L'absence de telles connections dans les cellules souches indique leur incompétence à la communication et reflète leur besoin de se maintenir dans un microenvironnement distinct [18, 58]. Une autre propriété du limbe est la composition unique de sa membrane basilaire. Comme mentionné précédemment, certains collagènes sont présents ou absents au niveau du limbe. Il a également été démontré que la membrane basilaire stimule davantage l'adhésion cellulaire [18, 45]. Tous ces aspects reprennent l'idée d'une niche microenvironnementale située au limbe pour maintenir la population des cellules souches de la cornée.

Les évidences expérimentales de la localisation des cellules souches cornéennes au niveau du limbe sont nombreuses. Premièrement, les cellules basales du limbe n'expriment pas les marqueurs de différenciation observés dans le centre de la cornée. Ce dernier, ainsi que les cellules suprabasales du limbe, expriment un patron de kératines différent des cellules basales du limbe [11, 18, 47, 82].

Deuxièmement, les cellules basales du limbe montrent une prolifération caractéristique des cellules souches. En culture, ces cellules sont capables d'effectuer beaucoup plus de divisions cellulaires que les cellules basales du centre de la cornée, démontrant leur potentiel élevé de prolifération [19]. *In vivo*, la thymidine tritiée n'est incorporée à long terme que dans les cellules basales du limbe, indiquant un cycle cellulaire long [13].

Troisièmement, les observations cliniques démontrent que les cellules du limbe sont les seules à posséder le pouvoir de régénérer l'épithélium de la cornée. Après une ablation totale de l'épithélium du limbe, la cornée peut difficilement se régénérer. Les ulcères et les érosions sont récurrents. La conjonctive envahie la cornée qui devient opaque et vascularisée [102]. Une expérience menée chez le lapin a démontré que la transplantation de tissu épithélial prélevé au limbe permettait la restauration de l'épithélium d'une cornée sévèrement endommagée [98]. Ce site de prélèvement des cellules épithéliales cornéennes pour la greffe est le seul à permettre le remplacement de l'épithélium, ce que la conjonctive ou le centre de la cornée ne peuvent accomplir [102, 104]. La prolifération et la migration des cellules épithéliales de la cornée se font selon un mouvement centripète. Initialement observé grâce à la migration de pigments à travers la cornée [16], le mouvement centripète des cellules épithéliales a également été confirmé par des études retraçant la migration des cellules à l'aide de particules d'encre [8, 81].

Quatrièmement, des analyses mathématiques prouvent que tout l'épithélium de la cornée peut être continuellement régénéré grâce aux seules cellules basales du limbe [86]. Pour expliquer le renouvellement de l'épithélium, une hypothèse fût proposée par Thoft et Friend, sous le nom d'hypothèse XYZ [96]. Ce scénario prévoit que les cellules perdues par l'épithélium sont remplacées par les nouvelles cellules venues du limbe. Les cellules du limbe se déplaceraient vers la surface selon le mécanisme XYZ où X (prolifération des

cellules basales vers la surface) + Y (prolifération et migration centripète des cellules basales du limbe) = Z (desquamation cellulaire) [15, 96].

### 1.3.3 Marqueurs des cellules souches

L'état indifférencié des cellules souches les rend différentes au point de vue moléculaire. Elles expriment certains marqueurs qui peuvent être utilisés pour les reconnaître *in vivo* et *in vitro*. Malheureusement, aucun marqueur n'est spécifique uniquement aux cellules souches de la cornée. Pour s'assurer du type cellulaire étudié, il faut généralement utiliser une combinaison de marqueurs.

La conservation *in vivo* à long terme de la thymidine tritiée ou du BrdU est généralement acceptée comme preuve de la présence de cellules souches [13]. La kératine 19 est exprimée par les cellules basales du limbe [50] et peut donc être utilisée comme marqueur des cellules souches. Cependant, la kératine 19 est également exprimée par les cellules épithéliales de la conjonctive adjacente [20]. Mais, selon Lauweryns et son équipe, en combinant cette expression avec celle de la vimentine, il est possible d'exclure les cellules d'origine conjonctivale. Donc, les cellules souches seraient celles qui coexprimeraient la kératine 19 et la vimentine [51]. D'autres marqueurs ont également été proposés. L' $\alpha$ -énolase [115], l'intégrine  $\alpha_9\beta_1$  [92] et le facteur de transcription p63 [70] seraient exprimés préférentiellement dans les cellules souches.

Pour permettre l'identification des cellules souches, il existe également des marqueurs qui sont absents des cellules souches. La paire de kératines 3/12, spécifique à l'épithélium de la cornée, n'est pas exprimée par les cellules basales du limbe [82]. De même que la kératine 4, spécifique à l'épithélium conjonctival, qui n'est retrouvé ni dans les cellules souches, ni dans les cellules du centre de la cornée [20, 49]. Certaines connexines pourraient également permettre l'identification des cellules souches. Les connexines sont des protéines présentes dans les jonctions lacunaires. Elles permettent le transport de petites molécules en s'organisant en oligomères. La connexine 43 est absente des cellules basales du limbe, alors que son expression s'intensifie avec la différenciation cellulaire dans le centre de la cornée [58]. Les cellules dépourvues de connexine 43 auraient un rôle de cellule souche.

### 1.3.4 Conservation des cellules souches en culture

*In vivo*, la population de cellules souches serait maintenue grâce à la niche microenvironnementale. Cette dernière procurerait aux cellules souches un environnement propice à leur état indifférencié et les protégerait des facteurs extérieurs provoquant la différenciation cellulaire [83]. En culture, il est nécessaire de reproduire ces conditions afin de conserver les cellules souches. Une méthode éprouvée et reconnue de tous est la méthode de coculture rapportée par Rheinwald et Green en 1975 [78]. Les cellules épithéliales sont cultivées sur une couche nourricière de fibroblastes murins irradiés. Ces fibroblastes ne peuvent se diviser mais ont un métabolisme actif pour soutenir la croissance des cellules épithéliales.

*In vitro* aussi bien qu'*in vivo*, les cellules épithéliales sont destinées à une lente mais irréversible différenciation terminale. Cependant, la vitesse de cette différenciation peut être sensiblement accélérée dans les cas où la culture est faite de façon inappropriée. La technique de coculture avec une couche nourricière permet de garder les cellules souches en culture pour de nombreux passages. La validité de cette méthode a été vérifiée par le potentiel de prolifération cellulaire. De plus, les greffes effectuées avec ces cultures ont pu être maintenues sur de longues périodes dans le cas de cellules épithéliales de peau pour les grands brûlés. Cette étude montrait la viabilité des cellules même après 15 années [67].

La conservation des cellules souches en culture a inspiré de nombreuses équipes à travers le monde à régénérer un épithélium complet. Bien que les procédures soient différentes, que ce soit par culture de feuillets [66], sur une membrane amniotique [44, 85, 101] ou sur un gel de fibrine [77], elles se rejoignent toutes par l'idée de départ : utiliser les cellules souches dans le but de les expandre *in vitro* afin de greffer le nouvel épithélium ainsi généré sur les plaies *in vivo*.

## 1.4 Déficience en cellules souches

Continuellement exposée à des traumatismes mineurs, la cornée possède des mécanismes de réparation rapide. Malheureusement, des traumatismes plus importants peuvent survenir et la guérison ne se solde pas toujours par un retour à la normale. Une abrasion de la cornée, peu importe le degré de sévérité, résulte en la perte d'une partie de l'épithélium.

Les cellules adjacentes à la lésion entreprennent alors de recouvrir la plaie, par migration et par division cellulaire. Comme il a été mentionné précédemment, toutes ces cellules proviennent des cellules souches situées dans le limbe. Lorsque le traumatisme s'étend jusqu'au limbe, les cellules souches peuvent être détruites. On parle alors de déficience en cellules souches [65].

#### **1.4.1 Apparence clinique**

Une cornée atteinte d'une déficience en cellules souches ne peut régénérer son épithélium convenablement. Les cellules de la conjonctive adjacente migrent pour recouvrir la cornée, qui devient opaque et superficiellement vascularisée. La conjonctivalisation est fréquemment accompagnée de défauts épithéliaux, d'inflammation chronique et d'une cicatrisation anormale [12]. Les patients atteints d'une déficience en cellules souches perdent lentement la vision et souffrent souvent de photophobie. Ces patients ne sont généralement pas de bons candidats pour une greffe de cornée conventionnelle, puisque celle-ci ne restaure que le centre de la cornée mais pas le limbe [75]. Une preuve de la conjonctivalisation peut être obtenue par impression cytologique et détection des cellules globulaires [18, 75]. Ces cellules normalement restreintes à la conjonctive, migrent avec l'épithélium conjonctival lors d'une déficience en cellules souches et se retrouvent sur toute la cornée [18, 75, 98].

#### **1.4.2 Causes**

La surface oculaire peut être détruite de plusieurs façons, incluant des agressions externes et des maladies. La déficience en cellules souches peut être causée par une brûlure chimique ou thermique, des radiations ultraviolet (UV) ou ionisantes, des chirurgies au limbe, des cryothérapies, le port prolongé de verres de contact, des infections microbiennes continuelles ou encore par des maladies d'ordre inflammatoire comme le syndrome de Stevens-Johnson et la maladie pemphigoïde [12].

La cause de déficience en cellules souches la plus courante et dont les patients atteints pourront bénéficier le plus rapidement des traitements est la brûlure chimique. Les brûlures chimiques ne sont pas seulement l'apanage des travailleurs industriels. Ce type de brûlure

peut aussi arriver à la maison et dans les milieux agricoles. Les brûlures chimiques par une base forte sont très répandues puisque de telles bases sont présentes dans plusieurs produits ménagers et industriels [107]. Elles impliquent généralement un hydroxyde comme le NaOH ou le NH<sub>4</sub>OH. Il y a également l'ammoniac anhydre liquéfié sous pression qui est utilisé dans les préparations d'engrais chimique. En cas de libération subite, l'ammoniac cherchera à se combiner à l'eau pour former un hydroxyde. C'est pourquoi les yeux, par la présence des larmes, sont le plus souvent très affectés. Les hydroxydes et les autres bases fortes causent la saponification des acides gras des membranes cellulaires. Les cellules meurent par désintégration de leur membrane [65]. Dans le cas d'une brûlure par un acide, la réaction exothermique de l'association de l'acide avec l'eau est aussi dommageable que l'acide lui-même. Il s'ensuit donc une combinaison de brûlures thermique et chimique. Il existe divers degrés de brûlure. Les degrés I et II sont plus superficiels et ont de bonne chance de guérison, tandis que dans les degrés III et IV, il y a une perte totale de l'épithélium et la cornée perd sa transparence. Ce sont des cas de déficience en cellules souches. Le pronostic est généralement mauvais puisque l'épithélium ne se régénère pas et le stroma reste opaque [65].

### 1.4.3 Traitements

Les traitements proposés aux patients souffrant de déficience en cellules souches sont peu nombreux. La greffe de tissus est la procédure chirurgicale la plus répandue (Figure 13). L'idéal consiste à greffer un tissu autologue mais dans le cas de lésions bilatérales, une allogreffe est le seul recours. La greffe autologue du limbe comporte certains risques pour l'œil qui subit le prélèvement. C'est pourquoi plusieurs équipes développent actuellement des techniques de greffe de cellules cultivées qui ont subi une expansion *in vitro*.

Pendant longtemps, les scientifiques ont cru que les cellules épithéliales de la conjonctive pouvaient régénérer l'épithélium cornéen selon un processus de transdifférenciation. Les cliniciens tentèrent donc de guérir les troubles cornéens en greffant une partie de la conjonctive sur la cornée [95]. Malgré certains résultats positifs, des doutes subsistaient quant à la transdifférenciation totale et complète des cellules conjonctivales en cellules cornéennes. Cette pratique fût abandonnée lorsque la preuve fût faite que les cellules de la

conjonctive et de la cornée ne dérivent pas des mêmes précurseurs et que les cellules souches de la cornée se trouvent dans le limbe [46, 62, 103].

En réalisant l'importance du rôle du limbe dans le renouvellement de l'épithélium de la cornée, les transplantations de limbe pour le traitement de la déficience en cellules souches devinrent un objet d'étude [17, 39, 94, 98-100, 105]. Une des premières greffes de limbe chez un patient fût réalisée en 1989 [39]. Les greffes autologues de limbe permettent de restituer un épithélium cornéen dans un œil déficient en cellules souches, sans risque de rejet. Par contre, cette pratique ne peut être effectuée que chez les patients ayant une lésion sur un seul des deux yeux [12]. De plus, la greffe doit être suffisamment étendue pour permettre une bonne régénération de l'épithélium (Figure 13). Cependant, il a été rapporté qu'un prélèvement d'une trop grande partie de limbe pouvait créer une déficience en cellules souches dans l'œil donneur [9, 10].

Les allogreffes sont des greffes de tissus d'un donneur qui peuvent être utilisées dans le cas où le patient est atteint de déficience en cellules souches aux deux yeux. Le limbe n'est pas une zone immunologiquement protégée comme la cornée car il y a présence de vaisseaux sanguins [112]. Pour contrer le rejet, les patients doivent être traités avec un immunosuppresseur, généralement la cyclosporine A. À long terme, la cyclosporine A peut avoir des effets néfastes sur les fonctions rénales et hépatiques [99, 105]. Malgré le traitement avec la cyclosporine A, les risques de rejet restent présents [17, 40].

Le risque de provoquer une déficience en cellules souches dans l'œil donneur poussa l'équipe de Pellegrini, en 1997, à appliquer une nouvelle technique [66]. En prélevant une très petite biopsie de cellules épithéliales du limbe contenant des cellules souches, le risque pour l'œil donneur était ainsi écarté. Les cellules mises en culture se multipliaient pour former un feuillet qui permit de régénérer l'épithélium de l'œil atteint. D'autres équipes préfèrent utiliser un support pour transplanter les cellules cultivées. L'utilisation de membranes amniotiques devint très populaire [84, 85, 101]. Par contre, ces dernières expériences de culture sur membrane amniotique furent sévèrement critiquées pour leur manque de contrôle sur la conservation des cellules souches en culture [77].

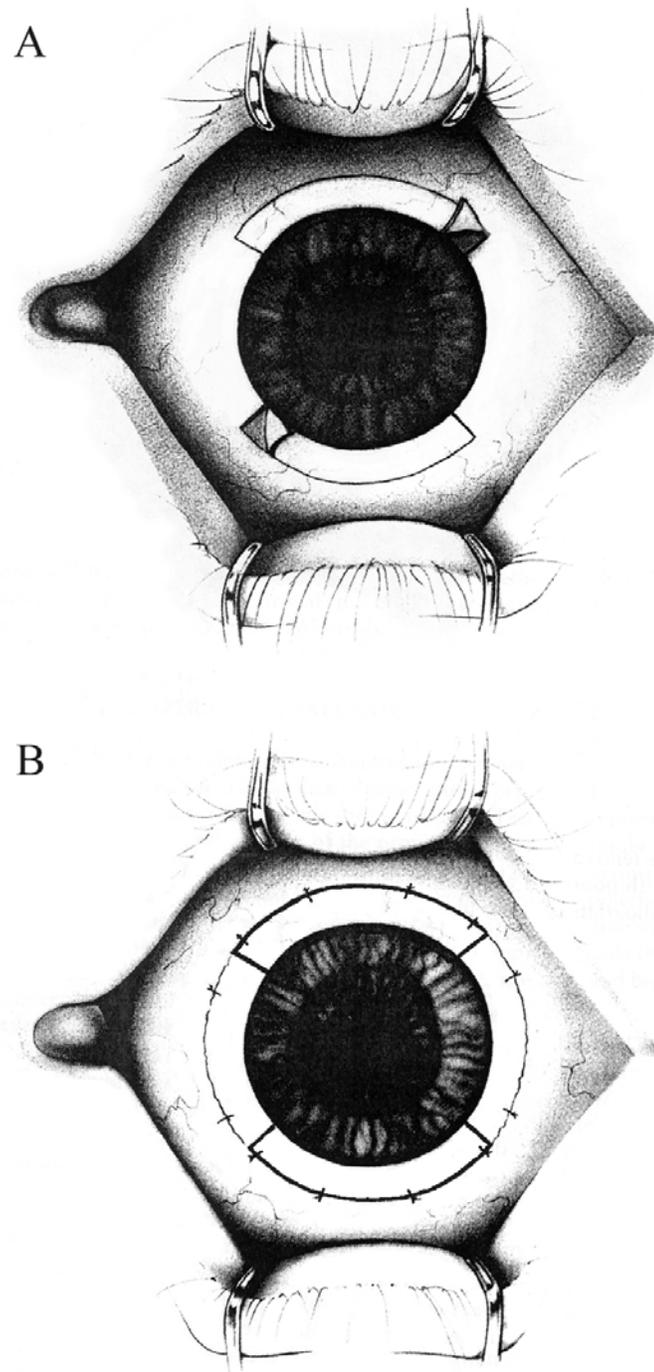


Figure 13. Procédure chirurgicale pour une greffe de limbe

Deux quadrants sont prélevés d'un œil sain (A) et greffés sur l'œil souffrant de la déficience en cellules souches. Tiré de Coster, 1998[12].

En effet, les cultures sur membrane amniotique se font en absence d'une couche nourricière, la seule méthode prouvée pour conserver les cellules souches *in vitro* [77, 78]. De plus, dans des études plus récentes, les chercheurs ne purent observer d'amélioration à l'état des patients atteints de déficience en cellules souches en utilisant des cultures de cellules sur membrane amniotique [40, 88]. Une équipe tenta même de reconstruire un épithélium de cornée chez le lapin avec des cellules de la muqueuse orale. Cependant, ces cellules ne peuvent se transdifférencier parfaitement en cellules épithéliales cornéennes [63]. Une technique prometteuse de greffe de cellules cultivées provient d'une équipe italienne. Les cellules épithéliales sontensemencées sur un gel de fibrine en présence d'une couche nourricière, le gel servant de matrice solide au transport et à la suture des cellules [77].

## **1.5 Modèle animal**

Bien que la culture de cellules permette d'étudier plusieurs aspects et caractéristiques d'un tissu, il est parfois essentiel d'expérimenter *in vivo*. L'utilisation d'un modèle animal pour l'étude de la régénération de l'épithélium cornéen permet d'avoir une vue d'ensemble du mécanisme plutôt que des caractéristiques isolées comme c'est le cas *in vitro*. Les études sur l'animal deviennent donc un composant essentiel et complémentaire à la recherche fondamentale.

### **1.5.1 L'utilisation du modèle de lapin dans les études sur la cornée**

Un des modèles les plus utilisés pour les études sur l'épithélium cornéen est le lapin [28, 55, 63, 98, 114]. La cornée de lapin a un diamètre similaire à celui de la cornée humaine, facilitant ainsi le travail. De plus, le lapin est un animal de laboratoire dont les lignées sont bien établies et dont la garde en animalerie est courante. Tout comme les cellules épithéliales humaines, les cellules épithéliales de cornée de lapin (CECL) sont facilement cultivables *in vitro*. Donc, la majorité des traitements envisagés chez l'humain peuvent d'abord être testés chez le lapin.

Par contre, comme tout modèle, la cornée de lapin ne saurait être un modèle parfait. En effet, des différences histologiques peuvent être notées, ce qui suggère également des

différences au niveau fonctionnel. De plus, la cornée de lapin n'est pas aussi bien caractérisée que peut l'être la cornée humaine. Ceci emmène des problèmes au niveau de l'approvisionnement en anticorps spécifiques. Le lapin demeure tout de même le modèle animal de choix pour les études sur la cornée.

### 1.5.2 Histologie de la cornée de lapin et particularités

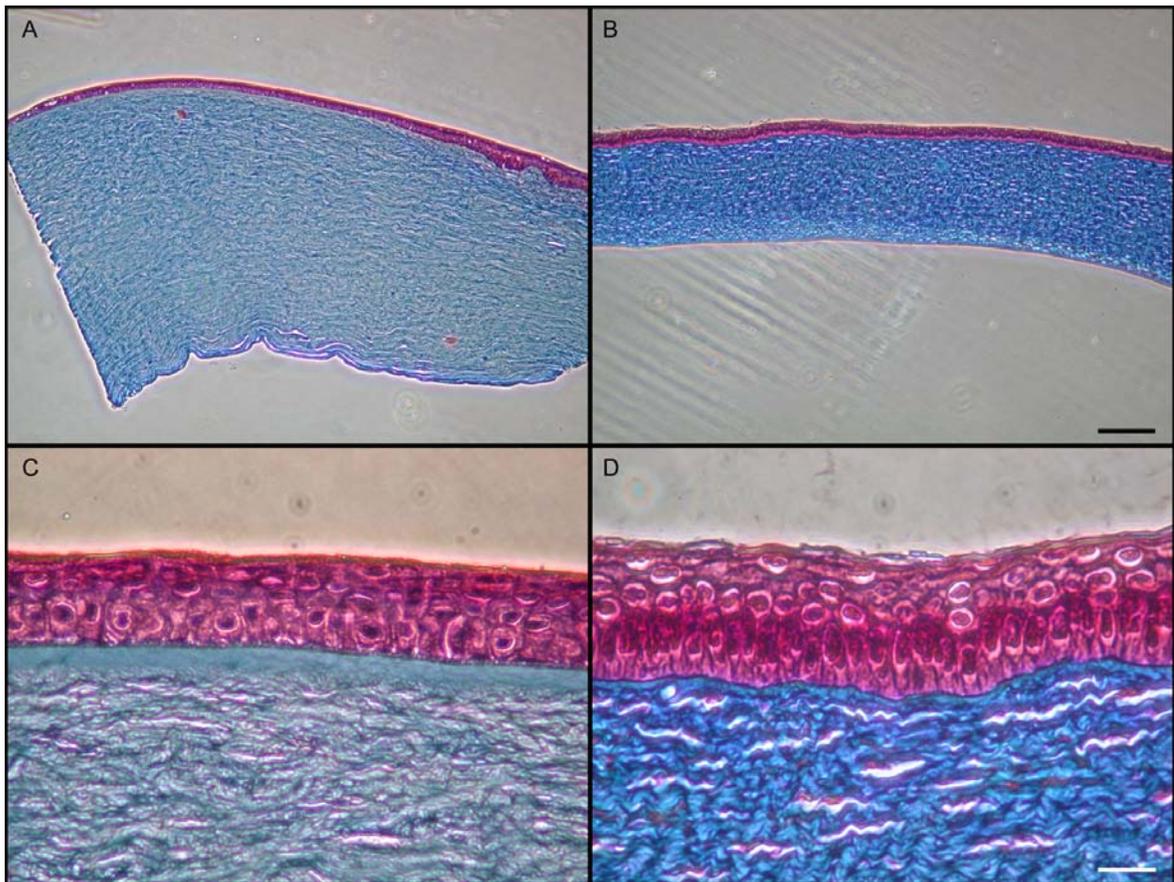


Figure 14. Histologie de la cornée humaine et de la cornée de lapin

La cornée humaine (A et agrandie en C) est plus épaisse et plus rigide que la cornée de lapin (B agrandie en D). Sur les agrandissements, on voit nettement la membrane de Bowman présente sous l'épithélium de la cornée humaine (C) et absente de la cornée de lapin (D). Coloration au trichrome de Masson (cellules roses et collagène bleu). A) et B) barre = 200µm; C) et D) barre = 20µm.

La cornée de lapin comprend les mêmes parties que la cornée humaine, sauf pour ce qui est de la membrane de Bowman, absente chez le lapin (Figure 14). L'épithélium se présente de la même façon, composé de 4 à 6 couches de cellules stratifiées, cuboïdales en couche basale et aplaties en couche superficielle. Le stroma est moins épais et n'a pas la même rigidité que le stroma de la cornée humaine. Au niveau du limbe, les palissades de Vogt sont absentes. Elles sont remplacées par de rares protubérances [29]. La membrane de Descemet et l'endothélium sont similaires à ce qui est retrouvé chez l'humain.

### **1.5.3 Induction d'une déficience en cellules souches**

Pour l'étude de la régénération de l'épithélium cornéen, il est nécessaire d'induire une déficience en cellules souches épithéliales dans les yeux originellement sains des lapins. Dans les études *in vivo* avec modèle animal, plusieurs méthodes sont employées pour induire une déficience en cellules souches. Malgré leurs différences, elles se rejoignent toutes par l'idée que les cellules souches doivent être totalement enlevées de la cornée pour éviter les faux-positifs.

Une méthode couramment utilisée est celle initialement décrite par Kruse *et al.* en 1990 [46]. L'épithélium du limbe est retiré chirurgicalement et l'épithélium du centre de la cornée est décollé par frottement avec un coton-tige imbibé de n-heptanol.

Notre choix s'est arrêté sur la méthode de Gipson *et al.* [28] qui offre l'avantage d'être plus simple à réaliser. L'épithélium du limbe est retiré par kératectomie, une procédure chirurgicale dans laquelle une mince lamelle de cornée est retirée. L'épithélium du centre de la cornée est ensuite gratté à l'aide d'un scalpel afin de dénuder complètement la cornée.

## **1.6 Gel de fibrine**

Utilisé comme support pour la culture des CECL dans la présente étude, le gel de fibrine comporte plusieurs caractéristiques qui seront décrites dans cette section.

Le gel de fibrine, aussi connu sous le nom de colle de fibrine, est un dérivé de plasma humain avec des applications cliniques multiples. Ce produit à deux composants mime les dernières étapes de la cascade de coagulation grâce à l'activation du fibrinogène par la

thrombine. Le produit se gélifie pour former une matrice semi-rigide qui est dégradée naturellement après quelques jours [76].

### **1.6.1 Utilisations possibles**

Les utilisations du gel de fibrine sont aussi nombreuses que variées. Il peut être utilisé lors de chirurgie comme agent hémostatique pour prévenir la perte de sang. Il est présentement utilisé dans plusieurs spécialités chirurgicales, notamment la chirurgie cardiovasculaire, la chirurgie thoracique, la neurochirurgie, la chirurgie plastique et la chirurgie dentaire. L'utilisation du gel de fibrine a été démontrée comme ayant des effets bénéfiques sur la santé des patients, notamment en réduisant les hémorragies et les complications chirurgicales [36]. Sa forte adhérence aux tissus en fait une colle tissulaire de choix. Il peut se substituer aux points de suture dans les cas de greffe de peau chez les grands brûlés ou de chirurgies plastiques [76].

Outre les applications chirurgicales, le gel de fibrine peut être utilisé comme moyen pour administrer lentement des médicaments, des hormones ou des antibiotiques. Dans ces cas, la dissolution du gel de fibrine dans l'organisme permet le relâchement du médicament [76].

Le domaine du génie tissulaire s'intéresse de plus en plus aux propriétés du gel de fibrine. En effet, le gel peut servir de support pour la culture de cellules *in vitro*. Les cellules peuvent également êtreensemencées dans le gel de fibrine qui devient alors une biomatrice en trois dimensions. L'avantage du gel de fibrine sur les biomatrices conventionnelles est sa combinaison unique de caractéristiques. Il est biocompatible, malléable, biodégradable, non-immunogène, adhérent et versatile [5].

### **1.6.2 Principe de polymérisation**

Le gel de fibrine se présente en deux composantes; une solution de fibrinogène et une solution de thrombine. Mélangées ensemble, ces deux solutions simulent les étapes finales de la coagulation sanguine pour former un gel semblable à un caillot physiologique (Figure 15). La thrombine active le fibrinogène en le clivant en monomères de fibrine et, grâce à la présence de calcium, active également le facteur XIII. Les monomères de fibrine se

combinent rapidement sous l'action du facteur XIII activé (FXIIIa) pour former un polymère de fibrine. La solution contient également de l'aprotinine, un agent antifibrinolytique, pour prévenir la dissolution prématurée du gel [76].

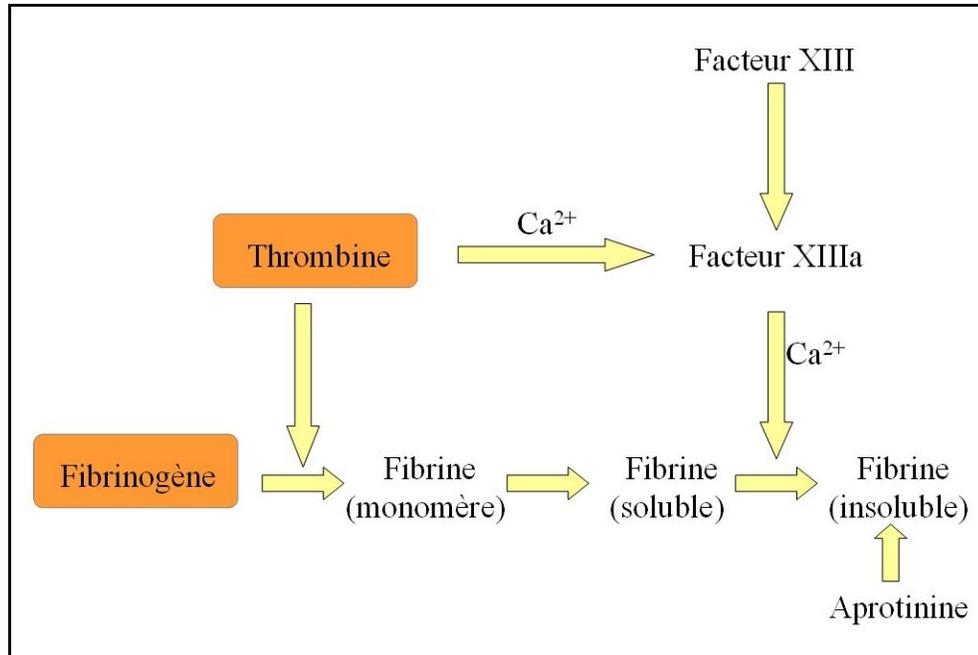


Figure 15. Schéma de la polymérisation du gel de fibrine

La thrombine active le fibrinogène en le clivant en monomères de fibrine. Le facteur XIII est activé par la thrombine et son cofacteur le calcium pour devenir le FXIIIa. Le FXIIIa permet la polymérisation de la fibrine. L'aprotinine joue un rôle de prévention fibrinolytique. Tiré de Baxter, 2001[5].

### 1.6.3 Propriétés du gel

Le gel de fibrine provient de plasma humain. Il est donc histocompatible et non-cytotoxique. Tout comme les caillots naturels, le gel de fibrine est facilement dégradé en quelques jours. La vitesse de dissolution du gel peut être contrôlée par la concentration d'aprotinine dans le gel. Le gel de fibrine adhère bien aux tissus et il établit des interactions avec la matrice de collagène des tissus. Il est facilement modelable et il peut être coulé en n'importe quelle forme. Il peut être appliqué avec une seringue ou un vaporisateur. Le gel de fibrine solidifié peut également être suturé [5].

### **1.6.4 Utilité pour les greffes dans cette étude**

Une des applications du gel de fibrine est de servir de support solide à la culture de cellules. Déjà rapportée pour la culture des kératinocytes de la peau [3, 69], cette application a été mise à profit par une équipe italienne pour la régénération d'un épithélium cornéen dans le cas d'une déficience en cellules souches [77]. La conservation des cellules souches sur le gel de fibrine a été démontrée par marquage avec des anticorps spécifiques [31] et grâce au potentiel de prolifération cellulaire [77].

## **1.7 Marqueurs utilisés**

Les cellules épithéliales expriment un patron de protéines différent selon leur localisation. L'épithélium du centre de la cornée, du limbe et de la conjonctive exprime des protéines caractéristiques qui sont utilisables comme marqueurs spécifiques. Malheureusement, peu de marqueurs ont pu être utilisés pour cette étude, le modèle animal limitant l'accès aux anticorps.

### **1.7.1 Kératines**

Les filaments intermédiaires du cytosquelette se caractérisent par leur diamètre de 6 à 11nm, à mi-chemin entre celui des microtubules et des microfilaments. Les kératines (K) sont une sous-classe des filaments intermédiaires présents dans les épithélia [51]. Les kératines sont des protéines fibreuses qui se caractérisent par leur forme allongée et leur structure secondaire incluant des motifs structuraux (Figure 16). Les kératines  $\alpha$  présentent une structure primaire séquentielle de 7 résidus qui force l'adoption d'une structure secondaire en hélice  $\alpha$  [106]. Les kératines  $\alpha$  qu'on retrouve dans les épithélia sont toujours constituées d'une paire comprenant une kératine de type I (acide) et une kératine de type II (basique) [90]. Jusqu'à 15 kératines de chaque type sont connues jusqu'à maintenant. Les kératines acides de type I ont des poids moléculaires qui varient de 44 à 60Kd, tandis que les kératines basiques de type II ont une gamme de poids moléculaires de 50 à 70Kd [91]. Les kératines de la paire s'associent étroitement en hétérodimère et elles s'enroulent l'une autour de l'autre pour former une hélice. Chaque axe d'hélice  $\alpha$  est lui-même hélicoïdal et cette structure est dite « spire enroulée » (coiled coils). Les spires enroulées s'associent entre elles par l'intermédiaire des domaines N- et C- terminaux de chaque polypeptide.

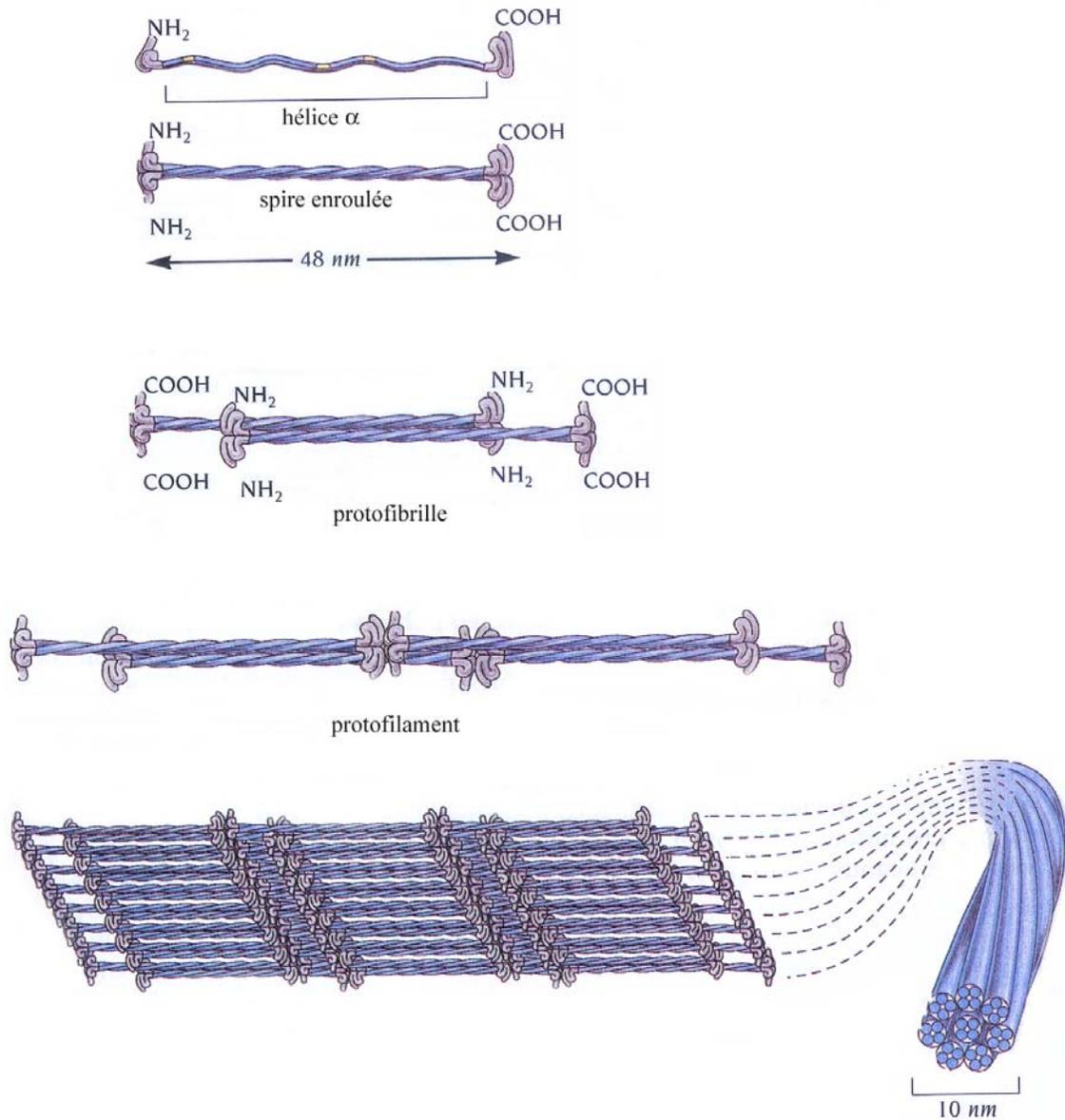


Figure 16. Structures tertiaires et quaternaires des kératines

Chaque monomère présente une grande portion en hélice  $\alpha$  qui se combine pour former une spire enroulée. Les spires enroulées s'assemblent de façon antiparallèle pour former des protofibrilles, des protofilaments et ensuite, une fibre de 10nm. Tiré de Brandon, 1999 [7].

Deux rangées de spires enroulées alignées de façon antiparallèle forment une protofibrille, et quatre protofibrilles forment une microfibrille [14, 106]. Les kératines forment dans la cellule un réseau qui parcourt le cytoplasme. Les filaments se rejoignent aux desmosomes

et aux hémidesmosomes. Ils ont donc comme fonction d'ancrer les cellules les unes aux autres ainsi qu'à leur membrane basilaire [91].

Dans les épithélia stratifiés, les kératines sont exprimées de façon spécifique aux tissus et aux types cellulaires. À titre d'exemple, la kératine 14 est retrouvée dans toutes les cellules épithéliales de la peau, tandis que les kératines 1, 10 sont spécifiques aux cellules épithéliales de peau différenciées [48]. Dans l'épithélium de la cornée humaine, de nombreuses kératines sont exprimées (K3, K8, K12, K14, K17 et autres) de même que dans la conjonctive (K4, K7, K8, K13, K17, K19 et autres) [20]. Seules les kératines 3 et 12, pour la cornée, et la kératine 4, pour la conjonctive, sont les plus spécifiques et peuvent servir de marqueur.

#### *1.7.1.1 Kératine 3*

La kératine 3 (K3) est une kératine de type basique de 64Kd. Elle est depuis longtemps reconnue comme un marqueur des cellules épithéliales cornéennes. Cette kératine est exprimée par toutes les couches de l'épithélium du centre de la cornée mais seulement par les cellules suprabasales du limbe. Donc, la K3 est un marqueur des cellules différenciées de la cornée et son absence trahirait la présence de cellules souches [82]. Bien que la K3 soit exprimée préférentiellement dans la cornée, elle est tout de même exprimée faiblement dans la conjonctive [47, 109]. La K3 s'associe avec la kératine 12 pour former un dimère stable [82].

#### *1.7.1.2 Kératine 12*

Formant une paire avec la K3, la kératine 12 (K12) est de type acide et a un poids moléculaire de 55Kd. Contrairement à la K3, la K12 n'a jamais été rapportée comme étant exprimée dans la conjonctive. Cette kératine serait donc le meilleur marqueur des cellules épithéliales de la cornée [62].

#### *1.7.1.3 Kératine 4*

La kératine 4 (K4) a un poids moléculaire de 59Kd et fait partie des kératines basiques [82]. La K4 est fortement exprimée par l'épithélium de la conjonctive [20]. Sa spécificité à la

conjonctive en fait un bon marqueur. Au niveau du limbe, la K4 est exprimée par les cellules superficielles [50].

#### *1.7.1.4 Kératine 19*

La kératine 19 (K19) est exprimée par les cellules épithéliales de la conjonctive mais également par les cellules basales du limbe. De ce fait, les cellules du limbe positives pour la K19 sont considérées comme des cellules souches [26, 50]. Bien qu'imparfait, ce marqueur des cellules souches de la cornée se trouve d'une grande utilité.

### **1.7.2 Facteurs de transcription**

Les protéines nécessaires à l'initiation de la transcription, autres que les ARN polymérases, sont des facteurs de transcription. La présence d'un facteur de transcription au sein de l'unité de transcription est essentielle pour la transcription de la cible spécifique [54].

#### *1.7.2.1 P63*

P63 est un facteur de transcription faisant partie de la famille de P53, un suppresseur de tumeur. Cette protéine est essentielle dans le développement embryonnaire, notamment, durant la différenciation de l'ectoderme [60]. Les bourgeons de membres expriment P63. En absence de ce facteur de transcription, les embryons ont les membres tronqués et des problèmes au niveau de tous les épithélia stratifiés et leurs dérivés. Des études démontrent que P63 serait impliqué dans le soutien des cellules souches épithéliales [113]. Ceci en fait un marqueur de choix pour les cellules souches de la peau et de la cornée. P63 est exprimé fortement dans les cellules souches et plus faiblement dans les CAT [70].

### **1.7.3 Les mucines**

Dans la cornée, les mucines sont associées avec le film lacrymal (Figure 8). Les mucines constituent des molécules jouant un rôle de structure dans la couche muqueuse des larmes. Cette couche muqueuse est en association avec les cellules épithéliales de la cornée et de la conjonctive. Les mucines ont comme fonction de lubrifier la surface oculaire, de stabiliser le film lacrymal, de prévenir le dessèchement de la cornée et d'empêcher l'infiltration des pathogènes. Toutes les mucines sont des glycoprotéines de structure semblables : elles

présentent des tandems répétés d'acides aminés riches en sérine, thréonine et proline et elles sont O-glycosylées, ce qui leur donne un poids moléculaire très élevé. Des études récentes compilent 14 gènes pour les mucines humaines (Tableau 1), nommées en ordre de découverte : MUC1, MUC2, MUC3A, MUC3B, MUC4, MUC5AC, MUC5B, MUC6 à 9 et MUC11 à 13 [2].

Tableau 1. Caractéristiques des mucines les plus connues

Mucine	Type	Site d'expression
MUC1	Transmembranaire	Épithélium cornée / conjonctive
MUC2	Sécrété / forme un gel	Épithélium cornée / conjonctive
MUC4	Transmembranaire	Épithélium conjonctive / cornée
MUC5AC	Sécrété / forme un gel	Cellules globulaires
MUC5B	Sécrété / forme un gel	
MUC6	Sécrété / forme un gel	
MUC7	Sécrété / Monomère soluble	Glande lacrymale

Tiré de Watanabe, 2002 [108]

Les mucines sont exprimées en majeure partie par les cellules globulaires de la conjonctive (Tableau 1). Cependant, les cellules épithéliales de la conjonctive et de la cornée produisent également des mucines. La glande lacrymale serait aussi une source de mucines pour le film lacrymal [30].

#### 1.7.3.1 MUC5AC

La mucine la plus abondante du film lacrymal est la MUC5AC (Figure 8). Elle fait partie des plus grosses glycoprotéines connues [2]. Elle forme un gel qui retient l'eau des larmes. Elle est synthétisée et sécrétée par les cellules globulaires de la conjonctive (Tableau 1) [30, 38]. Elle est donc considérée comme un marqueur de ce type cellulaire [59].

### *1.7.3.2 Cellules globulaires*

Les cellules globulaires (goblet cells) se retrouvent disséminées à travers la conjonctive. Elles sont reconnaissables en histologie par leur forme très ronde et la présence de vésicules dans leur cytoplasme. La présence des protéines glycosylées leur donne une coloration différente en histologie des cellules les entourant. Les cellules globulaires fournissent la mucine MUC5AC qui se disperse sous l'action des paupières dans le film lacrymal (Figure 8 et Tableau 1) [87].

Les cellules globulaires se retrouvent uniquement dans la conjonctive et sont absentes de la cornée. Des études montrent que les cellules souches épithéliales de la conjonctive sont des précurseurs bipotents, qui peuvent donner naissance aux cellules de la conjonctive et aux cellules globulaires [68, 110]. Ces résultats confirment l'utilité des cellules globulaires dans le diagnostic de conjonctivalisation de la cornée. En effet, la présence de cellules globulaires au centre de la cornée est un puissant indicateur de la conjonctivalisation et de la déficience en cellules souches de la cornée [18, 75, 98].

## **1.8 Objectifs**

Les traitements proposés à ce jour pour les patients souffrant de déficience en cellules souches ne sont pas pleinement satisfaisants. Les résultats obtenus jusqu'à maintenant avec les greffes hétérologues de limbe peuvent compromettre la qualité de vie des patients, sans être entièrement garanties à long terme. Dans ce contexte, les recherches à ce niveau se font très actives. La solution proposée par l'équipe de De Luca nous a séduit. La greffe de cellules autologues cultivées sur gel de fibrine pour restaurer la population de cellules souches chez les patients semble prometteuse. Puisque cette étude s'est déroulée avec des sujets humains, seuls des résultats d'examen externes ont été obtenus. En effet, le prélèvement de biopsies n'est pas indiqué chez ces patients déjà éprouvés. Nous avons donc voulu pousser plus loin la compréhension de la régénération épithéliale cornéenne grâce à cette technique en utilisant un modèle animal.

Les objectifs des travaux rapportés dans ce mémoire comportent plusieurs volets. Premièrement, il nous fallait mettre au point les conditions de culture cellulaire à partir d'une petite biopsie de limbe prélevée chez le lapin. Ensuite, nous devions établir un

modèle de déficience en cellules souches chez le lapin afin d'étudier la régénération d'un épithélium cornéen par l'entremise d'une greffe de CECL cultivées. Finalement, l'objectif le plus important était de vérifier de façon microscopique l'influence de ces greffes de cellules sur la guérison de la déficience en cellules souches.

## *Chapitre 2 - Matériel et Méthodes*

## 2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

Le projet a débuté par le développement d'une méthode d'isolement et de culture des cellules épithéliales de cornée de lapin (CECL). Comme pour les cellules épithéliales humaines, ces cellules ont été mises en coculture avec une couche nourricière de fibroblastes 3T3 murins pour conserver les cellules souches. Les cultures de CECL ont été établies à partir d'une très petite biopsie de limbe de cornée de lapin de quelques millimètres carrés (Figure 17). Au premier passage, les CECL ont été cultivées sur un gel de fibrine. À la confluence des cellules, les gels ont été utilisés pour faire des analyses ou pour la greffe chez un animal déficient en cellules souches. Un total de 20 lapins ont été utilisés pour l'expérience des greffes. Ceux-ci furent sacrifiés à différents temps, jusqu'à un mois post-greffe. Les cornées prélevées ont ensuite été analysées en histologie et par immunomarquage.

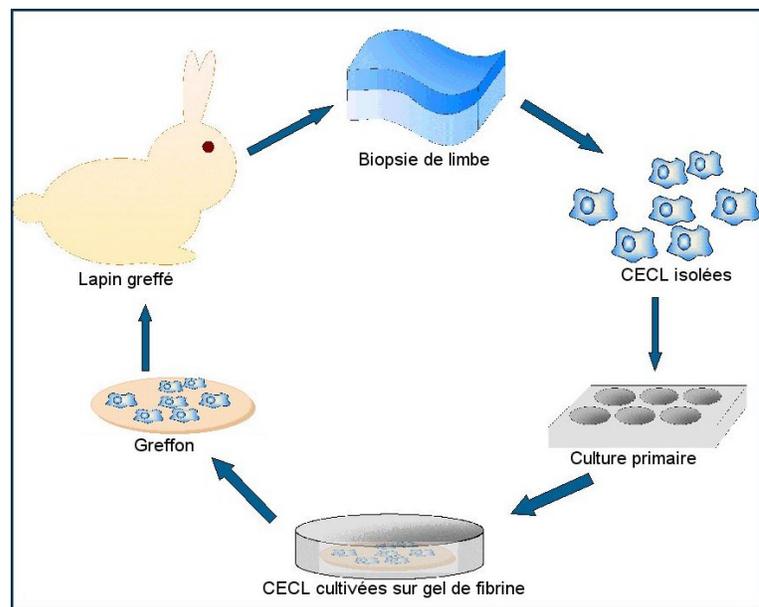


Figure 17. Schéma expérimental de la greffe de cellules autologues cultivées sur gel de fibrine

Une biopsie de limbe est prélevée et les CECL sont séparées du stroma. Les cellules épithéliales isolées sont mises en culture pour une amplification. Elles sont ensuite sous-cultivées sur un gel de fibrine pour produire un greffon de CECL. Le greffon est réimplanté de façon autologue dans l'œil déficient en cellules souches du lapin.

## 2.1 Fournisseurs

Le sérum de veau fœtal (FetalClone II) utilisé pour les cultures cellulaires provient de HyClone (Logan, Utah). L'insuline, l'adénine, la pénicilline G, la toxine du choléra, l'albumine bovine, l'aprotinine, l'azide de sodium, le diméthylsulfoxyde (DMSO), le phénol rouge, le  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  et le  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  proviennent tous de Sigma (Oakville, Ontario). La gélatine, le NaCl, le KCl, le  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , le  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  et le  $\text{NaHCO}_3$  ont été achetés de Fisher (St-Laurent, Québec). La glutamine, le milieu F12 et le Dulbecco's Minimum Essential Medium (DMEM) proviennent d'Invitrogen (Burlington, Ontario). Le glycérol et l'Hepes ont été achetés d'ICN (St-Laurent, Québec). L'hydrocortisone a été acheté de Calbiochem (La Jolla, Californie), le facteur de croissance épidermique (*epidermal growth factor*, EGF) de Austral Biologicals (San Ramon, Californie), la gentamicine de Schering Canada (Pointe-Claire, Québec), le Tisseel de Baxter (Mississauga, Ontario), la dispase II (Protease Neutral) de Roche (Laval, Québec), la trypsine 1-500 de Intergen (Toronto, Ontario), la fungizone de Squibb (Canada), l'enrobage Optimal Cutting Temperature (OCT) de Somagen (Edmonton, Alberta) et le fixatif Bouin de Produits chimiques ACP (St-Léonard, Québec).

## 2.2 Analyses préliminaires

### 2.2.1 Prélèvement des cornées de lapin pour les tests de culture

Les manipulations ont été exécutées avec des instruments stériles, dans un environnement conservé semi-stérile à l'aide d'une flamme. Les yeux ont subi de multiples rinçages dans un milieu de culture froid et stérile contenant des antibiotiques (pour tous les milieux et toutes les solutions, voir section 2.6). L'œil de lapin est placé dans un plat de Petri et maintenu en place par une gaze. Sous un binoculaire, la cornée est prélevée avec des ciseaux de chirurgie en prenant soin de conserver le limbe et d'écarter la conjonctive. La cornée est rincée une dernière fois dans le milieu de culture froid. Selon l'expérience, la cornée est découpée en morceaux ou conservée entière.

## 2.2.2 Culture cellulaire

### 2.2.2.1 Isolement et culture des CECL

Toutes les CECL, provenant de biopsie de limbe ou de cornée complète, ont été isolées et mises en culture de la même façon. La cornée ou ses morceaux sont déposés dans une solution de dispase, préchauffée à 37°C, pendant 45 minutes. Après l'incubation, l'activité de la dispase est neutralisée par ajout de milieu froid. Sous un binoculaire, l'endothélium est décollé et écarté. L'épithélium est ensuite décollé par doux frottement avec le dos d'une pince courbée. Les morceaux d'épithélium sont récoltés et directement mis en culture dans une plaque de 6 ou 12 puits, préensemencée avec la couche nourricière de fibroblastes 3T3. Les CECL sont cultivées dans un milieu SHEM modifié [6] et placées dans un incubateur à 100% d'humidité, 37°C et 8% de CO<sub>2</sub>. En 6 à 9 jours, les cultures primaires sont prêtes à être ensemencées pour le passage 1 (P1).

### 2.2.2.2 Culture de CECL sur gel de fibrine

À une confluence de 90%, les cultures primaires (P0) sont trypsinées et ensemencées en P1. Les CECL sont ensemencées à la même densité dans une plaque de culture ou sur un gel de fibrine avec la couche nourricière. La densité de 12 000 cellules épithéliales/cm<sup>2</sup> et de 20 000 3T3/cm<sup>2</sup> s'est avérée être la meilleure pour les expériences de greffe chez le lapin. Les cellules sont cultivées dans le milieu SHEM modifié. À la confluence des cellules, les gels sont transplantés chez les lapins.

## 2.3 Gels de fibrine

Le gel de fibrine est préparé selon la méthode de Rama *et al.* [77] qui modifie les instructions du fabricant (sections 2.3.1 à 2.3.3). Tous les milieux ajoutés aux cultures sur gel de fibrine sont additionnés de 25µg/ml d'aprotinine pour prévenir la fibrinolyse prématurée des gels.

### 2.3.1 Fibrinogène

Les flacons contenant les poudres et les solutions salines sont préchauffés à 37°C pendant 10 minutes. Le fibrinogène est reconstitué avec la solution d'aprotinine fournie par le

fabricant. Pour chaque millilitre de la solution d'aprotinine, 1,16ml de la solution de saline 1 est ajouté. La solution est agitée à 37°C pendant 8-10 minutes.

### **2.3.2 Thrombine**

Un flacon de thrombine 4UI prévu commercialement pour 1ml de solution est reconstitué avec 1,33ml de la solution de saline 2. La solution de thrombine est agitée pour la dissoudre et conservée à 37°C.

### **2.3.3 Mélange**

Un volume égal de chacune des solutions de fibrinogène et de thrombine est aspiré à l'aide du système d'application à double seringues fourni par la compagnie. Le gel de fibrine est préparé dans un anneau de plastique (Figure 18C) de 30mm de diamètre en mélangeant 330µl de la solution de thrombine et 330µl de la solution de fibrinogène. L'anneau de plastique est préalablement collé avec du silicone dans une boîte de Petri bactériologique. Le gel polymérise en quelques minutes.

## **2.4 Procédure chirurgicale**

Toutes les expériences impliquant des animaux ont été soumises à l'approbation du comité d'éthique de l'Université Laval.

### **2.4.1 Prélèvement des biopsies pour la culture et la greffe**

Une petite biopsie de limbe de 50µm de profondeur incluant l'épithélium et une couche de stroma est prélevée par le chirurgien avec un paufique, une petite lame ronde pour les chirurgies oculaires (Figure 18A). La biopsie, provenant de l'œil droit, a une dimension de 1mm par 3mm. Les cellules sont isolées selon la méthode décrite au point 2.2.2 Culture cellulaire.

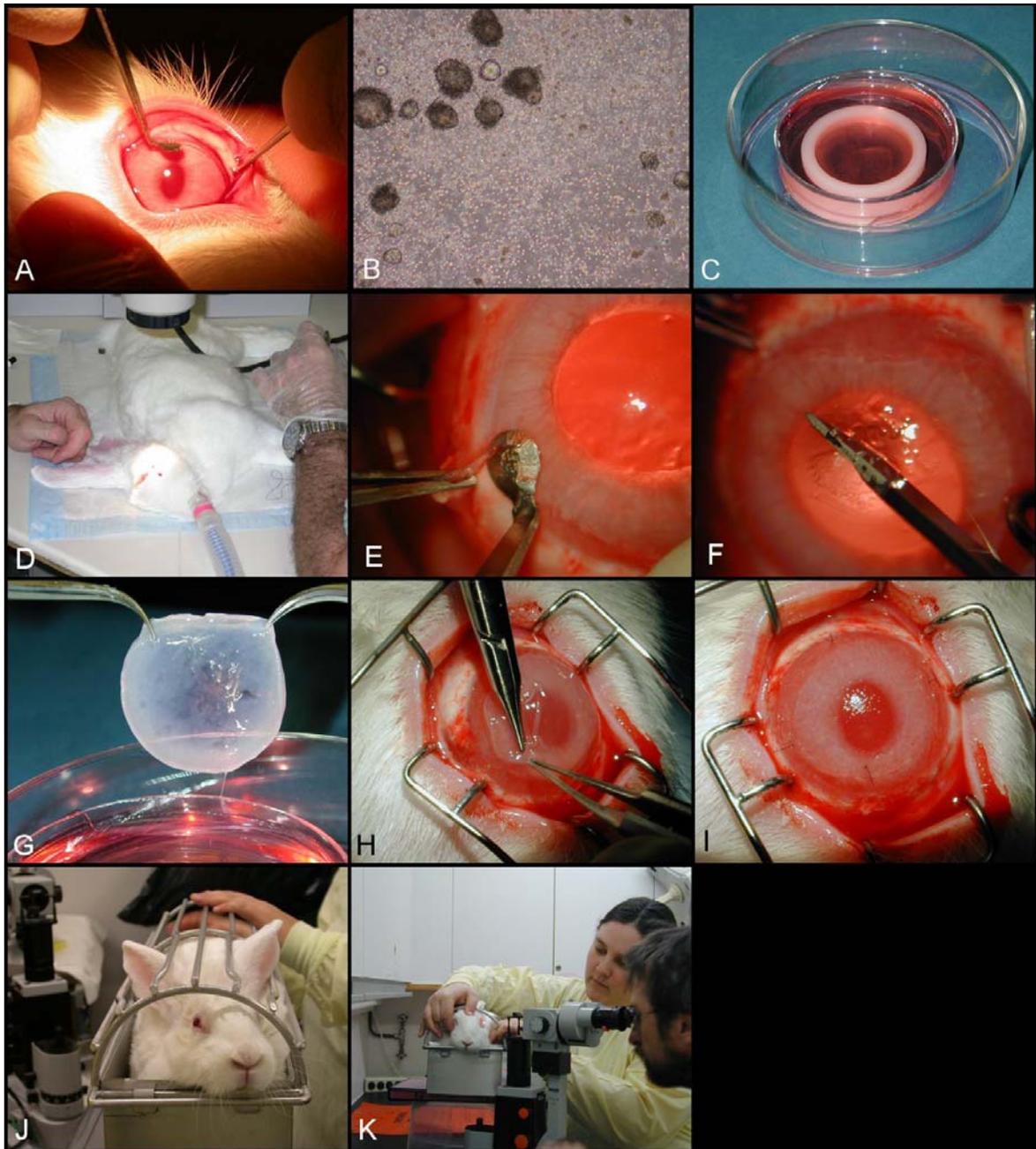


Figure 18. Les étapes pour la greffe de CECL cultivées sur gel de fibrine

A) Prélèvement d'une biopsie de limbe. B) CECL fraîchement isolées de la biopsie. C) Culture des cellules sur un gel de fibrine. D) Anesthésie du lapin pour la chirurgie. E) Kératectomie du limbe. F) Dénuement du centre de la cornée. G) Greffon avant la greffe. H) Positionnement du greffon. I) Suture du greffon sur la cornée dénudée. J) Lapin placé dans une chambre de contention pour son examen. K) Examen d'un lapin avec une lampe à fente.

### **2.4.2 Transplantation des CECL cultivées sur gel de fibrine**

Une déficience en cellules souches est créée dans l'œil gauche du lapin. Pour ce faire, une kératectomie lamellaire du limbe de 100 $\mu$ m de profondeur est faite par le chirurgien (Figure 18E). La kératectomie inclut 3mm de conjonctive pour s'assurer de supprimer toutes les cellules souches. L'épithélium de la cornée est ensuite gratté à l'aide d'un scalpel (Figure 18F). La cornée ainsi dénudée de son épithélium est prête à recevoir la greffe de cellules autologues. Les gels de fibrine avec les cultures de CECL sont greffés sur la cornée selon une méthode précédemment décrite [77]. Le gel est découpé avec un trépan de 16mm et est transporté jusqu'à la cornée avec une lamelle de verre. Le gel est ensuite positionné sur la cornée, cellules vers le haut, et suturé en place, en plaçant le gel entre la cornée et la conjonctive libre (Figure 18H). Pour éviter les mouvements du gel, les paupières sont suturées pour trois jours. Un onguent antibiotique est appliqué sur l'œil greffé immédiatement après la greffe et deux fois par jour par la suite pour 10 jours.

### **2.4.3 Approche expérimentale**

Les 20 lapins avec une déficience en cellules souches sont divisés en deux groupes égaux. Le premier groupe comprend tous les animaux recevant une greffe et le second, tous les animaux contrôles non-greffés. Ces derniers subissent la même chirurgie produisant une déficience en cellules souches mais ne reçoivent pas le traitement comprenant le gel de fibrine et les CECL cultivées. Aux jours 1, 3, 7, 14 et 28, tous les lapins sont observés avec une lampe à fente et un test à la fluorescéine est effectué (Figure 18K). À chacun de ces jours, deux lapins de chaque groupe sont sacrifiés. Les deux yeux, celui avec la plaie et celui sans plaie, sont conservés. Les cornées sont ensuite utilisées pour diverses analyses.

## **2.5 Analyses**

### **2.5.1 Analyses histologiques**

Les échantillons sont fixés dans une solution de Bouin et enrobés dans la paraffine. Des coupes de 6 $\mu$ m d'épaisseur sont colorées au Trichrome de Masson, qui rend les cellules roses et le collagène bleu.

### **2.5.2 Immunomarquage**

Les échantillons sont enrobés dans l'OCT et conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'à leur utilisation. Les coupes congelées, de  $5\mu\text{m}$  d'épaisseur, sont séchées à l'air 5 minutes et sont ensuite fixées dans l'acétone 100% pendant 10 minutes à  $-20^{\circ}\text{C}$ . Un marquage par immunofluorescence indirecte est ensuite effectué sur ces coupes. Les anticorps sont dilués dans une solution de PBS IF 1X contenant 1% d'albumine bovine. Cette solution sert également d'agent bloquant. Toutes les incubations sont effectuées dans une chambre humide à température de la pièce et à la noirceur pour les anticorps couplés à un fluorochrome. L'anticorps primaire est incubé 45 minutes et lavé trois fois dans du PBS IF 1X. L'anticorps secondaire couplé à un fluorochrome est ensuite incubé 30 minutes. Les coupes sont lavées trois fois dans du PBS IF 1X et ensuite deux fois dans de l'eau apyrogène. Pour une contre-coloration des noyaux, une solution de Hoechst 33258 diluée 1/100 dans de l'eau apyrogène est incubée 10 minutes et lavée trois fois dans de l'eau apyrogène. Chaque coupe marquée est accompagnée d'une coupe contrôle où l'anticorps primaire est omis afin de permettre l'évaluation du bruit de fond. Les lames immunomarquées sont conservées par un milieu de montage sur lequel est déposé une lamelle. Les lames sont entreposées à  $4^{\circ}\text{C}$ .

## **2.6 Les solutions**

### **Milieu SHEM modifié**

Mélange 1:1 de DMEM et de F12 supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal. Le milieu est additionné de  $1 \times 10^{-9}\text{M}$  de toxine du choléra, 10ng/ml de EGF,  $5\mu\text{g/ml}$  d'insuline, 2,4mM de L-glutamine, 0,5% de DMSO, 100UI/ml de pénicilline et  $25\mu\text{g/ml}$  de gentamycine. Le milieu est conservé à  $4^{\circ}\text{C}$  et utilisé à  $37^{\circ}\text{C}$ .

### **Dispase 0,25%**

Solution de 0,25% de Dispase II (Protease Neutral) dans un tampon Hepes 1X. La solution est stérilisée par filtration sur Sterivex GV ( $0,22\mu\text{m}$ ). La dispase est conservée à  $4^{\circ}\text{C}$  et utilisée à  $37^{\circ}\text{C}$ .

**PBS IF 1X**

Tampon physiologique contenant 137mM de NaCl, 2,7mM de KCl, 6,5mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,5mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,9mM de CaCl<sub>2</sub>•2H<sub>2</sub>O, 0,48mM de MgCl<sub>2</sub>•6H<sub>2</sub>O.

**PBS pour culture 10X**

Tampon physiologique concentré 10 fois. Le tampon contient 1,37M de NaCl, 27mM de KCl, 81mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> et 15mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.

**Trypsine**

Solution de PBS additionnée de 0,05% trypsine 1-500 et 0.01% sodium-EDTA. La solution est fabriquée à partir du PBS 10X. Elle contient également 0,05% D-glucose, 0,00075% phénol rouge, 25mg/L gentamicine et 50mg/L de pénicilline. Le pH est ajusté à 7,45 et la solution est stérilisée par filtration sur Sterivex GV (0,22µm).

**Tampon Hepes 10X**

Tampon de 100mM Hepes contenant 67mM de KCl et 1,42M de NaCl. Le pH est ajusté à 7,3. La solution doit être conservée à l'abri de la lumière.

**Tampon Hepes 1X**

Tampon de 10mM Hepes fabriqué avec la solution Hepes 10X. La solution contient en plus 1mM de CaCl<sub>2</sub>•2H<sub>2</sub>O. Le pH est ajusté à 7,45 et la solution est stérilisée par filtration sur Sterivex GV (0,22µm).

**Milieu de transport pour biopsie**

Milieu DMEM supplémenté de 10% de sérum de veau fœtal. Le milieu contient également 100UI/ml de pénicilline, 25µg/ml de gentamycine et 0,5µg/ml de fungizone.

**Milieu de montage**

Solution de 70% PBS 1X et 30% glycérol. La solution est fabriquée à partir du PBS pour culture 10X. Le milieu de montage contient également 20mg/ml de gélatine et 1mg/ml

d'azide de sodium. Le pH est ajusté à 7,6. Le milieu de montage est conservé à 4°C et réchauffé pour liquéfaction avant utilisation.

### **Milieu DMEM**

Dulbecco's Minimum Essential Medium Modified (DMEM) tamponné avec 44mM de  $\text{NaHCO}_3$ . Le milieu est stérilisé par filtration sur Sterivex GV (0,22 $\mu\text{m}$ ) et conservé à 4°C.

### **Milieu F12**

Milieu F12 tamponné avec 37mM de  $\text{NaHCO}_3$  et additionné de 24mg/L d'adénine. Le milieu est stérilisé par filtration sur Sterivex GV (0,22 $\mu\text{m}$ ), conservé à 4°C et utilisé à 37°C.

### **Solution de blocage**

Solution de PBS 1X contenant 1% d'albumine bovine.

### **Saline 1**

Solution saline contenant 1,86mM  $\text{CaCl}_2$  et 2% NaCl.

### **Saline 2**

Solution saline contenant 1mM  $\text{CaCl}_2$  et 1,1% NaCl.

## 2.7 Anticorps utilisés

<b>Anticorps et colorant</b>	<b>Compagnie</b>	<b>Dilution de travail</b>
Souris anti-Kératine 3	ICN lotR12101	1/3200
Souris anti-Kératine 4	ICN lot1510E	1/25
Souris anti-MUC5AC	Chemicon lot22121115	1/400
Chèvre anti-souris Alexa594	Molecular Probes lot83A3-1	1/800
Hoechst 33258	Sigma	1/100

## *Chapitre 3 - Résultats*

## **3. RÉSULTATS**

### **3.1 Culture des CECL**

#### **3.1.1 Isolement des CECL**

À partir d'une petite biopsie de limbe de  $3\text{mm}^2$  comprenant toute l'épaisseur de l'épithélium et une mince couche de stroma, il a été possible d'isoler les CECL (Figure 17 et Figure 18B). Avec l'utilisation de la dispase, qui agit au niveau de la membrane basilaire pour couper les molécules d'ancrage, l'épithélium s'est détaché du stroma après 45 minutes d'incubation. Les cultures obtenues grâce à cette méthode ne présentaient aucune contamination avec des fibroblastes. Les petits feuillets de cellules épithéliales détachés du stroma ont été déposés dans une plaque de culture préensemencée avec la couche nourricière de 3T3. Après quelques jours, les cellules ayant adhéré ont commencé à former des colonies. En six à neuf jours, les colonies ont proliféré pour atteindre la confluence. Au premier passage (P1), les cellules, ensemencées à une densité de  $12\,000\text{ cellules/cm}^2$ , ont mis six jours pour atteindre la confluence. L'ensemencement en P1 sur le plastique ou sur le gel de fibrine, à la même densité, donne une croissance identique des cellules. Après deux semaines de culture, la biopsie de  $3\text{mm}^2$  a donné naissance à des cellules couvrant une surface d'environ  $15\,000\text{mm}^2$ , soit une augmentation de 5 000 fois. Cette quantité de cellules est suffisante pour effectuer plusieurs analyses, préparer plusieurs greffons et congeler une partie des cellules pour une utilisation ultérieure.

#### **3.1.2 Aspect morphologique des cellules en culture**

Les CECL en culture primaire (P0) forment des colonies rondes et régulières (Figure 19). Les cellules composant les colonies sont petites et démontrent une morphologie de cellules peu différenciées : elles ont peu de cytoplasme et ont une forme régulière. En P1, les CECL sont de petite taille, bien que légèrement plus grosses que celles en P0, et leur forme est régulière (Figure 19). Qu'elles soient cultivées sur plastique ou sur gel de fibrine, les CECL ont une morphologie identique.

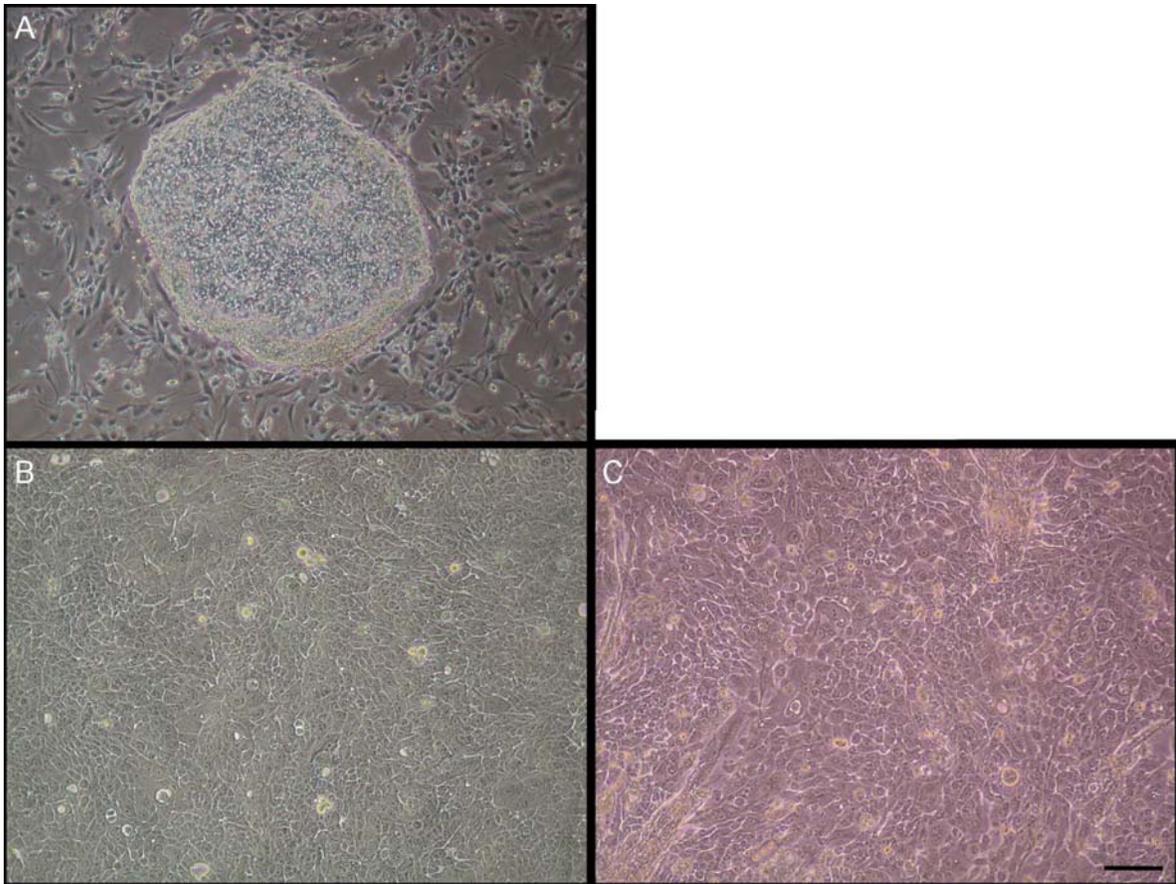


Figure 19. Aspect morphologique des CECL en culture

A) Colonie de CECL en P0 entourée des cellules nourricières 3T3. B) CECL à confluence cultivées sur plastique en P1. C) La même lignée de CECL à confluence mais cultivées sur gel de fibrine en P1. Barre = 50µm.

### 3.1.3 Culture sur gel de fibrine et fibrinolyse

Les premiers essais de culture de CECL sur gel de fibrine ont dévoilé des problèmes inattendus. Au jour prévu de la greffe, les gels en lambeaux montraient des signes évidents de dégradation (Figure 20). Les cellules épithéliales sont donc capables d'induire la fibrinolyse. Pour cette raison, un antifibrinolytique, l'aprotinine, entre dans la composition du gel de fibrine. Bien que la présence d'aprotinine ait permis de préserver le gel pendant quelques jours, elle n'a pas été suffisante pour contrecarrer l'action des CECL dès une confluence de 80% au cinquième jour. Une dose supplémentaire d'aprotinine a donc été ajoutée au milieu de culture des cellules sur gel de fibrine. Par la suite, il a été vérifié que la

présence d'aprotinine dans le milieu de culture n'influe pas sur la qualité des CECL en culture. La présence d'aprotinine a permis de conserver les gels en culture jusqu'à la confluence des cellules sans dégradation. La fibrinolyse prématurée des gels a ainsi pu être évitée.

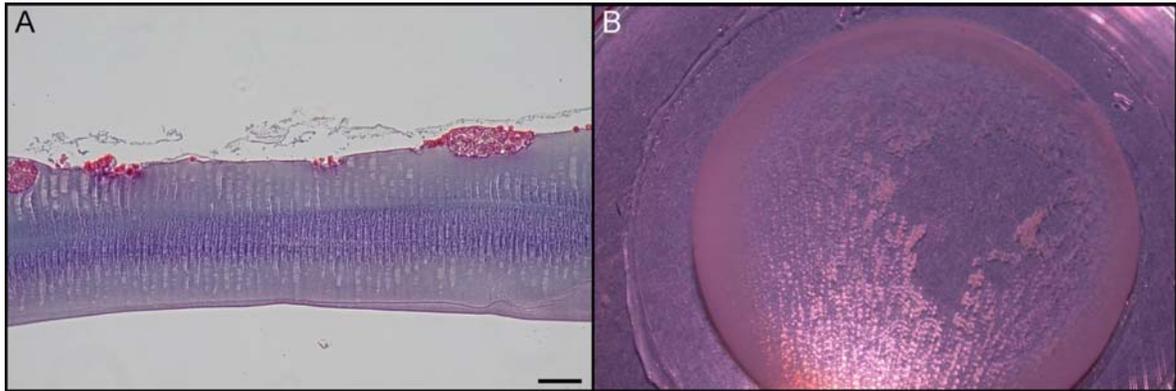


Figure 20. Apparence du gel de fibrine dégradé par les CECL

A) Coloration au Trichrome de Masson d'un gel en cours de dégradation. Notez que les petites colonies de cellules s'enfoncent dans le gel. B) Aspect macroscopique d'un gel dégradé. À confluence, les cellules ont dégradé la totalité du gel en son centre. Barre = 100 $\mu$ m.

## 3.2 Greffe des CECL cultivées sur gel de fibrine

### 3.2.1 Induction d'une déficience en cellules souches

Afin de vérifier l'efficacité de la greffe de cellules cultivées sur la régénération de l'épithélium cornéen, les cornées devaient préalablement être atteinte d'une déficience en cellules souches. L'induction d'une déficience totale en cellules souches est donc une étape primordiale de préparation à la greffe. Pour s'assurer de supprimer la totalité des cellules souches présentes au limbe, une kératectomie d'une profondeur de 100 $\mu$ m a été effectuée. L'analyse histologique des cornées récupérées immédiatement après la kératectomie a permis de confirmer que cette méthode supprimait la totalité de l'épaisseur de l'épithélium au niveau du limbe (Figure 21).

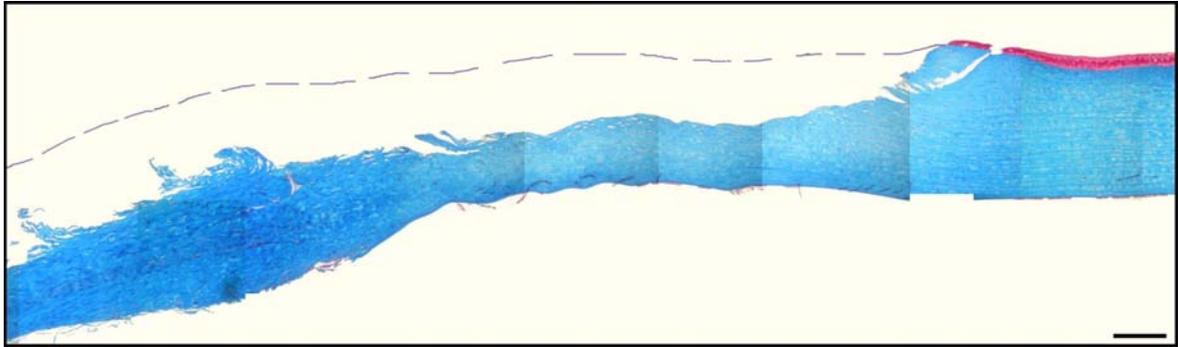


Figure 21. Kératectomie du limbe pour l'induction d'une déficience en cellules souches

Coloration au Trichrome de Masson d'une cornée de lapin après une kératectomie du limbe, qui permet de supprimer les cellules souches de la cornée. Le pointillé correspond à la position présumée de l'épithélium avant la kératectomie. À ce stade, la cornée n'a pas encore subi l'ablation des cellules épithéliales (en rose à droite) du centre de la cornée. Barre = 200µm.

### 3.2.2 Analyse du greffon de CECL sur gel de fibrine

Au jour de la greffe, le greffon, constitué de CECL cultivées à confluence sur gel de fibrine, a été analysé avec les marqueurs des cellules épithéliales de cornée (K3) et de conjonctive (K4) (Figure 22). Les immunomarquages ont révélé que les CECL expriment la K3 dès le début de la stratification de l'épithélium sur le gel. Sur le greffon, les cellules basales n'expriment pas ce marqueur de la différenciation cornéenne, seules les cellules superficielles l'expriment. Les CECL en culture n'expriment pas la K4 (résultats non-montrés). Donc, les cellules basales du greffon n'expriment pas la K3 ni la K4, une particularité qu'on retrouve *in situ* au niveau des cellules basales du limbe.

Le tissu formé par le gel de fibrine et les CECL a été découpé avec un trépan de 16mm de diamètre afin d'être greffé sur la cornée dénudée et déficiente en cellules souches. Bien que délicat, le gel a été suturé avec succès sur la cornée (Figure 18I et Figure 23). Les cornées récupérées 1 et 3 jours après la greffe ont permis de constater la vitesse de dégradation du gel de fibrine. Après 24 heures, le gel est encore visible sur les cornées ayant reçu un greffon. Après 72 heures, le gel a complètement disparu et les CECL reposent sur le stroma

de la cornée (résultats non-montrés). La dégradation du gel de fibrine *in vivo* prend donc moins de 72 heures.

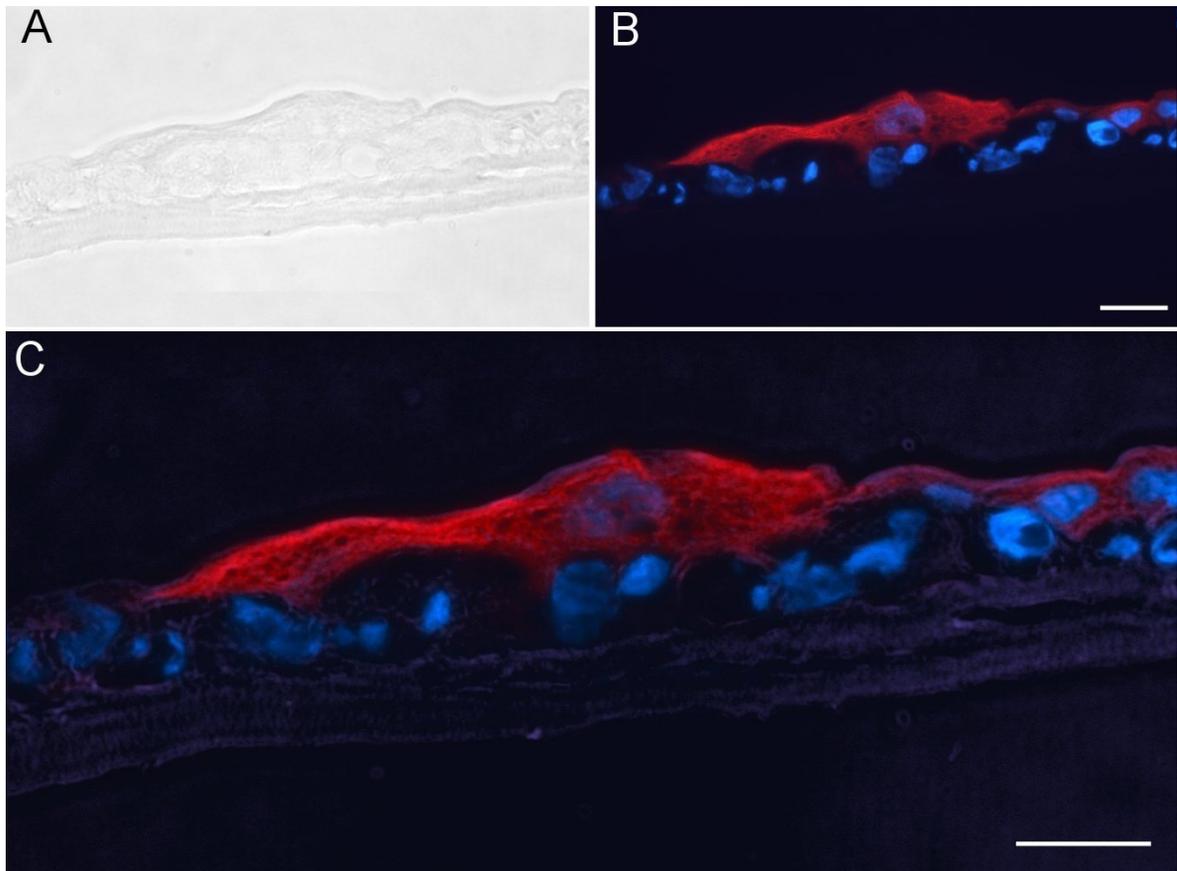


Figure 22. CECL cultivées à confluence sur gel de fibrine marquées avec la kératine 3

Cultivées sur gel de fibrine, seule les cellules superficielle expriment la kératine 3, le marqueur de différenciation des cellules épithéliales cornéennes. Les cellules basales ne sont pas marquées. A) Contraste de phase. B) Immunomarquage de la kératine 3 (rouge) et des noyaux suite à la coloration Hoechst (bleu). C) Combinaison du contraste de phase (A) et de l'immunomarquage de la kératine 3 (B). Barre = 50µm.



Figure 23. Aspect du gel de fibrine à différentes étapes expérimentales.

Gel de fibrine supportant les CECL prêt pour la greffe. A) Histologie, coloration au Trichrome de Masson. B) Aspect macroscopique. C) Gel greffé sur la cornée dénudée du lapin. Notez les quatre points de suture à la périphérie de la cornée (flèches). Barre = 50 $\mu$ m.

### 3.2.3 Observations *in situ* post-greffe

À chaque jour de prélèvement post-greffe, c'est-à-dire 1, 3, 7, 14, et 28 jours, toutes les cornées ont été observées à l'aide d'une lampe à fente. Un test à la fluorescéine, permettant de détecter les défauts dans la couverture épithéliale, a également été effectué. Les observations des cornées des lapins greffés et non-greffés n'ont pas permis de détecter des différences significatives à ce stade précoce de la guérison. Les deux groupes avaient un test positif à la fluorescéine les premiers jours après la greffe, qui redevenait négatif à mesure que l'épithélium, peu importe son origine, s'épaississait et recouvrait la cornée dénudée. La présence de vaisseaux sanguins avançant de quelques millimètres dans la cornée a également été observée chez les deux groupes. Ces vaisseaux sanguins se situaient principalement autour des points de suture. À ce stade, les cornées non-greffées observées *in situ* ne présentaient pas de signes évidents de conjonctivalisation (résultats non-montrés).

### 3.3 Origine de l'épithélium sur les cornées traitées

Toutes les cornées ayant reçu une plaie, incluant les cornées greffées et non-greffées, ont été analysées à différents temps après la plaie afin de déterminer l'origine de l'épithélium les recouvrant. Ces cornées ont donc été comparées avec les cornées normales de lapin provenant de l'œil controlatéral de chaque lapin n'ayant pas subi de kératectomie.

### 3.3.1 Immunomarquage avec les marqueurs spécifiques de la cornée et de la conjonctive

Toutes les cornées ont été analysées par immunomarquage avec les marqueurs de l'épithélium de cornée (K3) et de conjonctive (K4). Dans une cornée normale (Figure 24), la K3 est exprimée intensément au centre de la cornée. Au niveau du limbe, la K3 n'est exprimée que dans les cellules des couches suprabasales. L'épithélium de la conjonctive n'exprime que très faiblement ou pas du tout ce marqueur. La K4, par contre, est exprimée intensément dans l'épithélium de la conjonctive, dans les cellules superficielles du limbe et dans les cellules en desquamation du centre de la cornée. Les cellules de la couche basale du limbe, où sont situées les cellules souches, n'expriment aucun des deux marqueurs. Il est à noter que certaines cellules superficielles du limbe coexpriment les deux marqueurs.

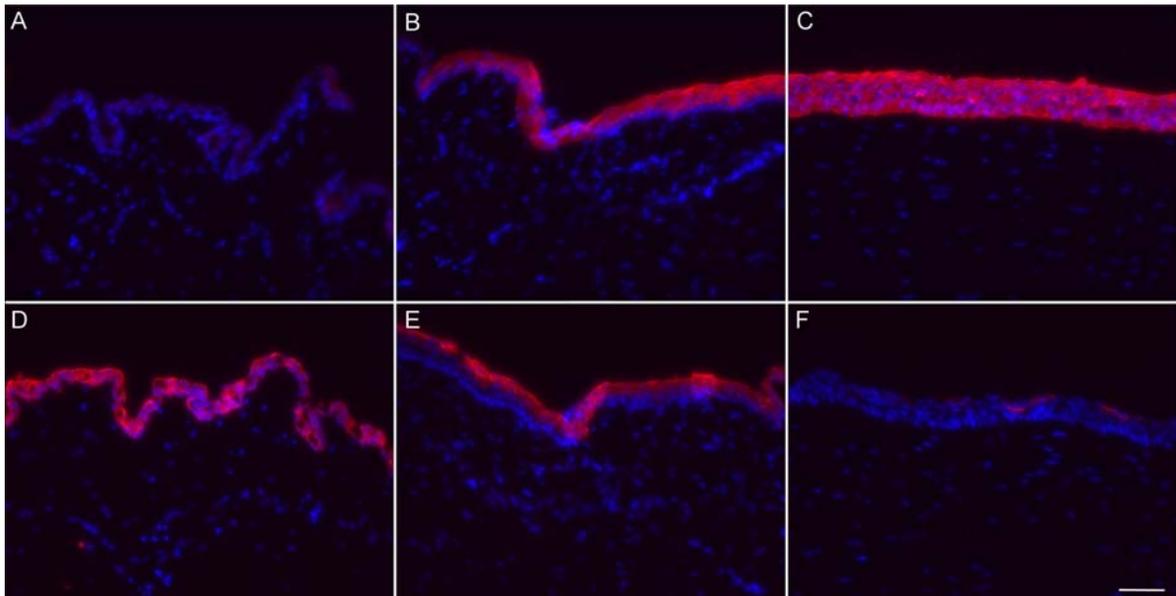


Figure 24. Cornée normale de lapin marquée avec les kératines 3 et 4

Cornée normale de lapin comprenant la conjonctive (A et D), le limbe (B et E) et le centre de la cornée (C et F). A), B) et C) Marquage de la kératine 3. D), E) et F) Marquage de la kératine 4. Les marquages sont en rouge et les noyaux sont en bleu suite à la coloration Hoechst. Barre = 50µm

La K3, utilisée comme marqueur des cellules différenciées de la cornée, est exprimée par l'épithélium des cornées greffées et non-greffées (Figure 25). Toute l'épaisseur de l'épithélium du centre de la cornée montre un marquage pour la K3 dans les deux groupes à

différents temps. Cependant, la morphologie de l'épithélium des cornées greffées ressemble davantage à celui d'un épithélium de cornée normale. Contrairement aux cornées greffées, les cornées non-greffées présentent un épithélium d'aspect anormal, en le comparant à celui d'une cornée normale de lapin. L'épithélium n'a pas une épaisseur constante et les cellules qui le composent sont irrégulières. Les trois niveaux de différenciation des cellules épithéliales, basales, ailées et superficielles, ne sont pas présents partout (Figure 25, Figure 26 et Figure 28).

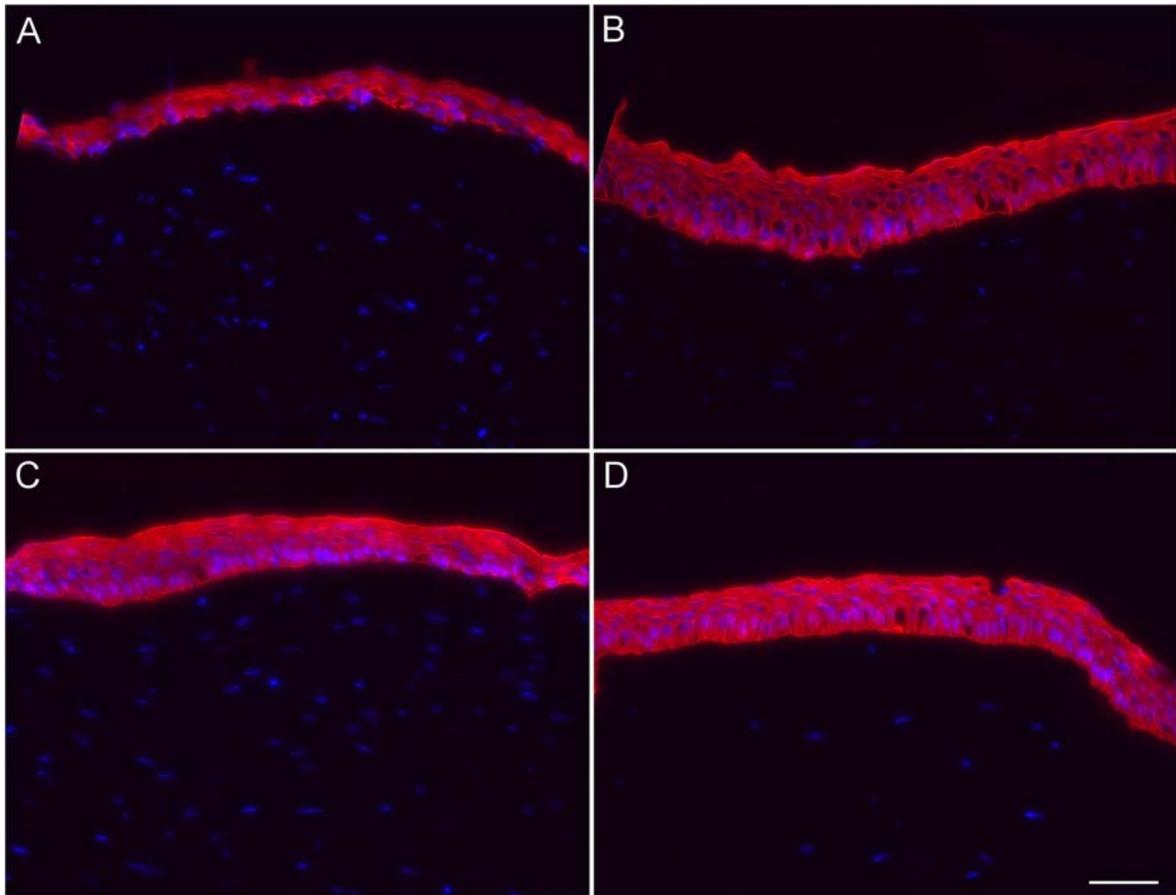


Figure 25. Cornées de lapin après la plaie marquées avec la kératine 3

Cornées de lapin non-greffées (A et B) et greffées (C et D) à 14 jours (A et C) et 28 jours (B et D) après la plaie. La kératine 3 est en rouge et les noyaux sont en bleu suite à la coloration Hoechst. Barre = 50µm.

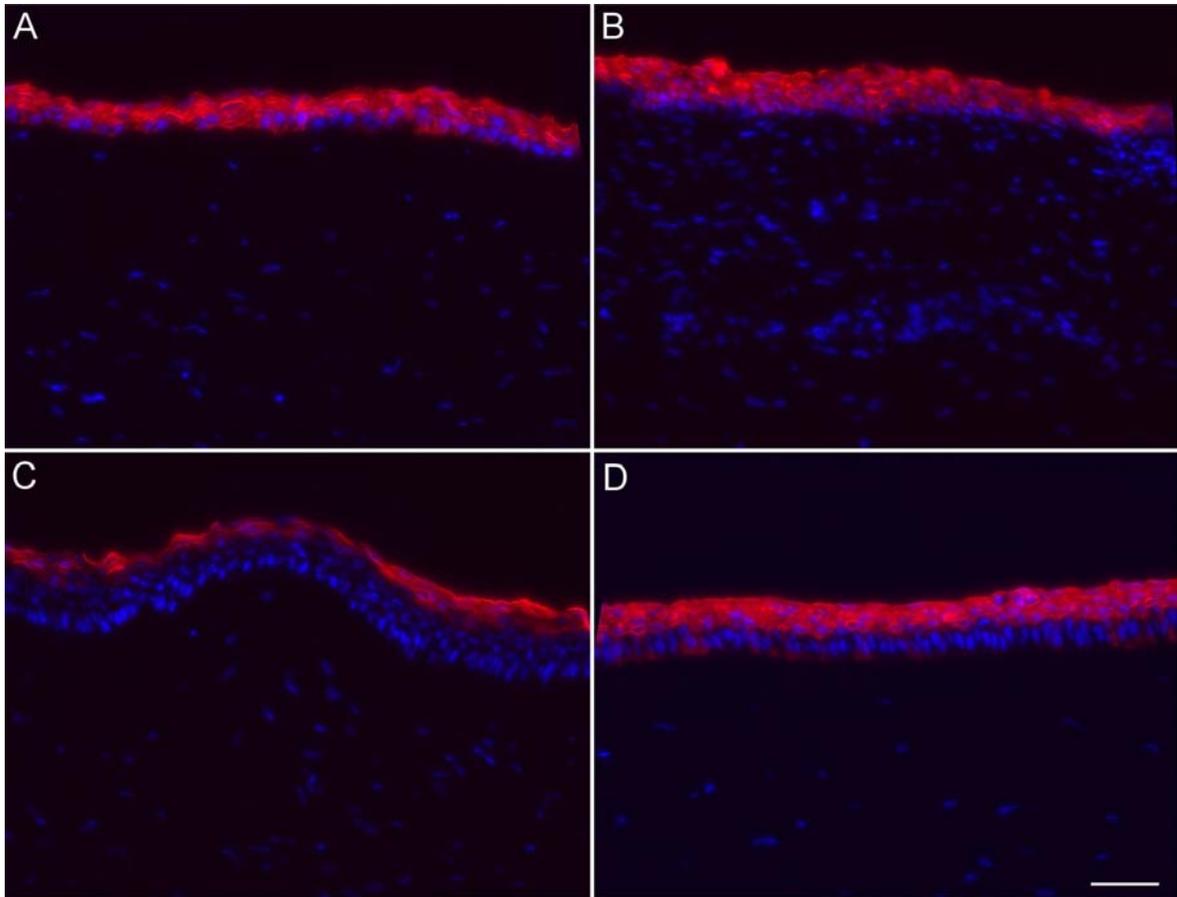


Figure 26. Cornées de lapin après la plaie marquées avec la kératine 4

Cornées de lapin non-gréffées (A et B) et greffées (C et D) à 14 jours (A et C) et 28 jours (B et D) après la plaie. La kératine 4 est en rouge et les noyaux sont en bleu suite à la coloration Hoechst. Barre = 50µm.

La K4, utilisée comme marqueur des cellules conjonctivales, montre une expression différente dans les deux groupes de lapins (Figure 26). Sur les cornées non-gréffées, toutes les couches épithéliales du centre sont positives pour ce marqueur. Dans les cornées greffées, seules les deux couches superficielles sont marquées. Les couches basales de l'épithélium des cornées greffées n'expriment pas la K4.

En comparant l'expression de ces deux marqueurs, on remarque que les cornées non-gréffées possèdent un épithélium coexprimant la K3 et la K4. Les cornées greffées montrent un patron d'expression différent : les cellules superficielles coexpriment les deux marqueurs tandis que les cellules basales n'expriment que la kératine 3.

### 3.3.2 Observation des cellules globulaires

La présence des cellules globulaires peut être détectée suite à une analyse en histologie et par immunomarquage spécifique avec la mucine MUC5AC. Dans les cornées normales de lapin (Figure 27), les cellules globulaires sont confinées à l'épithélium de la conjonctive. Visibles en histologie grâce à une coloration au Trichrome de Masson, les cellules globulaires sont rondes et présentent une coloration bleu pâle. Elles sont disséminées à travers tout l'épithélium conjonctival. Leur présence dans la conjonctive est confirmée par immunomarquage avec la mucine MUC5AC.

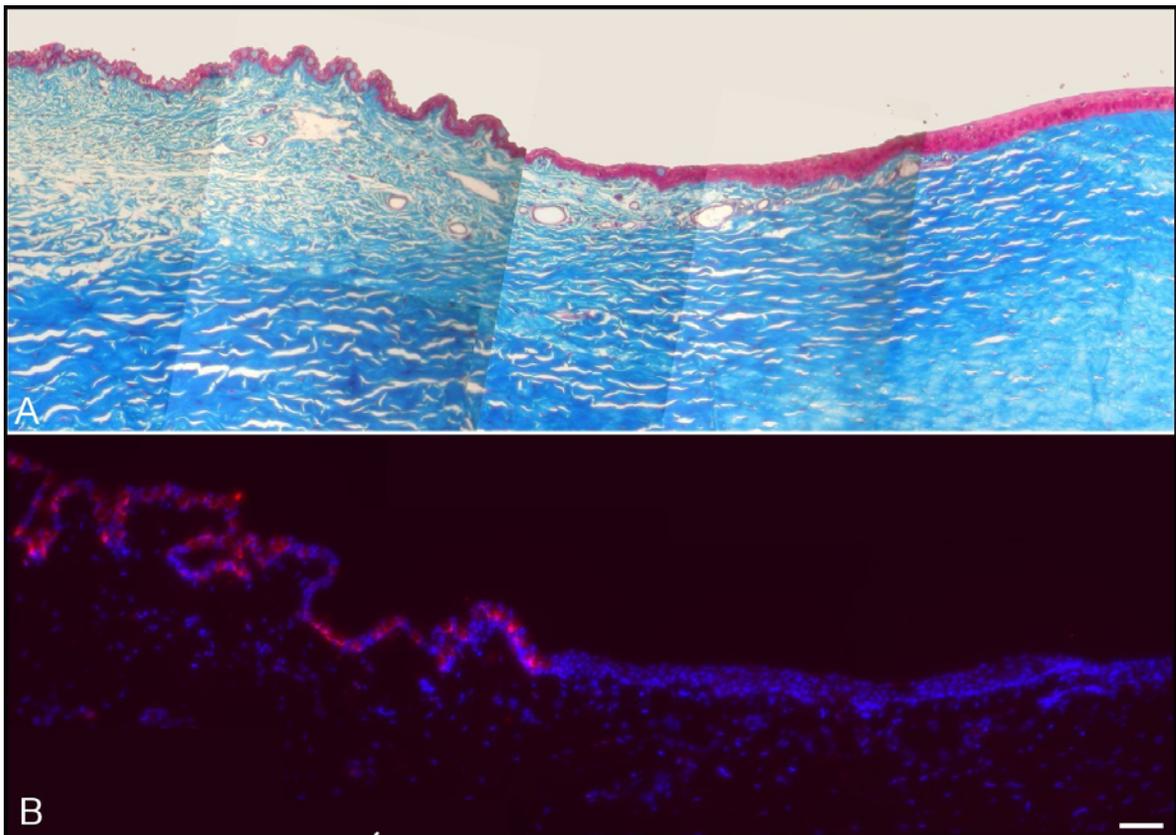


Figure 27. Présence des cellules globulaires dans la cornée normale de lapin

Les cellules globulaires se retrouvent dans la conjonctive. Sur les coupes, la conjonctive est à gauche et la cornée est à droite. A) Histologie, coloration au Trichrome de Masson. B) Immunomarquage par un anticorps contre la mucine MUC5AC. La MUC5AC est en rouge et les noyaux sont en bleu suite à la coloration Hoechst. Barre = 50µm.

Les analyses histologiques des cornées greffées et non-greffées permettent de détecter la présence des cellules globulaires au niveau de l'épithélium (Figure 28). Au jour 1, la cornée non-greffée est complètement dénudée tandis que la cornée greffée possède une mince couche de cellules avec le gel de fibrine (Figure 28 A et D). 14 jours après la plaie, les cellules globulaires commencent à apparaître dans l'épithélium central des cornées non-greffées (Figure 28 B). Après la quatrième semaine, la quantité de cellules globulaires au centre de la cornée est de beaucoup augmentée. À ce stade, la cornée non-greffée montre plusieurs amas de cellules globulaires (Figure 28 C). Dès la deuxième semaine après la plaie, l'épithélium des cornées greffées ressemble davantage à l'épithélium d'une cornée normale. Il contient plusieurs couches de cellules épithéliales parmi lesquelles les cellules globulaires sont absentes.

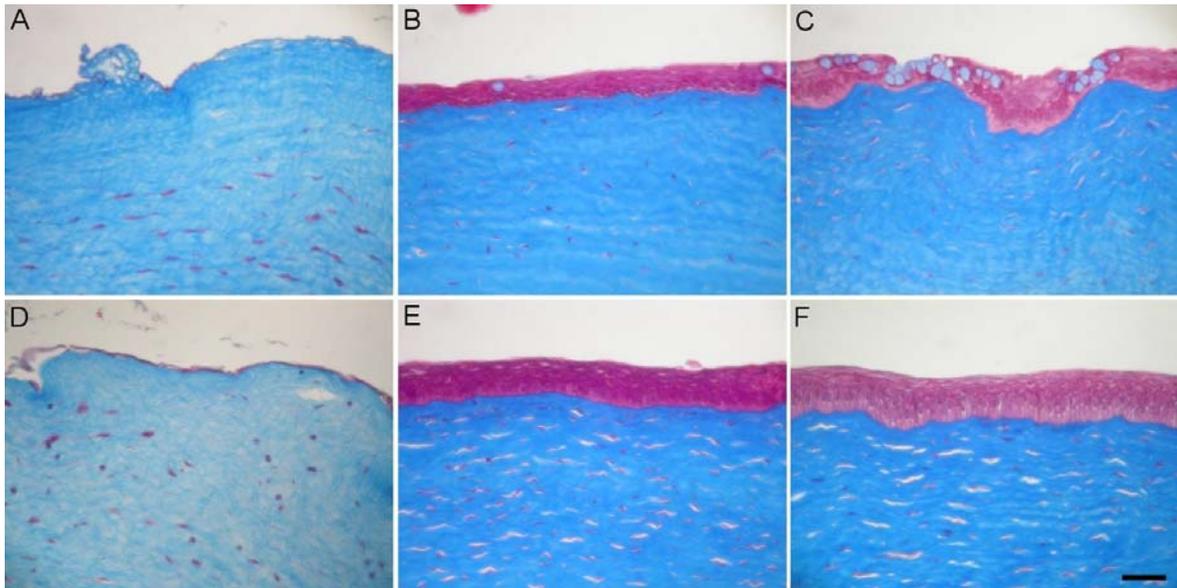


Figure 28. Histologie des cornées de lapin après la plaie

Coloration au Trichrome de Masson des cornées de lapin non-greffées (A, B et C) et greffées (D, E et F) à 1 jours (A et D) ,14 jours (B et E) et 28 jours (C et F) après la plaie. Barre = 50µm.

La présence des cellules globulaires a été ensuite confirmée par immunomarquage avec un anticorps spécifique reconnaissant la mucine MUC5AC. Cette mucine est exprimée exclusivement par les cellules globulaires et est utilisée ici comme un marqueur de ce type cellulaire. Tel que remarquée en histologie, la présence des cellules globulaires est détectée

deux semaines après la plaie. 14 et 28 jours après la plaie, les cornées non-greffées présentent un marquage de MUC5AC dans l'épithélium du centre de la cornée (Figure 29). Les cellules globulaires sont détectées sur toute la cornée ainsi qu'en profondeur de l'épithélium. Les cornées greffées ne présentent que peu de marquage de MUC5AC et celui-ci est restreint à la couche superficielle. Les cornées non-greffées présentent une quantité de cellules globulaires nettement supérieure à celle retrouvée dans les cornées greffées.

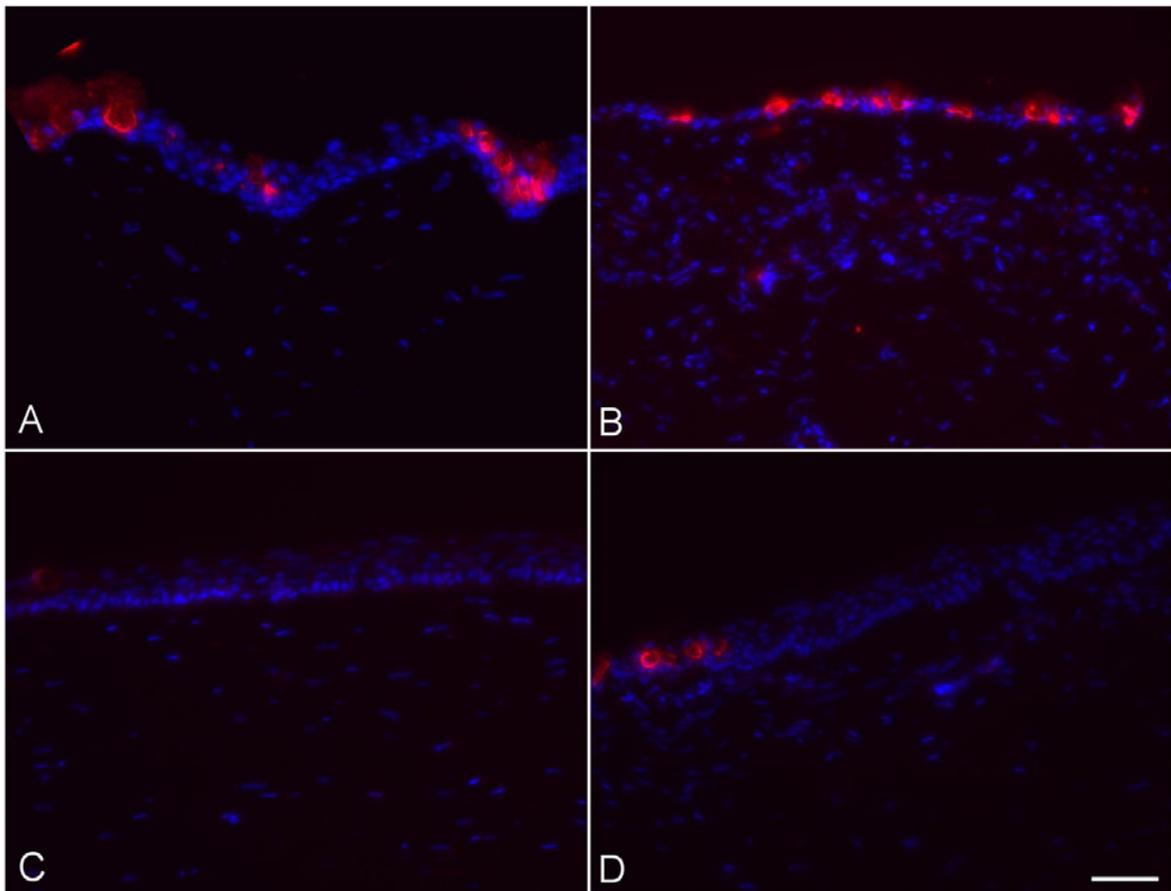


Figure 29. Cornées de lapin après la plaie marquées avec la mucine MUC5AC

Cornées de lapin non-greffées (A et B) et greffées (C et D) 14 jours (A et C) et 28 jours (B et D) après la plaie. MUC5AC est spécifiquement exprimée par les cellules globulaires. La MUC5AC est en rouge et les noyaux sont en bleu suite à la coloration Hoechst. Barre = 50 $\mu$ m.

## *Chapitre 4 – Discussion et conclusion*

## 4. DISCUSSION ET CONCLUSION

### 4.1 Isolement et culture

L'isolement de CECL à partir d'une biopsie aussi petite que 3mm<sup>2</sup> et l'amplification de ces cellules en culture a été un succès. L'utilisation d'une biopsie aussi petite pour l'obtention de cellules en culture assure l'intégrité de l'œil donneur. Il est ainsi possible de contourner un des problèmes rencontrés avec la greffe de limbe conventionnelle. Ce type de greffe comporte un risque pour l'œil donneur sain de souffrir d'une déficience en cellules souches après le prélèvement car les biopsies doivent être très étendues (Figure 13) [9, 10]. Dans la présente étude, le prélèvement d'une petite biopsie a permis à l'œil donneur de chaque lapin de guérir en moins de deux semaines sans séquelle ni problème de déficience en cellules souches.

L'utilisation de la dispase pour séparer l'épithélium est un élément clé dans l'obtention de cultures pures de cellules épithéliales, sans contamination par des fibroblastes cornéens [27, 97]. Les CECL que nous avons obtenu en culture étaient exemptes de toute contamination par d'autres types cellulaires (Figure 19). L'obtention de cultures pures est nécessaire puisqu'une seule biopsie est prélevée par œil donneur, pour éviter les problèmes de guérison précédemment mentionnés. Toutes les biopsies ont donné naissance à des colonies de petites cellules proliférant rapidement.

La coculture avec une couche nourricière de 3T3 est une méthode éprouvée pour conserver les cellules souches *in vitro* [78]. L'application de cette technique de culture cellulaire nous a permis de conserver les cellules souches des cornées de lapin en culture primaire sur plastique. La morphologie des CECL en culture indique que ces cellules sont dans un état indifférencié : les cellules sont petites, de forme régulière et possèdent peu de cytoplasme. Sur gel de fibrine, la conservation des cellules souches avec 3T3 a également été prouvée [69, 77]. Nos résultats concordent avec ces observations. Nous avons obtenu des CECL cultivées sur gel de fibrine n'exprimant pas le marqueur de différenciation cornéenne, la kératine 3 (Figure 22). Ces cellules étaient également négatives pour le marqueur des cellules conjonctivales, la kératine 4. Dans les cornées *in situ*, seules les cellules basales du

limbe comprenant les cellules souches sont négatives pour la K3 et la K4 (Figure 24). Les greffons de CECL sur gel de fibrine étaient donc constitués de cellules cornéennes dont une certaine proportion étaient des cellules souches.

Tel que précédemment observé par différentes équipes, la présence du gel de fibrine n'a pas eu d'influence négative sur les cellules [3, 69]. La vitesse de prolifération des CECL est la même sur gel de fibrine que sur plastique. La morphologie est également la même.

L'ajout d'aprotinine dans le milieu de culture a permis de conserver le gel de fibrine intact pendant la culture des CECL jusqu'à leur confluence. La nécessité d'utiliser l'aprotinine a été mise en évidence par la dégradation prématurée du gel lorsque les CECL atteignaient 80% de confluence après 5 jours de culture (Figure 20). Il est connu que les cellules épithéliales produisent des protéases en situation normale mais surtout lors de la guérison d'une plaie pour le remodelage de la MEC [22, 23, 80]. Les cellules en culture sont donc susceptibles de dégrader les MEC mises à leur disposition comme le gel de fibrine. L'innocuité de l'aprotinine pour les CECL a été vérifiée par des tests de prolifération cellulaire en culture. Nous avons démontré que la présence d'aprotinine à une concentration de 25µg/ml n'affectait pas la prolifération ni la morphologie. À cette concentration, la migration cellulaire n'est pas affectée [61]. La présence d'aprotinine dans le milieu inhibe donc l'action des protéases sans nuire à la qualité des cellules cultivées.

En somme, nous avons réussi à obtenir des greffons de CECL répondant aux critères de qualité nécessaires à une greffe pour restaurer l'épithélium cornéen. Il a été possible de prélever une petite biopsie de quelques millimètres carrés ne causant aucun dommage à l'œil donneur. De cette biopsie, nous avons isolé les cellules épithéliales contenant les cellules souches et nous les avons amplifiées pour obtenir une grande quantité de cellule.

## 4.2 Greffe

Deux semaines après le prélèvement des cellules, les greffons étaient prêts. Tous les lapins ont subi une kératectomie du limbe pour induire une déficience en cellules souches (Figure 21). La kératectomie est nécessaire afin de s'assurer d'enlever toutes les cellules basales du limbe. Tel qu'observé par Kruse *et al.* en 1990, la suppression incomplète des cellules

basales du limbe mène à une guérison sans conjonctivalisation [46]. L'épithélium cornéen se régénère alors normalement et reprend sa morphologie d'origine. Sans apport de cellules souches cornéennes extérieures, la déficience en cellules souches conduit invariablement à la conjonctivalisation [9, 10, 35, 46, 104]. Pour les deux groupes de lapins, greffés et non-greffés, nous nous attendions donc à obtenir des lapins présentant des types de guérison différents. L'hypothèse de départ s'appuie sur le fait que les cornées déficientes en cellules souches devraient présenter des signes de conjonctivalisation, mais que la greffe de cellules souches devrait permettre une guérison normale. Les résultats obtenus après la kératectomie nous confirment que toutes les cellules souches ont été supprimées puisque toutes les cellules basales du limbe ont été chirurgicalement enlevées (Figure 21). Tous les lapins étaient donc déficients en cellules souches avant la greffe.

Il a été rapporté que les points de suture placés près du limbe pour ancrer le greffon, provoquaient une inflammation et une vascularisation [97]. L'utilisation d'un greffon plus grand que le diamètre de la cornée est alors préférable puisque l'inflammation réduit l'efficacité des greffes de cellules souches [97, 100]. Dans notre modèle, le greffon a un diamètre de 16mm qui permet de recouvrir complètement la cornée de 13mm. L'inflammation liée aux points de suture a donc un impact réduit sur la guérison de la cornée.

Le gel de fibrine supportant les CECL en culture a été dégradé dans les 72 heures suivant la greffe. Ceci permet un contact rapide des cellules épithéliales avec le stroma sous-jacent. En comparaison, les membranes amniotiques supportant une culture de CECL sont encore bien visibles en histologie à 5 jours post-greffe [44] et 10 jours post-greffe [63]. Chez l'humain, la dissolution complète d'une membrane amniotique greffée sur la cornée prend 2 mois [4]. De plus, aucun signe de rejet, d'hémorragie ou d'inflammation excessive n'a été noté dans notre étude contrairement à certaines études d'allogreffe [94] ou de greffe autologue de CECL sur membrane amniotique [97]. L'utilisation du gel de fibrine est donc avantageuse par rapport à celle des membranes amniotiques.

Quatre semaines après l'opération, aucun des deux groupes de lapins ne montrait de signe évident de conjonctivalisation, suite à leur observation avec une lampe à fente. Les caractéristiques d'une conjonctivalisation, comme l'apparition de vaisseaux sanguins et

l'opacification de la cornée, n'apparaissent que quatre à six semaines après l'induction de la déficience en cellules souches [41, 97, 98]. Cependant, l'apparition de signes précoces de conjonctivalisation au niveau microscopique est mal connue. L'absence de signes macroscopiques d'une conjonctivalisation après seulement un mois n'est donc pas garante de l'absence de signes au niveau microscopique avec des marqueurs spécifiques.

### **4.3 Origine de l'épithélium sur les cornées traitées**

Comme plusieurs équipes l'avaient observé précédemment, nous nous attendions à obtenir des différences au niveau de l'expression des kératines sur les cornées greffées et non-greffées. La kératine 3 est utilisée comme marqueur des cellules cornéennes. Les cornées conjonctivalisées après plusieurs mois ne présentent donc pas ce marqueur [46, 55]. Seules les cornées greffées devraient exprimer la K3. La kératine 4 est utile pour vérifier l'origine conjonctivale des cellules épithéliales [49]. Les cornées non-greffées devraient donc exprimer la K4.

La présence de cellules globulaires au niveau de la cornée est un indice majeur permettant de conclure à la conjonctivalisation de la cornée. En effet, la présence de cellules globulaires et de leur marqueur la mucine MUC5AC n'est associée *in situ* qu'à la conjonctive (Figure 27) [104]. Puisque les cellules conjonctivales peuvent se différencier en cellules globulaires [68], la présence de ces cellules sur la cornée indique une origine conjonctivale. Nous nous attendions donc à ce que les cornées non-greffées présentent des cellules globulaires au centre de la cornée.

L'utilisation de la kératine 19 comme marqueur des cellules souches aurait été très utile dans cette étude. Cependant, les anticorps disponibles sont généralement conçus pour être spécifique à l'humain. Aucun anticorps reconnaissant la K19 de lapin n'était disponible. Les cellules épithéliales de cornée humaine en culture dans un gel de fibrine ont déjà été positivement marquées pour la K19, indiquant que les cellules souches de la cornée sont conservées en culture avec la fibrine [31].

### 4.3.1 Cornées non-greffées

Contrairement à nos attentes, les cornées non-greffées ont présenté un fort marquage de la kératine 3 au centre de la cornée (Figure 25). Cependant, l'expression de la kératine 4 dans toutes les couches de l'épithélium recouvrant le centre de la cornée (Figure 26) indiquaient une origine conjonctivale de ces cellules. De plus, la présence de cellules globulaires (Figure 28) et de marquage de la mucine MUC5AC (Figure 29) apportent des preuves solides d'une conjonctivalisation en cours.

Une revue de la littérature sur le sujet a permis d'éclaircir la présence inusitée de la K3 dans des cellules d'origine conjonctivale. Dans une étude de Tsai *et al.* en 1990, des cornées déficientes en cellules souches n'ayant pas reçu de greffe de limbe montraient un marquage de la K3 dans les cellules superficielles [98]. En 1983, l'observation de la migration de cellules conjonctivales sur un stroma cornéen *in vivo* avait permis de souligner l'apparition d'une kératine habituellement présente seulement dans les cellules cornéennes des tissus normaux [42]. Le rôle de la composition de la membrane basilaire et du stroma fût ensuite étudié par plusieurs équipes. La greffe *in vitro* de conjonctive sur un stroma comprenant ou non la membrane basilaire a permis d'observer une apparition dans les deux cas de la K3 en 10 jours [48]. Dans une étude clinique, plusieurs patients souffrant de maladies ou de blessures entraînant une déficience en cellules souches possédaient une cornée exprimant la K3 [20]. L'expression de la K3 à un niveau très faible dans l'épithélium de conjonctive normale *in situ* a également été détectée [47, 109].

L'expression de la K3 par les cellules épithéliales de conjonctive placées dans des conditions cornéennes est observée assez tôt dans le processus de guérison [48]. D'autre part, les cornées conjonctivalisées n'exprimant pas la K3 ont été observées à des moments beaucoup plus avancés dans le processus de conjonctivalisation, où les vaisseaux sanguins avaient envahi la cornée [46, 55]. Il est donc raisonnable de penser que l'expression de la K3 est induite dans les cellules conjonctivales placées dans un environnement cornéen. Cette situation est retrouvée de façon précoce dans le processus de conjonctivalisation. Les cellules n'en restent pas moins d'origine conjonctivale. Lorsque le processus de conjonctivalisation est complété, les vaisseaux sanguins qui ont envahi la cornée produisent un environnement plus conjonctival et l'expression de la K3 retourne alors à son état de

base, comme dans une conjonctive normale. Bref, la K3 ne peut servir de marqueur des cellules cornéennes dans une situation de guérison précoce. La K12 pourrait jouer ce rôle, puisque cette kératine est aussi exprimée spécifiquement par l'épithélium cornéen, et qu'elle n'est pas induite dans la conjonctive placée dans un environnement cornéen [48, 62]. Cependant, aucun anticorps n'est actuellement disponible pour utilisation chez le lapin, ce qui limite son utilisation à l'expérimentation chez l'humain pour l'instant.

#### **4.3.2 Cornées greffées**

Contrairement aux cornées non-greffées, l'épithélium des cornées greffées a présenté des caractéristiques d'un épithélium cornéen. L'absence de marquage de la K4 dans toutes les cellules basales, ainsi qu'un marquage des cellules superficielles de la cornée rappelle un patron d'expression retrouvé au niveau du limbe (Figure 26). De plus, l'absence de cellules globulaires est également une caractéristique spécifique à l'épithélium de cornée (Figure 28 et Figure 29). L'absence des deux marqueurs de conjonctive permet tout de même de conclure à une origine cornéenne des cellules épithéliales recouvrant les cornées greffées. Tel qu'expliqué précédemment, la présence de marquage pour la K3 (Figure 25) ne peut être interprété positivement pour une origine cornéenne des cellules.

La comparaison entre les cornées des deux groupes expérimentaux (Figure 30) indique clairement que l'origine des cellules des épithélia est différente. La présence de cellules d'origine cornéenne est nécessairement le fruit des greffes puisqu'une déficience en cellules souches a été induite pour toutes les cornées au départ. La restauration des cellules souches dans les cornées greffées a permis l'établissement d'un nouvel épithélium cornéen, présentant un phénotype similaire à celui retrouvé dans l'épithélium d'origine.

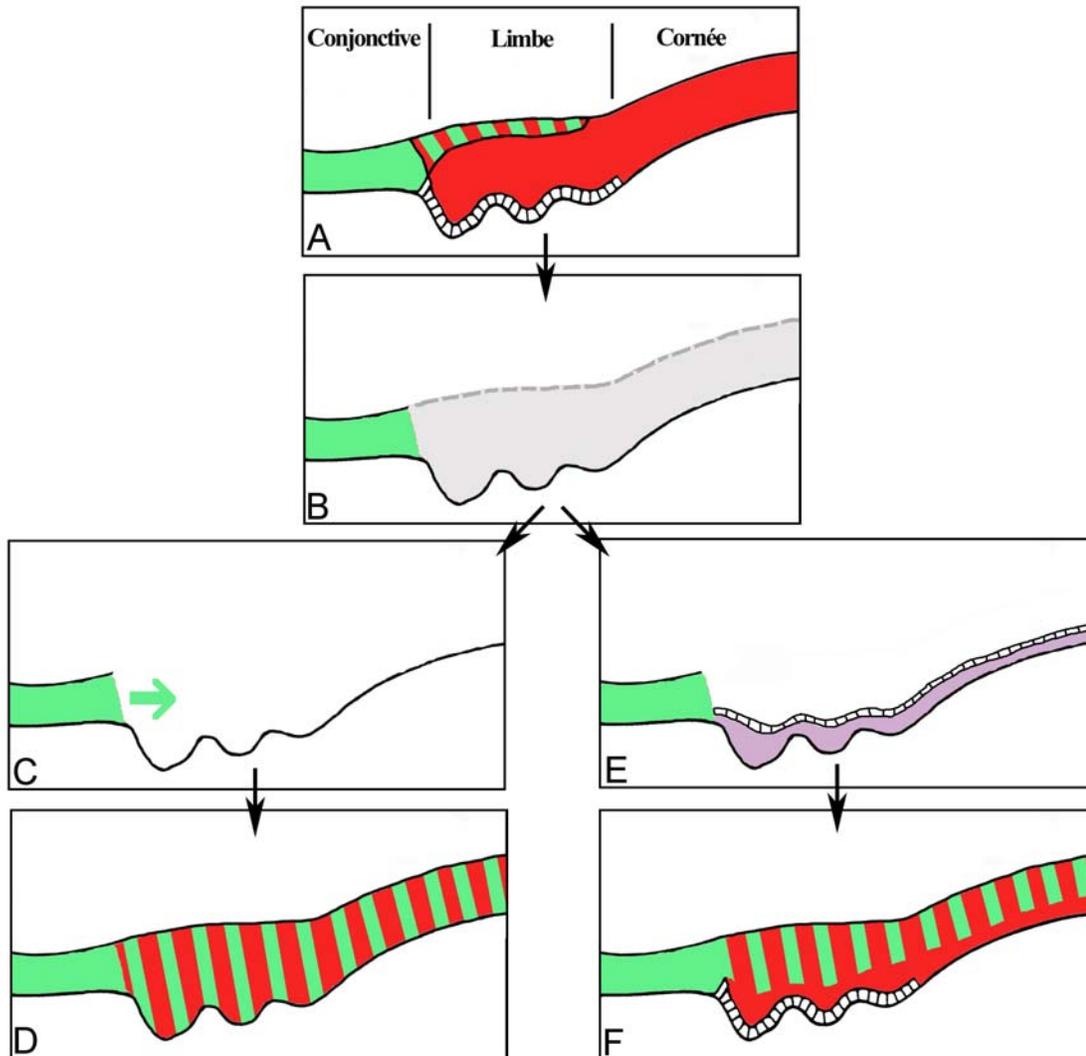


Figure 30. Schéma de l'expression précoce des kératines chez les cornées déficientes en cellules souches

La conjonctive qui migre sur le stroma cornéen est induite à exprimer la kératine 3. La greffe de CECL cultivées sur gel de fibrine restaure les cellules souches de la cornée. En vert, expression de la kératine 4; en rouge, expression de la kératine 3; en lilas, gel de fibrine. A) Phénotype normal. B) Induction d'une déficience en cellules souches. C) Guérison naturelle d'une cornée déficiente en cellules souches. Les cellules de la conjonctive migrent sur le stroma cornéen. D) Phénotype d'une cornée non-greffée après un mois. Les cellules de conjonctive expriment les kératines 3 et 4. E) Greffe de CECL cultivées sur gel de fibrine. F) Phénotype d'une cornée greffée après un mois.

## 4.4 Conclusion

Cette étude sur la régénération de l'épithélium d'une cornée déficiente en cellules souches grâce à une greffe de cellules cultivées nous a permis de faire progresser nos connaissances sur plusieurs points. Tout d'abord, nous avons pu établir que l'isolement et la culture de CECL à partir d'une petite biopsie de limbe était réalisable, et que l'amplification des cellules en culture nous permettait d'obtenir suffisamment de matériel en seulement deux semaines. Ensuite, les analyses du greffon ont permis de déterminer que les cellules cultivées contenaient des cellules souches d'origine cornéenne. Les analyses des cornées lors de la guérison de la plaie en fonction du temps nous ont indiqué que la K4 et la MUC5AC sont de bons marqueurs pour déterminer l'origine conjonctivale des cellules épithéliales dans notre modèle. De plus, la K3, induite dans les cellules conjonctivales migrant sur un stroma cornéen, ne peut jouer le rôle de marqueur des cellules cornéennes dans ce modèle de guérison à moyen terme. L'ensemble des résultats obtenus nous incite à conclure que l'utilisation des cellules épithéliales amplifiées en culture permet d'aider à la guérison d'une déficience en cellules souches.

Les perspectives qu'amènent ces résultats sont emballantes. Il serait d'un grand intérêt d'étudier avec ce modèle la guérison à long terme d'une déficience en cellules souches afin d'établir la persistance de l'épithélium greffé. Ensuite, la culture de cellules épithéliales de cornées humaines sur gel de fibrine pourrait être testée d'abord à court terme chez le lapin. Ce type d'étude à long terme avec les cellules humaines sur modèle animal n'est pas possible en raison du rejet associé aux greffes xénogéniques. Enfin, il serait envisageable d'utiliser cette méthode pour le traitement des patients souffrant d'une déficience en cellules souches.

## *Chapitre 5 - Bibliographie*

## 5. BIBLIOGRAPHIE

1. *Sagesse persanne*, in *L'actualité*. 2003. p. 100.
2. Argueso, P. and I.K. Gipson, *Epithelial mucins of the ocular surface: structure, biosynthesis and function*. Experimental Eye Research, 2001. **73**(3): p. 281-9.
3. Auger, F.A., et al., *Role and innocuity of Tisseel, a tissue glue, in the grafting process and in vivo evolution of human cultured epidermis*. British Journal of Plastic Surgery, 1993. **46**(2): p. 136-142.
4. Azuara-Blanco, A., C.T. Pillai, and H.S. Dua, *Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction*. British Journal of Ophthalmology, 1999. **83**(4): p. 399-402.
5. Baxter-Hyland-Immuno, *Tisseel Engineering, Fibrin matrix technology. The fibrin network in tissue engineering*. 2001.
6. Boisjoly, H.M., et al., *Effects of EGF, IL-1 and their combination on in vitro corneal epithelial wound closure and cell chemotaxis*. Experimental Eye Research, 1993. **57**(3): p. 293-300.
7. Brandon, C. and J. Tooze, *Introduction to protein structure*. Second Edition ed. 1999, New-York: Garland Publishing.
8. Buck, R.C., *Measurement of centripetal migration of normal corneal epithelial cells in the mouse*. Investigative Ophthalmology and Visual Science, 1985. **26**(9): p. 1296-1299.
9. Chen, J.J. and S.C. Tseng, *Corneal epithelial wound healing in partial limbal deficiency*. Investigative Ophthalmology and Visual Science, 1990. **31**(7): p. 1301-1314.

10. Chen, J.J. and S.C. Tseng, *Abnormal corneal epithelial wound healing in partial-thickness removal of limbal epithelium*. Investigative Ophthalmology and Visual Science, 1991. **32**(8): p. 2219-2233.
11. Cooper, D., A. Schermer, and T.-T. Sun, *Classification of human epithelia and their neoplasms using monoclonal antibodies to keratins: strategies, applications, and limitations*. Laboratory Investigation, 1985. **52**(3): p. 243-256.
12. Coster, D.J., *Surgical procedure to restore the corneal epithelium*, in *The Cornea*, H.E. Kaufman, B.A. Barron, and M.B. McDonald, Editors. 1998, Butterworth-Heinemann: Boston. p. 715-726.
13. Cotsarelis, G., et al., *Existence of slow-cycling limbal epithelial basal cells that can be preferentially stimulated to proliferate: implications on epithelial stem cells*. Cell, 1989. **57**(2): p. 201-209.
14. Coulombe, P.A. and E. Fuchs, *Elucidating the early stages of keratin filament assembly*. Journal of Cell Biology, 1990. **111**(1): p. 153-169.
15. Daniels, J.T., et al., *Corneal stem cells in review*. Wound Repair and Regeneration, 2001. **9**(6): p. 483-494.
16. Davanger, M. and A. Evensen, *Role of the pericorneal papillary structure in renewal of corneal epithelium*. Nature, 1971. **229**(5286): p. 560-561.
17. Daya, S.M., et al., *Clinical and pathologic findings in human keratolimbal allograft rejection*. Cornea, 2000. **19**(4): p. 443-450.
18. Dua, H.S. and A. Azuara-Blanco, *Limbal stem cells of the corneal epithelium*. Survey of Ophthalmology, 2000. **44**(5): p. 415-425.
19. Ebato, B., J. Friend, and R.A. Thoft, *Comparison of limbal and peripheral human corneal epithelium in tissue culture*. Investigative Ophthalmology and Visual Science, 1988. **29**: p. 1533-1537.

20. Elder, M.J., P. Hiscott, and J.K. Dart, *Intermediate filament expression by normal and diseased human corneal epithelium*. Human Pathology, 1997. **28**(12): p. 1348-54.
21. Fine, B.S. and M. Yanoff, *The Cornea and Sclera*, in *Ocular Histology: A Text and Atlas*, H. Row, Editor. 1979: Hagerstown. p. 163-193.
22. Fini, M.E. and M.T. Girard, *Expression of collagenolytic/gelatinolytic metalloproteinases by normal cornea*. Investigative Ophthalmology and Visual Science, 1990. **31**(9): p. 1779-1788.
23. Fini, M.E., M.T. Girard, and M. Matsubara, *Collagenolytic/gelatinolytic enzymes in corneal wound healing*. Acta Ophthalmologica. Supplement, 1992. **202**: p. 26-33.
24. Fini, M.E., *Keratocyte and fibroblast phenotypes in the repairing cornea*. Progress in Retinal and Eye Research, 1999. **18**(4): p. 529-551.
25. Geras, A.J., *Dermatology: A Medical Artist's Interpretation*. 1990, Switzerland: Sandoz Medical Publications. 38.
26. Germain, L., et al., *Can we produce a human corneal equivalent by tissue engineering?* Progress in Retinal and Eye Research, 2000. **19**(5): p. 497-527.
27. Gipson, I.K. and S.M. Grill, *A technique for obtaining sheets of intact rabbit corneal epithelium*. Investigative Ophthalmology and Visual Science, 1982. **23**(2): p. 269-73.
28. Gipson, I.K., J. Friend, and S.J. Spurr, *Transplant of corneal epithelium to rabbit corneal wounds in vivo*. Investigative Ophthalmology and Visual Science, 1985. **26**(4): p. 425-433.
29. Gipson, I.K., *The epithelial basement membrane zone of the limbus*. Eye, 1989. **3**: p. 132-140.

30. Gipson, I.K. and T. Inatomi, *Cellular origin of mucins of the ocular surface tear film*. *Advances in Experimental Medicine Biology*, 1998. **438**: p. 221-7.
31. Han, B., et al., *A fibrin-based bioengineered ocular surface with human corneal epithelial stem cells*. *Cornea*, 2002. **21**(5): p. 505-10.
32. Hogan, M.J. and L.E. Zimmerman, *The cornea and sclera*, in *Ophthalmic Pathology. An Atlas and Textbook*, M.J. Hogan and L.E. Zimmerman, Editors. 1962, W.B. Saunders Co.: Philadelphia. p. 277-290.
33. Hogan, M.J., J.A. Alvarado, and J.E. Weddel, *The Cornea*, in *Histology of the human eye: an Atlas and Textbook*, M.J. Hogan, J.A. Alvarado, and J.E. Weddel, Editors. 1971, W.B. Saunders: Philadelphia. p. 55-111.
34. Hogan, M.J., J.A. Alvarado, and J.E. Weddel, *The Limbus*, in *Histology of the human eye: an Atlas and Textbook. The Limbus.*, M.J. Hogan, J.A. Alvarado, and J.E. Weddel, Editors. 1971, W.B. Saunders: Philadelphia. p. 112-182.
35. Huang, A.J.W. and S.C. Tseng, *Corneal epithelial wound healing in the absence of limbal epithelium*. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 1991. **32**(1): p. 96-105.
36. Jackson, M.R., *Fibrin sealants in surgical practice: An overview*. *American Journal of Surgery*, 2001. **182**(2 Suppl): p. 1S-7S.
37. Jester, J.V., et al., *Corneal keratocytes: in situ and in vitro organization of cytoskeletal contractile proteins*. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 1994. **35**(2): p. 730-743.
38. Jumblatt, M.M., R.W. McKenzie, and J.E. Jumblatt, *MUC5AC mucin is a component of the human precorneal tear film*. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 1999. **40**(1): p. 43-9.
39. Kenyon, K.R. and S.C. Tseng, *Limbal autograft transplantation for ocular surface disorders*. *Ophthalmology*, 1989. **96**(5): p. 709-723.

40. Kim, J., et al., *Ocular surface reconstruction: limbal stem cell transplantation*. Ophthalmology Clinics of North America, 2003. **16**(1): p. 67-77.
41. Kim, J.C. and S.C. Tseng, *Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas*. Cornea, 1995. **14**(5): p. 473-484.
42. Kinoshita, S., et al., *Keratin-like proteins in corneal and conjunctival epithelium are different*. Investigative Ophthalmology and Visual Science, 1983. **24**(5): p. 577-581.
43. Klyce, S.D. and R.W. Beuerman, *Structure and function of the cornea*, in *The Cornea*, H.E. Kaufman, B.A. Barron, and M.B. McDonald, Editors. 1998, Butterworth-Heinemann: Boston. p. 3-50.
44. Koizumi, N., et al., *Amniotic membrane as a substrate for cultivating limbal corneal epithelial cells for autologous transplantation in rabbits*. Cornea, 2000. **19**(1): p. 65-71.
45. Kolega, J., M. Manabe, and T.-T. Sun, *Basement membrane heterogeneity and variation in corneal epithelial differentiation*. Differentiation, 1989. **42**(1): p. 54-63.
46. Kruse, F.E., et al., *Conjunctival transdifferentiation is due to the incomplete removal of limbal basal epithelium*. Investigative Ophthalmology and Visual Science, 1990. **31**(9): p. 1903-1913.
47. Kurpakus, M.A., E.L. Stock, and J.C. Jones, *Expression of the 55-kD/64-kD corneal keratins in ocular surface epithelium*. Investigative Ophthalmology and Visual Science, 1990. **31**(3): p. 448-456.
48. Kurpakus, M.A., E.L. Stock, and J.C. Jones, *The role of the basement membrane in differential expression of keratin proteins in epithelial cells*. Developmental Biology, 1992. **150**(2): p. 243-55.

49. Kurpakus, M.A., M.T. Maniaci, and M. Esco, *Expression of keratins K12, K4 and K14 during development of ocular surface epithelium*. Current Eye Research, 1994. **13**(11): p. 805-814.
50. Lauweryns, B., et al., *A new epithelial cell type in the human cornea*. Investigative Ophthalmology and Visual Science, 1993. **34**(6): p. 1983-1990.
51. Lauweryns, B., J.J. Van Den Oord, and L. Missotten, *The transitional zone between limbus and peripheral cornea. An immunohistochemical study*. Investigative Ophthalmology and Visual Science, 1993. **34**(6): p. 1991-1999.
52. Lavker, R.M., et al., *Relative proliferative rates of limbal and corneal epithelia*. Investigative Ophthalmology and Visual Science, 1991. **32**(6): p. 1864-1875.
53. Lawton, A.W., *Structure and Function of the Eyelids and Conjunctiva*, in *The Cornea*, H.E. Kaufman, B.A. Barron, and M.B. McDonald, Editors. 1998, Butterworth-Heinemann: Boston. p. 51-60.
54. Lewin, B., *Gènes VI*. 6ième ed, ed. D. Université. 1998, Bruxelles: Oxford University Press and Cell Press. 1268.
55. Li, Q.J., et al., *Long-term survival of allogeneic donor cell-derived corneal epithelium in limbal deficient rabbits*. Current Eye Research, 2001. **23**(5): p. 336-45.
56. Ljubimov, A.V., et al., *Human corneal basement membrane heterogeneity: topographical differences in the expression of type IV collagen and laminin isoforms*. Laboratory Investigation, 1995. **72**(4): p. 461-473.
57. Marieb, E.N., *Anatomie et physiologie humaine*. ERPI ed. 1993, St-Laurent. 1014.
58. Matic, M., et al., *Stem cells of the corneal epithelium lack connexins and metabolite transfer capacity*. Differentiation, 1997. **61**(4): p. 251-260.

59. Meller, D., V. Dabul, and S.C. Tseng, *Expansion of conjunctival epithelial progenitor cells on amniotic membrane*. *Experimental Eye Research*, 2002. **74**(4): p. 537-45.
60. Mills, A.A., et al., *p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis*. *Nature*, 1999. **398**(6729): p. 708-13.
61. Mirastschijski, U., et al., *Matrix metalloproteinase inhibitor BB-3103 unlike the serine proteinase inhibitor aprotinin abrogates epidermal healing of human skin wounds ex vivo*. *Journal of Investigative Dermatology*, 2002. **118**(1): p. 55-64.
62. Moyer, P.D., et al., *Conjunctival epithelial cells can resurface denuded cornea, but do not transdifferentiate to express cornea-specific keratin 12 following removal of limbal epithelium in mouse*. *Differentiation*, 1996. **60**(1): p. 31-8.
63. Nakamura, T., et al., *The successful culture and autologous transplantation of rabbit oral mucosal epithelial cells on amniotic membrane*. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 2003. **44**(1): p. 106-16.
64. Nishida, T., et al., *The network structure of corneal fibroblasts in the rat as revealed by scanning electron microscopy*. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 1988. **29**(12): p. 1887-1890.
65. Parrish, C.M. and J.W. Chandler, *Corneal Trauma*, in *The Cornea*, H.E. Kaufman, B.A. Barron, and M.B. McDonald, Editors. 1998, Butterworth-Heinemann: Boston. p. 633-671.
66. Pellegrini, G., et al., *Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium*. *Lancet*, 1997. **349**(9057): p. 990-993.
67. Pellegrini, G., et al., *Cultivation of human keratinocyte stem cells: current and future clinical applications*. *Medical and Biological Engineering and Computing*, 1998. **36**(6): p. 778-790.

68. Pellegrini, G., et al., *Location and clonal analysis of stem cells and their differentiated progeny in the human ocular surface*. Journal of Cell Biology, 1999. **145**(4): p. 769-782.
69. Pellegrini, G., et al., *The control of epidermal stem cells (holoclones) in the treatment of massive full-thickness burns with autologous keratinocytes cultured on fibrin*. Transplantation, 1999. **68**(6): p. 868-879.
70. Pellegrini, G., et al., *p63 identifies keratinocyte stem cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001. **98**(6): p. 3156-3161.
71. Potten, C.S., et al., *The segregation of DNA in epithelial stem cells*. Cell, 1978. **15**(3): p. 899-906.
72. Potten, C.S. and R.J. Morris, *Epithelial stem cells in vivo*. Journal of Cell Science, 1988. **10**(Suppl): p. 45-62.
73. Potten, C.S. and M. Loeffler, *Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the Crypt*. Development, 1990. **110**(4): p. 1001-1020.
74. Pouliquen, Y., et al., *La cornée, le limbe, la sclérotique*, in *Atlas d'histologie et d'ultrastructure du globe oculaire*, M. Cie, Editor. 1969: Paris. p. 1-19.
75. Puangsricharern, V. and S.C. Tseng, *Cytologic evidence of corneal diseases with limbal stem cell deficiency*. Ophthalmology, 1995. **102**(10): p. 1476-1485.
76. Radosevich, M., H.I. Goubran, and T. Burnouf, *Fibrin sealant: scientific rationale, production methods, properties, and current clinical use*. Vox Sanguinis, 1997. **72**(3): p. 133-143.
77. Rama, P., et al., *Autologous fibrin-cultured limbal stem cells permanently restore the corneal surface of patients with total limbal stem cell deficiency*. Transplantation, 2001. **72**(9): p. 1478-1485.

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**: p. 331-343.
79. Ross, R., N.B. Everett, and R. Tyler, *Wound healing and collagen formation. VI. The origin of the wound fibroblast studied in parabiosis*. *Journal of Cell Biology*, 1970. **44**(3): p. 645-54.
80. Saika, S., et al., *Epithelial repair: roles of extracellular matrix*. *Cornea*, 2002. **21**(2 Suppl 1): p. S23-9.
81. Sangwan, V.S., *Limbal stem cells in health and disease*. *Bioscience Report*, 2001. **21**(4): p. 385-405.
82. Schermer, A., S. Galvin, and T.-T. Sun, *Differentiation-related expression of a major 64K corneal keratin in vivo and in culture suggests limbal location of corneal epithelial stem cells*. *Journal of Cell Biology*, 1986. **103**(1): p. 49-62.
83. Schofield, R., *The stem cell system*. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 1983. **37**(8): p. 375-380.
84. Schwab, I.R., *Cultured corneal epithelia for ocular surface disease*. *Transactions of the American Ophthalmological Society*, 1999. **97**: p. 891-986.
85. Schwab, I.R., M. Reyes, and R.R. Isseroff, *Successful transplantation of bioengineered tissue replacements in patients with ocular surface disease*. *Cornea*, 2000. **19**(4): p. 421-426.
86. Sharma, A. and W.H. Coles, *Kinetics of corneal epithelial maintenance and graft loss. A population balance model*. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 1989. **30**(9): p. 1962-1971.
87. Shatos, M.A., et al., *Isolation and characterization of cultured human conjunctival goblet cells*. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 2003. **44**(6): p. 2477-86.

88. Shimazaki, J., et al., *Transplantation of human limbal epithelium cultivated on amniotic membrane for the treatment of severe ocular surface disorders*. *Ophthalmology*, 2002. **109**(7): p. 1285-1290.
89. Snyder, M.C., J.P. Bergmanson, and M.J. Doughty, *Keratocytes: no more the quiet cells*. *Journal of the American Optometric Association*, 1998. **69**(3): p. 180-7.
90. Steinert, P.M., et al., *Structural and functional implications of amino acid sequences of keratin intermediate filament subunits*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1985. **455**: p. 451-461.
91. Steinert, P.M. and D.R. Roop, *Molecular and cellular biology of intermediate filaments*. *Annual Review of Biochemistry*, 1988. **57**: p. 593-625.
92. Stepp, M.A., et al., *Localized distribution of  $\alpha 9$  integrin in the cornea and changes in expression during epithelial cell differentiation*. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 1995. **43**(4): p. 343-362.
93. Stevens, A. and J. Lowe, *Histologie*. 1993, Paris: Pradel. 193.
94. Swift, G.J., et al., *Survival of rabbit limbal stem cell allografts*. *Transplantation*, 1996. **62**(5): p. 568-574.
95. Thoft, R.A., *Conjunctival transplantation*. *Archives of Ophthalmology*, 1977. **95**(8): p. 1425-1427.
96. Thoft, R.A. and J. Friend, *The X, Y, Z hypothesis of corneal epithelial maintenance*. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 1983. **24**(10): p. 1442-1443.
97. Ti, S.E., et al., *Factors affecting outcome following transplantation of ex vivo expanded limbal epithelium on amniotic membrane for total limbal deficiency in rabbits*. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 2002. **43**(8): p. 2584-92.

98. Tsai, R.J., T.-T. Sun, and S.C. Tseng, *Comparison of limbal and conjunctival autograft transplantation in corneal surface reconstruction in rabbits*. *Ophthalmology*, 1990. **97**(4): p. 446-455.
99. Tsai, R.J. and S.C. Tseng, *Human allograft limbal transplantation for corneal surface reconstruction*. *Cornea*, 1994. **13**(5): p. 389-400.
100. Tsai, R.J. and S.C. Tseng, *Effect of stromal inflammation on the outcome of limbal transplantation for corneal surface reconstruction*. *Cornea*, 1995. **14**(5): p. 439-49.
101. Tsai, R.J., L.M. Li, and J.K. Chen, *Reconstruction of damaged corneas by transplantation of autologous limbal epithelial cells*. *New England Journal of Medicine*, 2000. **343**(2): p. 86-93.
102. Tseng, S.C., *Concept and application of limbal stem cells*. *Eye*, 1989. **3**: p. 141-157.
103. Tseng, S.C. and R.J. Tsai, *Limbal transplantation for ocular surface reconstruction-a review*. *Fortschritte der Ophthalmologie*, 1991. **88**(3): p. 236-42.
104. Tseng, S.C., *Regulation and clinical implications of corneal epithelial stem cells*. *Molecular Biology Reports*, 1996. **23**(1): p. 47-58.
105. Tsubota, K., et al., *Reconstruction of the corneal epithelium by limbal allograft transplantation for severe ocular surface disorders*. *Ophthalmology*, 1995. **102**(10): p. 1486-1496.
106. Voet, D. and J.G. Voet, *Biochimie*. 2ième ed, ed. D. Université. 1998.
107. Wagoner, M.D., *Chemical injuries of the eye: current concepts in pathophysiology and therapy*. *Survey of Ophthalmology*, 1997. **41**(4): p. 275-313.
108. Watanabe, H., *Significance of mucin on the ocular surface*. *Cornea*, 2002. **21**(2 Suppl 1): p. S17-22.

109. Wei, Z.-G., et al., *In vitro growth and differentiation of rabbit bulbar, fornix, and palpebral conjunctival epithelia*. Investigative Ophthalmology and Visual Science, 1993. **34**(5): p. 1814-1828.
110. Wei, Z.-G., et al., *Clonal analysis of the in vivo differentiation potential of keratinocytes*. Investigative Ophthalmology and Visual Science, 1997. **38**(3): p. 753-761.
111. Wessel, H., et al., *Type XII collagen contributes to diversities in human corneal and limbal extracellular matrices*. Investigative Ophthalmology and Visual Science, 1997. **38**(11): p. 2408-2422.
112. Williams, K.A. and D.J. Coster, *The role of the limbus in corneal allograft rejection*. Eye, 1989. **3**(Pt 2): p. 158-166.
113. Yang, A., et al., *p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development*. Nature, 1999. **398**(6729): p. 714-718.
114. Zhu, G., et al., *Expression of K12 keratin in alkali-burned rabbit corneas*. Current Eye Research, 1992. **11**(9): p. 875-87.
115. Zieske, J.D., et al.,  *$\alpha$ -enolase is restricted to basal cells of stratified squamous epithelium*. Developmental Biology, 1992. **151**(1): p. 18-26.
116. Zieske, J.D., *Perpetuation of stem cells in the eye*. Eye, 1994. **8**: p. 163-169.