

PATRICK CARRIER

**RECONSTRUCTION *IN VITRO* DE CORNÉES
HUMAINES PAR GÉNIE TISSULAIRE :
Étude de la variabilité des cellules épithéliales de cornées
humaines en culture primaire, de la réépithélialisation
cornéenne et du rôle des fibroblastes dans la différenciation et la
stratification des cellules épithéliales**

Thèse présentée
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval
dans le cadre du programme de doctorat de Biologie Cellulaire et Moléculaire
pour l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.)

FACULTÉ DE MÉDECINE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

JUIN 2006

Résumé

Élément essentiel du système dioptrique de l'œil, la cornée joue aussi un rôle important de protection du globe oculaire. Toutefois, sa localisation la prédispose à plusieurs blessures de diverses origines. Il peut alors en résulter une lésion importante nécessitant son remplacement. Le but ultime du programme de recherche est donc de reconstruire, selon la méthode d'auto-assemblage, une cornée humaine afin de l'utiliser comme modèle expérimental et éventuellement comme greffon pour des patients. Cependant, plusieurs aspects importants devaient faire l'objet d'études approfondies avant l'utilisation clinique afin d'évaluer le potentiel de réussite à long terme des greffes sur les patients. Le premier objectif spécifique de cette thèse consistait à étudier la grande hétérogénéité dans les capacités prolifératives des cellules épithéliales de cornées humaines (CECH) obtenues de différents donneurs. Cette étude démontre que ces variations sont liées à des altérations dans les niveaux d'expression des facteurs de transcription appartenant à la famille Sp. De plus, ces fluctuations semblent liées à la progression des CECH vers leur différenciation terminale. Finalement, une stratification adéquate des cellules épithéliales sur les équivalents cornéens coïncide avec un retard dans le pic d'expression des protéines Sp1 et Sp3. Nous disposons ainsi d'un moyen permettant d'identifier rapidement les populations cellulaires les plus appropriées pour la production des tissus reconstruits. Le deuxième objectif spécifique était de s'assurer que l'épithélium de nos cornées reconstruites puisse réépithélialiser des plaies éventuelles après la greffe. Pour ce faire, un modèle de guérison de plaies cornéennes *in vitro* a été développé à partir des cornées reconstruites. En plus de s'être assuré de la régénération des substituts cornéens à la suite d'une blessure, ce modèle a également permis de montrer que durant la réépithélialisation, la migration des cellules épithéliales suit un patron qui est semblable à celui rapporté lors de la guérison de blessures cornéennes humaines *in vivo*. Ce modèle présente aussi des aspects histologiques semblables au tissu d'origine ainsi que l'expression des constituants de la matrice extracellulaire et des sous-unités d'intégrines. Il permet également de quantifier le taux de réépithélialisation, qui est significativement accéléré en présence de la fibrine ou de l'EGF. Enfin, pour ce qui est du troisième objectif spécifique, il était

important d'évaluer si l'origine des cellules utilisées lors de la fabrication des cornées *in vitro* influençait l'épaisseur de l'épithélium obtenu, caractéristique essentielle à une bonne acuité visuelle. Les observations recueillies nous ont permis de démontrer que l'origine des cellules du mésenchyme et des cellules épithéliales influence grandement, en plus de l'aspect macroscopique, l'histologie des tissus reconstruits et que ces changements dans la différenciation et la stratification des cellules épithéliales sont contrôlés par des facteurs solubles. Une différence significative dans l'expression d'IL-6 a été détectée entre les fibroblastes cornéens et dermiques. Les résultats montrent également que la cornée reconstruite est en mesure d'absorber les rayons ultraviolets de façon similaire à la cornée *in situ*. Tous ces travaux ouvrent la voie à de nombreuses autres recherches et laissent entrevoir une application clinique des cornées reconstruites à moyen terme.

Abstract

The cornea is an essential part of the dioptric system of the eye. Furthermore, it also has a significant role in the protection of the eyeball. However, its location predisposes it to several wounds of various origins. In such cases, serious injuries may ensue requiring the replacement of the cornea. The main objective of the research program is based on the reconstruction, with the self-assembly method, of a human cornea in order to perform experimental studies and eventually graft it on patients. However, several aspects of this subject had to be carefully examined before any clinical use, in order to evaluate the success of long-term corneal graft on patients. The first specific objective of this thesis was to study the heterogeneity in the proliferative capacities of the human corneal epithelial cells (HCECs), obtained from various donors, was initially studied. This work shows that these variations were related to changes in the levels of expression of transcription factors belonging to the Sp family. In fact, these factors were highly expressed during one passage and then totally disappeared as cells terminally differentiated. Proper stratification of HCECs on reconstructed tissue substitutes could be obtained only with cells that also had a delayed peak of Sp1/Sp3 expression when cultured *in vitro*. We thus have a mean to identify quickly the cell lines most adapted for the production of reconstructed tissues. The second specific objective was to make sure that the epithelium of the reconstructed corneas could reepithelialize following a wound, after grafting. For this purpose, an *in vitro* corneal wound healing model was developed from the reconstructed corneas. We show that corneal substitutes regenerate after wounding. During reepithelialization, epithelial cell migration followed a consistent wave-like pattern similar to that reported for human corneal wound healing *in vivo*. This model showed an histological appearance similar to the native tissue as well as expression of basement membrane components and the integrin subunits known to be main actors during the wound healing process. It also allowed us to quantify the reepithelialization rate, which was significantly accelerated in the presence of fibrin or EGF. Finally, for the third specific objective, we determined whether the origin of the cells used during the production of *in vitro* corneas had any effect on the thickness of the epithelium obtained, an essential characteristic of a good vision. The results indicated that

the origin of fibroblasts and epithelial cells influences largely the macroscopic aspect as well as the histology of reconstructed tissues, and that these changes in the differentiation and stratification of epithelial cells are controlled by soluble factors. A significant difference in the expression of IL-6 was detected between corneal and skin fibroblasts. Our results also unravel that the reconstructed cornea has similar UV-absorption characteristics to that of the normal human cornea. Our research will lead to other experimental studies on human cornea. Moreover, clinical application of reconstructed corneas are anticipated in the future.

Avant-Propos

Durant toutes ces années passées au LOEX, j'ai eu le privilège de côtoyer plusieurs personnes qui ont grandement contribué à rendre cette grande aventure des plus agréables et sans qui la réalisation de ces travaux n'aurait pas été possible. Je tiens à les remercier.

Tout d'abord, j'aimerais remercier de tout cœur ma directrice de recherche, Dre Lucie Germain pour la confiance qu'elle m'a accordée en m'offrant de débiter un nouveau projet de recherche. Je la remercie pour son soutien, son dévouement, son dynamisme et sa grande disponibilité malgré un horaire très chargé et des journées de seulement 24 heures! Merci pour tout le temps que vous avez consacré à ma formation et pour la liberté dont j'ai disposé tout au long de mes études graduées. Je vous en serai éternellement reconnaissant. Ce fut et ce sera toujours un grand plaisir de travailler avec vous.

Ensuite, j'aimerais remercier le Dr. François Auger pour m'avoir accueilli dans un laboratoire qui a permis la réalisation de mes travaux dans d'excellentes conditions.

Un merci tout spécial à deux de mes anciens étudiants d'été, devenus mes collègues de l'équipe des « yeux », Alexandre Deschambeault et Mariève Talbot. Merci à vous deux pour votre aide, votre soutien et pour la correction de mes articles et de ma thèse. Vous avez été d'une aide précieuse et d'une grande générosité en temps. Merci également à Éric Grandbois pour son excellente assistance technique et à un de nos collaborateurs, le Dr Claude Giasson pour son oreille attentive, son aide, sa bonne humeur et pour la pré-lecture de ma thèse.

Je ne peux passer sous silence tout le travail exceptionnel de tous les techniciens et assistants de recherches du LOEX. Vos tâches quotidiennes sont d'une importance primordiale pour le bon déroulement du travail au laboratoire et pour les projets de recherche des étudiants. Mille fois merci!

De plus, je tiens à remercier Claude Marin et Gilles Langlois du service audiovisuel, Sylvie Marcoux pour ses services à la bibliothèque, Sergio Mendoza pour le soutien informatique, Aristide Prustela et Hélène Chamberland du service de microscopie électronique ainsi que tous les autres collègues du LOEX pour leur aide et leur amitié. Un gros merci à mon père Antoine pour son aide précieuse lors de la correction du français de cette thèse.

Enfin je tiens à remercier le Fonds de Recherche en Santé du Québec (FRSQ), le Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche (FCAR), le Réseau Vision du FRSQ, le Fonds de soutien au doctorat de l'Université Laval ainsi que ma directrice de recherche pour leur soutien financier. Leur aide financière précieuse a été essentielle pour la réalisation de cette thèse et m'a également permis de participer à des congrès d'envergure internationale et ce, à toutes les années de mes études graduées.

Voilà, j'ai adoré travailler sur mon projet de recherche et je souhaite qu'il puisse se poursuivre jusqu'à la greffe d'une cornée humaine reconstruite sur un patient. J'espère que la lecture de cette thèse sera agréable et intéressante.

À mes parents pour leur support et leur soutien depuis le début de mes études.

À mon fils Félix pour les petits bonheurs quotidiens.

*À mon amour Isabelle pour ses encouragements et son aide tout au long de mes études
graduées.*

*To suppose that eye, with all its inimitable
contrivances for adjusting the focus to
different distances, for admitting different
amounts of light, and for the correction of
spherical and chromatic aberration, could
have been formed by natural selection,
seems, I freely confess, absurd in the highest
degree.*

Charles Darwin, *The Origin of Species*

Table des matières

Résumé.....	ii
Abstract.....	iv
Avant-Propos	vi
Table des matières	ix
Liste des figures.....	xvi
Liste des abréviations.....	xviii
Chapitre I : Revue de littérature.....	1
Partie 1 : La cornée	1
1.1.1 Introduction.....	1
1.1.2 L'œil et sa surface.....	2
1.1.3 La cornée.....	3
1.1.3.1 Rôle et nutrition	3
1.1.3.2 Embryogenèse.....	5
1.1.3.3 Histologie de la cornée	8
1.1.3.3.1 L'épithélium cornéen	10
1.1.3.3.2 La membrane basilaire	13
1.1.3.3.2.1 Hémidesmosomes	14
1.1.3.3.3 La membrane de Bowman.....	17
1.1.3.3.4 Le stroma	18
1.1.3.3.5 La membrane de Descemet	22
1.1.3.3.6 L'endothélium	23
1.1.4 Le limbe et les cellules souches.....	25
1.1.4.1 Le limbe	25
1.1.4.2 Les cellules souches.....	28
1.1.4.3 Localisation et marqueurs des cellules souches.....	30
1.1.4.3.1 Les kératines	30
1.1.4.3.2 Thymidine tritiée et bromodeoxyuridine.....	32
1.1.4.4 Différenciation des cellules souches.....	33

Partie 2 : La guérison des plaies cornéennes	35
1.2.1 Importance de la guérison cornéenne	35
1.2.2 Étapes de la guérison de l'épithélium cornéen	36
1.2.2.1 Migration cellulaire.....	36
1.2.2.1.1 Phase latente.....	36
1.2.2.1.2 Phase linéaire migratoire	39
1.2.2.2 Prolifération cellulaire	40
1.2.2.3 Adhésion cellulaire	40
1.2.2.3.1 Intégrines	42
1.2.2.4 Rôle des kératocytes du stroma	46
1.2.3 Contrôle de la guérison cornéenne.....	47
1.2.3.1 Facteur de croissance épithélial (EGF).....	48
1.2.4 Modèles pour l'étude de la cicatrisation cornéenne.....	49
Partie 3: Troubles visuels liés à la cornée et traitements	52
1.3.1 Déficience en cellules souches	52
1.3.1.1 Causes	52
1.3.1.1 Apparence clinique	53
1.3.2 Traitements possibles.....	54
1.3.2.1 Greffe de cornée.....	54
1.3.2.2 Autogreffe.....	55
1.3.2.3 Allogreffe.....	55
1.3.2.3 Greffe d'épithélium cornéen cultivé <i>in vitro</i>	56
1.3.2.4 Membrane amniotique	57
1.3.2.5 Gel de fibrine	58
1.3.2.5 Cornées reconstruites <i>in vitro</i> par génie tissulaire	59
1.3.2.5.1 Génie tissulaire.....	59
1.3.2.5.2 Modèles de cornées reconstruites <i>in vitro</i>	60
1.3.2.5.3 Méthode d'auto-assemblage.....	62
1.3.2.5.4 Culture des cellules épithéliales cornéennes humaines et problèmes rencontrés	64

1.3.2.5.5 Facteurs de transcription : la famille Sp	65
 Partie 4 : La Peau	70
1.4.1 Caractéristiques et fonctions de la peau	70
1.4.2 Composition de la peau	72
1.4.2.1 Épiderme	72
1.4.2.1.1 Cellules de l'épiderme	73
1.4.2.1.2 Couches de l'épiderme	74
1.4.2.1.2.1 La couche basale (<i>stratum germinativum</i>)	76
1.4.2.1.2.2 La couche à épines ou épineuse (<i>stratum spinosum</i>)	76
1.4.2.1.2.3 La couche granuleuse (<i>stratum granulosum</i>)	77
1.4.2.1.2.4 La couche cornée (<i>stratum corneum</i>)	78
1.4.2.2 Le derme	78
1.4.2.2.1 La zone papillaire	79
1.4.2.2.2 La zone réticulaire	79
 Partie 5 : Rôle des fibroblastes au niveau de l'homéostasie de la cornée et de la peau....	80
 Partie 6 : Problématique et objectifs de recherche	84
1.6.1 Objectifs du projet de recherche	84
1.6.2 Présentation de la thèse	88
 Chapitre II : Article publié	89
LA VARIABILITÉ DES CELLULES ÉPITHÉLIALES DE CORNÉES HUMAINES EN CULTURE PRIMAIRE VOUÉES À LA PRODUCTION DE CORNÉES RECONSTRUITES EST DICTÉE PAR LES FACTEURS DE TRANSCRIPTION SP1 ET SP3	89
2.1 Contribution à l'article	89
2.2 Résumé	90
2.3 Article	92

Influence of Sp1/Sp3 Expression on Corneal Epithelial Cells Proliferation and Differentiation Properties in Reconstructed Tissues	92
2.3.1 Abstract.....	93
2.3.2 Introduction.....	94
2.3.3 Methods	97
Recombinant Plasmids.....	97
Cell Culture and Media.....	97
Preparation and Culture of Reconstructed.....	98
Histologic Analysis.....	98
Indirect Immunofluorescence	98
Nuclear Extract Preparation.....	99
Electrophoretic Mobility Shift Assays.....	99
SDS-PAGE and Western Blot	100
Transient Transfections and CAT Assays	100
2.3.4 Results.....	102
Influence of Cell Passage on the Morphology of HCECs	102
Patterns of Expression of Sp1 and Sp3	102
Regulatory Influence of HCEC Sp1/Sp3 on an Sp1-Dependent Promoter	107
Effect of Various Levels of Sp1/Sp3 on Properties of HCECs	111
2.3.5 Discussion.....	115
2.3.6 Acknowledgements.....	119
2.3.7 References.....	120
 Chapitre III : Article en préparation	128
CARACTÉRISATION DE LA RÉÉPITHÉLIALISATION CORNÉENNE À L'AIDE D'UN NOUVEAU MODÈLE DE CORNÉE RECONSTRUITE PAR GÉNIE TISSULAIRE.....	128
3.1 Contribution à l'article.....	128
3.2 Résumé.....	129
3.3 Article	131

Characterization of wound reepithelialization using a new tissue-engineered wound healing human corneal model.....	131
3.3.1 Abstract.....	132
3.3.2 Introduction.....	133
3.3.3 Methods	136
Tissue Extraction and Cell culture.....	136
Engineering of Reconstructed human corneas.....	137
Wound healing model.....	137
Wound treatments and measurement of reepithelialization rates 3 days after wounding	138
Histological Analysis.....	138
Immunofluorescence stainings	138
Transmission electron microscopy	139
3.3.4 Results.....	140
Sensitivity of the <i>in vitro</i> human wound healing model to evaluate the reepithelialization pattern and rate.....	140
Accelerated reepithelialization of corneal wounds by EGF and fibrin.....	141
Histological analysis of reconstructed cornea and of cellular migration during reepithelialization.....	142
Basement membrane components and integrin expression during wound healing	144
Ultrastructural analysis of the wounded reconstructed human corneas.....	148
3.3.5 Discussion.....	150
3.3.6 Acknowledgements.....	154
3.3.7 References.....	155
Chapitre IV : Article en préparation	162
INFLUENCE DES FIBROBLASTES SUR LA DIFFÉRENCIATION ET LA STRATIFICATION DES CELLULES ÉPITHÉLIALES : ÉLÉMENTS DE RÉPONSES À L'AIDE D'UNE CORNÉE HUMAINE RECONSTRUITE PAR GÉNIE TISSULAIRE.....	162
4.1 Contribution à l'article.....	162

4.2 Résumé.....	163
4.3 Article	165
Fibroblasts Modulate Differentiation and Stratification of Epithelial Cells: Insights from Human Cornea Reconstructed by Tissue Engineering	165
4.3.1 Abstract.....	166
4.3.2 Introduction.....	167
4.3.3 Methods	170
Cell extraction and culture.....	170
Reconstruction of tissues by tissue engineering	171
Conditioned media.....	172
Measurement of Absorption Spectrum.....	172
Histological Analysis and Thickness Measurement.....	173
Detection of Cytokines Expression in Fibroblast's Conditioned Media using Protein Arrays.....	173
4.3.4 Results.....	174
Macroscopic analysis of the reconstructed tissues	174
Absorption Spectrum of Reconstructed Tissues.....	176
Histological analyses of the four reconstructed tissues	177
Soluble factors influence epithelium changes in reconstructed tissues	180
Analysis of conditioned media components	182
4.3.5 Discussion.....	184
4.3.6 Acknowledgements.....	189
4.3.7 References.....	190
Chapitre V : Discussion et perspectives futures.....	197
5.1 Les facteurs de transcription Sp1 et Sp3 sont impliqués dans la capacité des CECH à proliférer et à se différencier.....	198
5.2 Caractérisation du nouveau modèle de guérison des plaies cornéennes et de la cornée reconstruite par la méthode d'auto-assemblage.....	206
5.3 Influence déterminante des fibroblastes sur la stratification et la différenciation des cellules épithéliales dans nos modèles de peaux et cornées reconstruites <i>in vitro</i>	218

Chapitre VI : Conclusion Générale.....	225
Bibliographie	226
Annexe A : CV-Curriculum Vitae.....	262
A.1 Publications.....	262
A.2 Communications	263

Liste des figures

FIGURE 1.1 L'œil humain.	2
FIGURE 1.2 Embryogenèse de la cornée.	6
FIGURE 1.3 Histologie de la cornée.	8
FIGURE 1.4 Morphologie des cellules épithéliales selon leur niveau de différenciation.	11
FIGURE 1.5 Adhésion des cellules épithéliales à la membrane basilaire via les hémidesmosomes.	16
FIGURE 1.6 Organisation des fibrilles de collagène.	19
FIGURE 1.7 Cellules de l'endothélium humain.	25
FIGURE 1.8 Histologie du limbe.	27
FIGURE 1.9 Division asymétrique des cellules souches.	29
FIGURE 1.10 Marqueur de différenciation des cellules épithéliales de la cornée.	32
FIGURE 1.11 Localisation et différenciation des cellules souches cornéennes.	34
FIGURE 1.12 Migration et adhésion des cellules épithéliales.	37
FIGURE 1.13 Interaction des intégrines avec les protéines de la matrice extracellulaire et les protéines cytoplasmiques au niveau des contacts focaux.	42
FIGURE 1.14 Association des sous-unités α et β des intégrines et leurs ligands.	45
FIGURE 1.15 Conjonctivalisation d'une cornée.	53
FIGURE 1.16 Reconstruction in vitro de cornée humaine par la méthode du gel de collagène.	62
FIGURE 1.17 Reconstruction in vitro de peau humaine par la méthode d'auto-assemblage.	64
FIGURE 1.18 Doigts de zinc.	67
FIGURE 1.19 Histologie de la peau humaine.	71
FIGURE 1.20 Couches de l'épiderme.	75
FIGURE 2.1. Expression of Sp family members in HCECs.	104
FIGURE 2.2. Influence of cell passages on the expression of Sp1, Sp3, and Sp4.	106
FIGURE 2.3. Influence of cell passages on Sp1/Sp3 DNA binding and transactivating properties.	110
FIGURE 2.4. Stratification of HCECs in reconstructed tissue substitutes.	112

FIGURE 2.5. Immunofluorescence analysis of K3 and Sp1 expression in the epithelia of the reconstructed tissue substitutes.....	114
FIGURE 3.1. Macroscopic aspect of the wound in the reconstructed human cornea.	141
FIGURE 3.2. Effect of exogenous factors on reepithelialization.	142
FIGURE 3.3. Histology of the in vitro self-assembled wound healing model 3 days after wounding.	144
FIGURE 3.4. Indirect immunofluorescence of the wound healing model three days after wounding.	147
FIGURE 3.5. Transmission electron microscopy showing details of reformation of the epithelium-stroma junction (EJS) in the wound-healing model.	149
FIGURE 4.1. Macroscopic aspect of the four types of tissues reconstructed by tissue engineering.....	175
FIGURE 4.2. Absorption coefficient for the four tissue types between 300 and 1000 nm.	176
FIGURE 4.3. Absorption coefficient for the reconstructed cornea and native normal human cornea between 240 and 400 nm.....	177
FIGURE 4.4. Histological organization of the four reconstructed tissues.	179
FIGURE 4.5. Histological organization of the four tissues cultured with conditioned media.	181
FIGURE 4.6. Detection of multiple cytokine expression from conditioned media.	183

Liste des abréviations

GÉNÉRALES

α	Alpha
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
β	Beta
BrdU	5-Bromodeoxyuridine
CAT	Cellules Amplificatrices Transitoires
CDI	<i>Cyclin dependant kinase inhibitor</i> ; inhibiteur de kinase dépendante des cyclines
CECH	Cellules épithéliales cornéennes humaines
C	Cytosine
Cys	Cystéine
DME	<i>Dulbecco-Vogt modification of Eagles medium</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Minimum Essential Medium</i> ; Milieu essentiel minimal de Dulbecco
ECM	<i>Extracellular matrix</i> ; matrice extracellulaire
EDTA	<i>Ethylene Diamine Tetraacetic Acid</i> ; acide éthylène-diamine tétra acétique

EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i> ; facteur de croissance épidermique
FAK	<i>Focal Adhesion Kinase</i> ; kinase dans les plaques d'adhésion
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i> ; facteur de croissance des fibroblastes
FITC	Fluorescein isothiocyanate
G	Guanine
His	Histidine
HGF	<i>Hepatocyte Growth Factor</i> ; facteur de croissance des hépatocytes
IL-1	Interleukine-1
IL-6	Interleukine-6
IL-8	Interleukine-8
IL-10	Interleukine-10
ILr	Récepteur de l'interleukine
K	Kératine
KGf	<i>Keratinocyte Growth Factor</i> ; facteur de croissance des kératinocytes
LOEX	Laboratoire d'Organogénèse Expérimentale
MEC	Matrice Extracellulaire
MMP	<i>Matrix Metalloproteinase</i> ; métalloprotéinase matricielle
Na ⁺ /K ⁺	Sodium/Potassium
NaOH	Hydroxyde de sodium
p21	Protéine kinase de 21 kDA

p27	Protéine kinase de 27 kDA
p53	Protéine kinase de 53 kDA
p63	Protéine kinase de 63 kDA
p107	Protéine kinase de 107 kDA
PARP	Poly(ADP-ribose polymérase)
PBS	<i>Phosphate buffer saline</i> ; tampon phosphate physiologique
PDGF	<i>Platelet Derived Growth Factor</i> ; facteur de croissance dérivé des plaquettes
PRK	Kératectomie Photoréfractive
RC	<i>Reconstructed cornea</i> ; cornée reconstruite
Rb	Rétinoblastome
RT-PCR	<i>Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction</i> ; réaction de polymérisation en chaîne avec la transcriptase inverse
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
Sp1	<i>Specific protein-1</i> ; protéine spécifique-1
T	Thymidine
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i> ; facteur de nécrose tumorale
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor-β</i> ; facteur de croissance transformant-beta
VEGF	<i>Vascular Endothelial growth factor</i> ; facteur de croissance des endothéliales vasculaires

Zn Zinc

UNITÉS

%	Pourcent
μ	Micro
μm	Micromètre
cm	Centimètre
g	Gramme
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramme
m	Milli
m	Mètre
M	Mole
Min	Minute
mm	Millimètre
nm	Nanomètre
°C	Degré Celcius

Chapitre I : Revue de littérature

Partie 1 : La cornée

1.1.1 Introduction

L'œil est un organe d'une extraordinaire complexité. Même le célèbre évolutionniste Charles Darwin avait de la difficulté à comprendre comment une chose aussi fascinante et complexe, qu'est l'œil humain, avait pu être créée par le processus de sélection naturelle (1). N'ayant pas accès à toutes les données actuelles sur ce sujet, il a également cru, pendant un bon moment, que l'œil causerait la remise en question de sa théorie. En effet, les yeux sont plus anciens et plus variés qu'il ne l'avait imaginé et il est maintenant connu qu'ils ont évolué pendant plusieurs millions d'années, passant d'un œil très primitif à un organe d'une perfection incomparable (2). Il est très difficile d'évaluer le moment précis où l'œil est apparu dans l'évolution puisqu'aucun fossile n'est disponible. Cependant, il est possible d'estimer l'âge de certaines des molécules clés entrant dans la composition de l'œil. Par exemple, l'âge de la molécule appelée opsine est évaluée à environ 600 millions d'années. Cette protéine, qui fait partie de la famille des protéines G couplées à des récepteurs, a été hautement conservée pendant toutes ces années. Elle permet à tous les êtres vivants munis d'yeux de détecter la lumière. Cette protéine est à l'origine de l'apparition des premiers yeux définis comme étant un amas de cellules photosensibles pourvues de pigments absorbant les ondes lumineuses et limitant la diffusion de la lumière (2). Par la suite, de multiples changements dans leurs structures ont été acceptés ou rejetés au cours de l'évolution dépendamment de leur utilité pour la survie de l'animal. Ceci a mené à la formation de l'œil humain tel qu'on le connaît aujourd'hui. L'un des composants de l'œil conservé par le processus de sélection naturelle est la cornée. Il s'agit du sujet central dont il sera question dans cette thèse et le présent chapitre fait une revue de littérature sur le sujet (2).

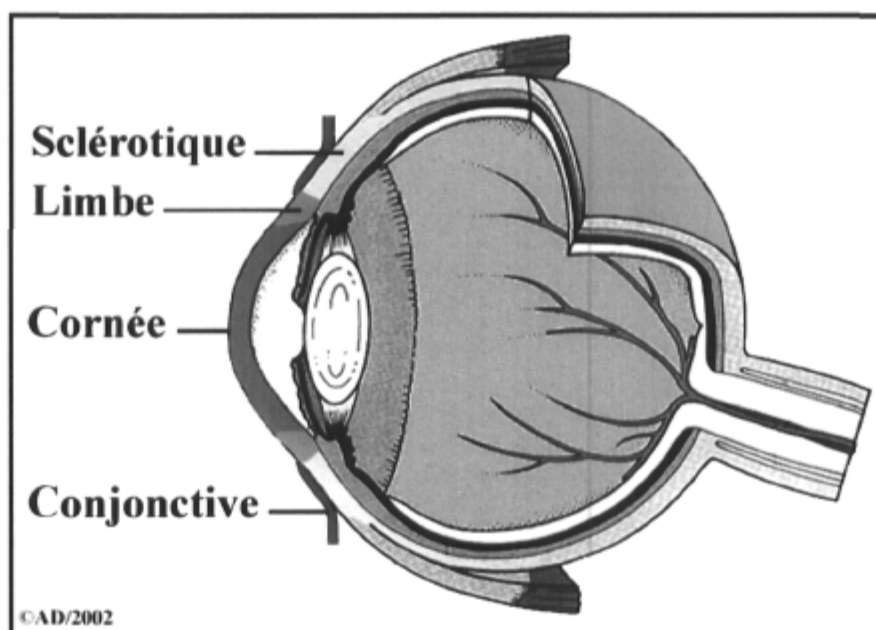


FIGURE 1.1 *L'œil humain.*

La cornée (bleu) est la partie centrale de l'œil qui permet le passage de la lumière. Le limbe (vert foncé) est la zone de transition entre la cornée transparente et la sclérotique opaque. Cette dernière (vert pâle) constitue la tunique fibreuse blanche de l'œil. La conjonctive (rouge), quant à elle, est une fine membrane qui couvre la face interne des paupières et la portion antérieure de la sclérotique jusqu'au limbe. Elle produit le mucus qui tapisse et lubrifie la surface de l'œil. (Gracieuseté de A. Deschambeault, modifié de Stevens, 1993 (3)).

1.1.2 L'œil et sa surface

Le globe oculaire humain est une sphère creuse légèrement irrégulière ayant un diamètre d'environ 2,5 cm chez l'adulte. Il a comme rôle principal de générer des influx jusqu'au centre de la vision situé dans le cerveau, où s'effectue la perception visuelle. L'enveloppe externe de l'œil, nommée tunique fibreuse, se compose de deux parties : la cornée et la sclérotique (aussi appelée sclère). Anatomiquement parlant, la cornée et la sclérotique constituent deux des tissus les plus simples de l'œil. Ils sont majoritairement composés de collagènes, contiennent seulement quelques types cellulaires et leur structure

semble plutôt homogène. Cependant, la cornée et la sclérotique sont très différentes. Tout d'abord, la sclérotique, qui forme la partie postérieure et l'essentiel de la tunique fibreuse, est opaque et très facile à reconnaître chez l'humain par sa couleur blanche. La cornée, qui représente le sixième antérieur de la tunique fibreuse, est quant à elle transparente et présente une courbure plus prononcée que la sclérotique. À la périphérie de la cornée, se trouve une zone de transition nommée le limbe ou la jonction cornéo-sclérotique (figure 1.1). De plus, ces deux tissus ont des fonctions très différentes. La sclérotique protège et façonne le globe oculaire, tout en fournissant un ancrage solide aux muscles extrinsèques de l'œil. Dans sa partie antérieure, la sclérotique est recouverte de la conjonctive. Il s'agit d'une fine membrane muqueuse transparente qui tapisse aussi la face interne des paupières, les rendant ainsi solidaires du globe oculaire. La principale fonction de cette membrane est de produire un mucus lubrifiant qui prévient la dessiccation de l'œil et permet une bonne transparence de la cornée (4).

1.1.3 La cornée

1.1.3.1 Rôle et nutrition

Tout comme la sclérotique, la cornée constitue une enveloppe rigide qui protège le globe oculaire. Elle sert aussi de barrière entre l'œil et son environnement. Par contre, son rôle principal est de laisser la lumière pénétrer dans l'œil et d'agir comme une lentille optique fixe qui focalise la lumière. En effet, les rayons lumineux sont réfractés aux surfaces antérieure et postérieure de la cornée afin que l'image se forme correctement sur la rétine. Toutefois, l'essentiel de la réfraction de l'œil a lieu au niveau de la surface antérieure de la cornée, puisque c'est à ce niveau que la différence d'indice de réfraction est la plus grande (1,376). Puisqu'elle constitue sa principale surface réfringente, la cornée représente ainsi un élément important du système optique de l'œil (5). Cependant, afin d'obtenir une acuité visuelle optimale et de bien jouer son rôle optique, la cornée doit être

transparente. Plusieurs facteurs contribuent à cette transparence: la régularité et l'épaisseur uniforme de l'épithélium et du film lacrymal, la disposition régulière des fibrilles de collagène, composants majeurs du stroma cornéen, la déshydratation relative de la cornée, et finalement l'absence totale de vaisseau sanguin (5, 6).

Le fait que la cornée soit avasculaire implique que la plupart des nutriments nécessaires à son maintien et à sa régénération proviennent de l'humeur aqueuse et du film lacrymal. En effet, la cornée satisfait son besoin en oxygène de l'atmosphère environnant qui traverse le film lacrymal et l'épithélium. Le glucose, les acides aminés ainsi que les autres substances essentielles proviennent, quant à eux, majoritairement de l'humeur aqueuse en passant au travers de l'endothélium cornéen (7). Une petite quantité seulement des nutriments sont acquis par les vaisseaux sanguins du limbe qui nourrissent uniquement les cellules en périphérie de la cornée (5).

La cornée est également très riche en terminaisons nerveuses. Il y aurait plus de 325 000 terminaisons nerveuses au niveau de l'épithélium cornéen (7). Ceci en fait un tissu extrêmement sensible, surpassant de beaucoup la sensibilité de la peau. Cette sensibilité procure un rôle protecteur puisque le contact d'un objet avec la cornée provoque le réflexe du clignement des paupières et accroît la sécrétion lacrymale, protégeant ainsi la surface cornéenne en la nettoyant. Cependant, contrairement à la peau où les nerfs possèdent des terminaisons nerveuses complexes myélinisées, l'innervation de la cornée repose sur la présence de nerfs ayant des extrémités libres non myélinisées, contribuant ainsi à maintenir la transparence (8).

1.1.3.2 Embryogenèse

La formation de la cornée débute aux environs de la 5^e semaine et s'effectue graduellement tout au long de la gestation. Tôt durant le développement de l'œil, des interactions entre la vésicule optique et l'ectoderme de surface causent des changements au niveau de la forme de ces tissus (figure 1.2). En effet, la vésicule optique se transforme en cupule optique et une invagination de l'ectoderme dans la cupule optique crée la vésicule cristallinienne. Vers le 33^e jour de grossesse, cette dernière se détache de l'ectoderme de surface et pénètre dans la cupule pour se transformer progressivement en cristallin. C'est à ce moment que la partie de l'ectoderme au-dessus du cristallin en formation est considérée comme étant l'épithélium cornéen primitif et que débute le développement de la cornée. L'épithélium cornéen est alors composé d'une couche de cellules reposant sur une mince lame basale (7, 9, 10).

Peu de temps après le détachement du cristallin, l'épithélium cornéen sécrète de la matrice extracellulaire formant ainsi le stroma primaire. Ce stroma acellulaire est composé d'une couche de courtes fibrilles de collagène. Durant cette même période, l'épithélium cornéen reste en contact avec le cristallin et avec les rebords de la cupule optique qui ont une influence sur sa différenciation (9). Aux environs de la 6^e semaine, une première vague de cellules provenant de la crête neurale (11-13) migre autour des rebords de la cupule optique, entre le cristallin et l'épithélium, formant ainsi l'endothélium cornéen. De plus, à cette période, l'épithélium est maintenant composé de deux couches de cellules : une couche de cellules superficielles aplaties et une couche de cellules basales cuboïdales.

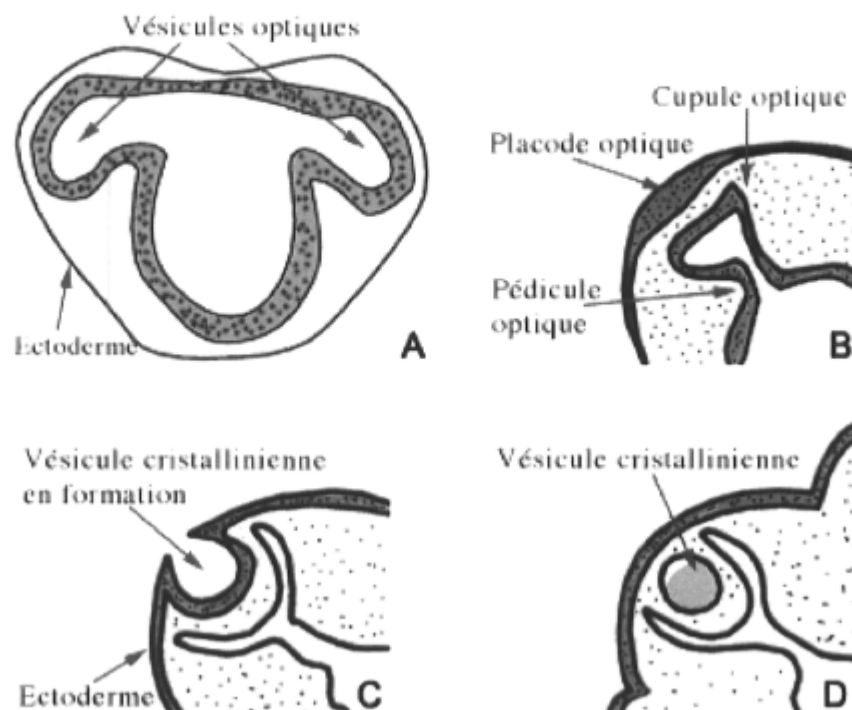


FIGURE 1.2 *Embryogenèse de la cornée.*

Au début de la quatrième semaine, deux dépressions, les gouttières optiques apparaissent de part et d'autre du cerveau. A) En s'avançant vers l'ectoderme superficiel, elles s'invaginent pour former les vésicules optiques. B) Par la suite, elles se transforment en cupules optiques sphériques et creuses, attachées au cerveau par les pédicules optiques (futurs nerfs optiques). L'ectoblaste à proximité des cupules va s'épaissir pour former les deux placodes optiques (futurs cristallins). C) Puis, ces placodes s'invaginent pour donner les vésicules cristalliniennes creuses et positionnées dans les cupules optiques. D) Finalement, la vésicule formée pénètre dans la cupule optique et se transforme progressivement en cristallin.

(Figures tirées du site: www.snof.org/maladies/embryoeil.html).

Après la sixième semaine de gestation, la cornée est alors composée de deux couches de cellules épithéliales reposant sur une lame basale formée de collagène de type IV et de laminine, d'une matrice acellulaire de fibrilles de collagène et de deux couches de cellules endothéliales cornéennes (14). Par la suite, à la fin de la 6^e semaine, le stroma primaire prend de l'expansion à la suite d'une hydratation et une seconde vague de cellules

provenant de la crête neurale commence à s'y infiltrer. Ces cellules sont les kératocytes cornéens qui secrèteront, tout au long de la grossesse, les fibrilles de collagène formant le stroma. Les courtes fibrilles de collagène du stroma primaire joueraient un rôle important à cette étape en fournissant une matrice pour la migration de ces cellules (7). De plus, il a longtemps été mentionné, dans la littérature, que ces deux vagues de cellules provenaient du mésoderme (15). Cependant, des expériences ont démontré clairement que les kératocytes et les cellules endothéliales expriment certaines protéines neuronales (16) et proviennent de la crête neurale (11, 12).

Durant la 16^e semaine de grossesse, la membrane de Bowman apparaît et les cellules endothéliales, qui forment alors une monocouche, secrètent la membrane de Descemet (5, 17, 18). À ce moment, une troisième couche de cellules polyédriques vient s'ajouter à l'épithélium entre les deux premières couches de cellules. Les hémidesmosomes, qui sont absents au début de la grossesse, apparaissent vers la 19^e semaine. À la 26^e semaine, lors de l'ouverture des paupières du fœtus, l'épithélium est composé de quatre couches de cellules et le nombre d'hémidesmosomes est augmenté puisque le potentiel d'abrasion des cellules épithéliales devient plus élevé (18). À la fin de la 28^e semaine, la cornée ressemble à la cornée adulte car elle possède essentiellement les mêmes caractéristiques structurales.

Chez l'humain, à la naissance, l'épithélium cornéen n'est composé que de quatre couches de cellules; les deux autres couches viennent se rajouter vers l'âge de 5 à 6 mois (7). De plus, la cornée, avec un diamètre approximatif de 10 mm, n'a pas encore complété son développement (5). Elle continue à croître en diamètre après la naissance. La majeure partie de la croissance en taille de la cornée s'effectue entre les âges de 6 à 12 mois et celle-ci atteint sa taille définitive de 1,3 cm² entre la première et la deuxième année (7).

1.1.3.3 Histologie de la cornée

La cornée est donc un tissu transparent, sensible et avasculaire qui laisse pénétrer la lumière dans l'œil. C'est la fenêtre permettant une bonne vision. Son épaisseur est d'environ 520 μm au centre et augmente au niveau du limbe pour atteindre environ 620 μm en périphérie (19). Dû à un limbe plus proéminent en supérieur et inférieur, la cornée est ovale lorsque vue de la face antérieure (épithélium) et de forme circulaire vue de la face postérieure (endothélium) (7). Son diamètre vertical moyen est de 11,7 mm et son diamètre horizontal de 12,6 mm (5, 20).

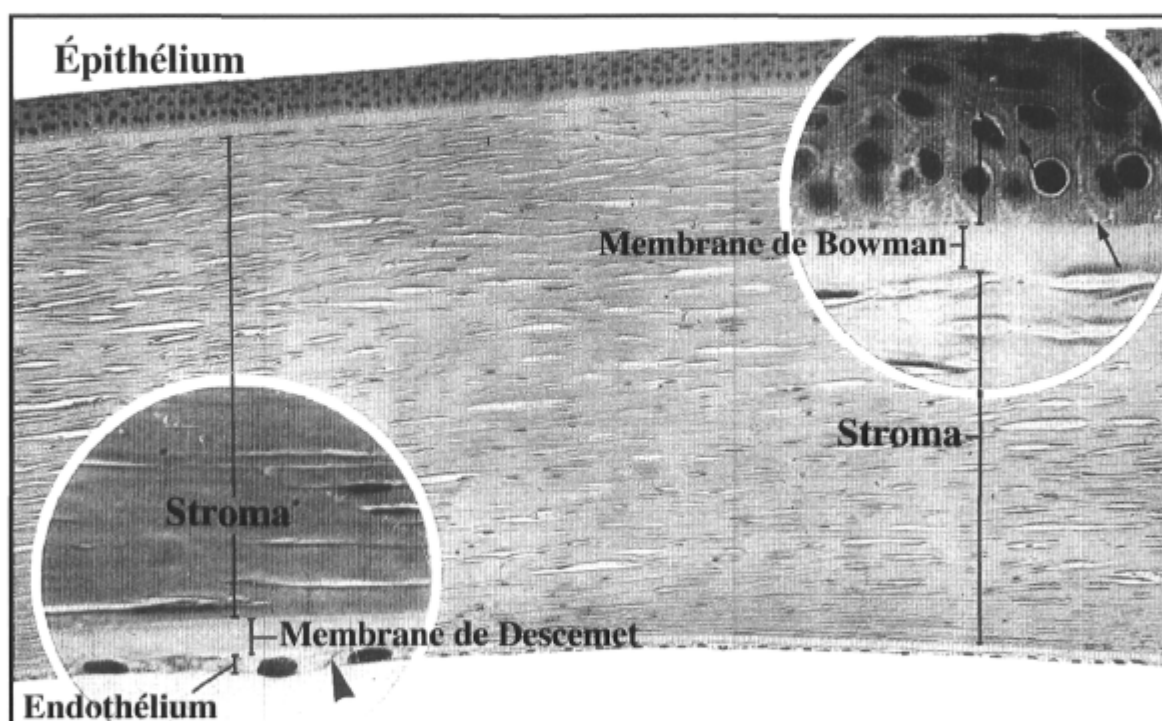


FIGURE 1.3 *Histologie de la cornée.*

La cornée est un tissu translucide composé de cinq couches: l'épithélium, la membrane de Bowman, le stroma, la membrane de Descemet et l'endothélium. La face antérieure de la cornée, qui est en contact avec l'air, est constituée de l'épithélium alors que la face postérieure de la cornée, qui est en contact avec l'humeur aqueuse, est constituée de l'endothélium. (Adapté de Hogan, 1971 (5)).

Au niveau microscopique, la cornée humaine peut être divisée en cinq couches distinctes: l'épithélium, la couche de Bowman, le stroma, la membrane de Descemet et l'endothélium (figure 1.3). De plus, la cornée est recouverte d'une autre mince couche, appelée le film lacrymal. Bien que celui-ci ne rentre pas dans la composition de la cornée, le film lacrymal est intimement associé à la cornée d'un point de vue anatomique et fonctionnel (7). Cette couche joue plusieurs rôles importants dans le maintien d'une cornée saine et transparente. Elle permet d'abord de prévenir les dommages à l'épithélium de la cornée en conservant la surface cornéenne humide et en éliminant les particules étrangères. De plus, le film lacrymal transfère l'oxygène de l'air ambiant à la cornée et comble les petites irrégularités de l'épithélium, qui devient alors lisse et homogène. Ceci permet d'obtenir une surface optique régulière. Le film lacrymal élimine également les cellules qui desquament, fournit un moyen supplémentaire aux cellules inflammatoires d'atteindre le centre de la cornée et contient des immunoglobulines qui protègent la surface oculaire des agents infectieux (21).

Le film lacrymal, d'une épaisseur de 7 μm , est composé de trois couches (22). La couche muqueuse, sécrétée par les cellules à gobelet de la conjonctive et par les cellules de l'épithélium cornéen et conjonctival, contient diverses mucines et est maintenue en place par les projections microscopiques des cellules superficielles de l'épithélium (7). La principale couche, la couche aqueuse est composée d'eau, d'électrolytes et de diverses protéines. Cette couche est surtout sécrétée par les glandes lacrymales situées dans la partie supérieure-temporale de l'orbite (21). Finalement, le film lacrymal est complété par une très fine couche lipidique qui diminue le taux d'évaporation de l'eau. Cette couche est sécrétée par les glandes Meibomius localisées au niveau des paupières (23).

1.1.3.3.1 L'épithélium cornéen

L'épithélium cornéen est un épithélium pavimenteux stratifié non-kératinisé d'une épaisseur d'environ 50 μm . Il représente approximativement 10% de l'épaisseur totale de la cornée (7). Cet épithélium joue deux rôles principaux. Il permet d'abord, en association avec le film lacrymal, de conserver une surface optique régulière pour le maintien d'une bonne vision. De plus, il joue un rôle de protection contre les agents pathogènes en formant une barrière protectrice.

L'épithélium cornéen est composé de cinq à six couches de cellules au niveau du centre de la cornée (24). En périphérie, le nombre de couches de cellules augmente pour atteindre environ dix couches cellulaires composées de trois principaux types cellulaires qui se distinguent les unes des autres par leur morphologie: les cellules basales qui sont les moins différenciées, les cellules ailées et les cellules superficielles qui sont les plus différenciées (figure 1.4) (5). Les cellules épithéliales subissent donc une maturation et une différenciation de la couche basale vers les couches superficielles. Au cours de ce processus, les cellules épithéliales changent de forme, s'aplatissent et perdent la grande majorité de leurs organelles (25). Les cellules superficielles finissent par se détacher de l'épithélium par desquamation puis sont évacuées dans le film lacrymal. L'épithélium est ainsi renouvelé complètement en quelques mois (26).

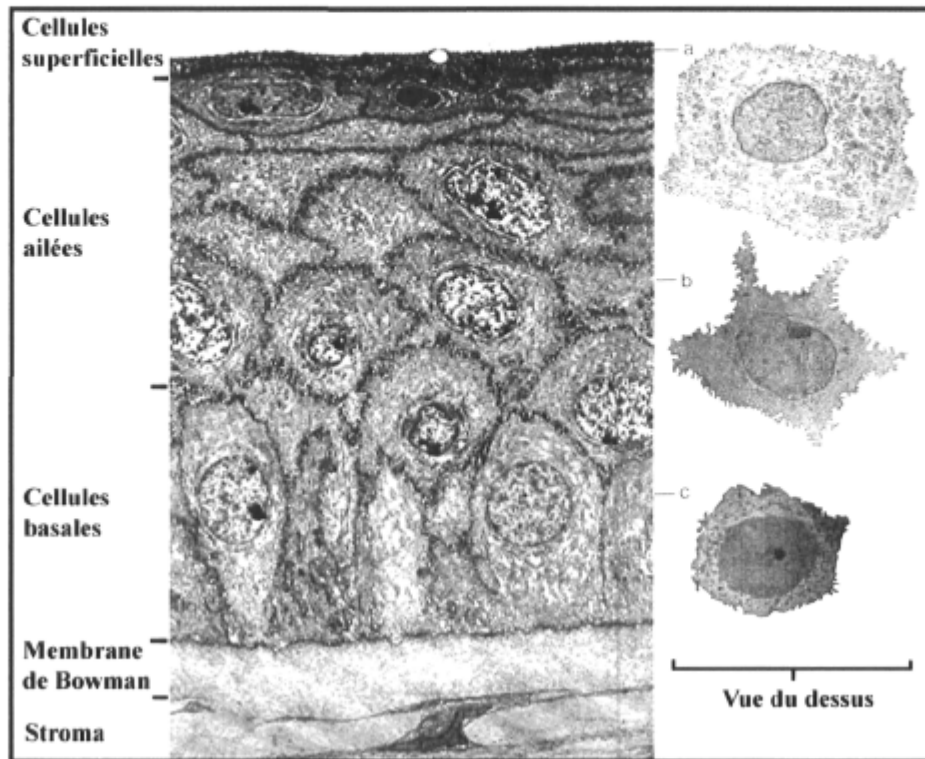


FIGURE 1.4 Morphologie des cellules épithéliales selon leur niveau de différenciation.

L'épithélium cornéen est composé de cinq à six couches de cellules. Parmi ces couches, trois principaux types cellulaires qui se distinguent les uns des autres par leur morphologie: a) les cellules superficielles qui sont les plus différenciées, b) les cellules ailées et c) les cellules basales qui sont les moins différenciées. (Gracieuseté de A. Deschambeault, modifié de Hogan, 1971 (5)).

Les cellules superficielles sont les cellules les plus différenciées de l'épithélium cornéen. Les deux couches de cellules superficielles sont composés de cellules très aplaties (entre 2 et 4 μm d'épaisseur) et très étendues avec des longueurs variant de 40 μm à 60 μm (7). Ces cellules deviennent d'autant plus plates qu'elles sont plus superficielles et perdent progressivement leurs différents organelles à l'exception du noyau qui est conservé jusqu'à la mort des cellules (25). Bien que ces cellules soient vouées à disparaître par desquamation, elles possèdent des caractéristiques qui leurs sont propres et qui leurs confèrent des rôles très importants. En effet, les cellules superficielles présentent, sur leurs

surfaces apicales, des projections microscopiques appelées « formations digitées (27)» permettant l'adhésion du film lacrymal (28). Elles sont également pourvues de jonctions serrées (*tight junctions*) qui participent à la formation d'une barrière semi-perméable avec l'environnement (29) et de desmosomes permettant une bonne stabilité mécanique latérale (7). Durant le processus de desquamation, ces jonctions sont perdues et les desmosomes sont brisés et dissous afin de permettre le renouvellement des cellules. En effet, les cellules superficielles qui meurent sont constamment remplacées par les cellules des couches sous-jacentes (5).

Les cellules ailées, faisant la transition entre les cellules basales et les cellules superficielles, sont distribuées sur deux ou trois couches de cellules. Leur nom vient de leur morphologie histologique. En effet, ces cellules, de formes irrégulières, possèdent une face antérieure convexe, une face postérieure concave ainsi que de courtes projections (ailes) sur leurs côtés entrant en contact avec les cellules adjacentes (figure 1.4) (2, 5). Les cellules ailées sont donc étroitement connectées entre elles et aux cellules basales par des desmosomes et des jonctions lacunaires (*gap junctions*) (7). Leur cytoplasme est pauvre en organelles (27), mais riche en tonofilaments qui permettent aux cellules de conserver leur forme et participent au maintien de la structure de l'épithélium par leur association aux desmosomes (7).

Finalement, la monocouche de cellules basales contient des cellules cuboïdales ayant un noyau arrondi situé dans la moitié inférieure de la cellule (27). Elles sont plus hautes (18 μm) que larges (10 μm) (figure 1.4) (5). Ces cellules sont les seules à entrer en mitose afin de permettre un renouvellement constant des couches supérieures de l'épithélium. Le cytoplasme des cellules basales est caractérisé par un grand nombre de granules de glycogène qui représentent une réserve énergétique pouvant être utilisée lors de situations de stress tels que la cicatrisation cornéenne ou le port prolongé hypoxique de lentilles cornéennes (7). Elles contiennent également de nombreux filaments d'actine pouvant jouer un rôle important pour la motilité de ces cellules lors de la cicatrisation (30).

Les parois latérales des cellules basales sont sinueuses, formant de nombreuses invaginations, s'intriquant avec les formations correspondantes des cellules voisines (27). Cela permet donc aux cellules basales d'être étroitement connectées entre elles. La partie inférieure de la membrane cytoplasmique, qui est en contact avec la membrane basilaire sous-jacente, contient de nombreux hémidesmosomes (7). Ces hémidesmosomes forment des ponts entre les filaments intermédiaires du cytosquelette et les constituants de la membrane basilaire permettant ainsi aux cellules basales d'adhérer fortement à la membrane basilaire (figure 1.5).

1.1.3.3.2 La membrane basilaire

L'épithélium cornéen repose sur une mince membrane basilaire, d'environ 75 à 100 nm d'épaisseur qui est située entre les cellules basales et la membrane de Bowman (5). Les principaux constituants de la membrane basilaire sont le collagène de type IV et VII, la laminine, l'héparane sulfate ainsi qu'une petite quantité de fibronectine et de fibrine (7, 31-34). Cette jonction épithélium-stroma joue plusieurs rôles (35, 36). Elle permet tout d'abord de séparer l'épithélium du stroma et d'agir comme une barrière sélective contrôlant les échanges moléculaires entre ces deux compartiments. Elle sert également de support pour l'adhésion des cellules épithéliales, ainsi que pour l'organisation et la différenciation de l'épithélium. Les différents constituants de la membrane basilaire sont élaborés à la fois par les cellules épithéliales de la couche basale et par les kératocytes du stroma (37).

Sur une coupe histologique, elle se présente comme une fine couche située immédiatement sous les cellules basales de l'épithélium cornéen. Cette membrane est cependant difficile à identifier en histologie car elle est juxtaposée à la membrane de Bowman qui est proéminente (27). Cependant, chez certains mammifères tels que le rat, où la membrane de Bowman est absente, la membrane basilaire est particulièrement facile à identifier (20).

La membrane basilaire ou jonction épithélium-stroma est composée principalement de deux lames: la lame basale et la lame réticulaire. Au microscope électronique, la lame basale est constituée de la superposition de deux zones; une couche superficielle claire appelée la *lamina lucida* et une plus profonde et dense, la *lamina densa* (27). La *lamina lucida*, qui est directement en contact avec l'épithélium, est formée de glycoprotéines et de protéoglycanes (38). Des laminines, qui proviennent de la *lamina densa*, et différentes intégrines, localisées sous les hémidesmosomes, mais également entre ceux-ci y sont principalement retrouvées. C'est au niveau de la *lamina lucida* que se fait la séparation épithélium-stroma lors de traitements chimiques (EDTA) ou enzymatiques (trypsine) (39). La *lamina densa*, quant à elle, se compose majoritairement de collagène de type IV, qui est responsable du support et de la flexibilité de la membrane basilaire (40), mais aussi de laminines, de nidogène et de protéoglycanes telles que le sulfate de chondroïtine et le sulfate d'héparane qui participent également à ancrer les cellules aux fibres de la matrice extracellulaire (38, 41). Finalement, la lame réticulaire, qui est en continuité avec la membrane de Bowman, consiste en une matrice extracellulaire dense composée de filaments de collagène de type I ainsi que des fibrilles d'ancrage de collagène de type VII (42, 43) qui, liées à la laminine 5 ou au collagène IV (44), se projettent dans la membrane de Bowman (7). Ces fibrilles d'ancrage s'y attachent grâce à l'entrecroisement avec des fibres de collagène et à des plaques d'ancrage (42, 45), elles même constituées, en plus de la laminine 5, du collagène de type IV et VII (44).

1.1.3.3.2.1 Hémidesmosomes

Tout le long de la membrane basilaire, des formations denses correspondant aux hémidesmosomes sont situées sur la membrane cellulaire des cellules basales (figure 1.5). Elles constituent un lien solide entre la membrane basilaire et l'épithélium (27). En effet, ces hémidesmosomes servent à fixer les cellules à la membrane basilaire sous-jacente. Un hémidesmosome ancre les filaments de kératines de la cellule à la lame basale (41, 46, 47). Il est composé d'une plaque dense (BP240 et plectine), qui forme un site d'adhésion pour

les kératines, et de protéines transmembranaires (BP180 et intégrine $\alpha_6\beta_4$) qui s'organisent en filaments d'ancrage et forment une plaque sous-basale dans la *lamina lucida* (48). Ces dernières protéines transmembranaires, qui relient la plaque dense à la *lamina lucida*, agissent donc à titre de récepteurs cellulaires en établissant des liens entre le cytoplasme et la matrice extracellulaire (49, 50). Par la suite, les molécules de la membrane basilaire terminent ce complexe d'adhésion. En effet, la laminine 5 (nommée aussi kalinine ou épiligrine), retrouvée dans la *lamina densa*, se projette dans les fins filaments d'ancrage de la *lamina lucida* où elle se lie à l'intégrine $\alpha_6\beta_4$ (51). Cela permet au cytosquelette et à la membrane cytoplasmique d'être retenus par des filaments d'ancrage traversant la *lamina lucida* et s'insérant dans la *lamina densa*. Finalement, des fibrilles d'ancrage de collagène VII (18, 42, 43), liées à la laminine 5 ou au collagène IV (44), quittent la *lamina densa* et s'enracinent à la lame réticulaire en entrecroisant des filaments de collagène I et en s'attachant à des plaques d'ancrage (43). Ce sont ces interactions entre les kératines, la plaque dense, les filaments d'ancrage (intégrine $\alpha_6\beta_4$), la laminine 5 de la *lamina densa*, le collagène VII des fibrilles d'ancrage qui procurent la fonction d'adhésion reconnue aux hémidesmosomes.

Les cellules basales ne sont cependant pas seulement fixées à la membrane basilaire par les hémidesmosomes. En effet, entre les hémidesmosomes, d'autres complexes d'adhésion focale assurent l'adhésion des cellules basales à la membrane basilaire. À ces endroits, se retrouve parfois les intégrines $\alpha_2\beta_1$ et $\alpha_3\beta_1$ qui sont reliées d'un côté aux microfilaments d'actine et de l'autre au collagène IV et à la laminine 5 (49, 53, 54).

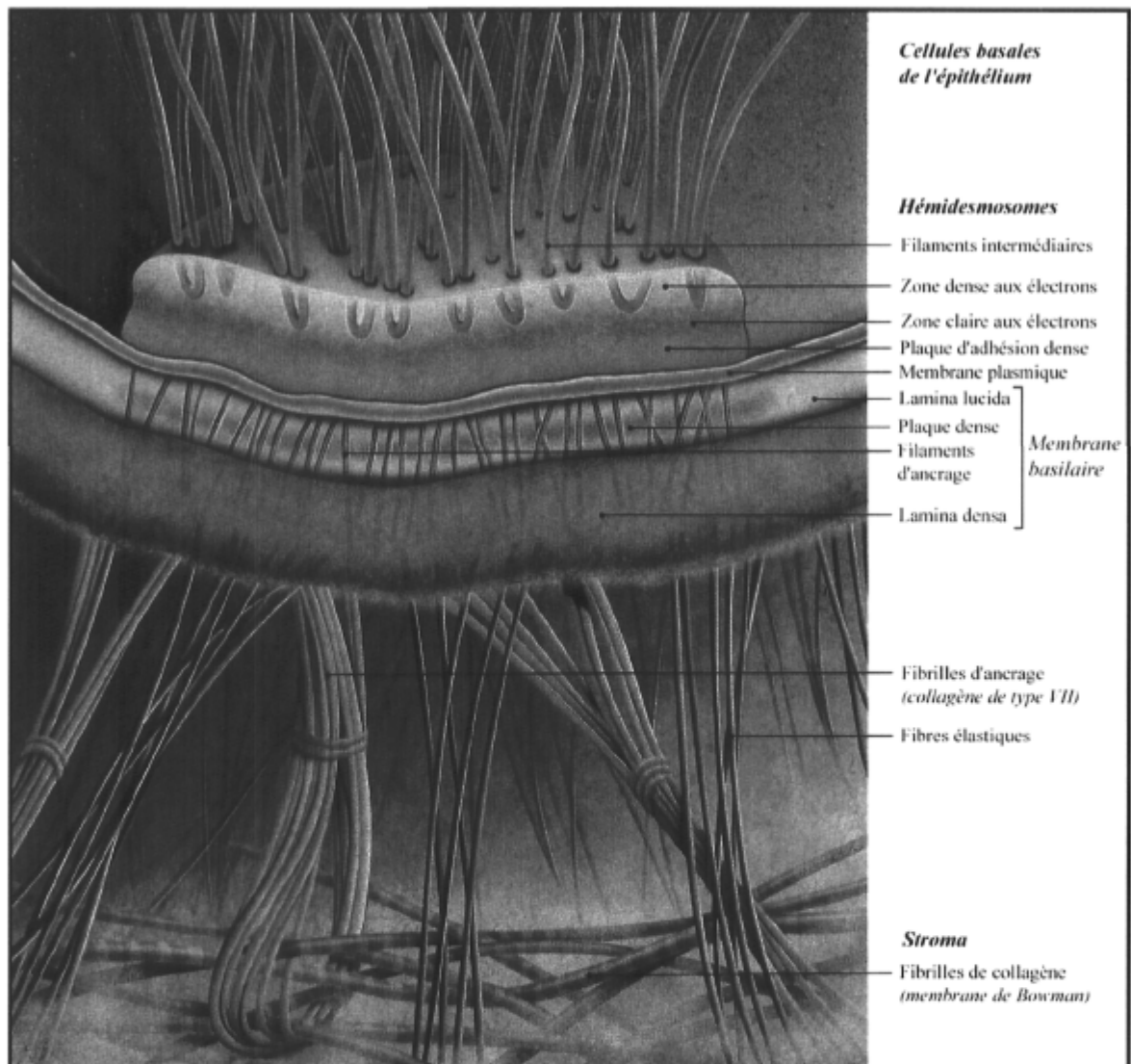


FIGURE 1.5 Adhésion des cellules épithéliales à la membrane basilaire via les hémidesmosomes.

Les hémidesmosomes sont des jonctions spécialisées permettant aux cellules basales d'adhérer fortement à la membrane basilaire. Du côté intracellulaire, des filaments intermédiaires viennent s'y attacher. Du côté extracellulaire, les fibrilles d'ancrage permettent l'adhésion aux fibres de collagène du stroma. (Adapté de Geras, 1990 (52)).

1.1.3.3.3 La membrane de Bowman

La membrane de Bowman est une couche acellulaire qui est composée essentiellement de très nombreuses fibrilles de collagène non orientées qui s'entremêlent en tout sens (27). Elle se situe entre la membrane basilaire de l'épithélium et la partie antérieure du stroma cornéen (figure 1.2). La membrane de Bowman est présente chez les primates et les humains ainsi que chez certains oiseaux et reptiles (5, 7). Son épaisseur varie de 8 à 12 μm (7). En périphérie de la cornée, la membrane de Bowman devient plus mince, moins dense, puis disparaît au niveau du limbe (5). Elle présente aussi de nombreux pores permettant le passage des terminaisons nerveuses jusqu'à l'épithélium (20).

Cette membrane est constituée principalement de collagènes de type I, III, V, VI et XII (55-59). Le collagène I est le principal constituant de la membrane de Bowman. Du collagène IV et VII, provenant de la membrane basilaire, se retrouve également sur une épaisseur de 2 μm du côté antérieur (18, 43). Les fibrilles de collagène qui entrent dans la composition de la membrane de Bowman sont plus petites et moins enchevêtrées que celles retrouvées au niveau du stroma. En effet, le diamètre de ces fibrilles équivaut à environ 70% de celui des fibrilles du stroma (7). En périphérie, l'arrangement des fibrilles est plus lâche et le collagène s'y mêle graduellement avec celui de la conjonctive. Comparativement à la face antérieure de la membrane qui se termine clairement à la membrane basilaire, la face postérieure de la membrane de Bowman est très floue et se confond avec les fibrilles du stroma antérieur. En effet, des fibrilles de collagène provenant du stroma s'y insèrent et attachent solidement la membrane de Bowman (5, 7, 60). Cette dernière ne peut effectivement pas être détachée du stroma aussi facilement que la membrane de Descemet.

Concernant le rôle de cette membrane, plusieurs hypothèses ont été formulées au cours des dernières années. Cependant, certaines données semblent démontrer que le rôle de cette membrane, s'il y en a un, n'est pas un rôle essentiel. Tout d'abord, cette partie de la

cornée n'est pas présente chez toutes les espèces (5, 7). De plus, elle ne se régénère pas après la naissance même à la suite d'une blessure. Elle est simplement remplacée par un épaissement de l'épithélium ou par du tissu cicatriciel (25). Finalement, sa destruction partielle lors d'une kératectomie photoréfractive (PRK) ne semble pas induire de complications (61).

1.1.3.3.4 Le stroma

Situé entre la membrane de Bowman et la membrane de Descemet, le stroma cornéen, qui mesure environ 500 μm , constitue près de 90% de l'épaisseur totale de la cornée (figure 1.2) (5). Il s'agit d'un tissu compact principalement composé de fibrilles de collagène (type I, III, V et VI) (56, 62, 63), de substance fondamentale ainsi que de cellules appelées kératecytes. Sa fonction première est de servir de structure rigide et transparente permettant une bonne vision. Le stroma est également essentiel afin que la cornée soit en mesure de résister à la pression oculaire interne (7, 64). C'est la très grande symétrie de l'organisation du collagène qui donne au stroma sa transparence (31). En effet, comme il est possible de le constater à la figure 1.6, le collagène du stroma possède un niveau d'organisation tridimensionnel fort complexe afin que la lumière soit transmise et qu'elle ne soit pas diffusée ou réfléchi.

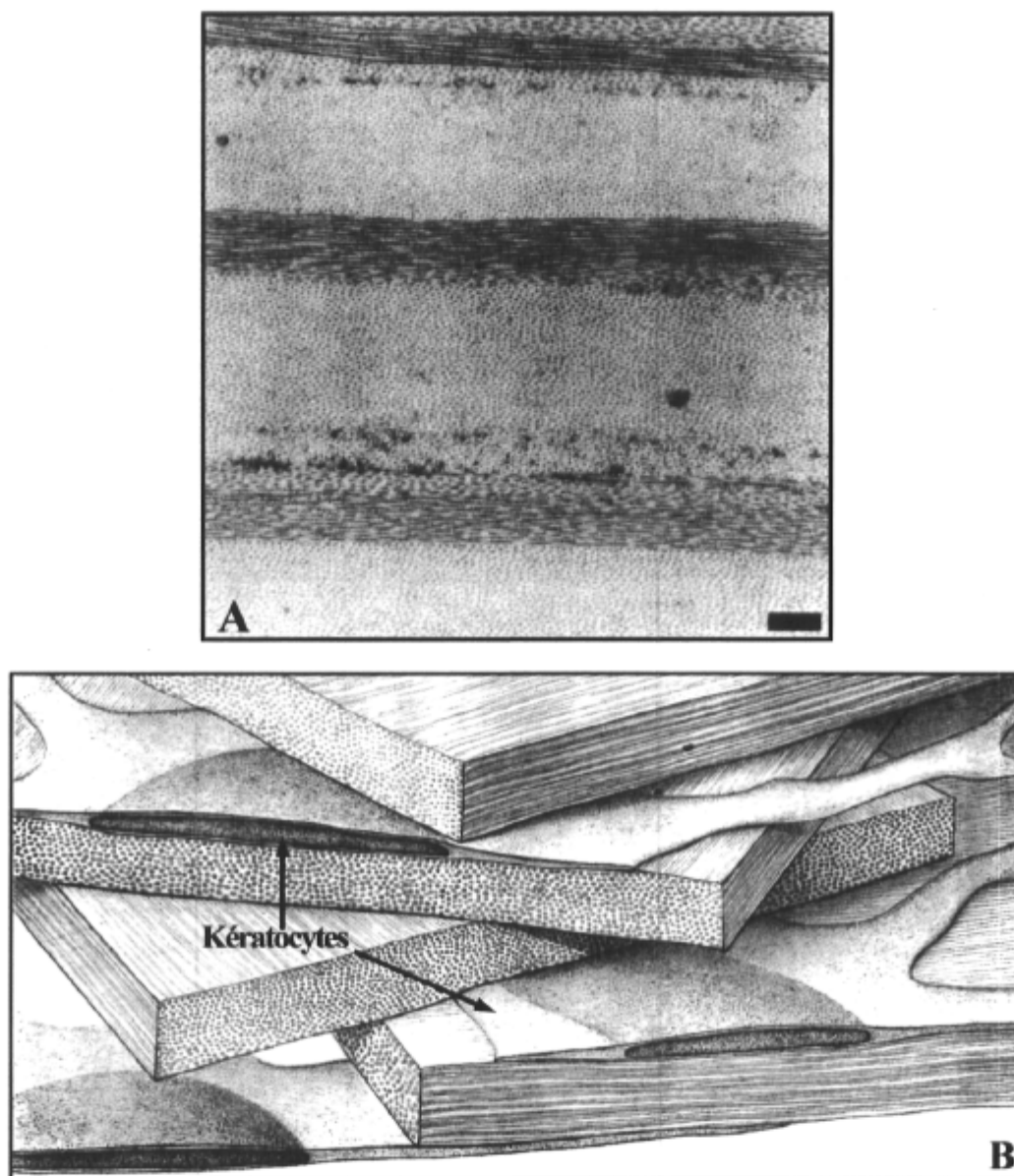


FIGURE 1.6 Organisation des fibrilles de collagène.

Le collagène du stroma possède un niveau d'organisation tridimensionnelle fort complexe. Cette organisation spécifique est contrôlée par l'interaction des fibrilles de collagène avec certaines protéines de la matrice extracellulaire. A) Microscopie électronique du stroma montrant l'organisation en lamelles des fibrilles de collagène. Les couches foncées correspondent aux fibrilles de collagène parallèles au plan de coupe. Les couches claires, parsemées de points, sont des fibres de collagène vues de face. (Tiré de Klyce, 1998 (7)) B) Schéma du stroma montrant l'organisation des lamelles de collagène et des kératocytes (Tiré de Hogan, 1971 (5)).

Le stroma est composé d'environ 300 lamelles superposées qui sont parallèles à la surface de la cornée et qui couvrent toute la largeur de la cornée. Elles adhèrent légèrement les unes aux autres, donnant ainsi une certaine résistance au stroma (65). Ces lamelles, d'une épaisseur d'environ 2 μm , sont constituées majoritairement de faisceaux de fibrilles de collagène (type I) ayant un diamètre très uniforme d'environ 35 nm. Les fibrilles présentes dans une lamelle sont toutes orientées dans le même axe parallèle, mais l'orientation des fibrilles est différente d'une lamelle à l'autre (figure 1.6) (66). En effet, les lamelles adjacentes sont disposées à un angle d'environ 60° par rapport aux autres, formant un réseau périodique (67).

Les fibrilles de collagène parallèles d'une lamelle sont incluses dans une matrice extracellulaire qui assure leur cohésion et les maintient à égale distance les unes des autres. Un espace interfibrillaire constant d'environ 60 nm entre les fibrilles de collagène du stroma permet donc à la cornée d'être transparente (7). En effet, selon la physique optique, la cornée est transparente lorsque la distance interfibrillaire (60 nm) est plus petite que la moitié de la longueur d'onde de la lumière visible (400-700 nm) (68, 69). De plus, le degré d'hydratation de cette matrice extracellulaire est important puisqu'il participe au maintien de cet écart constant. Lors d'œdème, cette régularité de l'espacement, tout comme la transparence, est perdue.

Cette organisation spécifique est contrôlée par des interactions avec certaines protéines de la matrice (70). En effet, la matrice extracellulaire du stroma est composée de différents constituants dont des mucoprotéines et des glycoprotéines telles que les protéoglycanes (71). Ce sont des molécules hybrides composées d'une protéine à laquelle sont attachées un ou plusieurs glycosaminoglycanes, i.e. de longues chaînes de disaccharides sulfates répétés (72). Les types les plus communs retrouvés dans la cornée sont le sulfate de kératane ainsi que les sulfates de dermatane et de chondroïtine (7). Ces molécules remplissent donc tout l'espace non occupé par les fibrilles de collagène et les kératocytes. Elles forment un revêtement pour chaque fibrille et sont directement

responsables de l'espacement précis entre celles-ci (5, 19, 73). En périphérie, les lamelles et leurs fibrilles ne sont pas aussi régulièrement orientées et leur arrangement se rapproche graduellement de celui observé au niveau de la sclère (5). En effet, la sclère contient des fibrilles de collagène de plus grand diamètre et l'espacement régulier entre celles-ci est perdu.

Les cellules du stroma, les kératocytes (ou corpuscules cornéens dans la vieille littérature) (2), se situent entre les lamelles, parallèlement aux amas de fibrilles de collagène. Elles sont peu nombreuses dans la cornée normale. Seulement deux à trois pour cent de son volume est occupé par ces dernières (2). Ce sont des cellules aplaties possédant de très longs prolongements qui s'étendent entre les lamelles et rejoignent les prolongements identiques des cellules voisines (74, 75). La formation de ce réseau d'extensions cytoplasmiques serait très important pour le contrôle des fonctions cellulaires (76). Leur principal rôle est de maintenir constante la quantité de fibrilles de collagène ainsi que de synthétiser la majeure partie des protéines composant la matrice extracellulaire (77). Cependant, les kératocytes sont normalement quiescents (cycle cellulaire extrêmement lent) et synthétisent le collagène à un taux très lent, se calculant même en terme d'années (2, 78). Par contre, lorsqu'une blessure se produit au niveau du stroma, les kératocytes subissent une transformation cellulaire menant à un changement phénotypique (79).

Les kératocytes sont alors activés en fibroblastes qui sont en mesure de synthétiser et de remodeler une nouvelle matrice extracellulaire. Cependant, les fibroblastes ne sont pas en mesure de reproduire l'arrangement original des fibrilles de collagène. En effet, lors de la guérison d'une plaie, le diamètre des fibrilles de collagène augmente, devenant presque similaire à celles du collagène de la sclérotique (5). De plus, les fibroblastes peuvent à leur tour se différencier en myofibroblastes. Ces derniers sont nécessaires afin de permettre la contraction de la plaie et sont caractérisés par l'expression de l' α -actine du muscle lisse (80-83). Les myofibroblastes sont également responsables de la production de plusieurs facteurs de croissance, tels que le facteur de croissance des kératinocytes (KGF)

et le facteur de croissance des hépatocytes (HGF), jouant un rôle important dans le contrôle de processus cellulaire comme la prolifération, la migration et la différenciation (84-87). Cependant, bien que les myofibroblastes puissent entrer en apoptose ou revenir à l'état de fibroblastes, les fibroblastes ne peuvent jamais revenir à leur état de kératocyte normal (79, 88). Tous ces facteurs contribuent donc à la formation de cicatrices opaques réduisant l'acuité visuelle et qui sont fréquentes dans des cas de blessures au stroma (79).

1.1.3.3.5 La membrane de Descemet

Sous le stroma se trouve une seconde couche acellulaire, la membrane de Descemet (figure 1.2) qui contribue à maintenir l'intégrité de l'endothélium cornéen (89). Elle est considérée comme étant la membrane basilaire des cellules endothéliales puisqu'elle est sécrétée par ces dernières mais aucun hémidesmosome ou autre jonction d'adhésion n'est présent entre la membrane et les cellules (2, 25). À la naissance, son épaisseur est d'environ 3 à 4 μm et augmente jusqu'à approximativement 12 μm chez l'adulte (89). La membrane de Descemet semble être séparée en deux zones distinctes. La première zone, en contact avec le stroma, est composée de fibrilles de collagène extrêmement fines présentant une distribution uniforme et se rejoignant entre elles au niveau de nodules (5). C'est au niveau de cette zone que des fibrilles de collagène provenant du stroma semblent s'y infiltrer légèrement pour servir d'attaches (90). Cependant, contrairement à la membrane de Bowman, elle peut facilement se détacher du stroma adjacent puisqu'elle n'y est pas fortement attachée (5). La seconde zone, sur la face postérieure, possède une organisation aléatoire des fibrilles de collagène (7). Tout comme la membrane de Bowman, la membrane de Descemet se termine au limbe.

Au moins cinq types de collagène (III, IV, V, VII et VIII) entrent dans la composition de la membrane de Descemet (55, 56). Cependant, le collagène de type VIII semblerait être le type de collagène majoritairement retrouvé dans la zone antérieure (91).

L'espace entre les fibrilles de collagène serait rempli de protéines, telles que la fibronectine et la laminine, qui participent également à l'adhésion de la membrane de Descemet au stroma et aux cellules endothéliales (2, 7, 55, 92-96).

1.1.3.3.6 L'endothélium

Finalement, la face postérieure de la cornée, qui est en contact avec l'humeur aqueuse, est constituée de l'endothélium (figure 1.2). Il s'agit d'une monocouche de cellules aplaties et hexagonales ayant une épaisseur d'environ 5 à 6 μm (figure 1.7) (5). Puisqu'il ne s'agit pas d'un véritable « endothélium », le nom mésothélium a été proposé pour mieux la définir. En effet, les cellules de l'endothélium cornéen ont davantage une fonction similaire aux populations de cellules qui tapissent habituellement les cavités internes de l'organisme (25, 27). Les cellules endothéliales cornéennes ne présentent pas de desmosomes. Elles sont cependant munies de plusieurs invaginations qui augmentent leur surface de contact et leur permettent de s'attacher les unes aux autres (7).

Ces cellules, en plus d'être impliquées dans la synthèse de la membrane de Descemet, jouent un rôle actif dans le transport des nutriments de l'humeur aqueuse vers la cornée (4). Elles sont également dotées de pompes à sodium/potassium (Na^+/K^+) actives qui préservent la transparence en rejetant des ions bicarbonate et sodium dans l'humeur aqueuse. Ce système de transport crée un gradient qui sort l'eau du stroma par osmose (7). Le pompage de l'eau hors de la cornée provoque donc une légère hypohydratation nécessaire au maintien de la transparence. En effet, les cellules endothéliales permettent de préserver une « déshydratation relative » constante essentielle pour maintenir régulière, la distance entre les fibrilles de collagène (27). En absence d'endothélium, l'eau présente dans l'humeur aqueuse s'infiltrerait dans la cornée provoquant un œdème du stroma qui sépare les fibrilles de collagène. Ceci compromet alors la bonne vision en augmentant la diffusion lumineuse dans la cornée.

Plusieurs désordres oculaires tels que la dystrophie de Fuchs résultent en un oedème du stroma à la suite d'une diminution de la densité des cellules endothéliales à 400-700 cellules/mm² (7). En effet, puisque les divisions mitotiques se font extrêmement rares chez l'adulte (5), la perte de cellules endothéliales (à la suite d'un traumatisme, d'une maladie ou tout simplement par attrition due au vieillissement) est compensée par l'augmentation de la taille, l'étalement ainsi que l'amincissement des cellules adjacentes (25). Cela cause donc une diminution progressive de la densité cellulaire avec l'âge, qui passe habituellement de 3500-4000 cellules/mm² à la naissance à 1400-2500 cellules/mm² chez l'adulte (7). Bien que ces cellules ne soient pas en mesure de se diviser *in vivo*, de récentes études suggèrent que des cellules souches pour l'endothélium pourraient être localisées dans la région du limbe (97-100).

Lorsqu'elles sont cultivées *in vitro*, les cellules endothéliales perdent leur aspect morphologique pavimenteux qui permettait de les différencier des kératocytes (101, 102). Récemment, un anticorps spécifique aux cellules endothéliales de la cornée a été développé pour permettre l'identification de ces cellules en culture (103). Il est assez difficile de cultiver les cellules endothéliales *in vitro* puisqu'elles sont peu actives au niveau de la division cellulaire dans la cornée. Il est cependant possible d'induire la prolifération des cellules endothéliales en culture grâce à des facteurs de croissance comme l'EGF, le FGF ainsi que le sulfate de chondroïtine (102, 104). Des milieux riches en sérum et des boîtes de Pétri de culture enduits de collagènes de type IV, de fibronectine ou de laminine ont également été utilisés (102, 105).

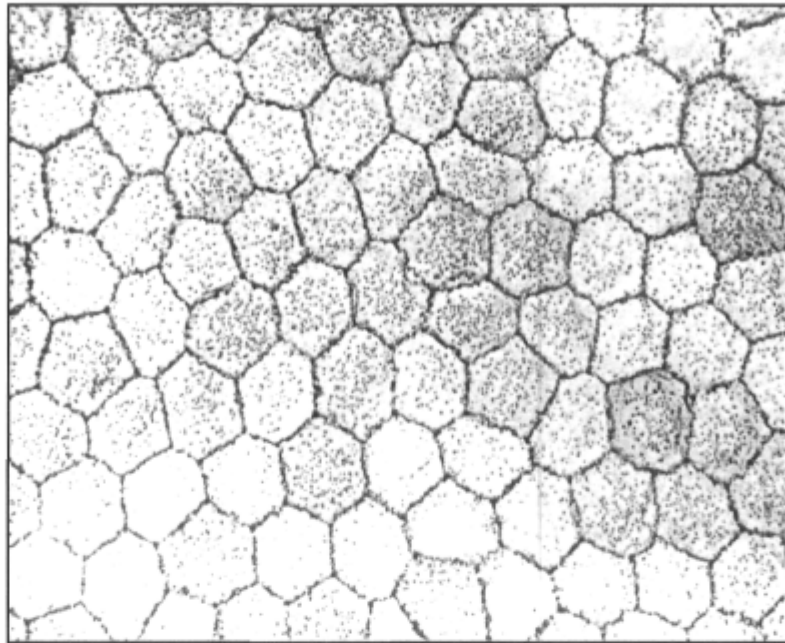


FIGURE 1.7 *Cellules de l'endothélium humain.*

La face postérieure de la cornée, qui est en contact avec l'humeur aqueuse, est constituée de l'endothélium. Il s'agit d'une monocouche de cellules aplaties et hexagonales permettant de préserver une hydratation constante de la cornée. Ceci est essentiel pour maintenir une distance régulière entre les fibrilles de collagène. (Tiré de Hogan, 1971 (5)).

1.1.4 Le limbe et les cellules souches

1.1.4.1 Le limbe

Le limbe est situé au niveau de la zone de transition entre la cornée transparente et la conjonctive opaque (figure 1.1). Il apparaît comme un anneau grisâtre semi-transparent de 1,5 mm de large entourant la cornée. En histologie, différents repères permettent d'identifier cette région (figure 1.8). Tout d'abord, la séparation entre la cornée et le limbe est définie par la terminaison des membranes de Bowman et de Descemet (2). De plus, l'épithélium du limbe est moins bien organisé et plus épais que celui de la cornée centrale.

En effet, comparativement à la cornée centrale, il est constitué d'environ dix à douze couches de cellules, dont les cellules basales plus petites et plus nombreuses, très rapprochées les unes des autres et possédant un cytoplasme peu abondant (106). Ces dernières ressemblent beaucoup aux cellules souches observées dans d'autres tissus (31). Chez les individus de couleur, les cellules basales du limbe contiennent également des granules de mélanine. Celles-ci les protégeraient des dommages potentiels causés par les rayons ultraviolets (107). L'épithélium limbique contient également des mélanocytes, des cellules de Langerhans ainsi qu'une grande quantité de vaisseaux sanguins situés dans des structures appelées palissades de Vogt (108). Contrairement à la cornée centrale, le limbe est un tissu bien vascularisé. Cette région fournit donc, grâce à ses capillaires, les éléments nutritifs nécessaires au bon fonctionnement de la cornée, en plus d'offrir des interactions avec les cytokines dérivées de la circulation sanguine (109). Ces substances diffusent très lentement des capillaires vers le stroma et l'épithélium cornéen (106).

Le stroma, au niveau du limbe, perd la régularité et l'arrangement caractéristique des lamelles de la cornée centrale et forme une zone de transition qui graduellement devient aussi irrégulière que la sclérotique. En effet, les lamelles de collagène se désorganisent, deviennent moins régulières et plus séparées. De plus, les fibrilles de collagène, si régulières dans leur diamètre et si ordonnées dans la cornée ont, au niveau du limbe, des diamètres variables. Certaines sont semblables aux fibrilles de la cornée centrale, d'autres rappellent celles de la sclérotique (27). La couleur grisâtre du limbe est causée par la transition de la cornée transparente à la sclérotique opaque (106). Une transition abrupte de la membrane basilaire est également remarquée; elle est épaisse au niveau de l'épithélium cornéen alors qu'elle est fine au niveau de l'épithélium conjonctival (25). De plus, le limbe ne contient pas de cellules à gobelet contrairement à la conjonctive (106).

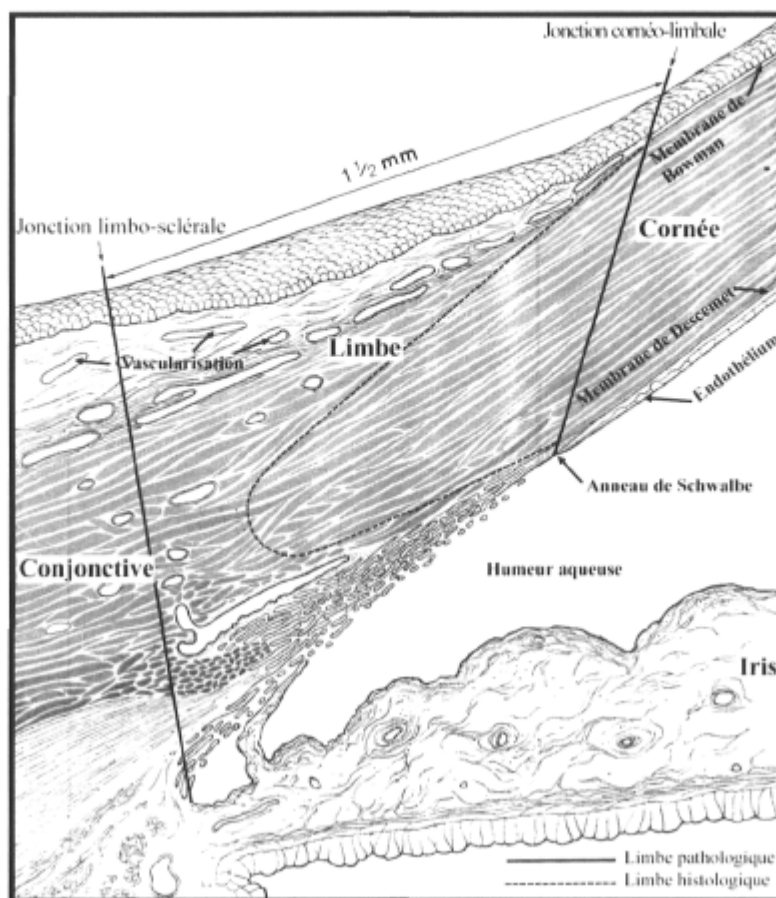


FIGURE 1.8 Histologie du limbe.

Le limbe est situé au niveau de la zone de transition entre la cornée transparente et la conjonctive opaque. En histologie, différents repères permettent d'identifier cette région. L'épithélium du limbe possède environ 10 à 12 couches de cellules. Les vaisseaux sanguins commencent également à apparaître dans le stroma sous-jacent. La jonction cornéo-limbique est définie par la terminaison des membranes de Bowman et de Descemet, tandis que le point de fixation de l'iris délimite la jonction limbo-sclérale. (Gracieuseté de A. Deschambeault, modifié de Hogan, 1971 (106)).

Finalement, le limbe est une région fonctionnellement très importante car il renferme, au niveau de sa couche basale, les cellules souches de l'épithélium cornéen (figure 1.10). Ces dernières sont essentielles au maintien de l'homéostasie de l'épithélium (110). De plus, les cellules souches adultes du limbe sont aussi fortement impliquées lors de la guérison d'une plaie cornéenne puisqu'elles fournissent les cellules nécessaires à la prolifération, la migration ainsi qu'à la différenciation de l'épithélium en régénération.

Plusieurs caractéristiques propres au limbe permettraient la conservation des cellules souches. La présence de vaisseaux sanguins et l'environnement protecteur des palissades de Vogt seraient des éléments importants pour le maintien de ces cellules (111) (112). La composition unique de la membrane basilaire du limbe jouerait également un rôle important en augmentant l'adhésion cellulaire (58, 110, 113). Toutes ces propriétés contribuent à l'idée d'une niche microenvironnementale située au limbe pour maintenir la population des cellules souches de la cornée. Cette notion de niche microenvironnementale fut proposée par Schofield et al. afin d'expliquer la présence des cellules souches dans les tissus adultes tout au long de la vie (114). Selon cette hypothèse, ces cellules seraient maintenues dans un état indifférencié grâce à un environnement particulier prévenant leur différenciation cellulaire.

1.1.4.2 Les cellules souches

Les cellules souches sont présentes dans tous les tissus se régénérant d'une façon constante tout au long de la vie, tels que la peau et la cornée. Ces deux tissus sont caractérisés par un renouvellement rapide et permanent des cellules de leur épithélium. En effet, la cornée, qui subit un processus de desquamation continu, doit constamment se renouveler afin de compenser la perte cellulaire. Ainsi, à tous les 10 jours, les cellules de la surface de la cornée se détachent par frottement et sont remplacées par de nouvelles cellules provenant de la couche basale (2). Les cellules différenciées sont donc continuellement remplacées grâce à la division d'une population cellulaire formée de cellules souches (115). Une cellule souche est définie comme étant une cellule indifférenciée, multipotente, généralement quiescente ayant un grand potentiel de prolifération. Cette cellule possède la capacité de se diviser de manière asymétrique (figure 1.9). Elle est donc capable d'une part de se reproduire afin de maintenir un réservoir permanent de cellules souches et d'autre part de donner naissance à des cellules différenciées ayant un potentiel de prolifération limité, les cellules amplificatrices transitoires (116). Comme leur nom l'indique, ces cellules vont

proliférer pendant quelques divisions cellulaires avant d'entrer dans le processus de différenciation terminale dont l'étape finale est la desquamation (111, 117).

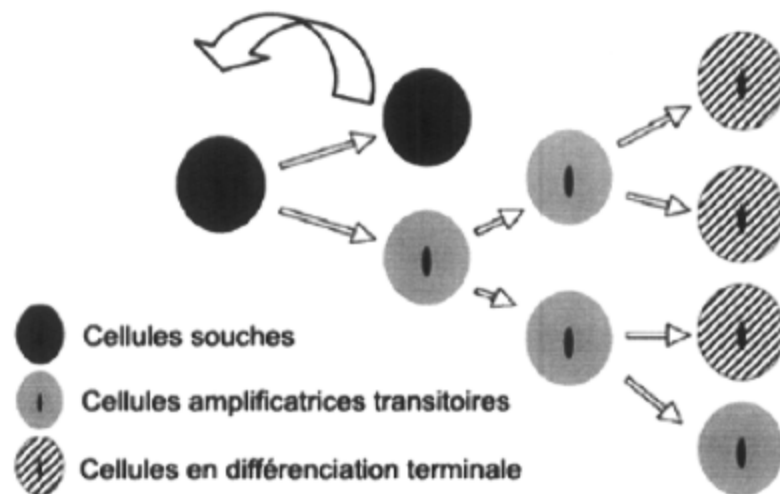


FIGURE 1.9 *Division asymétrique des cellules souches.*

La division asymétrique d'une cellule souche produit une cellule souche (représentée en noir) qui demeure indifférenciée et retourne dans sa niche et une cellule amplificatrice transitoire (représentée en gris). Ces dernières vont alors se diviser pour donner naissance aux cellules en différenciation terminale (représentées avec les lignes diagonales). (Adapté de Daniels, 2001 (109)).

Les cellules souches, qui représentent habituellement un très faible pourcentage de la population cellulaire totale (0,5 à 10%) (118, 119), possèdent plusieurs caractéristiques qui leur sont propres. En plus de leur capacité d'auto-renouvellement, ces cellules ont un très grand potentiel de prolifération ainsi qu'un cycle cellulaire lent et une faible activité mitotique (111). En effet, ces cellules sont habituellement arrêtées dans la phase G_0 du cycle cellulaire dans l'attente de stimuli leur indiquant de se diviser. Ceci leur permettrait de réparer les bris sur leur ADN s'il y en avait (117). De plus, les cellules souches ont

également une espérance de vie illimitée, au moins équivalente à la durée de la vie de l'organisme où elle se trouve (110).

1.1.4.3 Localisation et marqueurs des cellules souches

Contrairement aux cellules souches hématopoïétiques, il n'existe à ce jour, aucun marqueur spécifique des cellules souches limbiques. Les marqueurs utilisés pour l'identification des cellules souches cornéennes sont des marqueurs indirects. En effet, leur existence et leur localisation exclusive au niveau du limbe, ont pu être mises en évidence par différents travaux expérimentaux. Tout d'abord, l'étude de la différenciation cellulaire par marquage immuno-histochimique a montré que les cellules épithéliales cornéennes synthétisent des kératines différentes en fonction de leur degré de maturation.

1.1.4.3.1 Les kératines

Les kératines (K) sont des protéines structurales du cytosquelette appartenant à la famille des filaments intermédiaires. Selon leur séquence en acides aminés et leur point isoélectrique, les kératines peuvent être divisées en deux groupes; le type I qui comprend des kératines acides numérotées de 9 à 20 (K9 à K20) et les kératines de type II, neutres-basiques qui sont numérotées de 1 à 8 (K1 à K8) (120). Les filaments de kératines sont le résultat de l'association de polypeptides de kératines de type I et de type II pour former un hétérodimère, puis un hétérotétramère, suivi d'un protofibrille, d'un protofilament et finalement d'un filament de 10 nm (121, 122). Les filaments de kératines s'insèrent au niveau des hémidesmosomes et des desmosomes, ce qui leur permet de former un réseau intercellulaire continu à travers tout l'épithélium. Elles ont donc comme fonction d'ancrer les cellules les unes aux autres ainsi qu'à leur membrane basilaire (123). Les kératines ont aussi comme rôle le maintien de l'intégrité de l'épithélium en conférant aux cellules

épithéliales la résistance contre les chocs mécaniques (124). En effet, il semblerait que chaque paire de kératines confère des propriétés mécaniques spécifiques adaptées aux cellules dans lesquelles elles sont exprimées (125). Elles se retrouvent donc toujours sous forme de paire dans la cellule et, grâce à leur expression variable selon les tissus et les types cellulaires, les kératines sont des marqueurs de choix pour distinguer différentes sous-populations cellulaires. À titre d'exemple, les cellules épithéliales de la couche basale de la peau, moins différenciées, expriment les kératines 5 et 14, alors que les cellules des couches suprabasales, plus différenciées, expriment les kératines 1 et 10 (126). Au niveau de l'épithélium cornéen, les principales kératines retrouvées sont la K3, la K8, la K12, K14, la K18 et la K19 (127). Cependant, seules les kératines 3 et 12, formant un dimère stable (128), sont les plus spécifiques et peuvent servir de marqueur.

Ces deux kératines (K3 et K12), témoins d'un phénotype cornéen différencié, sont retrouvées sur l'ensemble de l'épithélium à l'exception de la couche basale de la région limbique (128, 129). En revanche, la kératine 19, largement exprimée dans l'épithélium cornéen fœtal (130, 131), n'est retrouvée chez l'adulte qu'au niveau de la couche basale limbique qui abrite donc les cellules les plus indifférenciées (111, 132) (figure 1.10). Cette kératine a également été identifiée comme étant un marqueur de cellules souches cutanées (133). L'extrapolation de ces travaux permet de croire que cette kératine pourrait aussi être un marqueur des cellules souches de la cornée (134). D'autres marqueurs ont également été proposés. L' α -énolase (135), l'intégrine $\alpha_9\beta_1$ (136) et le facteur de transcription p63 (137) seraient exprimés préférentiellement dans les cellules souches.

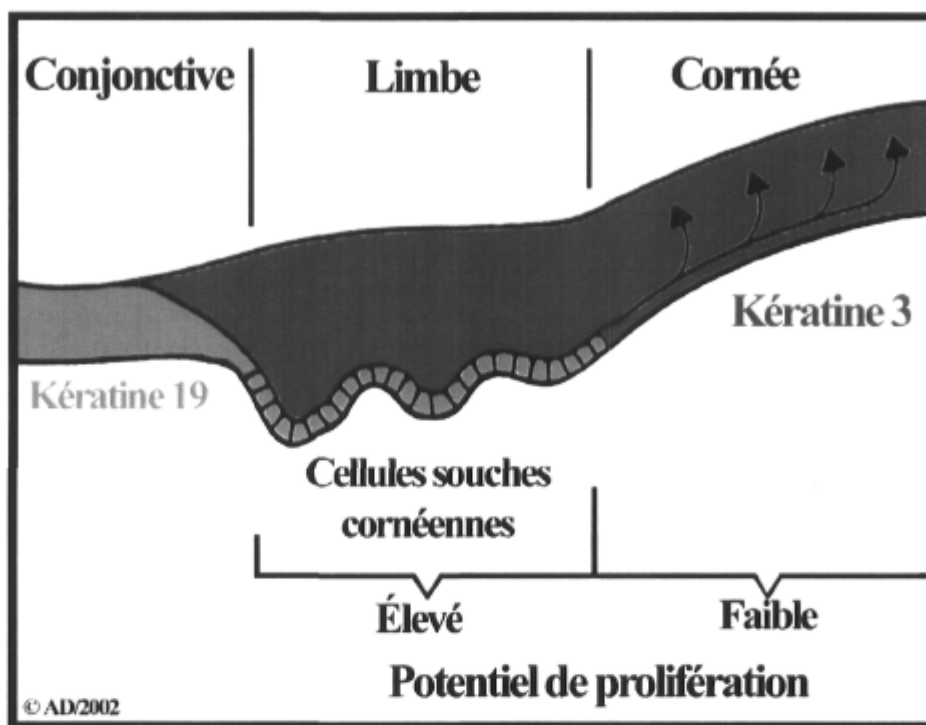


FIGURE 1.10 Marqueur de différenciation des cellules épithéliales de la cornée.

Les cellules basales du limbe expriment la K19 alors qu'elles n'expriment pas la K3. La K3 permet donc d'identifier les cellules différenciées de la cornée alors que la K19 permet d'identifier les cellules souches du limbe. Les cellules épithéliales de la conjonctive expriment également la K19. (Gracieuseté de A. Deschambeault, modifié de Schermer, 1986 (128)).

1.1.4.3.2 Thymidine tritiée et bromodeoxyuridine

Les cellules souches de la cornée ont également pu être identifiées grâce à leur cycle cellulaire lent. En effet, les cellules souches ont la propriété de retenir le marquage à la thymidine tritiée et au BrdU (5-bromodeoxyuridine), un analogue de l'uridine, durant une longue période de temps. Cotsarelis et son équipe ont donc observé, à la suite de l'incorporation péritonéale répétée de thymidine chez la souris, que seules les cellules de la couche basale du limbe retenaient ce marquage (107). L'analyse de leur comportement réplcatif *in vitro* a aussi permis de confirmer la présence de ces cellules au niveau du

limbe. Ainsi, il a été démontré qu'en culture, les cellules du limbe prolifèrent plus rapidement et ont un potentiel de prolifération plus grand que les cellules de la cornée centrale (138-140).

Finalement, ces évidences expérimentales de la localisation des cellules souches cornéennes au niveau du limbe sont confirmées par plusieurs arguments cliniques. La perte du phénotype cornéen épithélial après la destruction du limbe (comme il arrive dans les brûlures chimiques sévères), et sa restitution après une greffe limbique, constituent les arguments cliniques les plus significatifs (141, 142). De plus, tel qu'attendu, les cellules basales du limbe entrent en division pour répondre à la demande en cellules nécessaires au recouvrement de la plaie à la suite d'une blessure de la cornée centrale (107, 117).

1.1.4.4 Différenciation des cellules souches

Comme précédemment mentionné, le renouvellement permanent de la cornée se fait par la division des cellules souches cornéennes qui sont situées uniquement au niveau du limbe (143). À la suite d'une série de stimuli internes, ces cellules se divisent de manière asymétrique et donnent naissance à une cellule fille amplificatrice transitoire. Selon l'hypothèse « x,y,z » proposée par Thoft (144), les cellules amplificatrices transitoires (CAT), douées d'une forte activité mitotique mais n'ayant plus qu'un potentiel de vie limité, ont un mouvement centripète le long de la couche basale (figure 1.11). Elles sont d'autant plus différenciées qu'elles se rapprochent du centre de la cornée. En quittant la couche basale et en se déplaçant vers la surface, elles perdent leur pouvoir mitotique avant de mourir et de desquamer. Les cellules épithéliales qui desquament sont donc continuellement remplacées non seulement par les cellules basales qui se divisent mais aussi par les cellules qui migrent à partir de la périphérie. Ce type de mouvement centripète a été observé par différentes équipes. En effet, initialement observées grâce à la migration de pigments à travers la cornée (112), des spirales concentriques ont pu être observées par

des études retraçant la migration des cellules à l'aide de particules d'encre (118, 145) ainsi que par l'utilisation de vecteurs rétroviraux (146). Cette migration semblerait se faire dans le sens horaire (147).

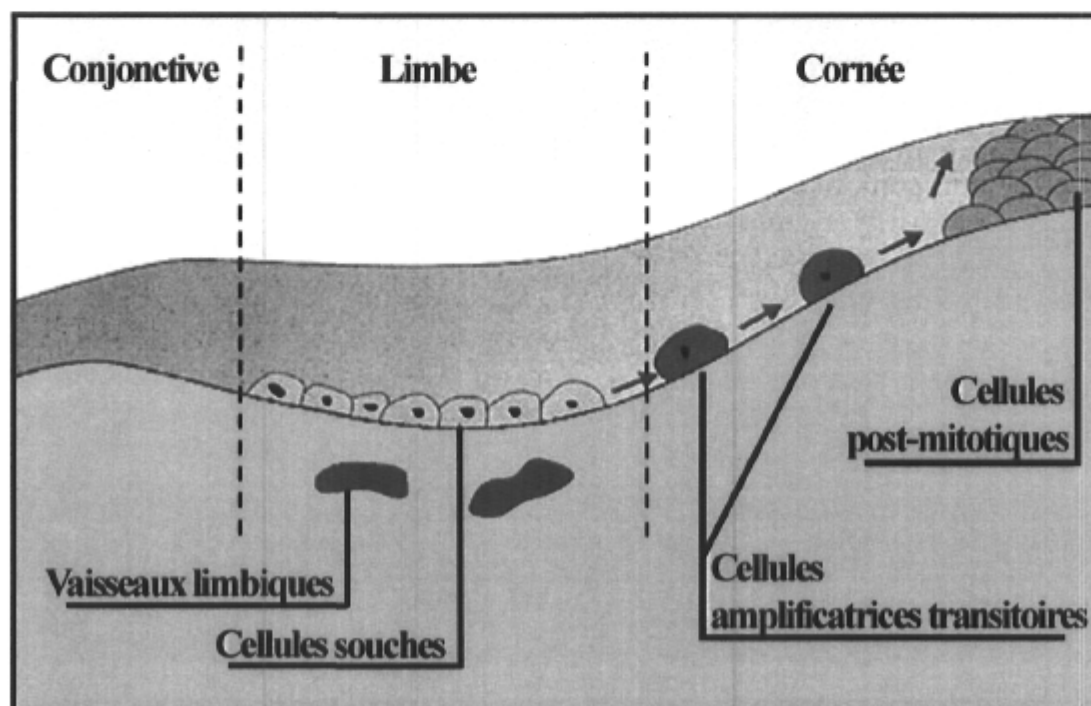


FIGURE 1.11 Localisation et différenciation des cellules souches cornéennes.

Les cellules souches cornéennes, exclusivement localisées au niveau de la couche basale limbique, se différencient en cellules amplificatrices transitoires. Ces cellules dotées d'une forte activité mitotique, ont un mouvement centripète le long de la couche basale, et se différencient en se rapprochant du centre de la cornée. En quittant la couche basale, elles évoluent vers un stade post-mitotique. (Modifié de Hoang-Xuan, 1998 (148)).

Partie 2 : La guérison des plaies cornéennes

1.2.1 Importance de la guérison cornéenne

En raison de sa localisation, la cornée, comme tous les épithélia stratifiés pavimenteux du corps, est constamment susceptible de subir des blessures d'origine mécanique ou chimique. Ces lésions peuvent être superficielles ou profondes. Dans le premier cas, les dommages se limitent uniquement à l'épithélium tandis que l'autre type de lésions implique des dommages au niveau de la membrane basilaire de l'épithélium ainsi qu'au stroma cornéen. Cependant, quel que soit le type de blessure, la qualité de la guérison d'une cornée endommagée est essentielle puisqu'une déficience à ce niveau peut avoir des conséquences graves telles une diminution de la vision ou même la cécité. En effet, une bonne vision est directement dépendante de l'intégrité de la surface épithéliale (régularité et épaisseur uniforme) ainsi que de la disposition des fibres de collagène du stroma. La guérison d'une plaie cornéenne est donc un processus extrêmement important visant à réparer des blessures le plus rapidement possible et ainsi reformer une cornée transparente pouvant continuer de jouer ses rôles de protection et transmission de la lumière.

La guérison d'une plaie cornéenne est un processus complexe pouvant être divisé en plusieurs étapes impliquant principalement trois mécanismes cellulaires qui s'entrecourent et qui sont impliqués dans plusieurs phases: la migration, la prolifération ainsi que l'adhésion. Ces trois mécanismes font donc partie d'un processus continu. Cependant, la contribution de chacun d'eux dépend de la taille, de la profondeur et de la nature de la blessure (31). Dans le cas d'une blessure de faible étendue, la prolifération cellulaire est initiée après la réépithélialisation afin de permettre une restructuration de l'épithélium. Pour les plaies plus étendues, la migration initiale des cellules est rapidement suivie de

l'induction de la prolifération des cellules amplificatrices transitoires qui fournit un nombre suffisant de cellules pour recouvrir la plaie. Ensuite la restratification de l'épithélium se produit (149). De plus, le processus de réparation tissulaire fait intervenir des interactions avec la matrice extracellulaire ainsi qu'entre les différents types cellulaires via la sécrétion de facteurs de croissance.

1.2.2 Étapes de la guérison de l'épithélium cornéen

1.2.2.1 Migration cellulaire

L'épithélium cornéen réagit à une blessure en enclenchant rapidement le processus de migration cellulaire le long de la membrane basilaire afin de réparer la région atteinte et de rétablir la barrière protégeant la cornée des agents infectieux. Bien que les processus qui initient et contrôlent la migration ne soient pas bien compris, diverses observations ont été faites concernant ce mécanisme cellulaire.

1.2.2.1.1 Phase latente

Cette phase correspond au délai entre le moment où la blessure se produit et le début de la migration cellulaire (108). En effet, durant les premières 4 à 6 heures suivant l'incident, aucune diminution appréciable de la taille de la plaie n'est observée. La lésion peut même s'agrandir quelque peu, puisque les cellules en bordure de la plaie se rétractent et meurent par nécrose (31). De plus, durant cette phase, l'activité métabolique ainsi que la synthèse de protéines structurales telles que la vinculine, l'actine, la taline et les intégrines sont augmentées (108). Les filaments d'actines sont réorganisés et polymérisés du côté basal des cellules.

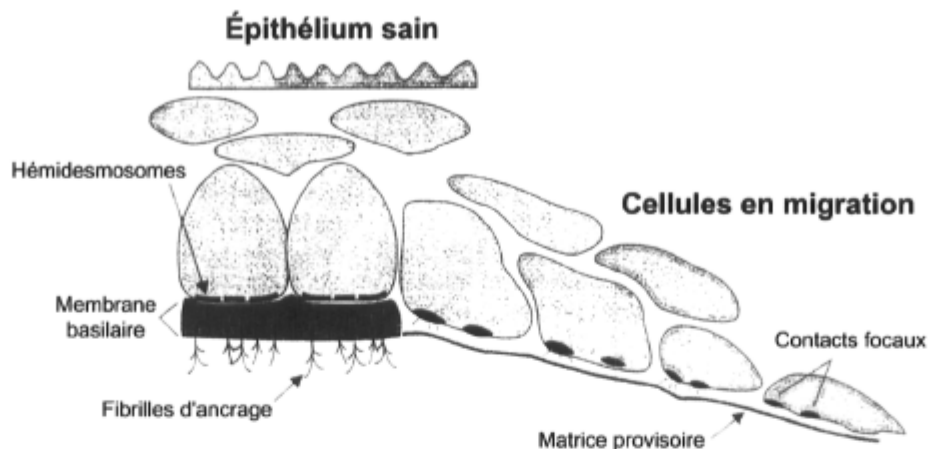


FIGURE 1.12 *Migration et adhésion des cellules épithéliales.*

À la suite d'une blessure, l'épithélium cornéen réagit rapidement en enclenchant le processus de migration cellulaire le long de la membrane basilaire afin de réparer la région atteinte. Les hémidesmosomes sont alors désassemblés pour permettre la migration des cellules. Étant donné l'absence de ceux-ci, les cellules épithéliales doivent utiliser, lors de la migration, un mécanisme d'adhésion temporaire, appelé contact focal. Les contacts focaux fournissent l'adhésion nécessaire des cellules à la matrice provisoire afin qu'elles soient en mesure de migrer. L'épaisseur de l'épithélium est aussi réduite à deux ou trois couches de cellules, diminuant jusqu'à une seule couche au front de migration. (Adapté de Gipson, 1995 (150)).

Les hémidesmosomes sont également désassemblés pour permettre la migration des cellules (151, 152). En effet, des expériences chez le lapin ont démontré que, moins de deux heures après la formation de la plaie, tous les hémidesmosomes reliant les cellules basales à leur membrane basilaire disparaissent sur une distance d'environ 50 à 70 μm à partir des bords de la plaie et diminuent de façon significative sur une distance de 200 μm (153). Ces hémidesmosomes sont remplacés par un autre type de complexe d'adhésion appelé contact focal, qui sera abordé plus en détail dans la section traitant de l'adhésion cellulaire. De plus, la desquamation des cellules superficielles et la perte de l'aspect cuboïdal des cellules basales causent l'amincissement progressif de l'épithélium situé au bord de la plaie (154). L'épaisseur de l'épithélium est alors réduit à deux ou trois couches de cellules, diminuant jusqu'à une seule couche au front de migration (31) (figure 1.12).

Ces cellules aplaties possèdent des filopodes et des lamellipodes leur permettant de se déplacer pour couvrir la lésion. Ce sont des prolongements composés de fibres d'actines polymérisées.

Finalement, des changements se produisent également au niveau des constituants de la matrice extracellulaire. Une accumulation de fibronectine, de fibrinogène et de fibrine est observée sur la surface du site lésé dans les premières huit heures suivant le traumatisme (155, 156) (figure 1.12). De plus, des protéines telles que le lumican, la tenascine ainsi que de la laminine 5 non-coupée sont également synthétisées sur la surface dénudée. Ces constituants servent alors de matrice provisoire supportant et stimulant la migration et l'adhésion des cellules épithéliales (108). Par exemple, il a été démontré récemment que la laminine 5 non-tronquée stimule la migration des cellules épithéliales cornéennes comparativement à la laminine 5 tronquée qui favorise plutôt leur adhésion (157). Ceci est d'autant plus intéressant, puisqu'au niveau des plaies cutanées, la laminine 5 non-tronquée est déposée au site de la blessure et la lamine 5 tronquée est présente au niveau de la membrane basilaire (158). Cependant, de tous ces composants de la matrice extracellulaire, la fibronectine constituerait la principale glycoprotéine ayant un rôle clé dans la migration cellulaire (155, 159, 160). Elle est normalement retrouvée en très faible quantité dans le stroma de la cornée saine. À la suite d'une blessure, les fibroblastes du stroma ainsi que les cellules épithéliales bordant la région lésée sont rapidement stimulés à synthétiser de la fibronectine (161). Cette dernière, comme plusieurs autres protéines de la matrice provisoire, possède un ou plusieurs sites de liaison pour la cellule, mieux connu sous le nom de site RGD. Il s'agit d'un tripeptide constitué d'arginine, de glycine et d'acide aspartique reconnu par les cellules via les intégrines, des molécules trans-membranaires impliquées dans la plupart des interactions cellules-matrice et cellules-cellules (162, 163). La fibronectine participerait ainsi à la signalisation des différents processus cellulaires impliqués lors de la guérison d'une plaie cornéenne. Pour ce qui est de la fibrine, très peu d'études ont évalué son importance durant la migration cellulaire. Récemment, une étude utilisant des souris déficientes en plasminogène et en fibrinogène a démontré que la formation du réseau de fibrine était essentielle à la guérison cornéenne (164). Cependant,

aucune équipe de recherche n'a tenté de rajouter de la fibrine exogène sur une plaie cornéenne afin de vérifier son effet sur la migration cellulaire.

1.2.2.1.2 Phase linéaire migratoire

La phase latente est suivie de la phase linéaire durant laquelle les cellules aplaties se déplacent vers la plaie jusqu'à ce que cette dernière soit complètement recouverte. La migration commence donc environ cinq heures après la formation de la plaie et les cellules migrent à une vitesse constante d'environ 60 à 80 $\mu\text{m}/\text{heure}$ (165). Elle est si rapide, qu'une blessure à l'épithélium de quelques millimètres de diamètre est complètement couverte en moins de deux jours (2). La migration cellulaire nécessite par contre beaucoup d'énergie provenant du glucose présent dans l'humeur aqueuse ainsi que des réserves de glycogène des cellules. D'ailleurs, des études chez le rat ont démontré qu'il y aurait une importante augmentation de l'expression des transporteurs de glucose à la surface des cellules (108). D'autres expériences ont également permis de noter une augmentation considérable du contenu en eau des cellules épithéliales, ce qui augmente leur volume et leur permet de couvrir une plus grande surface (166).

Ce sont les cellules suprabasales et basales qui participent au processus de migration (167). La formation des lamellipodes et des filopodes, qui correspond au réarrangement des filaments d'actine, marque le début de la migration cellulaire (31). Contrairement aux hémidesmosomes, les desmosomes (jonctions cellules-cellules) restent intacts durant la migration, permettant ainsi aux cellules basales de migrer en feuillet plutôt qu'en cellules individuelles (168). Cependant, des cellules individuelles ou de petits groupes de cellules peuvent également migrer de façon indépendante (31). Cette migration se fait de façon centripète, du limbe vers la partie centrale de la cornée, tout comme lors de la régénération permanente de l'épithélium cornéen.

1.2.2.2 Prolifération cellulaire

Bien que la migration soit indépendante de la prolifération, ces deux mécanismes cellulaires se complètent lors de la réépithélialisation cornéenne. Effectivement, la prolifération cellulaire contribue à la restauration d'un épithélium d'épaisseur normale, comprenant cinq à six couches de cellules. À la suite de la formation de la plaie, il y a une pause du processus naturel de desquamation et les cellules en bordure de la lésion cessent de se diviser pendant une période d'environ 24 heures. Cependant, les cellules situées à une certaine distance de la blessure subissent une augmentation significative du taux de division cellulaire (167). En effet, les cellules souches situées au limbe vont alors se diviser, tout en se déplaçant vers le centre de la cornée, le long de la membrane basilaire. Une succession de mitoses se déplace donc de la périphérie vers la plaie et se poursuit jusqu'à ce que la blessure soit guérie complètement et que l'épithélium revienne à son épaisseur originale (31). Pour ce faire, après avoir couvert la lésion, les cellules basales vont également se diviser afin de fournir des cellules plus différenciées pouvant restructurer l'épithélium cornéen. Un des marqueurs habituellement utilisé afin de localiser les cellules en division est le Ki67. Il s'agit d'un antigène nucléaire exprimé par les cellules en prolifération durant toutes les phases du cycle cellulaire (G_1 , S G_2 et M) à l'exception de la phase G_0 .

1.2.2.3 Adhésion cellulaire

La guérison de l'épithélium cornéen est incomplète tant que l'épithélium nouvellement formé (néoépithélium) n'est pas attaché solidement au stroma. Par contre, cette adhésion permanente n'aura lieu que lorsque la plaie sera totalement couverte. Les cellules épithéliales vont donc utiliser, lors de la migration, un complexe d'adhésion provisoire qui est constamment assemblé et désassemblé afin de permettre aux cellules de se déplacer (151). En effet, étant donné l'absence des hémidesmosomes, un autre mécanisme d'adhésion, appelé contact focal, doit être utilisé pour fournir la traction

nécessaire à la migration des cellules. Ces contacts focaux relient les protéines du cytosquelette et les filaments d'actine à la matrice extracellulaire via les intégrines. Celles-ci seront définies de façon plus approfondie dans la section suivante (169) (figure 1.13). Ces assemblages jouent ainsi un rôle important en induisant des changements de forme aux cellules impliquées dans l'étalement et la migration (170).

Les contacts focaux, qui sont établis par les lamellipodes et les filopodes au niveau du front de migration, fournissent donc l'adhésion nécessaire des cellules à leur substrat afin qu'elles soient en mesure de migrer (figure 1.12). Par la suite, les mécanismes contractiles intracellulaires tirent la cellule vers l'avant. Finalement, il doit y avoir un relâchement de cette adhésion qui permet à la cellule de continuer d'avancer et de former de nouveaux complexes d'adhésion. C'est la fibronectine et la fibrine de la matrice provisoire qui stimulent la sécrétion de l'activateur du plasminogène. Ce dernier convertit le plasminogène en plasmine, qui à son tour, brise l'adhérence entre la cellule et la matrice extracellulaire en effectuant le clivage de la fibronectine et de la fibrine (171). Ce cycle est répété jusqu'à ce que la migration cesse, lorsque l'espace déficient a été comblé (31).

Pour que l'épithélium cornéen soit de nouveau fonctionnel, une fois la blessure refermée, le tissu nouvellement constitué doit bien se fixer au substrat pour rester en place de façon permanente. Les hémidesmosomes sont alors réassemblés à la suite de la phosphorylation de deux de ses composantes, soit la sous-unité β_4 de l'intégrine $\alpha_6\beta_4$ ainsi que l'antigène-1 de la pemphigoïde bulleuse (151, 172). De plus, si elle avait été endommagée, la membrane basilaire doit également être réassemblée. De la même façon que pour ceux des hémidesmosomes (173), les différents constituants de la membrane sont synthétisés très tôt, par les cellules du front de migration. Cependant, leur assemblage commence seulement en périphérie de la plaie (174).

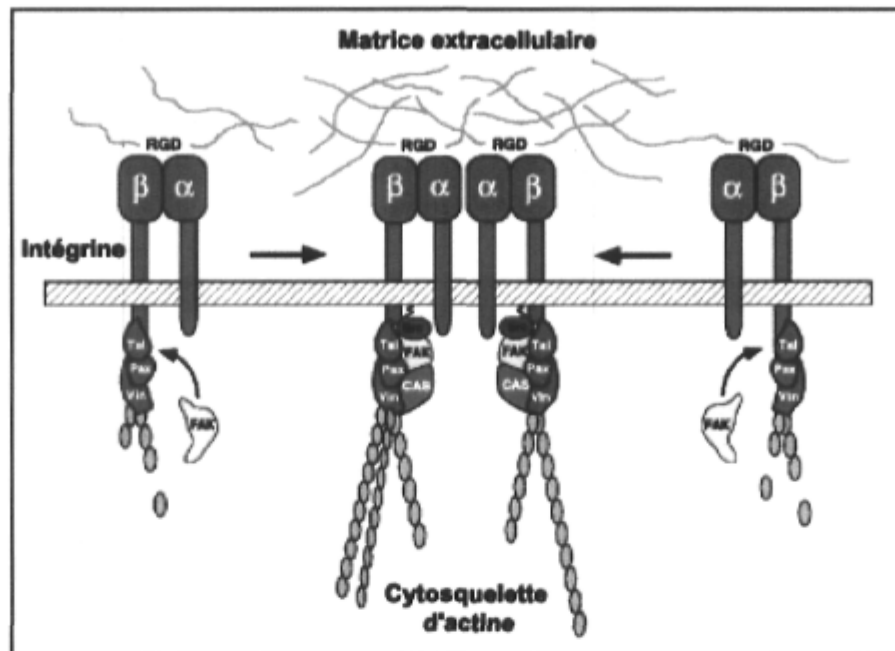


FIGURE 1.13 Interaction des intégrines avec les protéines de la matrice extracellulaire et les protéines cytoplasmiques au niveau des contacts focaux.

Les contacts focaux relient les protéines du cytosquelette et les filaments d'actine à la MEC via les intégrines. En effet, la plupart des intégrines lient des protéines de la MEC telles que la laminine, la fibronectine, le collagène, la vitronectine et la tenascine. Du côté cytoplasmique, elles se lient à des complexes de protéines (taline, vinculine, paxiline, tensile), des filaments d'actine ainsi qu'à des protéines de signalisation telles que FAK (focal adhesion kinase) et Src. Grâce aux intégrines, la MEC et le cytosquelette des cellules sont donc intimement reliés. (Adapté de Giancotti, 1999 (175)).

1.2.2.3.1 Intégrines

Les intégrines sont des récepteurs trans-membranaires composés de sous-unités α et β associées entre elles de façon non-covalente. Elles constituent la principale famille de molécules d'adhésion impliquées dans les interactions cellules-cellules et cellules-matrice (49). Cette famille de glycoprotéines est composée d'au moins 18 sous-unités α et 8 de type β qui s'associent pour former plus de 24 récepteurs différents (176). Plusieurs de ces récepteurs peuvent lier de nombreux ligands et vice-versa (figure 1.14). La sous-unité β

participe à la liaison du substrat tandis que la sous-unité α détermine la nature du ligand et de quelle façon cette interaction doit être traduite dans la cellule (49). La plupart des intégrines lient des protéines de la matrice extracellulaire telles que la laminine, la fibronectine, le collagène, la vitronectine et la tenascine. Du côté cytoplasmique, les intégrines se lient à des complexes de protéines, des filaments d'actine ainsi qu'à des protéines de signalisation telles que FAK (*focal adhesion kinase*) (177) (figure 1.13). Elles initient donc la transmission de signaux dans plusieurs voies de signalisation intracellulaire. Cela entraîne la phosphorylation de diverses protéines telles que des facteurs de transcription contrôlant l'expression de nombreux gènes. En établissant des contacts entre les cellules et la matrice, les intégrines sont ainsi impliquées dans une multitude de processus cellulaires tels que la migration, la prolifération, l'adhésion ainsi que l'apoptose et la différenciation (175, 178). Les intégrines jouent également un rôle important lors de l'embryogenèse ainsi que lors de la croissance et la migration des cellules cancéreuses.

Plusieurs intégrines sont présentes dans l'épithélium cornéen humain. L'expression de trois sous-unités β a été observée : β_1 , β_4 et β_5 . β_1 est localisée au niveau des cellules basales ainsi que dans les couches suprabasales (son expression décroît avec la différenciation des cellules), β_4 se retrouve du côté basal des cellules basales et β_5 autour de toutes les cellules de l'épithélium (152, 179, 180). L'épithélium cornéen exprime également les sous-unités α_1 , α_2 , α_3 , α_5 , α_6 , α_9 et α_V (136, 152, 179-182). Les sous-unités α_2 , α_3 et α_V sont localisées dans les régions où les interactions cellules-cellules sont importantes tandis que les sous-unités α_5 et α_6 se retrouvent à la surface basale des cellules basales, tout comme la sous-unité β_4 . Cependant, la sous-unité α_6 a aussi été observée sur les côtés latéraux des cellules basales (180, 181). La présence de la sous-unité α_4 reste encore un sujet controversé. Une équipe aurait identifiée cette sous-unité dans l'épithélium cornéen humain (179) tandis que d'autres équipes n'ont pu localiser cette intégrine dans un épithélium sain (180) ou en phase de guérison (152). Une controverse analogue concernant l'expression de l'intégrine $\alpha_5\beta_1$ a également été rapportée (179-181). Ces sous-unités

s'assemblent donc pour former diverses intégrines : $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$, $\alpha_6\beta_4$, $\alpha_v\beta_1$ et $\alpha_v\beta_5$ (182).

Durant la guérison d'une plaie cornéenne, plusieurs changements dans la distribution de certaines sous-unités ont été observés. En effet, l'intégrine β_4 , normalement présente sur la surface basale des cellules basales au niveau des hémidesmosomes, est relocalisée sur les surfaces apicales et latérales des cellules basales et suprabasales du front de migration (183, 184). La sous-unité α_6 , quant à elle, est redistribuée à l'ensemble de la surface membranaire des cellules basales et suprabasales (173, 181, 183, 185). De plus, l'expression de la sous-unité β_1 est également augmentée sur la surface basale des cellules situées au front de migration (48). La localisation de ces deux sous-unités (α_6 et β_1) suggère la présence de l'hétérodimère $\alpha_6\beta_1$ qui jouerait un rôle important lors de la migration (173, 181, 185). Les intégrines $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$ ainsi que leur ligand, sont des composants des contacts focaux lors de la migration des cellules épithéliales (49, 53, 54, 161, 186, 187). En effet, l'intégrine $\alpha_3\beta_1$ se lierait à la laminine 5 durant la migration cellulaire. Par la suite, la laminine 5 s'attacherait plutôt à l'intégrine $\alpha_6\beta_4$ lors de la formation des hémidesmosomes dans un épithélium intact. Finalement, il y aurait aussi une augmentation de l'expression de l'intégrine $\alpha_5\beta_1$ à la suite d'une blessure. L'intégrine $\alpha_5\beta_1$, étant donné sa liaison avec la fibronectine, aurait une fonction très importante durant la guérison (188, 189). Ainsi, ces molécules d'adhésion sont grandement impliquées dans le processus de guérison d'une plaie cornéenne.

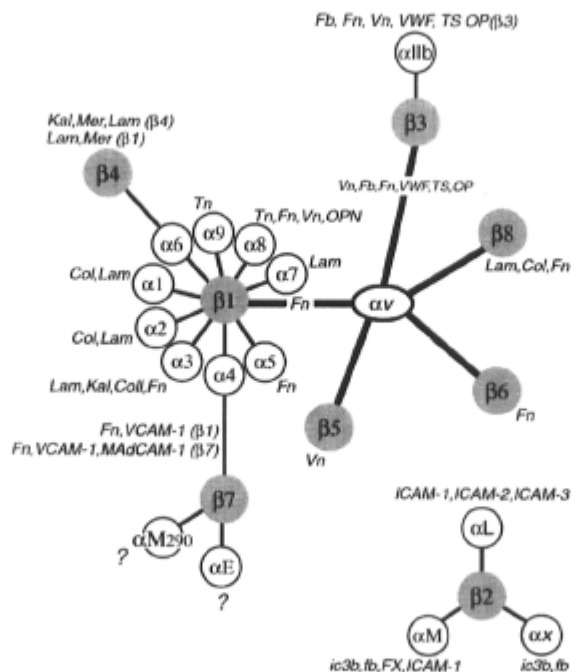


FIGURE 1.14 Association des sous-unités α et β des intégrines et leurs ligands.

Schéma représentant les associations connues des différentes sous-unités d'intégrines. Cette famille de glycoprotéines est composée d'au moins 18 sous-unités α et 8 de type β qui s'associent pour former plus de 24 hétérodimères différents. Chaque combinaison possède ses spécificités et peut lier un ou plusieurs ligands. Bien que la plupart des sous-unités α se lient à un seul type de sous-unité β , certaines, dont α_4 , α_6 et α_V , peuvent s'associer à plus d'une sous-unité β . Cela définit ainsi les 8 sous-familles de récepteurs dépendamment de la nature de la sous-unité β . À l'exception de quelques hétérodimères, les ligands reconnus par chaque récepteur ont été identifiés. Col, collagène; Fb, fibrinogène; Fn, fibronectine; FX, facteur X de coagulation; iC3b, fragment inactif C3b du complément; ICAM-1,-2,-3, molécule d'adhérence intercellulaire; Kal, kalinine; Lam, laminine; MadCAM-1, *mucosal addressin cell adhesion molecule*; Mer, mérosine; OP, Ostéopontine; Tn, ténascine; TS, Thrombospondine; VCAM-1, molécule d'adhérence de la cellule vasculaire-1; Vn, vitronectine; VWF, facteur Von Willebrand. (Adapté de Giancotti, 1994 (190), Tiré de Germain, 2000 (134)).

1.2.2.4 Rôle des kératocytes du stroma

Les kératocytes du stroma ont également une fonction importante dans le processus de guérison. Tout d'abord, les kératocytes adjacents à la zone épithéliale lésée, entrent en apoptose (191). Il a été suggéré que cette mort cellulaire programmée pourrait être le signal initiant tout le processus de guérison (151, 192). Des études récentes ont également révélé que cette apoptose serait modulée par des facteurs solubles tels que l'interleukine-1 (IL-1), le TNF et le ligand Fas, qui sont sécrétés par les cellules épithéliales (191). Par la suite, les kératocytes adjacents à la zone endommagée prolifèrent afin de remplacer les cellules mortes, se différencient en fibroblastes et migrent sous la plaie (80). Ces fibroblastes en migration sont en mesure de synthétiser des composantes de la matrice extracellulaire (88). Le collagène de type III est alors déposé en grande quantité dans le tissu cicatriciel (193). Ensuite, certains fibroblastes se différencient en myofibroblastes qui permettent la contraction de la plaie via les fibres de stress composées d' α -actine du muscle lisse (80, 81, 194, 195). L'interleukine-1 produite par les cellules épithéliales stimule également la production de HGF et de KGF par les myofibroblastes (196, 197). Ces facteurs de croissance sont connus pour jouer un rôle important dans le contrôle de processus cellulaires comme la prolifération, la migration et la différenciation des cellules épithéliales (84-87, 198). Par la suite, un grand nombre de cellules inflammatoires telles que des monocytes et des granulocytes migrent dans le stroma quelques heures après une blessure. Elles sont attirées au stroma grâce à différentes cytokines relarguées par les cellules du stroma et de l'épithélium (199, 200). Ces cellules inflammatoires ont alors pour rôle d'éliminer les débris de cellules mortes et de sécréter, à leur tour, différentes cytokines et collagénases essentielles à la réorganisation et à la réparation du tissu (201). Finalement, le processus de remodelage de la matrice extracellulaire s'effectue grâce à la sécrétion des métalloprotéinases et des gélatinases par les fibroblastes, les cellules épithéliales ainsi que les cellules inflammatoires (151). Le collagène de type III est ainsi remplacé par le type I (193). Cependant, durant ce processus, l'arrangement et l'organisation des fibrilles de collagène ne redevient pas aussi régulier que dans le tissu cornéen sain. En effet, dans un tissu cicatriciel, la distance interfibrillaire est plus grande. Cela induit une diffusion de la

lumière entraînant ainsi une perte de transparence de la cornée (202-204). La guérison d'une plaie cornéenne profonde peut donc entraîner la formation de cicatrices opaques pathologiques qui sont causées par un dépôt désorganisé de matrice extracellulaire (79).

1.2.3 Contrôle de la guérison cornéenne

Manifestement, plusieurs types de cytokines sont impliqués dans le maintien des fonctions de la cornée. Ces molécules ont en effet des rôles très importants lors de la guérison afin de préserver la transparence (205). Parmi ceux-ci, les facteurs de croissance tels que l'EGF, le FGF, le TGF, le KGF, le HGF, le PDGF et leurs récepteurs respectifs sont exprimés par les cellules cornéennes et participent à un contrôle positif ou négatif des différents processus cellulaires (206). Ce contrôle peut se faire soit de façon autocrine, c'est-à-dire en affectant le même type cellulaire qui a sécrété la cytokine, ou de façon paracrine, lorsque la cytokine exerce une influence sur un autre type cellulaire (193). En plus de ces nombreux facteurs de croissance, plusieurs interleukines, sécrétées par les cellules cornéennes et majoritairement par les cellules inflammatoires, contribuent au processus de guérison. En effet, il a été démontré que l'IL-1, l'IL-6 et l'IL-10, sont fortement exprimées à la suite d'un traumatisme de la cornée (207). De plus, l'expression de certaines interleukines (IL-1, IL-6 et IL-8) a été détectée dans des larmes provenant de yeux humains sains (208). Ainsi, ces dernières seraient peut-être impliquées dans l'homéostasie de la cornée (209).

Habituellement, une blessure de l'épithélium cornéen guérit rapidement et sans incident. Cependant, il arrive parfois que des érosions récidivantes persistent. Le seul traitement efficace de ces érosions est la photokéractectomie thérapeutique par laser eximer ou le pelage épithélial avec nettoyage de débris et repli de la membrane basilaire. Toutefois, ces traitements sont parfois inefficaces. Ceci a donc mené à la recherche de divers agents thérapeutiques capables de promouvoir et d'améliorer la guérison. En effet, divers agents

connus pour leur implication au niveau de la prolifération, l'adhésion et la différenciation des cellules épithéliales ont été utilisés lors d'études expérimentales et d'essais cliniques. Des composantes de la matrice extracellulaire ainsi que des cytokines furent alors appliquées localement sur des plaies *in vitro* et *in vivo* afin de déterminer leur potentiel à améliorer et augmenter la vitesse de guérison de la cornée (210, 211). Parmi ces cytokines, l'EGF a été largement utilisé.

1.2.3.1 Facteur de croissance épithélial (EGF)

L'EGF fut découvert pour la première fois dans les glandes sous-maxillaires de souris en 1962 (212). Il est d'abord synthétisé sous la forme d'une grosse protéine de 128 kD, puis excisé pour donner la forme active du EGF, un peptide de 53 acides aminés ayant un poids moléculaire de 6 kD (206). Dans la cornée, l'EGF est synthétisé par les trois types cellulaires mais il se retrouve principalement dans les larmes (213-215). Il a été récemment démontré qu'il existe deux types de récepteurs pour cette cytokine; un récepteur pour lequel l'EGF possède une grande affinité, exprimé à la surface des cellules épithéliales et endothéliales et un récepteur pour lequel l'EGF a une faible affinité, localisé à la surface des trois types cellulaires cornéens (206). La liaison de l'EGF sur son récepteur provoque la dimérisation de ce dernier, permettant l'activation des tyrosines kinases et l'autophosphorylation des domaines cytoplasmiques des récepteurs (108). Il y a ensuite internalisation du complexe et métabolisation dans les lysosomes (216). Il a été rapporté que l'EGF stimule la prolifération de plusieurs types cellulaires dont les cellules épithéliales et endothéliales cornéennes (104, 206, 217). De plus, il facilite également la migration des différents types cellulaires de la cornée (218-220) et accélère la réépithélialisation de plaies cornéennes *in vivo* chez le lapin, le primate et l'humain (221-225). En effet, l'EGF accélère la guérison principalement via un mécanisme de prolifération cellulaire mais aussi en stimulant la synthèse et le dépôt de fibronectine sur la plaie ainsi que l'expression des récepteurs de cette protéine (161, 220, 226). Ainsi, cette cytokine joue un rôle clé lors de la guérison d'une blessure de la cornée. L'équipe de Zieske et al. a d'ailleurs récemment observé chez le rat, que le récepteur de l'EGF est activé quelques minutes seulement après l'induction de la blessure (215).

1.2.4 Modèles pour l'étude de la cicatrisation cornéenne

Bien que les mécanismes de réparation de la cornée humaine soient de plus en plus connus, plusieurs étapes et processus cellulaires demeurent incompris et ce, malgré plusieurs recherches dans ce domaine. Les études sur la guérison de plaies cornéennes chez l'humain n'étant pas envisageables pour des raisons d'éthique, plusieurs modèles expérimentaux ont été développés pour étudier les mécanismes de guérison des plaies cornéennes et pour évaluer l'effet sur la guérison de diverses molécules et traitements. Un des premiers modèles utilisé a été la culture de blocs de tissus cornéens *in vitro*, dans lesquels les cornées étaient coupées en blocs et incubés avec l'épithélium sur le dessus (227). L'épithélium migrait alors sur le rebord du stroma coupé et la distance de migration pouvait être évaluée en microscopie. Un second modèle implique la culture *in vitro* de cornées humaines (228-231) ou d'animaux (232-234), auxquelles une surface définie de l'épithélium est enlevée. Le modèle peut alors être utilisé pour évaluer l'effet de différents produits sur la vitesse de réépithélialisation (235). Malgré l'avantage de pouvoir faire des études sur des tissus en trois dimensions, ces modèles comportent plusieurs désavantages. En premier lieu, une quantité limitée de cornées provenant de donneurs sont disponibles pour la recherche. De plus, ces cornées proviennent habituellement de donneurs âgés ou chroniquement malades ou débilisés. Deuxièmement, le délai séparant la mort du donneur et la réception du tissu est souvent très long. Cela peut donc influencer grandement les résultats obtenus, puisque les cornées ont pu subir des changements durant ces délais. Finalement, dans certains cas, ces modèles présentent une réduction du nombre de couches cellulaires au niveau de l'épithélium, un oedème du stroma et une réépithélialisation incomplète (232, 236, 237).

L'étude des mécanismes de guérison peut aussi être effectuée en analysant uniquement le comportement des cellules épithéliales *in vitro*. Des cultures monocouches

de cellules épithéliales cornéennes humaines (220, 238, 239) et animales (188, 218) auxquelles un déficit épithélial est induit, habituellement à l'aide d'une pipette (240) ont été utilisées. Il est alors possible d'étudier la migration et l'adhésion des cellules sur différents substrats (240), ainsi que la toxicité d'agents de conservation de certaines solutions ophtalmiques (239). Cependant, l'utilisation d'un épithélium seul pour étudier la guérison d'une plaie cornéenne comporte des limites car les interactions entre les différents types cellulaires sont absentes. De plus, l'étude est faite sur une seule couche de cellules plutôt que sur un épithélium pluristratifié tel que retrouvé *in vivo*. Finalement, les cellules sont cultivées sur des substrats de plastique où les interactions entre les cellules et la matrice extracellulaire, très importantes pour la guérison (241), sont absentes.

La guérison cornéenne a également été étudiée dans divers modèles *in vivo*. Le lapin, dont l'anatomie de l'œil se rapproche de celle de l'humain, est l'animal le plus utilisé. Des plaies ont été simulées en utilisant différents produits induisant seulement un débridement de l'épithélium (n-heptanol, vapeur d'iode ou brûlure thermique) ou altérant aussi la membrane basilaire (NaOH). Il est également possible de créer un déficit de façon mécanique, en enlevant chirurgicalement l'épithélium sur une surface définie (kératectomie superficielle). Ces modèles animaux sont par contre très contestés d'un point de vue éthique et présentent des différences majeures par rapport aux tissus humains. Par exemple, *in vivo*, l'une des principales limitations de l'utilisation des cornées de lapins est le fort potentiel de prolifération des cellules endothéliales comparativement à l'absence de réplication de ces cellules chez l'humain.

Pour contrer ces différents désavantages, la porte demeure ouverte à des modèles *in vitro* ressemblant davantage au tissu humain vivant. Depuis quelques années, différents groupes de recherche tentent de développer une cornée reconstruite *in vitro* en utilisant des cellules humaines (242-245) et animales (32, 246-249). Cependant, jusqu'à maintenant, aucun de ces équivalents cornéens n'a été utilisé pour étudier la cicatrisation cornéenne. Récemment, un nouveau modèle pour l'étude de la guérison des plaies cutanées a été

développé au LOEX (250). Celui-ci présente plusieurs avantages sur les modèles de peau utilisés auparavant et a apporté des réponses à plusieurs interrogations concernant les mécanismes impliqués lors de la guérison d'une plaie cutanée. Les équivalents cornéens devraient aussi offrir plusieurs avantages par rapport aux autres modèles utilisés auparavant. En effet, l'utilisation de cellules humaines, l'interaction possible entre celles-ci grâce à l'aspect tridimensionnel du modèle, ainsi que l'absence de matériel synthétique et de protéines exogènes de la matrice extracellulaire constituent des avantages considérables. De plus, il serait intéressant d'obtenir un modèle assez stable au cours des expériences et le plus près possible de la guérison des plaies cornéennes chez l'humain. Finalement, les cornées obtenues par génie tissulaire devraient permettre de pallier à certains inconvénients des modèles de guérison développés à partir de cornées humaines natives, tels la variabilité des résultats et le manque de disponibilité.

Partie 3: Troubles visuels liés à la cornée et traitements

1.3.1 Déficience en cellules souches

Aussi longtemps que le limbe et ses cellules souches sont intactes, l'épithélium cornéen, exposé à des blessures mécaniques et environnementales, est en mesure de se réparer rapidement en accélérant son processus normal de régénération. L'intégrité de l'épithélium cornéen étant essentielle au bon fonctionnement de l'œil, des mécanismes ont été mis en place afin de réparer toutes blessures le plus rapidement possible. Ces mécanismes ont été décrits plus en détails au chapitre précédent. Cependant, lorsque des traumatismes plus importants s'étendent jusqu'au limbe, les cellules souches peuvent être partiellement ou totalement détruites. Il s'agit alors de déficiences en cellules souches (251).

1.3.1.1 Causes

L'étiologie des déficits en cellules souches limbiques peut être séparée en deux catégories (143). La première catégorie est représentée par deux rares maladies congénitales, soit l'aniridie et la kératodermie congénitale. La deuxième catégorie inclue les causes les plus fréquentes telles que les brûlures thermiques ou chimiques, les radiations ultraviolettes et ionisantes, le port prolongé de verre de contact, les traumatismes chirurgicaux répétés, le vieillissement ainsi que des maladies inflammatoires auto-immunes comme le syndrome de Stevens-Johnson et le pemphigoïde (252).

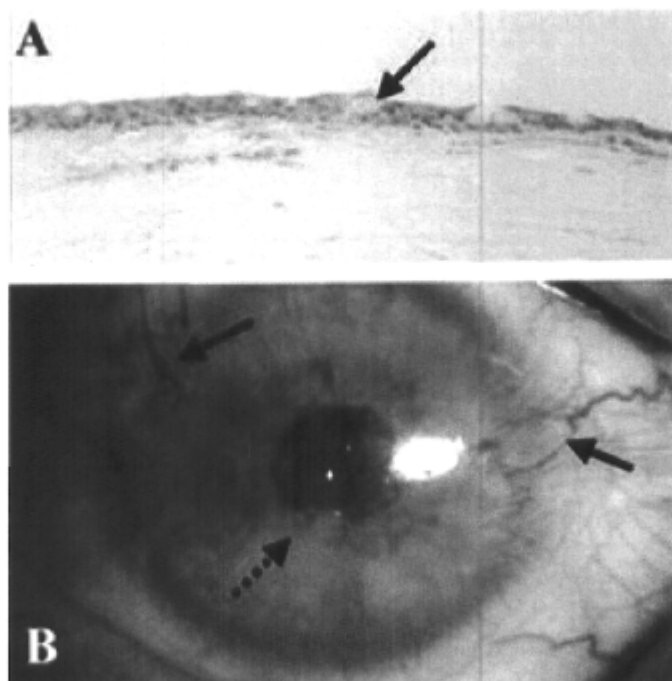


FIGURE 1.15 *Conjunctivalisation d'une cornée.*

A) La conjunctivalisation est causée par un envahissement progressif de la surface cornéenne par des cellules de type conjonctival, incluant les cellules à gobelet (flèche). B) Une vascularisation (flèches pleines) ainsi qu'une opacification (flèche pointillée) de l'épithélium cornéen sont alors observables. (Tiré de Daniels, 2001 (109)).

1.3.1.1 Apparence clinique

L'absence ou la dysfonction des cellules souches limbiques entraînent une incapacité de l'épithélium cornéen à se régénérer résultant en un envahissement progressif de la surface cornéenne par un épithélium de type conjonctival. En effet, à la suite de la perte des cellules épithéliales du limbe, les cellules de la conjonctive envahissent la cornée (253). Cette dernière devient alors le siège d'une inflammation chronique et d'érosions récidivantes à l'origine de douleurs oculaires et de photophobie (254). Plus grave, l'induction d'une néovascularisation par l'épithélium conjonctival, ainsi que l'apparition de cicatrices cornéennes et d'un épithélium irrégulier réduisent l'acuité visuelle et peuvent

conduire à la cécité (255). Les cellules à gobelet, normalement présentes au niveau de la conjonctive et ayant pour fonction de sécréter les mucines nécessaires au maintien du film lacrymal (256), se retrouvent dans l'épithélium recouvrant la cornée (109) (figure 1.15).

1.3.2 Traitements possibles

1.3.2.1 Greffe de cornée

Les traitements proposés aux patients souffrant de déficience en cellules souches sont peu nombreux. La greffe de cornée est parfois la seule possibilité de rendre au malade une vision utile, mais les risques de rejet sont considérables étant donné les nombreux problèmes liés à l'inflammation de la surface de la cornée. De plus, une déficience en cellules souches épithéliales cornéennes est une contre-indication à l'utilisation d'une greffe de cornée conventionnelle, puisque celle-ci ne restaure que le centre de la cornée mais pas le limbe (257). Or, l'absence de cellules souches empêche le renouvellement de l'épithélium cornéen du patient à long terme (143).

La mise en évidence des cellules souches limbiques a permis de mettre au point différentes techniques de greffes de limbe, chacune possédant des avantages et des inconvénients (252, 258). Elles ont toutes pour principe de fournir à un œil déficient, des cellules souches limbiques saines capables de proliférer et de régénérer un épithélium cornéen normal et stable (110).

1.3.2.2 Autogreffe

Kenyon et Tseng ont publié en 1989, la première série d'autogreffes limbiques réalisées chez des patients souffrant d'une atteinte unilatérale, c'est-à-dire sur un seul œil (259). La technique consiste à prélever sur l'œil sain deux greffons limbiques sur environ 1/3 de sa circonférence et de les suturer au niveau de la région limbique de l'œil receveur après avoir retiré le pannus fibrovasculaire cornéen et excisé la conjonctive périlimbique. Bien que cette technique ne comporte aucun problème de rejet, elle comporte cependant certains risques pour l'œil qui subit le prélèvement. Il a été démontré qu'une déficience en cellules souches pouvait être créée lorsqu'une trop grande partie du limbe du donneur était prélevée (260).

1.3.2.3 Allogreffe

En cas d'atteinte bilatérale, seule une allogreffe limbique est réalisable, mais ses chances de succès sont limitées par les risques de rejet du greffon (261). Le limbe étant une région très vascularisée et riche en cellules immunocompétentes, la confrontation des cellules de Langerhans de l'œil receveur avec celles du greffon favorise grandement le rejet (262). Le recours à des traitements immunosuppresseurs, tels que la cyclosporine A, semble améliorer le résultat des allogreffes, mais leurs effets secondaires en limitent l'utilisation. En effet, la cyclosporine A peut avoir des effets néfastes sur les fonctions rénales et hépatiques à long terme (263). Cependant, la cyclosporine est aussi disponible en format topique. Finalement, ce type de procédure s'accompagne également d'un risque de transmission infectieuse.

1.3.2.3 Greffe d'épithélium cornéen cultivé *in vitro*

Le risque de provoquer une déficience en cellules souches dans l'œil donneur du premier type de greffe limbique, ainsi que le risque de rejet et de transmission infectieuse de la seconde procédure ont amené quelques équipes à mettre au point d'autres techniques de greffe à l'aide de cellules cornéennes cultivées ayant subi une expansion *in vitro*. Il est cependant essentiel d'être en mesure de conserver les cellules souches en culture puisque le succès de ces nouvelles techniques repose évidemment sur la présence de ces cellules (264).

Il y a une dizaine d'années, il a été démontré que les cellules souches limbiques humaines, isolées à partir d'une petite biopsie de limbe, pouvaient être cultivées *in vitro* par passages sériés successifs sur des fibroblastes murins irradiés (cellules 3T3) (140). Ces études étaient basées sur des données précédemment obtenues avec la culture de cellules épithéliales de peau. Il avait été démontré qu'il était possible de conserver en culture les cellules souches cutanées pour de nombreux passages en les co-cultivant avec une couche nourricière de cellules 3T3 (265). Ces fibroblastes ne peuvent plus se diviser mais ont un métabolisme actif pouvant soutenir la croissance des cellules épithéliales. Cette technique a été utilisée pour la greffe de feuillets d'épiderme lors du traitement de grands brûlés (266, 267).

Ceci a donc inspiré quelques équipes à travers le monde à régénérer un épithélium cornéen complet. En 1997, l'équipe de Pellegrini fut la première à greffer chez deux patients, de l'épithélium cornéen cultivé *in vitro* à partir de cellules souches autologues limbiques (268). Le greffon épithélial cornéen a été conçu à partir d'une petite biopsie limbique d'environ 1 mm² prélevé sur l'œil sain. Après quelques passages, l'épithélium cultivé était pluristratifié, de phénotype cornéen (synthétisant la K3) et suffisamment cohérent pour être libéré de son support par traitement enzymatique. Le prélèvement d'une

si petite biopsie diminue fortement le risque de créer dans l'œil donneur une déficience en cellules souches. La surveillance à long terme (deux et quatre ans) a pu montrer que l'épithélium reformé était stable et conservait un phénotype cornéen. Cette nouvelle procédure semblait donc très séduisante pour remplacer l'allogreffe de limbe qui était jusqu'à présent la seule méthode disponible pour traiter les atteintes sévères bilatérales. Par la suite, d'autres équipes ont utilisé différents substrats servant de support pour cultiver *in vitro* les cellules épithéliales et facilitant la manipulation lors de la chirurgie. L'utilisation de membranes amniotiques (269-271) et de gels de fibrine (272, 273) devint alors populaire.

1.3.2.4 Membrane amniotique

L'idée de base était de fournir aux cellules épithéliales cultivées, une membrane basilaire qui pourrait améliorer la prise du greffon épithélial. De plus, la membrane amniotique serait peut-être en mesure de promouvoir la survie et le maintien des cellules souches en facilitant l'établissement d'une niche environnementale. La membrane amniotique, qui forme la couche interne du placenta, a donc été utilisée par certaines équipes de recherche pour le traitement de patients souffrant de déficience en cellules souches. En 2000, l'équipe de Tsai ainsi que celle de Schwab ont cultivé des cellules limbiques sur des membranes amniotiques puis les ont greffées chez des patients. Bien que des améliorations au niveau de la transparence de la cornée aient été obtenues, ces expériences furent grandement critiquées pour leur manque de contrôle sur la conservation des cellules souches en culture (272). 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* (26, 265, 274). De plus, les membranes furent greffées chez des patients atteints, pour la plupart, d'une déficience partielle en cellules souches (271). Les membranes ont alors peut-être simplement stimulé la prolifération des cellules souches des patients plutôt que d'agir comme un greffon permanent ayant régénéré l'épithélium cornéen.

Aussi, lors d'études plus récentes, les chercheurs ne furent pas en mesure d'observer d'améliorations significatives de l'état des patients atteints de déficience en cellules souches en utilisant des cultures de cellules sur membrane amniotique (275, 276). Le mécanisme d'action exact de la membrane amniotique est donc encore mal compris. Elle pourrait agir soit comme un pansement biologique sous lequel s'effectue la guérison grâce aux différents facteurs de croissance contenus dans la membrane ou comme une membrane basilaire sur laquelle migrent les cellules (110). Finalement, malgré toutes les précautions prises, la membrane amniotique restera toujours un tissu présentant un risque de rejet ainsi que de transmission d'agents pathogènes.

1.3.2.5 Gel de fibrine

Une autre technique prometteuse de greffe de cellules cornéennes cultivées fut développée à nouveau par l'équipe italienne de Pellegrini en 2001 (272). Les cellules épithéliales sontensemencées sur un gel de fibrine en présence d'une couche nourricière. Ce gel sert alors de support solide au transport et à la suture des cellules lors de la chirurgie. D'excellents résultats ont été obtenus avec cette méthode. Cette matrice avait déjà été utilisée pour la culture des cellules épithéliales cutanées (277) et le traitement des grands brûlés (278, 279). La conservation des cellules souches sur le gel de fibrine a été démontrée par marquage avec des anticorps (273) ainsi qu'en analysant le potentiel de prolifération cellulaire (272).

Le gel de fibrine est un dérivé de plasma humain ayant diverses applications cliniques (280). Ce produit mime les dernières étapes de la cascade de coagulation grâce à l'activation du fibrinogène par la thrombine. Il se gélifie alors pour former une matrice semi-rigide semblable au caillot formé lors de la guérison d'une plaie (273, 281). La fibrine fut choisie parce qu'elle possède plusieurs avantages sur les biomatériaux conventionnels. C'est une substance naturelle, biocompatible, non-immunogène et qui est dégradée

naturellement. En effet, une fois implanté *in vivo*, le gel de fibrine est remplacé par de la matrice extracellulaire permanente telle que du collagène. De plus, il est possible de contrôler la vitesse de dissolution du gel en variant la concentration d'aprotinine dans le gel, un agent antifibrinolytique qui prévient une dissolution prématurée (281). Cette nouvelle méthode est actuellement à l'étude au LOEX et des greffes sont présentement effectuées chez le lapin (282). Un des inconvénients de l'utilisation de la fibrine est le risque possible de transmission d'agents pathogènes relié à l'origine humaine des dérivés du plasma.

1.3.2.5 Cornées reconstruites *in vitro* par génie tissulaire

1.3.2.5.1 Génie tissulaire

Une nouvelle approche, en développement depuis une dizaine d'années, consiste à reconstruire une cornée humaine en laboratoire. La reconstruction d'organes par génie tissulaire est un domaine prometteur qui progresse très rapidement. Ce champ de recherche, avec ses applications autant fondamentales que thérapeutiques, suscite de plus en plus d'intérêt. Le manque d'organes à transplanter ainsi que les différents problèmes de rejet et de transmissions virales rencontrés lors de greffes, sont à l'origine du développement du génie tissulaire. La reconstruction d'organes implique tout d'abord l'isolement et la culture, à partir d'une petite biopsie, des différents types cellulaires d'un tissu. Par la suite, les cellules sont rassemblées *in vitro* et leur interaction permet d'obtenir des reconstructions tridimensionnelles ayant les aspects morphologiques et histologiques similaires au tissu d'origine.

L'épiderme de la peau est le premier tissu humain à avoir été reconstruit en laboratoire et greffé sur des patients gravement brûlés (266, 283). L'amélioration des

méthodes d'isolement et de culture des cellules cutanées a permis l'application clinique des épidermes cultivés à l'échelle mondiale (265, 284). Par la suite, les techniques ont été raffinées et diversifiées afin de reconstruire des tissus ou organes plus complexes tels que la peau (derme et épiderme), les vaisseaux sanguins, les ligaments et la cornée (285-288). C'est la grande similarité entre les épithélia cutanés et cornéens qui a permis l'adaptation de la méthode du gel de collagène mise au point dans le domaine de la peau et son utilisation dans le développement des cornées reconstruites *in vitro*.

1.3.2.5.2 Modèles de cornées reconstruites *in vitro*

Ainsi, au cours des dernières années, plusieurs équipes de recherche ont tiré profit des données recueillies lors du développement de la peau reconstruite, pour concevoir différentes approches permettant d'obtenir une cornée en laboratoire. Différentes matrices et des cellules de diverses origines ont été utilisées. Les premiers équivalents cornéens furent reconstruits avec des gels de collagène ainsi que des cellules animales provenant du bœuf, du lapin ou du porc. En 1993, l'équipe de Minami rapportait le développement d'un équivalent cornéen composé de cellules épithéliales, de fibroblastes et de cellules endothéliales cornéennes bovines (246). L'année suivante le groupe de Zieske obtient une cornée reconstruite en cultivant des cellules épithéliales de lapin sur un gel de collagène comprenant des kératocytes de lapin avec ou sans une couche de cellules endothéliales murines immortalisées (32). Par la suite, en 1999, Schneider et ses collaborateurs décrivaient le développement d'une cornée reconstruite en utilisant également un gel de collagène et les trois types cellulaires cornéens isolés du porc (248). Plus récemment, la méthode des gels de collagène fut également utilisée pour produire une cornée bovine utilisée pour des études pharmacologiques et toxicologiques (249, 289). En plus d'être de bons outils pour ce genre d'études, ces différents modèles de cornées furent d'une grande utilité pour l'optimisation des conditions de culture des équivalents ainsi que pour une meilleure compréhension des interactions entre les différents types cellulaires. Cependant,

étant donné l'origine des cellules, ces cornées reconstruites ne peuvent évidemment pas être greffées chez l'humain.

Parallèlement au développement de ces équivalents cornéens faits de cellules animales, deux équipes, dont la nôtre, ont reconstruit des cornées *in vitro* avec des cellules humaines en utilisant soit des gels de collagène (290) ou des éponges de collagène contenant des cellules immortalisées (243). L'équipe du Dre Griffith a développé un équivalent cornéen à partir de lignées cellulaires transformées provenant de l'épithélium, du stroma et de l'endothélium. Ils se sont d'abord assurés du fonctionnement physiologique normal de ces cellules en les comparant à des cellules fraîchement isolées. Par la suite, en utilisant comme matrice un mélange de collagènes et de sulfate de chondroïtine lié avec du glutaraldéhyde, la cornée a été reconstruite et cultivée pendant deux semaines afin de permettre aux cellules de se différencier. Bien que cet équivalent présente plusieurs similitudes avec la cornée humaine, il ne peut cependant pas être utilisé pour des greffes étant donné l'utilisation de cellules immortalisées par des virus (291). Par contre, ces cornées reconstruites peuvent être fort utiles lors d'études toxicologiques et pharmacologiques. La cornée obtenue réagissait de la même manière qu'une cornée humaine au contact de différents produits chimiques irritants. En effet, cette cornée reconstruite, normalement transparente, devient opaque.

L'équipe du Dre Germain a toutefois été la première à décrire le développement d'une cornée humaine composée de cellules épithéliales cultivées sur des fibroblastes inclus dans un gel de collagène (figure 1.16). Dans ce modèle, les populations cellulaires utilisées n'étaient pas transformées (ou immortalisées). Il en résulte des équivalents cornéens dont l'histologie se rapproche de celle de la cornée *in situ* et dont l'expression des intégrines et des composantes de la membrane basilaire sont similaires à celle du tissu d'origine (290). La méthode basée sur l'utilisation d'un gel ou d'une éponge de collagène a donc été la première à démontrer les vastes possibilités du génie tissulaire dans le domaine de l'ophtalmologie. Par contre, plusieurs problèmes n'ont pas permis à ces tissus d'être

utilisés en clinique. Tout d'abord, malgré leur biocompatibilité, la présence de matériel exogène représente un certain risque de rejet lors d'une éventuelle greffe (292). De plus, l'utilisation de collagène provenant d'animaux, tel que le collagène bovin, rend toujours possible la transmission d'agents pathogènes et ce, malgré la purification de ce dernier. Finalement, des problèmes au niveau de la résistance mécanique de ces équivalents ont été observés.

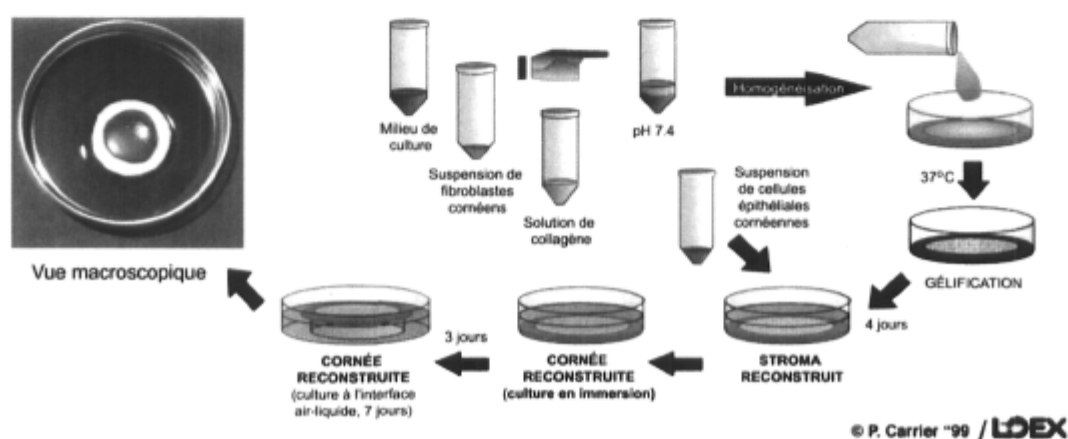


FIGURE 1.16 *Reconstruction in vitro de cornée humaine par la méthode du gel de collagène.*

Schéma représentant les différentes étapes lors de la reconstruction d'une cornée humaine en laboratoire avec la méthode du gel de collagène. Il montre également une vue macroscopique d'une cornée reconstruite. La photo originale en couleur fut publiée dans la revue *Science* (1999, 284, p. 423.) (Modifié de Germain, 2004 (293)).

1.3.2.5.3 Méthode d'auto-assemblage

En raison des différentes contraintes rencontrées avec cette méthode (gel de collagène), de nouvelles approches de génie tissulaire ont été développées. L'une d'elles, la méthode d'auto-assemblage, est particulièrement innovatrice et très prometteuse. Cette

nouvelle méthode, mise au point au LOEX, se base sur l'idée de cultiver les cellules humaines en condition adéquate et d'en tirer les avantages. En effet, il est possible de mettre à profit la propriété qu'ont les cellules de reconstruire le tissu dont elles proviennent si elles sont cultivées de la bonne façon. Cette approche a été utilisée afin de reconstruire une peau humaine en laboratoire. Dans un premier temps, les cellules fibroblastiques, cultivées en présence de sérum et d'acide ascorbique, s'auto-assemblent en un tissu cohérent et s'entourent de leur propre matrice extracellulaire produisant ainsi un équivalent dermique (figure 1.17). Il avait précédemment été démontré que l'acide ascorbique augmente la synthèse d'ARNm de procollagène chez les fibroblastes murins et humains (294-296). De plus, il permet l'hydroxylation post-transcriptionnelle de la lysine et de la proline, menant à la formation d'hélices de collagène, à la réticulation du collagène et à l'augmentation de la sécrétion du collagène chez les cellules en culture (297-299). Après environ trente-cinq jours de culture, les feuillets de fibroblastes cutanés sont décollés du flacon et superposés pour former le derme reconstruit. Après une semaine de maturation de ce derme, les kératinocytes sontensemencés à sa surface sous des paramètres de culture adéquats. Une semaine plus tard, la peau reconstruite est installée à une interface air-liquide, c'est-à-dire un derme nourri par le milieu de culture et un épiderme en contact avec l'air environnant, afin de favoriser la différenciation des kératinocytes. L'épiderme peut ainsi se stratifier en plusieurs couches (15 à 20 couches) et posséder les quatre principales couches cellulaires qui caractérisent l'épiderme, soit la couche basale, la couche épineuse, la couche granuleuse et la couche cornée. Ces peaux reconstruites *in vitro* expriment également les différentes protéines normalement présentes au niveau de la membrane basilaire, soit les collagènes de type IV et VII ainsi que la fibronectine. C'est donc maintenant de cette manière que des peaux humaines dénuées de tout matériel exogène et présentant des propriétés mécaniques supérieures à la méthode des gels de collagènes sont reconstruites au LOEX. Ainsi, en se basant sur les travaux antérieurs faits sur la peau (300) et le vaisseau sanguin (288), la possibilité de reconstruire *in vitro* une cornée humaine sans l'ajout de biomatériaux, de protéines exogènes et de cellules transformées par des virus pourrait être évaluée. La méthode d'auto-assemblage, qui n'a pas encore été employée à cette fin, permettrait d'obtenir des cornées possédant de nombreux avantages pour une

utilisation en clinique. En effet, il s'agirait de cornées entièrement autologues ne présentant aucun risque de rejet ni de problèmes d'inflammation.

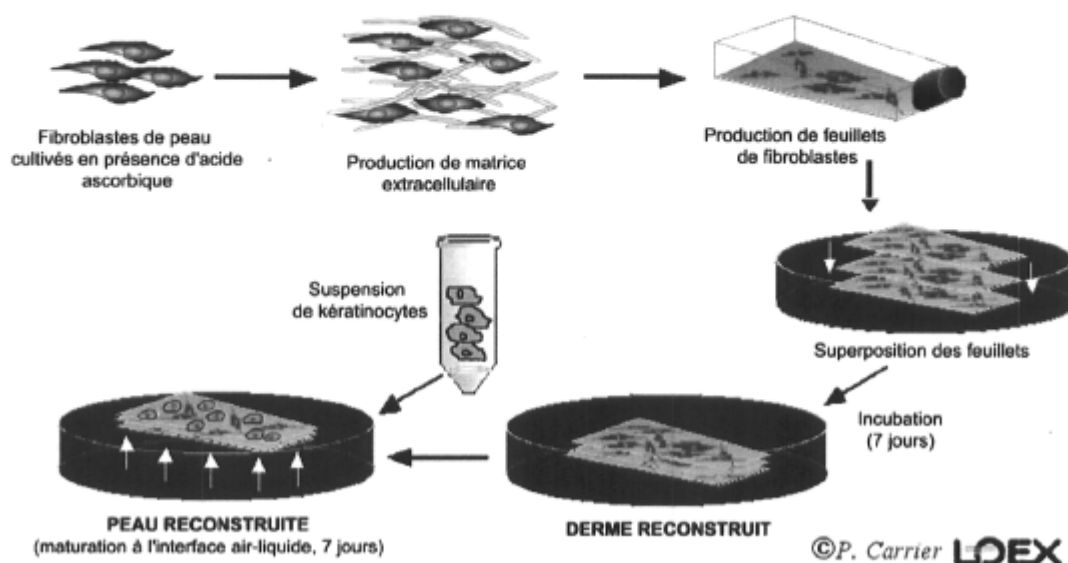


FIGURE 1.17 Reconstruction *in vitro* de peau humaine par la méthode d'auto-assemblage.

Schéma représentant les différentes étapes lors de la reconstruction d'une peau humaine en laboratoire avec la méthode d'auto-assemblage. (Modifié de Germain, 2004 (293)).

1.3.2.5.4 Culture des cellules épithéliales cornéennes humaines et problèmes rencontrés

Comme précédemment mentionné, une des étapes les plus importantes pour la reconstruction de tissus en laboratoire est l'isolement et la culture des cellules du tissu d'origine. Il arrive cependant que des problèmes surviennent lors de la culture de certaines populations cellulaires. Les cultures primaires de cellules épithéliales provenant de cornées humaines (CECH) font partie de ces populations cellulaires problématiques. En effet, la culture *in vitro* de ces cellules présente quelques difficultés (134, 290). Il a été effectivement observé par diverses équipes, une grande variabilité dans les capacités

prolifératives des CHEC obtenues des limbes de différents donneurs. Ainsi, certaines cultures de CECH ne peuvent être maintenues au-delà de 3 ou 4 passages avant d'entrer en différenciation terminale, alors que d'autres peuvent être cultivées jusqu'à 7 ou 8 passages (139, 140, 290). Plus précisément, les cellules isolées du limbe peuvent engendrer en moyenne jusqu'à 23 doublements de population *in vitro*, ce qui correspond à 4 ou 5 passages dépendamment du nombre de cellulesensemencées (140). Or, cette variabilité a également un impact sur la capacité de ces cellules à générer un épithélium correctement stratifié, puisque celui-ci dépend en grande partie de l'adhésion, de la prolifération et de la différenciation des CECH sur le stroma reconstruit (301). Il est donc primordial d'étudier plus en détails ce phénomène afin de pouvoir éventuellement isoler des cellules épithéliales de qualité pour la reconstruction de cornée *in vitro* pouvant être greffées.

Il est bien connu que les différents processus cellulaires menant à la différenciation terminale des cellules sont contrôlés au niveau transcriptionnel, plus spécifiquement, dans la variation de l'expression de certains gènes. Ceux-ci codent entre autres pour des protéines contrôlant le cycle cellulaire ou encore pour des récepteurs membranaires (appartenant à la famille des intégrines) importants pour l'adhérence des cellules, tels que les intégrines. Ce contrôle a lieu par l'entremise des facteurs de transcription, où Sp1 et Sp3 sont des candidats parfaits, puisque ces derniers sont reconnus pour moduler l'expression de gènes impliqués dans l'adhésion, la prolifération et la différenciation cellulaire (302).

1.3.2.5.5 Facteurs de transcription : la famille Sp

L'initiation de la transcription des ARNm est le site principal du contrôle de l'expression des gènes chez les eucaryotes (303). Toutes les protéines nécessaires à cette initiation, autres que les ARN polymérases, sont définies comme des facteurs de transcription. Plusieurs de ces facteurs agissent en reconnaissant directement des séquences cis-régulatrices au niveau des régions promotrices des gènes. Cependant, la liaison à l'ADN

n'est pas toujours requise pour l'action d'un facteur de transcription. Un facteur de transcription peut soit reconnaître un autre facteur de transcription qui lui lie l'ADN directement, ou reconnaître directement l'ARN polymérase (304). Les facteurs de transcription spécifiques Sp sont des intégrateurs clefs du contrôle transcriptionnel. Ils exercent des activités transactivatrices ou inhibitrices distinctes modulées par des modifications post-traductionnelles. Ils sont impliqués dans le contrôle de l'expression de multiples gènes, lors du cycle cellulaire et sont eux-mêmes contrôlés par des composants de la machinerie du cycle (303).

Parmi ces protéines nucléaires, le facteur de transcription Sp1 (Specific protein-1) est certainement un facteur clé pour la survie des cellules. Il fut le premier facteur de transcription, provenant d'un mammifère, à être cloné et purifié (305, 306). Le facteur Sp1 fait partie d'une famille de facteur de transcription qui inclut également 7 autres protéines, Sp2 à Sp8 (307). La famille Sp a récemment été classée comme étant un sous groupe de la grande famille des facteurs de transcription Sp/XKLF, qui comprend au moins 15 autres membres possédant tous une affinité pour les sites de liaison GC et GT situés sur l'ADN (308, 309). En effet, les facteurs de transcription de la famille Sp reconnaissent une séquence riche en résidus guanines et cytosines, GGGGCGGGG ainsi qu'une séquence riche en résidus guanines et thymidines, GGGTGTGGG (310). La boîte GC, par exemple, est localisée en principe entre la boîte TATA et la boîte CCAAT. Sa séquence permet la fixation du facteur de transcription Sp. Cependant, la protéine Sp ne se lie pas forcément de manière égale à toutes les boîtes GC. En effet, ces séquences seraient sensibles à la méthylation au niveau de leur cytosine (311).

Les membres de la famille Sp comportent des éléments répétitifs avec une forme en doigt de gant, leur permettant de lier l'ADN. Ces facteurs peuvent contenir de nombreux doigts. Ces derniers sont généralement organisés comme une série de répétitions en tandem allant jusqu'à 9 répétitions qui occupent toute la protéine. Ainsi, la protéine Sp1, qui se fixe sur les boîtes GC, possède trois doigts de zinc de type Cys₂-His₂, un motif qui doit son nom

à la boucle d'acides aminés présente au niveau du site d'adhésion. L'ion Zn^{2+} sert à stabiliser le motif sous forme de doigt (figure 1.18). La partie C-terminale de chaque doigt de zinc forme des hélices alpha qui lient l'ADN, et la partie N-terminale forme des feuillets bêta. La partie non conservée en C-terminal de chaque doigt est responsable de la reconnaissance spécifique de séquences d'ADN au niveau des gènes cibles (304). Des études comparant les domaines de liaison à l'ADN, sur les trois doigts de zinc de chacun des membres de la famille Sp, ont démontré que Sp1, Sp3 et Sp4 présentent beaucoup de ressemblances comparativement à Sp2 (310). De plus, Sp2 ne semblerait pas reconnaître les sites riches en GC mais plutôt les éléments riches en GT (312).

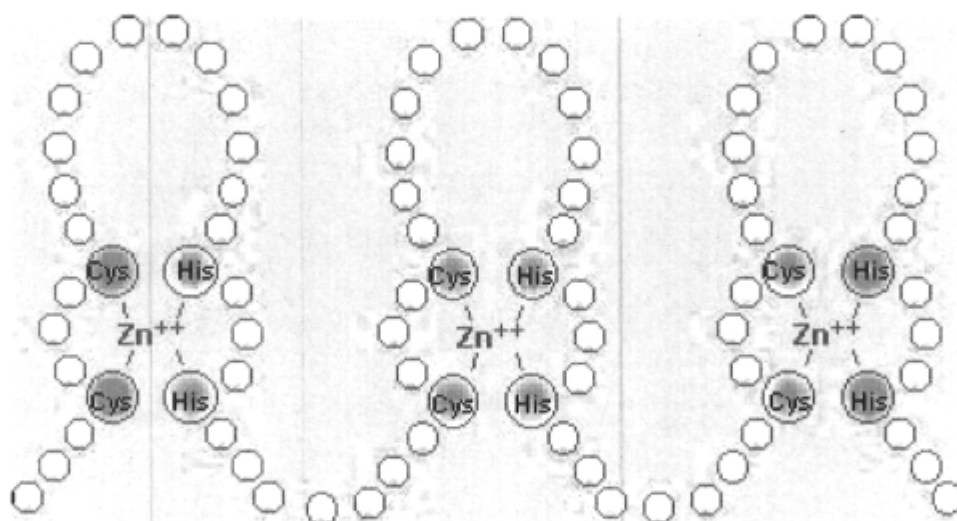


FIGURE 1.18 Doigts de zinc.

Le facteur de transcription Sp1 possède trois doigts de zinc de type Cys_2-His_2 , un motif qui doit son nom à la boucle d'acides aminés présente au niveau du site d'adhésion. La partie non conservée en C-terminal de chaque doigt est responsable de la reconnaissance spécifique de séquences d'ADN au niveau des gènes cibles. (Figure tirée du site : www.infobiogen.fr/services/chromcancer/Deep/TranscripFactorsID20043.html).

Les facteurs Sp possèdent des patrons d'expression très différents. En effet, certains, dont Sp4, Sp5, Sp7 et Sp9 ne sont exprimés que dans certains tissus ou durant une période bien spécifiques. Ainsi, ces facteurs sont présents dans les tissus neuronaux au niveau du

cerveau (Sp4) (313), durant l'embryogenèse (Sp5 et Sp9) (314), dans les os en développement (Sp7) ou au niveau du système reproducteur masculin (Sp6) (315). Pour ce qui est des autres, tels que Sp1 et Sp3, ils sont exprimés dans plusieurs sinon tous les tissus des mammifères (316). La littérature parle donc de ces protéines comme étant des facteurs de transcription ubiquitaires (317). Des variations dans l'expression de Sp1 et Sp3 peuvent avoir d'importantes conséquences sur la transcription des gènes qu'ils contrôlent, surtout en considérant le fait que Sp3, dans certains cas, active la transcription et dans d'autres, l'inhibe. D'ailleurs, plusieurs études rapportent la variation du ratio Sp1/Sp3 selon différentes conditions cellulaires (309, 318).

Les facteurs de transcription de la famille Sp ont un rôle important pour la survie des cellules puisqu'ils contrôlent l'expression de plusieurs gènes responsables de leur bon fonctionnement. Parmi ces gènes, se retrouve ceux codant pour les molécules d'adhésion de la famille des intégrines, qui sont bien connus pour leurs rôles essentiels dans les processus cellulaires de migration et d'adhésion. En effet, il a été rapporté que l'expression de plusieurs sous-unités d'intégrines, incluant α_2 (319), α_5 (320), α_6 (321), β_2 /CD18 (322), CD11d (323), α IIb (324), α_v (325), β_3 (326) et β_5 (327), est modulée par le facteur de transcription Sp1 et même parfois Sp3 (325, 327). Sp1 contrôle également l'expression de la kératine 3 chez le lapin (328, 329).

Sp1 est aussi étroitement associé à la progression dans le cycle cellulaire. En effet, en contrôlant l'expression de gènes dont les produits sont des inhibiteurs du cycle cellulaire, Sp1 pourrait ainsi contribuer à l'arrêt de la prolifération cellulaire (330). De plus, il a été démontré que Sp1 interagit directement avec de nombreuses protéines nucléaires requises dans le contrôle du cycle cellulaire dont la cycline D1, p21, p27, et le rétinoblastome (Rb) (331-335) ainsi que les protéines qui lui sont associées, telles que p107 (336), E2F-1 (337) et p53 (302, 338). Sp1 est principalement exprimé durant la phase G1 du cycle cellulaire (339). Il est ensuite dégradé par un processus de protéolyse dépendant du protéasome avant l'entrée en phase S du cycle. Le site de clivage serait situé sur un site

désigné « boîte Sp » qui est conservé chez les facteurs Sp1 à Sp8 (309). L'action de dégradation serait modulée par la phosphorylation, mais surtout par l'état de glycosylation de ce facteur (340). En effet, la glycosylation des résidus sérines/thréonines portés par certaines protéines, telles que Sp1, contribuerait à prévenir leur dégradation par le protéasome (340). Il a également été rapporté que la phosphorylation de Sp1, sur un résidu thréonine du second doigt de zinc, l'empêche de se lier à l'ADN et inhibe ainsi la transcription de plusieurs gènes (341). D'autres études ont démontré une augmentation de la phosphorylation de Sp1 dans des cellules différenciées provenant du foie comparativement aux cellules moins différenciées ou en régénération (342). Cette augmentation de la phosphorylation de Sp1 favoriserait aussi sa dégradation (343). Finalement Sp1 et Sp3 contrôlent également la transcription de plusieurs cytokines, telles que l'EGF, le TGF- β , le PDGF, le VEGF et le FGF (302, 344-348).

Partie 4 : La Peau

1.4.1 Caractéristiques et fonctions de la peau

La peau, avec une superficie variant de 1.5 à 2.0 m², est le plus grand organe du corps humain. Elle en couvre la totalité et protège nos organes internes des différents éléments agressants de l'environnement. La peau pèse environ 4 kg chez l'adulte moyen, ce qui en fait l'organe le plus lourd de l'organisme. Son épaisseur varie de 0.5 à 4 mm et plus selon la région anatomique. La peau est également appelée tégument, ce qui signifie couverture, mais en considérant ses nombreuses fonctions, il est évident qu'elle représente bien davantage qu'une simple enveloppe protectrice. En effet, divers rôles lui sont reconnus. La peau remplit donc plusieurs fonctions dont la protection contre les agressions chimiques, physiques et biologiques, l'élimination de déchets azotés par l'intermédiaire de la sueur, le contrôle de la température corporelle ainsi que la perception du milieu extérieur grâce aux nombreuses terminaisons nerveuses. De plus, elle possède une fonction immunitaire importante et synthétise de la vitamine D lorsqu'elle est irradiée par des rayons ultraviolets (4).

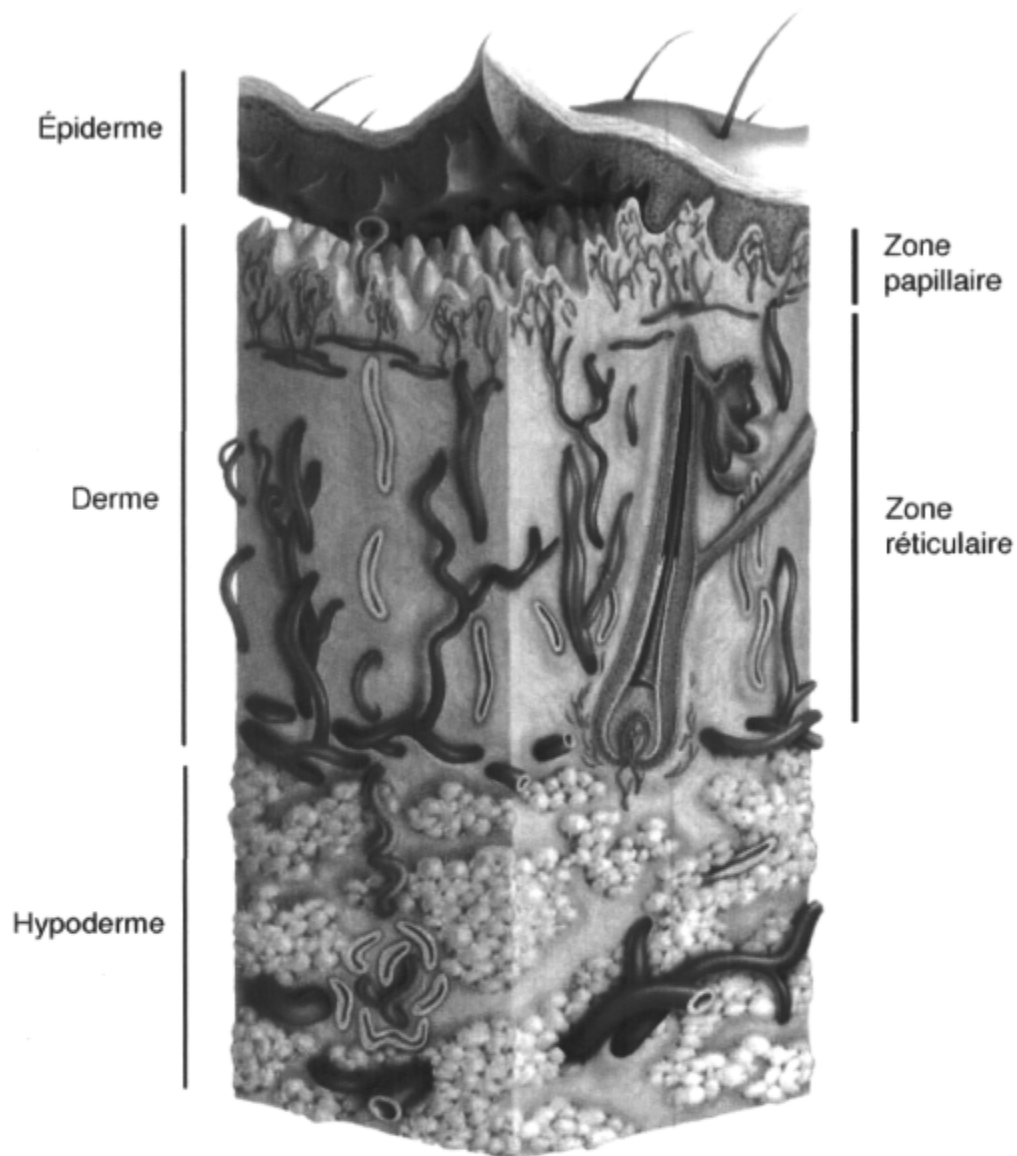


FIGURE 1.19 *Histologie de la peau humaine.*

Schéma permettant de distinguer les trois couches de la peau humaine : l'épiderme, le derme et l'hypoderme. Le derme comporte deux zones différentes: papillaire et réticulaire (Adapté de Geras, 1990 (52)).

1.4.2 Composition de la peau

La peau est formée de trois couches principales, l'épiderme, le derme et l'hypoderme (figure 1.19). L'épiderme et le derme sont solidement soudés l'un à l'autre par une surface ondulée: la membrane basilaire qui a été précédemment décrite dans la section traitant de l'histologie de la cornée. L'épiderme, majoritairement composé de cellules épithéliales, est la principale structure protectrice du corps. Le derme, pour sa part, est sous-jacent à l'épiderme. Cette couche résistante est une composante indispensable au sein de la peau en raison de son élasticité et de sa souplesse. Le tissu sous-cutané, qui se trouve juste en dessous du derme, est appelé hypoderme. Il constitue la partie la plus profonde de la peau. Il s'agit d'une couche d'épaisseur variable constituée de tissu conjonctif lâche et de tissu adipeux. Près de la moitié des graisses emmagasinées par l'organisme se situe dans ces cellules adipeuses. L'hypoderme relie le derme aux structures sous-jacentes afin de lui permettre de bouger et de s'étirer pour s'adapter aux mouvements de ces structures. En raison de sa composition grasseuse, il est en mesure d'absorber les chocs et d'isoler les tissus plus profonds de l'organisme en prévenant les pertes de chaleur.

1.4.2.1 Épiderme

En contact avec le milieu extérieur, l'épiderme est constitué d'un épithélium pavimenteux stratifié et kératinisé qui se renouvelle continuellement. Son épaisseur moyenne varie de 60 à 100 μm (349). Il est composé de quatre types de cellules et de quatre couches distinctes.

1.4.2.1.1 Cellules de l'épiderme

L'épiderme contient quatre types cellulaires: les mélanocytes, les cellules de Langerhans, les cellules de Merkel et les kératinocytes qui sont les cellules présentes en plus grand nombre dans l'épiderme.

Les mélanocytes sont des cellules spécialisées qui contiennent et synthétisent un pigment qui se nomme la mélanine. Ils se retrouvent dans les couches profondes de l'épiderme. Ils ont une forme étoilée avec de nombreux prolongements permettant d'entrer en contact avec les kératinocytes de la couche basale de l'épiderme. La mélanine se forme à l'intérieur de granules appelés mélanosomes. Ces granules cytoplasmiques migrent vers les prolongements des mélanocytes afin d'expulser la mélanine par exocytose dans le liquide interstitiel. Les kératinocytes absorbent alors le pigment et se colorent. Les granules de mélanine s'accumulent sur la surface superficielle du noyau des kératinocytes et forment ainsi une sorte de barrière pigmentaire qui protège le noyau de la cellule des effets néfastes des rayons ultraviolets du soleil.

Les prolongements des cellules de Langerhans leur confèrent une forme étoilée. Ces cellules sont produites dans la moelle osseuse avant de migrer vers l'épiderme. Ce sont des macrophages qui contribuent à l'activation des cellules du système immunitaire. En effet, elles phagocytent et présentent les antigènes aux lymphocytes T qui amorcent la réaction immunitaire.

Dans la peau glabre, se retrouvent également un petit nombre de cellules de Merkel à la jonction de l'épiderme et du derme. Ces cellules hémisphériques sont rattachées aux kératinocytes par des desmosomes et chacune d'elles est étroitement liée à la terminaison d'une neurofibre sensitive, en forme de disque, appelée disque de Merkel. Cette structure joue un rôle de récepteur sensoriel du toucher.

Les kératinocytes, quant à eux, forment 95% de la population épidermique. Le rôle principal de ces cellules consiste à produire la kératine, une protéine fibreuse et insoluble dans l'eau qui confère aux cellules de l'épiderme leurs propriétés protectrices. De plus, les kératinocytes sont étroitement reliés les uns aux autres par des desmosomes, des contacts intercellulaires qui lient les cellules ensemble. Les desmosomes servent de sites d'ancrage pour les filaments intermédiaires (kératines) qui forment un réseau structural à l'intérieur du cytoplasme. À travers les desmosomes, les filaments intermédiaires des cellules adjacentes sont connectés indirectement de façon à former un réseau continu à travers l'épiderme. Les kératinocytes assurent donc la protection du corps contre les agressions en maintenant la cohésion de l'épiderme grâce à leur cytosquelette et aux systèmes de jonction qui forment une barrière entre les milieux intérieur et extérieur (4).

Les kératinocytes proviennent de cellules se divisant de façon quasi continue par mitose et qui sont situées dans la partie la plus profonde de l'épiderme. À mesure que les kératinocytes sont poussés vers la surface de la peau par les nouvelles cellules, ils commencent à produire des kératines qui vont devenir les constituants majeurs des cellules. Les kératinocytes meurent pendant leur migration vers la surface de l'épiderme et ne deviennent guère plus que des membranes plasmiques remplies de kératine. Ainsi, notre épiderme se renouvelle tous les 35 à 45 jours, c'est-à-dire le laps de temps entre la naissance d'un kératinocyte dans la couche profonde de l'épiderme et sa disparition à la surface de la peau. L'épiderme sain est donc en mesure de maintenir son intégrité puisque la desquamation est comblée par la production de nouveaux kératinocytes.

1.4.2.1.2 Couches de l'épiderme

La différenciation progressive des kératinocytes de la couche basale vers la surface de l'épiderme s'accompagne d'une multitude de changements cellulaires. La kératinisation est l'un des principaux changements. Cela consiste en l'expression, la synthèse,

l'organisation des diverses kératines, leurs interactions avec d'autres protéines et leurs modifications tout au long de la différenciation (350, 351). Les kératinocytes subissent également des changements morphologiques témoignant de leur kératinisation. Ceci permet donc de distinguer principalement quatre couches de kératinocytes à l'intérieur de l'épiderme : la couche germinative (ou basale), la couche à épines (ou épineuse), la couche granuleuse et la couche cornée (Figure 1.20).

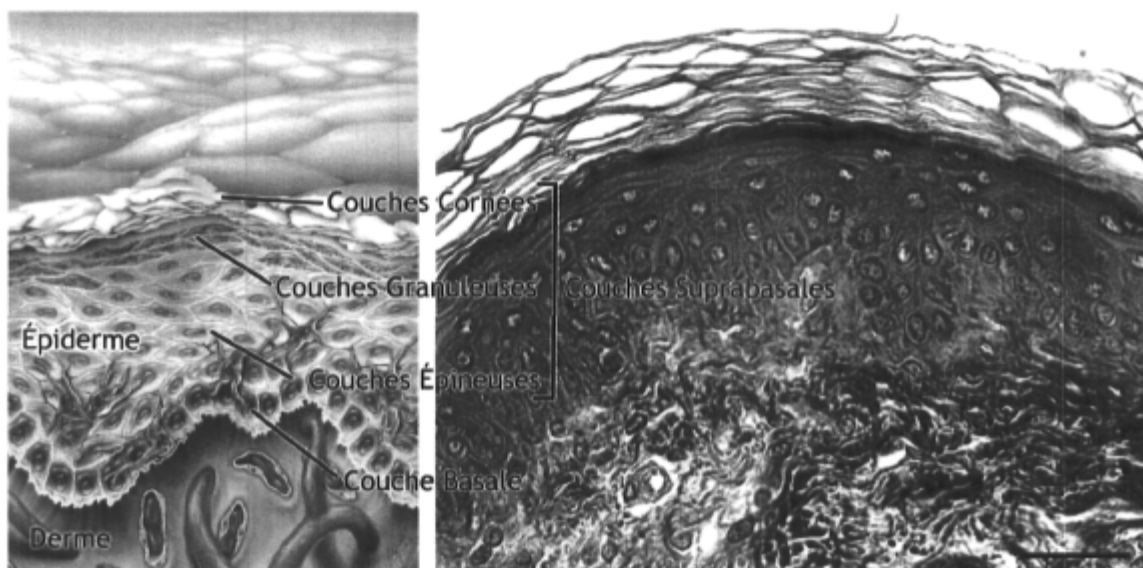


FIGURE 1.20 Couches de l'épiderme.

Schéma de la peau humaine représentant les quatre couches principales de l'épiderme : basale, épineuse, granuleuse et cornée et coupe histologique de la peau colorée au trichrome de Masson. (Adapté de Geras, 1990 et gracieuseté de D. Larouche).

1.4.2.1.2.1 La couche basale (*stratum germinativum*)

La couche basale, aussi appelée couche germinative, constitue la partie la plus profonde de l'épiderme; elle est séparée du derme par la membrane basilaire. Elle est principalement composée d'une seule épaisseur cellulaire dont la majorité sont des kératinocytes cylindriques ou cuboïdes. Ces cellules s'attachent à la membrane basilaire sous-jacente par des hémidesmosomes ou à d'autres kératinocytes par des desmosomes. C'est dans cette couche que les kératinocytes peu différenciés (cellules souches) se divisent, certains restent dans la couche basale tandis que d'autres migrent dans les couches suprabasales. Ces cellules en mitose se localisent majoritairement dans le creux des crêtes épidermiques ainsi qu'à l'intérieur des annexes cutanées (284). Ainsi, la forte activité mitotique des cellules qui composent la couche basale assure le renouvellement de l'épiderme. La couche basale contient aussi près de 25% de mélanocytes. Les prolongements de ces cellules s'étendent entre les kératinocytes, pouvant même atteindre la couche épineuse. La couche basale contient également quelques cellules de Merkel (3, 4).

Pour ce qui est des marqueurs de différenciation, les kératinocytes de la couche basale de l'épiderme et de la gaine folliculaire externe des follicules pileux expriment principalement K5 et K14 (120, 352). Les cellules souches, quant à elles, expriment les kératines 15 et 19 qui peuvent être ciblées pour marquer cette sous-population de cellules basales (133, 353).

1.4.2.1.2.2 La couche à épines ou épineuse (*stratum spinosum*)

Le *stratum spinosum*, aussi appelée couche épineuse, comprend plusieurs strates (5 à 6) de cellules polyédriques qui s'agencent étroitement les unes avec les autres grâce à de nombreux desmosomes. Ces derniers donnent une apparence épineuse aux cellules lorsque

les membranes cytoplasmiques se rétractent lors des préparations histologiques classiques. Bien que certaines cellules soient en mitose, l'activité mitotique y est moins intense que dans la couche basale. Ces cellules à épines renferment d'épais filaments de kératines appelés tonofilaments (filaments de tension). Elles expriment les kératines de types 1 et 10 qui vont remplacer les types 5 et 14 de la couche basale (352). Les kératinocytes de cette couche présentent également une forme légèrement aplatie et irrégulière. De plus, de nombreuses cellules de Langerhans sont disséminées parmi les kératinocytes, sans toutefois être rattachées aux kératinocytes par des desmosomes. Les cellules de la partie supérieure du *stratum spinosum*, davantage différenciées, ne reçoivent pas assez de nutriments et commencent à être moins viables, un processus de différenciation tout à fait normal (3, 4).

1.4.2.1.2.3 La couche granuleuse (*stratum granulosum*)

La couche granuleuse, constituée de 3 à 5 strates de cellules aplaties, est l'endroit où débute la kératinisation. Cette couche tire son nom des granules qui se trouvent à l'intérieur des cellules et qui contiennent une substance appelée kératohyaline. Ce composé est impliqué dans la formation de la barrière protégeant les couches plus profondes contre les blessures et les invasions microbiennes. En effet, la molécule constituant les grains de kératohyaline est la profilagrine qui, dans la couche cornée, se transforme en filaggrine. La filaggrine est étroitement associée à la kératinisation des cellules de la couche cornée puisqu'elle possède la propriété d'agréger les filaments de kératines. Cette couche contient également un grand nombre de tonofilaments et de kératinosomes, lesquels renferment un glycolipide imperméabilisant. Ce dernier est sécrété dans l'espace intercellulaire afin de limiter la perte d'eau dans les couches épidermiques et sa diffusion vers la surface externe de la peau. La membrane plasmique des kératinocytes de la *stratum granulosum* s'épaissit et devient plus résistante afin de faire des couches supérieures la région la plus résistante de la peau. Les cellules meurent à la lisière supérieure de la couche granuleuse, perdent leurs noyaux et les lysosomes commencent à digérer les organites cytoplasmiques (4). C'est aussi au niveau de cette couche qu'apparaissent les marqueurs de différenciation terminale

de l'épiderme tels que l'involucrine et la loricrine qui sont des précurseurs de l'enveloppe cornée ceinturant les cornéocytes (354-357).

1.4.2.1.2.4 La couche cornée (*stratum corneum*)

Cette couche, la plus superficielle de l'épiderme, est constituée de 20 à 30 strates de cellules qui occupent environ le trois quarts de l'épaisseur de l'épiderme. Les kératinocytes de cette couche, qui prennent maintenant le nom de cornéocytes, sont morts (perte du noyau et organelles) et entièrement remplis de fibrilles de kératines. Ces kératines sont des protéines résistantes et imperméables dont la présence abondante dans la couche cornée permet à cette dernière de fournir au corps une enveloppe qui résiste à l'abrasion, protège les cellules plus profondes des agressions de l'environnement (pénétration de substances chimiques et de bactéries) et prévient la perte de liquide. Il y a également formation de l'enveloppe cornée, qui est formée d'un polymère de protéines (358). Elle provient donc de l'agencement de plusieurs précurseurs apparus dans la couche granuleuse et qui deviennent fonctionnels dans la couche cornée.

1.4.2.2 Le derme

Le derme est constitué de tissu conjonctif, à la fois résistant et flexible, qui procure les propriétés mécaniques à la peau. Plusieurs types cellulaires tels que des fibroblastes, des macrophages, des cellules endothéliales et à l'occasion, des mastocytes et des globules blancs y sont retrouvés. Sa matrice extracellulaire contient une grande quantité de collagène, d'élastine et de réticuline. Le derme est aussi riche en neurofibres, en vaisseaux sanguins et en vaisseaux lymphatiques. La majeure partie des follicules pileux ainsi que les glandes sébacées et sudoripares y résident. Le derme est séparé en deux régions, soit la zone papillaire et la zone réticulaire (figure 1.19).

1.4.2.2.1 La zone papillaire

Située juste en dessous de la membrane basilaire, la zone papillaire est une mince couche de tissu conjonctif lâche formée de fibres entrelacées qui permettent le passage de nombreux vaisseaux sanguins ainsi que de neurofibres. La partie supérieure contient les papilles du derme dont certaines sont pourvues de bouquets capillaires, tandis que d'autres abritent des terminaisons nerveuses libres (récepteurs de la douleur) et des récepteurs du toucher (corpuscules de Meissner). La zone papillaire est riche en collagène type III, organisé en petits faisceaux composés de fibrilles de petits diamètres.

1.4.2.2.2 La zone réticulaire

La zone réticulaire, plus profonde, occupe environ 80% du derme et est formée de tissu conjonctif dense sans aucune orientation préférentielle. Elle renferme des faisceaux formés de fibres de collagène enchevêtrées (majoritairement collagène de type I), orientées dans toutes les directions et parallèles à la surface de la peau. La zone réticulaire contient aussi des fibres réticulées et des fibres élastiques. Ce sont ces fibres de collagènes et élastiques qui confèrent à la peau sa résistance et son élasticité. De plus, les glycosaminoglycanes présents entre les fibres de collagènes fixent l'eau et contribuent ainsi à l'hydratation de la peau.

Les fibroblastes constituent la population cellulaire principale du derme. Comme les fibroblastes cornéens, ce sont de grandes cellules fusiformes possédant de longs prolongements cytoplasmiques. Les fibroblastes dermiques, d'origine mésenchymateuse, sécrètent la majorité des molécules constituant la matrice extracellulaire notamment les collagènes, l'élastine, les glycoprotéines de structure et des facteurs de croissance mais aussi des protéinases capables de dégrader et de remodeler cette matrice telles les métalloprotéinases matricielles (359).

Partie 5 : Rôle des fibroblastes au niveau de l'homéostasie de la cornée et de la peau

Après avoir revu en détail l'histologie de la cornée et de la peau, il est clair que ces deux tissus, d'origine ectodermale, présentent des différences majeures au niveau de la composition et de la structure de leur épithélium (figures 1.4, 1.20). En effet, l'épithélium cutané est fait de 15 à 20 strates de cellules séparées en quatre couches distinctes: la couche germinative (ou basale), la couche à épines (ou épineuse), la couche granuleuse et la couche cornée. L'épithélium cornéen, quant à lui, est composé de seulement 5 à 6 strates de cellules divisées en trois principaux types cellulaires se distinguant les unes des autres par leur morphologie: les cellules basales, les cellules ailées et les cellules superficielles. Puisqu'il n'y a pas de couche granuleuse et de couche cornée, l'épithélium de la cornée est donc considéré comme étant moins différencié que celui de la peau. Dans ces deux tissus, l'épithélium est renouvelé de façon constante grâce à la présence des cellules souches (116, 143). À la suite de leur différenciation et leur prolifération, ces cellules produisent un grand nombre de cellules plus différenciées qui vont, à leur tour, proliférer et se différencier afin de régénérer la population cellulaire (119). Le maintien des fonctions et de l'architecture histologique de ces épithélia est donc dépendant d'un bon contrôle permettant l'équilibre entre la prolifération et la différenciation des cellules épithéliales. Cependant, les mécanismes qui contrôlent ces processus cellulaires dans les tissus adultes ne sont pas encore bien compris. Or, il est bien possible qu'ils soient similaires à ceux impliqués lors du développement de l'embryon.

Plusieurs études ont démontré que, durant le développement embryonnaire, le mésenchyme joue un rôle important dans l'implantation initiale de l'histo-architecture. En plus de servir de support pour sa différenciation, le mésenchyme contrôle le développement de l'épithélium en croissance en y exerçant une certaine influence (360-363). En effet, pendant l'embryogenèse, la différenciation de l'épiderme est habituellement dépendante de son association avec le derme (364, 365). De plus, durant le développement de l'œil, les

interactions entre les différents tissus jouent des rôles essentiels pour certaines étapes bien spécifiques menant à la morphogenèse et la maturation de la cornée (9, 366). Par conséquent, lors de l'organogenèse embryonnaire, les interactions entre le mésenchyme et l'épithélium semblent être extrêmement importantes puisqu'elles contrôlent la prolifération et la différenciation des cellules épithéliales (367-369). Cependant, le rôle exact de ces interactions pour le maintien de l'homéostasie des tissus adultes restent encore à être approfondi. Par exemple, très peu d'informations sont connues sur le contrôle de l'épaisseur de l'épithélium de la peau et de la cornée. En effet, tout au long de la vie, ces tissus présentent normalement une remarquable stabilité de leurs propriétés histologiques. L'épaisseur de leur épithélium reste uniforme et le nombre de strates de cellules est également constant.

Pour expliquer une telle stabilité du phénotype épithélial dans les tissus adultes, deux hypothèses ont été proposées (370). Premièrement, malgré les similarités morphologiques de leurs cellules basales ainsi que leur origine embryonnaire commune, ces épithélia ont peut-être divergé irréversiblement l'un de l'autre durant leur développement. Ceci a donc mené à deux programmes de différenciation différents. Deuxièmement, il se peut que les cellules basales aient le même potentiel mais que leur différenciation distincte *in vivo* soit attribuable à une certaine influence provenant du derme/stroma adjacent. Toutefois le rôle des interactions épithélium-stroma chez l'adulte a été beaucoup moins étudié que celui des interactions épithélium/mésenchyme chez l'embryon. En effet, même si plusieurs données suggèrent effectivement que le stroma contribue à maintenir la structure ainsi que la fonction de l'épithélium (371-375), les mécanismes par lesquels il s'y prend sont moins bien définis.

Un des modèles actuellement proposé pour expliquer cette influence du stroma, implique la transmission de substances diffusibles. Durant les dernières années, différentes études ont démontré l'importance des interactions épithélium/stroma contrôlées par des facteurs solubles pendant le développement et la guérison de tissus comme la peau et la

cornée (376, 377). De plus, des efforts considérables ont été faits pour tenter de clarifier le rôle des cytokines dans l'homéostasie de ces deux tissus. En effet, quelques données suggèrent que les interactions entre le stroma/derme et l'épithélium pourraient contrôler, par l'entremise d'un échange de cytokines, l'homéostasie de l'épithélium cutané et cornéen (367, 377-379). Cependant, plusieurs travaux devront être réalisés afin de confirmer ces résultats et d'identifier les facteurs impliqués. Ces facteurs, en permettant un bon équilibre entre la prolifération et la différenciation des cellules épithéliales, s'assureraient de maintenir l'architecture adéquate des épithélia.

L'importante influence du stroma sur la croissance des cellules épithéliales *in vivo* est également suggérée par diverses études rapportant que des facteurs provenant de tissus conjonctifs ou de fibroblastes stimulent la croissance de l'épithélium *in vitro* (265, 373, 380). Par la suite, afin d'étudier en détail cette influence du tissu conjonctif, des recherches plus récentes ont démontré l'importance de facteurs solubles dérivés des fibroblastes dans le contrôle de la prolifération et de la différenciation des cellules épithéliales (381, 382). En effet, il a été montré que les cellules épithéliales de peau sécrètent l'interleukine 1, qui induit, entre autre, l'expression par les fibroblastes du KGF et du HGF qui, à leur tour, agissent sur les cellules épithéliales (379, 383-385). Toutefois, ces travaux n'ont pas été en mesure de démontrer que ces facteurs participaient à un contrôle de l'épaisseur constante de l'épiderme. Ces résultats ont été obtenus, dans la majorité des cas, en utilisant des modèles *in vitro*, dont un équivalent de peau reconstruit par génie tissulaire. Dans ce modèle, les kératinocytes épidermiques se développent sur une matrice de collagène dans laquelle des lignées de fibroblastes cutanés murins ou humains sont incluses (383).

Alors que l'influence des fibroblastes sur la prolifération et la différenciation des cellules épithéliales a été étudiée de façon approfondie dans la peau (374, 386-388), très peu d'information quant au rôle des fibroblastes dans l'homéostasie de l'épithélium cornéen est disponible. En effet, seule une étude récente a tenté de mieux comprendre le rôle de l'IL-1 dans la cornée (197, 377), d'autres investigations sont clairement nécessaires

afin de découvrir et mieux documenter le réseau de cytokines contrôlant l'homéostasie de la cornée. D'autres cytokines, encore non identifiées, pourraient être libérées par l'épithélium ou le stroma pour le contrôler des processus cellulaires de prolifération et de différenciation. De plus, il serait intéressant d'identifier, s'ils existent, des facteurs affectant simultanément l'homéostasie des épithélia cutané et cornéen.

Différentes autres approches ont également été développées afin de démontrer l'influence du stroma sur la différenciation des cellules épithéliales. Plusieurs études *in vivo* et *in vitro* ont utilisé des recombinaisons épithélium-mésenchyme/stroma homotypiques et hétérotypiques. Ainsi, il a été possible d'observer que des épithélia provenant d'embryons et prélevés à différents endroits peuvent être transdifférenciés. Ils présentent alors de nouveaux phénotypes épithéliaux selon le type et la provenance du mésenchyme embryonnaire ou néonatal avec lequel ils ont été recombinaisonnés (364, 371, 373, 389-394). Quelques expériences ont aussi démontré que le mésenchyme ou le stroma peuvent induire des changements dans la morphologie, la différenciation et la croissance de cellules épithéliales adultes (392, 395-398). Ainsi des épithélia adultes peuvent répondre aux stimuli provenant du mésenchyme embryonnaire et du stroma adulte. Cependant, les expériences *in vivo* et *in vitro* impliquant des recombinaisons épithélium-mésenchyme/stroma homotypiques et hétérotypiques sont très difficiles à réaliser étant donné la complexité élevée des conditions expérimentales. Il est difficile d'étudier les interactions épithélium-mésenchyme/stroma dans de tels modèles puisqu'ils comportent de nombreuses limitations incluant les risques de contamination du système par des cellules épithéliales ou stromales de l'hôte, ainsi que la présence des facteurs systémiques de la circulation. De plus, il est difficile d'identifier les facteurs impliqués dans des systèmes aussi complexes.

Partie 6 : Problématique et objectifs de recherche

1.6.1 Objectifs du projet de recherche

Chaque année, des milliers de personnes en Amérique du Nord subissent une perte de vision à la suite des traumatismes divers. Près de 23% des consultations en cliniques ophtalmologiques concernent des lésions de la cornée. La majorité de ces lésions sont dues à des blessures mécaniques, des infections, des brûlures chimiques ou des dystrophies héréditaires. Quelles soient superficielles ou profondes, une guérison déficiente de ces lésions peut provoquer la formation de cicatrices diminuant ainsi l'acuité visuelle et entraînant même parfois la cécité, à la suite d'une opacification de la cornée. Plusieurs traitements sont disponibles, dont la greffe de cornée, mais ceux-ci comportent encore des risques sérieux et une pénurie de cornées utilisées pour fins de greffe est anticipée dans les prochaines années. De plus, lorsque le patient souffre d'une déficience en cellules souches épithéliales, le taux de succès des greffes de cornée conventionnelles (greffe de la cornée centrale seulement) diminue puisqu'il n'y a pas de renouvellement de l'épithélium cornéen à long terme. Ces traitements présentent donc certaines limites et ne peuvent pas toujours restaurer la qualité de vie des patients au niveau souhaité. Dans ce contexte, il devient donc important de trouver des alternatives pouvant se substituer aux cornées post-mortem utilisées lors des greffes de cornées. L'utilisation d'une cornée humaine reconstruite *in vitro* à partir de cellules humaines pourrait, pour certains patients, constituer une solution de rechange intéressante à la greffe de cornée. En effet, la mise au point d'un modèle tridimensionnel de la cornée humaine par génie tissulaire ouvrirait la voie à d'importantes applications tant expérimentales que cliniques.

Le but ultime du programme de recherche est donc de reconstruire, avec la méthode d'auto-assemblage, une cornée à partir de cellules cornéennes humaines et sans l'ajout de protéines exogènes de la matrice extracellulaire afin de l'utiliser comme modèle

expérimental et éventuellement comme greffon pour des patients dans le futur. Cependant, plusieurs aspects importants devaient faire l'objet d'études approfondies afin d'évaluer le potentiel de réussite à long terme des greffes de cornées reconstruites sur les patients.

En effet, étant donné l'importance d'avoir un épithélium d'une épaisseur régulière et stable, il était essentiel d'étudier différents paramètres se rapportant à cette partie de la cornée reconstruite. Les trois objectifs spécifiques de cette thèse sont : 1) étudier les facteurs de transcription qui contrôlent la qualité des cellules épithéliales servant à la production des équivalents cornéens, 2) évaluer la guérison de l'épithélium des cornées reconstruites et 3) mieux comprendre le rôle des fibroblastes dans le maintien de l'homéostasie des épithélia cornéens et cutanés.

En premier lieu, dans l'optique que les cornées reconstruites *in vitro* seront éventuellement greffées chez les patients, il était primordial de trouver une façon d'identifier très tôt les populations de cellules épithéliales capables non seulement de proliférer pendant plusieurs passages mais également en mesure de former un bel épithélium similaire à l'épithélium d'origine. En effet, lors de la reconstruction des cornées en laboratoire, il est essentiel de pouvoir travailler avec des populations cellulaires les plus prolifératives possibles afin d'obtenir un arrangement cellulaire adéquat. Or, une grande variabilité dans la stabilité des différentes cultures de cellules épithéliales de cornées humaines (CECH), servant à la production des cornées reconstruites, a été observée. En effet, comparativement à des populations cellulaires capables d'effectuer plusieurs passages, certaines des cultures de cellules épithéliales présentaient une morphologie de cellules différenciées. De plus, ces cellules semblaient être amenées hâtivement vers un état de différenciation terminale et formaient un épithélium reconstruit de moins bonne qualité, des processus pouvant provenir de l'altération de l'expression de certains facteurs de transcription. Il a donc été proposé, comme hypothèse, que cette variabilité pourrait être due à une altération des facteurs de transcription Sp1 et Sp3, des protéines nucléaires jouant un rôle dans le contrôle de l'expression de gènes dont les produits exercent des fonctions

importantes dans l'adhésion, la prolifération et la différenciation cellulaire. Il est important de mieux comprendre ce phénomène afin d'optimiser la qualité des CECH en culture et la qualité de l'épithélium lors de la fabrication des cornées reconstruites *in vitro*. Dans le but de vérifier cette hypothèse, le premier objectif spécifique était donc d'une part d'évaluer si les variations du potentiel de prolifération des CECH de différents donneurs étaient reliées aux niveaux d'expression des facteurs de transcription Sp1 et Sp3 et d'autre part, d'établir un lien entre l'expression de ces facteurs et la capacité de telles cellules à stratifier correctement sur des cornées reconstruites *in vitro*. D'un point de vue clinique, les résultats de cette étude permettront éventuellement de faire une prédiction dans la sélection des cultures primaires de CECH à utiliser pour la production des cornées reconstruites.

Dans un deuxième temps, il était primordial de s'assurer que l'épithélium des cornées reconstruites soit en mesure de réépithélialiser des plaies avoir été greffées. Le second objectif spécifique était donc de développer un modèle de guérison de plaies cornéennes *in vitro* à partir des cornées reconstruites et de caractériser ce nouveau modèle afin d'en connaître les propriétés, de les comparer avec la littérature et d'en déterminer la valeur pour de futures expériences en recherche fondamentale. Ainsi, des observations macroscopiques, histologiques, immunohistochimiques et ultrastructurales ont été réalisées afin d'étudier notamment l'expression des constituants de la membrane basilaire et de certaines intégrines jouant un rôle important durant la réépithélialisation de la plaie. De plus, une validation du modèle a été effectuée en y ajoutant des produits accélérant la guérison de l'épithélium. Finalement, ce modèle sera éventuellement d'une grande utilité dans la compréhension de la cicatrisation cornéenne, un phénomène encore bien mal compris puisque les travaux faits à ce jour l'ont été sur des modèles animaux. Or ces derniers présentent des limitations en raison de considérations éthiques et possèdent des caractéristiques très différentes de celles de l'humain.

Finalement, le dernier objectif spécifique était d'approfondir la compréhension et les connaissances du rôle des fibroblastes (cellules stromales) dans le contrôle de la

différenciation et de la stratification des cellules épithéliales. Selon la méthode utilisée pour la fabrication des tissus reconstruits, il est bien connu que les fibroblastes ont un rôle majeur dans la sécrétion et le remodelage de la matrice extracellulaire. Par contre, leur implication dans le contrôle de l'homéostasie de l'épithélium cornéen et cutané est encore mal définie. Le modèle de cornée reconstruite *in vitro*, jumelé au modèle de peau reconstruite précédemment développé au laboratoire, a donc été utilisé afin de pousser plus loin la compréhension des interactions entre les différents types cellulaires. Pour ce faire, des observations macroscopiques et histologiques ainsi que des analyses par spectrométrie ont été recueillies afin de comparer l'organisation tissulaire de tissus reconstruits à partir de cellules provenant de cornées et/ou de peaux humaines. De plus, des milieux conditionnés ont également été utilisés afin de déterminer si des facteurs solubles étaient impliqués dans ces interactions. Il est très important d'étudier ce phénomène en se souvenant que les cornées reconstruites greffées devront maintenir constante l'épaisseur de leur épithélium.

En conclusion, les travaux présentés dans cette thèse visaient donc à optimiser les conditions optimales pour la production des cornées reconstruites et à s'assurer que les cornées reconstruites étaient stables *in vitro*, une propriété essentielle avant d'envisager les greffes autologues. Les cornées reconstruites posséderont plusieurs avantages par rapport aux autres modèles développés auparavant (32, 243, 246, 248, 290) : a) l'utilisation de cellules humaines non transformées, b) la possibilité d'interactions entre les différents types cellulaires, c) l'absence de matériel synthétique et de protéines exogènes, d) l'absence de rejet du greffon puisqu'il s'agira d'une greffe autologue. De plus, les cornées humaines reconstruites par génie tissulaire représenteront plus fidèlement ce qui se passe *in situ* et seront de bons modèles pour de futures études fondamentales.

1.6.2 Présentation de la thèse

La suite de ce manuscrit est composée de quatre chapitres. Les chapitres II, III et IV regroupent une partie des travaux que j'ai réalisés au LOEX, présentés sous formes d'articles scientifiques publiés, soumis ou en préparation. Les manipulations effectuées puis la description, l'analyse et la discussion des résultats obtenus y sont retrouvées. Enfin, au chapitre V, une discussion générale et une conclusion souligneront l'apport que ces travaux représentent pour l'optimisation des conditions de culture des cornées reconstruites *in vitro*. Finalement, les perspectives d'études envisageables découlant de ces travaux seront abordées dans ce dernier chapitre. L'annexe A présente la liste des autres publications, publiées ou en préparation, auxquelles j'ai participé durant ma formation ainsi qu'une liste des communications traitant de mes travaux et présentées lors de divers congrès nationaux et internationaux. Les chapitres II, III et IV ont leur propre bibliographie en fin de chapitre. Pour ce qui est des chapitres I et V, la bibliographie complète se trouve à la fin de la thèse.

Chapitre II : Article publié

LA VARIABILITÉ DES CELLULES ÉPITHÉLIALES DE CORNÉES HUMAINES EN CULTURE PRIMAIRE DESTINÉES À LA PRODUCTION DE CORNÉES RECONSTRUITES EST DICTÉE PAR LES FACTEURS DE TRANSCRIPTION SP1 ET SP3

Ce chapitre reproduit le texte intégral d'un article intitulé : Influence of Sp1/Sp3 Expression on Corneal Epithelial Cells Proliferation and Differentiation Properties in Reconstructed Tissues, publié en 2003 dans la revue Investigative Ophthalmology and Visual Science, 44(4) :1447-1457.

2.1 Contribution à l'article

Étant premier auteur à part égale avec Mme Manon Gaudreault, étudiante au doctorat sous la direction du Dr Sylvain Guérin, les manipulations expérimentales ont été séparées en deux volets. Les manipulations relevant de la biologie moléculaire ont été réalisées par Mme Manon Gaudreault. Pour ma part, j'ai participé à la conception et à la réalisation de toutes les expériences de biologie cellulaire, incluant la culture des cellules épithéliales et stromales cornéennes, la production des tissus reconstruits ainsi que les études d'immunofluorescences. J'ai également contribué à la rédaction de certaines parties du manuscrit sous la supervision du Dre Lucie Germain, mais la majeure partie de cet article a été rédigée par les Drs Sylvain Guérin et Lucie Germain.

2.2 Résumé

INTRODUCTION. Les cultures primaires de cellules sont de plus en plus utilisées tant au niveau de la production d'équivalents tissulaire que dans l'expression génique. Cependant, une perte dans l'habilité à proliférer est vite observée lors des passages en culture de ces cellules, qui progressent rapidement vers un état de différenciation terminale, un processus pouvant provenir de l'altération de l'expression de facteurs de transcription ayant un rôle au niveau de l'adhérence cellulaire ainsi qu'au niveau de la différenciation cellulaire. Nous avons donc porté notre attention sur la grande instabilité des cellules épithéliales de cornées humaines (CECHs) et montré un niveau variable dans l'expression des facteurs de transcription Sp1 et Sp3.

MÉTHODOLOGIE. Les CECHs sont prélevées de patients post-mortem et étalées sur des fibroblastes irradiés (Swiss-3T3). L'expression des facteurs de transcription Sp1 et Sp3 est analysée par buvardage Western et par rétention en gel (electrophoretic mobility shift assays (EMSA)). L'influence de Sp1 et de Sp3 dans les CHECs est évaluée par transfection transitoire au chlorure de calcium (CaCl_2) à l'aide d'un plasmide recombinant portant le promoteur du gène PARP dont l'activité est dépendante des protéines Sp1 et Sp3. Les CHECs sont également utilisées dans la production de cornées reconstruites.

RÉSULTATS. Nous avons ainsi démontré que l'expression des facteurs de transcription Sp1 et Sp3 varie considérablement entre chaque culture de CHECs. De plus, l'expression de Sp1 et de Sp3 est reliée à la progression des CHECs vers leur différenciation terminale. Ce qui se traduit par une baisse directe de l'activité du promoteur PARPr-dépendant de Sp1 et Sp3. Finalement, une stratification adéquate des cellules épithéliales sur les équivalents cornéens coïncide avec une légère transcription du promoteur PARPr et un retard dans le pic d'expression des protéines Sp1 et Sp3.

CONCLUSION. L'identification du moment précis auquel l'expression maximale de Sp1 et de Sp3 se produit durant la mise en culture des CECHs pourrait s'avérer un outil puissant dans la sélection des CECHs qui présentent les propriétés adhérentes et prolifératives les

plus adéquate pour la production de substituts tissulaires cornéens reconstruits par génie tissulaire.

2.3 Article

Influence of Sp1/Sp3 Expression on Corneal Epithelial Cells Proliferation and Differentiation Properties in Reconstructed Tissues

Manon Gaudreault,^{1,2} Patrick Carrier,^{2,3} Kathy Larouche,¹ Steeve Leclerc,¹ Marcelle Giasson,⁴ Lucie Germain,³ and Sylvain L. Guérin¹

From the ¹Oncology and Molecular Endocrinology Research Center, and the ⁴Ophthalmology Research Unit, University Hospital Center of Laval (CHUL) Research Center, Québec, Canada; and the ³Laboratory of Experimental Organogenesis, Saint-Sacrement Hospital, University Affiliated Hospital Center (CHA), Laval University, Québec, Canada. ²Contributed equally to the work and therefore should be considered as equivalent first authors.

Corresponding author: Sylvain L. Guérin, Oncology and Molecular Endocrinology Research Center, CHUL, 2705 Laurier Boulevard, Ste-Foy, Québec G1V 4G2, Canada; sylvain.guerin@crchul.ulaval.ca.

Supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada Grant OGP0138624 (SLG), a Canadian Institutes of Health Research grant (LG, SLG), and the vision health network of the Funds for Health Research of Québec (FRSQ). LG is recipient of the Canadian Research Chair on Stem Cell and Tissue Engineering and SLG is a Senior Scholar from the FRSQ. Both MGa and PC held studentships funded by the FRSQ.

2.3.1 Abstract

PURPOSE. Primary cultured epithelial cells are widely used for the production of tissue-engineered substitutes and are gaining popularity as a model for gene expression studies. However, as such cells are passaged in culture, they often lose their ability to proliferate by progressing toward terminal cell differentiation, a process likely to be determined by altered expression of transcription factors that have functions critical for cell adhesion and differentiation. This study was designed to determine whether the variable life span of primary cultured human corneal epithelial cells (HCECs) might be the consequence of varying expression levels of the well-known transcription factors Sp1 and Sp3 (Sp1/Sp3).

METHODS. HCECs were obtained from donor eyes and cultured on irradiated Swiss-3T3. Sp1/Sp3 expression was monitored by Western blot and electrophoretic mobility shift assay (EMSA). The Sp1/Sp3 regulatory influence was evaluated by transfection of HCECs with a recombinant plasmid bearing the Sp1/Sp3-dependent poly(ADP-ribose) polymerase (rPARP) promoter fused to the CAT reporter gene. HCECs that expressed various levels of Sp1/Sp3 were also used for the production of corneal substitutes.

RESULTS. Expression of Sp1/Sp3 was dramatically inconsistent between HCECs isolated from the eyes of different donors. Both factors were highly expressed during one passage and then totally disappeared as cells terminally differentiated. Proper stratification of HCECs on reconstructed tissue substitutes could be obtained only with cells that also had a delayed peak of Sp1/Sp3 expression when cultured *in vitro*.

CONCLUSIONS. Expression of Sp1/Sp3 may represent a good predictor for selecting HCECs that are most likely to proliferate, stratify, and differentiate properly when used for the production of reconstructed corneal substitutes.

2.3.2 Introduction

Primary cultured cells are gaining in popularity in many areas of both clinical and basic research. They are widely used, either alone or in combination with synthetic biomaterials, in the production of tissue-engineered substitutes, a very active emerging field of medical research (reviewed in Ref. ¹). Indeed, new synthetic or bioengineered substitutes capable of upregulating or downregulating biological responses at the tissue–substitute interface are starting to reach clinical application.^{2,3} In addition, primary cultured cells are recognized as being cells much closer to their *in vivo* counterpart than transformed cells or cell lines are. Because of this characteristic, they became particularly attractive as a source of cellular material for gene expression studies.^{4–6} However, many technical difficulties render the use of primary cultured cells particularly limiting for such types of studies. These include the inability to grow certain types of cells *in vitro*, the tendency of many cell types to differentiate with an increasing number of cell passages, and the potential variations that may occur related to the age and health condition of the donor, not to mention the difficulty in obtaining adequate biopsy specimens of some tissues from normal human donors.

The corneal epithelium is a self-renewing tissue, a property that is ensured by the high proliferative potential of stem cells from the limbal area that surrounds the cornea.⁷ After corneal injury, these cells migrate in a swirling circular movement⁸ to the basal layer of the central cornea and then move through the suprabasal compartment toward the corneal surface.⁹ Apart from its protective influence against bacterial infections and the many environmental stresses (reviewed in Ref. ¹⁰), an intact corneal epithelium is an absolute requirement for maintaining proper visual acuity.¹¹ Nontransformed, primary cultured human corneal epithelial cells (HCECs) have been used successfully in the production of tissue-engineered human corneal substitutes.¹² The development of a true replacement cornea has several interesting advantages (reviewed in Ref. ¹³) such as the possibility to harvest corneal tissues from autologous biopsy specimens or from eye banks, nearly no rejection complications, and the absence of transmission of iatrogenic disease. It

is also particularly attractive as a model to conduct gene promoter studies, in that HCECs that have been expanded and transfected with recombinant DNA can also be seeded on reconstructed stroma to evaluate a gene's promoter behavior in a cell system much closer to the *in vivo* context (reviewed in Ref. ¹⁴).

Although preliminary reports regarding the transplantation of corneal epithelial stem cells are promising, long-term complications, such as severe corneal dysfunction, occur in many of such treated corneal defects.¹⁵⁻¹⁸ Although the precise mechanism underlying the inefficiency of corneal epithelial stem cell transplantation remains obscure, both the adhesive and proliferative properties of the cells selected for grafting are likely to play a pivotal role in the success of this procedure. Indeed, limbal HCECs can sustain, on average, up to 23 population doublings *in vitro*,¹⁹ which corresponds to four or five passages. We and others have observed a great deal of variability in the ability of HCECs to maintain viability through several passages in culture.^{12,14,20} Most cannot be maintained for more than three or four passages before they terminally differentiate. However, and for yet unknown reasons, a few such cells can be passaged up to seven or eight passages^{12,19,20} which makes them ideal cell sources for the production of tissue-engineered corneal substitutes.

Proper cell adhesion is crucial in obtaining an appropriate histologic structure by the assembly of individual cells into the three-dimensional tissues of animals (reviewed in Ref. ²¹). It allows cells to link either with one another or with components from the extracellular matrix (ECM), thereby establishing intracellular structural linkages with cytoskeletal proteins that organize themselves into supramolecular complexes. Although cell-cell adhesion through the formation of adherens junctions is primarily determined by cadherins, cell-ECM adhesions, which include the formation of focal adhesions, are primarily based on integrin-type receptors. Expression of the genes encoding these various adhesion receptors is in turn regulated at the transcriptional level by the binding of specific transcription factors to a variety of cis-acting regulatory elements present in both the promoter and 5'-flanking sequences of such genes. Among such nuclear proteins, Specificity protein-1 (Sp1) is certainly one of the most interesting candidates. Sp1 belongs to a family of transcription factors that includes three other proteins: Sp2, Sp3, and Sp4.²²

Transcription factors from the Sp family are likely to regulate the expression of most, if not all, housekeeping genes, such as that encoding poly(ADP-ribose) polymerase (PARP).²³ In addition, expression of many integrin subunit genes, which include $\alpha 2$,²⁴ $\alpha 5$,²⁵ $\alpha 6$,²⁶ $\alpha 2/CD18$,²⁷ $CD11d$,²⁸ αIIb ,²⁹ αv ,³⁰ $\beta 5$,³¹ and $\beta 3$,³² was reported to be regulated by the binding of Sp1 (and often also Sp3^{30,31}) to target sites located in the upstream promoter of these genes. A putative involvement of Sp1 in cell adhesion and migration is therefore not surprising, considering that it probably regulates the expression of most, if not all, integrin subunit genes.

The purpose of this study was to examine the expression of Sp1, as well as that of Sp3, in primary cultured HCECs obtained from different human donors and to establish whether cell passages have any influence on the DNA binding ability and protein concentration of such factors. HCECs from different human donors that express various amounts of these Sp1 family members when subjected to extended cell passages were also examined for their ability to regulate the activity directed by the basal recombinant PARP (rPARP) promoter. This promoter was selected for conducting transfection experiments in HCECs because its transcriptional activity was recently reported by us to be strongly dependent on its recognition by members of the Sp1 family,^{33,34} therefore providing a good molecular tool to investigate how alterations in the levels of Sp1 and Sp3 (Sp1/Sp3) expression translate into functional alterations of Sp1-dependent gene expression. In addition, their differentiation and stratification properties when used for the production of tissue-engineered corneal substitutes were also investigated.

2.3.3 Methods

This study was conducted in accordance with our institution's guidelines and the Declaration of Helsinki, and the protocols were also approved by the institution's Committee for the Protection of Human Subjects.

Recombinant Plasmids

The recombinant plasmid pCR3, which bears the CAT reporter gene fused to the basal promoter of the rat PARP gene, and the plasmid's mutated derivative pCR3/F2-F3-F4m, which bears mutations in each of its three Sp1 sites, have already been described.³³

Cell Culture and Media

Human corneal epithelial cells (HCECs) were isolated from the limbal area of normal eyes obtained from 3-day-old (L83HCECs), 19-year-old (L81HCECs), 24-year-old (L82HCECs), 49-year-old (L80HCECs), 52-year old (L203HCECs), 55-year old (L200HCECs), 61-year old (L204HCECs), and 65-year-old (L85HCECs) donors by a procedure that we have recently described.¹² They were cultured up to seven passages (referred to as P0 for primary culture (no passage), up to P7 for passage 7), as previously described.^{12,14} All cells were grown under either 5% or 8% CO₂ at 37°C, and culture medium was changed three times a week. Human fibroblasts obtained from the dermal portion of adult breast skin and cultured as described previously³⁵ were used at their sixth passage. Fibroblasts were cultured in Dulbecco-Vogt's modification of Eagle's medium (Life Technologies, Grand Island, NY), supplemented with 10% fetal calf serum (FCS; Hyclone-PDI Bioscience, Aurora, Ontario, Canada), 100 IU/mL penicillin, and 25 µg/mL gentamicin (Sigma, St. Louis, MO).

Preparation and Culture of Reconstructed

Human Tissues Reconstructed substitutes were produced by the autoassembly approach, as previously described.³⁶ Two dermal fibroblast sheets were superimposed and cultured for 7 days to form the reconstructed dermis. HCECs were then seeded on top and allowed to grow to confluence under submerged conditions for 7 days in complete DMEM/HAM supplemented with 10% serum (FetalClone II; HyClone-PDI Bioscience) and 50 µg/mL ascorbic acid. This dermal–corneal epithelial tissue substitute was brought to the air–liquid interface for 11 days before biopsy specimens were collected.

Histologic Analysis

Biopsy specimens from reconstructed human tissues were fixed with Bouin's solution and embedded in paraffin. Microtome sections were stained with Masson's trichrome for histologic analyses.

Indirect Immunofluorescence

Biopsy specimens from reconstructed human tissues were embedded in frozen tissue embedding medium (OCT compound, Tissue-Tek; Bayer Canada, Etobicoke, Ontario, Canada) frozen in liquid nitrogen, and stored at -70°C until use. Indirect immunofluorescence assays were performed on acetone-fixed cryosections, as previously reported.³⁶ Sections were incubated with the primary antibody (either the AE5 anti-keratin 3 (ICN Biomedicals, Aurora, OH) antibody or the rabbit polyclonal anti-Sp1 antibody (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA)) for 45 minutes, followed by incubation with the appropriate conjugated secondary antibody for 30 minutes (goat antimouse IgG-IgM conjugated with rhodamine; TRITC; Chemicon, Temecula, CA). Cell nuclei were also labeled with Hoechst reagent 33258 (Sigma) after immunofluorescence staining. They were then observed under a microscope, equipped with epifluorescence (Optiphot; Nikon, Tokyo, Japan) and photographed with a numeric charge-coupled device (CCD) camera.

Nuclear Extract Preparation

Crude nuclear extracts were prepared from each primary culture of HCECs when they reached approximately 80% confluence. Extracts were dialyzed against DNaseI buffer (50 mM KCl, 4 mM MgCl₂, 20 mM K₃PO₄ (pH 7.4), 1 mM β-mercaptoethanol, 20% glycerol), as described^{25,37} and kept frozen in small aliquots at -80°C until use.

Electrophoretic Mobility Shift Assays

Electrophoretic mobility shift assays (EMSAs) were performed using a synthetic double-stranded oligonucleotide bearing the high-affinity binding site for the positive transcription factor Sp1 (5'-GATCATATCTGCGGGGCGGGGCAGACACAG-3'). The oligonucleotide was chemically synthesized with a commercial apparatus (Biosearch 8700; Millipore, Bedford, MA).³⁸ Approximately 2x10⁴ cpm-labeled DNA was incubated with HCEC crude nuclear proteins (5 μg) in the presence of 500 ng poly(dI-dC).poly(dI-dC) (Pharmacia-LKB; Gaithersburg, MD) in buffer D (5 mM HEPES (pH 7.9), 10% glycerol (vol/vol), 25 mM KCl, 0.05 mM EDTA, 0.5 mM dithiothreitol, and 0.125 mM PhMeSO₂F). Incubation proceeded at room temperature for 15 minutes, at which time DNA-protein complexes were separated by gel electrophoresis through either 6% or 8% native polyacrylamide gels run against Trisglycine buffer as described.³⁹ Gels were dried and autoradiographed at -80°C to reveal the position of the shifted DNA-protein complexes generated. Competitive EMSA was performed the same, except that a 500-fold molar excess of unlabeled double-stranded oligonucleotides bearing either the Sp1 binding site or the target sequence for human HeLa CCAAT-transcription factor/nuclear factor-I (CTF/NF-I) in adenovirus type 2 (Ad2) (5'-GATCTTATTTTGGATTGAAGCCAATATGAG-3')⁴⁰, or single-stranded oligonucleotides bearing either the top (Sp1a) or the bottom (Sp1b) strand from the Sp1 high-affinity target site, were added to the reaction mix before gel analysis.

SDS-PAGE and Western Blot

The protein concentration from each of the HCEC crude nuclear extracts was evaluated by the Bradford procedure and further validated after Coomassie blue staining of SDS-polyacrylamide fractionated nuclear proteins. Approximately 20 µg proteins was added to 1 volume of sample buffer and then size fractionated on a 10% SDS-polyacrylamide minigel before transfer onto a nitrocellulose filter under conditions that we have described.²⁵ A full set of protein molecular mass markers (Gibco BRL, Burlington, Ontario, Canada) was also loaded as a control to evaluate protein sizes. The blot was then washed once in TS buffer and four times in TSM buffer.²⁵ A 1:500 dilution of either a mouse (Sp1) or rabbit (Sp3 and Sp4) polyclonal antibody raised against the transcription factors Sp1, Sp3, or Sp4 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.), or a 1:10,000 dilution of a mouse monoclonal antibody (C-2-1041) raised against the C-terminal end of the DNA binding domain of bovine PARP (kindly provided by Guy G. Poirier, Unit of Health and Environment, University Hospital Center of Laval (CHUL) Research Center, Québec, Canada) was added to the membrane-containing TSM buffer and incubation proceeded for another 4 hours at 22°C. The blot was then washed and incubated an additional 1 hour at 22°C in a 1:1000 dilution of a peroxidase-conjugated goat anti-mouse (Sp1 and PARP) or anti-rabbit (Sp3 and Sp4) IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratory, West Grove, PA). The membrane was successively washed in TSM (four times, 5 minutes each) and TS buffers before immunoreactive complexes were revealed using Western blot chemiluminescence reagents (Renaissance, NEN Dupont; Boston, MA) and autoradiographed.

Transient Transfections and CAT Assays

Primary cultured HCECs (5×10^5 cells per 60-mm plate) isolated from the limbal area of normal eyes obtained from three different donors (L200HCECs, L203HCECs, and L204HCECs) were transiently transfected at various cell passages (up to P6, P4, and P3 for L200HCECs, L203HCECs, and L204HCECs, respectively) by the calcium phosphate precipitation method.⁴² Each cell-containing tissue culture well received 15 µg test plasmid and 5 µg of the human growth hormone (hGH) gene-encoding plasmid pXGH5.⁴³ Levels of CAT activity for all transfected cells were determined²⁵ and normalized to the amount of

hGH secreted into the culture media and assayed using a kit for quantitative measurement of hGH (Immunocorp, Montréal, Québec, Canada). The data for each test plasmid transfected correspond to the mean \pm SD of results of two separate transfections performed in triplicate.

2.3.4 Results

Influence of Cell Passage on the Morphology of HCECs

HCECs obtained from the limbus of human donor eyes were seeded with a 3T3 feeder layer on plastic substrate and cultured according to a procedure we recently described¹² and initially designed for culturing human cutaneous keratinocytes. Under these conditions, limbal epithelial cells produced large colonies of small cells in primary culture (Fig. 2.1A; P0). However, this property could not be maintained with increasing cell passages in most of our patient's HCECs, the colonies being much smaller and essentially made up of large cells that were difficult to subculture to the following passages (Fig. 2.1A; P1, P2). Many HCEC subcultures could not be maintained beyond passage 3 (Fig. 2.1A; P3), at which point the culture exhibited a terminally differentiated phenotype, mainly constituted of large nondividing cells.

Patterns of Expression of Sp1 and Sp3

Transcription factors undoubtedly determine the fate of any particular cell by controlling the pattern of genes that should be transcribed to maintain the cell's functionality. Among such genes are those encoding adhesion molecules from the integrin family, which are known to have very critical functions in processes such as cell adhesion and migration. We therefore hypothesized that the morphologic changes occurring in HCECs with increasing cell passages may be the consequence of substantial alterations in the expression of such transcription factors. The positive transcription factors that belong to the Sp1 family are probably those that have been the most studied so far. Most of all, expression of many integrin subunit genes has been reported to be regulated by members of this family.²⁴⁻³²

To investigate whether Sp1, or any other member of this family, is expressed in HCECs, nuclear proteins were obtained from cells at P2 and incubated with a 5'-end-labeled oligonucleotide bearing the sequence of a high-affinity target site for Sp1. Formation of DNA-protein complexes was then monitored by EMSA. As shown on Figure 2.1B, a number of DNAProtein complexes (designated *a-d*) could be observed when

increasing amounts (5–20 μg) of HCEC crude nuclear proteins were added to the Sp1-labeled probe. Formation of both complexes *a* and *d*, and to some extent that of complex *b*, was prevented by the addition of the unlabeled Sp1 competitor, but not by an oligonucleotide bearing the target sequence for the unrelated transcription factor NF1, providing evidence that formation of all three complexes (*a*, *b*, and *d*) was specific (Fig. 2.1C). Further competitions using single-stranded oligonucleotides bearing the sequence from either the top (Sp1a) or the bottom (Sp1b) strand of the Sp1 target site revealed that formation of complex *d* resulted from the recognition of the free-labeled Sp1b strand by a yet unknown nuclear protein. We next performed supershift experiments in EMSAs to define more precisely which of the Sp family members yield both complexes *a* and *b*. As revealed on Figure 2.1D, formation of complex *a*, but not that of any of the remaining complexes, was substantially decreased by the addition of a polyclonal antibody raised against Sp1, which also led to the formation of a new supershifted complex designated *a*/Sp1Ab. The addition of an anti-Sp3 antibody resulted in only a moderate decrease in the formation of complex *a*, but totally prevented formation of a weak complex designated *b**, often appearing on the gel just above complex *b* when the concentration of the gel was lowered to 6%, leading to the formation of a new supershifted complex designated *a*+*b**/Sp3Ab (Fig. 2.1D). Altogether, these results suggest that complex *a* is essentially made up of Sp1 with a small amount of Sp3 and that complex *b** results solely from the recognition of the Sp1-labeled probe by Sp3. Indeed, the addition of both the Sp1 and Sp3 antibodies to the reaction mix totally prevented formation of both complexes *a* and *b**, as expected (Fig. 2.1D). That both Sp1 and Sp3 yield DNA-protein complexes which comigrated in EMSA is not unique and has been reported before.^{4,44,45} The fast-migrating Sp3 complex yielding *b** apparently results from the recognition of the Sp1-labeled probe by an N-terminal truncated form of Sp3 that possess an intact DNA-binding domain but a partially deleted activation domain.^{45–48} Formation of the *b* complex, which in Figures 2.1B and 2.1C could not be dissociated from complex *b**, appears to be nonspecific. No influence whatsoever has been observed on the formation of any of these complexes when the reaction was performed in the presence of the anti-Sp4 Ab, even when used at 4 μL (data not shown). In addition, the formation of neither complex *c* or *d* was altered by any of these antibodies.

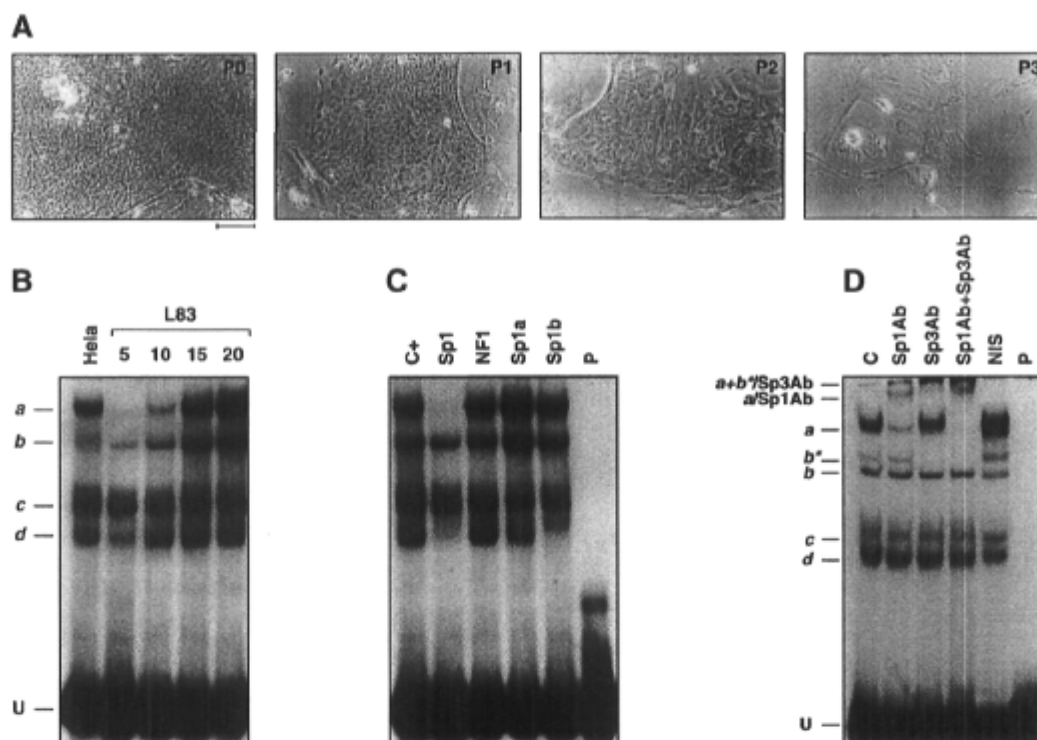


FIGURE 2.1. Expression of *Sp* family members in HCECs.

(A) Phase-contrast images of cultured HCECs in passages indicated (top right). Magnification, $\times 200$. Bar, 200 μm . (B) Binding of nuclear proteins from HCECs to a high-affinity Sp1 target site. Increasing amounts (5–20 μg) of nuclear proteins from P2 L83HCECs were incubated with the Sp1 probe and formation of DNA-protein complexes analyzed by EMSA on an 8% gel. The Sp1 probe was incubated with 5 μg nuclear proteins from human HeLa cells, as a positive control. The position of four distinct DNA-protein complexes is indicated (*a–d*), along with that of the free probe (U). (C) Specificity for the formation of complexes *a* to *d* was evaluated by competitive EMSA. Nuclear proteins (10 μg) from L83HCECs were incubated with the Sp1 probe in the presence of a 500-fold molar excess of unlabeled oligonucleotides bearing the binding sites for either Sp1 or NF1 or with unlabeled single-stranded oligonucleotides bearing the sequence of either the top (Sp1a) or the bottom (Sp1b) strand from the Sp1 target site. P, labeled probe alone; C+, labeled probe with nuclear proteins but without competitors. (D) Supershift analyses in EMSA. Nuclear proteins (7 μg) from P1 L85HCECs were incubated with the Sp1 probe, either alone or in the presence of antibodies against either Sp1 (2 μL) or Sp3 (4 μL), or both the Sp1 and Sp3 antibodies (2 and 4 μL , respectively). Formation of DNA-protein complexes was then monitored by EMSA on a 6% gel. The position of two supershifted complexes (*a/Sp1Ab* and *a+b*/Sp3Ab*) is indicated. C, labeled probe with nuclear proteins but without antibodies; NIS, labeled probe incubated with both nuclear proteins and nonimmune serum as a control.

Because we observed a great deal of variability in the efficiency of HCECs obtained from different donor eyes in properly stratifying on tissue-engineered corneal substitutes,^{12,14} we investigated whether the formation of complexes *a* to *d* was both quantitatively and qualitatively altered with increasing cell passages in HCECs obtained from different human donors. Crude nuclear proteins were then prepared from limbal HCECs obtained from donor eyes of five different individuals (designated L80HCEC, L81HCEC, L82HCEC, L83HCEC, and L85HCEC) at P1, P2, and P3. When an equal amount of nuclear proteins from each of these extracts was incubated with the Sp1 probe, dramatic age-independent alterations in the formation of both the Sp1/Sp3-dependent complex *a* and the nonspecific complex *b* were observed (Fig. 2.2A). In contrast, no such alterations were observed in the formation of complexes *c* and *d*. It is interesting to note that the protein yielding complex *a* (essentially Sp1) was obviously more consistently expressed at P2 than at P1. Formation of complex *b*, which clearly predominated at P1, progressively shifted toward formation of complex *a* at both P2 and P3 (Fig. 2.2A).

These results suggest that dramatic alterations, either in the concentration or the DNA binding affinity of both Sp1 and Sp3 for their target site, occurred in HCECs from different donors and from one passage to another. To determine which of these two hypothesis accounts for the alterations in the formation of both complexes *a* and *b**, expression of both Sp1 and Sp3 (as well as Sp4) was examined by Western blot analyses. As revealed in Figure 2B, the alterations in the formation of complex *a* observed in Figure 2.2A also perfectly matched with corresponding variations in the absolute concentration of Sp1. Extracts that yielded either no or only a modest formation of complex *a* (e.g., P1 HCECs from L80 and L81) also had barely detectable amounts of Sp1. However, those that yielded complex *a* with strong signal strengths, such as in cells from donors L85HCEC at P1 and L81HCEC at P2 (Fig. 2.2A), also expressed more of the Sp1 protein (Fig. 2.2B). Similar alterations were also observed in the expression of Sp3 at both P1 and P2 (Fig. 2.2B), as well as P3 (result not shown). Expression of Sp4 was found to be much more stable and less subjected to alterations than Sp1 and Sp3 (Fig. 2.2B). Therefore, the variations observed in the formation of complexes *a* and *b** can be accounted for by corresponding alterations in the amount of Sp1/Sp3 expressed in these cells and not by alterations in their affinity for their target sequences, as we recently reported.²⁵

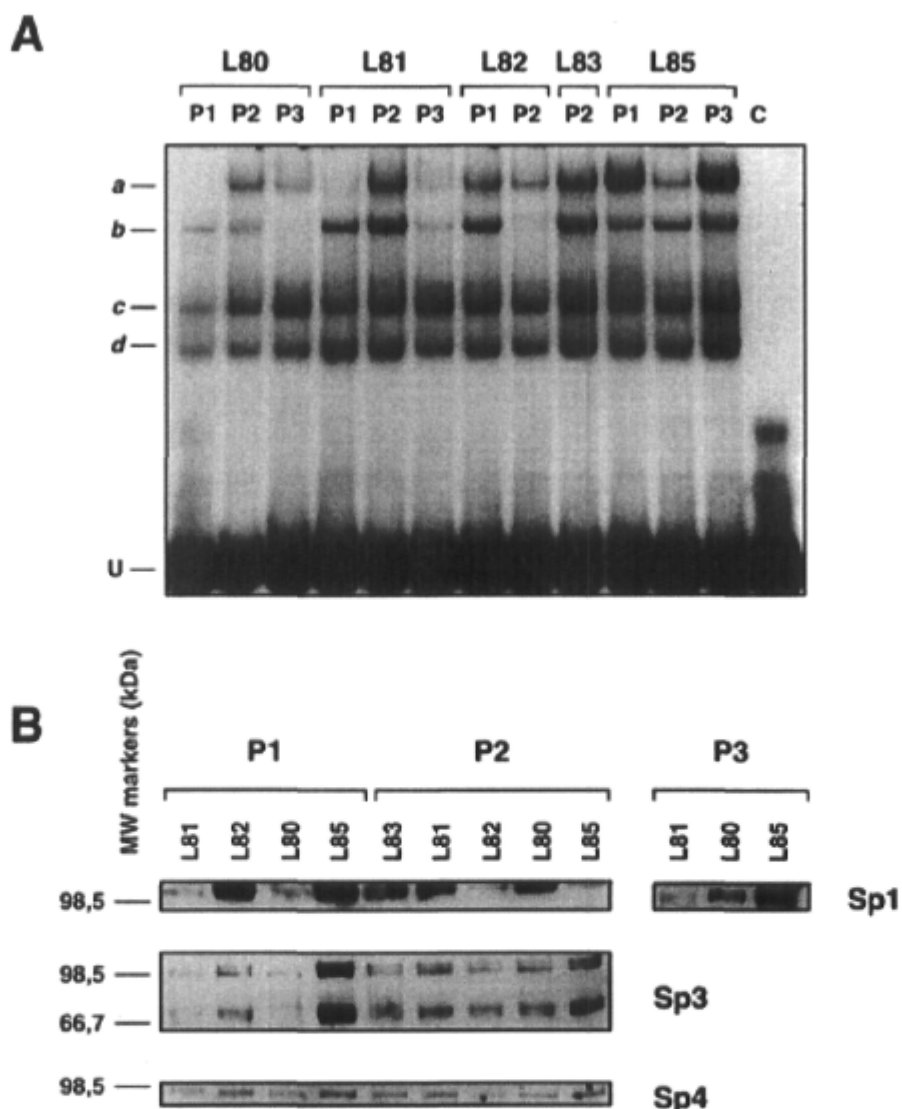


FIGURE 2.2. Influence of cell passages on the expression of Sp1, Sp3, and Sp4.

(A) Nuclear proteins were obtained from L80HCECs, L81HCECs, L82HCECs, L83HCECs, and L85HCECs at P1 to P3 and incubated (20 μ g of each) with the Sp1 probe. Formation of DNAProtein complex *a* (which contain both Sp1 and Sp3) as well as that of complexes *b* to *d* was then monitored by EMSA on an 8% gel. U, unbound fraction of the probe; C, labeled probe with no added proteins. (B) Western blot analysis of Sp family members. Approximately 30 μ g nuclear proteins from the cells used in (A) were examined in Western blot analyses, using antibodies directed against Sp1, Sp3, and Sp4. The position of the specific signals for members of the Sp1 family are indicated, along with that of the nearest molecular mass markers (phosphorylase B; apparent molecular mass, 98.5 kDa) and bovine serum albumin (apparent molecular mass, 66.7 kDa).

Regulatory Influence of HCEC Sp1/Sp3 on an Sp1-Dependent Promoter

To determine whether the variations observed in the pattern of Sp1/Sp3 expression have any functional significance *in vitro*, we transiently transfected HCECs isolated from the eyes of three different donors (L200HCEC, L203HCEC, and L204HCEC) at various passages (P1–P6) with a recombinant construct bearing the CAT reporter gene fused to the promoter of the rat PARP (rPARP) gene.^{33,49} The rPARP basal promoter was selected because it has been shown to bear multiple Sp1 binding sites that are critical for basal rPARP promoter activity. Both the recombinant plasmid pCR3, which bears rPARP promoter sequences from position -101 to +13 and has three well-characterized Sp1 sites (F2, F3, and F4), and its corresponding derivative pCR3/F2-F3-F4m, which bears mutations in each of the three Sp1 sites, were selected for this experiment.³³ Crude nuclear extracts were prepared from each of the three HCEC cultures and at each cell passage to determine whether functional correlations can be established between any potential alterations in the level of Sp1 activity and that directed by the rPARP basal promoter.

Each of the HCEC primary cultures used for the study exhibited very distinctive growth and proliferative properties. Indeed, the L200HCECs could be cultured up to P7 whereas cells L203HCECs and L204HCECs could be maintained only up to P5 and P4, respectively, before they terminally differentiated. EMSAs revealed that binding of Sp1/Sp3 could not be detected before P4 in L200HCECs, which then totally disappeared in the extracts from P5 and P6 cells (Fig. 2.3A). A similar pattern was also observed with the extracts from L203HCECs except that the Sp1/Sp3 binding activity appeared earlier, reaching a peak at P2. No Sp1/Sp3 binding activity occurred in the extracts prepared from L204HCECs, which yielded only diffuse, nonspecific signals similar to those observed at P1 and P2 with L200HCECs (Fig. 2.3A). As Figure 2.3B indicates, the Sp1 protein was detected by Western blot analyses in the samenuclear extracts (P4 for L200HCECs, P2 and P3 for L203HCECs, and no signal in L204HCECs), which also supported Sp1 binding in the EMSA. The two protein doublets that are typically observed for Sp3 in Western blot were also detected in the Sp1-positive extracts. In addition, a weak but clearly detectable Sp3 signal was observed in the P1 extract from L204HCECs. Although unlikely, extinction of Sp1/Sp3 may have resulted from their proteolytic cleavage by apoptotic caspases as a consequence of passaged HCECs progressing into apoptosis. To test for this hypothesis,

proteins from passages P1 to P4 from L203HCECs were blotted and probed with a monoclonal antibody (C-2-10) raised against the bovine PARP protein (bPARP),⁴¹ the cleavage of which by caspase 3 is well recognized as an early marker of apoptosis.⁵⁰ The epitope recognized by the C-2-10 antibody is localized near the C-terminal end of the PARP DNA-binding domain, a region shown to be totally conserved between murine, bovine, and human PARP.⁴¹ Cleavage of the 113-kDa mature PARP by caspase 3 yielded two degradation products with molecular masses of 89 and 24 kDa, of which only the larger, which bears the intact epitope, can be recognized by the C-2-10 mAb.⁵¹ As shown in Figure 3B, bottom, a single clear signal corresponding to the 113-kDa mature PARP protein was observed in the P1 and P2 crude extracts from L203HCEC cells, with a peak expression at P2. Then, as Sp1 decreased at P3, so did the PARP protein, which then became totally absent at P4. Crude nuclear proteins from HL60 cells, exposed or not to the cell death inducer VP16, were also included as the control (Fig. 2.3B, bottom right). The 89-kDa PARP caspase 3 cleavage product, which was easily detected in the extract from apoptotic VP16-treated HL60 cells, was obviously missing in the P1 to P4 extracts from L203HCECs, clear evidence that these cells were never committed to apoptosis at any time. Therefore, that both Sp1 and Sp3 did not form in the extracts from passaged HCECs can be accounted for by the corresponding absence of expression of both Sp1 and Sp3 in these cells and not by their proteolytic cleavage by apoptotic caspases.

Consistent with the highly unstable expression of Sp1/Sp3 between the three HCEC cultures and passages used, transiently transfecting the wild-type construct pCR3 in HCECs also yielded highly variable CAT activity (Fig. 2.3C). It was interesting that the lower the PARP promoter activity was at earlier passages, the higher the number of passages the HCECs could sustain. Indeed, L204HCECs had the highest PARP promoter activity at P1 (approximately five times more than that measured with the L200HCECs), closely followed by L203HCECs (3.5 times more than with L200HCECs). Unlike L203 and L204HCECs, HCECs presenting the best proliferative capabilities (e.g., L200HCECs) sustained a more constant PARP promoter activity over a much higher number of passages (up to P6). A detailed examination of the ratio of the CAT activity directed by the recombinant plasmid pCR3 over that directed by its mutated derivative pCR3/F2-F3-F4m, which no longer binds Sp1 and therefore highlights the real Sp1 influence on the PARP

promoter, revealed striking differences. As shown in Figure 2.3D, both L200HCECs and L203HCECs had a peak ratio of CAT activity that perfectly matched the peak of Sp1 binding activity observed in EMSA (Fig. 2.3A). Indeed, L200HCECs had detectable Sp1 proteins only at passage 4, which also translated into a dramatic 38-fold increase in the pCR3-to-pCR3/F2-F3-F4m ratio (Fig. 2.3D). Maximal Sp1 protein expression in L203HCECs was observed at P2. As for L200HCECs, this also perfectly matched the maximal influence both Sp1/Sp3 had on the rPARP promoter in these cells, the pCR3-to-pCR3/F2-F3-F4m ratio reaching a peak (a nearly 12-fold increase) at P2 in L203HCECs (Fig. 2.3D). As with L200HCECs, the pCR3-to-pCR3/F2-F3-F4m ratio dramatically dropped in the passages beyond that of the peak in L203HCECs. Unlike L200HCECs and L203HCECs, L204HCECs exhibited a moderately high pCR3-to-pCR3/F2-F3-F4m ratio at P1, which then decreased progressively up to P3, suggesting that the peak of Sp1/Sp3 activity must have occurred at the very beginning of the cell culture (P0).

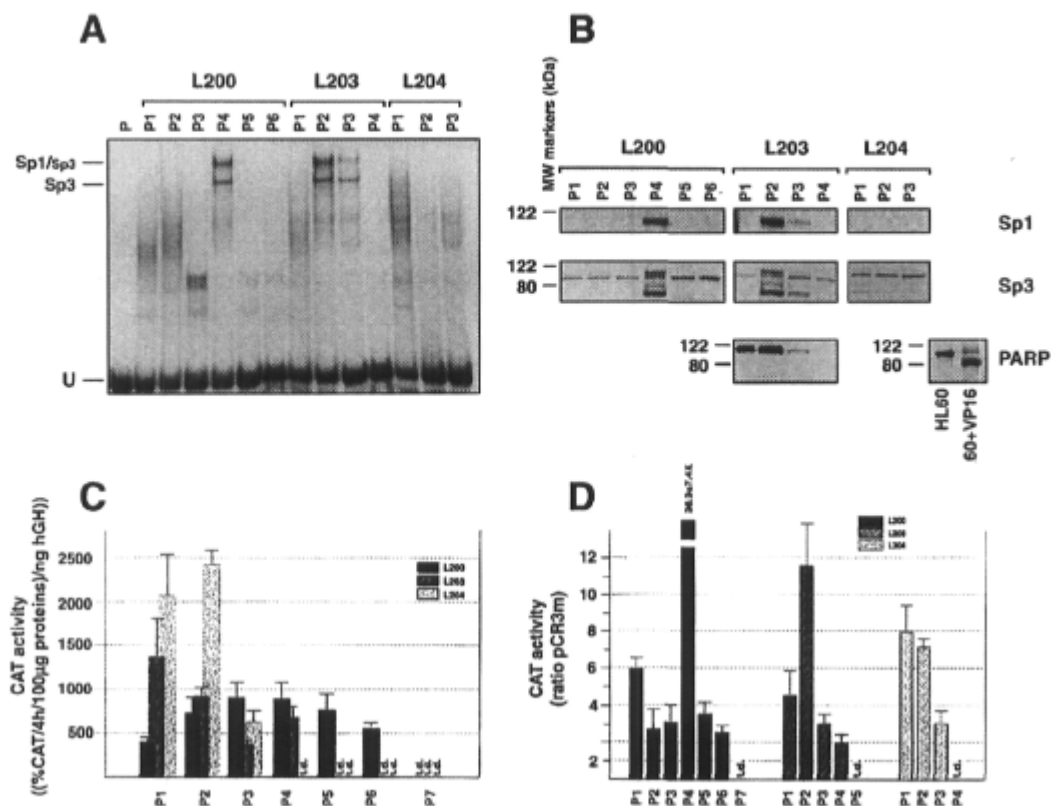


FIGURE 2.3. Influence of cell passages on Sp1/Sp3 DNA binding and transactivating properties.

(A) EMSA analysis of Sp1/Sp3 binding in L200HCECs, L203HCECs, and L204HCECs at various passages. Nuclear proteins were obtained from L200HCECs, L203HCECs, and L204HCECs at different passages (P1–P6 for L200HCECs; P1–P4 for L203HCECs; P1–P3 for L204HCECs). Twenty micrograms of each were incubated with the Sp1 probe and formation of the Sp1/Sp3 DNA–protein complexes was monitored by EMSA on an 8% gel. U, unbound fraction of the probe; P, labeled probe with no added proteins. (B) Approximately 30 µg nuclear proteins from the extracts used in (A) were examined in Western blot analyses, using both Sp1 and Sp3 antisera. Expression of endogenous PARP was also monitored with the C-2-10 mAb in the P1 to P4 extracts from L203HCECs. Nuclear proteins prepared from either untreated or VP16-treated HL60 cells were also included as a control for the expression of the mature 113-kDa PARP protein or its 89-kDa apoptotic cleavage derivative, respectively. The position of the nearest molecular mass markers β-galactosidase (molecular mass, 122 kDa); bovine serum albumin (molecular mass, 80.0 kDa) is indicated. (C, D) Transfection analysis in L200HCECs, L203HCECs, and L204HCECs at various passages. The rPARP basal promoter-bearing plasmid pCR3 and its mutated derivative pCR3/F2-F3-F4m were individually transfected into L200HCECs, L203HCECs, and L204HCECs at various passages (P1–P6 for L200HCECs; P1–P4 for L203HCECs; P1–P3 for L204HCECs). Cells were harvested 48 hours later and CAT activities measured and normalized. (C) Results obtained with the wild-type rPARP pCR3 plasmid. (D) Ratio of the activity directed by pCR3 over that of pCR3/F2-F3-F4m. t.d., terminally differentiated.

Effect of Various Levels of Sp1/Sp3 on Properties of HCECs

L200HCECs, L203HCECs, and L204HCECs were shown to exhibit clearly distinctive proliferative properties *in vitro* that may be related to the precise moment the peak of Sp1/Sp3 expression appears in these cells. We therefore evaluated the ability of each of these HCECs to attach, grow, differentiate, and stratify properly within reconstructed tissue substitutes.^{12,14} To study the differentiation and stratification abilities of each group of HCECs, we took advantage of the model for tissue reconstruction by the autoassembly approach.³⁶ This approach combines the use of both dermal fibroblasts and corneal epithelial cells, which leads to the formation of a thicker epithelium than when corneal fibroblasts are used (Carrier P, Deschambeault A, Auger FA, Guérin SL, Germain L, ARVO Abstract 1634, 2001) thus facilitating the detection of the effect of Sp1/Sp3 expression on stratification. In contrast, the culture of corneal epithelial cells on reconstructed stroma made with corneal keratocytes leads to the formation of a thin epithelium comprising four to six-cell layers, as is normally observed with cornea *in situ* (Carrier P, Deschambeault A, Auger FA, Guerin SL, Germain L, ARVO Abstract 1634, 2001). L200HCECs, L203HCECs, and L204HCECs were therefore cultured on top of reconstructed dermis made up of dermal fibroblasts induced to secrete and organize collagen by culturing them in the presence of ascorbic acid. HCEC differentiation was induced by culturing at the air-liquid interface for 11 days.

As shown in Figure 2.4, the production of reconstructed substitutes with L200HCECs at P1, P2, or P3, yielded properly stratified epithelia constituted of 13 to 15 layers of epithelial cells with a layer of basal cells that exhibited the typical morphology of corneal epithelial basal cells. Substitutes reconstructed with L203HCECs at P1 yielded an epithelium very similar to that composed of L200HCECs. However, when cells were used at P2, the epithelium thickness decreased to only eight to nine layers of cells, yet maintained an intact basal layer. These changes also correlated with the peak of Sp1/Sp3 expression observed in these cells (see Fig. 2.3). Very little cell stratification was observed when L203HCECs were used in P3, the reconstructed epithelium being constituted of only three or four layers of epithelial cells with no organized basal layer. This reduced efficiency of the HCECs to yield epithelia with proper histologic features was further emphasized when L204HCECs were used. Indeed, even P1 cells yielded poor quality epithelia made up

of only a few cell layers. Yet the basal cell layer remained essentially intact up to passage 3, at which point L204HCECs in reconstructed substitutes no longer had the ability to proliferate and differentiate into suprabasal cells. L204HCECs at P3 were also poorly organized in the basal layer.

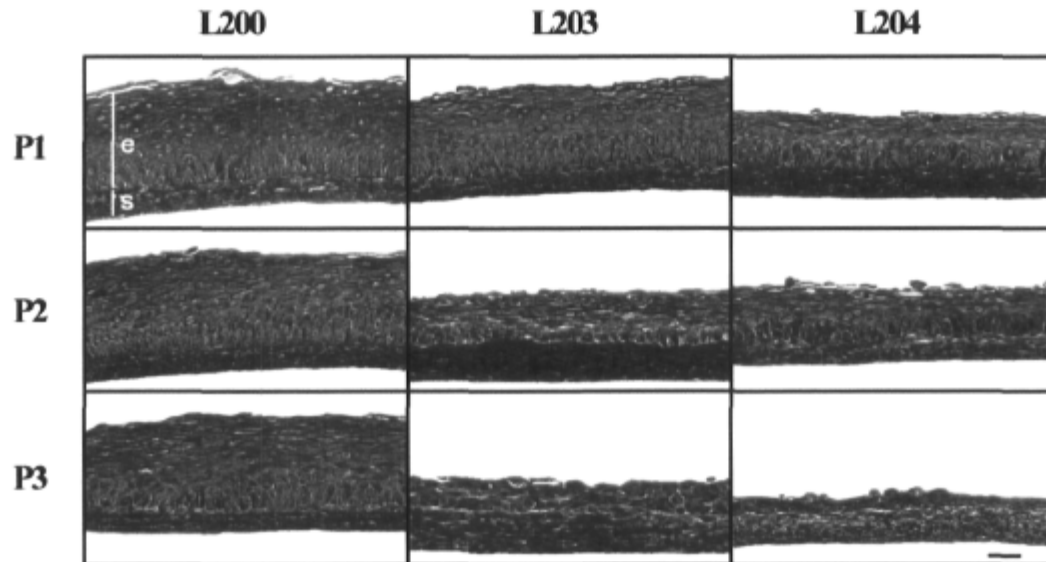


FIGURE 2.4. Stratification of HCECs in reconstructed tissue substitutes.

Histologic cross sections of the reconstructed tissue substitutes after 11 days of culture at the air–liquid interface. L200HCECs, L203HCECs, and L204HCECs were cultured *in vitro* and then seeded on the reconstructed stroma after P1, P2, or P3. e, epithelium; s, stroma. Bar: 100 μ m.

The state of differentiation reached by cultured cells can be closely examined by observing the expression and accumulation of specific members from the keratin family.⁵² Keratin filaments are formed of a pair of keratins, type I and type II.⁵³ The terminally differentiated cells that constitute the central area of the corneal epithelium express the K3/K12 pair of keratins.⁵⁴ The expression of K3 was therefore examined by immunofluorescence labeling of reconstructed substitutes produced with L203HCECs at P1 to P3. As shown in Figure 2.5, a proportion of the suprabasal epithelial cells stained

positively for K3 when P1 L203HCECs were used. However, the highest level of K3 expression was observed in reconstructed substitutes produced with L203HCECs at P2, which also correlated with the peak of Sp1 expression in these cells, as revealed by EMSA (Fig. 2.3A), Western blot (Fig. 2.3B), and transfection (Figs. 2.3C, 2.3D) analyses. Only weak staining was observed in the epithelium from the substitute produced with L203HCECs at P3, which is consistent with the dramatic reduction in Sp1/Sp3 activity observed in these cells (see Fig. 2.3). As further evidence that proper K3 expression is dependent on the presence of Sp1-expressing cells in the culture,^{55,56} endogenous levels of Sp1 were examined by immunofluorescence analyses in the epithelia from the tissue substitutes produced with the L203HCECs of P1 to P3. As shown on Figure 2.5, the pattern of K3 expression was maximal in reconstructed epithelia with high endogenous expression of Sp1. Indeed, moderate and maximum levels of Sp1 were observed in the epithelium yielded by the L203HCECs of P1 and P2, respectively, whereas no staining was found in those from L203HCECs of P3. These results suggest that proper expression of endogenous Sp1 is absolutely required for HCECs to differentiate properly and express K3 on reconstructed tissue substitutes.

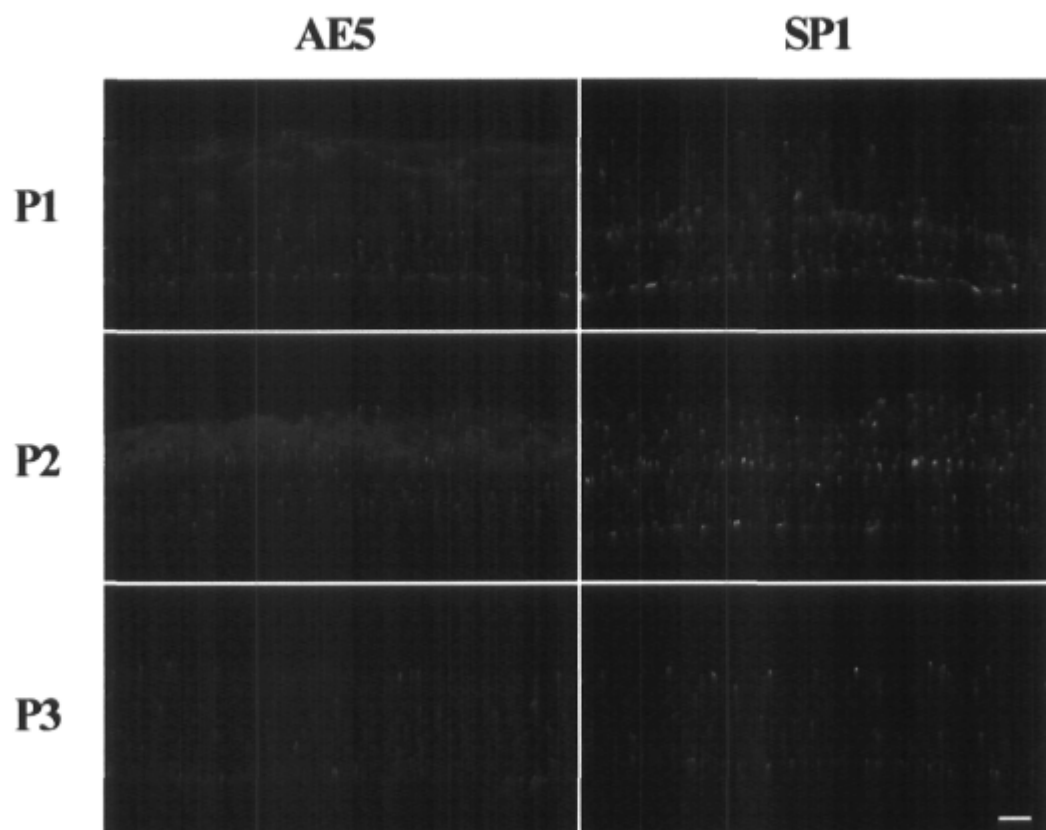


FIGURE 2.5. Immunofluorescence analysis of K3 and Sp1 expression in the epithelia of the reconstructed tissue substitutes.

L203HCECs were expanded *in vitro* and seeded on the reconstructed stroma after P1, P2, or P3. Immunolocalization of both keratin K3 and Sp1 was performed using the AE5 and Sp1 mAbs and further revealed with TRITC (red). Nuclei were counterstained with Hoechst reagent 33258 (blue). Pink (blue+red) fluorescence of the nuclei represents double labeling of Sp1 and nuclei. Bar: 100 μ m.

2.3.5 Discussion

It is well known that many primary cultured cells are very difficult to maintain and passage in culture. Over the past few years, we have experienced such difficulties in culturing HCECs *in vitro*.^{12,14} Indeed, many cannot be maintained for more than three or four passages before they terminally differentiate. However, and for as yet unclear reasons, a few such cell cultures reach up to seven or eight passages.^{12,19,20} If these cell cultures are to be used for the engineering of human corneal substitutes, the best cell cultures should be chosen, and our results show that Sp1 expression may become one particularly interesting criterion for selecting them. Cells that terminally differentiate at early passages also stop migrating and proliferating, suggesting that the integrin-mediated cell adhesion mechanisms may be deeply altered during that process. Indeed, corneal wound-healing models have provided evidence that expression of integrins is altered depending on the state reached by corneal epithelial cells during the whole wounding process (Zhu L, Stepp, MA, ARVO Abstract 4743,1996).^{57,58} Some of them increase their level of expression during the proliferative phase required for the cells to cover the wound. Expression is then stopped while basal corneal epithelial cells terminally differentiate through their vertical stratification. Because such profound changes in integrin expression has been reported to occur at the transcriptional level, we postulated that alterations in the abundance of transcription factors that are required for these genes to be properly expressed may account, at least in part, for these cells' progressing to terminal differentiation. One such likely candidate is Sp1. Indeed, the expression of many integrin subunit genes has been shown to be modulated by this transcription factor or by members of this family.²⁴⁻³² Sp1 belongs to a family of GC-rich binding transcription factors, the Sp family, that includes three other proteins: Sp2, Sp3, and Sp4.^{47,59,60} The comparison of the three zinc fingers from the DNA-binding domain of each Sp family member reveals that Sp1, Sp3, and Sp4 are more closely related to each other than to Sp2,⁶¹ which is one of the few reasons why we directed our attention solely to Sp1, Sp3, and Sp4. Besides, Sp2 was not reported to recognize the classic GC box that is bound by the remaining members of this family, but rather targets GT-rich elements.⁶² The Sp family has been recognized recently as a subgroup within the

larger Sp/XKLF family, which comprises at least 16 members that possess affinity for GC/GT-rich elements.⁶¹

In the present study, we investigated whether the frequent terminal differentiation of primary cultured HCECs is also accompanied by various expression levels of the members of the Sp1 family. In our results, the DNA binding ability of Sp1 varied dramatically in HCECs isolated from the eyes of different human donors. These alterations are clearly not accounted for by alterations in the state of phosphorylation of Sp1, as has been recently reported^{25,63,64} but resulted from corresponding changes in the absolute amount of Sp1 protein. Furthermore, these alterations are not related to the age of the individuals from whom corneas were excised. There was a clear surge in the expression of Sp1 at P2 which then, in most HCEC cultures, decreased when cells were passaged beyond P2 (as occurred with L80HCECs and L81HCECs). HCECs that expressed substantial amounts of Sp1 at early passages (e.g., P1), also corresponded to those cells that terminally differentiated early. That low levels of Sp1 are found in differentiated or nonproliferating human corneal epithelial cells has also been reported in a study by Whitelock et al.,⁶⁵ who examined expression of a panel of transcription factors in the corneal epithelium of normal individuals and in patients with keratoconus. This noninflammatory disease progressively thins and distorts the central portion of the cornea, ultimately leading to visual impairment. Through the use of several procedures, they found only a low basal level of Sp1 expression in corneal epithelia from normal individuals. A dramatic surge in Sp1 expression was observed in the corneal epithelium of those patients affected by keratoconus.⁶⁵ These results are of particular interest, in that they link aberrant expression of Sp1 to upregulation of Sp1-regulated genes that encode enzymes and inhibitor genes affected in keratoconus.^{66,67} Most of all, they also bridge corneal epithelial wound healing, a process that is typical of keratoconus and that requires active proliferation and migration of the basal cells from the corneal epithelium to high levels of Sp1 expression.

The progressive reduction of the positive influence exerted by Sp1 on the rPARP gene promoter when HCECs were passaged is consistent with the reduction in Sp1 binding observed by Chen et al.⁵⁵ in differentiated rabbit (R)CECs. Although the rPARP promoter has been shown to bear a putative AP-2 binding site,²³ no evidence has been provided as to

whether this transcription factor exerts any regulatory influence at all on rPARP gene transcription. However, it is interesting that undifferentiated RCECs have been shown to express high levels of the AP-2 transcription factor.⁵⁵ This may explain, at least in part, the activity driven by the rPARP promoter in the L200HCECs and L203HCECs at low passages (P1 to P3 for L200HCECs and P1 for L203HCECs) where no Sp1/Sp3 proteins are observed. Other transcription factors for which binding sites were identified in the rPARP basal promoter, such as members from the nuclear factor 1 (NF1) family,^{33,49} may contribute to maintain low basal promoter activity under Sp1- deficient culture conditions. Furthermore, the reduced transcriptional activity directed by the rPARP promoter when HCECs progress toward terminal differentiation is consistent with the decrease in PARP-1 mRNA levels that is typically associated with cellular differentiation^{68,69} and senescence.⁷⁰ Extinction of rPARP gene expression in differentiated cells is therefore likely to be the consequence of reduced expression of both Sp1 and Sp3.

The results presented in this study suggest that alterations in the level of expression of both Sp1 and Sp3 may trigger the cells to commit themselves to terminal differentiation. Undifferentiated basal epithelial cells from rabbit cornea have been reported to express both keratins K5 and K14.⁷¹ Keratins belong to a family of intermediate filament proteins that comprises more than 20 members with expression that is confined to epithelial cells. As cells grow exponentially, expression of the hyperproliferation markers K6 and K16 keratins is switched on. Then, as the cells progress toward terminal differentiation through vertical stratification, expression of both K6 and K16 is turned off and that of both K3 and K12 is turned on.⁷² Expression of the K3 gene is heavily dependent on the recognition of a regulatory element from the K3 gene promoter designated the E site by Sp1.^{55,56} Furthermore, the ratio between Sp1 and the transcription factor activator-protein 2 (AP-2) has recently been found to be very critical for the expression of the K3 gene in RCECs, which, along with the K12 keratin, have been reported as markers of RCEC differentiation.⁵⁵ The dependence of K3 gene expression on the presence of Sp1/Sp3 was well demonstrated in the corneal epithelia from the tissue substitutes constructed in our study. Indeed, maximal expression of K3 in reconstructed epithelia produced with L203HCECs was observed with cells seeded at P2 on the dermal substitute, which is the precise condition under which maximal Sp1 expression was also observed. The immunologic

detection of K3 is recognized as a marker of fully differentiated corneal epithelial cells. The fact that we detected only low levels of K3 expression in the epithelium reconstructed with P3 L203HCECs is puzzling. This could be explained by the fact that the nonproliferative, K3-positive, fully differentiated cells contained in the subcultured L203HCECs at P3 could not be maintained on the dermal substitutes. The thin epithelium observed may have resulted solely from the low proliferative properties of a few epithelial cells still present in L203HCECs at P3. Such cells would be expected to express only low amounts of Sp1 and to progress rapidly toward terminal differentiation after only a few cell doublings, therefore producing poorly stratified epithelium in reconstructed substitutes as those seen with L203HCECs and L204HCECs at P3. Under such conditions, epithelial cells probably had no time to accumulate sufficient amounts of K3 to be detected by the usual immunologic procedures.

Because they are recognized as being much closer to normal cells than transformed cells or cell lines are, primary cultured cells represent a very powerful model for gene promoter studies.⁴⁻⁶ However, the results yielded by the transfection of the rPARP promoter, which has a transcriptional activity largely dependent on Sp1,³³ highlighted how critical it is to conduct such analyses in cells that reach the same number of passages when primary cultures are used as a model. As pointed out by Apt et al.,⁴⁶ research on Sp1 might be biased by the fact that Sp1 is apparently unspecifically upregulated in transformed cultured cells, whereas its expression in different tissues varies significantly *in vivo*, as reported by Saffer et al.⁷⁴ It is noteworthy that, so far, virtually all gene-promoter studies have been conducted in transformed cultured cells and not in primary cultures of normal (untransformed) cells, most likely for the reasons stated previously (refer to the introduction section). The results presented herein add further to the complexity of the Sp1 picture by providing evidence that its expression is also subjected to higher levels of regulation that depend on the state of differentiation reached by the cell system used. The use of primary cultured cells may be entering a new era as a tool to study and characterize gene promoter and regulatory sequences, as well as providing living starting material for clinical applications through tissue engineering. It is then vital to have a better understanding of how parameters such as cell passages and the human donor's origin influences the results of such studies.

2.3.6 Acknowledgements

The authors thank Serge Rivest and Guy Poirier (Oncology and Molecular Endocrinology Research Center and Unit of Health and Environment, CHUL Research Center, Que'bec, Canada, respectively) for critically reviewing this manuscript and Christian Saesle for helpful discussion and comments.

2.3.7 References

1. Omstead DR, Baird LG, Christenson L, et al. Voluntary guidance for the development of tissue-engineered products. *Tissue Eng.* 1998;4:239–266.
2. Purdue GF, Hunt JL Jr, Still JM, et al. A multicenter clinical trial of a biosynthetic skin replacement, Dermagraft-TC, compared with cryopreserved human cadaver skin for temporary coverage of excised burn wounds. *J Burn Rehabil.* 1997;18:52–57.
3. Veves A, Falanga V, Armstrong DG, Sabolinski ML. Graftskin, a human skin equivalent, is effective in the management of noninfected neuropathic diabetic foot ulcers: a prospective randomized multicenter clinical trial. *Diabetes Care.* 2001;24:290–295.
4. Gao JG, Mazella J, Tseng L. Activation of the human IGFBP-1 gene promoter by progesterin and relaxin in primary culture of human endometrial stromal cells. *Mol Cell Endocrinol.* 1994;104:39–46.
5. Park HM, Okumura J, Muramatsu T. Modulation of transcriptional activity of the chicken ovalbumin gene promoter in primary cultures of chicken oviduct cells: effects of putative regulatory elements in the 5'-flanking region. *Biochem. Mol Biol Int.* 1995;36: 811–816.
6. Sun J, Oddoux C, Gilbert MT, et al. Pituitary-specific transcription factor (Pit-1) binding site in the human renin gene 5'-flanking DNA stimulates promoter activity in placental cell primary cultures and pituitary lactosomatotropic cell lines. *Circ Res.* 1994;75:624–629.
7. Kruse FE. Stem cells and corneal epithelial regeneration. *Eye.* 1994;8:170–183.
8. Bradshaw JJ, Obritsch WF, Cho BJ, Gregerson DS, Holland EJ. Ex vivo transduction of corneal epithelial progenitor cells using a retroviral vector. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1999;40:230–235.

9. Thoft RA, Friend J. The X, Y, Z hypothesis of corneal epithelial maintenance. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1983;24:1442–1443.
10. Reim M, Kottek A, Schrage N. The cornea surface and wound healing. *Prog Retinal Eye Res.* 1997;16:183–225.
11. Dua H, Forrester JV. The corneoscleral limbus in human corneal epithelial wound healing. *Am J Ophthalmol.* 1990;110:646–656.
12. Germain L, Auger FA, Grandbois E, et al. Reconstructed human cornea produced *in vitro* by tissue engineering. *Pathobiology.* 1999;67:140–147.
13. Allan B. Closer to nature: new biomaterials and tissue engineering in ophthalmology. *Br J Ophthalmol.* 1999;83:1235–1240.
14. Germain L, Carrier P, Auger F, Salesse C, Guérin SL. Can we produce a human corneal equivalent by tissue engineering? *Prog Retinal Eye Res.* 2000;19:497–527.
15. Tsubota K, Satake Y, Kaido M, et al. Treatment of severe ocular surface disorders with corneal epithelial stem-cell transplantation. *N Engl J Med.* 1999;340:1697–1703.
16. Tsubota K, Toda I, Saito H, Shinozaki N, Shimazaki J. Reconstruction of the corneal epithelium by limbal allograft transplantation for severe ocular surface disorders. *Ophthalmology.* 1995;102:1486–1496.
17. Jenkins C, Tuft S, Liu C, Buckley R. Limbal transplantation in the management of chronic contact-lens-associated epitheliopathy. *Eye.* 1993;7:629–633.
18. Pellegrini G, Golisano O, Paterna P, et al. Location and clonal analysis of stem cells and their differentiated progeny in the human ocular surface. *J Cell Biol.* 1999;145:769–782.
19. Lindberg K, Brown ME, Chaves HV, Kenyon KR, Rheinwald JG. *In vitro* propagation of human ocular surface epithelial cells for transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1993;34:2672–2679.

20. Rama P, Bonini S, Lambiase A, et al. Autologous fibrin-cultured limbal stem cells permanently restore the corneal surface of patients with total limbal stem cell deficiency. *Transplantation*. 2001;72:1478–1485.
21. Gumbiner BM. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell*. 1996;84:345–357.
22. Cook T, Gebelein B, Urrutia R. Sp1 and its likes: biochemical and functional predictions for a growing family of zinc finger transcription factors. *Ann NY Acad Sci*. 1999;880:94–102.
23. Potvin F, Thibodeau J, Kirkland JB, Dandenault B, Duchaine C, Poirier GG. Structural analysis of the putative regulatory region of the rat gene encoding poly(ADP-ribose) polymerase. *FEBS Lett*. 1992;302:269–273.
24. Zutter MM, Ryan EE, Painter AD. Binding of phosphorylated Sp1 protein to tandem Sp1 binding sites regulates alpha2 integrin gene core promoter activity. *Blood*. 1997;90:678–689.
25. Larouche K, Leclerc S, Salesse C, Guérin SL. Expression of the alpha 5 integrin subunit gene promoter is positively regulated by the extracellular matrix component fibronectin through the transcription factor Sp1 in corneal epithelial cells *in vitro*. *J Biol Chem*. 2000;275:39182–39192.
26. Lin CS, Chen Y, Huynh T, Kramer R. Identification of the human alpha6 integrin gene promoter. *DNA Cell Biol*. 1997;16:929–937.
27. Rosmarin AG, Luo M, Caprio DG, Shang J, Simkevich CP. Sp1 cooperates with the ets transcription factor, GABP, to activate the CD18 (beta2 leukocyte integrin) promoter. *J Biol Chem*. 1998;273:13097–13103.
28. Noti JD, Johnson AK, Dillon JD. Structural and functional characterization of the leukocyte integrin gene CD11d: essential role of Sp1 and Sp3. *J Biol Chem*. 2000;274:8959–8969.

29. Block KL, Shou Y, Poncz M. An Ets/Sp1 interaction in the 5'-flanking region of the megakaryocyte-specific alpha IIb gene appears to stabilize Sp1 binding and is essential for expression of this TATA-less gene. *Blood*. 1996;88:2071–2080.
30. Czyz M, Cierniewski CS. Selective Sp1 and Sp3 binding is crucial for activity of the integrin alphaV promoter in cultured endothelial cells. *Eur J Biochem*. 1999;265:638–644.
31. Feng X, Teitelbaum SL, Quiroz ME, et al. Transforming growth factor-beta up-regulates the beta 5 integrin subunit expression via Sp1 and Smad signaling. *J Biol Chem*. 2000;275:8331–8340.
32. Jin Y, Wilhide CC, Dang C, et al. Human integrin beta3 gene expression: evidence for a megakaryocytic cell-specific cis-acting element. *Blood*. 1998;92:2777–2790.
33. Bergeron MJ, Leclerc S, Laniel MA, Poirier GG, Guérin SL. Transcriptional regulation of the rat poly(ADP-ribose) polymerase gene by Sp1. *Eur J Biochem*. 1997;250:342–353.
34. Potvin F, Roy RJ, Poirier G, Guérin SL. The US-1 element from the gene encoding rat poly(ADP-ribose) polymerase binds the transcription factor Sp1: the US-1 element from the gene encoding rat poly(ADP-ribose) polymerase binds the transcription factor Sp1. *Eur J Biochem*. 1993;215:73–80.
35. Germain L, Auger FA. Tissue engineered biomaterials: biological and mechanical characteristics. In: Wise DL, ed. *Applications*. New York: Marcel Dekker, Inc.; 1995;1:699–734. *Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering*; part B.
36. Laplante A, Germain L, Auger FA, Moulin V. Mechanism of wound reepithelialization: hints from a tissue-engineered reconstructed skin to long-standing questions. *FASEB J*. 2001;15:2377–2389.
37. Roy R, Gosselin P, Guérin SL. A short protocol for micro-purification of nuclear proteins from whole animal tissue. *Biotechniques*. 1991;11:770–777.
38. Dynan WS, Tjian R. The promoter-specific transcription factor Sp1 binds to upstream sequences in the SV40 early promoter. *Cell*. 1983;35:79–87.

39. Schneider R, Gander I, Muller U, Mertz R, Winnacker EL. A sensitive and rapid gel retention assay for nuclear factor I and other DNA-binding proteins in crude nuclear extracts. *Nucleic Acids Res.* 1986;14:1303–1317.
40. De Vries E, Van Driel W, Van den Heuvel SJL, Van der Vliet PC. Contactpoint analysis of the HeLa nuclear factor I recognition site reveals symmetrical binding at one side of the DNA helix. *EMBO J.* 1987;6:161–168.
41. Duriez PJ, Desnoyers S, Hoflack JC, et al. Characterization of anti-peptide antibodies directed towards the automodification domain and apoptotic fragment of poly (ADP-ribose) polymerase. *Biochim Biophys Acta.* 1997;1334:65–72.
42. Graham FL, van der Eb AJ. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology.* 1973;52:456–467.
43. Selden RF, Burke-Howie K, Rowe ME, Goodman HM, Moore DD. Human growth hormone as a reporter gene in regulation studies employing transient gene expression. *Mol Cell Biol.* 1986;6:3173–3179.
44. Han B, Liu N, Yang X, Sun HB, Yang YC. MRG1 expression in fibroblasts is regulated by Sp1/Sp3 and an Ets transcription factor. *J Biol Chem.* 2000;276:7937–7942.
45. Zhuang Y, Wendt C, Gick G. Up-regulation of Na, K-ATPase beta 1 transcription by hyperoxia is mediated by SP1/SP3 binding. *J Biol Chem.* 2000;275:24173–24184.
46. Apt D, Watts RM, Suske G, Bernard HU. High Sp1/Sp3 ratios in epithelial cells during epithelial differentiation and cellular transformation correlate with the activation of the HPV-16 promoter. *Virology.* 1996;224:281–291.
47. Hagen G, Muller S, Beato M, Suske G. Cloning by recognition site screening of two novel GT box binding proteins: a family of Sp1 related genes. *Nucleic Acids Res.* 1992;20:5519–5525.
48. Hagen G, Müller S, Beato M, Suske G. Sp1-mediated transcriptional activation is repressed by Sp3. *EMBO J.* 1994;13:3843–3851.

49. Laniel MA, Bergeron MJ, Poirier GG, Guérin SL. A nuclear factor other than Sp1 binds the GC-rich promoter of the gene encoding rat poly(ADP-ribose) polymerase *in vitro*. *Biochem Cell Biol*. 1997;75:427–434.
50. Kaufmann SH, Desnoyer S, Ottaviano Y, Davidson NE, Poirier GG. Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res*. 1993;53:3976–3985.
51. Boucher C, Gobeil S, Samejima K, Earnshaw WC, Poirier GG. Identification and analysis of caspase substrates: proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase and DNA fragmentation factor 45. *Methods Cell Biol*. 2001;66:289–306.
52. Quinlan RA, Schiller DL, Hatzfeld M, et al. Patterns of expression and organization of cytokeratin intermediate filaments. *Ann NY Acad Sci*. 1985;455:282–306.
53. Coulombe PA, Fuchs E. Elucidating the early stages of keratin filament assembly. *J Cell Biol*. 1990;111:153–169.
54. Lui JJ, Kao WWY, Wilson SE. Corneal epithelium-specific mouse keratin K12 promoter. *Exp Eye Res*. 1999;68:295–301.
55. Chen TT, Wu RL, Castro-Munozledo F, Sun TT. Regulation of K3 keratin gene transcription by Sp1 and AP-2 in differentiating rabbit corneal epithelial cells. *Mol Cell Biol*. 1997;17:3056–3064.
56. Wu RL, Chen TT, Sun TT. Functional importance of an Sp1- and NFkB-related nuclear protein in a keratinocyte-specific promoter of rabbit K3 keratin gene. *J Biol Chem*. 1994;269:28450–28459.
57. Stepp MA, Zhu L. Upregulation of alpha 9 integrin and tenascin during epithelial regeneration after debridement in the cornea. *J Histochem Cytochem*. 1997;2:189–201.
58. Stepp MA, Zhu L, Cranfill R. Changes in beta 4 integrin expression and localization *in vivo* in response to corneal epithelial injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1996;37:1593–1601.

59. Hagen G, Dennig J, Preiss A, Beato M, Suske G. Functional analyses of the transcription factor Sp4 reveal properties distinct from Sp1 and Sp3. *J Biol Chem.* 1995;270:24989–24994.
60. Majello B, De Luca P, Suske G, Lania L. Differential transcriptional regulation of c-myc promoter through the same DNA binding sites targeted by Sp1-like proteins. *Oncogenes.* 1995;10:1841–1848.
61. Philipsen S, Suske G. A tale of three fingers: the family of mammalian Sp/XKLF transcription factors. *Nucleic Acids Res.* 1999;27:2991–3000.
62. Kingsley C, Winoto A. Cloning of GT box-binding proteins: a novel Sp1 multigene family regulating T-cell receptor gene expression. *Mol Cell Biol.* 1992;12:4251–4261.
63. Ammanamanchi S, Brattain MG. Sp3 is a transcriptional repressor of transforming growth factor-beta receptors. *J Biol Chem.* 2001;276:3348–3352.
64. Black AR, Jensen D, Lin SY, Azizkhan C. Growth/cell cycle regulation of Sp1 phosphorylation. *J Biol Chem.* 1999;274:1207–1215.
65. Whitelock RB, Li Y, Zhou L, Sugar J, Yue BY. Expression of transcription factors in keratoconus, a cornea-thinning disease. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;235:253–258.
66. Geier C, von Figura K, Pohlmann R. Structure of the human lysosomal acid phosphatase gene. *Eur J Biochem.* 1989;183:611–616.
67. Perlino E, Cortese R, Ciliberto G. The human alpha 1-antitrypsin gene is transcribed from two different promoters in macrophages and hepatocytes. *EMBO J.* 1987;6:2767–2771.
68. Bhatia M, Kirkland JB, Meckling-Gill KA. Modulation of poly(ADPribose) polymerase during neutrophilic and monocytic differentiation of promyelocytic (NB4) and myelocytic (HL-60) leukaemia cells. *Biochem J.* 1995;308:131–137.

69. Suzuki H, Uchida K, Shima H, et al. Nucleotide sequence of a full-length cDNA for human fibroblast poly(ADP-ribose) polymerase. *Biochem Biophys Res Commun.* 1987;146:403–409.
70. Salminen A, Helenius M, Lahtinen T, et al. Down-regulation of Ku autoantigen, DNA-dependent protein kinase, and poly(ADP-ribose) polymerase during cellular senescence. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;238:712–716.
71. Schermer A, Galvin AS, Sun TT. Differentiation-related expression of a major 64K corneal keratin *in vivo* and in culture suggests limbal location of corneal epithelial stem cells. *J Cell Biol.* 1986;103:49–62.
72. Saffer JD, Jackson SP, Annarella MB. Developmental expression of Sp1 in the mouse. *Mol Cell Biol.* 1991;11:2189–2199.

Chapitre III : Article en préparation

CARACTÉRISATION DE LA RÉÉPITHÉLIALISATION CORNÉENNE À L'AIDE D'UN NOUVEAU MODÈLE DE CORNÉE RECONSTRUITE PAR GÉNIE TISSULAIRE

3.1 Contribution à l'article

Ce chapitre fait l'objet d'un article intitulé : Characterization of wound reepithelialization using a new tissue-engineered wound healing human corneal model, qui sera prochainement soumis pour publication dans la revue Investigative Ophthalmology and Visual Science. J'ai réalisé la conception ainsi que la totalité des expériences de ce travail. J'ai également effectué la rédaction du manuscrit en étroite collaboration et sous la direction du Dre Lucie Germain. La contribution d'Alexandre Deschambeault et de Mariève Talbot se situe au niveau de l'assistance technique. Les Drs Giasson, Auger et Guérin ont participé à la supervision du projet et à la rédaction de l'article. Dre Julie Fradette a également participé à la pré-lecture et à la correction du manuscrit.

3.2 Résumé

INTRODUCTION. La réépithélialisation de la surface cornéenne est un procédé permettant à ce tissu de conserver son rôle dans le système dioptrique de l'œil. Le but de la présente étude était de caractériser et de valider un nouveau modèle tridimensionnel de réépithélialisation cornéenne développé *in vitro* grâce au génie tissulaire. L'expression des constituants de la matrice extracellulaire et des sous-unités d'intégrines qui jouent un rôle important pendant la migration des cellules épithéliales a été étudiée. De plus, des facteurs exogènes ont été ajoutés afin de vérifier leur influence sur la vitesse de réépithélialisation.

MÉTHODOLOGIE. Une plaie a été produite sur la cornée humaine reconstruite avec un poinçon à biopsie de 6 millimètres de diamètre et la réépithélialisation à partir des marges de la plaie a été étudiée. Des biopsies de la surface de réépithélialisation ont été effectuées trois jours après l'induction de la plaie pour effectuer des études histologiques, immunohistologiques et de microscopie électronique. L'effet de la fibrine et du facteur de croissance épidermique (EGF) sur la réépithélialisation a également été analysé.

RÉSULTATS. Les résultats montrent que ce modèle *in vitro* permet la migration des cellules épithéliales cornéennes humaines sur une matrice extracellulaire naturelle. Durant la réépithélialisation, la migration des cellules épithéliales a suivi un patron qui est semblable à celui rapporté lors de la guérison de blessures cornéennes humaines *in vivo*. Ce modèle présente des aspects histologiques semblables au tissu d'origine ainsi que l'expression des constituants de la matrice extracellulaire et des sous-unités d'intégrines. Il a également permis de quantifier le taux de réépithélialisation, qui est significativement accéléré en présence de la fibrine ou de l'EGF. Les résultats ont aussi montré que l'expression de l'intégrine $\alpha_v\beta_6$ est augmentée dans les cellules épithéliales en migration comparativement au tissu cornéen non lésé.

CONCLUSIONS. Les similitudes observées avec le processus de guérison des blessures *in vivo* appuient l'utilisation de ce modèle tridimensionnel pour étudier les mécanismes de base impliqués dans le processus de réépithélialisation des cellules épithéliales cornéennes.

De plus, ce modèle pourrait également être utilisé pour évaluer l'effet de nouveaux agents et facteurs de croissance pouvant améliorer le traitement des lésions cornéennes avant même l'utilisation des animaux.

3.3 Article

Characterization of wound reepithelialization using a new tissue-engineered wound healing human corneal model

Patrick Carrier^{1,2,3}, Alexandre Deschambeault^{1,2,3}, Mariève Talbot^{1,2,3}, Claude Giasson^{1,5}, François A. Auger^{1,2,3}, Sylvain L. Guérin^{2,4}, and Lucie Germain^{1,2,3}.

From the ¹Laboratory of Experimental Organogenesis, Saint-Sacrement Hospital, Centre Hospitalier Affilié Universitaire de Québec (CHA), and ²Department of Oto-Rhinolaryngology and Ophthalmology and ³Surgery, Laval University, Québec, Canada; and the ⁴Oncology and Molecular Endocrinology Research Center, Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université Laval (CHUL) Research Center, Québec, Canada; ⁵School of Optometry, Research Unit in Ophthalmology, Université de Montréal, Québec, Canada.

Corresponding author: Dr. Lucie Germain, Laboratoire d'Organogénèse Expérimentale (LOEX), Hôpital du Saint-Sacrement du CHA, 1050 chemin Sainte-Foy, Québec, Canada, G1S 4L8, phone number: (418) 682-7696 or 7663; fax number: (418) 682-8000; E-mail: Lucie.germain@chg.ulaval.ca

This work was supported by Grants from the Canadian Institutes for Health Research (CIHR) (LG, FAA, SLG), Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ) and the Réseau de Recherche en Santé de la Vision from the FRSQ (LG, SLG, FAA, CG). LG is the recipient of a Canadian Research Chair on Stem Cell and Tissue Engineering and SLG is a Senior Scholar from the FRSQ. PC, AD and MT held studentships from the FRSQ.

3.3.1 Abstract

PURPOSE. The reepithelialization of the corneal surface is an important process for restoring the imaging properties of this tissue. The purpose of the present study was to characterize and validate a new human *in vitro* three-dimensional corneal wound healing model by studying the expression of ECM components and integrin subunits that play an important role during epithelial cell migration. In addition, we verified whether the presence of exogenous factors could accelerate the reepithelialization.

METHODS. Reconstructed human cornea was wounded with a 6 mm biopsy punch and the reepithelialization from the surrounding margins was studied. Biopsies of the reepithelialized surface were harvested three days after wounding and processed for histological, electron microscopy and immunofluorescence analyses. The effect of fibrin and epithelial growth factor on wound reepithelialization was also studied.

RESULTS. Our results demonstrate that this *in vitro* model allows the migration of human corneal epithelial cells on a natural ECM. During reepithelialization, epithelial cell migration followed a consistent wave-like pattern similar to that reported for human corneal wound healing *in vivo*. This model showed an histological appearance similar to the native tissue as well as expression of basement membrane components and the integrin subunits known to be main actors during the wound healing process. It also allowed us to quantify the reepithelialization rate, which was significantly accelerated in the presence of fibrin or EGF. Our results unravel that the $\alpha_v\beta_6$ integrin was increased in the migrating epithelial cells compared to the surrounding corneal tissue.

CONCLUSIONS. The similarity observed with the *in vivo* wound healing process supports the use of this tissue-engineered model for investigating the basic mechanisms involved in corneal reepithelialization. Moreover, this model could also be used as a tool for the screening of agents affecting reepithelialization or to evaluate the effect of growth factors before animal testing.

3.3.2 Introduction

The cornea is a highly specialized and unique organ in the human body. Because of its anatomical localization, the cornea is continually subjected to abrasive forces and occasional mechanical trauma. Damages to the cornea can result in scarring or opacification causing visual defects which compromise transparency and can even lead to complete loss of vision. Many of these wound healing problems are associated with the inability to reorganize a complete and mature smooth epithelium. This is essential in restoring the imaging properties of the tissue (1, 2). Therefore, to improve wound management and to develop new therapeutic approaches, it is essential to better understand the mechanisms of corneal wound healing.

Epithelial wound healing involves complex epithelial and stromal interactions mediated by growth factors and extracellular matrix (ECM) components (3-7). Cell-cell and cell-matrix interactions play important roles in maintaining the stratified structure of the corneal epithelium (2). Both cell adhesion and migration depend on the synthesis and assembly of the ECM at the epithelium-stroma junction (ESJ). During wound healing, the regeneration of a functional corneal epithelium depends on epithelial migration and the reconstitution of the epithelium-stroma junction (ESJ), which anchors the epithelium to the stroma.

Several models of wound healing have been developed in order to investigate the corneal mechanisms of reepithelialization and to screen growth factors susceptible to stimulate a healthy healing response. For example, corneal epithelial cell migration has been studied widely in *in vivo* and *in vitro* models. Many *in vitro* experiments consisted in the wounding of either animal (8-10) or human (11, 12) cells cultured in monolayers. These *in vitro* models suffer from two limitations. First, they do not allow all the interactions between different cell types as they happen during *in vivo* reepithelialization. Second, the study is limited to a single cell layer rather than the characteristic stratified epithelium found *in vivo*.

Corneal wound healing has also been studied using an *ex vivo* organ culture model for which the central region of a human (13-16) or animal (17-19) cornea is abraded and the reepithelialization studied. Despite the benefit of studying a human tridimensional tissue, these models suffer from a variety of disadvantages. First, the supply of human donor corneas for research is often limited and comes from a pool of corneas from older donors, from donors with severe medical disorders or rejected for transplantation due to corneal problems. In addition, the human eyes are received in the laboratory within two to six days after death (20), a delay that could negatively influence the results obtained with these tissues. In some cases, organ culture models also present a reduction in the number of epithelial cell layers, a stromal oedema and an incomplete reepithelialization (17, 21, 22).

Significant advances have also been made by studying corneal wound healing with *in vivo* models such as rabbits, rodents and horses (23-26). However, these studies are expensive and difficult owing to the complexity of the experimental procedures. Not only do these animal models implicate the well-known variability of cellular responses when cells of different origin are used but extrapolating from animal models to humans can be hazardous. To overcome these problems, there is a need for a new human *in vitro* wound healing model closely mimicking the cornea *in vivo* that could represent a more appropriate alternative to the use of monolayer cultures, organ culture models, and to a certain extent, animal experimentation.

Although several three-dimensional bioengineered corneal models have been generated with human (27-30) and animal (31-35) cells, they were not used to study corneal wound healing. We have previously reported the engineering of the first corneal model reconstructed from a collagen gel with untransformed human corneal fibroblasts and epithelial cells (36). More recently, using the self-assembly approach (37, 38), we have developed a completely natural reconstructed cornea without the addition of exogenous ECM proteins (27, 39). Our laboratory also modeled wound healing using a tissue-engineered skin construct in order to study *in vitro* the mechanisms of skin reepithelialization (40). A representative corneal wound healing model is suitable to better

understand the mechanism of wound healing and the factors that could improve the speed and quality of wound closure.

In the present study, we report the development of a new, human *in vitro* three-dimensional corneal wound healing model to study reepithelialization. Our results demonstrate that this *in vitro* construct allows the migration of human corneal epithelial cells on a natural ECM and shows an histological appearance similar to the native tissue as well as expression of basement membrane components and the integrin subunits known to be main actors during the wound healing process. Epithelial cell migration formed a typical wave-like pattern. In fact, convex leading fronts of migrating epithelial cells developed along the circumference of the defect. The reepithelialization was significantly accelerated when a fibrin clot was added after wounding. The $\alpha_v\beta_6$ integrin was increased in the migrating epithelial cells compared to the surrounding corneal tissue. We conclude that this wound healing model is a promising tool to screen new molecules that could modulate corneal reepithelialization.

3.3.3 Methods

This study was conducted in accordance with our institution's guidelines and the Declaration of Helsinki. The protocols were approved by the institution's Committee for the Protection of Human Subjects.

Tissue Extraction and Cell culture

Human corneal epithelial cells (HCECs) were isolated and cultured from post-mortem donors corneas unsuitable for transplantation (Banque nationale d'yeux du CHUQ) as described previously (36). Briefly, corneas were dissected out of the ocular globes with a curved scissor (Storz, St-Louis, MO) and the limbus was separated from the central cornea with a 7.5 mm diameter trephine (Pilling Weck, Markham, Ontario, Canada). The limbal ring was incubated in 2 mg/mL of dispase II (Roche, Laval, Québec, Canada) in Hepes buffer (ICN Biomedicals, Montréal, Québec, Canada), for 18h at 4°C. The epithelium, was mechanically removed from the stroma with forceps under a dissecting microscope (Nikon, SMZ-2T), cut into small pieces with a scalpel and centrifuged for 10 min (200 x g) at 20°C. The pellet of HCEC was then seeded in tissue culture flasks along with irradiated (6000 rads) murine Swiss-3T3 fibroblasts (ATCC, Rockville, MD). Primary cultures (P0) were subcultured up to the fourth four passage (P4). Human corneal fibroblasts were isolated from stromal portion of the cornea left after dispase digestion and removal of the epithelium and endothelium. Briefly, the stroma was incubated three hours at 37°C in a collagenase H solution (0.125U/mL) (Roche Diagnostics, Laval, Québec, Canada). After a 10-min-centrifugation (20°C), cells were seeded in 25 cm² tissue culture flasks and cultured as previously described (36). Fibroblasts were used in all experiments between the fifth and seventh passage. Human skin fibroblasts were obtained from the dermal portion of adult breast skin and cultured as described previously (40, 41). Each cell type was grown under 8% CO₂ at 37°C, and the culture medium was changed three times a week.

Engineering of Reconstructed human corneas

The self-assembly approach was used to produce reconstructed human corneas. Fibroblasts were cultured for 40 days in Dulbecco-Vogt modification of Eagle's medium (DME), supplemented with 10% fetal calf serum (Hyclone, Logan.), 100 IU/mL penicillin G (Sigma, Oakville, Ontario, Canada) and 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ gentamicin (Schering, Pointe-Claire, Québec, Canada) containing 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of ascorbate (Sigma) that supports ECM production and allows thick fibrous sheet formation in plastic culture flasks. After peeling off from the dishes, one dermal and one corneal fibroblasts sheet were superimposed and cultured for an additional week resulting in reconstructed stroma (RS). For this study, both dermal and corneal fibroblasts were used to produce the reconstructed stroma. Preliminary studies have lead to the conclusion that the combination of these two types of fibroblasts allowed the formation of a well-differentiated corneal epithelium histologically resembling that of a human cornea and resulted in higher reepithelialization rates than the use of corneal fibroblasts only. Corneal epithelial cells were seeded on the surface of RS and cultured in submerged conditions in complete epithelial cells medium supplemented with 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ascorbate, as previously described (38). After seven days, reconstructed corneas were raised at the air-liquid interface and cultured for another week in the same medium without EGF to induce the differentiation of epithelial cells. Media were changed three times a week.

Wound healing model

After a week of epithelial maturation at the air-liquid interface, RCs were wounded with a 6 mm diameter biopsy punch (Laboratoire Stiefel, Nanterre, France) and placed over a second reconstructed stroma devoid of epithelium in order to allow reepithelialization by epithelial cells onto this natural matrix. The wounded RC was cultured at the air-liquid interface for 3 days at the end of which the reepithelialized surface was photographed before the biopsy. Biopsies were processed for histological, electron microscopy and immunofluorescence analyses. All experiments were repeated 4 times.

Wound treatments and measurement of reepithelialization rates 3 days after wounding

To study the effect of EGF on wound reepithelialization, 20 μ L of a 25 ng/mL of human epidermal growth factor (EGF) (Austral Biological, San Ramon, CA) in culture medium (treated) or culture medium (control) was added on the wound twice a day during 3 days after wounding. In another set of experiments, the effect of fibrin clot was evaluated by adding or not 20 μ L of a mixture of 10 mg/mL of fibrinogen (Sigma) with 50 IU/mL of thrombin (Sigma) in a 10:1 ratio immediately after wounding.

The progression of reepithelialization was calculated for each treatment (n=4) using the photographed surfaces (Figs. 1B, 1D) and the NIH Image software on the third day after wounding. Results were expressed as percentage of wound closure on the 3rd day. Differences in relative reepithelialization between each treatment and controls were tested for statistical significance with the paired unilateral Student's t-test. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Histological Analysis

Biopsy specimens from the reconstructed wound healing model were fixed with Bouin's solution (ACP, St-Léonard, Québec, Canada) and embedded in paraffin. Five- μ m-thick microtome sections were stained with Masson's trichrome for histological analysis.

Immunofluorescence stainings

Samples were embedded in OCT (Optimal Cutting Temperature) compound (Somagen, Edmonton, Alberta, Canada) frozen in liquid nitrogen and then stored at -70°C until used. An indirect immunofluorescence assay was performed on acetone-fixed (10 minutes at -20°C) cryosections (5 μ m) as previously reported (42). Sections were incubated with the primary antibody (diluted in PBS containing 1% BSA) (mouse monoclonal anti-human collagen VII, laminin V (chain γ 2), integrin subunit β_4 , β_1 (ATCC), $\alpha_2\beta_1$ (Chemicon, Temecula, CA), α_3 (VM2, (43)), α_6 (Serotec, Mississauga, Ontario, Canada) and $\alpha_v\beta_6$ (Chemicon), AE5 (keratin 3) (ICN Biomedicals), Ki67 (BD PharmaMingen, Mississauga, Ontario, Canada)) for 45 minutes, followed by incubation

with the appropriate conjugated secondary antibody for 30 minutes (goat anti-mouse IgG-IgM conjugated with rhodamine (Chemicon)). Cell nuclei were also labeled with Hoechst reagent 33258 (Sigma) following immunofluorescence staining. Samples were then observed with a Nikon Optiphot microscope. They were photographed with a numeric CCD camera (Sensys, Roper Scientific, Trenton, NJ). Negligible background was observed for controls (primary antibodies omitted).

Transmission electron microscopy

Samples were fixed in 2.5% glutaraldehyde and processed for electron microscopy as previously described (40).

3.3.4 Results

Sensitivity of the *in vitro* human wound healing model to evaluate the reepithelialization pattern and rate

In order to study the reepithelialization of corneal wounds in an environment close to the *in vivo* conditions, tissue-engineered cornea comprising an epithelium and a stroma was produced by the self-assembly approach. After wounding with a six mm biopsy punch (Figs. 3.1A, 3.1C), the epithelial cell migration onto the natural matrix secreted by fibroblasts was evaluated. This model allowed us to follow the wound closure macroscopically by observing the ring of reepithelialization that progressed toward the wound center (Figs. 3.1B, 3.1D). The macroscopic observations after wounding revealed that the corneal epithelium migrated following a specific pattern observed in the four independent experiments performed. The progression of the epithelium was not uniform, occurring more rapidly in some areas than in others. Indeed, 3 or more convex leading fronts from different regions of the surrounding intact epithelium advanced towards the center (Figs. 3.1B, 3.1D). These migrating fronts developed within 12 to 24 h after wounding and continued to advance for the period studied (72 h). Therefore, this model allowed us to follow the wound closure macroscopically by observing convex fronts of reepithelialization that progressed toward the wound center in a pattern similar to the one reported for human corneal wound healing *in vivo* (44).

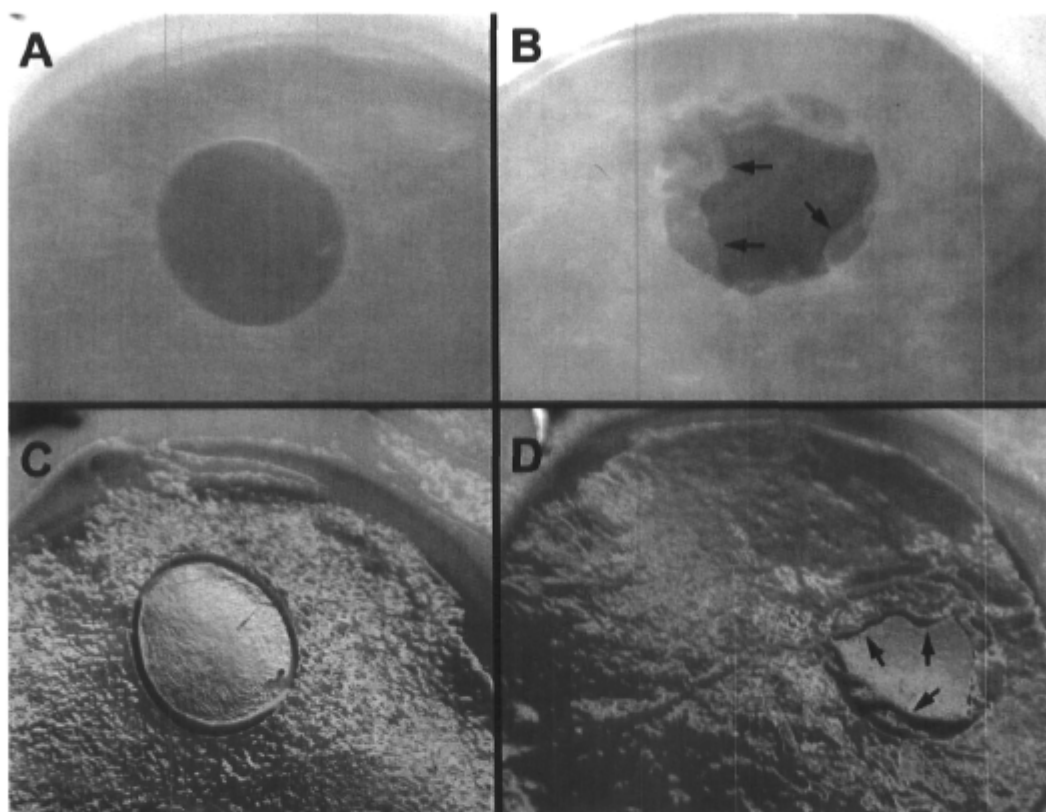


FIGURE 3.1. Macroscopic aspect of the wound in the reconstructed human cornea.

Reconstructed human cornea immediately (A, C) and two days after wounding (B, D) with a punch biopsy. Two days after wounding, the reepithelialization progressing from the wound margin toward the center can be observed macroscopically (arrows). Note that in C and D, the angle of the camera and the omission of the flash allow us to properly visualize the extent of reepithelialization from the surrounding epithelium.

Accelerated reepithelialization of corneal wounds by EGF and fibrin

In order to quantify the effect of fibrin or EGF on wound healing, the reepithelialized surface was measured 3 days after wounding. Tissue-engineered corneas treated with EGF displayed a statistically significant acceleration of wound reepithelialization compared to control wounds treated with culture medium without EGF (Fig. 3.2). Fibrin clot was also a potent factor since it increased the surface reepithelialized after 3 days by 2 folds (Fig. 3.2). These results indicated that EGF as well as fibrin clot accelerated reepithelialization.

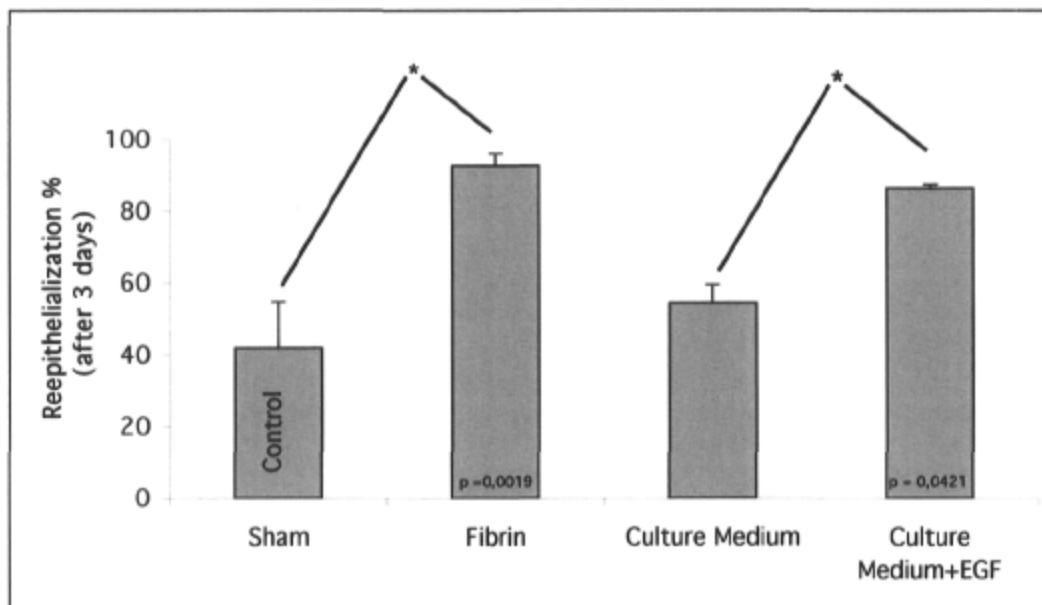


FIGURE 3.2. Effect of exogenous factors on reepithelialization.

The percentage of reepithelialization was calculated for each treatment (n=4) from the photographs taken on the third day after wounding as described in Materials and Methods. The student's t test ($p < 0.05$) was conducted to compare the treated wounds with their respective controls. A significant difference (*) was noted for fibrin and EGF treatment compared to their controls.

Histological analysis of reconstructed cornea and of cellular migration during reepithelialization

The histological observations of unwounded RC revealed a normal epithelial architecture after ten days of maturation at the air-liquid interface. As seen in Figures 3.3A and 3.3C, the epithelium stratified uniformly over the reconstructed stroma to form a well differentiated epithelium composed of 5 to 6 cell layers. Basal cells were cuboidal with round nuclei. The superficial layers showed spindle wing-like cells and flat squamous cells that did not cornify, a phenotype similar to normal human cornea *in situ*. Electron microscopy of the superficial layer revealed numerous projections, the typical structures known to contribute to the maintenance of the tear film (Fig. 3.5A'). The reconstructed stroma, supporting the epithelium, was composed of two fibroblast sheets comprising abundant natural collagen matrix secreted and assembled by fibroblasts (F1 and F2 on Figs.

3.3A and 3.3C). After wounding, the RC was placed over two supplementary fibroblast sheets (F3 and F4 on Figs. 3.3A and 3.3C) to allow reepithelialization over a natural matrix. The cut produced in the two initial fibroblast sheets could be used as a landmark for the location of the wound margin. The fibroblast sheets placed underneath after wounding served as a natural matrix for epithelial cell migration from the surrounding uninjured epithelium. The 3-day neoepithelium was separated into three regions (Fig. 3.3A); 1) the region called “near the wound margin” was located proximal to the wound margin (cut made by the biopsy punch), 2) the middle of the neoepithelium, 3) the migrating epithelial tongue (MET) was constituted of epithelial cells forming the tip of the neoepithelium. Three days after wounding, epithelial cells have migrated to regenerate a neoepithelium forming, near the wound margin and in the middle of the neoepithelium, a stratified epithelium similar to the normal corneal structure i.e. a basal layer covered by 5-6 layers of differentiating cells (Figs. 3.3A, 3.3B). When a fibrin clot was added onto the fresh wounds, the faster reepithelialization observed at the macroscopic level resulted in a more elongated neoepithelium over the fibrin (Fig. 3.3B). Suprabasal epithelial cells at the tip of the MET migrated over the basal layer to make contact with the reconstructed stroma (not shown) or the fibrin matrix (Fig. 3.3D). Moreover, at the tip of the leading edge, the basal cells were not columnar but presented a more flattened morphology (Fig. 3.3D).

Taken together, these results indicated that tissue-engineered cornea produced using the self-assembly approach, allows the formation of a well differentiated epithelium able to respond to an injury by restoring a new epithelium.

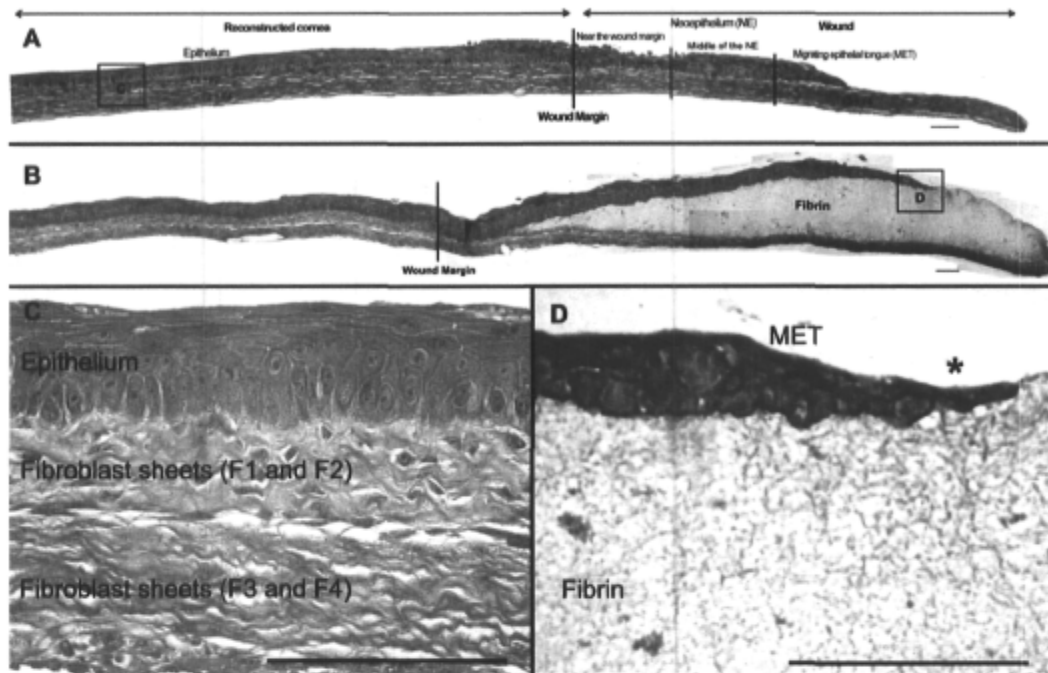


FIGURE 3.3. Histology of the *in vitro* self-assembled wound healing model 3 days after wounding.

Sections were stained with Masson's trichrome. (Cells are stained in pink and collagen in blueish.) (A) Composite picture showing a complete view of the wound healing model. (C) Higher magnification shows the histological organization of the reconstructed cornea. (B) When a fibrin clot was added onto the wounds, reepithelialization was accelerated. (D) Suprabasal epithelial cells at the tip of the migrating epithelial tongue (MET) (*) migrated over the basal cells to make contact with the fibrin matrix. Scale bar: 100 μ m.

Basement membrane components and integrin expression during wound healing

The deposition of basement membrane components, collagen type VII (Figs. 3.4A, 3.4B) and laminin V (Figs. 3.4C, 3.4D), formed a continuous line along the epithelium stroma junction (ESJ) (Figs. 3.4A, 3.4C) of the unwounded RC. Three days after wounding, an increased expression of collagen type VII and laminin V was detected in the cytoplasm of the migrating epithelial cells at the tip of the MET (Figs. 3.4B, 3.4D). Closer to the wound margin, the laminin V labeling became strong and almost continuous whereas collagen VII was weaker and patchy at the ESJ indicating that as soon as epithelial cells

settled, they initiated extracellular deposition of laminin V, which occurred earlier than collagen VII.

To further characterize the reepithelialization process occurring after wounding the reconstructed corneas, we studied the expression of integrins likely to be involved in cell migration processes during remodeling of the healing epithelium. The β_4 (Fig. 3.4E) and α_6 (Fig. 3.4J) integrin subunits, components of the hemidesmosomes, were present at the ESJ in the unwounded cornea. In contrast, β_4 integrin subunit was present on the entire cytoplasmic membrane surrounding the basal cells of the MET although the staining of the basal side was weaker and different from that of the unwounded area (Figs. 3.4E, 3.4F). Near the wound margin, the staining of the β_4 integrin subunit was almost continuous and restricted to the basal membrane of the neoepithelium (Fig. 3.4E). The distribution of the α_6 integrin subunit resembled that of β_4 , although it was not restricted to the basal membrane but also extended to the lateral membrane of basal cells of the unwounded cornea (Fig. 3.4J), and wounded area with a continuous staining of the basal membrane in the neoepithelium (Fig. 3.4K) and MET (Fig. 3.4L).

The expression of α_2 , α_3 and β_1 integrin subunits was detected around the basal cells of the intact epithelium (Figs. 3.4P, 3.4S, 3.4M). For the β_1 subunit, a slight staining of the superficial cells was also observed (Fig. 3.4M). A brighter staining of these integrins was detected at the tip of the MET (Figs. 3.4R, 3.4U, 3.4O) and in the middle of the neoepithelium (Figs. 3.4Q, 3.4T, 3.4N). In addition, the staining intensity of the β_1 subunit also increased in the suprabasal cells of the neoepidermis (Figs. 3.4N, 3.4O). The distribution of that integrin subunit suggests the presence of $\alpha_6\beta_1$ complexes in the newly forming epithelium of the MET since the β_4 subunit staining is diminish. Of particular interest was the change noted in the $\alpha_v\beta_6$ integrin during wound healing. This integrin was not observed in the unwounded RC (Fig. 3.4I). In contrast, a strong $\alpha_v\beta_6$ staining was detected all along the basal cells of the neoepithelium (Fig. 3.4I) indicating that epithelial cells induced their synthesis of $\alpha_v\beta_6$ during migration.

To determine how differentiated were the intact epithelium and the NE, we examined them by immunofluorescence microscopy using a monoclonal antibody to the

cornea specific differentiation marker keratin 3 (K3) (45). In the neoepithelium, from the margin up to the MET, the pattern of K3 expression resumed progressively in the most superficial epithelial cells of the neoepithelium. This indicates a progressive regeneration of a differentiated epithelium during restratification (Fig. 3.4G). The basal cells of unwounded and wounded epithelium did not expressed K3.

The proliferation marker Ki67 was then used to evaluate the proliferative activity of epithelial cells during wound healing. Two main regions of the epithelium showed positive expression of this marker (Fig. 3.4H). First, the unwounded RC had a great number of proliferating cells closely located to the wound margin. Moreover, the proliferation was also high in the middle of the neoepithelium. As the neoepithelium elongates and the wound margin becomes distant, epithelial cells in proliferation, over the surface of the wound, could supply cells for migration and stratification.

Thus, labeling the corneal constructs for basement membrane components and a differentiation marker showed that these proteins gradually recovered their normal expression pattern similar to that of unwounded epithelium. In addition, the expression of some integrin subunits in the regenerating epithelium was different from the intact surrounding epithelium.

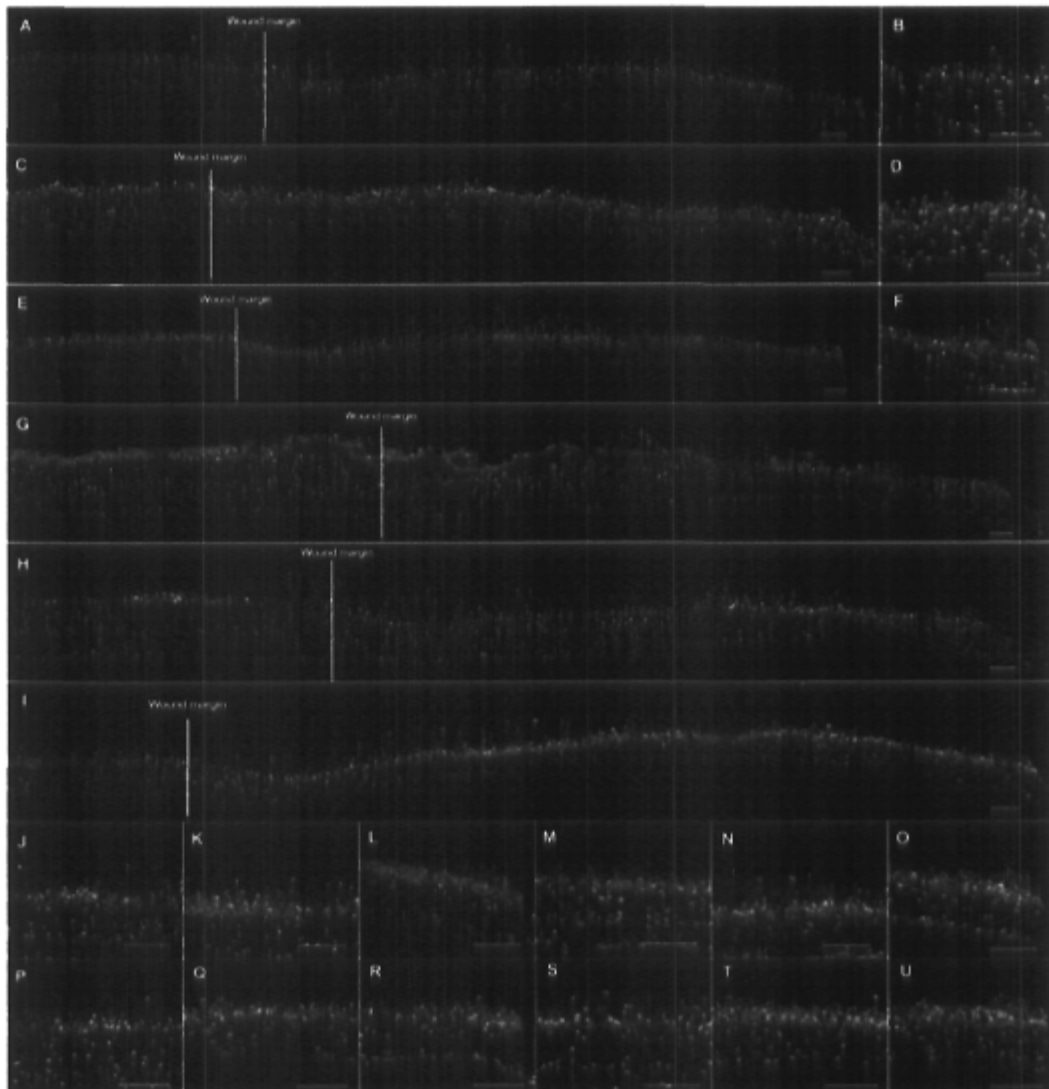


FIGURE 3.4. Indirect immunofluorescence of the wound healing model three days after wounding.

Composite picture of type VII collagen (A), laminin V (C), integrin subunit β_4 (E), keratin 3 (G), Ki67 (H) and integrin $\alpha_v\beta_6$ (I) showing the evolution of their expression from the unwounded RC to the end of the MET. Pictures B, D and F are higher magnification of the expression of type VII collagen, laminin V and integrin subunit β_4 at near the MET. Immunolocalization of integrin subunit α_6 (J,K,L), β_1 (M,N,O), $\alpha_2\beta_1$ (P,Q,R) and α_3 (S, T,U) was also performed on the unwounded RC (J,M,P,S), the middle of the neoepithelium (K,N,Q,T) and the MET (L,O,R,U). All these markers were revealed with TRITC (red) and nuclei were counterstained with Hoechst reagent 33258 (blue). Scale bar: 100 μm .

Ultrastructural analysis of the wounded reconstructed human corneas

To extend our study on the basement membrane components expressed under the neoepithelium, the structure of the basement membrane was then examined with electron microscopy. An organized epithelium-stroma junction (ESJ) was observed in the unwounded reconstructed cornea. Many hemidesmosomes that attached basal cells to the underlying fibroblast sheets were present along the continuous basement membrane (Fig. 3.5A). A higher magnification showed anchoring filaments which crossed the lamina lucida to form a sub-basal dense plate and connect hemidesmosomes to the lamina densa (Fig. 3.5A'').

At the tip of the MET where cells were migrating to reepithelialize the wound, no basement membrane was observed (Fig. 3.5F). Behind the MET, foci of *lamina densa* in reorganization were observed under the neoepithelium (Figs. 3.5C-3.5E). Near the wound margin, the ESJ was comparable to that of adjacent RC in term of continuity but hemidesmosomes were less frequent (Fig. 3.5B). Toward the wound center, the ESJ was progressively more continuous. The stromal compartment underneath the epithelium was composed of numerous collagen fibers. Thus, these results indicated that the formation of a continuous and organized ESJ with characteristic ultrastructural features resumed after the migration of epithelium.

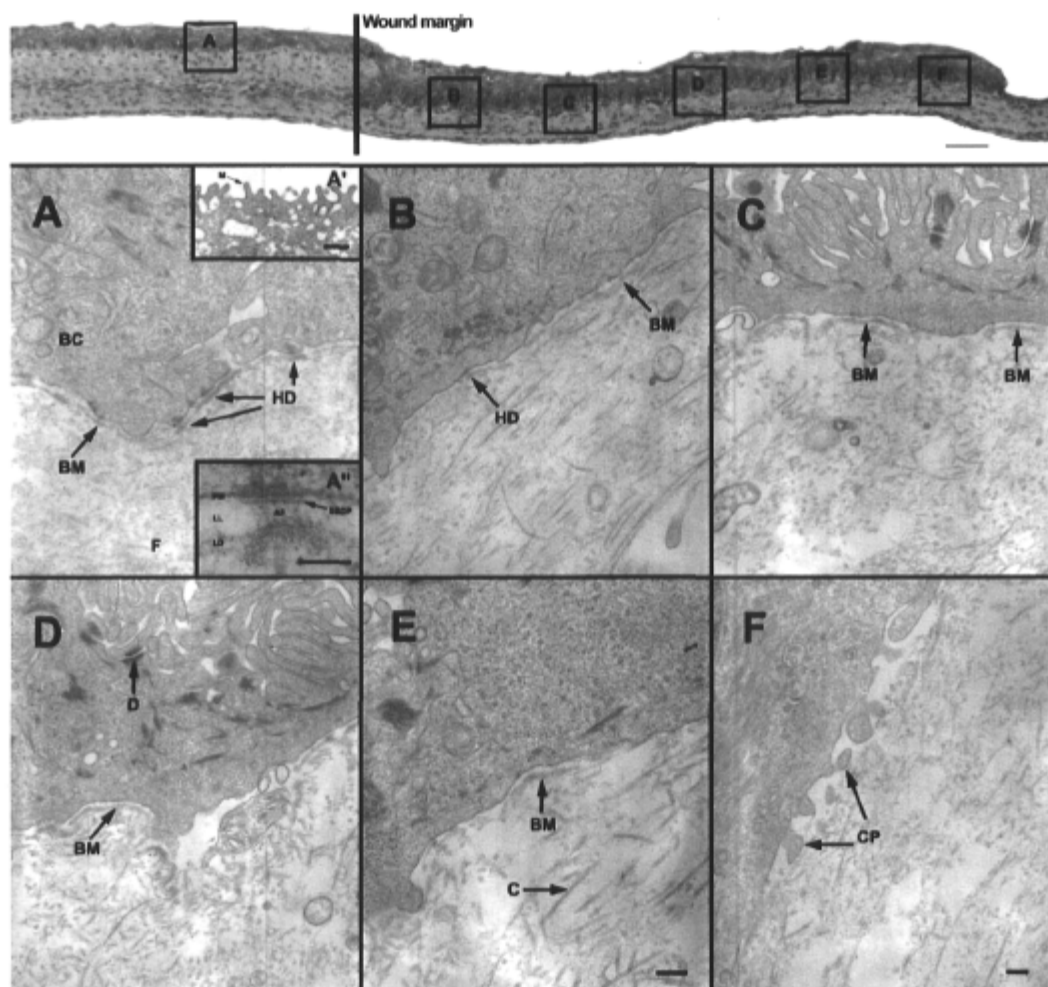


FIGURE 3.5. Transmission electron microscopy showing details of reformation of the epithelium-stroma junction (ESJ) in the wound-healing model.

The electron microscopic characterization was made on the RC (A) and on different part of the neopithelium (B-F). (A') Higher magnification displaying the presence of microvilli at the apical surface of the superficial cells. (A'') Higher magnification shows the structure of an hemidesmosome present at the ESJ. BC, basal cell; BM, basement membrane; HD, hemidesmosome; F, fibroblast sheet; M, microvilli; PM, plasma membrane; LL, lamina lucida; LD lamina densa; AF, anchoring fibrils; SBDP, sub-basal dense plate; D, desmosome; C, collagen fiber; CP, cytoplasmic projections. Scale bars: (A'), 500 nm; (A''), 100nm, (A-F), 200nm.

3.3.5 Discussion

Because a smooth, intact corneal epithelium is essential to maintain good vision and protect the cornea against infection (46), improvements in the understanding of the mechanisms regulating reepithelialization after epithelial defects are required. To the best of our knowledge, this is the first description of an *in vitro* human reconstructed cornea comprising an epithelium and a natural stroma to study wound healing. The described model offers several advantages. This *in vitro* system a) is a three-dimensional and completely biological cellular environment, b) allows epithelial-mesenchymal interactions between fibroblasts and epithelial cells, c) exhibits the major histological, immunohistological and ultrastructural properties of the human corneal epithelium, d) allows the study of a single parameter at a time as a result of controlled and reproducible *in vitro* conditions, e) mimics many aspects of the reepithelialization including cell migration, proliferation and the restoration of a stratified epithelium. This model reproduced the peculiar pattern observed in corneal wound healing. It demonstrated that EGF and fibrin significantly increased the reepithelialization rate. Finally, the studies of integrins unraveled that $\alpha_v\beta_6$ was *de novo* expressed in the neoe epithelium during wound healing.

Interestingly, in our reconstructed corneal wound healing model, reepithelialization processed as convex fronts of migrating cells, a peculiar pattern observed in corneal healing *in vivo* (44), *ex vivo* in human (13) and animal models (47) as well as *in vitro* after wounding confluent epithelial cell cultures (48). In patients, all corneal abrasions, irrespective of the nature of the injury, follow this consistent pattern during reepithelialization (44). It has been proposed that these convex fronts are due to areas of delayed healing, mixed with areas of normal cellular potential for migration and multiplication along the circumference of an abrasion. The present model offers a tool to further study this hypothesis with human cells in a natural environment.

Our results on the acceleration of wound closure by fibrin clot or EGF is consistent with previous studies performed in other systems (40, 49, 50). The role of the temporary scaffold formed by fibrin play a role in epithelial migration and temporary adhesion to the

substrate during corneal wound healing, at a time when normal anchoring mechanisms are lost. EGF is also known to increase migration of skin epithelial cells (51-53). The importance of fibrin in wound healing *in vivo* is suggested by the successful reepithelialization over corneal ulcers previously resistant to the therapy (54) by topical inhibition of plasmin, a serine protease capable of degrading fibrin and fibronectin, using aprotinin. Taken together with our results, it could be suggested that topical application of fibrin could have a potential therapeutic effect in some ocular disorders involving a loss of epithelium.

Therefore, this model offers a tool to compare and evaluate, under standard conditions, the effect of various exogenous factors on the rate and quality of reepithelialization. In addition, our method also offers other considerable benefits over *in vivo* animal models. Not only does it reduce animal used and ocular discomfort associated with *in vivo* corneal wounding, but it overcomes the inherent interindividual variability associated with animal models. Overall, modulation of corneal reepithelialization by the addition of exogenous factors can be studied and easily quantified *in vitro* with this wound healing model, indicating its potential use for drug screening in the pharmaceutical industry.

The stability of our corneal wound healing model allows to study reepithelialization over several days. Hence, as observed in *in vivo* studies, cells actively divided and migrated in our *in vitro* model. This contrasted with other *in vitro* models in which cells migrate but rarely divide (55). It is likely that the two clusters of proliferating cells have distinct function; the first, just behind the leading edge, provide a mass of cells ready to migrate (56), while the second, in the unwounded epithelium proximal to the wound bed (57), generate cells for stratification and differentiation.

Our model allows the study of healing in a tridimensionnal context. As *in vivo*, basal cells of the reconstructed human cornea formed hemidesmosomes and lay on a continuous basement membrane. Upon wounding, cells migrated over the natural matrix provided by the fibroblast sheet. This migration from the intact edge toward the wound center is possible through the disassembly of hemidesmosomes in MET and their replacement by focal adhesion. The integrins, that links the cells to the extracellular matrix,

undergo changes. We described that $\alpha_6\beta_4$ integrins, initially present in the hemidesmosomes as in native cornea, redistributed to lateral and apical membranes in MET as also observed in other models (55, 58-61). The increased expression of α_2 , α_3 and β_1 subunits we observed in the neopithelium is consistent with the presence of $\alpha_2\beta_1$ and $\alpha_3\beta_1$ in focal contacts (62-65), the temporary adhesion involved in epithelial cell migration that is well described in skin wound healing (66, 67). This difference reinforces the hypothesis of the implication of these integrins in corneal epithelial cell adhesion to basement membrane and adjacent cells during wound healing (68). The distribution of α_6 integrin subunit in the migrating epithelial cells was different from that of β_4 , suggesting that it could form a heterodimer with β_1 . This is consistent with the role of $\alpha_6\beta_1$ in epithelial cell migration proposed in cornea following studies with corneal organ culture models (60, 69).

The most striking modification in the integrin expression was the up-regulation of the $\alpha_v\beta_6$ integrin in the basal cells of the migrating neopithelium. $\alpha_v\beta_6$ was not detected in the unwounded adjacent epithelium as in the corneal epithelium *in situ* (not shown). This first report of $\alpha_v\beta_6$ in corneal healing is consistent with previous studies in skin and oral mucosa reporting the induction of this integrin during wound healing (70, 71). Taken together with the fact that $\alpha_v\beta_6$ integrin mediates adhesion to fibronectin and tenascin (72, 73), our results strongly suggest that $\alpha_v\beta_6$ may play a primary role in epithelial cell spreading and migration during corneal wound healing.

The reformation of the stratified epithelium after migration can be visualized in our model close to the position of the initial wound edge. Interestingly, the β_4 integrin subunit expression returned to its normal localization at the basal aspect of the basal cells, presumably in hemidesmosomes, in the middle of the neopithelium. Moreover, in this region, ultrastructural studies showed that hemidesmosomes reappeared and the basement membrane restructured in a more continuous structure as the one observed under the unwounded reconstructed cornea. This reorganization occurred by foci, where we and others have observed precursors of hemidesmosomes (41, 74). This progressive re-establishment of the epithelial-stroma junction was present at the wound margin before complete epithelial wound closure. It was accompanied by the deposition of type VII

collagen that was preceded by laminin V, a sequence similar to that occurring in skin (75, 76). Moreover, a progressive redifferentiation of the suprabasal cells of the neoepithelium toward a phenotype observed in the adjacent unwounded reconstructed cornea was observed by cellular expression of K3.

In summary, we have developed a fully human *in vitro* tissue-engineered corneal wound healing model devoid of any synthetic material that allows reepithelialization over a natural matrix after wounding. This model, which is composed of untransformed human epithelial corneal cells and fibroblasts, reproduces the *in vivo* cell environment and mimics many aspects of the reepithelialization process during wound closure. It also shows appropriate histology and expression of basement membrane components and integrins. Therefore, this completely biological three-dimensional model is very promising to further study the mechanisms involved in the reepithelialization process of corneal epithelial cells. Moreover, this model could be used for toxicological and pharmacological studies such as the screening and evaluation of potential agents affecting reepithelialisation. The use of our model will also enable investigation of the expression, distribution and characterization of the role of growth factors, their receptors, and ECM proteins during corneal wound healing.

3.3.6 Acknowledgements

The authors thank Julie Fradette, Ph.D for critically reviewing this manuscript. We also thank Éric Grandbois, Véronique Racine and Nathalie Tremblay for their technical assistance and Aristide Pusterla and Hélène Chamberland (Service de Microscopie et d'Histologie de l'Université Laval) for the preparation of specimen for electron microscopy.

3.3.7 References

1. Taliana, L., Evans, M. D., Dimitrijevic, S. D., and Steele, J. G. (2000) Vitronectin or fibronectin is required for corneal fibroblast-seeded collagen gel contraction. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 41, 103-109.
2. Agrawal, V. B., and Tsai, R. J. (2003) Corneal epithelial wound healing. *Indian J Ophthalmol.* 51, 5-15.
3. Zieske, J. D. (2001) Extracellular matrix and wound healing. *Curr Opin Ophthalmol.* 12, 237-241.
4. Imanishi, J., Kamiyama, K., Iguchi, I., Kita, M., Sotozono, C., and Kinoshita, S. (2000) Growth factors: importance in wound healing and maintenance of transparency of the cornea. *Prog Retinal Eye Res* 19, 113-129.
5. Saika, S., Ohnishi, Y., Ooshima, A., Liu, C. Y., and Kao, W. W. (2002) Epithelial repair: roles of extracellular matrix. *Cornea* 21, S23-29.
6. Nishida, T., and Tanaka, T. (1996) Extracellular matrix and growth factors in corneal wound healing. *Curr Opin Ophthalmol.* 7, 2-11.
7. Wilson, S. E., Mohan, R. R., Ambrosio, R., Jr., Hong, J., and Lee, J. (2001) The corneal wound healing response: cytokine-mediated interaction of the epithelium, stroma, and inflammatory cells. *Prog Retinal Eye Res.* 20, 625-637.
8. Nelson, J. D., Silverman, V., Lima, P. H., and Beckman, G. (1990) Corneal epithelial wound healing: a tissue culture assay on the effect of antibiotics. *Curr Eye Res* 9, 277-285.
9. Simmons, S. J., Jumblatt, M. M., and Neufeld, A. H. (1987) Corneal epithelial wound closure in tissue culture: an in vitro model of ocular irritancy. *Toxicol Appl Pharmacol* 88, 13-23.
10. Boisjoly, H. M., Laplante, C., Bernatchez, S. F., Salesse, C., Giasson, M., and Joly, M. C. (1993) Effects of EGF, IL-1 and their combination on in vitro corneal epithelial wound closure and cell chemotaxis. *Exp Eye Res.* 57, 293-300.
11. Grant, M. B., Khaw, P. T., Schultz, G. S., Adams, J. L., and Shimizu, R. W. (1992) Effects of epidermal growth factor, fibroblast growth factor, and transforming growth factor-beta on corneal cell chemotaxis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 33, 3292-3301.

12. Maldonado, B. A., and Furcht, L. T. (1995) Epidermal growth factor stimulates integrin-mediated cell migration of cultured human corneal epithelial cells on fibronectin and arginine-glycine-aspartic acid peptide. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 36, 2120-2126.
13. Zagon, I. S., Sassani, J. W., and McLaughlin, P. J. (2000) Reepithelialization of the human cornea is regulated by endogenous opioids. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 41, 73-81.
14. Foreman, D. M., Pancholi, S., Jarvis-Evans, J., McLeod, D., and Boulton, M. E. (1996) A simple organ culture model for assessing the effects of growth factors on corneal re-epithelialization. *Exp Eye Res.* 62, 555-564.
15. Collin, H. B., Anderson, J. A., Richard, N. R., and Binder, P. S. (1995) In vitro model for corneal wound healing; organ-cultured human corneas. *Curr Eye Res.* 14, 331-339.
16. Hardarson, T., Hanson, C., Claesson, M., and Stenevi, U. (2004) Time-lapse recordings of human corneal epithelial healing. *Acta Ophthalmol Scand* 82, 184-188.
17. Tanelian, D. L., and Bisla, K. (1992) A new in vitro corneal preparation to study epithelial wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 33, 3024-3028.
18. Lin, C. P., and Boehnke, M. (1997) A new model for in vitro corneal epithelial wound healing study. *Kaohsiung J Med Sci.* 13, 475-479.
19. Chuck, R. S., Behrens, A., Wellik, S., Liaw, L. L., Dolorico, A. M., Sweet, P., Chao, L. C., Osann, K. E., McDonnell, P. J., and Berns, M. W. (2001) Re-epithelialization in cornea organ culture after chemical burns and excimer laser treatment. *Arch Ophthalmol.* 119, 1637-1642.
20. Zhao, M., Song, B., Pu, J., Forrester, J. V., and McCaig, C. D. (2003) Direct visualization of a stratified epithelium reveals that wounds heal by unified sliding of cell sheets. *Faseb J.* 17, 397-406.
21. Richard, N. R., Anderson, J. A., Weiss, J. L., and Binder, P. S. (1991) Air/liquid corneal organ culture: a light microscopic study. *Curr Eye Res.* 10, 739-749.
22. Van Horn, D. L., Doughman, D. J., Harris, J. E., Miller, G. E., Lindstrom, R., and Good, R. A. (1975) Ultrastructure of human organ-cultured cornea. II. Stroma and epithelium. *Arch Ophthalmol.* 93, 275-277.
23. Kim, M. J., Jun, R. M., Kim, W. K., Hann, H. J., Chong, Y. H., Park, H. Y., and Chung, J. H. (2001) Optimal concentration of human epidermal growth factor (hEGF) for epithelial healing in experimental corneal alkali wounds. *Curr Eye Res.* 22, 272-279.

24. Zieske, J. D., Hutcheon, A. E., Guo, X., Chung, E. H., and Joyce, N. C. (2001) TGF- β receptor types I and II are differentially expressed during corneal epithelial wound repair. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 42, 1465-1471.
25. Brazzell, R. K., Stern, M. E., Aquavella, J. V., Beuerman, R. W., and Baird, L. (1991) Human recombinant epidermal growth factor in experimental corneal wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32, 336-340.
26. Burling, K., Seguin, M. A., Marsh, P., Brinkman, K., Madigan, J., Thurmond, M., Moon-Massat, P., Mannis, M., and Murphy, C. J. (2000) Effect of topical administration of epidermal growth factor on healing of corneal epithelial defects in horses. *Am J Vet Res.* 61, 1150-1155.
27. Germain, L., Carrier, P., Giasson, M., Grandbois, E., Auger, F. A., and Guerin, S. L. (1999) A new method for in vitro production of human reconstructed cornea by tissue engineering. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 40, S329.
28. Griffith, M., Osborne, R., Munger, R., Xiong, X., Doillon, C. J., Laycock, N. L., Hakim, M., Song, Y., and Watsky, M. A. (1999) Functional human corneal equivalents constructed from cell lines. *Science.* 286, 2169-2172.
29. Orwin, E. J., and Hubel, A. (2000) In vitro culture characteristics of corneal epithelial, endothelial, and keratocyte cells in a native collagen matrix. *Tissue Eng.* 6, 307-319.
30. Reichl, S., Bednarz, J., and Muller-Goymann, C. C. (2004) Human corneal equivalent as cell culture model for in vitro drug permeation studies. *Br J Ophthalmol.* 88, 560-565.
31. Minami, Y., Sugihara, H., and Oono, S. (1993) Reconstruction of cornea in three-dimensional collagen gel matrix culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 34, 2316-2324.
32. Zieske, J. D., Mason, V. S., Wasson, M. E., Meunier, S. F., Nolte, C. J. M., Fukai, N., Olsen, B. R., and Parenteau, N. L. (1994) Basement membrane assembly and differentiation of cultured corneal cells: importance of culture environment and endothelial cell interaction. *Exp Cell Res* 214, 621-633.
33. Parnigotto, P. P., Bassani, V., Montesi, F., and Conconi, M. T. (1998) Bovine corneal stroma and epithelium reconstructed in vitro: characterisation and response to surfactants. *Eye.* 12, 304-310.
34. Schneider, A. I., Maier-Reif, K., and Graeve, T. (1999) Constructing an in vitro cornea from cultures of the three specific corneal cell types. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 35, 515-526.
35. Tegtmeyer, S., Reichl, S., and Muller-Goymann, C. C. (2004) Cultivation and characterization of a bovine in vitro model of the cornea. *Pharmazie.* 59, 464-471.

36. Germain, L., Auger, F. A., Grandbois, E., Guignard, R., Giasson, M., Boisjoly, H. M., and Gu erin, S. L. (1999) Reconstructed human cornea produced in vitro by tissue engineering. *Pathobiology*. 67, 140-147.
37. Auger, F. A., Remy-Zolghadri, M., Grenier, G., and Germain, L. (2002) A truly new approach for tissue engineering: the LOEX self-assembly technique. *Ernst Schering Res Found Workshop*, 73-88.
38. Germain, L., Berthod, F., Moulin, V., Goulet, F., and Auger, F. A. (2004) Principles of Living Organ Reconstruction by Tissue Engineering. In *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering* pp. 197-228, Marcel Dekker, New-York.
39. Carrier, P., Deschambeault, A., Talbot, M., Guerin, S., Auger, F., and Germain, L. (2002) Expression Of Extracellular Matrix Components In Reconstructed Human Cornea Produced By Tissue Engineering. *ARVO Meeting Abstracts* 43, E-abstract 4166.
40. Laplante, A. F., Germain, L., Auger, F. A., and Moulin, V. (2001) Mechanisms of wound reepithelialization: hints from a tissue-engineered reconstructed skin to long-standing questions. *FASEB J.* 15, 2377-2389.
41. Germain, L., and Auger, F. A. (1995) Tissue engineered biomaterials: biological and mechanical characteristics. In *Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering, part B; Applications* Vol. 1 pp. 699-734, Marcel Dekker, inc. Publishers, New York, USA.
42. Auger, F. A., Lopez-Valle, C. A., Guignard, R., Tremblay, N., No el, B., Goulet, F., and Germain, L. (1995) Skin equivalent produced with human collagens. *In Vitro Cell Dev Biol. Animal* 31, 432-439.
43. Kaufmann, R., Frosch, D., Westphal, C., Weber, L., and Klein, C. E. (1989) Integrin VLA-3: ultrastructural localization at cell-cell contact sites of human cell cultures. *J Cell Biol.* 109, 1807-1815.
44. Dua, H. S., and Forrester, J. V. (1987) Clinical patterns of corneal epithelial wound healing. *Am J Ophthalmol.* 104, 481-489.
45. Schermer, A., Galvin, S., and Sun, T.-T. (1986) Differentiation-related expression of a major 64K corneal keratin in vivo and in culture suggests limbal location of corneal epithelial stem cells. *J Cell Biol.* 103, 49-62.
46. Nishida, T., Nakamura, M., Mishima, H., and Otori, T. (1990) Differential modes of action of fibronectin and epidermal growth factor on rabbit corneal epithelial migration. *J of Cellular Physiology* 145, 549-554.
47. Petroustos, G., Guimaraes, R., Giraud, J., and Pouliquen, Y. (1983) Antibiotics and corneal epithelial wound healing. *Arch Ophthalmol.* 101, 1775-1778.

48. Jumblatt, M. M., and Neufeld, A. H. (1986) A tissue culture assay of corneal epithelial wound closure. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 27, 8-13.
49. Dejana, E., Lampugnani, M. G., Giorgi, M., Gaboli, M., and Marchisio, P. C. (1990) Fibrinogen induces endothelial cell adhesion and spreading via the release of endogenous matrix proteins and the recruitment of more than one integrin receptor. *Blood.* 75, 1509-1517.
50. Geer, D. J., and Andreadis, S. T. (2003) A novel role of fibrin in epidermal healing: plasminogen-mediated migration and selective detachment of differentiated keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 121, 1210-1216.
51. Chen, J. D., Kim, J. P., Sarret, Y., Wynn, K. C., and Woodley, D. T. (1992) Recombinant human epidermal growth factor (rEGF) promotes human keratinocyte locomotion. *J Invest Dermatol.* 948, 614.
52. Chen, J. D., Kin, J. P., Zhang, K., Sarret, Y., Wynn, K. C., Kramer, R. H., and Woodley, D. T. (1993) Epidermal growth factor (EGF) promotes human keratinocyte locomotion on collagen by increasing the $\alpha 2$ integrin subunit. *Exp Cell Res.* 209, 216-223.
53. Tanaka, A., Nagate, T., and Matsuda, H. (2005) Acceleration of wound healing by gelatin film dressings with epidermal growth factor. *J Vet Med Sci.* 67, 909-913.
54. Cejkova, J. (1998) The appearance and possible role of plasminogen activator of urokinase type (u-PA) activity in the cornea related to soft contact lens wear in rabbits. *Doc Ophthalmol.* 95, 165-179.
55. Stepp, M. A., Zhu, L., and Cranfill, R. L. (1996) Changes in $\beta 4$ Integrin expression and localization in vivo in response to corneal epithelial injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 37, 1593-1601.
56. Garlick, J. A., and Taichman, L. B. (1994) Fate of human keratinocytes during reepithelialization in an organotypic culture model. *Lab Invest.* 70, 916-924.
57. Szerenyi, K., Wang, X., Gabrielian, K., LaBree, L., and McDonnell, P. J. (1994) Immunocytochemistry with 5-bromo-2-deoxyuridine for visualization of mitotic cells in the corneal epithelium. *Cornea.* 13, 487-492.
58. Kurpakus, M. A., Quaranta, V., and Jones, J. C. R. (1991) Surface relocation of $\alpha 6 \beta 4$ integrins and assembly of hemidesmosomes in an in vitro model of wound healing. *J Cell Biol.* 115, 1737-1750.
59. Iglesia, D. D., Gala, P. H., Qiu, T., and Stepp, M. A. (2000) Integrin expression during epithelial migration and re-stratification in the tenascin-C-deficient mouse cornea. *J Histochem Cytochem.* 48, 363-376.

60. Paallysaho, T., Tervo, T., Virtanen, I., and Tervo, K. (1992) Integrins in the normal and healing epithelium. *Acta Ophthalmol.* 202, 22-25.
61. Gipson, I. K., Spurr-Michaud, S., Tisdale, A., Elwell, J., and Stepp, M. A. (1993) Redistribution of the hemidesmosome components $\alpha 6\beta 4$ integrin and bullous pemphigoid antigens during epithelial wound healing. *Exp Cell Res.* 207, 86-98.
62. Carter, W. G., Kaur, P., Gil, S. G., Gahr, P. J., and Wayner, E. A. (1990) Distinct functions for integrins $\alpha 3\beta 1$ in focal adhesions and $\alpha 6\beta 4$ bullous pemphigoid antigen in a new stable anchoring contact (SAC) of keratinocytes: relation to hemidesmosomes. *J Cell Biol.* 111, 3141-3154.
63. Nguyen, B. P., Ren, X. D., Schwartz, M. A., and Carter, W. G. (2001) Ligation of integrin alpha 3beta 1 by laminin 5 at the wound edge activates Rho-dependent adhesion of leading keratinocytes on collagen. *J Biol Chem.* 276, 43860-43870.
64. Decline, F., and Rousselle, P. (2001) Keratinocyte migration requires alpha2beta1 integrin-mediated interaction with the laminin 5 gamma2 chain. *J Cell Sci.* 114, 811-823.
65. Kreidberg, J. A. (2000) Functions of alpha3beta1 integrin. *Curr Opin Cell Biol.* 12, 548-553.
66. Goldfinger, L. E., Hopkinson, S. B., deHart, G. W., Collawn, S., Couchman, J. R., and Jones, J. C. (1999) The alpha3 laminin subunit, alpha6beta4 and alpha3beta1 integrin coordinately regulate wound healing in cultured epithelial cells and in the skin. *J Cell Sci.* 112, 2615-2629.
67. Cavani, A., Zambruno, G., Marconi, A., Manca, V., Marchetti, M., and Giannetti, A. (1993) Distinctive integrin expression in the newly forming epidermis during wound healing in humans. *J Invest Dermatol.* 101, 600-604.
68. Lauweryns, B., Van Den Oord, J. J., Valpes, R., Foets, B., and Missotten, L. (1991) Distribution of very late activation integrins in the human cornea. An immunohistochemical study using monoclonal antibodies. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 32, 2079-2085.
69. Latvala, T., Paallysaho, T., Tervo, K., and Tervo, T. (1996) Distribution and of $\alpha 6$ and $\beta 4$ integrins following epithelial abrasion in the rabbit cornea. *Acta Ophthalmol Scand.* 74, 21-25.
70. Haapasalmi, K., Zhang, K., Tonnesen, M., Olerud, J., Sheppard, D., Salo, T., Kramer, R., Clark, R. A., Uitto, V. J., and Larjava, H. (1996) Keratinocytes in human wounds express alpha v beta 6 integrin. *J Invest Dermatol.* 106, 42-48.

71. Thomas, G. J., Poomsawat, S., Lewis, M. P., Hart, I. R., Speight, P. M., and Marshall, J. F. (2001) alpha v beta 6 Integrin upregulates matrix metalloproteinase 9 and promotes migration of normal oral keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 116, 898-904.
72. Prieto, A. L., Edelman, G. M., and Crossin, K. L. (1993) Multiple integrins mediate cell attachment to cytotactin/tenascin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90, 10154-10158.
73. Weinacker, A., Chen, A., Agrez, M., Cone, R. I., Nishimura, S., Wayner, E., Pytela, R., and Sheppard, D. (1994) Role of the integrin alpha v beta 6 in cell attachment to fibronectin. Heterologous expression of intact and secreted forms of the receptor. *J Biol Chem.* 269, 6940-6948.
74. Smola, H., Stark, H. J., Thiekotter, G., Mirancea, N., Krieg, T., and Fusenig, N. E. (1998) Dynamics of basement membrane formation by keratinocyte-fibroblast interactions in organotypic skin culture. *Exp Cell Res.* 239, 399-410.
75. Larjava, H., Salo, T., Haapasalmi, K., Kramer, R. H., and Heino, J. (1993) Expression of integrins and basement membrane components by wound keratinocytes. *J Clin Invest.* 92, 1425-1435.
76. Kurpakus, M. A., Stock, E. L., and Jones, J. C. (1992) The role of the basement membrane in differential expression of keratin proteins in epithelial cells. *Dev Biol.* 150, 243-255.

Chapitre IV : Article en préparation

INFLUENCE DES FIBROBLASTES SUR LA DIFFÉRENCIATION ET LA STRATIFICATION DES CELLULES ÉPITHÉLIALES : ÉLÉMENTS DE RÉPONSES À L'AIDE D'UNE CORNÉE HUMAINE RECONSTRUITE PAR GÉNIE TISSULAIRE

4.1 Contribution à l'article

Ce chapitre fait l'objet d'un manuscrit intitulé : *Fibroblasts Modulate Differentiation and Stratification of Epithelial Cells : Insights from Human Cornea Reconstructed by Tissue Engineering*, qui sera prochainement soumis pour publication dans la revue *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. Cet article a été écrit avec mes travaux. J'ai réalisé la conception et effectué l'ensemble des manipulations expérimentales. J'ai aussi effectué la rédaction de cet article en étroite collaboration et sous la direction du Dr Lucie Germain. Robert Gauvin a conçu la cuvette qui a permis la mesure des coefficients d'absorption. La contribution d'Alexandre Deschambeault et de Mariève Talbot se situe au niveau de l'assistance technique. Les Drs Giasson, Auger et Guérin ont participé à la supervision du projet et à la rédaction de l'article. Dre Julie Fradette a également participé à la pré-lecture et à la correction du manuscrit.

4.2 Résumé

INTRODUCTION. Plusieurs interactions entre les cellules du mésenchyme et les cellules épithéliales ont lieu lors de processus tels que le développement embryonnaire ainsi que le renouvellement et le maintien de l'épithélium de la cornée et de la peau. Cependant, la signification fonctionnelle de ces interactions qui contrôlent l'homéostasie des tissus pendant la vie adulte est encore mal comprise. Le but de ce travail était d'étudier l'impact de la provenance des fibroblastes et des cellules épithéliales sur la différenciation et la stratification des tissus reconstruits *in vitro*, en utilisant un modèle de cornée humaine récemment développé grâce au génie tissulaire. De plus, l'implication de facteurs solubles dans ces interactions a été évaluée.

MÉTHODOLOGIE. Quatre types de tissus ont été produits *in vitro* par génie tissulaire à partir des quatre combinaisons possibles avec des fibroblastes et des cellules épithéliales provenant de la peau ou de la cornée: fibroblastes cornéens/épithéliales cornéennes, fibroblastes cornéens/épithéliales de peau, fibroblastes de peau/épithéliales de peau, fibroblastes de peau/épithéliales cornéennes. Des fibroblastes isolés de la peau ou de la cornée ont été cultivés en présence d'acide ascorbique pour permettre la formation de matrice extracellulaire sur laquelle des cellules épithéliales ont étéensemencées et cultivées. Des milieux conditionnés ont été également préparés à partir de monocouches de fibroblastes cornéens ou dermiques. Ces milieux ont été ajoutés aux milieux dans lesquels les tissus reconstruits ont été cultivés puis analysés avec des membranes de détection de cytokines. Des études histologiques ont été réalisées et les spectres d'absorption des quatre tissus reconstruits ont été mesurés.

RÉSULTATS. Les résultats démontrent que la provenance des cellules du mésenchyme et des cellules épithéliales a une grande influence sur les propriétés macroscopiques et histologiques (épaisseur) ainsi que sur les propriétés fonctionnelles (transparence) des tissus reconstruits. La différenciation des cellules épithéliales et l'épaisseur des tissus étaient contrôlées par le mésenchyme grâce à des facteurs solubles sécrétés par les fibroblastes. Une différence significative dans l'expression d'IL-6 a été détectée entre les

fibroblastes cornéens et dermiques. Les résultats ont également montré que la cornée reconstruite est en mesure d'absorber les rayons ultraviolets de façon similaire à la cornée *in situ*.

CONCLUSIONS. La provenance des fibroblastes et des cellules épithéliales joue un rôle important sur les propriétés des tissus reconstruits. Ces modèles tridimensionnels complètement biologiques semblent être très prometteurs pour améliorer la compréhension des interactions entre les cellules épithéliales et les cellules du mésenchyme, du contrôle de l'homéostasie des épithélia et possiblement pour le développement de traitements efficaces de plusieurs maladies de la cornée et de la peau.

4.3 Article

Fibroblasts Modulate Differentiation and Stratification of Epithelial Cells: Insights from Human Cornea Reconstructed by Tissue Engineering

Patrick Carrier^{1,2,3}, Mariève Talbot^{1,2,3}, Alexandre Deschambeault^{1,2,3}, Robert Gauvin^{1,2,3}, Claude Giasson^{1,5}, François A. Auger^{1,2,3}, Sylvain L. Guérin^{2,4}, and Lucie Germain^{1,2,3}.

From the ¹Laboratory of Experimental Organogenesis, Saint-Sacrement Hospital, Centre Hospitalier Affilié Universitaire de Québec (CHA), and ²Department of Oto-Rhino-Laryngology and Ophthalmology and ³Surgery, Laval University, Québec, Canada; and the ⁴Oncology and Molecular Endocrinology Research Center, Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université Laval (CHUL) Research Center, Québec, Canada; ⁵School of Optometry, Research Unit in Ophthalmology, Université de Montréal, Québec, Canada.

Corresponding author: Dr. Lucie Germain, Laboratoire d'Organogénèse Expérimentale (LOEX), Hôpital du Saint-Sacrement du CHA, 1050 chemin Sainte-Foy, Québec, Canada, G1S 4L8, phone number: (418) 682-7696 or 7663; fax number: (418) 682-8000; E-mail: Lucie.germain@chg.ulaval.ca

This work was supported by Grants from the Canadian Institutes for Health Research (CIHR) (LG, FAA, SLG), Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ) and the Réseau de Recherche en Santé de la Vision from the FRSQ (LG, SLG, FAA, CG). LG is the recipient of a Canadian Research Chair on Stem Cell and Tissue Engineering and SLG is a Senior Scholar from the FRSQ. PC, AD and MT held studentships from FRSQ.

4.3.1 Abstract

PURPOSE. Interactions between stromal and epithelial cells are present during processes such as development and maintenance of cornea and skin. However, the functional significance of the stromal-epithelial interactions that regulate homeostasis during postnatal life is still poorly understood. The aim of this work was to investigate the impact of the tissular source of fibroblasts and epithelial cells on the fate of tissues reconstructed *in vitro*, using a recently developed human corneal model produced by tissue engineering. In addition, we evaluated whether the factors involved in these interactions were soluble.

METHODS. Four constructs were produced by tissue engineering from the four combinations possible with fibroblasts and epithelial cells cultured from skin or cornea: corneal fibroblasts/corneal epithelial cells, corneal fibroblasts/skin epithelial cells, skin fibroblasts/skin epithelial cells, skin fibroblasts/corneal epithelial cells. Fibroblasts isolated from skin or cornea were cultured in the presence of ascorbic acid to produce sheets on which epithelial cells were then seeded and cultured. Conditioned media was also prepared from corneal and skin fibroblast's monolayer cultures. They were added to the media in which reconstructed tissues were cultured and analyzed with cytokine array membranes. Histological studies were performed and the absorption spectra of the four reconstructed tissues was measured.

RESULTS. Our results demonstrate that the tissular source of both epithelial and mesenchymal cells have a great impact on the macroscopic and histological features (thickness) as well as the functional properties (transparency) of reconstructed tissues. The regulation of epithelial differentiation and thickness was mesenchyme-dependent and mediated by diffusible factors secreted by fibroblasts. A significant difference in the expression of IL-6 was detected between corneal and skin fibroblasts. Our results also unravel that the reconstructed cornea has similar UV-absorption characteristics to that of the normal human cornea.

CONCLUSIONS. The cell source of both fibroblasts and epithelial cells plays a significant role in the properties of reconstructed tissues. These completely biological three-dimensional models appear to be very promising to gain a thorough understanding of interactions between stromal and epithelial cells, regulation of epithelia homeostasis and possibly development of effective treatments for many corneal disorders and skin diseases.

4.3.2 Introduction

Corneal epithelium regenerate continuously through stem cells located in the limbus. Multiple surgery or cryotherapy to the limbal area, chemical or thermal injuries, Stevens-Johnson syndrome, contact lens injury, aniridia or multiple endocrine deficiency may lead to limbal stem cell deficiency characterized by corneal opacification and vascularization resulting in a marked decrease in vision (1, 2). Since the treatment of these patients necessitate the restoration of limbal cells, they are poor candidates for conventional corneal graft. Thus, the progress in the development of living substitutes has generated an increased clinical interest in the applications of tissue engineering products as permanent wound coverage for the treatment of stem cell deficiency. Limbal epithelial progenitor cells expanded *ex vivo* by culturing on various substrates have been used to treat stem cell deficiency in animal models and in humans (3-7). More sophisticated substitutes comprising the stroma and the epithelium, and harboring the three-dimensional architecture of native tissue are currently developed for cornea and skin (8-14). The stroma is then reconstituted using fibroblasts in a collagen gel, sponge or in the matrix fibroblasts have produced and organized (self-assembly approach) (15). The limited availability of limbal tissue and the poor outcome of allogeneic grafting has lead to the question whether other autologous tissular source for both epithelial and fibroblasts could be adequate for tissue engineering.

Epithelia from different anatomic sites present various thickness and histological features. During the post-natal life, epithelia such as skin or cornea continuously renew through stem cells (2, 16). However, this extensive cellular growth and differentiation must be regulated and adjusted to cell loss to make it compatible with maintenance of normal structure and function. Indeed, adult epithelia generally exhibit a remarkable stability of differentiation and their histological features are highly conserved throughout postnatal life as a result of the homeostasis. For example, it is well known that the thickness of the epidermis and corneal epithelium remains remarkably uniform and that the number of epithelial cell layers is strikingly constant. The question thus arises as to how thickness is so precisely maintained. It remains that the differential factors involved in the maintenance

of the proper architecture of mature epithelia through a well-controlled balance between epithelial cell proliferation and differentiation is poorly characterized.

In spite of a common ectodermal embryonic origin, skin has a 15-20-cell-layer-thick pluristratified squamous epithelial components whereas the central cornea is only 6 cell-layer-thick and do not contain the granular and cornified layers. The cornified layers are composed of dead anucleated cells essential to impart impermeability to the skin. Thus, despite the morphological similarities of their basal cells, cutaneous and corneal epithelia may have diverged irreversibly from each other during development, thus resulting in different programs of differentiation. Alternatively, basal cells may be equipotential and their distinctive *in vivo* differentiation would then be due to distinct local directives derived from the underlying mesenchymal tissues (17, 18). Even if several lines of evidence indicate that the stroma contributes to the maintenance of epithelial phenotype (18-22), few is known concerning the factors involved in stromal-epithelial interactions during adulthood.

The role of the mesenchyme in the initial establishment of the histoarchitecture has been well established during the embryonic development. Not only does it support differentiation, but it also controls the developmental fate of its overlying epithelium by exerting instructive influences on the developing epithelial structures (23-26). Indeed, during embryogenesis, the differentiation of the epidermis (27, 28) and corneal epithelium (29) is dependent upon their associated dermis and stroma. Therefore, mesenchymal-epithelial interactions are well known to be of uppermost importance during embryonic organogenesis by regulating epithelial cell proliferation and differentiation (30-32). In contrast, the functional significance of the stromal-epithelial interactions that regulate homeostasis during adulthood is still poorly understood.

The study of stromal-epithelial interactions in specific situations such as wound healing has allowed the identification of some cytokines involved in these cellular communications (33-35). However, the potential influences of systemic factors and the presence of additional cell types such as endothelial cells and circulating lymphocytic cells complicate the analyses performed with *in vivo* systems. The use of cells in monolayer

cultures are more distant from the reality (without extracellular matrix and normal histoarchitecture) and often result in unstable models.

The development of tissue engineered three-dimensional reconstructed skin (12, 36) and cornea (8, 37), offers a valuable complementary *in vitro* approach. These recently developed models contains several layers of epithelial cells growing on top of fibroblasts sheets comprising fibroblasts and extracellular matrix. They provide *in vivo*-like tissue substitutes that may be manipulated experimentally under more defined and reproducible *in vitro* conditions. Moreover, these completely biological cellular environments, which mimics the normal histology of skin and corneal epithelium, allows interactions between different cell types, i.e. fibroblasts and epithelial cells. The cellular composition can also be controlled. In this context, we took advantage of these *in vitro* reconstructed tissues to assess how tissue homeostasis is so precisely maintained in surface epithelia such as epidermis and corneal epithelium.

The aim of the present study was to evaluate the contribution of epithelial and mesenchymal cells to determine the importance of the cell source in the production of corneal substitutes by tissue engineering. Their effects on the histological features of the epithelium as well as the maintenance of homeostasis was investigated using three-dimensional *in vitro* models of cornea and skin reconstructed by the self-assembly approach of tissue engineering. Our results showed that the tissular origin of both fibroblasts and epithelial cells impacted on the thickness of the epithelium, and the UV-absorption characteristics of reconstructed tissues. The influence of fibroblasts on the epithelium was mediated by diffusible factors.

4.3.3 Methods

This study was conducted in accordance with our institution's guidelines and the Declaration of Helsinki. The protocols were also approved by the institution's Committee for the Protection of Human Subjects.

Cell extraction and culture

Human limbal epithelial cells (HLECs) were isolated and cultured from two post-mortem donor corneas unsuitable for transplantation (Banque nationale d'yeux du CHUQ, Québec, Canada) as described previously (12). Briefly, the cornea was dissected out of the ocular globe with a curved scissor (Storz, St-Louis, MO) and the limbus was separated from the central cornea with a 7.5 mm diameter trephine (Pilling Weck, Markham, Ontario, Canada). The limbal ring, epithelium facing up, was incubated in a 2 mg/mL dispase II (Roche, Laval, Québec, Canada) in HEPES buffer for 18h at 4°C. The epithelium was mechanically removed from the stroma with forceps under a dissecting microscope (Nikon, SMZ-2T), cut into small pieces with a scalpel and centrifuged for 10 minutes (200 x g) at room temperature (RT). HLECs were then seeded in tissue culture flasks with feeder cells (irradiated (6000 rads) murine Swiss-3T3 fibroblasts (ATCC, Rockville, MD)). HLECs were subcultured up to the fourth passage (P4).

For the isolation of human corneal fibroblasts, the stroma was obtained after removal of the epithelium and endothelium following the dispase digestion. Then, the bare stroma was incubated three hours at 37°C in a collagenase H solution (0.125 IU/mL) (Roche Diagnostic, Laval, Canada). After a 10 minutes-centrifugation at RT, the cells were seeded in 25 cm² tissue culture flasks and cultured as previously described (Germain et al., 1999). Corneal fibroblasts were used between their seventh and ninth passage.

Keratinocytes (skin epithelial cells) and dermal fibroblasts were obtained from human breast skin specimen and cultured as previously described (12, 38). Briefly, skin was incubated overnight at 4°C in a thermolysin (Sigma, Oakville, Ontario, Canada) solution (500 µg/mL in an HEPES buffer). The epidermis was peeled from the dermis and

incubated for 30 minutes in a trypsin-EDTA solution (0.05% trypsin (ICN Biomedicals), 0.01% EDTA (JT Baker, Phillipsburg, NJ) to dissociate epithelial cells. The dermis was incubated three hours in a collagenase H (Roche Diagnostic) solution (0.125 IU/mL in the fibroblast's culture medium) to recuperate fibroblasts.

For each experiment, cells from 2 donors were analysed. All cells cultured on plastic or reconstructed tissues were grown under 8% CO₂ at 37°C, and culture medium was changed three times a week.

Reconstruction of tissues by tissue engineering

The self-assembly approach was used to produce four types of reconstructed tissues according to the following homo or heterotopic recombinations: corneal fibroblasts with corneal epithelial cells (CC), corneal fibroblasts with skin epithelial cells (CS), skin fibroblasts with skin epithelial cells (SS), and skin fibroblasts with corneal epithelial cells (SC). To produce the reconstructed stroma, 8000 fibroblasts/cm² were cultured for 40 days in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), supplemented with 10% fetal calf serum (Hyclone, Logan, UT), 100 IU/mL penicillin G (Sigma) and 25 µg/mL gentamicin (Schering, Pointe-Claire, Québec, Canada) containing 50 µg/mL of ascorbate (Sigma). Ascorbic acid induces extracellular matrix production and allows thick fibrous sheet formation in plastic culture flasks. After peeling off from the flasks, two sheets were superimposed to form a reconstructed dermis or stroma and cultured for another week to let them adhere together. Then, corneal or skin epithelial cells were seeded on the surface of the reconstructed stroma or dermis and cultured in submerged conditions in complete epithelial cell medium supplemented with ascorbate, as previously described (12, 37). After seven days, reconstructed tissues were fed with an EGF-free epithelial cell medium and were raised at the air-liquid interface for two additional weeks to induce epithelial cells to differentiate.

Conditioned media

The culture supernatant of corneal and skin fibroblasts cultured on plastic was harvested after 48 hours of contact with subconfluent monolayers cultured in DMEM supplemented with 10% fetal calf serum (Hyclone). After centrifugation, filtration through a 0.22 μm low protein-binding Millex-GV filter (Millipore, Nepean, Ontario, Canada), the conditioned media was stored at -80°C until use. When indicated, the conditioned media was further diluted 1:1 with fresh epithelial cell medium and added to the four reconstructed tissues from the moment of epithelial cells seeding. The media was changed every 48 hours. The experiment was repeated twice, each time with two different cell lines isolated from dermal skin and stromal cornea respectively (n=4).

Measurement of Absorption Spectrum

Absorbance (A) of the four reconstructed tissues was measured at room temperature with a scanning spectrophotometer (model Ultraspec 3000; Biochrom, Cambridge, England). Reconstructed tissues were immersed in PBS (Phosphate buffered saline) solution and placed in a quartz cuvette especially designed to measure absorbance of tissues. A fresh PBS solution was used after each measurement. To normalize the different thicknesses of the tissues, the absorption coefficient (α) of the investigated sample has been calculated using the following relation (39):

$$\alpha = A / d \times \lg e \text{ where } d \text{ is the thickness of the sample and } \lg e = 0,434$$

The experiment was repeated twice, each time with two different cell lines isolated from dermal skin and stromal cornea and from corneal and skin epithelium (n=4).

Histological Analysis and Thickness Measurement

After the absorbance measurements, biopsies from the reconstructed tissues were fixed in a Bouin solution (Produits chimiques ACP, St-Léonard, Québec, Canada) and embedded in paraffin. Five μm -thick sections were stained with Masson's trichrome. The thickness of different tissues was also determined after fixation with a microscope using a micrometer with a resolution of 1 μm .

Detection of Cytokines Expression in Fibroblast's Conditioned Media using Protein Arrays

The presence of 79 different cytokines and growth factors was evaluated with a Human Cytokine Array V kit produced by RayBiotech (Cedarlane Laboratories, Hornby, Ontario, Canada). Briefly, one mL of conditioned media was incubated with cytokine array membranes. To prepare this conditioned media, corneal and skin fibroblasts were plated at a density of 8 000 cells/cm². Cells were cultured in DME containing 10% fetal calf serum (Hyclone), 100 IU/mL penicillin G (Sigma), and 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ gentamycin (Schering Canada). At 70-75% of confluence, cells were washed twice in PBS (to remove residual serum proteins) and the complete culture medium was replaced with serum-free DME containing 0.5% of bovine serum albumin (BSA) (Sigma) for 48h. Supernatants were obtained as above and stored at 4°C until analysis. Following incubation of the conditioned media with the protein array, membranes were incubated with biotin-conjugated anti-cytokine antibodies. Membranes were washed and incubated with HRP-conjugated streptavidin. Signals were visualized using an enhanced chemiluminescence (ECL) system (Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, Québec, Canada). HRP-conjugated antibody produced positive signals, which are used to identify the orientation and to compare the relative expression levels among different membranes. The experiment was repeated twice (n=2).

4.3.4 Results

In order to determine the impact of the tissular source of fibroblasts and epithelial cells on the fate of tissues reconstructed *in vitro*, four constructs were produced by tissue engineering from the four combinations possible with fibroblasts and epithelial cells cultured from skin or cornea: reconstructed cornea (corneal fibroblasts and epithelial cells (CC)), reconstructed skin (skin fibroblasts and epithelial cells (SS)) and heterotypic reconstruction (skin fibroblasts with corneal epithelial cells (SC), and corneal fibroblasts with skin epithelial cells (CS)). To allow a fair comparison, all these reconstructed tissues were produced and cultured using the same defined experimental conditions.

Macroscopic analysis of the reconstructed tissues

Distinctive macroscopic aspects of the various reconstructed tissues were observed depending on the tissular source of fibroblasts and epithelial cells. Macroscopic observations from four independent experiments showed that the reconstructed cornea (CC) was uniformly transparent (Fig. 4.1A) whereas the reconstructed skin (SS) was regularly whitish and opaque (Fig. 4.1B). Thus, the apparent transparency exhibited by the reconstructed cornea and skin was similar to that of their corresponding native tissues.

The macroscopic observation of the heterotypic tissues reconstructed with corneal epithelial cells and skin fibroblasts (SC) (Fig. 4.1C) or skin epithelial cells and corneal fibroblasts (CS) (Fig. 4.1D) reveal that they were more heterogeneous than the two others (Figs. 4.1A, 4.1B). In addition, the two heterotypic reconstruction (Figs. 4.1C, 4.1D) were neither as transparent as the reconstructed cornea nor as opaque as the reconstructed skin. Therefore, these results indicated that the cell source of both epithelial cells as well as fibroblasts influenced the macroscopic features such as the transparency of the reconstructed tissues.

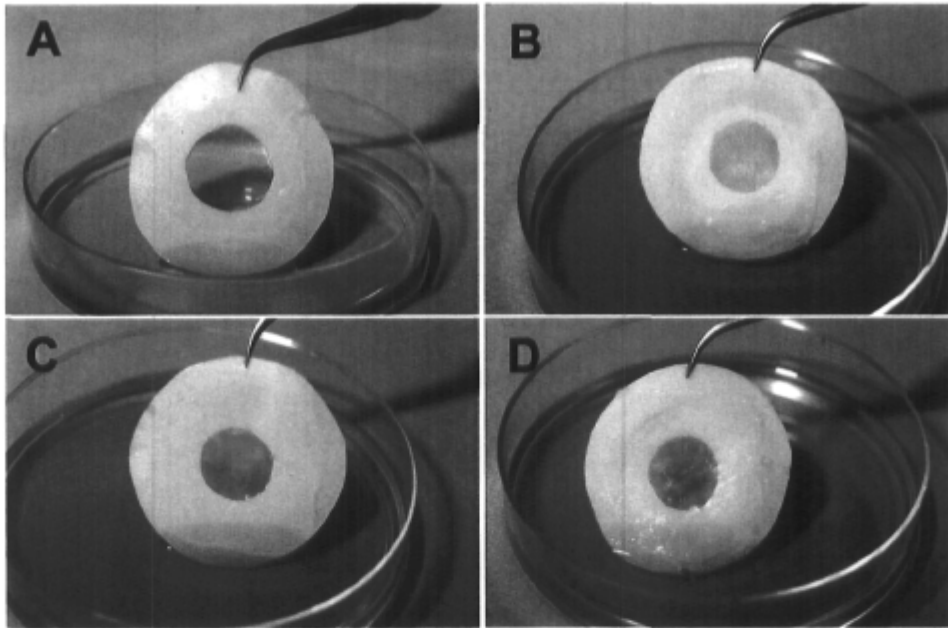


FIGURE 4.1. *Macroscopic aspect of the four types of tissues reconstructed by tissue engineering.*

In A), the reconstructed cornea (CC). In B), the reconstructed skin (SS). In C) the heterotopic tissue reconstructed with skin fibroblasts and corneal epithelial cells (SC), and in D), with corneal fibroblasts and skin epithelial cells (CS). Note that the macroscopic aspect of the reconstructed cornea was transparent whereas that of the skin was whitish and opaque. The two recombined tissues in C) and D) present intermediate features that were neither as transparent as the reconstructed cornea nor opaque as the reconstructed skin.

Absorption Spectrum of Reconstructed Tissues

To quantify these macroscopic observations on the transparency, we measured the absorption spectra of the four reconstructed tissues from 300 to 1000 nm. The reconstructed cornea (CC) presented the lowest absorption coefficient whereas the reconstructed skin (SS) had a higher absorption coefficient than the three other reconstructed tissues (Fig. 4.2) indicating that the cell source had a great influence on the ability of the reconstructed tissues to absorb light.

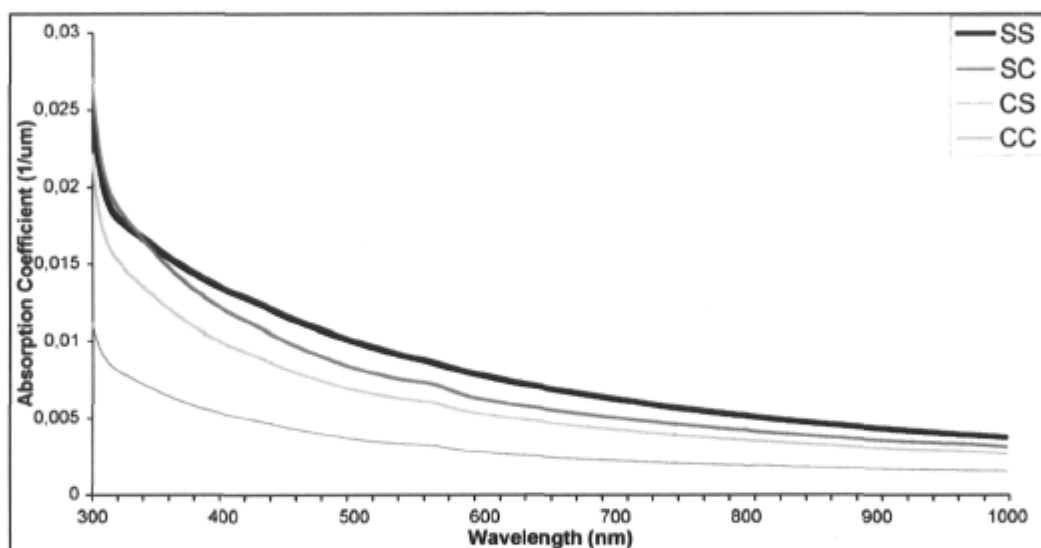


FIGURE 4.2. Absorption coefficient for the four tissue types between 300 and 1000 nm.

Note the higher absorption coefficient of the reconstructed skin (SS) compared with the two heterotypic tissues (SC and CS) and the reconstructed cornea (CC), which has the lower absorption coefficient. These results are in accordance with the macroscopic aspect of each reconstructed tissue, i.e. an opaque reconstructed skin and a transparent cornea. The absorption coefficient curves represent the average measurements on 4 different samples. The standing error (SE) was no greater than 17,74%.

We also studied the corneal absorption in the far ultraviolet (UV) region, with a special attention to the biologically significant range from 290 to 310 nm. The maximum UV absorption by the reconstructed cornea (CC) occurred at 265 nm with a broad peak at 255-

275 nm (Fig. 4.3). These results indicated that the reconstructed cornea presented absorption characteristics approaching those of cornea *in situ*.

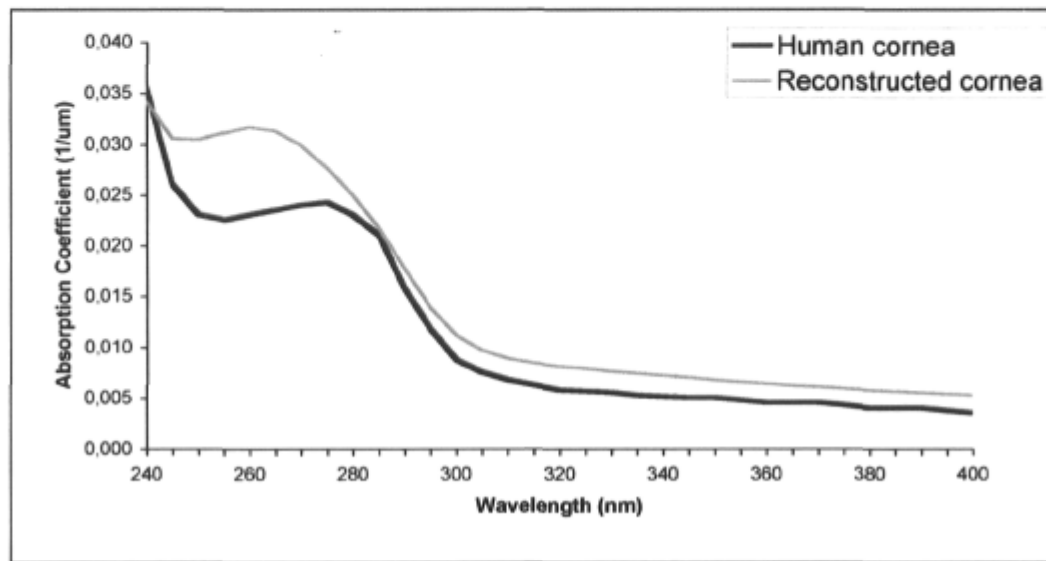


FIGURE 4.3. Absorption coefficient for the reconstructed cornea and native normal human cornea between 240 and 400 nm.

Note that absorption of the reconstructed cornea was relatively strong from 240 to 310. Moreover, these results were similar to those of normal human cornea. The absorption coefficient curve of the normal human cornea has been taken with permission from Kolozsvari et al. 2002 (39). The absorption coefficient curves represent the average measurements on 4 different samples. The SE was no greater than 16,05%.

Histological analyses of the four reconstructed tissues

In order to determine whether the cell source could also influence the histological features of the reconstructed tissues, the four constructs were stained with Masson's trichrome after fourteen days of maturation at the air-liquid interface. In all cases, the epithelial cells attached, proliferated, and differentiated to reform continuous and stratified epithelia. However, the thickness and differentiation (e.g. presence of the stratum corneum) of the reconstructed epithelia varied depending on the cell source.

Tissues reconstructed with homotypic cell types produced a well-organized corneal and epidermal epithelium. Corneal epithelial cells stratified uniformly over the reconstructed stroma (CC) forming an epithelium 5-6 cell layers thick. The basal layer was composed of cuboidal cells with round nuclei. Superficial layers had spindle wing-like cells overlaid by flat squamous cells that did not cornify (Fig. 4.4A). These results are similar to normal human cornea *in situ*. In contrast, the epithelium of the reconstructed skin was thicker and more differentiated (Fig. 4.4B). Indeed, a stratified, well-differentiated epithelium with up to 15-20 cell layers comprising the four characteristic cutaneous layers was present. Cells of the basal layer were cuboidal. Typical stratum spinosum and stratum granulosum covered by several layers of cornified cells resembling a typical stratum corneum were distinguishable. This layer was sometimes thicker than normal, presumably because of the absence of desquamation under *in vitro* experimental conditions.

When corneal epithelial cells were combined with dermal fibroblasts (SC), they formed a thicker epithelium, 10-11 cell layers (Fig. 4.4C), than when corneal fibroblasts were used (Fig. 4.4A). However, strata were similar to that of the normal corneal epithelium, with elongated nucleated suprabasal cells and without either granular or cornified anucleated layers. Although the thickness of the epithelium produced by skin epithelial cells cultured on corneal fibroblasts (CS) was similar (12 cell layers, Fig. 4.4D) to the other heterotypic combination, it was reduced compared to reconstructed skin and the differentiation was different. Indeed, the stratum granulosum and stratum corneum were thinner and sometimes completely lacking. Thus, these results indicated that the source of both mesenchymal and epithelial cell types influenced the thickness and histological features of the reconstructed epithelium.

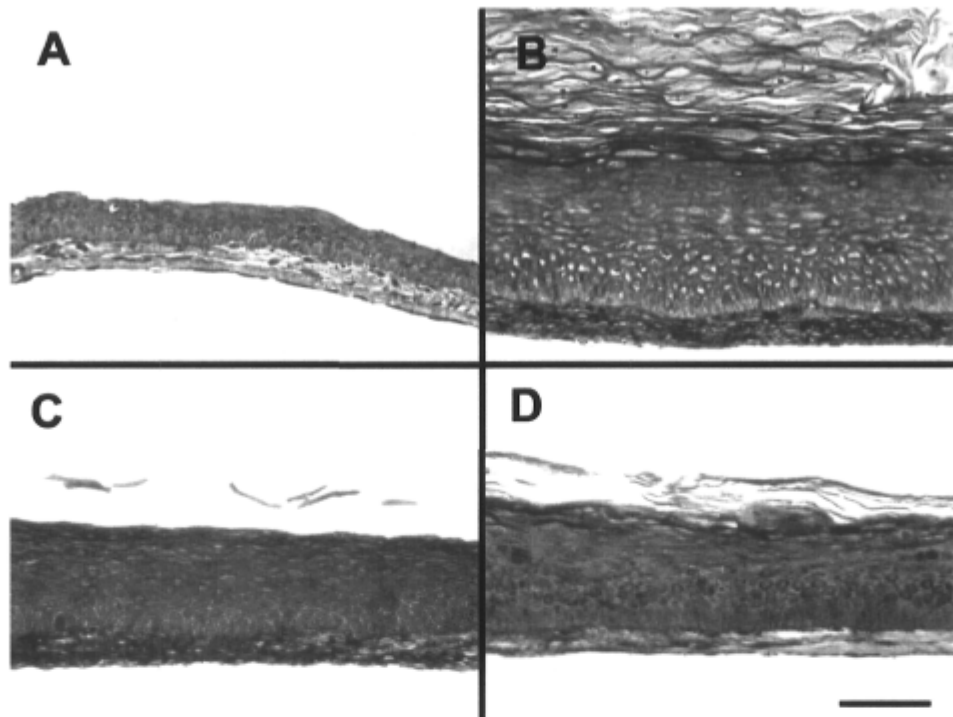


FIGURE 4.4. *Histological organization of the four reconstructed tissues.*

A) a 4-6 cell-layer-thick epithelium with cuboïdal basal cells and no stratum corneum was observed for the reconstructed cornea (CC) (as *in situ*). In B) a 15-20 cell-layer-thick epithelium with the four characteristic cutaneous layers including the basal, spinous, granular and cornified layers was observed in the reconstructed skin (SS) (again as observed *in situ*). The thickness of the epithelium of the other two heterotypic reconstructed tissues was intermediate with no or thinner stratum corneum. Indeed, when corneal epithelial cells were seeded on reconstructed dermis (SC), we observed an increase in the number of cell layers and the absence of a stratum corneum C). When skin epithelial cells were added on the reconstructed stroma (CS), we obtained a diminution of the stratification and a thinner stratum corneum D) compared with reconstructed skin in B). Scale bar: 100 μm .

Soluble factors influence epithelium changes in reconstructed tissues

The effect of fibroblasts on the epithelium could be mediated by direct cell-cell interactions or by diffusible factors they produce. To assess whether the effects of fibroblasts on the formation of the epithelium could be attributed to soluble factors, conditioned media collected from subconfluent monolayers of human corneal or skin fibroblasts were added to the four reconstructed tissues during the entire culture period of epithelial cells.

In reconstructed cornea (CC), medium conditioned by skin fibroblasts induced an increase in the thickness of the epithelium (Fig. 4.5A) resulting in an epithelium resembling that of the reconstructed tissue composed of skin fibroblasts and corneal epithelial cells (SC) (Fig. 4.4C). Moreover, this medium prevented the diminution in the number of epithelial cell layers observed in tissues reconstructed with corneal fibroblasts and skin epithelial cells (CS) (Fig. 4.4D) and allows a partial correction of histological properties of this epithelium. A much thicker anucleated stratum corneum was restored (Fig. 4.5D).

An opposite effect was observed in tissues supplemented with media conditioned by corneal fibroblasts. In its presence, reconstructed skin presented a thinner epithelium comprising a decrease in the thickness of the stratum corneum (Fig. 4.5B). Moreover, the addition of this conditioned medium to tissues reconstructed from skin fibroblasts and corneal epithelial cells reversed the increase in the number of epithelial cell layers and allowed the restoration of an essentially normal corneal epithelial architecture (Fig. 4.5C). Taken together, these observations indicated that corneal and skin fibroblasts induced variations in the epithelial cell differentiation and stratification through soluble factors.

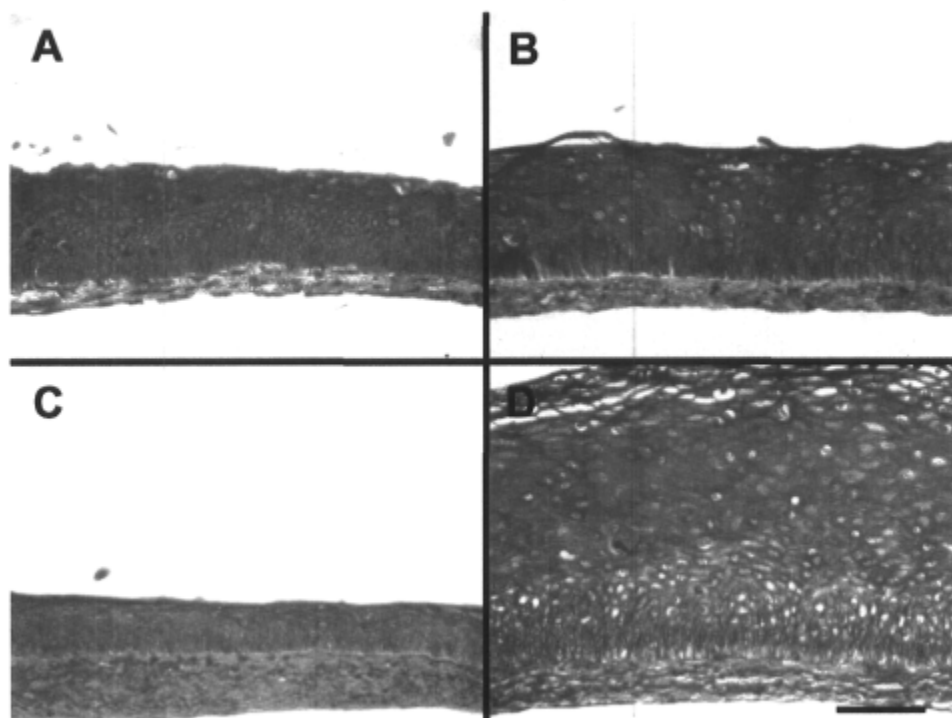


FIGURE 4.5. *Histological organization of the four tissues cultured with conditioned media.*

The media conditioned by a subconfluent monolayer of corneal fibroblasts gave rise to a lower number of cell layers in the epithelium of the reconstructed skin (SS) (B) and also in the heterotypic tissue composed of skin fibroblasts and corneal epithelial cells (SC) (C). In contrast, the media conditioned by skin fibroblasts was able to increase the epithelium thickness of the reconstructed cornea (CC) (A) and also in the heterotypic tissue composed of corneal fibroblasts and skin epithelial cells (CS) (D). Scale bar: 100 μm .

Analysis of conditioned media components

In order to seek for these fibroblast-derived soluble factors transregulating epithelial cell growth and differentiation, we analyzed the conditioned media with cytokine array membranes. Several cytokines and growth factors were detected at various level in media conditioned by corneal (Fig. 4.6A) and skin fibroblast monocultures (Fig. 4.6B). The most striking difference was the expression of interleukin 6 (Figs. 4.6A, 4.6B arrowhead). Corneal fibroblasts highly expressed IL-6 while this factor was hardly detectable in media conditioned by dermal fibroblasts. Furthermore, the signal for some factors (macrophage chemoattractant protein 1 (MCP-1), interleukin-1-alpha (IL-1 α), interleukin-1-beta (IL-1 β), interleukin-8 (IL-8)) was stronger in media conditioned by corneal fibroblasts whereas skin fibroblasts produced higher amount of other factors (epidermal growth factor (EGF), hepatocyte growth factor (HGF), transforming growth factor beta 2 (TGF β 2), transforming growth factor beta 3 (TGF β 3), tumor necrosis factor alpha (TNF α), tumor necrosis factor beta (TNF β)) (Figs. 4.6A, 4.6B arrows number 1 to 10)). The keratinocyte growth factor (KGF) and transforming growth factor beta (TGF β 1) signals were too weak to be quantified in both conditioned media. Thus, these results indicated that the pattern of secretion of soluble factors by skin fibroblasts and corneal fibroblasts were distinct.

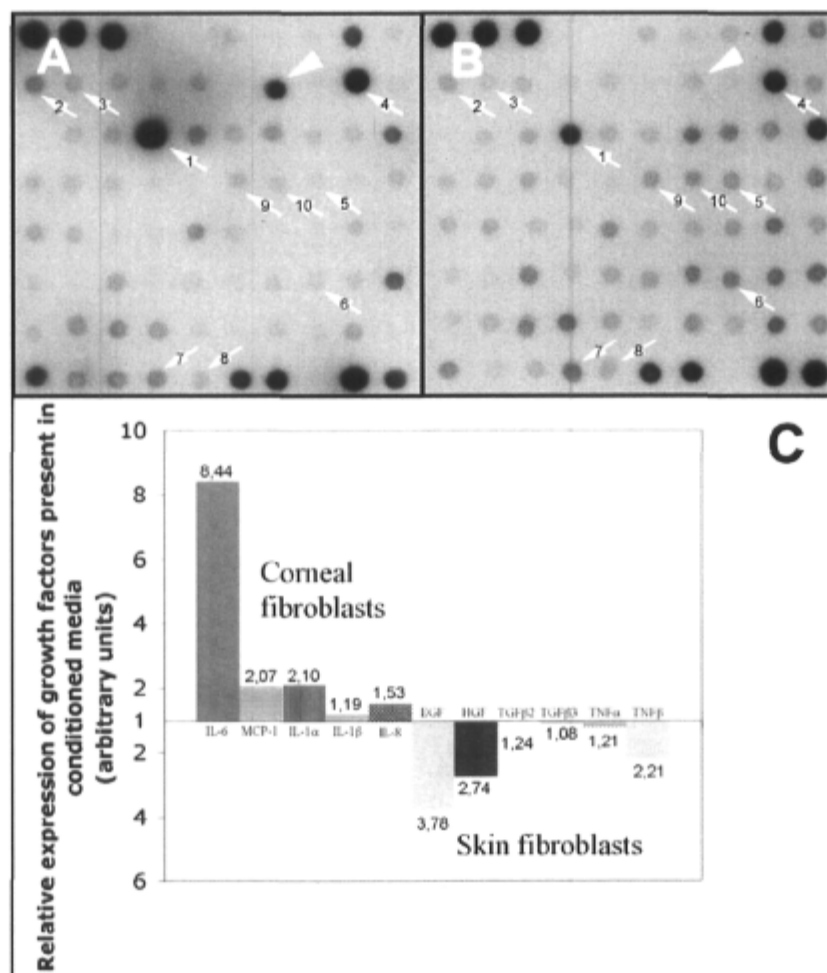


FIGURE 4.6. Detection of multiple cytokine expression from conditioned media.

The cytokine array membranes were incubated with conditioned media collected from human corneal (A) and skin fibroblast (B) cultures. The membranes were then incubated subsequently with biotin-conjugated anti-cytokine antibodies and then with HRP-conjugated streptavidin as described under Materials and Methods. The signals were visualized by ECL. Arrowhead indicates the detection of IL-6 in media conditioned by corneal and skin fibroblasts. Note that corneal fibroblasts highly expressed IL-6 while this factor was hardly detectable in media conditioned by dermal fibroblasts. Arrows indicate the detection of some factors which were produced in higher amount either in media conditioned by corneal fibroblasts (MCP-1 (1), IL-1 (2), IL-1 (3), IL-8 (4)) or in media conditioned by skin fibroblasts (EGF (5) HFG (6) TGF β 2 (7) TGF β 3 (8) TNF α (9), TNF β (10)). C) Variation in expression of some growth factors present in media conditioned by skin and corneal fibroblasts. A relative expression of 1 mean that there was no difference in the expression of a growth factor in both conditioned media. The membranes and graph represent one of two experiments with the same results.

4.3.5 Discussion

Progress in tissue engineering has led to the development of a few clinical applications. In addition, it provides improved models for *in vitro* applications such as physiologic or pharmacotoxicologic studies (9, 11, 40-42). The reconstruction of the stromal as well as the epithelial portion of cornea and skin under controlled conditions provided a system to investigate epithelial-mesenchymal interactions in the absence of external factors inherent to *in vivo* studies. In the present study, we took advantage of a well defined *in vitro* model produced by tissue engineering and enabling the reconstruction of cornea, skin and blood vessels *in vitro* (43-45), to further examine the importance of the tissular cell source in the production of tissues for regenerative medicine. Our results showed that the histological and functional (transparency) properties of the living construct resulted from the influence of both cell types, the epithelial as well as the fibroblastic cells from which the tissues were reconstructed. These epithelial-mesenchymal interactions were mediated soluble factors.

The three-dimensional aspect of the tissues reconstructed *in vitro* combined with their histologic features comparable to the native tissues allowed us to use these models to examine the impact of cell source on the homeostasis and functional properties of these tissues. Our results showed that both cell types, the fibroblasts as well as the epithelial cells were involved in the maintenance of an adequate transparency and epithelium thickness. Thus, we conclude that the epithelial-mesenchymal interactions play crucial roles in the homeostasis of mature epithelium during post-natal life. It is consistent with the mesenchyme influence taking place during embryonic development resulting in the establishment of the phenotypes leading to the various epithelium, as well as during some post-natal processes such as wound healing (46, 47).

Transparency is an additional functional parameter of utmost importance in corneal reconstruction. The macroscopic observation revealed that the transparency and opacification of the reconstructed tissues varied depending on their cellular composition. The best transparency was obtained when the source of both epithelial and mesenchymal cells was cornea. A more detailed analysis of the reconstructed cornea (CC) revealed that its UV-absorption characteristics were reminiscent of those of normal human cornea (39). Our data on the UV absorption spectrum are consistent with previous measures reported by Kolozsvari et al. (2002) (39) showing a peak of absorbance of the native human cornea at 275 nm with a broad peak around 255-290 nm. Taken together, these results suggest that grafting of a reconstructed cornea of thickness similar to that of a native cornea could protect the retina from UV radiation.

We examined the plasticity of adult epithelial cells from skin and cornea by combining them with a heterotypic corneal stroma or dermis, respectively. The stable and continued expression of a specific epithelial phenotype in adulthood may be due to an irreversible commitment by epithelial cells themselves, or alternatively, to ongoing instructive messages from the stroma (17, 18). Although it is generally believed that epithelial differentiation is progressively and irreversibly determined during embryonic and early postnatal life (48-51), strong evidence supporting the concept that stroma participate in the control of the plasticity of epithelial differentiation after birth is provided by the studies on uterus and vagina (52, 53) as well as those on the preservation of stem cells (54). Our results suggest that post-natal human skin and corneal epithelial cells remain responsive to the influence of foreign stroma since the transparency, thickness as well as histological features were modified in heterotypic reconstructions. The partial preservation of the original epithelial specificity, such as the absence of a cornified layer in reconstructed SC, is consistent with results from epithelial-mesenchymal recombinations *in vivo* which demonstrated that tissue specific differentiation is probably determined by a combination of stromal control mechanisms and intrinsic epithelial properties (17, 20, 55-60).

The variations obtained with our four tissue-engineered constructs show that changing the tissular source of fibroblasts induced dramatic changes to the stratification and histological features of the reconstructed epithelia. This is consistent with the observations that fibroblasts modify the proliferation, protein synthesis, stratification and differentiation of epithelial cells (61-64). Therefore, our data further support the concept that the function of fibroblasts is not only to synthesize, degrade and reorganize extracellular matrix components (65), but also to modulate epithelial homeostasis in adult organs.

Indeed, the results of the present study strongly suggest that fibroblasts, depending on their tissular origin, modulate epithelial cell growth, differentiation, and stratification in either a positive or in a negative way. Since conditioned media from the appropriate fibroblast type was sufficient to normalize the epithelium of heterotypic constructs (SC, CS), we conclude that the interactions took place through diffusible factors and did not require direct cell-cell contacts. Thus, skin (corneal) fibroblasts seem to release growth factors and cytokines with a net stimulatory (inhibitory) potential, which determine epithelial cell differentiation and stratification. These paracrine factors may be involved in the regulation of epithelial cell turnover in healthy epithelium. Together, these results clearly confirm that fibroblasts effectively influence the degree of differentiation and stratification of epithelial cells *in vitro* and play a crucial role in regulating epithelial homeostasis in a paracrine fashion.

The comparison of the media conditioned by corneal and skin fibroblasts provided fibroblast-derived cytokine candidates as possible key regulators of the paracrine loop responsible for the fine-tuned balance of epithelial cell differentiation and stratification. In addition to previously identified fibroblast-derived factors, such as IL-1, HGF and KGF, that may contribute to corneal and skin homeostasis (33, 62, 66-68), but with relatively similar expression by both types of fibroblasts, we suggest that IL-6 could have a dominant role in homeostasis of the healthy corneal and skin epithelium. It was expressed 8 times more by corneal than skin fibroblasts. This hypothesis is compatible with the ability of corneal (69) and skin fibroblasts (66) to produce nanogram levels of IL-6 following epithelial secretion of IL-1. In addition to specific immune responses (69), the abundant IL-

6 synthesized by these fibroblasts may promote various activities, including regulation of the epithelial homeostasis. This hypothesis is supported by the group of Kinoshita (70) who suggested that lacrymal IL-6 and IL-8 could help maintain corneal integrity. The range of concentration of such cytokines observed in human basal and reflex tears, led them to assume these cytokines as principal products of the quiescent ocular surface. (71). Since IL-6 and IL-8 are present even in the tears of eyes with no signs of inflammation, they could play a major role, in the ocular surface maintenance and homeostasis in addition to its demonstrated role in ocular inflammation.

Furthermore, our observation that media conditioned by corneal fibroblasts decreased the cornification in the CS is consistent with the decrease in keratinocyte differentiation associated with the addition of IL-6 to an *in vitro* wound healing model (72). Findings from this study also suggest that this cytokine could help regulate skin epithelial cell differentiation processes, in the same manner than EGF and TGF- α do. It is tempting to speculate that the large amount of IL-6 secreted by corneal fibroblasts may be associated with the suppression of the cornification and the maintenance of the special program of differentiation of the corneal epithelium. Conversely, the small quantity secreted by skin fibroblasts and low-levels of IL-6 in normal human skin (73-75) may contribute to the high differentiation state of the skin epithelium including cornification.

In conclusion, our investigation demonstrate that the tissular source of both epithelial and mesenchymal cells influences the macroscopic and histological features as well as the functional properties of reconstructed tissues. The regulation of epithelial differentiation and thickness was mesenchyme-dependent. It was mediated by diffusible factors secreted by fibroblasts. We suggest that IL-6 is a likely candidate to explain the difference between corneal and skin epithelia homeostasis. Moreover, we show that epithelial-mesenchymal interactions plays a key role in the homeostasis of post-natal tissues. The distinct differentiation program between corneal and skin epithelial cells seems to be controlled by both intrinsic and extrinsic programs.

Therefore, these completely biological three-dimensional models appear to be very promising to gain a thorough understanding of interactions between stromal and epithelial cells, regulation of epithelia homeostasis and possibly development of effective treatments

for many corneal disorders and skin diseases. Interestingly, the reconstructed cornea has similar UV-absorption characteristics to that of the normal human cornea, a greatly desirable property in order to protect the highly sensitive structures of the eye. In this context, the present study suggests that the best cell type for corneal reconstruction is the limbal epithelium since clearly distinct epithelium properties were obtained in the tissues reconstructed *in vitro* with the other cell source tested, the epidermis. This may appear to contrast with previous morphological similarities reported for cultured epithelial sheets obtained from epidermis, cornea, conjunctiva and oral mucosa (8, 76-79). We attribute these variations to the poor differentiation of the epithelial sheets that comprise only 3 to 5 stratified cell layers following submerged culture on plastic compared to the long-term culture of three-dimensional reconstructed tissues resulting in thicker epithelium including differentiated layers that resemble much more the native tissues.

4.3.6 Acknowledgements

The authors express their gratitude to Dr. Antal Nogradi for providing the data on native cornea (Fig. 3) and the permission to reproduce them. They also thank Julie Fradette, Ph.D, Stéphanie Proulx, Ph.D for critically reviewing this manuscript. We also thank Julie Guérard, Éric Grandbois, Véronique Racine and Nathalie Tremblay for their technical assistance.

4.3.7 References

1. Daniels, J. T., Dart, J. K., Tuft, S. J., and Khaw, P. T. (2001) Corneal stem cells in review. *Wound Repair Regen.* 9, 483-494.
2. Sangwan, V. S. (2001) Limbal stem cells in health and disease. *Biosci Rep.* 21, 385-405.
3. Rama, P., Bonini, S., Lambiase, A., Golisano, O., Paterna, P., De Luca, M., and Pellegrini, G. (2001) Autologous fibrin-cultured limbal stem cells permanently restore the corneal surface of patients with total limbal stem cell deficiency. *Transplantation.* 72, 1478-1485.
4. Talbot, M., Carrier, P., Giasson, C. J., Deschambeault, A., Guerin, S. L., Auger, F. A., Bazin, R., and Germain, L. (2006) Autologous transplantation of rabbit limbal epithelia cultured on fibrin gels for ocular surface reconstruction. *Mol Vis.* 12, 65-75.
5. Tsai, R. J., Li, L. M., and Chen, J. K. (2000) Reconstruction of damaged corneas by transplantation of autologous limbal epithelial cells. *N Engl J Med.* 343, 86-93.
6. Ramaesh, K., and Dhillon, B. (2003) Ex vivo expansion of corneal limbal epithelial/stem cells for corneal surface reconstruction. *Eur J Ophthalmol.* 13, 515-524.
7. Tseng, S. C., Prabhasawat, P., Barton, K., Gray, T., and Meller, D. (1998) Amniotic membrane transplantation with or without limbal allografts for corneal surface reconstruction in patients with limbal stem cell deficiency. *Arch Ophthalmol.* 116, 431-441.
8. Germain, L., Auger, F. A., Grandbois, E., Guignard, R., Giasson, M., Boisjoly, H. M., and Guérin, S. L. (1999) Reconstructed human cornea produced in vitro by tissue engineering. *Pathobiology.* 67, 140-147.
9. Griffith, M., Osborne, R., Munger, R., Xiong, X., Doillon, C. J., Laycock, N. L., Hakim, M., Song, Y., and Watsky, M. A. (1999) Functional human corneal equivalents constructed from cell lines. *Science.* 286, 2169-2172.
10. Orwin, E. J., and Hubel, A. (2000) In vitro culture characteristics of corneal epithelial, endothelial, and keratocyte cells in a native collagen matrix. *Tissue Eng.* 6, 307-319.

11. Reichl, S., Bednarz, J., and Muller-Goymann, C. C. (2004) Human corneal equivalent as cell culture model for in vitro drug permeation studies. *Br J Ophthalmol.* 88, 560-565.
12. Michel, M., L'Heureux, N., Pouliot, R., Xu, W., Auger, F. A., and Germain, L. (1999) Characterization of a new tissue-engineered human skin equivalent with hair. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 35, 318-326.
13. Black, A. F., Berthod, F., L'Heureux, N., Germain, L., and Auger, F. A. (1998) In vitro reconstruction of a human capillary-like network in a tissue-engineered skin equivalent. *FASEB J.* 12, 1331-1340.
14. Supp, D. M., and Boyce, S. T. (2005) Engineered skin substitutes: practices and potentials. *Clin Dermatol.* 23, 403-412.
15. Auger, F. A., Rémy-Zolghadri, M., Grenier, G., and Germain, L. (2000) The self-assembly approach for organ reconstruction by tissue engineering. *E-Biomed* 1, 75-85.
16. Alonso, L., and Fuchs, E. (2003) Stem cells of the skin epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100 Suppl 1, 11830-11835.
17. Doran, T. I., Vidrich, A., and Sun, T.-T. (1980) Intrinsic and extrinsic regulation of the differentiation of skin, corneal and esophageal epithelial cells. *Cell.* 22, 17-25.
18. Cunha, G. R., Bigsby, R. M., Cooke, P. S., and Sugimura, Y. (1985) Stromal-epithelial interactions in adult organs. *Cell Differ.* 17, 137-148.
19. Bohnert, A., Hornung, J., Mackenzie, I. C., and Fusenig, N. E. (1986) Epithelial-mesenchymal interactions control basement membrane production and differentiation in cultured and transplanted mouse keratinocytes. *Cell Tissue Res.* 244, 413-429.
20. Boukamp, P., Breitkreutz, D., Stark, H. J., and Fusenig, N. E. (1990) Mesenchyme-mediated and endogenous regulation of growth and differentiation of human skin keratinocytes derived from different body sites. *Differentiation.* 44, 150-161.
21. Coulomb, B., Lebreton, C., and Dubertret, L. (1989) Influence of human dermal fibroblasts on epidermalization. *J Invest Dermatol* 92, 122-125.
22. Limat, A., Breitkreutz, D., Hunziker, T., Boillat, C., Wiesmann, U., Klein, E., Noser, F., and Fusenig, N. E. (1991) Restoration of the epidermal phenotype by follicular outer root sheath cells in recombinant culture with dermal fibroblasts. *Exp Cell Res.* 194, 218-227.
23. Sengel, P. (1976) Morphogenesis of single cutaneous appendages. In *'Morphogenesis of skin'*, pp. 153-267, Cambridge University Press.

24. McLoughlin, C. B. (1963) Mesenchymal influences on epithelial differentiation. *Symp Soc Exp Biol.* 17, 359-388.
25. Lash, J. W., and Vasan, N. S. (1977) Tissue interactions and extracellular matrix components. *Soc Gen Physiol Ser.* 32, 101-113.
26. Fleischmajer, R., and Billingham, R. E. (1968) *Epithelial-Mesenchymal Interactions*, Williams and Wilkins Co., Baltimore.
27. Delorme, P., and Dhouailly, D. (1989) The expression of mouse cytokeratin 9 during normal development and in dermal-epidermal recombinants. *J Invest Dermatol.* 94, 393.
28. Dhouailly, D. (1977) *Dermo-epidermal interactions during morphogenesis of cutaneous appendages in amniotes* Vol. 4, Karger, Basel.
29. Hay, E. D. (1979) Development of the vertebrate cornea. *Int Rev Cytol.* 63, 263-322.
30. Luger, T. A., and Schwarz, T. (1990) Evidence for an epidermal cytokine network. *J Invest Dermatol.* 95, 100S-104S.
31. Schroder, J. M. (1995) Cytokine networks in the skin. *J Invest Dermatol* 105, 20S-24S.
32. Hicks, C. R., Crawford, G. J., Lou, X., Tan, D. T., Snibson, G. R., Sutton, G., Downie, N., Werner, L., Chirila, T. V., and Constable, I. J. (2003) Corneal replacement using a synthetic hydrogel cornea, AlphaCor: device, preliminary outcomes and complications. *Eye.* 17, 385-392.
33. Wilson, S. E., Liu, J. J., and Mohan, R. R. (1999) Stromal-epithelial interactions in the cornea. *Prog Retin Eye Res.* 18, 293-309.
34. Imanishi, J., Kamiyama, K., Iguchi, I., Kita, M., Sotozono, C., and Kinoshita, S. (2000) Growth factors: importance in wound healing and maintenance of transparency of the cornea. *Prog Retin Eye Res.* 19, 113-129.
35. Moulin, V. (1995) Growth factors in skin wound healing. *Eur J Cell Biol.* 68, 1-7.
36. Pouliot, R., Larouche, D., Auger, F. A., Juhasz, J., Xu, W., Li, H., and Germain, L. (2002) Reconstructed human skin produced in vitro and grafted on athymic mice. *Transplantation.* 73, 1751-1757.
37. Germain, L., Giasson, C. J., Carrier, P., Guerin, S. L., Salette, C., and Auger, F. A. (2004) Tissue Engineering of Cornea. In *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering* pp. 1534-1544, Marcel Dekker, New-York.

38. Fradette, J., Michel, M., and Germain, L. (1995) Culture d'épiderme humain in vitro: des kératinocytes normaux possédant un potentiel de prolifération exceptionnel. *Médecine/sciences* 11, 19.
39. Kolozsvari, L., Nogradi, A., Hopp, B., and Bor, Z. (2002) UV absorbance of the human cornea in the 240- to 400-nm range. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 43, 2165-2168.
40. Augustin, C., and Damour, O. (1995) Pharmacotoxicological applications of an equivalent dermis: three measurements of cytotoxicity. *Cell Biol Toxicol.* 11, 167-171.
41. Michel, M., Germain, L., Bélanger, P. M., and Auger, F. A. (1995) Functional evaluation of anchored skin equivalent cultured in vitro: percutaneous absorption studies and lipid analysis. *Pharm Res.* 12, 455-458.
42. Tegtmeier, S., Papantoniou, I., and Muller-Goymann, C. C. (2001) Reconstruction of an in vitro cornea and its use for drug permeation studies from different formulations containing pilocarpine hydrochloride. *Eur J Pharm Biopharm.* 51, 119-125.
43. L'Heureux, N., Pâquet, S., Labbé, R., Germain, L., and Auger, F. A. (1998) A completely biological tissue-engineered human blood vessel. *FASEB J.* 12, 47-56.
44. Michel, M., Auger, F. A., and Germain, L. (1993) Anchored skin equivalent cultured in vitro: a new tool for percutaneous absorption studies. *In Vitro Cell Dev Biol. Anim.* 29A, 834-837.
45. Germain, L., Carrier, P., Auger, F. A., Salesse, C., and Guérin, S. L. (2000) Can we produce a human corneal equivalent by tissue engineering? *Prog Retin Eye Res.* 19, 497-527.
46. Wilson, S. E., Mohan, R. R., Ambrosio, R., Jr., Hong, J., and Lee, J. (2001) The corneal wound healing response: cytokine-mediated interaction of the epithelium, stroma, and inflammatory cells. *Prog Retin Eye Res.* 20, 625-637.
47. Wilson, S. E., Mohan, R. R., and Ambrosio, R. (2003) Corneal injury. A relatively pure model of stromal-epithelial interactions in wound healing. *Methods Mol Med.* 78, 67-81.
48. Billingham, R. E., and Silvers, W. K. (1963) The origin and conservation of epidermal specificities. *N Engl J Med.* 268, 539-545 .
49. Beer, A. E., and Billingham, R. E. (1970) Implantation, transplantation, and epithelial-mesenchymal relationships in the rat uterus. *J Exp Med.* 132, 721-736.

50. Cunha, G. R., and Lung, B. (1979) The importance of stroma in morphogenesis and functional activity of urogenital epithelium. *In Vitro* 15, 50-71.
51. Oliver, R. F. (1973) Responses of oral epithelium to the influence of whisker dermal papillae in the adult rat. *Arch Oral Biol.* 18, 413-421.
52. Cunha, G. R. (1976) Stromal induction and specification of morphogenesis and cytodifferentiation of the epithelia of the Mullerian ducts and urogenital sinus during development of the uterus and vagina in mice. *J Exp Zool.* 196, 361-370.
53. Cunha, G. R., Chung, L. W., Shannon, J. M., Taguchi, O., and Fujii, H. (1983) Hormone-induced morphogenesis and growth: role of mesenchymal-epithelial interactions. *Recent Prog Horm Res.* 39, 559-598.
54. Espana, E. M., Kawakita, T., Romano, A., Di Pascuale, M., Smiddy, R., Liu, C. Y., and Tseng, S. C. (2003) Stromal niche controls the plasticity of limbal and corneal epithelial differentiation in a rabbit model of recombined tissue. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 44, 5130-5135.
55. Mackenzie, I. C., and Hill, M. W. (1984) Connective tissue influences on patterns of epithelial architecture and keratinization in skin and oral mucosa of the adult mouse. *Cell Tissue Res.* 235, 551-559.
56. Ferraris, C., Chaloin-Dufau, C., and Dhouailly, D. (1994) Transdifferentiation of embryonic and postnatal rabbit corneal epithelial cells. *Differentiation.* 57, 89-96.
57. Ferraris, C., Chevalier, G., Favier, B., Jahoda, C. A., and Dhouailly, D. (2000) Adult corneal epithelium basal cells possess the capacity to activate epidermal, pilosebaceous and sweat gland genetic programs in response to embryonic dermal stimuli. *Development.* 127, 5487-5495.
58. Zak, N. B., and Linsenmayer, T. F. (1985) Analysis of corneal development with monoclonal antibodies. II. Tissue autonomy in cornea-skin recombinants. *Dev Biol.* 108, 455-464.
59. Aboseif, S., El-Sakka, A., Young, P., and Cunha, G. (1999) Mesenchymal reprogramming of adult human epithelial differentiation. *Differentiation.* 65, 113-118.
60. Briggaman, R. A. (1982) Epidermal-dermal interactions in adult skin. *J Invest Dermatol.* 79, 21s-24s.
61. Goulet, F., Poitras, A., Rouabhia, M., Cusson, D., Germain, L., and Auger, F. A. (1996) Stimulation of human keratinocyte proliferation through growth factor exchanges with dermal fibroblasts in vitro. *Burns.* 22, 107-112.

62. Maas-Szabowski, N., Shimotoyodome, A., and Fusenig, N. E. (1999) Keratinocyte growth regulation in fibroblast cocultures via a double paracrine mechanism. *J Cell Sci.* 112, 1843-1853.
63. Smola, H., Stark, H. J., Thiekotter, G., Mirancea, N., Krieg, T., and Fusenig, N. E. (1998) Dynamics of basement membrane formation by keratinocyte-fibroblast interactions in organotypic skin culture. *Exp Cell Res.* 239, 399-410.
64. El Ghalbzouri, A., Lamme, E., and Ponec, M. (2002) Crucial role of fibroblasts in regulating epidermal morphogenesis. *Cell Tissue Res.* 310, 189-199.
65. Nusgens, B., Merrill, C., Lapiere, C., and Bell, E. (1984) Collagen biosynthesis by cells in a tissue equivalent matrix in vitro. *Coll Relat Res* 4, 351-363.
66. Smola, H., Thiekotter, G., and Fusenig, N. E. (1993) Mutual induction of growth factor gene expression by epidermal-dermal cell interaction. *J Cell Biol* 122, 417-429.
67. Maas-Szabowski, N., Stark, H. J., and Fusenig, N. E. (2000) Keratinocyte growth regulation in defined organotypic cultures through IL-1-induced keratinocyte growth factor expression in resting fibroblasts. *J Invest Dermatol.* 114, 1075-1084.
68. Weng, J., Mohan, R. R., Li, Q., and Wilson, S. E. (1997) IL-1 upregulates keratinocyte growth factor and hepatocyte growth factor mRNA and protein production by cultured stromal fibroblast cells: interleukin-1 beta expression in the cornea. *Cornea.* 16, 465-471.
69. Cubitt, C. L., Lausch, R. N., and Oakes, J. E. (1995) Differences in interleukin-6 gene expression between cultured human corneal epithelial cells and keratocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 36, 330-336.
70. Kinoshita, S., Adachi, W., Sotozono, C., Nishida, K., Yokoi, N., Quantock, A. J., and Okubo, K. (2001) Characteristics of the human ocular surface epithelium. *Progn Retin Eye Res.* 20, 639-673.
71. Nakamura, Y., Sotozono, C., and Kinoshita, S. (1998) Inflammatory cytokines in normal human tears. *Curr Eye Res.* 17, 673-676.
72. Sugawara, T., Gallucci, R. M., Simeonova, P. P., and Luster, M. I. (2001) Regulation and role of interleukin 6 in wounded human epithelial keratinocytes. *Cytokine.* 15, 328-336.
73. Grossman, R. M., Krueger, J., Yourish, D., Granelli-Piperno, A., Murphy, D. P., May, L. T., Kupper, T. S., Sehgal, P. B., and Gottlieb, A. B. (1989) Interleukin 6 is expressed in high levels in psoriatic skin and stimulates proliferation of cultured human keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86, 6367-6371.

74. Elder, J. T. (1995) Cytokine and genetic regulation of psoriasis. *Adv Dermatol.* 10, 99-133; discussion 134.
75. Debets, R., Hegmans, J. P., Deleuran, M., Hoofst, S., Benner, R., and Prens, E. P. (1996) Expression of cytokines and their receptors by psoriatic fibroblast. I. Altered IL-6 synthesis. *Cytokine.* 8, 70-79.
76. Nakamura, T., Endo, K., Cooper, L. J., Fullwood, N. J., Tanifuji, N., Tsuzuki, M., Koizumi, N., Inatomi, T., Sano, Y., and Kinoshita, S. (2003) The successful culture and autologous transplantation of rabbit oral mucosal epithelial cells on amniotic membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 44, 106-116.
77. Meallet, M. A., Espana, E. M., Grueterich, M., Ti, S. E., Goto, E., and Tseng, S. C. (2003) Amniotic membrane transplantation with conjunctival limbal autograft for total limbal stem cell deficiency. *Ophthalmology.* 110, 1585-1592.
78. Shimmura, S., and Tsubota, K. (2002) Ocular surface reconstruction update. *Curr Opin Ophthalmol.* 13, 213-219.
79. Germain, L., Berthod, F., Moulin, V., Goulet, F., and Auger, F. A. (2004) Principles of Living Organ Reconstruction by Tissue Engineering. In *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering* pp. 197-228, Marcel Dekker, New-York.

Chapitre V : Discussion et perspectives futures

La cornée, étant l'interface entre l'œil et le milieu environnant, est continuellement susceptible de subir des blessures d'origine mécanique ou chimique. Les conséquences d'une guérison déficiente de la cornée ou la destruction des cellules souches peuvent être graves et occasionner des troubles visuels importants, voir même la cécité. Différents traitements sont disponibles (258, 259, 271), dont la greffe de cornée, mais ceux-ci comportent encore des risques sérieux tels que la transmission d'agents infectieux et nécessitent parfois l'utilisation d'un traitement immunosuppresseur (263). De plus, une pénurie de cornées utilisées pour fins de greffe est anticipée au cours des prochaines années. En effet, il est prévu qu'il deviendra plus difficile d'obtenir des cornées humaines pour greffer, en raison du resserrement des critères d'exclusion. La reconstruction d'une cornée humaine en laboratoire devient ainsi une alternative intéressante au manque de dons d'organes ainsi qu'aux autres procédures chirurgicales présentement utilisées.

L'objectif principal de cette thèse était donc de poursuivre, grâce au génie tissulaire, l'optimisation de la reconstruction d'une cornée humaine afin de l'utiliser comme modèle expérimental et éventuellement comme greffon pour des patients. Cependant, plusieurs aspects importants devaient faire l'objet d'études approfondies avant l'utilisation clinique afin d'évaluer le potentiel de réussite à long terme des greffes sur les patients. L'originalité de cette thèse réside ainsi dans la mise au point d'un nouveau modèle tridimensionnel de cornée humaine et l'utilisation de ce dernier afin de s'assurer de la stabilité à long terme d'un épithélium reconstruit de bonne qualité et présentant les caractéristiques du tissu d'origine. Les travaux rapportés dans cette thèse comportent plusieurs volets divisés en trois principaux objectifs spécifiques. De plus, ils ouvrent la voie à de nouvelles perspectives et futures études qui sont décrites brièvement dans les sections qui suivent.

5.1 Les facteurs de transcription Sp1 et Sp3 sont impliqués dans la capacité des CECH à proliférer et à se différencier

Le premier objectif spécifique de cette thèse était de mieux comprendre la grande hétérogénéité dans les capacités prolifératives des primo-cultures de CECH obtenues de différents donneurs. Cette étude s'avérait essentielle puisque la qualité de l'épithélium des cornées reconstruites dépend directement de celle des cultures de CECH. De plus, toujours en prévision d'une utilisation clinique des tissus reconstruits, il était primordial de pouvoir identifier rapidement et avec précision, les cultures primaires de CECH qui devraient être utilisées pour la production des cornées reconstruites.

Au cours des dernières décennies, l'utilisation des cultures primaires et des premiers passages cellulaires a gagné en popularité dans plusieurs domaines de la recherche fondamentale et clinique (399). En effet, puisque ces cellules sont plus apparentées aux cellules normales *in situ* que celles transformées ou immortalisées, les primo-cultures cellulaires sont maintenant très attirantes en tant que source biologique pour divers types d'études. Cependant plusieurs équipes, dont la nôtre, ont observé des variations importantes dans la capacité de ces cellules à proliférer et à se différencier correctement en culture.

Lors de cette étude, nous avons également remarqué que ces variations se manifestent dans la qualité de l'épithélium des tissus reconstruits puisqu'elle dépend en partie de la capacité des cellules épithéliales à proliférer et à adhérer sur le stroma reconstruit (301). En effet, seuls les tissus reconstruits avec des cellules épithéliales qui sont en mesure d'effectuer plusieurs passages (4-5) en culture possèdent un épithélium pluristratifié. Par contre, tous les tissus reconstruits avec des cellules épithéliales qui ne peuvent être maintenues au-delà de trois ou quatre passages présentent plutôt un épithélium peu ou pas stratifié. Ceci serait alors causé par un arrêt de la prolifération et de la migration des cellules. Il a donc été postulé que cette variabilité entre les primo-cultures

de CECH pourrait être due à une modification de l'expression de certains facteurs de transcription impliqués dans le contrôle de gènes jouant un rôle clé au niveau de la différenciation, de la prolifération et de l'adhésion des cellules épithéliales.

Nos travaux ont permis de confirmer l'hypothèse selon laquelle les variations qualitatives dans la production des cornées reconstruites sont liées à des altérations dans les niveaux d'expression des facteurs de transcription appartenant à la famille Sp. Ainsi, en évaluant le profil d'expression de ces facteurs, nous disposons maintenant d'un moyen permettant d'identifier rapidement les populations de cellules les plus appropriées pour la production des tissus reconstruits. Nous avons effectivement été en mesure de démontrer des variations quantitatives considérables de certains facteurs de transcription d'un individu à l'autre. En effet, tout comme la grande hétérogénéité du nombre de passages atteints par les différentes populations cellulaires de CECH, ces dernières présentent aussi d'importantes fluctuations des niveaux d'expression des facteurs de transcription Sp1 et Sp3. De plus, nos travaux ont démontré que ces modifications étaient liées à la progression de ces cellules vers un état de différenciation cellulaire plus avancée. Effectivement, pour chacune des cultures primaires de CECH étudiées, nous avons pu observer un pic dans l'expression des facteurs Sp1 et Sp3. Celui-ci survient lors du passage précédent la différenciation terminale des cellules épithéliales. En effet, lorsque ces facteurs sont présents en faible quantité, les cellules possèdent une belle morphologie en culture, prolifèrent et sont indifférenciées. Cependant, à la suite d'une très forte augmentation de l'expression de Sp1 et Sp3, les cellules se différencient au cours du passage suivant, durant lequel l'expression des facteurs disparaît dramatiquement, voir même complètement. Des résultats similaires (forte augmentation de l'expression de Sp1) avaient aussi été rapportés au niveau de l'épithélium cornéen de patients souffrant de kératocônes, une maladie qui réduit l'épaisseur de l'épithélium au centre de la cornée (400).

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer le lien entre ces changements de l'expression des facteurs de transcription et la différenciation terminale des cellules

épithéliales. Premièrement, les facteurs de la famille Sp sont bien connus pour contrôler la transcription de plusieurs gènes codant pour des intégrines (319, 321, 325). Ces molécules sont non seulement essentielles pour une bonne adhésion des cellules mais elles jouent également un rôle important dans la transmission de signaux dans plusieurs voies de signalisation intracellulaire (176). Une variation importante des niveaux d'expression des facteurs de transcription pourrait alors modifier grandement l'expression de certaines intégrines et ainsi affecter la différenciation cellulaire.

Deuxièmement, il a été démontré que les facteurs Sp1 et Sp3 contrôlent également la transcription de plusieurs cytokines, telles que le TGF- β , le PDGF, le VEGF et le FGF (302, 344-348). Il se pourrait donc que le niveau anormalement élevé des facteurs Sp1 et Sp3 qui est détecté au passage précédant la différenciation des cellules, augmente la transcription de facteurs de croissance menant à cette différenciation terminale. Par exemple, une étude récente rapporte que le TGF- β empêcherait la prolifération et favoriserait la différenciation des cellules de type épithélial (401).

Troisièmement, il a été démontré que le facteur Sp1 interagit aussi directement avec des protéines nucléaires requises pour le contrôle du cycle cellulaire telles que la cycline D1 et le rétinoblastome (Rb) (332, 338). Une équipe de recherche a alors proposé que la formation du complexe Sp1-Rb conduirait à la transcription de gènes dont les produits favoriseraient l'arrêt de la croissance cellulaire et/ou la différenciation hâtive des cellules. Par contre, la formation du complexe Sp1-cycline D1 mènerait plutôt à un retard ou à un dysfonctionnement partiel de la différenciation (338). D'après les résultats que nous avons obtenus, il semble que la grande quantité de Sp1, qui a été détectée tout juste avant la différenciation des cellules, a formé un complexe avec le Rb plutôt qu'avec la cycline D1. Le rôle probable de Sp1 dans l'arrêt de la croissance et la différenciation est également supporté par le fait que ce facteur de transcription interagit avec des protéines Smad pour contrôler le promoteur de la protéine p21^{Cip1/WAF1} (333, 402). En effet, Sp1 contrôle aussi la transcription de plusieurs gènes impliqués dans le cycle cellulaire dont celle des protéines

kinases p21 et p27. Ces dernières sont des protéines inhibitrices du cycle cellulaire, plus spécifiquement des inhibitrices de kinases dépendantes des cyclines (CDI) qui sont reconnues pour leur effet inducteur de la différenciation cellulaire (403, 404). Sp1 serait donc étroitement lié à la différenciation cellulaire en influençant la progression dans le cycle cellulaire. Effectivement, par son influence positive sur le contrôle de gènes dont les produits sont des inhibiteurs du cycle cellulaire (330), la forte augmentation de l'expression de Sp1 pourrait ainsi expliquer l'arrêt de la prolifération cellulaire de certaines populations de CECH. D'autres travaux seront toutefois nécessaires afin de vérifier et de confirmer ces diverses hypothèses. Par exemple, il serait tout à fait envisageable d'évaluer l'interaction physique entre Sp1, Rb et la cycline D1 ainsi qu'entre Sp1 et certaines protéines Smad pour diverses cultures de CECH ayant des potentiels de prolifération *in vitro* différents. Pour ce faire, des études de coimmunoprécipitation pourraient être effectuées afin de mettre en évidence les interactions protéines-protéines. Cette technique consiste à immunoprécipiter les protéines d'un lysat cellulaire avec un anticorps dirigé contre la protéine désirée (Sp1). Par la suite, l'ajout de protéines A (ou G) sépharose permet de récupérer le complexe immun. Ce dernier est ensuite resuspendu et le tout est séparé sur gel SDS-PAGE. On peut alors effectuer un buvardage de type Western à l'aide d'un anticorps permettant de reconnaître la protéine associée d'intérêt. Finalement, il serait aussi intéressant de déterminer, par buvardage de type Western, les niveaux de protéines kinases p21 et p27 retrouvés dans ces cultures de CECH.

Puisque Sp1 semble étroitement impliqué dans le contrôle du cycle cellulaire, la dégradation contrôlée de ce dernier (afin de prévenir une forte augmentation de son expression) pourrait être, pour les cellules, un moyen d'empêcher leur différenciation hâtive. Ainsi, il s'avère possible que l'état de glycosylation de Sp1 puisse avoir un impact majeur sur la qualité des tissus reconstruits. En effet, puisque la glycosylation de Sp1 contribuerait à limiter sa dégradation par le protéasome en le stabilisant (309), il serait très intéressant de vérifier s'il existe un lien entre le niveau de glycosylation de Sp1 et la capacité des CECH à conserver leur potentiel de prolifération et à régénérer un épithélium correctement stratifié lorsqu'elles sont utilisées dans la production d'une cornée

reconstruite. Pour déterminer le niveau de glycosylation de Sp1 des CECH, la technique consiste tout d'abord à immuno-précipiter Sp1 à l'aide d'un anticorps et à séparer les produits immunoprécipités sur un gel de polyacrylamide-SDS. Les protéines ainsi séparées sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose et révélées par un anticorps monoclonal anti-*O-linked* qui permet de reconnaître les protéines N-glycosylées. Finalement, la culture des CECH en présence d'inhibiteurs ou d'activateurs de la N-glycosylation pourrait permettre de confirmer si la capacité des CECH à conserver leur potentiel de prolifération résulte d'une stabilisation de Sp1 par glycosylation.

Récemment, une étude a démontré que le niveau de glycosylation de Sp1 était augmenté lorsque les kératinocytes de peau étaient cultivés en présence d'une couche nourricière de cellules 3T3 irradiées (405). En effet, cette dernière pourrait être d'une grande importance pour maintenir le niveau des facteurs de transcription constant. Ces cellules nourricières préviendraient alors une perte trop hâtive des facteurs de transcription en les stabilisant dans les cellules par un mécanisme impliquant possiblement la glycosylation. Cette glycosylation pourrait ainsi permettre une meilleure translocation de ces facteurs au noyau, favorisant ainsi une meilleure transcription de certains gènes (406). Les résultats obtenus dans cette étude suggèrent aussi qu'une réduction importante du niveau d'expression des facteurs de transcription Sp1 et Sp3 pourrait induire une différenciation terminale précoce des cellules. Or, combinées avec les résultats que nous avons obtenus, ces données indiquent qu'il est important que le niveau d'expression des facteurs Sp1 et Sp3 reste constant le plus longtemps possible (pas d'augmentation ni de diminution importante) afin de permettre aux cellules de proliférer durant une plus longue période.

Nos travaux ont donc clairement démontré des variations au niveau de la quantité de certains facteurs de transcription (Sp1 et Sp3) d'une population cellulaire à l'autre. Cependant, des études supplémentaires seraient nécessaires afin de déterminer avec plus de précision si ces fluctuations sont causées par des changements au niveau de la transcription

des gènes codant pour ces facteurs ou par des modifications post-traductionnelles (phosphorylation et/ou glycosylation) affectant la stabilité des protéines. Effectivement, si aucun changement dans la quantité de transcrits (ARNm) n'était détecté à la suite d'un RT-PCR semi-quantitatif, il serait alors évident que les variations obtenues dans la quantité de Sp1 et Sp3 sont dues à une ou plusieurs modifications post-traductionnelles qui affectent la stabilité ou la dégradation de ces protéines.

D'autres expériences pourraient également être entreprises afin d'en connaître davantage sur l'expression des facteurs de transcription de la famille Sp. Premièrement, il serait tout à fait envisageable de refaire cette étude avec plusieurs populations cellulaires provenant de donneurs d'âges différents afin de tenter d'établir une corrélation entre l'âge des donneurs et les niveaux d'expression des facteurs de transcription. Des résultats obtenus récemment avec des primo-cultures de kératinocytes ont permis de démontrer un lien évident entre l'âge des individus et le maintien des capacités de prolifération des cellules (405). De notre côté, nous avons déjà remarqué que les cellules épithéliales cornéennes provenant de jeunes enfants possèdent une plus grande capacité de prolifération et peuvent être cultivées durant de nombreux passages.

Deuxièmement, il serait aussi très pertinent d'étudier l'influence du délai qui s'écoule entre le décès du donneur et la mise en culture des cellules. En effet, une fois prélevées du donneur, il peut s'écouler plusieurs heures, voire même un ou deux jours avant que les cellules ne soient mises en culture. Durant ces longs délais, des signaux cellulaires et moléculaires pourraient bien conduire à la perte ou à l'augmentation de l'expression des facteurs de transcription, menant ainsi à une différenciation prématurée des cellules. Cette variation des délais, d'une population cellulaire à l'autre, pourrait d'ailleurs être impliquée dans la grande hétérogénéité du potentiel de prolifération des primo-cultures de CECH.

Troisièmement, il serait intéressant d'effectuer des expériences similaires avec plusieurs autres types cellulaires afin de déterminer si les diverses données obtenues lors de cette étude peuvent être généralisées à l'ensemble des primo-cultures. Par exemple, il serait très avantageux d'obtenir des observations similaires lors d'une analyse détaillée du profil d'expression des facteurs de transcription chez les fibroblastes et les cellules endothéliales cornéennes. En effet, nous disposerions alors d'un moyen permettant de sélectionner rapidement les cellules les plus prolifératives et les plus appropriées pour la reconstruction des cornées *in vitro*. Cet outil de dépistage cellulaire pourrait même s'avérer utile dans le développement d'autres tissus en laboratoire tels que la peau et le vaisseau sanguin.

Pour ce faire, il s'agirait de mettre en culture des populations de CECH ainsi que d'autres types cellulaires provenant d'un certain nombre de donneurs d'âges différents et ayant des délais différents de mise en culture afin d'évaluer, selon les approches utilisées précédemment (rétention en gel de polyacrylamide, buvardage de type Western, etc.), les variations dans les niveaux d'expression des facteurs de transcription Sp1 et Sp3. De plus, tel qu'il a été montré dans l'article présenté au chapitre II de cette thèse, la qualité des cornées reconstruites pourrait être également évaluée en utilisant des paramètres comme la capacité de ces cellules à former un bel épithélium ainsi qu'une monocouche de cellules endothéliales, à exprimer certains marqueurs typiquement observés dans celles-ci et à sécréter les différentes composantes des membranes basilaires.

En résumé, nous avons démontré que des modifications dans les niveaux d'expression des facteurs de transcription de la famille Sp sont impliquées dans la qualité et l'intégrité des tissus cornéens reconstruits. Cette étude nous a donc permis de mieux comprendre la grande variabilité entre les cultures primaires de CECH et de mieux cerner les raisons expliquant les difficultés rencontrées lors de la reconstruction des cornées *in vitro*. Il sera maintenant possible de prédire avec succès la qualité de l'épithélium reconstruit en analysant les niveaux d'expression de ces facteurs. De plus, les études complémentaires proposées, qui ont été décrites dans les paragraphes précédents,

apporteraient de nouveaux éléments nécessaires à une meilleure compréhension des variations qualitatives observées lors de la production des tissus. Dans l'éventualité d'une application clinique des cornées reconstruites, il serait effectivement essentiel de connaître les conditions optimales permettant de stabiliser le plus longtemps possible les niveaux d'expression des facteurs de transcription (Sp1 et Sp3) dans les cellules cornéennes. Ainsi, nous pourrions réduire considérablement les variations observées et obtenir une meilleure reproductibilité des expériences, ce qui serait primordial en vue de futures greffes de cornées humaines autologues.

5.2 Caractérisation du nouveau modèle de guérison des plaies cornéennes et de la cornée reconstruite par la méthode d'auto-assemblage

Le deuxième objectif spécifique de cette thèse était de s'assurer que l'épithélium de nos cornées reconstruites soit en mesure de réépithélialiser à la suite d'une blessure, après avoir été greffées. Cela est important puisque l'intégrité de l'épithélium cornéen est absolument nécessaire afin de maintenir une bonne acuité visuelle (253). Pour ce faire, un modèle d'étude de la guérison des plaies cornéennes *in vitro* a été développé à partir des cornées reconstruites. En plus de s'être assuré de la régénération des équivalents cornéens à la suite d'une blessure, ce modèle a également permis de recueillir des informations pertinentes concernant la guérison des plaies. Il s'agit en fait de la première fois qu'une cornée reconstruite est utilisée pour mieux comprendre les mécanismes impliqués au cours de la guérison cornéenne. Plusieurs caractéristiques permettent à ce modèle d'être un outil de recherche des plus intéressants: formation d'un environnement tridimensionnel complètement biologique, interactions possibles entre les différents types cellulaires, plutôt simple à réaliser, assez stable au cours des expériences, le plus près possible de la guérison des plaies cornéennes chez l'humain et reproductible.

Ces équivalents cornéens possèdent donc plusieurs avantages par rapport aux autres modèles ayant été utilisés auparavant. Par exemple, par comparaison avec des cultures monocouches de CECH (220, 238, 239), les cornées reconstituées par auto-assemblage permettent d'obtenir des modèles plus proches du tissu d'origine. En effet, l'utilisation de cellules humaines non transformées et l'interaction possible entre celles-ci, grâce à l'aspect tridimensionnel du modèle, sont des avantages considérables. Les cornées humaines reconstruites par la méthode d'auto-assemblage présentent ainsi une histologie similaire à celle des tissus natifs, i.e. un épithélium multi-couche différencié (5 à 6 couches de cellules) sur un stroma composé d'une matrice synthétisée par les fibroblastes. D'ailleurs, un des principaux avantages de l'utilisation de cette méthode pour la reconstruction des

cornées est de pouvoir obtenir une matrice extracellulaire et une ultrastructure qui sont également semblables à celles normalement retrouvées dans la cornée *in situ*, et cela, en l'absence de tout matériel synthétique ou de protéines exogènes de la matrice extracellulaire.

Par comparaison, cette fois, avec les modèles de guérison développés à partir de cornées humaines natives (228-231), les cornées obtenues par génie tissulaire permettent de pallier certains inconvénients comme la variabilité des résultats et la limitation de leur disponibilité. En effet, la reconstruction des tissus possède plusieurs avantages: obtention d'une très grande quantité de cellules à partir de cornées provenant d'un seul donneur, reconstruction d'un grand nombre de cornées ayant la même origine et offrant ainsi une meilleure reproductibilité des expériences, possibilité de comparer et de confirmer certains résultats avec des tissus reconstruits provenant de donneurs différents et de refaire des expériences similaires à des moments différents à partir des mêmes cellules. Inversement, les cornées humaines énucléées, souvent obtenues en quantité limitée, ne permettent d'effectuer qu'un petit nombre d'expériences sur le même tissu. Les expériences doivent donc être répétées sur des cornées qui, provenant de sujets différents, peuvent être d'une grande hétérogénéité. Cela peut alors mener à un grand écart entre les résultats qui deviennent alors difficiles à interpréter.

De plus, bien que les expériences menées sur les animaux soient inévitables et nécessaires dans certains cas pour confirmer l'applicabilité clinique d'un traitement, un modèle d'étude *in vitro* comme celui développé pourrait éventuellement conduire à une diminution de leur utilisation. En effet, son emploi dans les premières étapes d'une investigation pourrait permettre de mieux cibler les futures expériences à réaliser sur les animaux. Ceci pourrait alors engendrer des économies importantes autant en vies animales qu'en argent, tout en permettant une meilleure reproductibilité des expériences.

Les tissus reconstruits présentent non seulement un grand nombre des caractéristiques de la cornée humaine mais également de sa guérison. Effectivement, différentes données suggèrent que le modèle développé de guérison des plaies imite plusieurs étapes du processus de réépithélialisation normalement observées *in vivo*. En premier lieu, puisque la réépithélialisation se voit très bien macroscopiquement, il a été intéressant de constater que la migration des cellules épithéliales s'effectuait de la même manière que pour les cornées *in vivo* (407). En effet, il a été possible d'observer des fronts de migrations convexes s'avancant vers le centre de la plaie afin de la refermer. Cette particularité de la migration des CECH avait déjà été observée dans d'autres modèles de guérison cornéenne, i.e. avec des cornées humaines cultivées *in vitro* et chez l'animal (228, 408). Par contre, cette façon particulière de migrer des CECH est très différente de celle obtenue lors de la réépithélialisation du modèle de peau reconstruite, où l'on observe plutôt un anneau de réépithélialisation parfaitement circulaire refermant la plaie cutanée (250). Étonnamment, aucun travail n'a été effectué afin d'approfondir cette différence.

Une des hypothèses pouvant expliquer une telle observation serait la distribution non uniforme des cellules les plus prolifératives, le long de la circonférence de la plaie cornéenne. C'est d'ailleurs ce qui a été démontré pour la distribution des cellules souches au niveau du limbe de la cornée *in vivo* (26, 132, 409, 410). Afin de bien cerner la question, des études de microscopie confocale sur le modèle de guérison pourraient alors se révéler utiles pour tenter de confirmer cette hypothèse. En effet, le microscope confocal, qui permet d'analyser toutes les couches d'un épithélium, pourrait apporter de précieuses informations sur la localisation des cellules souches.

La présence de ces cellules, qui est essentielle à la guérison de l'épithélium de la cornée reconstruite, pourrait donc être vérifiée en utilisant des marqueurs tels que la kératine 19 et le facteur de transcription p63. Des études ont démontré que le facteur p63 serait impliqué dans le maintien de la population de cellules souches épithéliales (411). Ceci en fait donc un marqueur de choix pour les cellules souches de la peau et de la cornée.

Il est fortement exprimé dans les cellules souches et plus faiblement dans les cellules amplicatrices transitoires (137). Une expérience complémentaire visant à confirmer le caractère souche des cellules exprimant ces marqueurs consisterait à incorporer au milieu de culture des cornées reconstruites un analogue de l'uridine, le BrdU (5-bromodeoxyuridine). Pour être en mesure d'identifier seulement les cellules souches ayant un cycle cellulaire lent, une période suffisamment longue devrait être prévue afin de permettre aux cellules plus différenciées de perdre le BrdU. Par la suite, après perméabilisation des cellules et dénaturation partielle de l'ADN, le BrdU incorporé serait révélé par une réaction antigène-anticorps, à l'aide d'un anticorps anti-BrdU spécifique couplé à un fluorochrome. L'analyse qualitative et quantitative des cellules souches s'effectuerait ensuite par immunohistochimie.

En second lieu, l'analyse histologique, immunohistochimique et ultrastructurale des plaies cornéennes a révélé que plusieurs des étapes et mécanismes observés pour la réépithélialisation des cornées *in vivo* (31, 151, 209) sont préservés dans ce modèle. En effet, tous les éléments suivants ont pu être observés : 1) une phase latente de quelques heures qui correspond au délai entre le moment où il y a formation de la blessure et le début de la migration cellulaire (108), 2) une réépithélialisation des plaies grâce à la prolifération et la migration des cellules épithéliales à partir du tissu cornéen non lésé adjacent (31), 3) la perte de l'aspect cuboïdale des cellules basales (154) et l'amincissement de l'épithélium qui diminue jusqu'à une seule couche au niveau de la langue de migration (31), 4) la participation des cellules basales et suprabasales à la migration (30, 167), 5) la prolifération de cellules épithéliales de la portion non blessée ainsi que de celles du néoépithélium afin de contribuer à la migration et la restauration d'un épithélium d'épaisseur normale (149), 6) le réassemblage progressif des hémidesmosomes et de ses composants (sous-unité β_4 du côté basal) (173), 7) la réapparition progressive des différents constituants de la membrane basilaire (collagène de type VII et laminine 5) et des cellules différenciées (K3) en périphérie de la plaie (174), 8) l'accélération de la migration des CECH à la suite d'un traitement avec de l'EGF (223), 9) des variations de l'expression et de la localisation de certaines sous-unités d'intégrines (152, 181, 182, 185). Ces données confirment donc que la

cornée reconstruite est en mesure de se réépithélialiser correctement et de façon similaire à la cornée humaine *in vivo*.

Concernant les variations de l'expression de certaines intégrines, la plus marquante fut certainement la détection de l'intégrine $\alpha_V\beta_6$ au niveau des cellules du néoépithélium en régénération. Dans la peau, cette dernière avait déjà été identifiée comme étant une intégrine participant à la migration des cellules épithéliales de l'épiderme lors d'une blessure (412). De plus, une seconde étude avait démontré que, lors de la guérison de l'épiderme de quelques volontaires, la diminution de l'expression de l'intégrine $\alpha_V\beta_5$ était compensée par l'augmentation de l'intégrine $\alpha_V\beta_6$ (413). Toutefois, l'intégrine $\alpha_V\beta_6$ n'avait jamais été identifiée comme étant une intégrine importante pour la migration des CECH lors de la guérison d'une lésion cornéenne. Des études supplémentaires seraient donc nécessaires afin de mieux comprendre le rôle de cette intégrine lors de la migration. Par exemple, il serait possible d'évaluer l'importance de cette intégrine par l'ajout d'anticorps bloquant celle-ci au milieu de culture lors de la guérison des plaies. Une étude récente a aussi montré qu'une courte séquence d'acides aminés du domaine cytoplasmique de la sous-unité β_6 favorisait la prolifération de cellules embryonnaires provenant du foie (414). L'intégrine $\alpha_V\beta_6$ pourrait ainsi être impliquée dans la prolifération des cellules épithéliales lors de la guérison cornéenne. Il serait également intéressant de poursuivre ces travaux en analysant, par immunohistochimie à l'aide d'un anticorps monoclonal dirigé contre l'intégrine $\alpha_V\beta_5$, la distribution de cette intégrine afin d'évaluer si elle se localise au niveau de l'épithélium sain de la cornée reconstruite, tel que déjà observé par une autre équipe dans la cornée humaine *in situ* (415) et s'il y a des variations de son expression tout au long du processus de guérison.

Pour ce qui est de l'expression de l'intégrine α_4 , aucun marquage n'a été obtenu. Ce résultat est en accord avec plusieurs autres travaux (152, 180, 290). Cependant, il a été étonnant de ne pas pouvoir observer de variations dans l'expression de l'intégrine $\alpha_5\beta_1$, qui

joue habituellement un rôle important lors de la migration des cellules épithéliales cornéennes (188, 189). Par contre, d'autres équipes ont aussi éprouvé des difficultés à localiser cette intégrine dans la cornée (179, 180). Des méthodes d'analyse plus sensibles que l'immunohistochimie pourraient toutefois confirmer les résultats obtenus. Par exemple, bien que la grosseur d'une biopsie du néoépithélium puisse être un facteur limitant, il serait tout à fait envisageable d'analyser l'expression de la sous-unité α_5 dans cette région qui contient les cellules en migration, en utilisant des techniques plus sensibles telles que le RT-PCR. De plus, l'implication probable de la sous-unité α_5 pourrait aussi être indirectement étudiée par l'ajout d'anticorps bloquant cette sous-unité au milieu de culture lors de la guérison des plaies. L'importance de cette sous-unité d'intégrine pourrait alors être évaluée. En effet, si la réépithélialisation se déroule de façon similaire aux contrôles, le rôle de l'intégrine $\alpha_5\beta_1$, lors de la guérison d'une lésion cornéenne, devra être remise en question. Finalement, il n'a pas été possible d'observer des changements dans l'expression des différentes sous-unités d'intégrine étudiées sous le néoépithélium migrant sur le gel de fibrine. Il aurait été effectivement probable que certaines variations soient détectées et permettent ainsi d'expliquer l'accélération de la migration. Il serait par contre intéressant de vérifier si les CECH expriment l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ qui se lie normalement à la fibrine et au fibrinogène (416).

À propos de la fibrine, les travaux présentés dans cette thèse ont mis en évidence qu'il était possible, dans un modèle de guérison *in vitro*, d'accélérer la vitesse de migration des CECH par l'ajout exogène de fibrine. Il s'agissait d'ailleurs de la première expérience de ce genre où une solution de fibrine était appliquée sur une plaie cornéenne afin d'étudier son effet sur la réépithélialisation. En effet, aucune étude fondamentale ou clinique n'avait été réalisée chez l'épithélium cornéen auparavant. Par contre, deux études récentes effectuées avec des cellules provenant de la peau, l'une utilisant des monocouches de kératinocytes (416) et l'autre un modèle de guérison des plaies cutanées *in vitro* (250), avaient également démontré une accélération de la migration des kératinocytes avec l'ajout de fibrine exogène. Deux hypothèses ont alors été énoncées pour expliquer la manière dont la fibrine influençait la vitesse de migration des cellules. Premièrement, la fibrine pourrait

promouvoir la migration de façon indirecte en fournissant du plasminogène supplémentaire aux cellules en migration. Deuxièmement, la fibrine briserait sélectivement l'adhésion des cellules les plus différenciées (416). Étant donné l'absence d'information dans la littérature concernant le rôle possible de la fibrine lors de la guérison de la cornée, le modèle développé pourrait devenir un outil de recherche des plus intéressants. Par exemple, des études supplémentaires seraient nécessaires afin de déterminer si l'activateur du plasminogène de type urokinase (u-PA) est présent dans notre modèle de plaies cornéennes et si ce dernier est retrouvé en plus grande quantité à la suite d'un traitement avec de la fibrine exogène. Cela pourrait être fait par immunohistochimie à l'aide d'anticorps dirigés contre ce type d'activateur du plasminogène ou par dosages ELISA des milieux de culture ayant été en contact avec les cellules, lors des différentes conditions expérimentales (contrôle et guérison avec ou sans l'ajout de fibrine). Des techniques plus sensibles telles que le buvardage de type Western ainsi que le RT-PCR pourraient aussi être utilisées. Les résultats obtenus avec d'autres systèmes de plaies cornéennes (monocouches de cellules et cornées provenant d'animaux) ont démontré une augmentation de l'expression de cet activateur au front de migration (417). De plus, des anticorps anti-activateurs inhibaient la migration des cellules. Le modèle de plaies cornéennes développé pourrait donc éventuellement permettre de mieux comprendre le rôle de la fibrine qui entre dans la composition de la matrice provisoire sur laquelle migrent les cellules épithéliales.

Toujours dans le but d'approfondir les mécanismes impliqués lors de la migration des cellules épithéliales, il serait intéressant d'étudier plus en détail la distribution de la laminine 5, qui est progressivement déposée à la jonction épithélium-stroma en formation, lors de la réépithélialisation du modèle *in vitro*. En effet, il a précédemment été démontré qu'il existait deux types de laminine 5. Une forme longue, non-coupée, qui permet la migration des cellules et celle coupée par la plasmine, jouant un rôle important pour l'adhésion et l'assemblage des hémidesmosomes (157). De plus, il a aussi été montré qu'au niveau des plaies cutanées, la laminine 5 non-coupée était déposée au site de la blessure et la forme coupée était présente au niveau de la membrane basilaire (158). Des études similaires seraient facilement envisageables avec notre modèle de guérison des plaies et

pourraient éventuellement permettre de mieux comprendre le rôle de la laminine 5 lors de la guérison d'une plaie cornéenne. Ainsi, le remodelage de cette dernière serait étudié par immunohistochimie en utilisant des anticorps dirigés contre les différentes formes de laminine 5. De plus, des essais pourraient être effectués en ajoutant de la laminine 5 soluble non-coupée ou coupée sur des blessures cornéennes. Cela permettrait possiblement d'observer une accélération ou une diminution de la vitesse de migration des cellules épithéliales (157) ainsi que des changements dans la distribution des intégrines $\alpha_3\beta_1$ et $\alpha_6\beta_4$ (187).

L'accélération de la migration des CECH après l'ajout d'EGF et de fibrine ouvre également la voie à une utilisation du modèle de guérison des plaies cornéennes en recherche appliquée. En effet, puisque ce modèle permet de bien visualiser l'avancement de la réépithélialisation et qu'il est suffisamment sensible pour détecter des variations dans la vitesse de réépithélialisation, cela permet d'envisager son emploi lors de futures études pharmacologiques. Ces propriétés en font un outil de choix pour évaluer les effets positifs ou négatifs de différents médicaments (molécules pharmaceutiques) sur la vitesse de réépithélialisation. Pour ce faire, la molécule (facteur de croissance ou autre produit pharmaceutiques) serait déposée sur la plaie quotidiennement durant les trois jours de réépithélialisation. Par la suite, la vitesse de réépithélialisation serait quantifiée à l'aide de photographies prises après trois jours de traitement et des biopsies incluant la cornée reconstruite intacte et l'épithélium en migration seraient prélevées et congelées pour des études immunohistochimiques ou fixées pour des analyses histologiques. Ce modèle permettrait ainsi d'analyser directement, de façon macroscopique et microscopique, l'effet de différents produits sur la vitesse de réépithélialisation ainsi que sur la qualité de l'épithélium régénéré.

Une autre application intéressante des cornées reconstruites concerne les études toxicologiques. Jusqu'à présent, ces études reposent sur le test de Draize qui consiste à évaluer la toxicité et l'inflammation dues à l'application de certaines substances sur des

yeux de lapins vivants. Le développement des cornées humaines reconstruites *in vitro*, qui ressemblent aux tissus d'origine, pourrait permettre de les employer afin de réduire l'utilisation des animaux. De plus, il est connu que certains produits provoquent des réactions différentes selon l'espèce, d'où l'avantage de se servir de tissus reconstruits à partir de cellules humaines. Ainsi, la toxicité de divers produits médicaux, cosmétiques et ménagers pourrait être évaluée. Il s'agirait simplement de déposer à la surface des cornées reconstruites, un petit volume de diverses concentrations des substances à tester. Le produit à évaluer peut être déposé sur la cornée reconstruite à une seule reprise ou quotidiennement durant une période pré-déterminée. Par la suite, les effets de ces solutions seraient étudiés en quantifiant la viabilité des cellules avec la méthode du rouge neutre et en analysant le métabolisme cellulaire en utilisant le test de conversion du sel de tétrazolium MTT (418). Des résultats prometteurs ont déjà été obtenus avec le modèle de l'équipe du Dre Griffith. En effet, certains produits ont causé des variations dans la transparence des cornées reconstruites (243). Par contre, l'absence de transformation virale des cellules cornéennes utilisées lors de la production des substituts par la méthode d'auto-assemblage constitue un grand avantage puisque l'ampleur des changements cellulaires et moléculaires associés à ces immortalisations n'est pas encore totalement connue.

Les données recueillies lors des présents travaux indiquent donc que la cornée reconstruite par la méthode d'auto-assemblage serait en mesure, une fois greffée, de se régénérer par elle-même et de façon similaire à la cornée *in situ*. De plus, la nature élaborée du modèle, qui possède plusieurs caractéristiques de la cornée humaine et de sa réépithélialisation, le rend d'une grande valeur pour étudier *in vitro*, dans des conditions contrôlées, la guérison des plaies cornéennes dont l'investigation *in vivo* s'avère plus difficile, en raison des multiples facteurs mis en jeu simultanément. Ce modèle pourrait donc apporter une multitude d'informations permettant de mieux comprendre la guérison cornéenne. En effet, les étapes qui, lorsque déficientes, sont susceptibles d'empêcher la guérison pourraient être identifiées. Par exemple, un déficit de l'épithélium cornéen peut être occasionné par une incapacité des cellules épithéliales à migrer ou à se diviser. Il peut aussi survenir lorsque les cellules sont incapables de bien se fixer à leur substrat. Il est à

espérer que les découvertes dans le domaine de la réépithélialisation cornéenne conduiront à une meilleure compréhension de ces mécanismes, ce qui permettrait éventuellement de développer des thérapies cliniques efficaces contre les déficits épithéliaux cornéens.

Pour ce qui est du modèle de cornée reconstruite *in vitro*, celui-ci devrait être perfectionné dans l'avenir en y ajoutant, par exemple, le troisième type cellulaire normalement présent au niveau de la cornée. En effet, étant donné l'importance des cellules endothéliales dans la cornée *in situ*, il est essentiel de les ajouter aux cornées reconstruites. D'après une étude antérieure, l'ajout de ce type cellulaire améliore beaucoup la qualité des substituts cornéens. En effet, les cellules endothéliales induiraient une meilleure différenciation des cellules épithéliales ainsi qu'une meilleure formation de la membrane basilaire séparant l'épithélium du stroma (32). Ces observations pourraient donc être vérifiées en ajoutant, à l'équivalent cornéen, des cellules endothéliales humaines. L'isolement des cellules endothéliales se ferait selon la méthode développée par l'équipe du Dre Nancy Joyce (419). Brièvement, la membrane de Descemet (sur laquelle sont attachées les cellules endothéliales) est enlevée du stroma sous un binoculaire à l'aide de pince courbe. Par la suite, un traitement avec de l'EDTA est utilisé pour dissocier les cellules de la membrane de Descemet. Les cellules recueillies sont alors cultivées dans un milieu spécialement adapté à leur croissance qui a été également développé par cette équipe de recherche (419). À la suite de leur expansion *in vitro*, les cellules endothéliales seraient déposées à la surface d'un stroma reconstruit par la méthode d'auto-assemblage. Une monocouche confluyente de cellules endothéliales serait obtenue après quelques jours de culture en condition immergée. Ensuite, le stroma reconstruit serait retourné afin de permettre l'ensemencement des CECH. Ce tissu serait conservé sept jours immergé puis cultivé à l'interface air-liquide pendant quatorze autres jours.

Les effets produits par l'addition de cellules endothéliales à la surface postérieure de la cornée humaine reconstruite seraient évalués en analysant l'histologie et la transparence des équivalents, le niveau de différenciation des cellules de l'épithélium, la présence et la

composition des deux membranes basales (l'une sous l'épithélium et l'autre au-dessus de l'endothélium) ainsi que l'organisation du stroma (orientation et espacement entre les fibres de collagènes). De cette façon la qualité histologique, immunohistochimique et ultrastructurale des cornées reconstruites endothélialisées serait minutieusement étudiée. De plus, puisqu'il y a une différence au niveau de la morphologie et du potentiel de prolifération des cellules endothéliales selon leur provenance (420), c'est-à-dire soit celles provenant du limbe ou du centre de la cornée, une évaluation du comportement de ces cellules au sein du modèle pourrait être effectuée. Finalement, à la suite de l'ajout de ce type cellulaire à la cornée reconstruite, le bon fonctionnement des pompes à sodium/potassium (Na^+/K^+) devra être examiné. Pour ce faire, l'épaisseur du stroma reconstruit de cornées reconstruites avec ou sans cellules endothéliales serait analysé (421). De plus, l'addition de ouabaïne (100 μM) dans le milieu de culture devrait causer l'arrêt des pompes et une augmentation de l'épaisseur du stroma (422).

Afin de poursuivre l'optimisation des cornées reconstruites, une attention particulière devra également être apportée au stroma reconstruit. Au niveau de la cornée *in situ*, les fibrilles de collagène du stroma possèdent une organisation tridimensionnelle bien définie. En effet, en plus de leur diamètre constant (25 nm) et de l'espace interfibrillaire d'environ 60 nm entre ces dernières, les fibrilles présentes dans une lamelle sont toutes orientées dans le même axe parallèle et l'orientation de celles-ci est différente d'une lamelle à l'autre (figure 1.6) (66). Cette organisation bien particulière est nécessaire à la transparence du tissu et assure une bonne vision. L'orientation de la matrice extracellulaire représente donc un grand défi à relever afin de pouvoir améliorer la qualité du stroma reconstruit. Une des stratégies possibles est de tenter d'induire, lors de la production des feuillets de fibroblastes, l'alignement du collagène en appliquant des contraintes mécaniques. Il a été récemment démontré que l'un des paramètres influençant l'orientation de la matrice extracellulaire est la réponse des cellules à des stimulations mécaniques (423). En effet, cette étude a établi, avec des cellules cutanées et vasculaires, que l'application de contraintes mécaniques sur les feuillets servant à la production des tissus reconstruits, selon la méthode d'auto-assemblage, provoquait l'alignement des cellules et du collagène. Cet

alignement se fait de façon parallèle à l'axe de la contrainte mécanique. Des expériences similaires pourraient donc être effectuées avec le stroma cornéen reconstruit.

Il s'agirait tout d'abord de cultiver des fibroblastes cornéens en présence d'acide ascorbique afin d'obtenir des feuillets de fibroblastes inclus dans une matrice extracellulaire (figure 1.17). Par la suite, la contrainte mécanique unidirectionnelle serait induite en détachant le feuillet du flacon de culture et en attachant les extrémités opposées du feuillet sur un cadre de carton rigide. Plusieurs feuillets seraient ensuite superposés et cultivés pendant quelques semaines supplémentaires. La transparence du tissu serait évaluée avec un spectromètre, en plaçant celui-ci dans une cellule à immersion composée de plastique et de lamelles de quartz. Des analyses histologiques, immunohistochimiques (alignement du collagène de type I et de l'actine) et ultrastructurales (distance entre les fibrilles et diamètre de celles-ci) seraient également effectuées afin d'évaluer l'effet des contraintes mécaniques sur l'organisation du stroma reconstruit. Finalement, la présence des protéoglycanes, qui sont directement responsables de l'espace régulier entre les fibrilles, pourrait être observée par immunodétection et buvardage de type Western à l'aide d'anticorps monoclonaux dirigés contre le kératane sulfate, la chondroïtine, la chondroïtine sulfate ainsi que le dermatane sulfate. Ces études permettraient donc d'optimiser la qualité du stroma reconstruit et de confirmer que ce dernier possède les mêmes caractéristiques structurales que celui retrouvé *in vivo*. Ceci est particulièrement important pour les cornées reconstruites développées en vue de futures applications cliniques.

5.3 Influence déterminante des fibroblastes sur la stratification et la différenciation des cellules épithéliales dans nos modèles de peaux et cornées reconstruites *in vitro*

Le troisième objectif spécifique de cette thèse était de mieux comprendre le rôle des fibroblastes dans le contrôle de la différenciation et de la stratification des cellules épithéliales. En effet, leur implication dans le contrôle de l'homéostasie de l'épithélium cornéen et cutané adulte est encore mal définie. Ainsi, en prévision d'éventuelles greffes des cornées reconstruites, il était primordial d'effectuer des études afin d'évaluer si l'origine des fibroblastes utilisés lors de la fabrication des cornées *in vitro* influençait l'épaisseur de l'épithélium obtenu. Ceci est particulièrement important puisque l'uniformité et le maintien de l'épaisseur de l'épithélium cornéen sont des caractéristiques essentielles à une bonne acuité visuelle.

Le modèle de cornées reconstruites *in vitro*, jumelé au modèle de peaux reconstruites précédemment développé dans notre laboratoire, a été utilisé afin d'approfondir les interactions entre les cellules épithéliales et les fibroblastes. Cette étude est d'ailleurs la première effectuée à partir d'une cornée reconstruite *in vitro* à cette fin. Par contre, des travaux antérieurs avaient déjà utilisés des équivalents cutanés reconstruits avec la méthode du gel de collagène afin d'approfondir les interactions mésenchyme/épiderme dans la peau (383, 424). De nombreuses autres expériences étudiant aussi ces interactions ont été effectuées à l'aide de recombinaisons épithélium-mésenchyme/stroma homotypiques et hétérotypiques (364, 371, 373, 389-394). Ces dernières, réalisées *in vivo*, sont cependant très difficiles à réaliser étant donné la complexité des conditions expérimentales.

Le développement de tissus tridimensionnels reconstruits en laboratoire, tels que la peau (300) et la cornée (425), offre donc une approche *in vitro* complémentaire pouvant

être utilisée afin de mieux comprendre les interactions épithélium/stroma. En effet, ces modèles uniques sont très intéressants puisqu'ils permettent d'étudier en détail, dans des conditions contrôlées, l'effet de l'origine des fibroblastes sur la transparence et l'histologie des tissus reconstruits. Ces travaux ont ainsi permis de démontrer que 1) l'aspect macroscopique des peaux et des cornées reconstruites est très différent; les peaux sont opaques et blanchâtres comparativement aux cornées qui sont transparentes, 2) l'origine des fibroblastes influence grandement, en plus de l'aspect macroscopique, l'histologie des tissus reconstruits; les fibroblastes cornéens favorisent un nombre moins élevé de couches de cellules comparativement aux fibroblastes dermiques qui entraînent plutôt une augmentation du nombre de strates de cellules, 3) ces changements dans la différenciation et la stratification des cellules épithéliales sont contrôlés par des facteurs solubles sécrétés dans le milieu de culture, 4) l'interleukine 6 (IL-6) pourrait être impliquée dans ce contrôle.

Cette étude a effectivement permis de confirmer, grâce à l'utilisation de milieux conditionnés, que l'influence des fibroblastes sur la différenciation des cellules épithéliales impliquait la transmission de substances diffusibles. L'analyse de ces milieux a mis en évidence le rôle possible de IL-6 dans le maintien de l'homéostasie des épithélia adultes cornéens et cutanés. Cependant, plusieurs expériences supplémentaires seront nécessaires afin de confirmer l'importance de cette cytokine dans le contrôle de l'épaisseur de ces épithélia. Par exemple, il serait intéressant d'ajouter cette cytokine dans le milieu de culture afin de vérifier si celle-ci est en mesure de moduler la différenciation et la stratification des cellules épithéliales de façon similaire au milieu conditionné par les fibroblastes cornéens. En effet, l'IL-6 exogène devrait pouvoir entraîner une diminution du nombre de couches de cellules au niveau de l'épithélium de la peau reconstruite (PP) et du tissu composé de fibroblastes dermiques et de cellules épithéliales cornéennes (PC). Alternativement, une plus forte expression de l'IL-6 pourrait être introduite dans les fibroblastes dermiques à la suite d'une transfection transitoire de ces cellules. De plus, un anticorps bloquant l'IL-6 pourrait également être ajouté au milieu conditionné, ce qui devrait théoriquement annuler les effets obtenus avec ce dernier. Une approche encore plus spécifique serait d'utiliser la

technique des siRNA (*short interfering RNA*) qui se lient directement à l'ARNm et conduisent à sa dégradation par l'organisme.

Différentes autres données viennent également appuyer l'implication de l'IL-6 dans le contrôle de la différenciation des cellules épithéliales. En effet, il a été récemment rapporté que différentes protéines reliées au phénomène de kératinisation, dont la transglutaminase 1 (Tgase 1), accompagnent la kératinisation pathologique lors de graves maladies affectant cette surface (426). Ces molécules ne sont habituellement pas présentes au niveau de la surface oculaire. Cette kératinisation, plus souvent appelée "*squamous metaplasia*", consiste en la transition d'un épithélium stratifié non-kératinisé en un épithélium kératinisé (427). En histologie, une augmentation de la stratification de l'épithélium cornéen, un élargissement des cellules épithéliales superficielles ainsi qu'une perte des cellules à gobelet sont alors observés (428, 429). Ce processus implique donc une différenciation anormale des cellules épithéliales et résulte en une diminution de l'acuité visuelle ainsi qu'en une grande instabilité du film lacrymal. En plus de la présence inhabituelle de la Tgase 1, il a été également postulé que l'absence du film lacrymal pourrait être associée à cette pathologie. D'autres hypothèses et les résultats de nos recherches semblent démontrer cette possibilité. En effet, il fut proposé que la présence de l'IL-6 et IL-8 dans les larmes pouvait aider à maintenir l'intégrité de l'épithélium cornéen (208). De plus, parce que nos résultats suggèrent que l'IL-6 pourrait empêcher la kératinisation d'un épithélium, nous croyons également que le processus de kératinisation pathologique observé pour diverses maladies pourrait être relié à une diminution de la quantité d'IL-6 due à la perte du film lacrymal.

Diverses autres molécules pourraient aussi jouer des rôles essentiels dans le contrôle de la différenciation des cellules épithéliales. En effet, il est fort probable que le contrôle de l'homéostasie soit le résultat d'interactions entre plusieurs cytokines (430). C'est pourquoi plusieurs expériences pourraient être entreprises afin de permettre l'identification d'autres facteurs possiblement impliqués dans ce contrôle. Tout d'abord, il serait intéressant

d'effectuer une analyse plus approfondie des milieux conditionnés à l'aide d'un gel d'électrophorèse en deux dimensions (2D-PAGE). L'électrophorèse bidimensionnelle permet de séparer les protéines contenues dans les milieux conditionnés selon leur charge et leur poids moléculaire. En effet, les protéines seraient séparées dans un gel de polyacrylamide selon leur point isoélectrique (pI) lors de la première dimension et selon leur masse lors de la seconde dimension. Après coloration au nitrate d'argent, une première identification des diverses protéines contenues dans les différentes bandes du gel serait effectuée grâce à leur pI et leur poids moléculaire. La présence d'une molécule pourrait alors être confirmée et aussi quantifiée par des ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*). Par la suite, si certaines bandes correspondent à des molécules inconnues (points inconnus) ou si l'identité de la protéine est ambiguë, il serait envisageable de caractériser celles-ci en utilisant un spectromètre de masse. Ce dernier permet l'identification de composés inconnus et la caractérisation de composés en mesurant la masse peptidique avec une haute sensibilité.

Les expériences que nous avons effectuées ont aussi clairement démontré que des signaux provenant des cellules du stroma/derme peuvent être reconnus par les cellules épithéliales et affectent leur programme de différenciation. Effectivement, les changements dans l'épaisseur des épithélia des tissus reconstruits avec des fibroblastes et des cellules épithéliales provenant de différentes origines suggèrent une modification de la différenciation de ces cellules. Cependant, afin de bien cerner la question, des études additionnelles devraient être réalisées afin de vérifier la présence de certains marqueurs de différenciation de l'épithélium cutané et cornéen (369, 370, 373, 431). Cela pourrait être effectué par immunohistochimie ou par buvardage de type Western avec des anticorps monoclonaux dirigés contre des molécules telles que la K1, K3, K5, K10, K12, K14, la filaggrine ainsi que l'involucrine, la transglutaminase et la loricine qui sont connues comme étant les principaux marqueurs de différenciation terminale de l'épiderme (354-357). De plus, il serait également intéressant, à la suite de l'isolement d'extraits nucléaires provenant de l'épithélium des tissus reconstruits, d'évaluer l'expression de certains facteurs de transcription (Sp1, Sp3, AP-1, AP-2) impliqués dans l'activation du promoteur de

plusieurs kératines et autres marqueurs exprimés lors de la différenciation des cellules épithéliales (328, 329, 338, 432).

Les interactions épithélium/stroma jouent un rôle très important lors du développement et du maintien de l'homéostasie des épithélia. Par conséquent, une perturbation de ces échanges intercellulaires peut mener à des anomalies du développement et de la croissance des cellules épithéliales. Des études ont d'ailleurs rapporté, pour plusieurs maladies de la peau telles que le lichen planus et le psoriasis, un dysfonctionnement dans l'expression de gènes codant pour diverses cytokines (433). En effet, il a été démontré que plusieurs cytokines étaient présentes au niveau des lésions psoriatiques, dont une grande quantité d'IL-6 habituellement détectée très faiblement dans la peau humaine saine (434-436). Or, la forte expression de cette cytokine, sécrétée par les fibroblastes des lésions, pourrait être mêlée au dérèglement du programme de différenciation des cellules épithéliales qui s'observe par l'absence des couches granuleuses et l'augmentation du nombre de couche cornée. En accord avec cette hypothèse, des souris transgéniques, surexprimant l'IL-6, présentent aussi des dysfonctionnements de leur programme de différenciation tel qu'un important retard de l'apparition des poils (437). Il a été également proposé que le syndrome de Stevens-Johnson, qui est une grave maladie inflammatoire affectant principalement la peau et d'autres tissus comme la surface oculaire, pourrait être causé par un problème au niveau du réseau de cytokines (438, 439). De plus, une expression anormale de certains facteurs de croissance, tels que le VEGF, le BMP-2, le BMP-4 et l'IGF-I, a aussi été identifiée pour certaines maladies cornéennes comme le kératocône, la kératopathie bulleuse ainsi que chez des cornées provenant de patients diabétiques (440). C'est pourquoi l'identification des molécules (facteurs de croissance et cytokines) jouant des rôles essentiels dans le maintien de l'homéostasie des épithélia cutanés et cornéens est cruciale pour une meilleure compréhension et prévention de ces maladies (441).

Les tissus reconstruits (peau et cornée) par la méthode d'auto-assemblage pourraient alors s'avérer de nouveaux outils qui faciliteraient grandement l'avancement des recherches sur ces diverses maladies. En effet, ces modèles d'étude permettent de recréer des conditions pathologiques *in vitro*, par l'emploi de cellules particulières provenant de patients souffrant d'une maladie. Par exemple, il a été précédemment démontré que des kératinocytes normaux ont développé un épiderme caractéristique du psoriasis lorsque ces derniers sontensemencés sur des fibroblastes de lésions psoriatiques (442). Ainsi, des tissus reconstruits avec d'autres cellules déficientes pourraient éventuellement permettre d'identifier les cytokines responsables de certaines maladies. Ces équivalents reconstruits pourraient peut-être même servir, dans le futur, à cibler les produits pharmaceutiques qui permettront de corriger ces anomalies.

Cette étude a également permis de recueillir, pour la toute première fois, des informations pertinentes concernant l'absorption des UV par la cornée reconstruite. En effet, il a été montré que les cornées reconstruites sont en mesure d'absorber les rayons ultraviolets de façon similaire aux cornées *in situ*. L'absorption des UV-B (<310 nm) par l'épithélium cornéen est particulièrement importante puisque cela protège la rétine ainsi que les autres structures internes de l'œil qui y sont très sensibles (108, 443). Toujours dans la perspective d'éventuelles greffes des équivalents cornéens, il était essentiel que cet aspect soit analysé. Par contre, pour les expériences futures, il serait primordial d'utiliser un spectromètre muni d'une sphère d'intégration, qui permet de mesurer, en plus du spectre de transmission direct, la transmission diffuse. En effet, puisque la cornée n'est pas considérée comme un tissu homogène, il est essentiel de mesurer la lumière diffuse dans le tissu. De cette façon, les données recueillies procureraient une évaluation plus juste des caractéristiques optiques des cornées reconstruites.

Dans l'ensemble, tous les résultats obtenus lors de cette étude démontrent que les fibroblastes jouent un rôle important dans le contrôle de la différenciation des cellules épithéliales. En effet, les modèles de peaux et de cornées reconstruites permettent d'évaluer

de quelle manière l'origine des cultures de fibroblastes utilisées lors de la reconstruction des tissus, influence le programme de différenciation des cellules épithéliales. De plus, les données obtenues suggèrent que nos modèles pourraient contribuer grandement à découvrir quelles sont les différentes cytokines qui participent au maintien de l'homéostasie des tissus adultes.

Chapitre VI : Conclusion Générale

L'objectif de cette thèse était de déterminer les conditions optimales en vue de la production de cornées reconstruites. Nous devons nous assurer de la stabilité, de la qualité et de l'épaisseur de l'épithélium ainsi que des propriétés optiques et du potentiel de guérison de ces tissus reconstruits. Les résultats obtenus nous indiquent que le modèle de cornée reconstruite par la méthode d'auto-assemblage permet d'obtenir un substitut cornéen qui, en plus de démontrer une très bonne capacité de guérison, présente aussi d'excellentes qualités macroscopiques, histologiques et optiques. De plus, l'ensemble des données présentées dans cette thèse conduisent à une meilleure compréhension des processus cellulaires impliqués dans la réépithélialisation des plaies, la différenciation terminale, la prolifération, la migration et l'adhésion des cellules épithéliales, tout en démontrant le rôle clé des fibroblastes dans la différenciation et la stratification des épithélia. Ces nouvelles informations sont indispensables afin de poursuivre la reconstruction de tissus humains en laboratoire et rendent possible l'avancement de la recherche dans le domaine de la vision. Enfin, les progrès réalisés dans le développement des cornées reconstruites au cours des dernières années permettent aujourd'hui d'envisager la greffe de tissus complètement autologues chez l'humain.

Bibliographie

1. Darwin, C. (1934) *The origin of species*, London : J.M. Dent & sons, ltd ; New York : E.P. Dutton & co., inc.
2. Oyster, C. W. (1999) *The Human Eye: Structure and Function*, Sinauer Associates, Inc., Sunderland.
3. Stevens, A., and Lowe, J. (1993) *Histologie*, Pradel, Paris.
4. Marieb, E. N. (1993) *Anatomie et physiologie humaine*, St-Laurent.
5. Hogan, M. J., Alvarado, J. A., and Weddel, J. E. (1971) The Cornea. In *Histology of the human eye: an Atlas and Textbook* (Hogan, M. J., Alvarado, J. A., and Weddel, J. E., eds) pp. 55-111, W.B. Saunders, Philadelphia.
6. Kinoshita, S., Adachi, W., Sotozono, C., Nishida, K., Yokoi, N., Quantock, A. J., and Okubo, K. (2001) Characteristics of the human ocular surface epithelium. *Prog Retinal Eye Res.* 20, 639-673.
7. Klyce, S. D., and Beuerman, R. W. (1998) Structure and function of the cornea. In *The Cornea* (Kaufman, H. E., Barron, B. A., and McDonald, M. B., eds) pp. 3-50, Butterworth-Heinemann, Boston.
8. Rozsa, A. J., and Beuerman, R. W. (1982) Density and organization of free nerve endings in the corneal epithelium of the rabbit. *Pain.* 14, 105-120.
9. Hay, E. D. (1979) Development of the vertebrate cornea. *Int Rev Cytol.* 63, 263-322.
10. Thut, C. J., Rountree, R. B., Hwa, M., and Kingsley, D. M. (2001) A large-scale in situ screen provides molecular evidence for the induction of eye anterior segment structures by the developing lens. *Dev Biol.* 231, 63-76.
11. Noden, D. M. (1986) Origins and patterning of craniofacial mesenchymal tissues. *J Cran Gen Dev Biol.* 2, 15-31.
12. Johnston, M. C., Noden, D. M., Hazelton, R. D., Coulombre, J. L., and Coulombre, A. J. (1979) Origins of avian ocular and periocular tissues. *Exp Eye Res.* 29, 27-43.
13. Le Lievre, C. S., and Le Douarin, N. M. (1975) Mesenchymal derivatives of the neural crest: analysis of chimaeric quail and chick embryos. *J Embryol Exp Morphol.* 34, 125-154.

14. Ben-Zvi, A., Rodrigues, M. M., Krachmer, J. H., and Fujikawa, L. S. (1986) Immunohistochemical characterization of extracellular matrix in the developing human cornea. *Curr Eye Res.* 5, 105-117.
15. Warwick, R. (1976) *Eugene Wolff's Anatomy of the Eye and Orbit*, WB Saunders, Philadelphia.
16. Adamis, A. P., Molnar, M. L., Tripathi, B. J., Emmerson, M. S., Stefansson, K., and Tripathi, R. C. (1985) Neuronal-specific enolase in human corneal endothelium and posterior keratocytes. *Exp Eye Res.* 41, 665-668.
17. Wulle, K. G. (1972) Electron microscopy of the fetal development of the corneal endothelium and Descemet's membrane of the human eye. *Invest Ophthalmol.* 11, 897-904.
18. Tisdale, A. S., Spurr-Michaud, S. J., Rodrigues, M., Hackett, J., Krachmer, J., and Gipson, I. K. (1988) Development of the anchoring structures of the epithelium in rabbit and human fetal corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 29, 727-736.
19. Maurice, D. M. (1957) The structure and transparency of the cornea. *J Physiol London* 136, 263.
20. Duke-Elder, S., and Wybar, K. C. (1961) *The Anatomy of the Visual System* Vol. Vol. 2, The C.V. Mosby Company, St-Louis.
21. Records, R. E. (1979) Tear film. In *Physiology of The Human Eye and Visual System* (RE, R., ed), Harper and Row, New York.
22. Ehlers, N. (1965) The precorneal film. *Acta Ophthalmol.* 81, 10134.
23. Watanabe, H. (2002) Significance of mucin on the ocular surface. *Cornea.* 21, S17-22.
24. Ehlers, N. (1970) Some comparative studies on the mammalian corneal epithelium. *Acta Ophthalmol. (Copenh)* 48, 821-828.
25. Fine, B. S., and Yanoff, M. (1979) The Cornea and Sclera. In *Ocular Histology: A Text and Atlas* (Row, H., ed) pp. 163-193, Hagerstown.
26. Pellegrini, G., Golisano, O., Paterna, P., Lambiase, A., Bonini, S., Rama, P., and De Luca, M. (1999) Location and clonal analysis of stem cells and their differentiated progeny in the human ocular surface. *J Cell Biol.* 145, 769-782.
27. Pouliquen, Y., Limon, S., Faure, J. P., and Bisson, J. (1969) La cornée, le limbe, la sclérotique. In *Atlas d'histologie et d'ultrastructure du globe oculaire* (Cie, M., ed) pp. 1-19, Paris.

28. Pfister, R. R. (1973) The normal surface of corneal epithelium: a scanning electron microscopic study. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 12, 654-668.
29. McLaughlin, B. J., Caldwell, R. B., Sasaki, Y., and Wood, T. O. (1985) Freeze-fracture quantitative comparison of rabbit corneal epithelial and endothelial membranes. *Curr Eye Res.* 4, 951-961.
30. Gipson, I. K. (1977) Cytoplasmic filaments: their role in motility and cell shape. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 16, 1081-1084.
31. Dua, H. S., Gomes, J. A. P., and Singh, A. (1994) Corneal epithelial wound healing. *Br J Ophthalmol.* 78, 401-408.
32. Zieske, J. D., Mason, V. S., Wasson, M. E., Meunier, S. F., Nolte, C. J. M., Fukai, N., Olsen, B. R., and Parenteau, N. L. (1994) Basement membrane assembly and differentiation of cultured corneal cells: importance of culture environment and endothelial cell interaction. *Exp Cell Res.* 214, 621-633.
33. Ljubimov, A. V., Burgeson, R. E., Butkowski, R. J., Michael, A. F., Sun, T.-T., and Kenney, M. C. (1995) Human corneal basement membrane heterogeneity: topographical differences in the expression of type IV collagen and laminin isoforms. *Lab Invest.* 72, 461-473.
34. Tuori, A., Uusitalo, H., Burgeson, R. E., Terttunen, J., and Virtanen, I. (1996) The immunohistochemical composition of human corneal basement membrane. *Cornea.* 15, 286-294.
35. Briggaman, R. A., and Wheeler, C. E., Jr. (1975) The epidermal-dermal junction. *J Invest Dermatol.* 65, 71-84.
36. Burgeson, R. E., and Christiano, A. M. (1997) The dermal-epidermal junction. *Curr Opin Cell Biol.* 9, 651-658.
37. Marinkovich, M. P., Keene, D. R., Rimberg, C. S., and Burgeson, R. E. (1993) Cellular origin of the dermal-epidermal basement membrane. *Dev dyn.* 197, 255-267.
38. Ray, M. C., and Gately, L. E. (1996) Basement membrane zone. *Clin Dermatol.* 14, 321-330.
39. Briggaman, R. A., and Wheeler, C. E. (1975) The epidermal-dermal junction. *J Invest Dermatol* 65, 71-84.
40. Sage, H. (1982) Collagens of basement membranes. *J Invest Dermatol.* 79, 51s-59s.

41. Lodish, H., Baltimore, D., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., and Darnell, J. (1997) *Biologie moléculaire de la cellule*, DeBoeck Université.
42. Sakai, L. Y., Keene, D. R., Morris, N. P., and Burgeson, R. E. (1986) Type VII collagen is a major structural component of anchoring fibrils. *J Cell Biol.* 103, 1577-1586.
43. Gipson, I. K., Spurr-Michaud, S. J., and Tisdale, A. S. (1987) Anchoring fibrils form a complex network in human and rabbit cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 28, 212-220.
44. Rousselle, P., Keene, D. R., Ruggiero, F., Champlaud, M. F., Rest, M., and Burgeson, R. E. (1997) Laminin 5 binds the NC-1 domain of type VII collagen. *J Cell Biol.* 138, 719-728.
45. Keene, D. R., Sakai, L. Y., Lunstrum, G. P., Morris, N. P., and Burgeson, R. E. (1987) Type VII collagen forms and extended network of anchoring fibrils. *J Cell Biol.* 104, 611-621.
46. Jones, J. C. R., Asmuth, J., Baker, S. E., Langhofer, M., Roth, S. I., and Hopkinson, S. B. (1994) Hemidesmosomes: extracellular matrix/intermediate filament connectors. *Exp Cell Res.* 213, 1-11.
47. Borradori, L., and Sonnenberg, A. (1999) Structure and function of hemidesmosomes: more than simple adhesion complexes. *J Invest Dermatol.* 112, 411-418.
48. Stepp, M. A., Spurr-Michaud, S., Tisdale, A., Elwell, J., and Gipson, I. K. (1990) $\alpha 6\beta 4$ integrin heterodimer is a component of hemidesmosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87, 8970-8974.
49. Hynes, R. O. (1992) Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell.* 69, 11-25.
50. Giancotti, F. G. (1996) Signal transduction by the alpha 6 beta 4 integrin: charting the path between laminin binding and nuclear events. *J Cell Sci.* 109 (Pt 6), 1165-1172.
51. Niessen, C. M., Hogervorst, F., Jaspars, L. H., de Melker, A. A., Delwel, G. O., Hulsman, E. H., Kuikman, I., and Sonnenberg, A. (1994) The alpha 6 beta 4 integrin is a receptor for both laminin and kalinin. *Exp Cell Res.* 211, 360-367.
52. Geras, A. J. (1990) *Dermatology: A Medical Artist's Interpretation*, Sandoz Medical Publications, Switzerland.

53. Carter, W. G., Kaur, P., Gil, S. G., Gahr, P. J., and Wayner, E. A. (1990) Distinct functions for integrins $\alpha 3\beta 1$ in focal adhesions and $\alpha 6\beta 4$ bullous pemphigoid antigen in a new stable anchoring contact (SAC) of keratinocytes: relation to hemidesmosomes. *J Cell Biol.* 111, 3141-3154.
54. Carter, W. G., Ryan, M. C., and Gahr, P. J. (1991) Epiligrin, a new cell adhesion ligand for integrin $\alpha 3\beta 1$ in epithelial basement membranes. *Cell.* 65, 599-610.
55. Marshall, G. E., Konstas, A. G., and Lee, W. R. (1991) Immunogold fine structural localization of extracellular matrix components in aged human cornea. I. Types I-IV collagen and laminin. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 229, 157-163.
56. Marshall, G. E., Konstas, A. G., and Lee, W. R. (1991) Immunogold fine structural localization of extracellular matrix components in aged human cornea. II. Collagen types V and VI. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 229, 164-171.
57. Jacobsen, I. E., Jensen, O. A., and Prause, J. U. (1984) Structure and composition of Bowman's membrane. Study by frozen resin cracking. *Acta Ophthalmol. (Copenh)* 62, 39-53.
58. Wessel, H., Anderson, S., Fite, D., Halvas, E., Hempel, J., and SundarRaj, N. (1997) Type XII collagen contributes to diversities in human corneal and limbal extracellular matrices. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 38, 2408-2422.
59. Nakayasu, K., Tanaka, M., Konomi, H., and Hayashi, T. (1986) Distribution of types I, II, III, IV and V collagen in normal and keratoconus corneas. *Ophthalmic Res.* 18, 1-10.
60. Scroggs, M. W., and Klintworth, G. K. (1992) Normal Eye and ocular Adnexa. In *Histology for pathologists* (Sternberg, S. S., ed) Vol. Chap 47 pp. 903-911, Raven Press, New York.
61. Wilson, S. E., and Hong, J. W. (2000) Bowman's layer structure and function: critical or dispensable to corneal function? A hypothesis. *Cornea.* 19, 417-420.
62. Freeman, I. L. (1978) Collagen polymorphism in mature rabbit cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 17, 171-177.
63. Newsome, D. A., Gross, J., and Hassell, J. R. (1982) Human corneal stroma contains three distinct collagens. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 22, 376-381.
64. Maurice, D. M. (1984) The cornea and sclera. In *The Eye. Vegetative Physiology and Biochemistry* (Davison, H., ed) Vol. 1B, Academic Press, Orlando, Florida.

65. Ojeda, J. L., Ventosa, J. A., and Piedra, S. (2001) The three-dimensional microanatomy of the rabbit and human cornea. A chemical and mechanical microdissection-SEM approach. *J Anat.* 199, 567-576.
66. Payrau, P., Pouliquen, Y., Faure, J. P., and Offret, G. (1967) La transparence de la cornée. *Bulletin et Memoires de la Societe Francaises d Ophthalmologie* 80, 1-35.
67. Radner, W., Zehetmayer, M., Aufreiter, R., and Mallinger, R. (1998) Interlacing and cross-angle distribution of collagen lamellae in the human cornea. *Cornea.* 17, 537-543.
68. Sayers, Z., Koch, M. H., Whitburn, S. B., Meek, K. M., Elliott, G. F., and Harmsen, A. (1982) Synchrotron x-ray diffraction study of corneal stroma. *J Mol Biol.* 160, 593-607.
69. Cox, J. L., Farrell, R. A., Hart, R. W., and Langham, M. E. (1970) The transparency of the mammalian cornea. *J of Physiol.* 210, 601-616.
70. Scott, J. E. (1988) Proteoglycan-fibrillar collagen interactions. *Biochem J.* 252, 313-323.
71. Birk, D. E., Fitch, J. M., Babiarz, J. P., Doane, K. J., and Linsenmayer, T. F. (1990) Collagen fibrillogenesis in vitro: interaction of types I and V collagen regulates fibril diameter. *J Cell Sci.* 95, 649-657.
72. Kurpakus-Wheater, M., Kernacki, K. A., and Hazlett, L. D. (2001) Maintaining corneal integrity how the "window" stays clear. *Prog Histochem Cytochem.* 36, 185-259.
73. Scott, J. E., and Haigh, M. (1985) 'Small'-proteoglycan:collagen interactions: keratan sulphate proteoglycan associates with rabbit corneal collagen fibrils at the 'a' and 'c' bands. *BioSci Rep.* 5, 765-774.
74. Jester, J. V., Barry, P. A., Lind, G. J., Petroll, W. M., Garana, R., and Cavanagh, H. D. (1994) Corneal keratocytes: in situ and in vitro organization of cytoskeletal contractile proteins. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 35, 730-743.
75. Ueda, A., Nishida, T., Otori, T., and Fujita, H. (1987) Electron-microscopic studies on the presence of gap junctions between corneal fibroblasts in rabbits. *Cell Tissue Res.* 249, 473-475.
76. Assouline, M., Chew, S. J., Thompson, H. W., and Beuerman, R. (1992) Effect of growth factors on collagen lattice contraction by human keratocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 33, 1742-1755.
77. Reim, M., Kottek, A., and Schrage, N. (1997) The cornea surface and wound healing. *Prog Retinal Eye Res.* 16, 183-225.

78. Smelser, G. K., Polack, F. M., and Ozanics, V. (1965) Persistence of donor collagen in corneal transplants. *Exp Eye Res.* 4, 349-354.
79. Fini, M. E. (1999) Keratocyte and fibroblast phenotypes in the repairing cornea. *Prog Retinal Eye Res.* 18, 529-551.
80. Jester, J. V., Rodrigues, M. M., and Herman, I. M. (1987) Characterization of avascular corneal wound healing fibroblasts. New insights into the myofibroblast. *Am J Pathol.* 127, 140-148.
81. Skalli, O., and Gabbiani, G. (1988) The biology of the myofibroblast relationship to wound contraction and fibrocontractive diseases. In *The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair* (Clark, R. A. F., and Henson, P. M., eds) pp. 373-401, Plenum, New York.
82. Darby, I., Skalli, O., and Gabbiani, G. (1990) α -smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing. *Lab Invest.* 63, 21-29.
83. Sappino, A. P., Schurch, W., and Gabbiani, G. (1990) Differentiation repertoire of fibroblastic cells: expression of cytoskeletal proteins as marker of phenotypic modulations. *Laboratory Investigation* 63, 144-161.
84. Rubin, J. S., Osada, H., Finch, P. W., Taylor, W. G., Rudikoff, S., and Aaronson, S. A. (1989) Purification and characterization of a newly identified growth factor specific for epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86, 802-806.
85. Finch, P. W., Rubin, J. S., Miki, T., Roni, D., and Aaronson, S. A. (1989) Human KGF is FGF-related with properties of a paracrine effector of epithelial cell growth. *Science.* 245, 752-755.
86. Matsumoto, K., Hashimoto, K., Yoshikawa, K., and Nakamura, T. (1991) Marked stimulation of growth and motility of human keratinocytes by hepatocyte growth factor. *Exp Cell Res.* 196, 114-120.
87. Wilson, S. E., He, Y. G., Weng, J., Zieske, J. D., Jester, J. V., and Schultz, G. S. (1994) Effect of epidermal growth factor, hepatocyte growth factor, and keratinocyte growth factor, on proliferation, motility and differentiation of human corneal epithelial cells. *Exp Eye Res.* 59, 665-678.
88. Wilson, S. E. (2000) Role of apoptosis in wound healing in the cornea. *Cornea.* 19, S7-12.
89. Johnson, D. H., Bourne, W. M., and Campbell, R. J. (1982) The ultrastructure of Descemet's membrane. I. Changes with age in normal corneas. *Archs Ophthalmol.* 100, 1942-1947.

90. Binder, P. S., Rock, M. E., Schmidt, K. C., and Anderson, J. A. (1991) High-voltage electron microscopy of normal human cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 32, 2234-2243.
91. Tamura, Y., Konomi, H., Sawada, H., Takashima, S., and Nakajima, A. (1991) Tissue distribution of type VIII collagen in human adult and fetal eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 32, 2636-2644.
92. Kefalides, N. A., and Denduchis, B. (1969) Structural components of epithelial and endothelial basement membranes. *Biochemistry.* 8, 4613-4621.
93. Labermeier, U., Demlow, T. A., and Kenney, M. C. (1983) Identification of collagens isolated from bovine Descemet's membrane. *Exp Eye Res.* 37, 225-237.
94. Benya, P. D., and Padilla, S. R. (1986) Isolation and characterization of type VIII collagen synthesized by cultured rabbit corneal endothelial cells. A conventional structure replaces the interrupted-helix model. *J Biol Chem.* 261, 4160-4169.
95. Kapoor, R., Bornstein, P., and Sage, E. H. (1986) Type VIII collagen from bovine Descemet's membrane: structural characterization of a triple-helical domain. *Biochemistry.* 25, 3930-3937.
96. Sawada, H., Konomi, H., and Hirose, K. (1990) Characterization of the collagen in the hexagonal lattice of Descemet's membrane: its relation to type VIII collagen. *J Biol.* 110, 219-227.
97. Paull, A. C., and Whitehart, D. R. (2005) Expression of the p53 family of proteins in central and peripheral human corneal endothelial cells. *Mol Vis.* 11, 328-334.
98. Aintablian, A., Weissmann, J. A., Engelmann, K., and Bednarz, J. (2003) Further Evidence of Regenerative Capacity of Human Corneal Endothelial Cells in the Corneal Periphery. *ARVO Meeting Abstracts* 44, E-Abstract 4331.
99. Parikh, C. H., Vaughn, A. C., Holley, G. P., Whitehart, D. R., and Edelhauser, H. F. (2003) The Potential Proliferative Capacity of the Human Corneal Endothelium. *ARVO Meeting Abstracts* 44, E-Abstract 4718.
100. Whitehart, D. R., Vaughn, A. C., Holley, G. P., and Edelhauser, H. F. (2002) Telomerase Activity in the Human Corneal Endothelial Limbus. *ARVO Meeting Abstracts* 43, E-Abstract 1627.
101. Pistov, M. Y., Sadovnikova, E. Y., and Danilov, S. M. (1988) Human corneal endothelial cells : Isolation, characterization and long-term cultivation. *Exp Eye Res.* 47, 403-414.

102. Engelmann, K., Böhnke, M., and Friedl, P. (1988) Isolation and long-term cultivation of human corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 29, 1656-1662.
103. Engelmann, K., Bednarz, J., Schäfer, H. J., and Friedl, P. (2001) Isolation and characterization of a mouse monoclonal antibody against human corneal endothelial cells. *Exp Eye Res.* 73, 9-16.
104. Gospodarowicz, D., Mescher, A. L., and Birdwell, C. R. (1977) Stimulation of corneal endothelial cell proliferations in vitro by fibroblast and epidermal growth factors. *Exp Eye Res.* 25, 75-89.
105. Engelmann, K., and Friedl, P. (1989) Optimization of culture conditions for human corneal endothelial cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 25, 1065-1072.
106. Hogan, M. J., Alvarado, J. A., and Weddel, J. E. (1971) The Limbus. In *Histology of the human eye: an Atlas and Textbook.* (Hogan, M. J., Alvarado, J. A., and Weddel, J. E., eds) pp. 112-182, W.B. Saunders, Philadelphia.
107. Cotsarelis, G., Cheng, S. Z., Dong, G., Sun, T.-T., and Lavker, R. M. (1989) Existence of slow-cycling limbal epithelial basal cells that can be preferentially stimulated to proliferate: implications on epithelial stem cells. *Cell.* 57, 201-209.
108. Luo, L., Reinach, P. S., and Kao, W. W. (2001) Corneal epithelial wound healing. *Exp Biol Med. (Maywood)* 226, 653-664.
109. Daniels, J. T., Dart, J. K., Tuft, S. J., and Khaw, P. T. (2001) Corneal stem cells in review. *Wound Repair Regen.* 9, 483-494.
110. Dua, H. S., and Azuara-Blanco, A. (2000) Limbal stem cells of the corneal epithelium. *Surv Ophthalmol.* 44, 415-425.
111. Zieske, J. D. (1994) Perpetuation of stem cells in the eye. *Eye* 8, 163-169.
112. Davanger, M., and Evensen, A. (1971) Role of the pericorneal papillary structure in renewal of corneal epithelium. *Nature.* 229, 560-561.
113. Kolega, J., Manabe, M., and Sun, T.-T. (1989) Basement membrane heterogeneity and variation in corneal epithelial differentiation. *Differentiation.* 42, 54-63.
114. Schofield, R. (1983) The stem cell system. *Biomed Pharma.* 37, 375-380.
115. Miller, S. J., Sun, T. T., and Lavker, R. M. (1993) Hair follicles, stem cells, and skin cancer. *J Invest Dermatol.* 100, 288S-294S.

116. Cotsarelis, G., Kaur, P., Dhouailly, D., Hengge, U., and Bickenbach, J. R. (1999) Epithelial stem cells in the skin: definition, markers, localization and functions. *Exp Dermatol.* 8, 80-88.
117. Tseng, S. C. (1989) Concept and application of limbal stem cells. *Eye.* 3, 141-157.
118. Sangwan, V. S. (2001) Limbal stem cells in health and disease. *BioSci Rep.* 21, 385-405.
119. Potten, C. S., and Morris, R. J. (1988) Epithelial stem cells in vivo. *J Cell Sci.* 10, 45-62.
120. Moll, R., Franke, W. W., Schiller, D. L., Geiger, B., and Krepler, R. (1982) The catalog of human cytokeratins: Patterns of expression in normal epithelial, tumors and cultured cells. *Cell.* 31, 11-24.
121. Coulombe, P. A., and Fuchs, E. (1990) Elucidating the early stages of keratin filament assembly. *J Cell Biol.* 111, 153-169.
122. Coulombe, P. A., and Omary, M. B. (2002) 'Hard' and 'soft' principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments. *Curr Opin Cell Biol.* 14, 110-122.
123. Steinert, P. M., and Roop, D. R. (1988) Molecular and cellular biology of intermediate filaments. *Ann Rev Biochem.* 57, 593-625.
124. Bousquet, O., Ma, L., Yamada, S., Gu, C., Idei, T., Takahashi, K., Wirtz, D., and Coulombe, P. A. (2001) The nonhelical tail domain of keratin 14 promotes filament bundling and enhances the mechanical properties of keratin intermediate filaments in vitro. *J Cell Biol.* 155, 747-753.
125. Paladini, R. D., and Coulombe, P. A. (1999) The functional diversity of epidermal keratins revealed by the partial rescue of the keratin 14 null phenotype by keratin 16. *J Cell Biol.* 146, 1185-1201.
126. Kurpakus, M. A., Stock, E. L., and Jones, J. C. (1992) The role of the basement membrane in differential expression of keratin proteins in epithelial cells. *Dev Biol.* 150, 243-255.
127. Elder, M. J., Hiscott, P., and Dart, J. K. (1997) Intermediate filament expression by normal and diseased human corneal epithelium. *Hum Pathol.* 28, 1348-1354.
128. Schermer, A., Galvin, S., and Sun, T.-T. (1986) Differentiation-related expression of a major 64K corneal keratin in vivo and in culture suggests limbal location of corneal epithelial stem cells. *J Cell Biol.* 103, 49-62.

129. Kurpakus, M. A., Stock, E. L., and Jones, J. C. (1990) Expression of the 55-kD/64-kD corneal keratins in ocular surface epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 31, 448-456.
130. Kivela, T., and Uusitalo, M. (1998) Structure, development and function of cytoskeletal elements in non-neuronal cells of the human eye. *Prog Retinal Eye Res.* 17, 385-428.
131. Kasper, M., Moll, R., Stosiek, P., and Karsten, U. (1988) Patterns of cytokeratin and vimentin expression in the human eye. *Histochemistry.* 89, 369-377.
132. Lauweryns, B., Van Den Oord, J. J., De Vos, R., and Missotten, L. (1993) A new epithelial cell type in the human cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 34, 1983-1990.
133. Michel, M., Torok, N., Godbout, M.-J., Lussier, M., Gaudreau, P., Royal, A., and Germain, L. (1996) Keratin 19 as a biochemical marker of skin stem cells in vivo and in vitro: keratin 19 expressing cells are differentially localized in function of anatomic sites, and their number varies with donor age and culture stage. *J Cell Sci.* 109, 1017-1028.
134. Germain, L., Carrier, P., Auger, F. A., Salesse, C., and Guérin, S. L. (2000) Can we produce a human corneal equivalent by tissue engineering? *Prog Retinal Eye Res.* 19, 497-527.
135. Zieske, J. D., Bukusoglu, G., Yankauckas, M. A., Wasson, M. E., and Keutmann, H. T. (1992) α -enolase is restricted to basal cells of stratified squamous epithelium. *Dev Biol.* 151, 18-26.
136. Stepp, M. A., Zhu, L., Sheppard, D., and Cranfill, R. L. (1995) Localized distribution of $\alpha 9$ integrin in the cornea and changes in expression during epithelial cell differentiation. *J Histochem Cytochem.* 43, 343-362.
137. Pellegrini, G., Dellambra, E., Golisano, O., Martinelli, E., Fantozzi, I., Bondanza, S., Ponzin, D., McKeon, F., and De Luca, L. M. (2001) p63 identifies keratinocyte stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98, 3156-3161.
138. Ebato, B., Friend, J., and Thoft, R. A. (1987) Comparison of central and peripheral human corneal epithelium in tissue culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 28, 1450-1456.
139. Ebato, B., Friend, J., and Thoft, R. A. (1988) Comparison of limbal and peripheral human corneal epithelium in tissue culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 29, 1533-1537.

140. Lindberg, K., Brown, M. E., Chaves, H. V., Kenuon, K. R., and Rheinwald, J. G. (1993) In vitro propagation of human ocular surface epithelial cells for transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 34, 2672-2679.
141. Huang, A. J. W., and Tseng, S. C. (1991) Corneal epithelial wound healing in the absence of limbal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 32, 96-105.
142. Tsai, R. J., Sun, T.-T., and Tseng, S. C. (1990) Comparison of limbal and conjunctival autograft transplantation in corneal surface reconstruction in rabbits. *Ophthalmology* 97, 446-455.
143. Kruse, F. E. (1994) Stem cells and corneal epithelial regeneration. *Eye* 8, 170-183.
144. Thoft, R. A., and Friend, J. (1983) The X, Y, Z hypothesis of corneal epithelial maintenance. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 24, 1442-1443.
145. Buck, R. C. (1985) Measurement of centripetal migration of normal corneal epithelial cells in the mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 26, 1296-1299.
146. Bradshaw, J. J., Obritsch, W. F., Cho, B. J., Gregerson, D. S., and Holland, E. J. (1999) Ex vivo transduction of corneal epithelial progenitor cells using a retroviral vector. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 40, 230-235.
147. Dua, H. S., Watson, N. J., Mathur, R. M., and Forrester, J. V. (1993) Corneal epithelial cell migration in humans: hurricane and blizzard keratopathy. *Eye.* 7, 53-58.
148. Hoang-Xuan, T. (1998) Restauration de l'épithélium cornéen à partir des cellules souches limbiques. *Médecine/sciences* 14, 1375-1377.
149. Stepp, M. A., and Zhu, L. (1997) Upregulation of $\alpha 9$ integrin and tenascin during epithelial regeneration after debridement in the cornea. *J Histochem Cytochem.* 45, 189-201.
150. Gipson, I. K., and Inatomi, T. (1995) Extracellular matrix and growth factors in corneal wound healing. *Curr Opin Ophthalmol.* 6, 3-10.
151. Zieske, J. D. (2001) Extracellular matrix and wound healing. *Curr Opin Ophthalmol.* 12, 237-241.
152. Stepp, M. A., Spurr-Michaud, S., and Gipson, I. K. (1993) Integrins in the wounded and unwounded stratified squamous epithelium of the cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 34, 1829-1844.
153. Crosson, C. E., Klyce, S. D., and Beuerman, R. W. (1986) Epithelial wound closure in the rabbit cornea. A biphasic process. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 27, 464-473.

154. Pfister, R. R. (1975) The healing of corneal epithelial abrasions in the rabbit: a scanning electron microscope study. *Invest Ophthalmol.* 14, 648-661.
155. Fujikawa, L. S., Foster, C. S., Harrist, T. J., Lanigan, J. M., and Colvin, R. B. (1981) Fibronectin in healing rabbit corneal wounds. *Lab Invest.* 45, 120-129.
156. Drew, A. F., Schiman, H. L., Kombrinck, K. W., Bugge, T. H., Degen, J. L., and Kaufman, A. H. (2000) Persistent corneal haze after excimer laser photokeratectomy in plasminogen-deficient mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 41, 67-72.
157. Ebihara, N., Mizushima, H., Miyazaki, K., Watanabe, Y., Ikawa, S., Nakayasu, K., and Kanai, A. (2000) The functions of exogenous and endogenous laminin-5 on corneal epithelial cells. *Exp Eye Res.* 71, 69-79.
158. Nguyen, B. P., Gil, S. G., and Carter, W. G. (2000) Deposition of laminin 5 by keratinocytes regulates integrin adhesion and signaling. *J Biol Chem.* 275.
159. Fujikawa, L. S., Foster, C. S., Gipson, I. K., and Colvin, R. B. (1984) Basement membrane components in healing rabbit corneal epithelial wounds : Immunofluorescence and ultrastructural studies. *J Cell Biol.* 98, 128-138.
160. Nishida, T., Nakagawa, S., Awata, T., Ohashi, Y., Watanabe, K., and Manabe, R. (1983) Fibronectin promotes epithelial migration of cultured rabbit cornea in situ. *J Cell Biol.* 97, 1653-1657.
161. Gipson, I. K., Watanabe, H., and Zieske, J. D. (1993) Corneal wound healing and fibronectin. *Int Ophthalmol Clin.* 33, 149-163.
162. Ruoslahti, E. (1996) Integrin signaling and matrix assembly. *Tum Biol.* 17, 117-124.
163. Ruoslahti, E., and Pierschbacher, M. D. (1987) New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science.* 238, 491-497.
164. Kao, W. W., Kao, C. W., Kaufman, A. H., Kombrinck, K. W., Converse, R. L., Good, W. V., Bugge, T. H., and Degen, J. L. (1998) Healing of corneal epithelial defects in plasminogen- and fibrinogen-deficient mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 39, 502-508.
165. Matsuda, M., Ubels, J. L., and Edelhauser, H. F. (1985) A larger corneal epithelial wound closes at a faster rate. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 26, 897-900.
166. Cintron, C., Hong, B. S., and Kublin, C. L. (1981) Quantitative analysis of collagen from normal developing corneas and corneal scars. *CurrEye Res.* 1, 1-8.
167. Hanna, C. (1966) Proliferation and migration of epithelial cells during corneal wound repair in the rabbit and the rat. *Am J Ophthalmol.* 61, 55-63.

168. Gipson, I. K. (1992) Adhesive mechanisms of the corneal epithelium. *Acta Ophthalmol. Supplement*, 13-17.
169. Clark, E. A., and Brugge, J. S. (1995) Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science*. 268, 233-239.
170. Huttenlocher, A., Sandborg, R. R., and Horwitz, A. F. (1995) Adhesion in cell migration. *Curr Opin Cell Biol.* 7, 697-706.
171. Irigoyen, J. P., Munoz-Canoves, P., Montero, L., Koziczak, M., and Nagamine, Y. (1999) The plasminogen activator system: biology and regulation. *Cell Mol Life Sci.* 56, 104-132.
172. Payne, J., Gong, H., and Trinkaus-Randall, V. (2000) Tyrosine phosphorylation: a critical component in the formation of hemidesmosomes. *Cell Tissue Res.* 300, 401-411.
173. Gipson, I. K., Spurr-Michaud, S., Tisdale, A., Elwell, J., and Stepp, M. A. (1993) Redistribution of the hemidesmosome components $\alpha 6 \beta 4$ integrin and bullous pemphigoid antigens during epithelial wound healing. *Exp Cell Res.* 207, 86-98.
174. Gipson, I. K., Spurr-Michaud, S., Tisdale, A., and Keough, M. (1989) Reassembly of the anchoring structures of the corneal epithelium during wound repair in the rabbit. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 30, 425-434.
175. Giancotti, F. G., and Ruoslahti, E. (1999) Integrin signaling. *Science*. 285, 1028-1032.
176. Hynes, R. O. (2002) Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell.* 110, 673-687.
177. Paallysaho, T., and Williams, D. S. (1991) Epithelial cell-substrate adhesion in the cornea of actin, talin, integrin, and fibronectin. *Exp Eye Res.* 52, 261-267.
178. Sheppard, D. (1996) Epithelial integrins. *BioEssays.* 18, 655-660.
179. Lauweryns, B., Van Den Oord, J. J., Valpes, R., Foets, B., and Missotten, L. (1991) Distribution of very late activation integrins in the human cornea. An immunohistochemical study using monoclonal antibodies. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 32, 2079-2085.
180. Tervo, K., Tervo, T., van Setten, G.-B., and Virtanen, I. (1991) Integrins in human corneal epithelium. *Cornea.* 10, 461-465.
181. Paallysaho, T., Tervo, T., Virtanen, I., and Tervo, K. (1992) Integrins in the normal and healing epithelium. *Acta Ophthalmol.* 202, 22-25.

182. Elner, S. G., and Elner, V. M. (1996) The integrins superfamily and the eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 37, 696-701.
183. Kurpakus, M. A., Quaranta, V., and Jones, J. C. R. (1991) Surface relocation of alpha6beta4 integrins and assembly of hemidesmosomes in an in vitro model of wound healing. *J Cell Biol.* 115, 1737-1750.
184. Iglesia, D. D., Gala, P. H., Qiu, T., and Stepp, M. A. (2000) Integrin expression during epithelial migration and re-stratification in the tenascin-C-deficient mouse cornea. *J Histochem Cytochem.* 48, 363-376.
185. Latvala, T., Paallysaho, T., Tervo, K., and Tervo, T. (1996) Distribution and of $\alpha 6$ and $\beta 4$ integrins following epithelial abrasion in the rabbit cornea. *Acta Ophthalmol Scand.* 74, 21-25.
186. Carter, W., Wayner, E., Bouchard, T., and Kaur, P. (1990) The role of integrins $\alpha 2\beta 1$ and $\alpha 3\beta 1$ in cell-cell and cell-substrate adhesion of human epidermal cells. *J Cell Biol.* 110, 1387-1404.
187. Goldfinger, L. E., Hopkinson, S. B., deHart, G. W., Collawn, S., Couchman, J. R., and Jones, J. C. (1999) The alpha3 laminin subunit, alpha6beta4 and alpha3beta1 integrin coordinately regulate wound healing in cultured epithelial cells and in the skin. *J Cell Sci.* 112, 2615-2629.
188. Maldonado, B. A., and Furcht, L. T. (1995) Epidermal growth factor stimulates integrin-mediated cell migration of cultured human corneal epithelial cells on fibronectin and arginine-glycine-aspartic acid peptide. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 36, 2120-2126.
189. Murakami, J., Nishida, T., and Otori, T. (1992) Coordinated appearance of beta 1 integrins and fibronectin during corneal wound healing. *J Lab Clin Med.* 120, 86-93.
190. Giancotti, F. G., and Mainiero, F. (1994) Integrin-mediated adhesion and signaling in tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta* 1198, 47-64.
191. Wilson, S. E., and Kim, W. J. (1998) Keratocyte apoptosis: implications on corneal wound healing, tissue organization, and disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 39, 220-226.
192. Mohan, R. R., Kim, W. J., Stark, G. R., and Wilson, S. E. (2000) Defective keratocyte apoptosis in response to epithelial injury in stat 1 null mice. *Exp Eye Res.* 70, 485-491.
193. Ahmadi, A. J., and Jakobiec, F. A. (2002) Corneal wound healing: cytokines and extracellular matrix proteins. *Int Ophthalmol Clin.* 42, 13-22.

194. Jester, J. V., Petroll, W. M., Barry, P. A., and Cavanagh, H. D. (1995) Expression of alpha-smooth muscle (alpha-SM) actin during corneal stromal wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 36, 809-819.
195. Jester, J. V., Petroll, W. M., and Cavanagh, H. D. (1999) Corneal stromal wound healing in refractive surgery: the role of myofibroblasts. *Prog Retin Eye Res.* 18, 311-356.
196. Wilson, S. E., Liu, J. J., and Mohan, R. R. (1999) Stromal-epithelial interactions in the cornea. *Prog Retin Eye Res.* 18, 293-309.
197. Weng, J., Mohan, R. R., Li, Q., and Wilson, S. E. (1997) IL-1 upregulates keratinocyte growth factor and hepatocyte growth factor mRNA and protein production by cultured stromal fibroblast cells: interleukin-1 beta expression in the cornea. *Cornea.* 16, 465-471.
198. Sotozono, C., Inatomi, T., Nakamura, M., and Kinoshita, S. (1995) Keratinocyte growth factor accelerates corneal epithelial wound healing in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 36, 1524-1529.
199. Wilson, S. E., Mohan, R. R., Ambrosio, R., Jr., Hong, J., and Lee, J. (2001) The corneal wound healing response: cytokine-mediated interaction of the epithelium, stroma, and inflammatory cells. *Prog Retin Eye Res.* 20, 625-637.
200. Hong, J. W., Liu, J. J., Lee, J. S., Mohan, R. R., Woods, D. J., He, Y. G., and Wilson, S. E. (2001) Proinflammatory chemokine induction in keratocytes and inflammatory cell infiltration into the cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 42, 2795-2803.
201. O'Brien, T. P., Li, Q., Ashraf, M. F., Matteson, D. M., Stark, W. J., and Chan, C. C. (1998) Inflammatory response in the early stages of wound healing after excimer laser keratectomy. *Arch Ophthalmol.* 116, 1470-1474.
202. Cintron, C., Hassinger, L. C., Kublin, C. L., and Cannon, D. J. (1978) Biochemical and ultrastructural changes in collagen during corneal wound healing. *J Ultrastruct Res.* 65, 13-22.
203. Benedek, G. B. (1971) The theory of transparency of the eye. *Appl Opt.* 10, 459-473.
204. Kaji, Y., Obata, H., Usui, T., Soya, K., Machinami, R., Tsuru, T., and Yamashita, H. (1998) Three-dimensional organization of collagen fibrils during corneal stromal wound healing after excimer laser keratectomy. *J Cataract Refract Surg.* 24, 1441-1446.
205. Nishida, T., and Tanaka, T. (1996) Extracellular matrix and growth factors in corneal wound healing. *Curr Opin Ophthalmol.* 7, 2-11.

206. Imanishi, J., Kamiyama, K., Iguchi, I., Kita, M., Sotozono, C., and Kinoshita, S. (2000) Growth factors: importance in wound healing and maintenance of transparency of the cornea. *Prog Retin Eye Res.* 19, 113-129.
207. Sotozono, C., He, J., Matsumoto, Y., Kita, M., Imanishi, J., and Kinoshita, S. (1997) Cytokine expression in the alkali-burned cornea. *Curr Eye Res.* 16, 670-676.
208. Nakamura, Y., Sotozono, C., and Kinoshita, S. (1998) Inflammatory cytokines in normal human tears. *Curr Eye Res.* 17, 673-676.
209. Agrawal, V. B., and Tsai, R. J. (2003) Corneal epithelial wound healing. *Ind J Ophthalmol.* 51, 5-15.
210. Schultz, G., Khaw, P. T., Oxford, K., MaCauley, S., Van Setten, G., and Chegini, N. (1994) Growth factors and ocular wound healing. *Eye.* 8, 184-187.
211. Tripathi, B. J., Kwait, P. S., and Tripathi, R. C. (1990) Corneal growth factors: a new generation of ophthalmic pharmaceuticals. *Cornea.* 9, 2-9.
212. Cohen, S. (1962) Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. *J Biol Chem.* 237, 1555-1562.
213. Wilson, S. E., He, Y. G., and Lloyd, S. A. (1992) EGF, EGF receptor, basic FGF, TGF beta-1, and IL-1 alpha mRNA in human corneal epithelial cells and stromal fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 33, 1756-1765.
214. van Setten, G. B., Tervo, T., Tervo, K., and Tarkkanen, A. (1992) Epidermal growth factor (EGF) in ocular fluids: presence, origin and therapeutical considerations. *Acta Ophthalmol Suppl.* 54-59.
215. Zieske, J. D., Takahashi, H., Hutcheon, A. E., and Dalbone, A. C. (2000) Activation of epidermal growth factor receptor during corneal epithelial migration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 41, 1346-1355.
216. Carpenter, G. (1993) EGF: new tricks for an old growth factor. *Curr Opin Cell Biol.* 5, 261-264.
217. Savage, C. R., Jr., and Cohen, S. (1973) Proliferation of corneal epithelium induced by epidermal growth factor. *Exp Eye Res.* 15, 361-366.
218. Grant, M. B., Khaw, P. T., Schultz, G. S., Adams, J. L., and Shimizu, R. W. (1992) Effects of epidermal growth factor, fibroblast growth factor, and transforming growth factor-beta on corneal cell chemotaxis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 33, 3292-3301.

219. Watanabe, K., Nakagawa, S., and Nishida, T. (1987) Stimulatory effects of fibronectin and EGF on migration of corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 28, 205-211.
220. Boisjoly, H. M., Laplante, C., Bernatchez, S. F., Salesse, C., Giasson, M., and Joly, M. C. (1993) Effects of EGF, IL-1 and their combination on in vitro corneal epithelial wound closure and cell chemotaxis. *Exp Eye Res.* 57, 293-300.
221. Ho, P. C., Davis, W. H., Elliott, J. H., and Cohen, S. (1974) Kinetics of corneal epithelial regeneration and epidermal growth factor. *Invest Ophthalmol.* 13, 804-809.
222. Brightwell, J. R., Riddle, S. L., Eiferman, R. A., Valenzuela, P., Barr, P. J., Merryweather, J. P., and Schultz, G. S. (1985) Biosynthetic human EGF accelerates healing of Neodecadron-treated primate corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 26, 105-110.
223. Daniele, S., Frati, L., Fiore, C., and Santoni, G. (1979) The effect of the epidermal growth factor (EGF) on the corneal epithelium in humans. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 210, 159-165.
224. Petroustos, G., Courty, J., Guimaraes, R., Pouliquen, Y., Barritault, D., Plouet, J., and Courtois, Y. (1984) Comparison of the effects of EGF, pFGF and EDGF on corneal epithelium wound healing. *Curr Eye Res.* 3, 593-598.
225. Kitazawa, T., Kinoshita, S., Fujita, K., Araki, K., Watanabe, H., Ohashi, Y., and Manabe, R. (1990) The mechanism of accelerated corneal epithelial healing by human epidermal growth factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 31, 1773-1778.
226. Nishida, T., Nakamura, M., Mishima, H., and Otori, T. (1990) Differential modes of action of fibronectin and epidermal growth factor on rabbit corneal epithelial migration. *J Cell Physiol.* 145, 549-554.
227. Cameron, J. D., Flaxman, B. A., and Yanoff, M. (1974) In vitro studies of corneal wound healing: epithelial-endothelial interactions. *Invest Ophthalmol.* 13, 575-579.
228. Zagon, I. S., Sassani, J. W., and McLaughlin, P. J. (2000) Reepithelialization of the human cornea is regulated by endogenous opioids. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 41, 73-81.
229. Foreman, D. M., Pancholi, S., Jarvis-Evans, J., McLeod, D., and Boulton, M. E. (1996) A simple organ culture model for assessing the effects of growth factors on corneal re-epithelialization. *Exp Eye Res.* 62, 555-564.
230. Collin, H. B., Anderson, J. A., Richard, N. R., and Binder, P. S. (1995) In vitro model for corneal wound healing; organ-cultured human corneas. *Curr Eye Res.* 14, 331-339.

231. Hardarson, T., Hanson, C., Claesson, M., and Stenevi, U. (2004) Time-lapse recordings of human corneal epithelial healing. *Acta Ophthalmol Scand.* 82, 184-188.
232. Tanelian, D. L., and Bisla, K. (1992) A new in vitro corneal preparation to study epithelial wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 33, 3024-3028.
233. Lin, C. P., and Boehnke, M. (1997) A new model for in vitro corneal epithelial wound healing study. *Kaohsiung J Med Sci.* 13, 475-479.
234. Chuck, R. S., Behrens, A., Wellik, S., Liaw, L. L., Dolorico, A. M., Sweet, P., Chao, L. C., Osann, K. E., McDonnell, P. J., and Berns, M. W. (2001) Re-epithelialization in cornea organ culture after chemical burns and excimer laser treatment. *Arch Ophthalmol.* 119, 1637-1642.
235. Soong, H. K., McClenic, B., Varani, J., Hassan, T., Huang, S. C., and Brenz, R. (1989) EGF does not enhance corneal epithelial cell motility. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 30, 1808-1812.
236. Richard, N. R., Anderson, J. A., Weiss, J. L., and Binder, P. S. (1991) Air/liquid corneal organ culture: a light microscopic study. *Curr Eye Res.* 10, 739-749.
237. Van Horn, D. L., Doughman, D. J., Harris, J. E., Miller, G. E., Lindstrom, R., and Good, R. A. (1975) Ultrastructure of human organ-cultured cornea. II. Stroma and epithelium. *Arch Ophthalmol.* 93, 275-277.
238. Nelson, J. D., Silverman, V., Lima, P. H., and Beckman, G. (1990) Corneal epithelial wound healing: a tissue culture assay on the effect of antibiotics. *Curr Eye Res.* 9, 277-285.
239. Simmons, S. J., Jumblatt, M. M., and Neufeld, A. H. (1987) Corneal epithelial wound closure in tissue culture: an in vitro model of ocular irritancy. *Toxicol Appl Pharmacol.* 88, 13-23.
240. Jumblatt, M. M., and Neufeld, A. H. (1986) A tissue culture assay of corneal epithelial wound closure. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 27, 8-13.
241. Saika, S., Ohnishi, Y., Ooshima, A., Liu, C. Y., and Kao, W. W. (2002) Epithelial repair: roles of extracellular matrix. *Cornea.* 21, S23-29.
242. Germain, L., Carrier, P., Giasson, M., Grandbois, E., Auger, F. A., and Guerin, S. L. (1999) A new method for in vitro production of human reconstructed cornea by tissue engineering. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 40, S329.

243. Griffith, M., Osborne, R., Munger, R., Xiong, X., Doillon, C. J., Laycock, N. L., Hakim, M., Song, Y., and Watsky, M. A. (1999) Functional human corneal equivalents constructed from cell lines. *Science*. 286, 2169-2172.
244. Orwin, E. J., and Hubel, A. (2000) In vitro culture characteristics of corneal epithelial, endothelial, and keratocyte cells in a native collagen matrix. *Tissue Eng*. 6, 307-319.
245. Reichl, S., Bednarz, J., and Muller-Goymann, C. C. (2004) Human corneal equivalent as cell culture model for in vitro drug permeation studies. *Br J Ophthalmol*. 88, 560-565.
246. Minami, Y., Sugihara, H., and Oono, S. (1993) Reconstruction of cornea in three-dimensional collagen gel matrix culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 34, 2316-2324.
247. Parnigotto, P. P., Bassani, V., Montesi, F., and Conconi, M. T. (1998) Bovine corneal stroma and epithelium reconstructed in vitro: characterisation and response to surfactants. *Eye*. 12, 304-310.
248. Schneider, A. I., Maier-Reif, K., and Graeve, T. (1999) Constructing an in vitro cornea from cultures of the three specific corneal cell types. *In Vitro Cell Dev Biol. Anim*. 35, 515-526.
249. Tegtmeyer, S., Reichl, S., and Muller-Goymann, C. C. (2004) Cultivation and characterization of a bovine in vitro model of the cornea. *Pharmazie*. 59, 464-471.
250. Laplante, A. F., Germain, L., Auger, F. A., and Moulin, V. (2001) Mechanisms of wound reepithelialization: hints from a tissue-engineered reconstructed skin to long-standing questions. *FASEB J*. 15, 2377-2389.
251. Parrish, C. M., and Chandler, J. W. (1998) Corneal Trauma. In *The Cornea* (Kaufman, H. E., Barron, B. A., and McDonald, M. B., eds) pp. 633-671, Butterworth-Heinemann, Boston.
252. Dua, H. S. (1995) Stem cells of the ocular surface: scientific principles and clinical applications. *Br J Ophthalmol*. 79, 968.
253. Dua, H. S., and Forrester, J. V. (1990) The corneoscleral limbus in human corneal epithelial wound healing. *Am J Ophthalmol*. 110, 646-656.
254. Coster, D. J. (1998) Surgical Procedures to Restore the Corneal Epithelium. In *The Cornea* (Kaufman, H. E., Barron, B. A., and McDonald, M. B., eds) pp. 715-726, Butterworth-Heinemann, Boston.
255. Hoang-Xuan, T. (1998) Restauration de l'épithélium cornéen à partir des cellules souches limbiques. *Médecine/sciences*. 14, 1375-1377.

256. Lawton, A. W. (1998) Structure and Function of the Eyelids and Conjunctiva. In *The Cornea* (Kaufman, H. E., Barron, B. A., and McDonald, M. B., eds) pp. 51-60, Butterworth-Heinemann, Boston.
257. Puangsricharern, V., and Tseng, S. C. (1995) Cytologic evidence of corneal diseases with limbal stem cell deficiency. *Ophthalmology*. 102, 1476-1485.
258. Holland, E. J., and Schwartz, G. S. (1996) The evolution of epithelial transplantation for severe ocular surface disease and a proposed classification system. *Cornea*. 15, 549-556.
259. Kenyon, K. R., and Tseng, S. C. (1989) Limbal autograft transplantation for ocular surface disorders. *Ophthalmology*. 96, 709-723.
260. Chen, J. J., and Tseng, S. C. (1991) Abnormal corneal epithelial wound healing in partial-thickness removal of limbal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 32, 2219-2233.
261. Turgeon, P. W., Nauheim, R. C., Roat, M. I., Stopak, S. S., and Thoft, R. A. (1990) Indications for keratoepithelioplasty. *Arch Ophthalmol*. 108, 233-236.
262. Thoft, R. A. (1993) Graft failure in keratoepithelioplasty. *Cornea*. 12, 362-365.
263. Tsubota, K., Toda, I., Saito, H., Shinozaki, N., and Shimazaki, J. (1995) Reconstruction of the corneal epithelium by limbal allograft transplantation for severe ocular surface disorders. *Ophthalmology*. 102, 1486-1496.
264. Pellegrini, G., Bondanza, S., Guerra, L., and De Luca, M. (1998) Cultivation of human keratinocyte stem cells: current and future clinical applications. *Med Biol Eng Comp*. 36, 778-790.
265. Rheinwald, J. G., and Green, H. (1975) Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell*. 6, 331-343.
266. Green, H., Kehinde, O., and Thomas, J. (1979) Growth of cultured human epidermal cells into a multiple epithelia suitable for grafting. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 76, 5665-5668.
267. Compton, C. C., Hickerson, W., Nadire, K., and Press, W. (1993) Acceleration of skin regeneration from cultured epithelial autografts by transplantation to homograft dermis. *J Burn Care Rehabil*. 14, 653-662.
268. Pellegrini, G., Traverso, C. E., Franzi, A. T., Zingirian, M., Cancedda, R., and De Luca, M. (1997) Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium. *Lancet*. 349, 990-993.

269. Schwab, I. R. (1999) Cultured corneal epithelia for ocular surface disease. *Trans Am Ophthalmol Soc.* 97, 891-986.
270. Schwab, I. R., Reyes, M., and Isseroff, R. R. (2000) Successful transplantation of bioengineered tissue replacements in patients with ocular surface disease. *Cornea* 19, 421-426.
271. Tsai, R. J., Li, L. M., and Chen, J. K. (2000) Reconstruction of damaged corneas by transplantation of autologous limbal epithelial cells. *N Eng J Med.* 343, 86-93.
272. Rama, P., Bonini, S., Lambiase, A., Golisano, O., Paterna, P., De Luca, M., and Pellegrini, G. (2001) Autologous fibrin-cultured limbal stem cells permanently restore the corneal surface of patients with total limbal stem cell deficiency. *Transplantation.* 72, 1478-1485.
273. Han, B., Schwab, I. R., Madsen, T. K., and Isseroff, R. R. (2002) A fibrin-based bioengineered ocular surface with human corneal epithelial stem cells. *Cornea.* 21, 505-510.
274. Barrandon, Y., and Green, H. (1987) Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 84, 2302-2306.
275. Shimazaki, J., Aiba, M., Goto, E., Kato, N., Shimmura, S., and Tsubota, K. (2002) Transplantation of human limbal epithelium cultivated on amniotic membrane for the treatment of severe ocular surface disorders. *Ophthalmology.* 109, 1285-1290.
276. Kim, J., Djalilian, A., Schwartz, G., and Holland, E. (2003) Ocular surface reconstruction: limbal stem cell transplantation. *Ophthalmol Clin North Am.* 16, 67-77.
277. Auger, F. A., Guignard, R., Lopez Valle, C. A., and Germain, L. (1993) Role and innocuity of Tisseel, a tissue glue, in the grafting process and in vivo evolution of human cultured epidermis. *Br J Plast Surg.* 46, 136-142.
278. Pellegrini, G., Ranno, R., Stracuzzi, G., Bondanza, S., Guerra, L., Zambruno, G., Micali, G., and De Luca, L. M. (1999) The control of epidermal stem cells (holoclones) in the treatment of massive full-thickness burns with autologous keratinocytes cultured on fibrin. *Transplantation.* 68, 868-879.
279. Ronfard, V., Rives, J. M., Neveux, Y., Carsin, H., and Barrandon, Y. (2000) Long-term regeneration of human epidermis on third degree burns transplanted with autologous cultured epithelium grown on a fibrin matrix. *Transplantation.* 70, 1588-1598.
280. Baxter-Hyland-Immuno (2001) The fibrin network in tissue engineering, *In Tisseel Engineering, Fibrin matrix technology*, (Baxter-Hyland-Immuno, ed) pp. 1-6, Mississauga, Ontario.

281. Radosevich, M., Goubran, H. I., and Burnouf, T. (1997) Fibrin sealant: scientific rationale, production methods, properties, and current clinical use. *Vox Sang.* 72, 133-143.
282. Talbot, M., Carrier, P., Giasson, C. J., Deschambeault, A., Guérin, S. L., Auger, F. A., Bazin, R., and Germain, L. (2005) Autologous transplantation of rabbit limbal epithelia cultured on fibrin gels for ocular surface reconstruction. *Mol Vis.* 12,65-75.
283. Gallico, G. G., O'Connor, N. E., Compton, C. C., Kehinde, O., and Green, H. (1984) Permanent coverage of large burn wounds with autologous cultured human epithelium. *N Eng J Med.* 311, 448-451.
284. Germain, L., Rouabhia, M., Guignard, R., Carrier, L., Bouvard, V., and Auger, F. A. (1993) Improvement of human keratinocyte isolation and culture using thermolysin. *Burns.* 2, 99-104.
285. Bell, E., Sher, S., Hull, B., Merrill, C., Rosen, S., Chamson, A., Asselineau, D., Dubertret, L., Coulomb, B., Lapière, C., Nusgens, B., and Neveu, Y. (1983) The reconstitution of living skin. *J Invest Dermatol.* 81, 2s-10s.
286. Germain, L., and Auger, F. A. (1995) Tissue engineered biomaterials: biological and mechanical characteristics. In *Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering, part B; Applications* Vol. 1 pp. 699-734, Marcel Dekker, inc. Publishers, New York, USA.
287. Goulet, F., Germain, L., Caron, C., Rancourt, D., Normand, A., and Auger, F. A. (1996) Tissue-engineered ligament. In *Ligaments and ligamentoplasties* (Yahia, L., ed) pp. 367-377.
288. L'Heureux, N., Pâquet, S., Labbé, R., Germain, L., and Auger, F. A. (1998) A completely biological tissue-engineered human blood vessel. *FASEB J.* 12, 47-56.
289. Tegtmeier, S., Papantoniou, I., and Muller-Goymann, C. C. (2001) Reconstruction of an in vitro cornea and its use for drug permeation studies from different formulations containing pilocarpine hydrochloride. *Eur J Pharm Biopharm.* 51, 119-125.
290. Germain, L., Auger, F. A., Grandbois, E., Guignard, R., Giasson, M., Boisjoly, H. M., and Guérin, S. L. (1999) Reconstructed human cornea produced in vitro by tissue engineering. *Pathobiology.* 67, 140-147.
291. Griffith, M., Hakim, M., Shimmura, S., Watsky, M. A., Li, F., Carlsson, D., Doillon, C. J., Nakamura, M., Suuronen, E., Shinozaki, N., Nakata, K., and Sheardown, H. (2002) Artificial human corneas: scaffolds for transplantation and host regeneration. *Cornea.* 21, S54-61.

292. Geggel, H. S., Friend, J., and Thoft, R. A. (1985) Collagen gel for ocular surface. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 26, 901-905.
293. Germain, L., Berthod, F., Moulin, V., Goulet, F., and Auger, F. A. (2004) Principles of Living Organ Reconstruction by Tissue Engineering. In *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering* pp. 197-228, Marcel Dekker, New-York.
294. Geesin, J. C., Darr, D., Kaufman, R., Murad, S., and Pinnell, S. R. (1988) Ascorbic acid specifically increases type I and type III procollagen messenger RNA levels in human skin fibroblast. *J Invest Dermatol.* 90, 420-424.
295. Lamande, S. R., and Bateman, J. F. (1993) A mouse 3T6 fibroblast cell culture model for the study of normal and protein-engineered collagen synthesis and deposition into the extracellular matrix. *Matrix.* 13, 323-330.
296. Nusgens, B. V., Humbert, P., Rougier, A., Colige, A. C., Haftek, M., Lambert, C. A., Richard, A., Creidi, P., and Lapiere, C. M. (2001) Topically applied vitamin C enhances the mRNA level of collagens I and III, their processing enzymes and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 1 in the human dermis. *J Invest Dermatol.* 116, 853-859.
297. Murad, S., Tajima, S., Johnson, G. R., Sivarajah, S., and Pinnell, S. R. (1983) Collagen synthesis in cultured human skin fibroblasts: effect of ascorbic acid and its analogs. *J Invest Dermatol.* 81, 158-162.
298. Hata, R., and Senoo, H. (1989) L-ascorbic acid 2-phosphate stimulates collagen accumulation, cell proliferation, and formation of a three-dimensional tissuelike substance by skin fibroblasts. *J Cell Physiol.* 138, 8-16.
299. Chan, D., Lamande, S. R., Cole, W. G., and Bateman, J. F. (1990) Regulation of procollagen synthesis and processing during ascorbate-induced extracellular matrix accumulation in vitro. *Biochem J.* 269, 175-181.
300. Michel, M., L'Heureux, N., Pouliot, R., Xu, W., Auger, F. A., and Germain, L. (1999) Characterization of a new tissue-engineered human skin equivalent with hair. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 35, 318-326.
301. Gumbiner, B. M. (1996) Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell.* 84, 345-357.
302. Marco, E., Garcia-Nieto, R., and Gago, F. (2003) Assessment by molecular dynamics simulations of the structural determinants of DNA-binding specificity for transcription factor Sp1. *J Mol Biol.* 328, 9-32.
303. Lania, L., Majello, B., and De Luca, P. (1997) Transcriptional regulation by the Sp family proteins. *Int J Biochem Cell Biol.* 29, 1313-1323.

304. Lewin, B. (1998) *Gènes VI*, Oxford University Press and Cell Press, Bruxelles.
305. Kadonaga, J. T., Carner, K. R., Masiarz, F. R., and Tjian, R. (1987) Isolation of cDNA encoding transcription factor Sp1 and functional analysis of the DNA binding domain. *Cell*. 51, 1079-1090.
306. Briggs, M. R., Kadonaga, J. T., Bell, S. P., and Tjian, R. (1986) Purification and biochemical characterization of the promoter-specific transcription factor, Sp1. *Science*. 234, 47-52.
307. Cook, T., Gebelein, B., and Urrutia, R. (1999) Sp1 and its likes : biochemical and functional predictions for a growing family of zinc finger transcription factors. *Ann N York Acad Sci*. 880, 94-102.
308. Philipsen, S., and Suske, G. (1999) A tale of three fingers: the family of mammalian Sp/XKLF transcription factors. *Nucleic Acids Res*. 27, 2991-3000.
309. Bouwman, P., and Philipsen, S. (2002) Regulation of the activity of Sp1-related transcription factors. *Mol Cell Endocrinol*. 195, 27-38.
310. Suske, G. (1999) The Sp-family of transcription factors. *Gene*. 238, 291-300.
311. Boisclair, Y. R., Brown, A. L., Casola, S., and Rechler, M. M. (1993) Three clustered Sp1 sites are required for efficient transcription of the TATA-less promoter of the gene for insulin-like growth factor-binding protein-2 from the rat. *J Biol Chem*. 268, 24892-24901.
312. Kingsley, C., and Winoto, A. (1992) Cloning of GT box-binding proteins : a novel Sp1 multigene family regulating T-cell receptor gene expression. *Mol Cell Biol*. 12, 4251-4261.
313. Hagen, G., Dennig, J., Preiss, A., Beato, M., and Suske, G. (1995) Functional analyses of the transcription factor Sp4 reveal properties distinct from Sp1 and Sp3. *J Biol Chem*. 270, 24989-24994.
314. Harrison, S. M., Houzelstein, D., Dunwoodie, S. L., and Beddington, R. S. (2000) Sp5, a new member of the Sp1 family, is dynamically expressed during development and genetically interacts with Brachyury. *Dev Biol*. 227, 358-372.
315. Xiao, J., Xu, M., Li, J., Chang Chan, H., Lin, M., Zhu, H., Zhang, W., Zhou, Z., Zhao, B., and Sha, J. (2002) NYD-SP6, a novel gene potentially involved in regulating testicular development/spermatogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*. 291, 101-110.
316. Bouwman, P., Gollner, H., Elsasser, H. P., Eckhoff, G., Karis, A., Grosveld, F., Philipsen, S., and Suske, G. (2000) Transcription factor Sp3 is essential for post-natal survival and late tooth development. *Embo J*. 19, 655-661.

317. Nicolas, M., Noe, V., and Ciudad, C. J. (2003) Transcriptional regulation of the human Sp1 gene promoter by the specificity protein (Sp) family members nuclear factor Y (NF-Y) and E2F. *Biochem J.* 371, 265-275.
318. Apt, D., Watts, R. M., Suske, G., and Bernard, H. U. (1996) High Sp1/Sp3 ratios in epithelial cells during epithelial differentiation and cellular transformation correlate with the activation of the HPV-16 promoter. *Virology.* 224, 281-291.
319. Zutter, M. M., Ryan, E. E., and Painter, A. D. (1997) Binding of phosphorylated Sp1 protein to tandem Sp1 binding sites regulates $\alpha 2$ integrin gene core promoter activity. *Blood.* 90, 678-689.
320. Larouche, K., Leclerc, S., Salesse, C., and Guérin, S. L. (2000) Expression of the $\alpha 5$ integrin subunit gene promoter is positively regulated by the extracellular matrix component fibronectin through the transcription factor Sp1 in corneal epithelial cells in vitro. *J Biol Chem.* 275, 39182-39192.
321. Lin, C. S., Chen, Y., Huynh, T., and Kramer, R. (1997) Identification of the human $\alpha 6$ integrin gene promoter. *DNA and Cell Biol.* 16, 929-937.
322. Rosmarin, A. G., Luo, M., Caprio, D. G., Shang, J., and Simkevich, C. P. (1998) Sp1 cooperates with the ets transcription factor, GABP, to activate the CD18 (b2 leukocyte integrin) promoter. *J Biol Chem.* 273, 13097-13103.
323. Noti, J. D., Johnson, A. K., and Dillon, J. D. (2005) The leukocyte integrin gene CD11d is repressed by gut-enriched Kruppel-like factor 4 in myeloid cells. *J Biol Chem.* 280, 3449-3457.
324. Block, K. L., Shou, Y., and Poncz, M. (1996) An Ets/Sp1 interaction in the 5'-flanking region of the megakaryocyte-specific alpha IIb gene appears to stabilize Sp1 binding and is essential for expression of this TATA-less gene. *Blood.* 88, 2071-2080.
325. Czyz, M., and Cierniewski, C. S. (1999) Selective Sp1 and Sp3 binding is crucial for activity of the integrin αv promoter in cultured endothelial cells. *Eur J Biochem.* 265, 638-644.
326. Jin, Y., Wilhide, C. C., Dang, C., Li, L., Li, S. X., Villa-Garcia, M., and Bray, P. F. (1998) Human integrin b3 gene expression : evidence for a megakaryocytic cell-specific cis-acting element. *Blood.* 92, 2777-2790.
327. Feng, X., Teitelbaum, S. L., Quiroz, M. E., Cheng, S. L., Lai, C. F., Avioli, L. V., and Ross, F. P. (2000) Sp1/Sp3 and PU.1 differentially regulate $\alpha 5$ integrin gene expression in macrophages and osteoblasts. *J Biol Chem.* 275, 8331-8340.

328. Chen, T. T., Wu, R. L., Castro-Munozledo, F., and Sun, T. T. (1997) Regulation of K3 keratin gene transcription by Sp1 and AP-2 in differentiating rabbit corneal epithelial cells. *Mol Cell Biol.* 17, 3056-3064.
329. Wu, R. L., Chen, T. T., and Sun, T. T. (1994) Functional importance of an Sp1- and an NFkB-related nuclear protein in a keratinocyte-specific promoter of rabbit K3 keratin gene. *J Biol Chem.* 269, 28450-28459.
330. Pagliuca, A., Gallo, P., and Lania, L. (2000) Differential role for Sp1/Sp3 transcription factors in the regulation of the promoter activity of multiple cyclin-dependent kinase inhibitor genes. *J Cell Biochem.* 76, 360-367.
331. Kim, S. J., Onwuta, U. S., Lee, Y. I., Li, R., Botchan, M. R., and Robbins, P. D. (1992) The retinoblastoma gene product regulates Sp1-mediated transcription. *Mol Cell Biol.* 12, 2455-2463.
332. Udvardia, A. J., Templeton, D. J., and Horowitz, J. M. (1995) Functional interactions between the retinoblastoma (Rb) protein and Sp-family members: superactivation by Rb requires amino acids necessary for growth suppression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92, 3953-3957.
333. Gartel, A. L., Goufman, E., Najmabadi, F., and Tyner, A. L. (2000) Sp1 and Sp3 activate p21 (WAF1/CIP1) gene transcription in the Caco-2 colon adenocarcinoma cell line. *Oncogene.* 19, 5182-5188.
334. Wang, C. H., Tsao, Y. P., Chen, H. J., Chen, H. L., Wang, H. W., and Chen, S. L. (2000) Transcriptional repression of p21((Waf1/Cip1/Sdi1)) gene by c-jun through Sp1 site. *Biochem Biophys Res Commun.* 270, 303-310.
335. Watanabe, G., Albanese, C., Lee, R. J., Reutens, A., Vairo, G., Henglein, B., and Pestell, R. G. (1998) Inhibition of cyclin D1 kinase activity is associated with E2F-mediated inhibition of cyclin D1 promoter activity through E2F and Sp1. *Mol Cell Biol.* 18, 3212-3222.
336. Datta, P. K., Raychaudhuri, P., and Bagchi, S. (1995) Association of p107 with Sp1: genetically separable regions of p107 are involved in regulation of E2F- and Sp1-dependent transcription. *Mol Cell Biol.* 15, 5444-5452.
337. Lin, S. Y., Black, A. R., Kostic, D., Pajovic, S., Hoover, C. N., and Azizkhan, J. C. (1996) Cell cycle-regulated association of E2F1 and Sp1 is related to their functional interaction. *Mol Cell Biol.* 16, 1668-1675.
338. Opitz, O. G., and Rustgi, A. K. (2000) Interaction between Sp1 and cell cycle regulatory proteins is important in transactivation of a differentiation-related gene. *Cancer Res.* 60, 2825-2830.

339. Grinstein, E., Jundt, F., Weinert, I., Wernet, P., and Royer, H. D. (2002) Sp1 as G1 cell cycle phase specific transcription factor in epithelial cells. *Oncogene*. 21, 1485-1492.
340. Han, I., and Kudlow, J. E. (1997) Reduced O glycosylation of Sp1 is associated with increased proteasome susceptibility. *Mol Cell Biol*. 17, 2550-2558.
341. Armstrong, S. A., Barry, D. A., Leggett, R. W., and Mueller, C. R. (1997) Casein kinase II-mediated phosphorylation of the C terminus of Sp1 decreases its DNA binding activity. *J Biol Chem*. 272, 13489-13495.
342. Leggett, R. W., Armstrong, S. A., Barry, D., and Mueller, C. R. (1995) Sp1 is phosphorylated and its DNA binding activity down-regulated upon terminal differentiation of the liver. *J Biol Chem*. 270, 25879-25884.
343. Mortensen, E. R., Marks, P. A., Shiotani, A., and Merchant, J. L. (1997) Epidermal growth factor and okadaic acid stimulate Sp1 proteolysis. *J Biol Chem*. 272, 16540-16547.
344. Ammanamanchi, S., and Brattain, M. G. (2001) Sp3 is a transcriptional repressor of transforming growth factor-beta receptors. *J Biol Chem*. 276, 3348-3352.
345. Humphries, D. E., Bloom, B. B., Fine, A., and Goldstein, R. H. (1994) Structure and expression of the promoter for the human type II transforming growth factor-beta receptor. *Biochem Biophys Res Commun*. 203, 1020-1027.
346. Leitman, D. C., Mackow, E. R., Williams, T., Baxter, J. D., and West, B. L. (1992) The core promoter region of the tumor necrosis factor alpha gene confers phorbol ester responsiveness to upstream transcriptional activators. *Mol Cell Biol*. 12, 1352-1356.
347. Luster, T. A., Johnson, L. R., Nowling, T. K., Lamb, K. A., Philipsen, S., and Rizzino, A. (2000) Effects of three Sp1 motifs on the transcription of the FGF-4 gene. *Mol Reprod Dev*. 57, 4-15.
348. Finkenzeller, G., Sparacio, A., Technau, A., Marme, D., and Siemeister, G. (1997) Sp1 recognition sites in the proximal promoter of the human vascular endothelial growth factor gene are essential for platelet-derived growth factor-induced gene expression. *Oncogene*. 15, 669-676.
349. Holbrook, K. A., and Wolff, K. (1987) The structure and development of skin. In *Dermatology in general medicine* (Fitzpatrick, T. B., Eisen, A. Z., Wolff, K., Freedberg, I. M., and Austen, K. F., eds) Vol. 1 pp. 93-131, McGraw-Hill, New-York.
350. Watt, F. M. (1989) Terminal differentiation of epidermal keratinocytes. *Curr Opin Cell Biol*. 1, 1107-1115.

351. Eckert, R. L. (1989) Structure, function, and differentiation of the keratinocyte. *Physiol Rev.* 69, 1316-1346.
352. Fuchs, E., and Green, H. (1980) Changes in keratin gene expression during terminal differentiation of the keratinocyte. *Cell.* 19, 1033-1042.
353. Lyle, S., Christofidou-Solomidou, M., Liu, Y., Elder, D. E., Albelda, S., and Cotsarelis, G. (1998) The C8/144B monoclonal antibody recognizes cytokeratin 15 and defines the location of human hair follicle stem cells. *J Cell Sci.* 111, 3179-3188.
354. Watt, F. M. (1983) Involucrin and other markers of keratinocyte terminal differentiation. *J Invest Dermatol.* 81, 100s-103s.
355. Thacher, S. M., and Rice, R. H. (1985) Keratinocyte-specific transglutaminase of cultured human epidermal cells: relation to cross-linked envelope formation and terminal differentiation. *Cell.* 40, 685-695.
356. Mehrel, T., Hohl, D., Rothnagel, J. A., Longley, M. A., Bundman, D., Cheng, C., Lichti, U., Bisher, M. E., Yuspa, S. H., and Roop, D. R. (1990) Identification of a major keratinocyte cell envelope protein, loricrin. *Cell.* 61, 1103-1112.
357. Banks-Shlegel, S., and Green, H. (1981) Involucrin synthesis and tissue assembly by keratinocytes in natural and cultured human epithelia. *J Cell Biol.* 90, 732-737.
358. Sun, T. T., and Green, H. (1976) Differentiation of the epidermal keratinocyte in cell culture: formation of the cornified envelope. *Cell.* 9, 511-521.
359. Garrone, R. (1985) Le fibroblaste et la biosynthèse du collagène. *INSERM* 131, 81-84.
360. Sengel, P. (1976) Morphogenesis of single cutaneous appendages. In *in 'Morphogenesis of skin'*, pp. 153-267, Cambridge University Press.
361. McLoughlin, C. B. (1963) Mesenchymal influences on epithelial differentiation. *Symp Soc Exp Biol.* 17, 359-388.
362. Lash, J. W., and Vasan, N. S. (1977) Tissue interactions and extracellular matrix components. *Soc Gen Physiol Ser.* 32, 101-113.
363. Fleischmajer, R., and Billingham, R. E. (1968) *Epithelial-Mesenchymal Interactions*, Williams and Wilkins Co., Baltimore.
364. Delorme, P., and Dhouailly, D. (1989) The expression of mouse cytokeratin 9 during normal development and in dermal-epidermal recombinants. *J Invest Dermatol.* 94, 393.

365. Dhouailly, D. (1977) *Dermo-epidermal interactions during morphogenesis of cutaneous appendages in amniotes* Vol. 4, Karger, Basel.
366. Hay, E. D. (1979) Development of the vertebrate cornea. *Int Rev Cytol.* 63, 263-322.
367. Luger, T. A., and Schwarz, T. (1990) Evidence for an epidermal cytokine network. *J Invest Dermatol.* 95, 100S-104S.
368. Schroder, J. M. (1995) Cytokine networks in the skin. *J Invest Dermatol.* 105, 20S-24S.
369. Werner, S., and Smola, H. (2001) Paracrine regulation of keratinocyte proliferation and differentiation. *Trends Cell Biol.* 11, 143-146.
370. Doran, T. I., Vidrich, A., and Sun, T.-T. (1980) Intrinsic and extrinsic regulation of the differentiation of skin, corneal and esophageal epithelial cells. *Cell.* 22, 17-25.
371. Cunha, G. R., Bigsby, R. M., Cooke, P. S., and Sugimura, Y. (1985) Stromal-epithelial interactions in adult organs. *Cell Differ.* 17, 137-148.
372. Bohnert, A., Hornung, J., Mackenzie, I. C., and Fusenig, N. E. (1986) Epithelial-mesenchymal interactions control basement membrane production and differentiation in cultured and transplanted mouse keratinocytes. *Cell Tissue Res.* 244, 413-429.
373. Boukamp, P., Breitkreutz, D., Stark, H. J., and Fusenig, N. E. (1990) Mesenchyme-mediated and endogenous regulation of growth and differentiation of human skin keratinocytes derived from different body sites. *Differentiation.* 44, 150-161.
374. Coulomb, B., Lebreton, C., and Dubertret, L. (1989) Influence of human dermal fibroblasts on epidermalization. *J Invest Dermatol.* 92, 122-125.
375. Limat, A., Breitkreutz, D., Hunziker, T., Boillat, C., Wiesmann, U., Klein, E., Noser, F., and Fusenig, N. E. (1991) Restoration of the epidermal phenotype by follicular outer root sheath cells in recombinant culture with dermal fibroblasts. *Exp Cell Res.* 194, 218-227.
376. Angel, P., and Szabowski, A. (2002) Function of AP-1 target genes in mesenchymal-epithelial cross-talk in skin. *Biochem Pharmacol.* 64, 949-956.
377. Wilson, S. E., Chen, L., Mohan, R. R., Liang, Q., and Liu, J. (1999) Expression of HGF, KGF, EGF and receptor messenger RNAs following corneal epithelial wounding. *Exp Eye Res.* 68, 377-397.

378. Werner, S., Smola, H., Liao, X., Longaker, M. T., Krieg, T., Hofschneider, P. H., and Williams, L. T. (1994) The function of KGF in morphogenesis of epithelium and reepithelialization of wounds. *Science*. 266, 819-822.
379. Maas-Szabowski, N., Shimotoyodome, A., and Fusenig, N. E. (1999) Keratinocyte growth regulation in fibroblast cocultures via a double paracrine mechanism. *J Cell Sci*. 112, 1843-1853.
380. Chan, K. Y., and Haschke, R. H. (1983) Epithelial-stromal interactions: specific stimulation of corneal epithelial cell growth in vitro by a factor(s) from cultured stromal fibroblasts. *Exp Eye Res*. 36, 231-246.
381. Mackenzie, I. C., and Fusenig, N. E. (1983) Regeneration of organized epithelial structure. *J Invest Dermatol*. 81, 189s-194s.
382. Mackenzie, I., Rittman, G., Bohnert, A., Breitzkreutz, D., and Fusenig, N. E. (1993) Influence of connective tissues on the in vitro growth and differentiation of murine epidermis. *Epithelial Cell Biol*. 2, 107-119.
383. Smola, H., Thiekotter, G., and Fusenig, N. E. (1993) Mutual induction of growth factor gene expression by epidermal-dermal cell interaction. *J Cell Biol*. 122, 417-429.
384. Hancock, G. E., Kaplan, G., and Cohn, Z. A. (1988) Keratinocyte growth regulation by the products of immune cells. *J Exp Med*. 168, 1395-1402.
385. Maas-Szabowski, N., Stark, H. J., and Fusenig, N. E. (2000) Keratinocyte growth regulation in defined organotypic cultures through IL-1-induced keratinocyte growth factor expression in resting fibroblasts. *J Invest Dermatol*. 114, 1075-1084.
386. Robert, M., Noel-Hudson, M. S., Font, J., Aubery, M., and Wepierre, J. (1994) Influence of fibroblasts on epidermization by keratinocytes cultured on synthetic porous membrane (insert) at the air-liquid interface. *Cell Biol Toxicol*. 10, 361-365.
387. Saintigny, G., Bonnard, M., Damour, O., and Collombel, C. (1993) Reconstruction of epidermis on a chitosan cross-linked collagen-GAG lattice: effect of fibroblasts. *Acta Derm Venereol*. 73, 175-180.
388. El Ghalbzouri, A., Lamme, E., and Ponc, M. (2002) Crucial role of fibroblasts in regulating epidermal morphogenesis. *Cell Tissue Res*. 310, 189-199.
389. Zak, N. B., and Linsenmayer, T. F. (1985) Analysis of corneal development with monoclonal antibodies. II. Tissue autonomy in cornea-skin recombinants. *Developmental Biol*. 108, 455-464.
390. Ferraris, C., Chaloin-Dufau, C., and Dhouailly, D. (1994) Transdifferentiation of embryonic and postnatal rabbit corneal epithelial cells. *Differentiation*. 57, 89-96.

391. Ferraris, C., Chevalier, G., Favier, B., Jahoda, C. A., and Dhouailly, D. (2000) Adult corneal epithelium basal cells possess the capacity to activate epidermal, pilosebaceous and sweat gland genetic programs in response to embryonic dermal stimuli. *Development*. 127, 5487-5495.
392. Aboseif, S., El-Sakka, A., Young, P., and Cunha, G. (1999) Mesenchymal reprogramming of adult human epithelial differentiation. *Differentiation*. 65, 113-118.
393. Briggaman, R. A. (1982) Epidermal-dermal interactions in adult skin. *J Invest Dermatol*. 79, 21s-24s.
394. Reynolds, A. J., and Jahoda, C. A. (1992) Cultured dermal papilla cells induce follicle formation and hair growth by transdifferentiation of an adult epidermis. *Development*. 115, 587-593.
395. Cunha, G. R., Shannon, J. M., Neubauer, B. L., Sawyer, L. M., Fujii, H., Taguchi, O., and Chung, L. W. (1981) Mesenchymal-epithelial interactions in sex differentiation. *Hum Genet*. 58, 68-77.
396. Cunha, G. R., Lung, B., and Reese, B. (1980) Glandular epithelial induction by embryonic mesenchyme in adult bladder epithelium of BALB/c mice. *Invest Urol*. 17, 302-304.
397. Mackenzie, I. C., and Hill, M. W. (1984) Connective tissue influences on patterns of epithelial architecture and keratinization in skin and oral mucosa of the adult mouse. *Cell Tissue Res*. 235, 551-559.
398. Cunha, G. R., Fujii, H., Neubauer, B. L., Shannon, J. M., Sawyer, L., and Reese, B. A. (1983) Epithelial-mesenchymal interactions in prostatic development. I. morphological observations of prostatic induction by urogenital sinus mesenchyme in epithelium of the adult rodent urinary bladder. *J Cell Biol*. 96, 1662-1670.
399. Omstead, D. R., Baird, L. G., Christenson, L., Du Moulin, G., Tubo, R., Maxted, D. D., Davis, J., and Gentile, F. T. (1998) Voluntary guidance for the development of tissue-engineered products. *Tissue Engineering*. 4, 239-266.
400. Whitelock, R. B., Li, Y., Zhou, L. L., Sugar, J., and Yue, B. Y. (1997) Expression of transcription factors in keratoconus, a cornea-thinning disease. *Biochem Biophys Res Commun*. 235, 253-258.
401. Moustakas, A., Pardali, K., Gaal, A., and Heldin, C. H. (2002) Mechanisms of TGF-beta signaling in regulation of cell growth and differentiation. *Immunol Lett*. 82, 85-91.

402. Moustakas, A., and Kardassis, D. (1998) Regulation of the human p21/WAF1/Cip1 promoter in hepatic cells by functional interactions between Sp1 and Smad family members. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95, 6733-6738.
403. Koutsodontis, G., Tentes, I., Papakosta, P., Moustakas, A., and Kardassis, D. (2001) Sp1 plays a critical role in the transcriptional activation of the human cyclin-dependent kinase inhibitor p21(WAF1/Cip1) gene by the p53 tumor suppressor protein. *J Biol Chem.* 276, 29116-29125.
404. Wei, Q., Miskimins, W. K., and Miskimins, R. (2003) The Sp1 family of transcription factors is involved in p27(Kip1)-mediated activation of myelin basic protein gene expression. *Mol Cell Biol.* 23, 4035-4045.
405. Masson-Gadais, B., Fugère, C., Paquet, C., Leclerc, S., Lefort, N., Germain, L., and Guérin, S. L. The feeder layer-mediated extended lifetime of cultured human skin keratinocytes is associated with altered levels of the transcription factors Sp1 and Sp3. *J Cell Physiol.* 206, 831-842.
406. Majumdar, G., Harmon, A., Candelaria, R., Martinez-Hernandez, A., Raghov, R., and Solomon, S. S. (2003) O-glycosylation of Sp1 and transcriptional regulation of the calmodulin gene by insulin and glucagon. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 285, E584-591.
407. Dua, H. S., and Forrester, J. V. (1987) Clinical patterns of corneal epithelial wound healing. *Am J Ophthalmol.* 104, 481-489.
408. Petroutsos, G., Guimaraes, R., Giraud, J., and Pouliquen, Y. (1983) Antibiotics and corneal epithelial wound healing. *Arch Ophthalmol.* 101, 1775-1778.
409. Wiley, L., SundarRaj, N., Sun, T.-T., and Thoft, R. A. (1991) Regional heterogeneity in human cornea and limbal epithelia: An immunohistochemical evaluation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 32, 594-602.
410. Deschambeault, A., Carrier, P., Talbot, M., and Germain, L. Regional variation in the localization of limbal stem cells. en préparation.
411. Yang, A., Schweitzer, R., Sun, D., Kaghad, M., Walker, N., Bronson, R. T., Tabin, C., Sharpe, A., Caput, D., Crum, C., and McKeon, F. (1999) p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. *Nature.* 398, 714-718.
412. Haapasalmi, K., Zhang, K., Tonnesen, M., Olerud, J., Sheppard, D., Salo, T., Kramer, R., Clark, R. A., Uitto, V. J., and Larjava, H. (1996) Keratinocytes in human wounds express alpha v beta 6 integrin. *J Invest Dermatol.* 106, 42-48.

413. Clark, R. A. F., Ashcroft, G. S., Spencer, M.-J., Larjava, H., and Ferguson, M. W. J. (1996) Re-epithelialization of normal human excisional wounds is associated with a switch from $\alpha\text{v}\beta 5$ to $\alpha\text{v}\beta 6$. *Br J Dermatol.* 135, 46-51.
414. Agrez, M., Chen, A., Cone, R. I., Pytela, R., and Sheppard, D. (1994) The αv $\beta 6$ integrin promotes proliferation of colon carcinoma cells through a unique region of the $\beta 6$ cytoplasmic domain. *J Cell Biol.* 127, 547-556.
415. Rayner, S. A., Gallop, J. L., George, A. J., and Larkin, D. F. (1998) Distribution of integrins αv $\beta 5$, αv $\beta 3$ and αv in normal human cornea: possible implications in clinical and therapeutic adenoviral infection. *Eye.* 12, 273-277.
416. Geer, D. J., and Andreadis, S. T. (2003) A novel role of fibrin in epidermal healing: plasminogen-mediated migration and selective detachment of differentiated keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 121, 1210-1216.
417. Watanabe, M., Yano, W., Kondo, S., Hattori, Y., Yamada, N., Yanai, R., and Nishida, T. (2003) Up-regulation of urokinase-type plasminogen activator in corneal epithelial cells induced by wounding. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 44, 3332-3338.
418. Augustin, C., and Damour, O. (1995) Pharmacotoxicological applications of an equivalent dermis: three measurements of cytotoxicity. *Cell Biol Toxicol.* 11, 167-171.
419. Joyce, N. C., and Zhu, C. C. (2004) Human corneal endothelial cell proliferation: potential for use in regenerative medicine. *Cornea.* 23, S8-S19.
420. Bednarz, J., Rodokanaki-von Schrenck, A., and Engelmann, K. (1998) Different characteristics of endothelial cells from central and peripheral human cornea in primary culture and after subculture. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 34, 149-153.
421. Engelmann, K., Drexler, D., and Böhnke, M. (1999) Transplantation of adult human porcine corneal endothelial cells onto human recipients in vitro. Part I: Cell culturing and transplantation procedure. *Cornea.* 18, 199-206.
422. Geroski, D. H., Kies, J. C., and Edelhauser, H. F. (1984) The effects of ouabain on endothelial function in human and rabbit corneas. *Curr Eye Res.* 3, 331-338.
423. Grenier, G., Rémy-Zolghadri, M., Larouche, D., Gauvin, R., Baker, K., Bergeron, F., Dupuis, D., Langelier, E., Rancourt, D., Auger, F. A., and Germain, L. (2005) Tissue reorganization in response to mechanical load increases their functionality. *Tissue Eng.* 11, 90-100.

424. Szabowski, A., Maas-Szabowski, N., Andrecht, S., Kolbus, A., Schorpp-Kistner, M., Fusenig, N. E., and Angel, P. (2000) C-JUN and JunB antagonistically control cytokine-regulated mesenchymal-epidermal interaction in skin. *Cell*. 103, 745-755.
425. Germain, L., Giasson, C. J., Carrier, P., Guerin, S. L., Salesse, C., and Auger, F. A. (2004) Tissue Engineering of Cornea. In *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering* pp. 1534-1544, Marcel Dekker, New-York.
426. Nishida, K., Yamanishi, K., Yamada, K., Dota, A., Kawasaki, S., Quantock, A. J., and Kinoshita, S. (1999) Epithelial hyperproliferation and transglutaminase 1 gene expression in Stevens-Johnson syndrome conjunctiva. *Am J Pathol*. 154, 331-336.
427. Tseng, S. C. (1985) Staging of conjunctival squamous metaplasia by impression cytology. *Ophthalmology*. 92, 728-733.
428. Tseng, S. C., Hirst, L. W., Maumenee, A. E., Kenyon, K. R., Sun, T. T., and Green, W. R. (1984) Possible mechanisms for the loss of goblet cells in mucin-deficient disorders. *Ophthalmology*. 91, 545-552.
429. Kinoshita, S., Kiorpes, T. C., Friend, J., and Thoft, R. A. (1983) Goblet cell density in ocular surface disease. A better indicator than tear mucin. *Arch Ophthalmol*. 101, 1284-1287.
430. Wilson, S. E., Netto, M., and Ambrosio, R., Jr. (2003) Corneal cells: chatty in development, homeostasis, wound healing, and disease. *Am J Ophthalmol*. 136, 530-536.
431. Leask, A., Byrne, C., and Fuchs, E. (1991) Transcription factor AP2 and its role in epidermal-specific gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 88, 7948-7952.
432. Banks, E. B., Crish, J. F., and Eckert, R. L. (1999) Transcription factor Sp1 activates involucrin promoter activity in non-epithelial cell types. *Biochem J*. 337 (Pt 3), 507-512.
433. Lever, W. F. (1984) From "descriptive" to "dynamic" dermatopathology. *J Cutan Pathol*. 11, 467-470.
434. Grossman, R. M., Krueger, J., Yourish, D., Granelli-Piperno, A., Murphy, D. P., May, L. T., Kupper, T. S., Sehgal, P. B., and Gottlieb, A. B. (1989) Interleukin 6 is expressed in high levels in psoriatic skin and stimulates proliferation of cultured human keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 86, 6367-6371.
435. Elder, J. T. (1995) Cytokine and genetic regulation of psoriasis. *Adv Dermatol*. 10, 99-133; discussion 134.

436. Debets, R., Hegmans, J. P., Deleuran, M., Hooft, S., Benner, R., and Prens, E. P. (1996) Expression of cytokines and their receptors by psoriatic fibroblast. I. Altered IL-6 synthesis. *Cytokine*. 8, 70-79.
437. Turksen, K., Kupper, T., Degenstein, L., Williams, I., and Fuchs, E. (1992) Interleukin 6: insights to its function in skin by overexpression in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89, 5068-5072.
438. Arstikaitis, M. J. (1973) Ocular aftermath of Stevens-Johnson syndrome. *Arch Ophthalmol*. 90, 376-379.
439. Hochman, M. A., and Mayers, M. (1997) Stevens-Johnson syndrome, epidermolysis bullosa, staphylococcal scalded skin syndrome, and dermatitis herpetiformis. *Int Ophthalmol Clin*. 37, 77-92.
440. Saghizadeh, M., Chwa, M., Aoki, A., Lin, B., Pirouzmanesh, A., Brown, D. J., Ljubimov, A. V., and Kenney, M. C. (2001) Altered expression of growth factors and cytokines in keratoconus, bullous keratopathy and diabetic human corneas. *Exp Eye Res*. 73, 179-189.
441. Slifka, M. K., and Whitton, J. L. (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. 78, 74-80.
442. Saiag, P., Coulomb, B., Lebreton, C., Bell, E., and Dubertret, L. (1985) Psoriatic fibroblasts induce hyperproliferation of normal keratinocytes in a skin equivalent model in vitro. *Science*. 230, 669-672.
443. Andley, U. P., Lewis, R. M., Reddan, J. R., and Kochevar, I. E. (1994) Action spectrum for cytotoxicity in the UVA- and UVB-wavelength region in cultured lens epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 35, 367-373.

Annexe A : CV-Curriculum Vitae

Dans cette section, on retrouve la liste des autres publications, publiées ou en cours de publication, auxquels j'ai eu la chance de contribuer en parallèle à mes principaux projets. De plus, on y retrouve une liste des principales communications présentées au cours de mes études graduées lors de congrès nationaux et internationaux.

A.1 Publications

Chapitre de livre :

Germain, L, Giasson, CJ, **Carrier, P**, Guerin, SL, Salesse, C, and Auger, FA. Tissue Engineering of Cornea. In Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering pp. 1534-1544, Marcel Dekker, New-York, 2004

Article de revue:

Germain L, **Carrier P**, Auger F, Salesse C, Guérin SL. Can we produce a human corneal equivalent by tissue engineering? *Progress in Retinal and Eye Research*, 19(5) :497–527, 2000.

Manuscrit publié :

Talbot M, **Carrier P**, Giasson CJ, Deschambeault A, Guérin SL, Auger FA, Bazin R, Germain L, Autologous transplantation of rabbit limbal epithelia cultured on fibrin gels for ocular surface reconstruction, *Molecular Vision*, 12 :65-75, 2006.

Landreville S, Coulombe S, **Carrier P**, Gelb MH, Guérin SL, Salesse C. Expression of Phospholipases A2 and C in Human Corneal Epithelial Cells, *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 45(11) :3997-4003, 2004.

Béliveau A, Bérubé M, **Carrier P**, Mercier C, Guérin SL, Tumorigenicity of the mixed spindle-epithelioid SP6.5 and epithelioid TP17 uveal melanoma cell lines is differentially related to alpha5 beta1 integrin expression, *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 42(12) :3058-3065, 2001.

(cet article nous a permis de faire la page couverture de la revue *Investigative Ophthalmology and Visual Science*).

Manuscrit en préparation :

Deschambeault A, **Carrier P**, Talbot M, Germain L, Regional variation in the localization of limbal stem cells. Sera soumis prochainement.

A.2 Communications

On retrouve ici les congrès nationaux ou internationaux où mes travaux ont été présentés.

Carrier P, Proulx S, Deschambeault A, Talbot M, Guérin SL, Auger FA, Germain L. Optimization of human endothelial cell culture and donor stromal button for the reconstruction of a partial thickness posterior cornea, Association for research in vision and ophthalmology (ARVO) Meeting Abstracts, Floride, Mai 2006, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2006 45: E-Abstract 4389. Affiche.

Carrier P, Deschambeault A, Talbot M, Guérin SL, Auger FA, Germain L. Epithelial-mesenchymal interactions in reconstructed human cornea and skin: production of soluble factors by fibroblasts modulates epithelial cell differentiation and stratification, American Society of Cell Biology, Washington, Décembre 2004 . Affiche.

Carrier P, Deschambeault A, Talbot M, Guérin SL, Auger FA, Germain L. Epithelial-mesenchymal interactions in reconstructed human cornea and skin: production of soluble factors by fibroblasts modulates epithelial cell differentiation and stratification, Tissue Engineering Society International (TESI) Annual Meeting, Lausanne, Suisse, Octobre 2004. Affiche.

Carrier P, Deschambeault A, Talbot M, Guérin SL, Auger FA, Germain L. Fibroblasts modulate differentiation and stratification of epithelial cells on reconstructed human cornea through the production of soluble factors, Association for research in vision and ophthalmology (ARVO) Meeting Abstracts, Floride, Mai 2004, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2004 45: E-Abstract 1451. Affiche.

Carrier P, Talbot M, Deschambeault A, Grandbois E, Auger FA, Guérin SL, Germain L, Characterization of a new tissue-engineered wound healing model for human corneal reepithelialization, Tissue Engineering Society International (TESI) Annual Meeting, Orlando, Floride, Décembre 2003. Affiche.

Carrier P, Talbot M, Deschambeault A, Grandbois E, Auger FA, Guérin SL, Germain L, Characterization of a new tissue-engineered wound healing model for human corneal

Carrier P, Deschambeault A, Talbot M, Guérin SL, Auger FA, Germain L. Epithelial-mesenchymal interactions in reconstructed human cornea and skin: production of soluble factors by fibroblasts modulates epithelial cell differentiation and stratification, American Society of Cell Biology, Washington, Décembre 2004 . Affiche.

Carrier P, Deschambeault A, Talbot M, Guérin SL, Auger FA, Germain L. Epithelial-mesenchymal interactions in reconstructed human cornea and skin: production of soluble factors by fibroblasts modulates epithelial cell differentiation and stratification, Tissue Engineering Society International (TESI) Annual Meeting, Lausanne, Suisse, Octobre 2004. Affiche.

Carrier P, Deschambeault A, Talbot M, Guérin SL, Auger FA, Germain L. Fibroblasts modulate differentiation and stratification of epithelial cells on reconstructed human cornea through the production of soluble factors, Association for research in vision and ophthalmology (ARVO) Meeting Abstracts, Floride, Mai 2004, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2004 45: E-Abstract 1451. Affiche.

Carrier P, Talbot M, Deschambeault A, Grandbois E, Auger FA, Guérin SL, Germain L, Characterization of a new tissue-engineered wound healing model for human corneal reepithelialization, Tissue Engineering Society International (TESI) Annual Meeting, Orlando, Floride, Décembre 2003. Affiche.

Carrier P, Talbot M, Deschambeault A, Grandbois E, Auger FA, Guérin SL, Germain L, Characterization of a new tissue-engineered wound healing model for human corneal

reepithelialization, ARVO Meeting Abstracts, Floride, Mai 2003, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2003 44: E-Abstract 3825. Affiche.

Carrier P, Deschambeault A, Talbot M, Guérin SL, Auger FA, Germain L, Expression of extracellular matrix components In reconstructed human cornea produced by tissue engineering, ARVO Meeting Abstracts, Floride, Mai 2002, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2002 43: E-Abstract 4166. Affiche.

Gaudreault M, **Carrier P**, Leclerc S, Giasson M, Germain L, Guérin SL, Differential expression of the transcription factors Sp1/Sp3 dictates the stratification properties of primary cultured human corneal epithelial cells on tissue-engineered corneal substitutes, ARVO Meeting Abstracts, Floride, Mai 2002, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2002 43: E-Abstract 1648. Affiche.

Carrier P, Deschambeault A, Auger FA, Guérin SL, Germain L, Influence of the origin of keratocytes and epithelial cells on reconstructed human cornea produced by tissue engineering, ARVO Meeting Abstracts, Floride, Mai 2001, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2001 XX: E-Abstract 1147. Oral.

Germain, L, Rochon MH, Larouche D, Beauparlant A, **Carrier P**, Laplante A, Auger FA, Moulin V, Guérin SL, Reconstructed human skin and cornea produced by the auto-assembly approach : *in vitro* and *in vivo* applications. 5th annual Hilton Head Workshop, Hilton Head Island, Février 2001, Oral.

Carrier P, Germain L, Giasson M, Grandbois E, Auger FA, Guerin, SL, A new method for *in vitro* production of human reconstructed cornea by tissue engineering. MRC/BioContact 2000/Prix à la relève, Québec, Octobre 2000, Affiche. (J'ai été choisi parmi les dix finalistes au Canada pour participer à ce symposium)

Germain, L, Beauparlant A, **Carrier P**, Fradette J, Larouche D, Skin and corneal cells *in situ* and in human tissue reconstructed *in vitro* by tissue engineering. International congress on differentiation molecular and cell biology, Australie, Septembre 2000, Oral.

Carrier P, Germain L, Giasson M, Grandbois E, Auger FA, Guerin, SL, A new method for *in vitro* production of human reconstructed cornea by tissue engineering. MRC/Connections 2000/Next Generation Award, Toronto, Mai 2000, Affiche. (J'ai été choisi parmi les dix finalistes au Canada pour participer à ce symposium).

Carrier P, Giasson M, Grandbois E, Auger FA, Guerin, SL, Germain L, A new method for *in vitro* production of human reconstructed cornea by tissue engineering. ARVO Meeting Abstracts, Mai 1999, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 1999 40: E-Abstract S329. Affiche.