



Traitement des pathologies cornéennes par thérapie cellulaire et bioingénierie tissulaire

Djida Ghoubay-Benalloua

► To cite this version:

Djida Ghoubay-Benalloua. Traitement des pathologies cornéennes par thérapie cellulaire et bio-ingénierie tissulaire. Biologie cellulaire. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2017. Français. NNT : 2017PA066445 . tel-01949307

HAL Id: tel-01949307

<https://theses.hal.science/tel-01949307>

Submitted on 10 Dec 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Pierre et Marie Curie

Ecole doctorale : Cerveau, Cognition, Comportement

Institut de la Vision

Equipe : Molécules de guidage axonal

Traitement des pathologies cornéennes par thérapie cellulaire et bioingénierie tissulaire

Djida Ghoubay-Benallaoua

Thèse de Doctorat

Dirigée par le Professeur Vincent Borderie

Présentée et soutenue publiquement le 08 Décembre 2017

Devant un jury composé de :

Professeur Philippe Bierling

Rapporteur

Professeur François Majo

Rapporteur

Docteur Marie-Claire Schanne-Klein

Examinatrice

Docteur Olivier Goureau

Examineur

Professeur Vincent Borderie

Directeur de thèse

Remerciements

Je remercie tout particulièrement le Professeur Vincent Borderie d'avoir dirigé ma thèse avec beaucoup d'efforts et de patience. Ses qualités pédagogiques remarquables m'ont permis de profiter de ses connaissances et ont contribué à l'avancement de mon travail en ne négligeant ni ses conseils avisés et ni ses critiques constructives. Merci de m'avoir encouragé à faire cette magnifique aventure qu'est la thèse. Merci de n'avoir jamais cessé de croire en moi et à l'aboutissement de mes travaux.

Je tiens à exprimer mes remerciements aux membres du jury qui ont accepté d'évaluer et d'examiner mon travail de thèse: Pr Philippe Bierling et Dr François Majo, mes rapporteurs ; mon examinatrice Dr Marie-Claire Schanne-Clain et mon examinateur Dr Olivier Goureau. Merci à tous pour l'intérêt que vous avez bien voulu porter à ces travaux.

J'exprime toute ma gratitude au Dr Alain Chédotal de nous avoir accueillie dans son équipe. Merci pour tous tes précieux conseils.

J'exprime toute ma gratitude à Madame Christine Chaumeil, merci de m'avoir accueillie dans votre laboratoire pour mon stage M1, c'est à partir de là que tout a commencé. Mention spéciale pour le Docteur Pablo Goldschmidt, vous m'avez appris à travailler et être indépendante, vous avez su révéler ma créativité et vous m'avez transmis votre passion de la recherche translationnelle. Je remercie également tout les membres du laboratoire de biologie médicale du CHNO des 15/20. Vous avez tous contribué de près ou de loin à ma formation : Cathy Saint Jean, Isabelle Thomazic, Josette Rault, Claire Poilane, Didier Gleize ...

Je voudrai remercier mes collègues de l'Etablissement Français du Sang à Saint Antoine, j'ai passé 3 belles années avec vous, Aline Piquemal et Céline de Sousa et je suis très contente de toujours continuer à vous voir.

Je remercie également les diverses personnes avec qui j'ai eu l'occasion de collaborer : Le laboratoire de chimie de la matière condensée de Paris: Gervaise Mosser et Aurélien Tidu ; l'équipe Onde et Image au sein de L'institut Langevin : Thu Mai Nguyen, Romain Bocheux et Olivier Thouvenin ; le Laboratoire d'Optique et Biosciences à polytechnique : Marie-Claire Schanne-Klein, Gaël Latour et Margaux Schmeltz ; Kristina Irsch de The Wilmer Eye Institute, The Johns Hopkins University School of Medicine.

Merci à Kate Grieve, ma collègue que j'apprécie énormément, et qui a apporté beaucoup à notre équipe. J'apprécie autant nos échanges professionnels que personnels.

Un grand Merci à Marie Borderie, qui était là au bon moment pour m'aider pour l'analyse des souris. Je ne saurais comment te remercier pour tes efforts pour le comptage cellulaire.

Merci à mon stagiaire, Raphaël Martos, pour son efficacité et son investissement dans le travail.

J'aimerais remercier toutes les personnes avec qui j'ai partagé de merveilleux moments au sein de l'institut et qui, un jour ou l'autre, m'ont forcément aidé ou dépanné pour une technique ou un produit : l'ensemble de l'équipe S1, l'équipe S2 et l'équipe exploratoire. Merci à mes amis Céline, Amélie, Sacha, Oriane et Anaïs.

Merci à Karima Kessal et à Luisa Riancho, pour leurs aides dans mes manips de cytométrie en flux et pour nos échanges enrichissants.

Je tiens aussi à remercier toutes les personnes travaillant au sein des plateformes de l'institut de la visions : l'Animalerie (Manu, Julie, Quenol...) ; La Microscopie (Stéphane et David) ; l'Histologie (Marie-Laure) ; La Biochimie (Yvrick) ; Le service informatique (Benjamin et Mayooraan) ; Le service achat (Vera, Nathalie et Cédric). Merci à tous pour votre implication et votre aide.

Enfin, je ne peux conclure ces remerciements sans une énorme pensée pour mes parents, mes frères et sœurs, mes beaux frères et mes belles sœurs, mes neveux et nièces et toutes ma belle famille. Merci à tous pour vos encouragements. Un immense merci à mon Mari, pour m'avoir encouragée, soutenu, réconfortée et surtout supportée.

Je termine par une petite caresse pour mes enfants, Farès et Zahra.

Liste des abréviations

ABCB5	ATP-binding cassette, sub-family B, member 5
ABCG2	ATP Binding Cassette Subfamily G member 2
ALDH1A1	Aldéhydes déshydrogénases 1A1
ALDH1A3	Aldéhydes déshydrogénases 1A3
BDNF	Brain-Derived Neurotrophic Factor
CAT	Cellule Amplificatrice Transitoire
CHST6	Carbohydrate Sulfotransferase 6
CK	Cytokératines
CSM	Cellules souches mésenchymateuses
CSN	Cellules souches neurales
DCSL	Déficiencia en cellules souches limbique
DMEK	Descemet Membrane Endothelial keratoplasty
DSAEK	Descemet Stripping Endothelial keratoplasty
ECM	Extracellular matrix
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl) carbodiimide
EDU	5-Ethynyl-2'-DeoxyUridine
EGF	Epithelial Growth Factor
EPR	L'épithélium pigmentaire de la rétine
FFOCM	Full Field Optical Coherence Microscopy
FGF	Fibroblaste growth factor
HES	Hematoxylin and eosine staining
IL-10	Interleukin 10
IL-6	Interleukin 6
IP	Iodure de propidium
iPS	Induced pluripotent stem cells
IVCM	In vivo confocal microscopy
Kpros	Kératoprothèses
KPS	Kératite Ponctuée Superficielle
LAF	Lampe à fente
LEC	Limbal epithelial crypt
LSC	Limbal stem cells
MMPs	Métalloprotéases
NHS	N-hydroxysuccinimide
OCT	Tomographie a cohérence optique
p63	Protéine 63
PHEMA	Poly 2-hydroxyméthyl méthacrylate
SHG	Second harmonic generation
Shh	Sonic hedgehog
SP	Side Population
SSC	Stromal stem cells
TGFβ	Transforming Growth Factor beta
VEGFR-3	Vascular endothelial growth factor receptor-3

Table des Matières

Table des Matières

1. Introduction	1
2. Généralités	3
2.1. L'œil	3
2.1.1. Anatomie générale de l'œil	3
2.2. La cornée	4
2.2.1. Anatomie, histologie et fonction de la cornée	4
2.2.2. Les couches de la cornée	6
2.2.2.1. L'épithélium cornéen	6
2.2.2.2. La couche de Bowman	9
2.2.2.3. Le stroma lamellaire	9
2.2.2.4. La couche de Dua	11
2.2.2.5. La membrane de Descemet	11
2.2.2.6. L'endothélium	11
2.2.3. Innervation de la cornée	13
2.2.4. Embryogenèse de la cornée	15
2.3. Les cellules souches de la cornée	17
2.3.1. Généralités sur les cellules souches	17
2.3.2. Les différents types de cellules souches	19
2.3.3. La niche des cellules souches	21
2.3.3.1. Qu'est-ce qu'une niche ?	21
2.3.3.2. La niche des cellules souches cornéennes	22
2.3.4. Les cellules souches épithéliales limbiques (LSC)	23
2.3.5. Les cellules souches stromales limbiques (SSC)	25
2.4. Renouveaulement de l'épithélium cornéen	26
2.5. Renouveaulement du stroma cornéen	28
2.6. Troubles visuels liés à la cornée	30
2.6.1. Les ulcères cornéens	31
2.6.2. L'œdème cornéen	31
2.6.3. Déficience en cellules souches limbique (DCSL)	31
2.6.4. Les dystrophies cornéennes	31
2.6.5. Le kératocône	32

2.7. Traitement des pathologies cornéennes.....	32
2.7.1. Greffe de cornée	32
2.7.2. Thérapie cellulaire.....	33
2.7.2.1. Utilisation des cellules souches épithéliales limbiques.....	35
2.7.2.2. Utilisation d'autres sources de cellules	36
2.7.2.3. Utilisation des cellules souches stromales limbiques.....	37
2.7.3. Kératoprothèses (KPros)	39
2.7.4. Cornées décellularisées	40
2.7.5. Cornées artificielles.....	42
3. Objectifs de la thèse.....	43.
4. Résultats	45
4.1. Article 1 : Caractérisation de la niche limbique.....	45
4.2. Article 2 : Culture des cellules souches limbiques dans un milieu exempt de produits et cellules d'origine animale.....	67
4.3. Partie 3 : Utilisation des cellules souches limbiques stromales (SSC) en Thérapie cellulaire.....	92
4.3.1. Protocole Expérimental	94
4.3.2. Développement du modèle animal	97
4.3.2.1. Animaux utilisés.....	97
4.3.2.2. Examen des souris après traitement	98
4.3.2.3. Caractérisation du modèle animal après application d'azote pendant 5 secondes.....	100
4.3.3. Effet des SSC sur la lésion provoquée par l'azote	
4.3.3.1. Culture des SSC	111
4.3.3.2. Injection des SSC	111
4.3.3.3. Prolifération des SSC injectées	113
4.3.3.4. Effet des SSC injectées sur l'opacité cornéenne.....	115
4.3.3.5. Epaisseur stromale et densité kératocytaire..	117
4.3.3.6. Effet des SSC sur l'organisation de la matrice extracellulaire	120

4.3.4.	Discussion	121
4.3.5.	Conclusion.....	125
4.4.	Article 4	126
4.4.1.	Synthèse d'une cornée artificielle à partir de collagène I et de cellules souches cornéennes.....	126
4.4.2.	Encapsulation des kératocytes au sein des matrices de collagène : Résultats préliminaires.....	151
5.	Conclusion générale	156
6.	Références bibliographiques	159

1. Introduction

La cornée, la partie transparente du globe oculaire, a pour rôle de transmettre la lumière et de faire converger les rayons lumineux sur la rétine. Afin de pouvoir assurer cette fonction, la cornée doit rester transparente. Les pathologies cornéennes provoquant son opacification représentent la deuxième cause de cécité mondiale après la cataracte. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, 10 millions de personnes dans le monde souffrent d'opacités cornéennes. La greffe de cornée représente le traitement de choix pour ces atteintes, mais malheureusement 1% seulement des patients bénéficient d'une greffe de cornée par manque de donneurs.

Afin de pallier au manque de dons de cornées, des thérapies alternatives ont été développées telle que l'utilisation de kératoprothèses faites de matériaux rigides ou constituées en partie de matériaux biologiques. Cependant leur utilisation se heurte aux problèmes de bio-intégration, aux risques d'infections et aux nombreux problèmes de rejets et dislocations. Grâce à une meilleure connaissance du renouvellement de l'épithélium cornéen, des thérapies plus innovantes utilisant des cellules souches limbiques cultivées sur des membranes amniotiques ou sur un gel de fibrine afin de restituer un épithélium cornéen sain ainsi que des cellules souches du stroma, sont en voie de développement.

La découverte récente des cellules souches du stroma cornéen ouvre la voie à une nouvelle approche thérapeutique visant à régénérer le stroma cornéen avant la constitution de lésions irréversibles. Ces cellules souches pourraient stopper l'évolution de la maladie à un stade précoce en régénérant la matrice extracellulaire. Pour les cas évolués, ces mêmes cellules souches pourraient être utilisées pour synthétiser au laboratoire des cornées artificielles soit en apportant un substrat colonisable par ces cellules soit en utilisant les cellules elles même pour synthétiser la matrice extracellulaire. Ces cornées artificielles de production aisée (pas de limitation liée à la disponibilité des donneurs) et de qualité optimisée et constante pourraient remplacer les greffons cornéens humains dans l'avenir.

La première question à laquelle nous allons essayer de répondre est : **Quelles sont les caractéristiques de la niche des cellules souches cornéennes limbiques ?** La réponse à cette question est très importante en thérapie cellulaire et tissulaire. Cela nous permettra dans un premier temps, de localiser dans la partie limbique les régions riches en cellules souches. Dans un deuxième temps, l'étude des caractéristiques de la niche limbique permettra de

Introduction

reproduire par bioingénierie tissulaire un limbe artificiel greffable permettant un apport de cellules souche important avec leur microenvironnement nécessaire à leur maintien à long terme.

Les cellules souches de la cornée peuvent-elles être cultivées sur des milieux exempts de produits d'origine animale ? C'est la deuxième question à laquelle nous allons répondre au cours de ce travail de thèse. L'utilisation des cellules souches en thérapie cellulaire, avec un haut niveau de sécurité pour le patient, implique leur culture dans des milieux ne contenant pas de produits d'origine animale ni l'utilisation de cellules nourricières murines. Ceci en vue d'un usage clinique tout en respectant les bonnes pratiques de fabrications.

Nous avons aussi cherché à savoir si **les cellules souches du stroma cornéen étaient capables de régénérer le stroma après une lésion cornéenne profonde** ? Nous avons utilisé ces cellules pour la régénération stromale dans des souris ayant subi une lésion stromale profonde.

En collaboration avec le laboratoire de Chimie et de la Matière Condensée de l'Université Pierre & Marie Curie qui modélise des cornées artificielles en utilisant les propriétés physico-chimiques du collagène I, nous avons regardé **si les cellules épithéliales cornéennes et les cellules souches stromales pouvaient proliférer et repeupler ces matrices de collagène**. Les matrices ainsi colonisées seront utilisées en remplacement des cornées de donneurs.

Avant d'exposer les résultats que j'ai obtenus, je présente ci-après une revue bibliographique sur la cornée, son anatomie, sa fonction, son embryogenèse et les cellules responsables de son homéostasie. J'aborderai aussi les troubles visuels affectant la cornée et qui sont responsables de la diminution de sa transparence. Je terminerai cette première partie par les moyens utilisés et les efforts de développements pour lutter contre ses troubles visuels. Cette revue bibliographique regroupe les connaissances que j'ai acquises au cours de la préparation de ma thèse et qui étaient requises pour émettre les hypothèses de travail et l'analyse des résultats.

Généralités

2. Généralités

3. L'œil

3.1.1. Anatomie générale de l'œil

L'œil ou globe oculaire, est l'organe récepteur du système visuel. C'est par le sens de la vue qu'on perçoit les couleurs, les formes et les mouvements. C'est une sphère d'environ 25 mm de diamètre protégé par les paupières. L'œil fonctionne comme un appareil photo. La pupille au centre de l'œil joue le rôle de diaphragme et le cristallin permet de faire une mise au point pour passer de la vision de loin à la vision de près. L'œil capte la lumière et la transforme en signal électrique. La lumière captée traverse différentes structures (**Figure 1**) :

La couche externe de l'œil ou tunique fibreuse, est composée de la sclère « le blanc de l'œil » et de la cornée qui est transparente. Celle-ci constitue la barrière entre l'environnement extérieur et l'intérieur de l'œil, et réfracte les rayons lumineux pour qu'ils convergent sur la région centrale de la rétine, la macula.

La couche intermédiaire, l'uvée, tunique vasculaire, est constituée de la choroïde, membrane riche en vaisseaux sanguins, du corps ciliaire et de l'iris. Derrière la cornée se trouve l'iris qui contient des cellules pigmentaires qui donnent la couleur des yeux et délimite un orifice, la pupille, par lequel passe la lumière, et dont le diamètre varie de manière à réguler l'intensité de la lumière entrante. Après l'iris on retrouve le cristallin, correspondant à une grosse lentille qui fait converger les rayons lumineux vers le fond de l'œil.

La rétine correspond à la couche interne de l'œil. Epaisse d'un demi-millimètre chez l'homme, elle intègre le signal lumineux et le transforme en signal électrique nerveux. Elle est composée d'une couche pigmentaire externe, l'épithélium pigmentaire de la rétine (EPR) et d'un neuroépithélium interne. La partie externe du neuroépithélium est composée de cellules visuelles appelées photorécepteurs, dont les bâtonnets sont en relation avec les cellules de l'épithélium pigmentaire. Les bâtonnets sont situés en périphérie de la rétine et sont responsables de la vision périphérique. Les cônes se localisent au centre de la rétine et interviennent dans la vision des couleurs et des détails en pleine lumière.

L'humeur aqueuse, liquide acellulaire et transparent, remplit l'espace entre la cornée et le cristallin. Le vitré, situé dans l'espace entre le cristallin et la rétine, est une substance gélatineuse et transparente. Le rôle de l'humeur aqueuse et du vitré est de maintenir la pression intraoculaire.

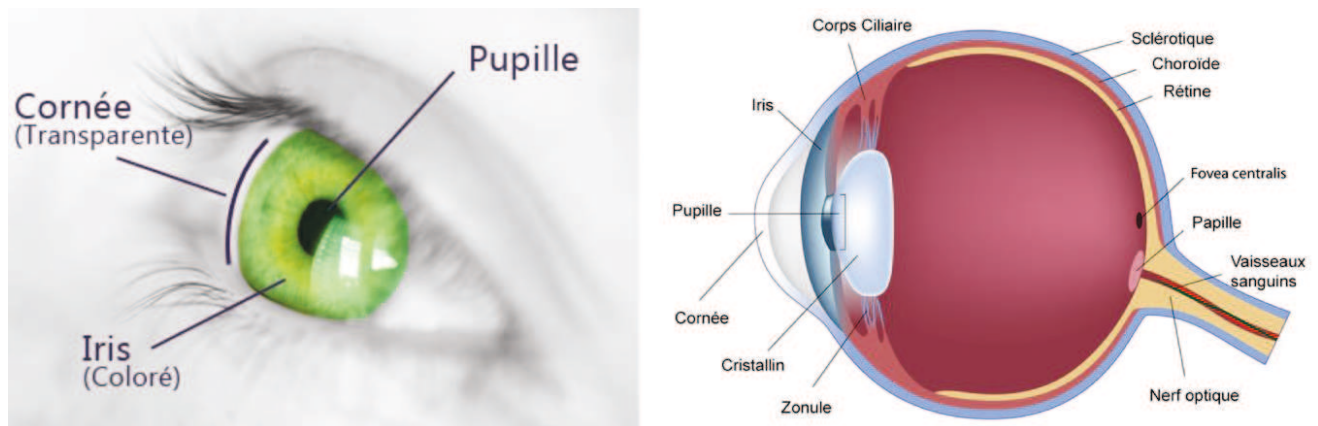


Figure 1. Schéma anatomique d'un œil humain

4. La cornée

4.1.1. Anatomie, histologie et fonction de la cornée

La cornée correspond à la partie la plus antérieure de l'œil. Transparente et avasculaire, elle assure les 2/3 du pouvoir de réfraction des structures oculaires (le 1/3 restant étant dévolu au cristallin). La cornée humaine a un diamètre moyen d'environ 11,5 mm, un rayon de courbure de 8 mm, son épaisseur varie de 0,5 mm au centre à 0,7 mm en périphérie. La région centrale de la cornée présente un rayon de courbure antérieur compris entre 7,5 mm (ce qui correspond à un pouvoir réfractif cornéen total de 45 D) et 8,4 mm (40 D) et un rayon de courbure postérieur compris entre 6,2 mm et 6,6 mm. La face antérieure, ovoïde à grand axe horizontal, est en contact direct avec l'air et est recouverte d'un film aqueux, le film lacrymal. Celui-ci comporte 3 couches, lipidique, aqueuse et mucinique. La face postérieure, concave et circulaire, se trouve directement en contact avec l'humeur aqueuse (**Figure 2**).

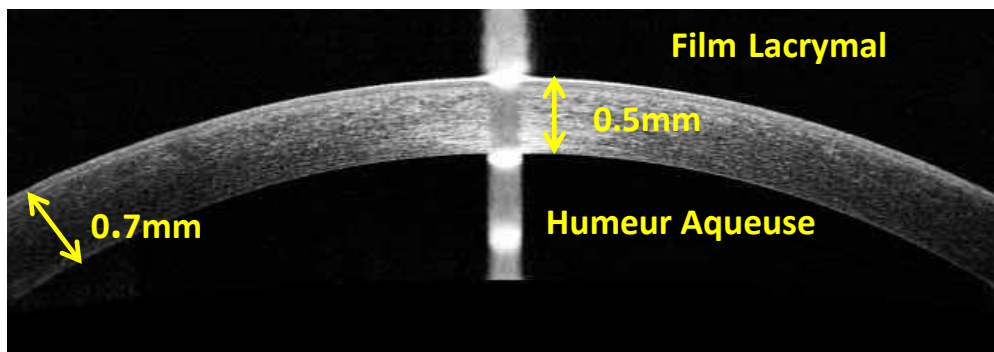


Figure 2. Image en Tomographie à cohérence optique (OCT) d'une cornée humaine normale. Il s'agit d'une technique d'imagerie utilisant un balayage infrarouge de l'œil, elle est non invasive, sans contact et donc non douloureuse pour le patient.

La cornée est avasculaire, ceci est expliqué par Dana et al., par la présence en grande quantité de VEGFR-3 (Vascular endothelial growth factor receptor-3), la protéine responsable de neutraliser la formation des vaisseaux sanguin (Partanen et al., 2000). Le blocage d'expression de VEGFR-3 dans des yeux de souris, provoque la croissance massive de vaisseaux sanguins qui conduit à une opacité cornéenne (Cursiefen et al., 2006).

La cornée est composée de 4 couches : l'épithélium, la couche de Bowman, le stroma lamellaire et l'endothélium, et de 2 membranes basales : la membrane basale épithéliale et la membrane de Descemet (**Figure 3**). Récemment la partie la plus postérieure du stroma lamellaire a été individualisée comme une entité clivable par injection d'air (couche de Dua) (Dua et al. 2013).

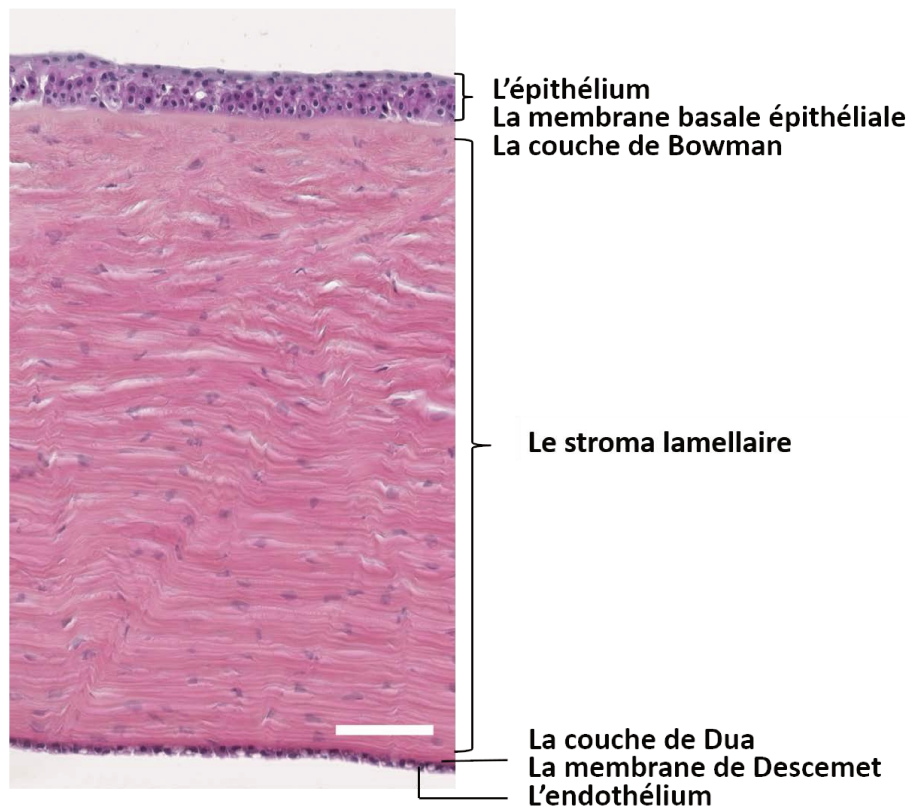


Figure 3. Coupe histologique transversale d'une cornée humaine. Coupe paraffine de 4 µm d'une cornée humaine colorée à l'hématoxyline et éosine (HES). Barre d'échelle : 100 µm.

4.1.2. Les couches de la cornée

4.1.2.1. L'épithélium cornéen

L'épithélium cornéen est la couche la plus externe qui protège la surface cornéenne. Il est dit malpighien et non kératinisé, pavimenteux et stratifié, composé de 5 à 7 assises de cellules empilées (**Figure 4**). Les cellules épithéliales sont jointives afin de former une barrière contre les fluides et empêcher la pénétration d'agents pathogènes. Son épaisseur est d'environ 50 µm. L'épithélium cornéen est organisé en trois couches de cellules, les cellules superficielles, plates et hexagonales, les cellules intermédiaires (wing cells), moins aplaties et les cellules les plus profondes, les cellules basales, étroites et hautes, les moins différenciées et disposées en monocouche. Les cellules basales de l'épithélium secrètent une membrane basale dont l'épaisseur est proche de 50 nm, qui est composée principalement de collagène de type IV et qui permet l'ancrage de l'épithélium à la couche de Bowman. Les cellules épithéliales expriment des cytokératines (CK) qui sont des

filaments intermédiaires de leur cytosquelette jouant un rôle dans l'adhésion intercellulaire et dans l'intégrité de l'épithélium (Steinert et al., 1988). Les CK sont caractéristiques des épithéliums et s'accrochent sur les plaques des desmosomes et des hémidesmosomes. Elles se divisent en deux groupes : le groupe I correspondant aux CK acides (CK9 à CK20) et le groupe II aux CK basiques (CK1 à CK8) (Moll et al., 1982). Les CK s'organisent en paires, une CK acide s'associe avec une CK basique (Paladini et al., 1999). Les paires de CK exprimées varient en fonction de la position des cellules dans l'épithélium, le type d'épithélium et de l'organe où elles se trouvent. Dans l'épithélium cornéen, la paire *CK3/CK12* est retrouvée dans les couches épithéliales de la cornée centrale constituant un marqueur histochimique de la différenciation des cellules épithéliales (Tseng et al., 1984 ; Espana et al., 2004).

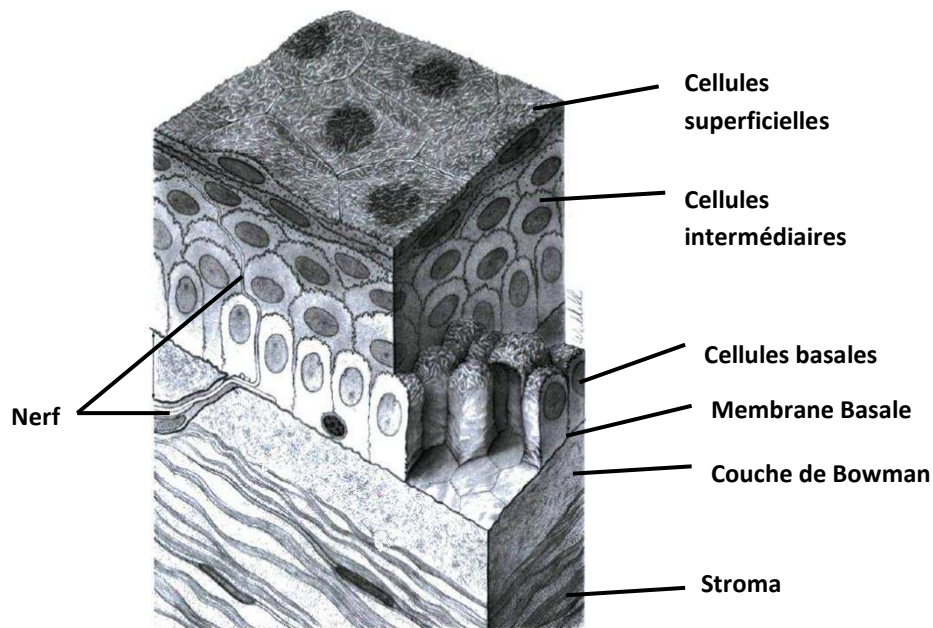


Figure 4. Organisation de l'épithélium cornéen. (Uwamaliya Jeanne d'Arc, 2009)

En périphérie de la cornée, on trouve le limbe qui est la jonction entre la cornée et la conjonctive et est caractérisé par l'absence de la couche de Bowman (**Figure 5A et 5C**). L'épithélium limbique présente une épaisseur et une densité cellulaires plus importantes que l'épithélium cornéen adjacent. Sa couche basale est particulièrement dense et peu différenciée avec un nombre de couches cellulaires trois fois plus important qu'au niveau cornéen (**Figure 5A**). Cette couche est également irrégulière et forme des cryptes limbiques situées entre les palissades de Vogt (formations stromales limbiques en forme de crêtes radiaires perpendiculaires à la circonférence limbique et parallèles entre elles). Ces structures sont considérées comme la niche des cellules souches limbiques (**Figure 5B**) (Rama et al., 2010 ; Levis et al., 2013 ; Eberwein and Reinhard, 2014 ; Grieve et al., 2015). A la différence des cellules épithéliales, les cellules basales limbiques n'expriment pas la paire *CK3/CK12* (Schermer et al., 1986). Leur identification se fait par l'expression de marqueurs de cellules souches tels que l'ABCG2 (ATP Binding Cassette Subfamily G Member 2), le facteur de transcription p63 α , ABCB5 (ATP-binding cassette, sub-family B, member 5) (Bruce et al. 2014) et leurs capacités à former des colonies en culture (Pellegrini et al., 1997 ; Ghoubay et al., 2013).

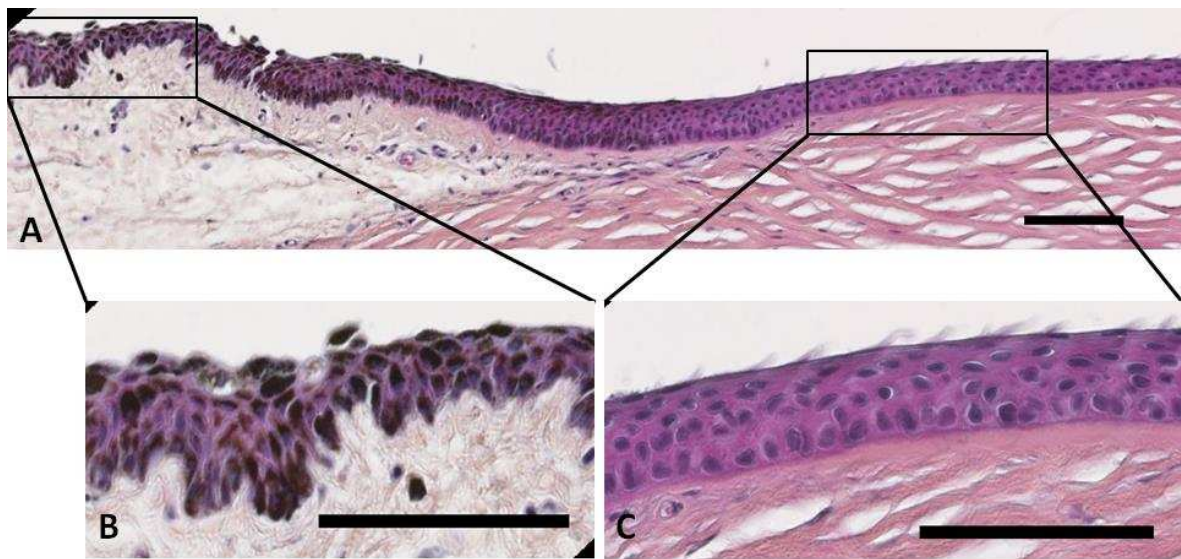


Figure 5. Coupe histologique représentant la partie limbique de la cornée.

A) Coloration HES d'une coupe de cornée.

B) Irrégularité dans l'organisation de la partie limbique correspondant aux cryptes limbiques séparées par les palissades de Vogt, niche des cellules souches limbiques épithéliales.

C) Jonction entre la cornée centrale et le limbe montré par la disparition de la couche de Bowman. Barre d'échelle : 100 μ m

4.1.2.2. La couche de Bowman

Cette couche est acellulaire composée de fibrilles de collagènes entrelacées et de protéoglycanes sur lesquels repose l'épithélium et sa membrane basale. Son épaisseur est de 8 à 16 μm . Une fois altérée cette couche ne se régénère pas, la guérison des lésions qui l'affecte peut entraîner une cicatrisation opaque qui nuit à la transparence de la cornée.

4.1.2.3. Le stroma lamellaire

La couche principale de la cornée est le stroma lamellaire qui représente 90% de l'épaisseur de la cornée (500 μm environ). Le stroma est composé de kératocytes et d'une matrice extracellulaire faite de collagène essentiellement de type I, V et VI et de protéoglycanes.

Le collagène forme des fibrilles d'un diamètre allant de 25 à 35 nm qui s'organisent en lamelles (Daxer et al. 1998). Le stroma cornéen est composé de l'empilement de 200 à 300 lamelles de collagènes (Bergmanson et al., 2005). Ces lamelles de tissu conjonctif ont une épaisseur d'environ 2 μm et d'une largeur de 9 à 260 μm . Elles sont disposées parallèlement à la surface de la cornée en inter-digitations de faisceaux dans le stroma antérieur et en plans superposés perpendiculaires entre eux dans le stroma postérieur (**Figure 6**). Les fibrilles sont composées de collagène organisé en hétérofibrilles de collagène I et V (périodicité de 64-67 nm, diamètre $25,5 \pm 1,5$ nm) reliées par des filaments de collagène VI (périodicité 100 nm), avec un peu de collagène XII, III et IV, et d'une substance fondamentale comportant des protéoglycanes qui se fixent aux fibrilles sur des sites spécifiques (Meek et al., 1986), leur rôle est le maintien d'un espace interfibrillaire fixe et participent ainsi à la transparence de la cornée. Les principaux protéoglycanes de la cornée sont : la décorine qui comporte du dermatan sulfate et de la chondroïtine sulfate, le lumican, le kératocan et le mimecan qui comportent du kératan sulfate et la fibromoduline (Meek et al., 2015).

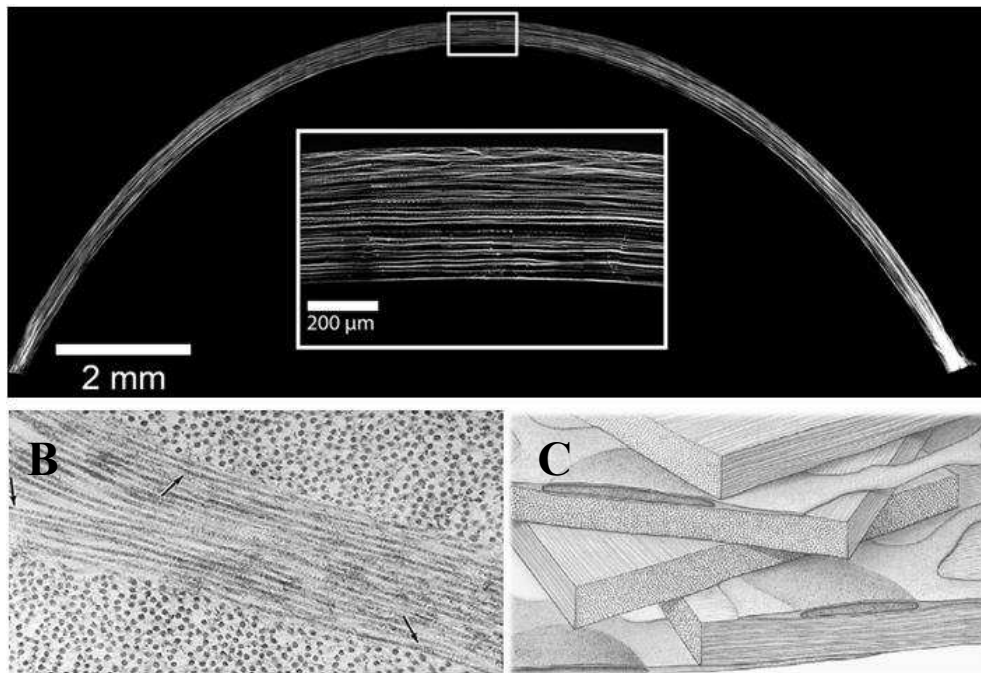


Figure 6. Organisation des fibrilles de collagène au sein du stroma cornéen. (Thomasy et al., 2014).

A) Image HRMac (high-resolution macroscopy) d'une coupe vibratome de cornée de lapin. Une organisation parallèle des fibres de collagène est observée et constitue l'organisation dominante de la cornée.

B) Microscopie électronique d'un stroma cornéen **C)** Schéma représentant l'organisation des lamelles de collagène au sein du stroma. Les fibrilles de collagène s'arrangent en lamelles qui ont une organisation particulière dite en contreplaqué (au sein d'une lamelle les fibrilles sont quasi parallèles et les fibrilles de la lamelle adjacente vont dans une direction perpendiculaire).

Les kératocytes retrouvés dans le stroma dérivent de la crête neurale (Lwigale et al., 2005 ; Creuzet et al., 2005a ; Creuzet et al., 2005b ; Davies 2010 ; Zhang, 2015), et assurent le renouvellement de la matrice extracellulaire de la cornée (Muller et al., 1995). Des macrophages et des cellules dendritiques sont aussi retrouvés dans le stroma (Hassell and Birk, 2010).

La transparence de la cornée est souvent attribuée à l'agencement des fibrilles de collagène en « réseau régulier permettant la destruction de la lumière diffusée par interférence mutuelle » (Maurice, 1957), mais qu'en est-il de la présence des kératocytes ?

Les kératocytes représentent environ 15% du volume total du stroma cornéen (Huang et Meek, 1999). Maurice a proposé que la transparence soit en partie liée à la dispersion des kératocytes au sein du stroma et à leur faible volume. L'équipe de Jester a quant à elle postulé que les cellules stromales contiendraient des molécules cytoplasmiques appelées cristallines cornéennes, protéines absorbant les UV retrouvées dans le cristallin (Benedek et al., 1983 ; Bettelheim et al., 1985). Ces protéines modifient l'indice de réfraction du cytoplasme cellulaire afin d'égaliser l'indice de réfraction de la matrice extracellulaire et empêcher ainsi la diffusion de la lumière. Parmi ces cristallines cornéennes on retrouve les aldéhydes déshydrogénases 1A1 (Jester et al., 1999) et 3A1 (Silverman et al., 1981 ; Chen et al., 2013) (ALDH1A1 et ALDH3A1) et l' α -énolase (Cuthbertson et al., 1992).

4.1.2.4. La couche de Dua

La couche de Dua est située entre le stroma postérieur et la membrane de Descemet. Elle comporte 5 à 8 lamelles de collagène sans kératocytes. Elle est composée de fibrilles de collagène I orientées dans des directions transverses, longitudinales et obliques mais est aussi riche en collagène VI.

4.1.2.5. La membrane de Descemet

C'est la seconde membrane basale de la cornée (membrane sécrétée par les cellules endothéliales) et se situe sous le stroma. Elle est constituée de deux couches, la couche antérieure périodique (Anterior Banded Zone), qui apparaît au cours du développement et la couche postérieure non périodique (Posterior Non Banded Zone) sécrétée après la naissance tout au long de la vie. Elle est composée de collagène IV et VIII, mais aussi III, V et XVIII, fibronectine, laminine-1, héparan sulfate, entactine/nidogène, chondroïtine sulfate, kératan sulfate et ténascine. Le collagène VIII est un marqueur des membranes basales des cellules dérivées de la crête neurale. L'épaisseur de la membrane de Descemet est de 3 μm à la naissance et 8 à 10 μm à l'âge de 80 ans.

4.1.2.6. L'endothélium

L'endothélium représente la dernière couche de la cornée. Il est composé d'une couche unique de cellules polygonales qui repose sur la membrane de Descemet. Contrairement

aux cellules épithéliales, les cellules endothéliales ne prolifèrent pas *in vivo*. La densité des cellules endothéliales décline avec l'âge en passant d'environ 6000 cellules par mm^2 à la naissance, jusqu'à atteindre 2000 à 3000 cellules par mm^2 (perte estimée à 45% au cours de la première année de vie, puis de 0,5% par an entre 20 et 80 ans). La densité moyenne est de 2500 cellules/ mm^2 . Ce déclin se caractérise par un élargissement des cellules, afin de recouvrir de nouveau la surface cornéenne (Thoft, 2005). Une perte importante des cellules, induit la perte de fonction de l'endothélium, causant ainsi un œdème dans le stroma et une diminution de la transparence cornéenne (Joyce, 2003).

L'endothélium joue un rôle à la fois de pompe et de barrière sélective, perméable entre le stroma et l'humeur aqueuse grâce à un agencement cellulaire très serré (**Figure 7**). Il permet le passage des fluides du stroma vers l'humeur aqueuse, afin de réguler le volume et l'indice de réfraction du stroma (Jumblatt et al., 1978). La pompe endothéliale est l'élément le plus important de la régulation de l'hydratation cornéenne.

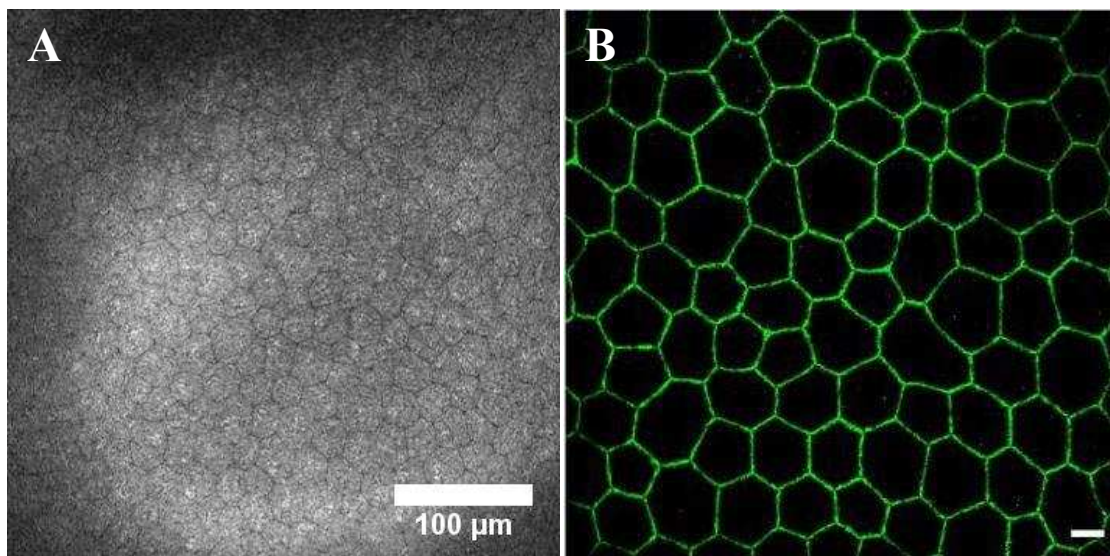


Figure 7. Images de l'endothélium cornéen humain.

A) Image de microscopie confocale *in vivo* (IVCM). On observe la forme hexagonale des cellules endothéliales ainsi que leur agencement cellulaire serré.

B) Immunomarquage de l'endothélium par l'anticorps ZO-1 (Zonula Occludens-1) montrant les jonctions entre les cellules endothéliales. Barre d'échelle : 10µm. (He et al., 2011)

4.1.3. Innervation de la cornée

La cornée est extrêmement innervée avec une densité en terminaisons nerveuses estimée de 300 à 400 fois plus importante que celle de la peau et de 20 à 40 fois plus que dans la pulpe dentaire. Ceci explique la difficulté à tolérer la moindre poussière à sa surface (Müller et al., 2003). Ainsi, elle comporte 70 à 80 faisceaux nerveux qui contiennent 900 à 1 500 axones (**Figure 8**). Les nerfs cornéens innervent l'épithélium et le stroma antérieur. Les plexus nerveux sous-épithéliaux se situent sous la couche basale épithéliale. Les terminaisons nerveuses sensibles se situent dans toutes les couches de l'épithélium mais aussi dans le stroma au contact des kératocytes (Borderie et al., 2005 ; He et al., 2016).

La cornée présente une innervation sensitive, de la branche ophtalmique du nerf trijumeau, ainsi qu'une innervation sympathique en provenance du ganglion cervical supérieur. Du plexus ciliaire se détachent des rameaux qui vont aborder la cornée au limbe pour former un réseau cheminant soit sous l'épithélium pour devenir intra-épithélial, soit dans le stroma antérieur. Chaque fibre innerve un territoire cornéen et s'entrecroise pour former un important réseau nerveux sous la couche de Bowman (Marfurt et al., 2010).

Les faisceaux épithéliaux dérivant des branches stromales périphériques progressent vers le centre de la cornée et forment cette structure caractéristique appelé « vortex ». La densité en fibres nerveuses stromales est plus importante en périphérie qu'au centre de la cornée alors que les fibres nerveuses épithéliales sont plus nombreuses au centre qu'en périphérie de la cornée (He et al., 2016).

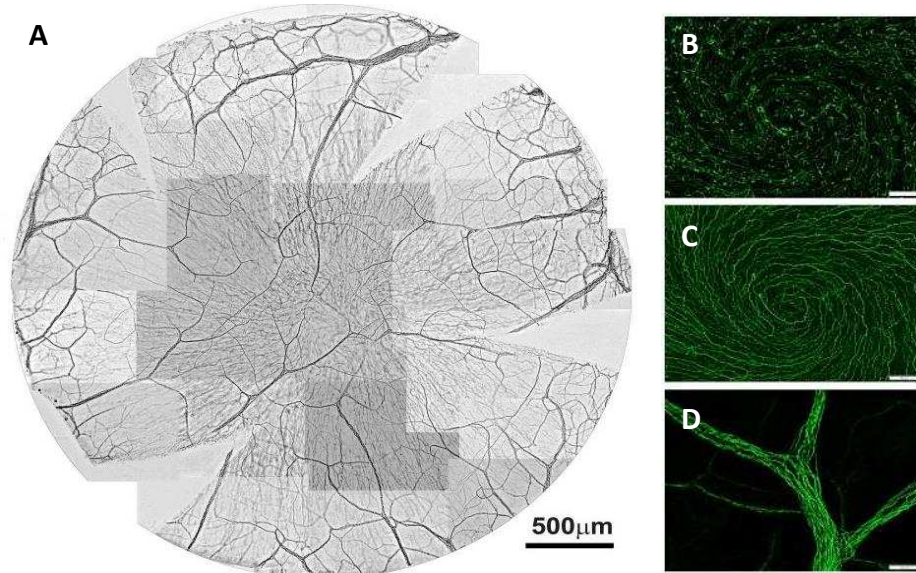


Figure 8. Innervation de la cornée. (Images Tirées de l'article de He et al., 2016)

- A) Innervation totale d'une cornée de souris immunomarquées avec un anti- β III-tubuline.
- B) Terminaisons nerveuses retrouvées dans l'épithélium cornéen
- C) Plexus nerveux sous épithélial
- D) Tronc nerveux stromal. Barre d'échelle : 50 μ m.

4.1.4. Embryogenèse de la cornée

La formation de la cornée commence dès les stades précoces du développement. A 5,5 semaines de gestation chez l'homme, la cornée primitive est constituée d'un épithélium comportant deux assises cellulaires et d'un stroma primaire. L'épithélium est composé de l'épidermo-ectoderme (qui dérive de l'ectoderme). Le stroma primaire (acellulaire) est formé par une sécrétion de collagène par les cellules épithéliales. Il est constitué de fibrilles de collagène et limité en arrière par un réseau de capillaires qui borde la face antérieure du cristallin.

A la 6^{ème} et 8^{ème} semaine de gestation chez l'homme, deux vagues successives de cellules de la crête neurale avancent aux rebords antérieurs de la vésicule optique.

La première vague, vient former la couche continue de l'endothélium cornéen à la partie interne de la cornée et au même moment l'ectoderme sous-jacent induit la synthèse du stroma primaire acellulaire composé de fibrilles de collagène (Hay et al. 1969 ; Hendrix et al. 1982. Fitch et al. 1988).

Durant la 7/8^{ème} semaine de gestation, les cellules de la crête neurale de la seconde vague colonisent le stroma primaire, elles se différencient ensuite en keratocytes qui sécrètent du collagène I, V et VI et des protéoglycanes (Hart et al. 1976. Lwigale et al. 2005). Les fibres de collagène deviennent ainsi plus abondantes dans la cornée que dans la sclère, et donnent naissance au limbe qui apparaît dans la zone de transition entre ces deux tissus.

Autour de la 16^{ème} semaine, on distingue la couche de Bowman et la membrane de Descemet qui est sécrétée par les cellules endothéliales. La **Figure 9** résume les étapes de l'embryogénèse de la cornée chez le poulet décrite par Lwigale et al., par la création d'une chimère caille-poulet par transplantation du tube neurale de la caille chez le poulet afin de suivre la progression des cellules de la crête neurale lors du développement de la cornée. (Lwigale et al. 2005)

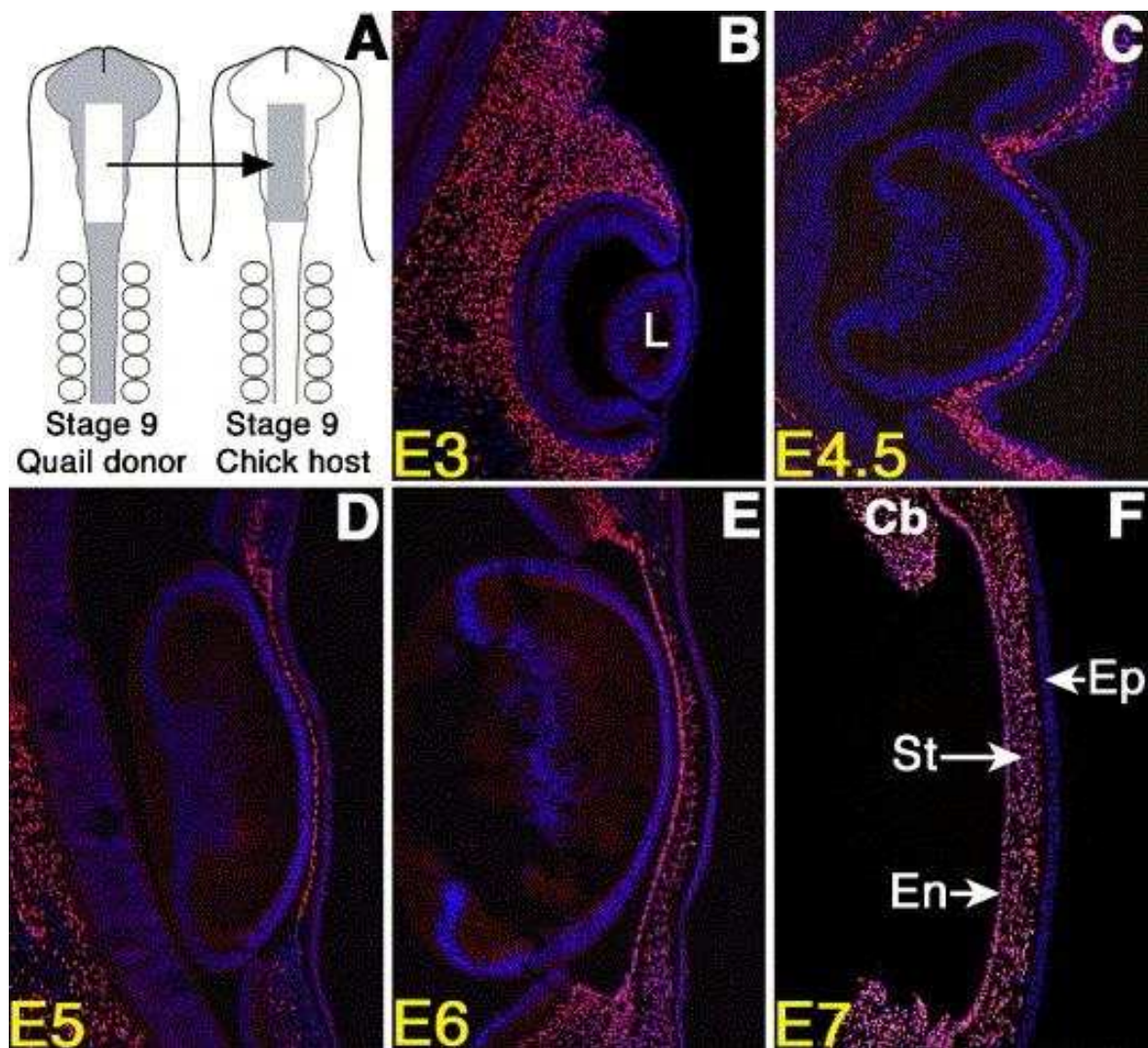


Figure 9. Embryogenèse de la cornée chez le poulet. (Lwigale et al. 2005)

- A. Schéma montrant la méthode d'obtention d'une chimère caille-poulet par transplantation du tube neurale de la caille chez le poulet.
 - B. A E3, les cellules de la crête neurale de la caille en rouge se retrouvent au niveau de la région périoculaire
 - C. A E4,5 migration des cellules de la crête neurale entre le cristallin et l'épithélium.
 - D. Formation de l'endothélium à E5.
 - E. Migration de la deuxième vague de cellules de la crête neurale entre l'endothélium et l'épithélium à E6.
 - F. A E7 formation de toutes les couches de la cornée.
- (L: lens; Ep: epithelium; St: stroma; Cb: ciliary body; En: endothélium).

5. Les cellules souches de la cornée

5.1.1. Généralités sur les cellules souches

C'est en 1908 que le terme de « cellules souches » est proposé pour la première fois par le russe Alexander Maksimov lors du congrès de la société hématologique de Berlin. James Till et Ernest McCulloch ont prouvé l'existence de ces cellules en injectant des cellules de moelle osseuse dans des souris irradiées (Till and Mc 1961). Avec la contribution de Becker et Siminovitch, ils ont défini les deux principales caractéristiques de ces cellules : la capacité de s'auto-renouveler et à se différencier en cellules plus spécialisées (Becker, Mc et al., 1963 ; Siminovitch et al., 1963 ; Till and Mc 1963) (**Figure 10**). Les cellules souches peuvent proliférer en maintenant un phénotype indifférencié (divisions symétriques) et ont la capacité de résister, détecter et réparer les modifications du génome (raccourcissement des télomères, accumulation de mutations). La production de cellules différenciées se fait par des divisions asymétriques. Elles ont également la capacité de former des clones de cellules en culture.

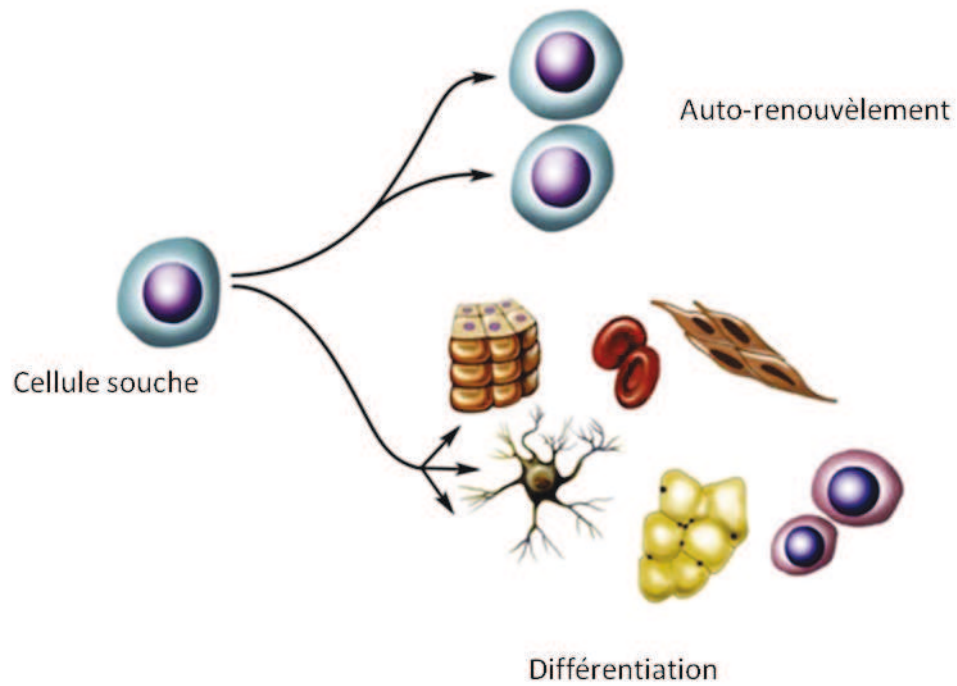


Figure 10 : Les deux principales propriétés des cellules souches : auto-renouveaulement et différenciation.

5.1.2. Les différents types de cellules souches

Les cellules souches peuvent être classées en quatre catégories, selon leur potentiel de différenciation (**Figure 11**) :

Les cellules souches totipotentes sont capables de donner lieu à n'importe quel type cellulaire et ainsi constituer tous les tissus et organes du corps pour finalement former un organisme entier. Cette propriété se retrouve dans les cellules de l'embryon du stade zygote au stade 8 cellules. L'utilisation expérimentale de ces cellules pose des problèmes d'ordre éthique (McLaren et al., 2001) et, en raison de leur fort pouvoir mitogène et tumorigène (Yamamoto et al., 2006), elles sont donc difficilement exploitables en ingénierie tissulaire (Kiatpongsan et al., 2007).

Les cellules souches pluripotentes représentent la masse cellulaire interne du blastocyste et peuvent donner toutes les cellules du corps (Thomson and Marshall, 1998). Ces cellules souches embryonnaires peuvent générer les cellules des trois lignées germinales, endodermiques, mésodermiques et ectodermiques. Des cellules souches pluripotentes ont été obtenues par reprogrammation de cellules somatiques, il s'agit des cellules pluripotentes induites ou iPS (induced Pluripotent Stem cell). Elles sont obtenues par l'expression forcée des facteurs de transcription Oct4, Sox2, Myc-C et Nanog (Takahashi and Yamanaka, 2006 ; Takahashi et al., 2007).

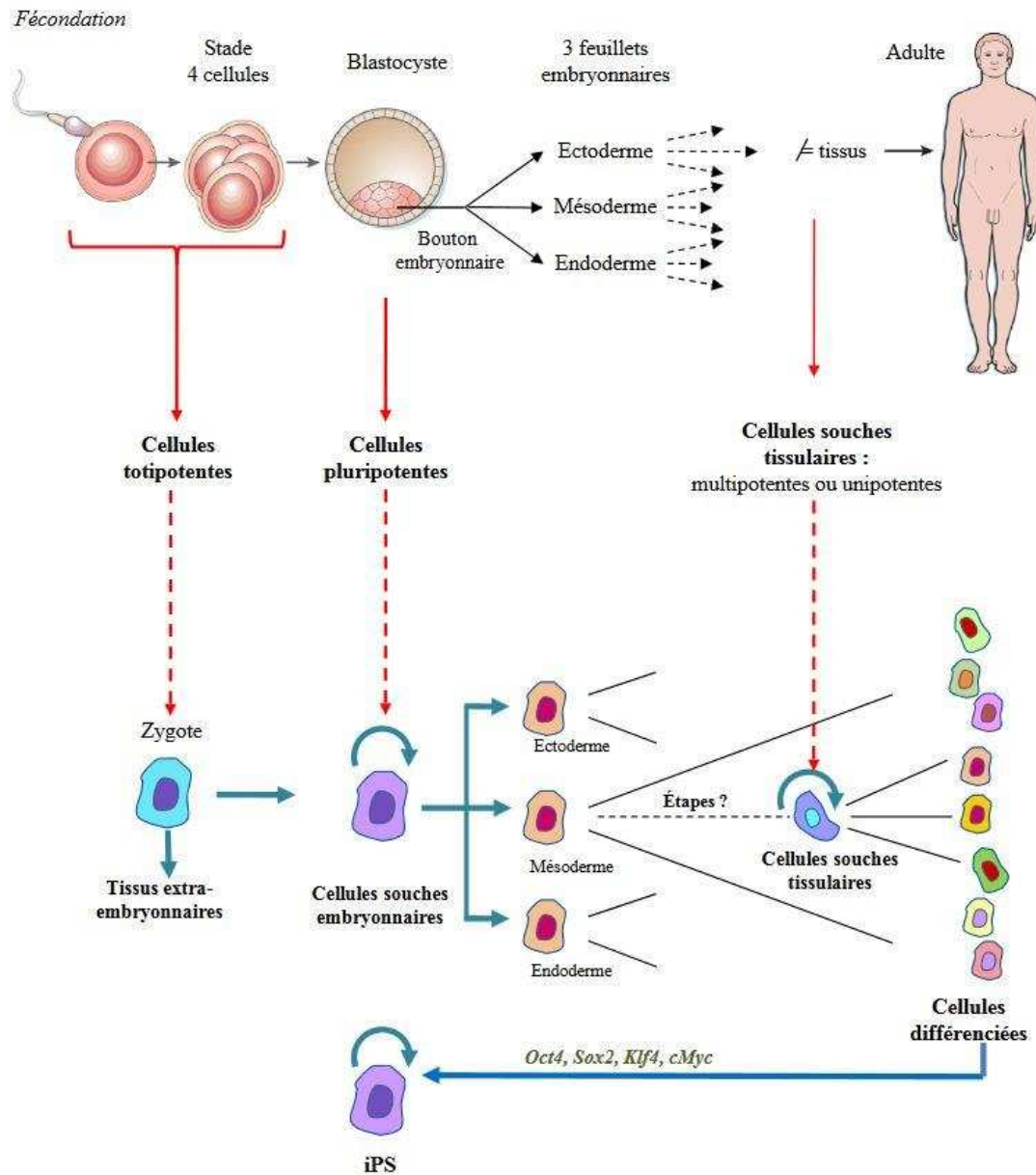


Figure 11. Schéma représentant les différents types de cellules souches. (E. Collomb., 2010).

Les cellules souches multipotentes peuvent donner lieu à un large éventail de types cellulaires mais leur capacité de différenciation est moindre, étant déjà engagées dans un lignage spécifique (ectodermique, endodermique ou mésodermique). Elles remplacent les cellules malades ou âgées, fonctionnant ainsi pour assurer l'homéostasie des tissus du corps tout au long de la vie d'un individu (Wagers and Weissman, 2004). Ces cellules sont également appelées cellules souches adultes. Elles apparaissent avec le fœtus et sont

présentes chez l'adulte, constituant les cellules souches hématopoïétiques présentent au sein de la moelle osseuse, les cellules souches mésenchymateuses (CSM), les cellules souches neurales (CSN) et les cellules souches musculaires.

Les cellules souches unipotentes peuvent se différencier en un seul type cellulaire et sont situées dans les tissus adultes. Par rapport aux autres types cellulaires, elles ont le plus faible potentiel de différenciation. En dépit de cela, les cellules unipotentes ont elles aussi la propriété importante d'auto-renouvellement et jouissent encore d'un vaste potentiel thérapeutique pour traiter les blessures et les maladies.

5.1.3. La niche des cellules souches

5.1.3.1. Qu'est-ce qu'une niche ?

Schofield, en 1978, décrit une niche comme étant le microenvironnement qui permet le maintien de l'état indifférencié des cellules souches hématopoïétiques (Schofield, 1978). La niche protège les cellules souches des éléments extérieurs, tels que les facteurs de différenciation ou d'apoptose, et de tous stimuli qui pourraient affecter leur nombre et leurs caractères. La niche ou les signaux qui émanent de celle-ci permettent de contrôler la survie, la prolifération, la différenciation et la migration des cellules souches (Jones et al., 2008). La niche est donc un microenvironnement spécifique à chaque tissu, permettant de maintenir l'homéostasie de ce tissu grâce aux cellules souches qu'il contient.

La composition de la niche est très complexe, on y trouve non seulement les cellules souches mais aussi une matrice extracellulaire (ECM) qui définit une structure et une certaine organisation, des cellules servant de support et qui interagissent avec les cellules souches et l'ECM, des vaisseaux sanguins et des fibres nerveuses (Spradling et al., 2001). Chaque niche se distingue par ses voies de signalisation qui contrôlent la prolifération des cellules souches. Parmi elles, la voie Wnt, induit l'activation et la différenciation des cellules souches du follicule pileux (Niemann et al., 2002) et la régulation et la prolifération des cellules souches limbiques (Nakatsu et al., 2011). Le FGF (Fibroblast Growth Factor) et le BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor) permettent le maintien de l'état indifférencié ainsi que le renouvellement des cellules souches du système nerveux central (Zhao et al., 2008).

Les cellules souches interagissent avec leur niche par l'expression de protéines d'adhésion telles que les cadhérines (Chen et al., 2013) et les intégrines. Ces molécules permettent l'ancrage des cellules souches à la matrice extracellulaire, l'étude de Song et al. chez la drosophile, montre que le fait de supprimer ces molécules d'adhésion de la niche des cellules souches germinales induit leur sortie de la niche et leur différenciation (Song et al., 2002).

La niche est donc un microenvironnement important pour la régulation du maintien de l'état indifférencié, de l'autorenouveau, de l'activation et de la prolifération des cellules souches par la mise en jeu de plusieurs voies de signalisation.

5.1.3.2. La niche des cellules souches cornéennes

Les cellules souches épithéliales sont localisées dans le limbe, à la jonction entre la cornée et la conjonctive. Cette jonction constitue la niche des cellules souches cornéennes, et se caractérise par sa vascularisation, son innervation et offre une protection contre les UV par la présence de mélanine (Eberwein and Reinhard, 2014 ; Dua et al., 2005 ; Davanger and Evensen, 1971 ; Goldberg and Bron, 1982 ; Townsend, 1991). En 1921, Vogt, grâce aux observations faites à la lampe à fente, décrit en détail l'apparence clinique des cryptes conjonctivales observées précédemment par Henle en 1866 puis par Dubreuil en 1906 (Townsend, 1991). Aujourd'hui ces cryptes sont appelées « les palissades de Vogt », qui forment des ondulations en contact avec les vaisseaux sanguins source de nutriments et de facteurs de survie (Tseng, 1996 ; Li et al., 2012). Les cellules souches limbiques résident dans des structures se trouvant entre les palissades. Des coupes histologiques de la partie limbique montrent que les cellules épithéliales limbiques sont contenues dans des cryptes appelées par Dua cryptes épithéliales limbiques « LEC » (Dua et al., 2005 ; Shortt et al. 2007).

Afin de maintenir leur caractère indifférencié, les cellules souches communiquent avec leur niche. Des signaux exogènes sont nécessaires pour contrôler le programme de différenciation des cellules souches, certains d'entre eux proviennent de l'interaction entre les cellules, la matrice extracellulaire et la membrane basale épithéliale. Des variations sont observées dans la composition de cette membrane basale qui est en contact avec les cellules basales de la cornée et les cellules basales du limbe. Considérée comme une barrière et une matrice pour l'adhésion des cellules, il est devenu évident qu'elle joue un rôle dans la régulation des activités biologiques telles que la prolifération, la différenciation

et la migration des cellules (Erickson and Couchman, 2000). La composition de la membrane basale a été étudiée par l'équipe de Kruse. Si plusieurs similarités dans la composition de la membrane du côté cornéen et du côté limbique ont été observées (Collagène IV, VII, XV, XVII, fibronectine), certains composants sont seulement exprimés au niveau limbique de la membrane basale, tels que le collagène XVI, la fibulin-2, la ténascine-C/R, la vitronectine et la chondroïtine sulfate, ces marqueurs étant colocalisés avec des marqueurs des cellules souches limbiques (ABCG2, p63 et CK19) (Schlötzer-Schrehardt et al., 2007). Ces résultats confirment le rôle de la membrane basale dans la régulation de l'expression génique, du phénotype et de la prolifération cellulaire.

Des voies de signalisation interviennent aussi au sein de la niche. Une voie de signalisation est une séquence d'étapes impliquant plusieurs molécules dans une cellule ou à sa surface afin de contrôler de nombreuses fonctions telles que la prolifération, la migration ou la mort cellulaire. Les voies les plus connues sont les voies BMP, Shh, Notch et Wnt (Spardling et al., 2001 ; Staal et al., 2010). Les voies BMP et Wnt contrôlent les cellules souches des cryptes intestinales, du bulbe dermique et de la moelle osseuse (Myung et al., 2013 ; Hirata et al., 2013 ; Huang et al., 2012). Afin de déterminer leurs rôles dans la niche limbique, l'équipe de Tseng a établi un modèle de culture cellulaire en 3D dans du matrigel, où les cellules souches épithéliales limbiques sont soit isolées seules de la niche avec de la dispase, soit isolées avec un agrégat cellulaire en utilisant de la collagénase. En comparaison avec la culture de cellules souches épithéliales limbiques seules, la culture de l'agrégat cellulaire produit plus de colonies et induit moins de différenciation cellulaire (Chen et al., 2011), ce qui est expliqué par l'implication des voies BMP et Wnt, l'expansion clonale des cellules souches épithéliales limbiques impliquant l'activation de la voie Wnt et l'inhibition de la voie BMP par la niche limbique (Han et al., 2014.)

5.1.4. Les cellules souches épithéliales limbiques (LSC)

A ce jour, il n'existe pas de marqueur unique afin d'identifier les LSC. Leur caractérisation se fait donc par la combinaison de plusieurs marqueurs. L'un de ces marqueurs et le plus connu est la protéine 63 (p63), qui joue un rôle important dans le développement épithélial (Yang et al., 1999). Ce facteur de transcription a été proposé comme marqueur des LSC par Pellegrini et al. (2001). En 2005, Di Iorio et al suggèrent que la partie N terminale de

l'alpha isoforme de p63 ($\Delta Np63\alpha$) est la plus spécifique pour les cellules souches épithéliales limbiques (Di Iorio et al., 2005).

Le transporteur ABCG2 (ATP-Binding Cassette, subfamily G, member 2), est également utilisé comme marqueur des LSC. Ces cellules se distinguent par leur aptitude à exclure le Hoechst 33342 (colorant vital) par l'expression du transporteur ABCG2. Elles portent également le nom de « Side Population » (SP), donné en référence à leur position près de l'axe des ordonnées sur un graphique de cytométrie en flux (Watanabe et al., 2004).

La Kératine 19 et la *Vimentine*, deux types de filaments intermédiaires, sont aussi exprimés par les LSC (Lauweryns et al., 1993; Ghouby-Benallaoua et al., 2011; Albert et al., 2012). D'autres marqueurs d'identification des LSC tels que Bmi1 (Barbaro et al., 2007), ABCB5 (Bruce et al., 2014), l'alpha énalase (Chung et al., 1995), la connexine 43 (Matic et al., 1997) et C/EBP delta (Barbaro et al., 2007) sont également utilisés. La paire de cytokératines 3/12, spécifique de l'épithélium cornéen, et qui caractérise les cellules cornéennes différenciées, n'est pas exprimée par les LSC (Schermer et al., 1986).

Les LSC ne sont pas seulement identifiées par des marqueurs immunocytochimiques, mais aussi par leur comportement en culture. En effet, Barrandon et Green en 1987, ont identifié trois types de colonies issues de la culture clonale de kératinocytes épidermiques sur des cellules nourricières murines (fibroblastes 3T3) (Barrandon et Green, 1987). Le premier type de colonie formé par les cellules est l'holoclone, qui correspond à de larges colonies formées par de petites cellules correspondant aux cellules souches. Le deuxième type de colonie est le méroclone, les colonies sont plus petites que les holoclones et les cellules qu'il contient sont des cellules d'amplification transitoire et se différencient après quelques passages en culture. Le troisième type de colonie correspond au paraclone, formé de cellules transitoires et de cellules différenciées, et ne contenant peu ou pas de cellules souches (Barrandon et Green, 1987). Cultivées sur des cellules nourricières murines, les LSC forment le même type de colonies (Pellegrini et al., 1999). Dans l'étude de Daniels et col., les biopsies limbiques contenant plusieurs cryptes épithéliales, forment en culture 17% d'holoclones, 43% de méroclones et 38% de paraclones. Alors que les biopsies pauvres en cryptes forment 1% d'holoclones, 41% de méroclones et 56% de paraclones (Dziasko et al., 2014).

5.1.5. Les cellules souches stromales limbiques (SSC)

En 2005, différents groupes ont isolé et identifié des cellules souches stromales à partir de cornées murine, bovine ou humaine, ayant les mêmes propriétés que les cellules souches mésenchymateuses (Du et al., 2005 ; Funderburgh et al., 2005) et comme origine la crête neurale (Yoshida et al., 2006). Ces cellules ont la capacité de former des clones en culture et de s'expandre *in vitro* (plus de 65 doublements de population) (Funderburgh et al., 2005 ; Yoshida et al., 2005 ; Du et al., 2005). Les cellules souches stromales sont localisées dans la partie limbique du stroma cornéen en étroite relation avec les LSC, l'une de leur fonction étant le maintien des propriétés des LSC dans la niche.

Dans leurs études, Funderburgh et al. ont trouvé que ces cellules exprimaient des gènes impliqués dans le développement de l'œil, *Pax6*, *Six2* et *Six3* (Funderburgh et al., 2005). *Pax6*, le gène le plus caractérisé dans le développement oculaire, est requis entre autres pour le développement du cristallin, une perte de fonction de ce gène provoquant la formation d'un petit œil ou « l'aniridie » qui est une malformation bilatérale existant dès la naissance, caractérisée par une absence subtotale d'iris (Ramaesh et al., 2003 ; Mort et al., 2011). *Pax6* est exprimé dans la rétine et dans l'épithélium cornéen au cours du développement et son expression continue dans l'épithélium cornéen adulte.

Les SSC expriment aussi des marqueurs spécifiques des cellules souches de la crête neurale *Sox9*, *Sox10* et *HNK1* (Human Natural killer 1), des marqueurs communs aux cellules souches (*Sox2*, *Bmi1*, *Nestin*) (Yoshida et al., 2006), des marqueurs spécifiques des kératocytes (*Vimentin*, *Keratocan*, *ALDH3A1*) et des marqueurs de cellules souches embryonnaires (*Oct4*, *Sox2*, *SSEA4* et *Nanog*) (Li et al., 2012). La caractérisation des SSC se fait aussi par leur potentiel de différenciation.

Dans des milieux spécifiques, les cellules souches stromales adoptent plusieurs phénotypes, kératocytes, fibroblastes, myofibroblastes et neurones. Dans des milieux de différenciation adaptés pour la différenciation des cellules souches mésenchymateuses, les cellules souches stromales limbiques se différencient tout comme les cellules souches mésenchymateuses en adipocytes (formation de vacuoles lipidiques intracellulaires), en chondrocytes (accumulation de matrice extracellulaire correspondant aux protéoglycanes typiques du cartilage) et en ostéocytes (présence de dépôts de calcium) (Du et al., 2007 ; Li et al., 2012 ; Veréb et al., 2016).

La culture des cellules souches stromales limbiques se fait après dissociation d'explants cornéens avec de la collagénase. La formation d'agrégats cellulaires en culture ou « sphères », due à la prolifération cellulaire, est l'une des caractéristiques de ces cellules. Le milieu utilisé généralement pour leurs cultures contient des facteurs de croissance telles que l'EGF (epithelial growth factor), le FGF2 (fibroblast growth factor 2) et du sérum de veau fœtal (Du et al., 2005 ; Funderburgh et al., 2005 ; Mimura et al., 2010)

Les SSC ont la propriété de sécréter en culture une matrice extracellulaire contenant du collagène (Col I, IV, V et VI) et des protéoglycanes (Lumican, Keratocan). Sur un substrat contenant des polymères formant des nanofibres alignées, ces cellules sécrètent une matrice extracellulaire organisée, cette matrice pourra servir par la suite comme support pour la formation d'un stroma artificiel pour une utilisation en thérapie cellulaire (Du et al., 2007 ; Wu et al. 2012).

2.4 Renouveaulement de l'épithélium cornéen

L'épithélium cornéen se reouvele tout les 15 jours. Deux hypothèses ont été proposées afin d'expliquer la façon dont ce renouvellement s'effectue : 1) Renouveaulement de l'épithélium à partir des cellules souches présentes dans la partie limbique de la cornée et 2) Renouveaulement vertical à partir de cellules souches situées dans la couche basale de l'épithélium cornéen.

La première théorie propose que les cellules souches adultes présentent dans le limbe (**Figure 12**) seraient responsables de ce renouvellement. En effet, il existerait un flux constant de cellules épithéliales du limbe vers le centre de la cornée (Schermer et al., 1986 ; Cotsarelis et al., 1989 ; Kruse et al., 1994 ; Lehrer et al., 1998). Les cellules souches limbiques donnent naissance à une cellule souche fille (auto-renouveaulement) et à une cellule amplificatrice transitoire (CAT) qui entreprendrait une migration centripète le long de la couche basale (Kinoshita et al., 1981). Une fois dans la couche basale les CAT, qui ont un fort pouvoir mitotique (Beebe et Masters 1996, Lehrer et al., 1998), proliféreraient et migreraient verticalement vers la superficie de l'épithélium tout en se différenciant en cellules épithéliales cornéennes. Quand elles occupent la partie la plus superficielle de l'épithélium, les cellules deviennent anuclées et desquament ensuite dans le film lacrymal. Cette hypothèse est appelée « X, Y, Z hypothesis » (Thoft et Friend, 1983). X correspondant à la prolifération des CAT, Y à la migration centripète des cellules souches limbiques et Z à la

desquamation des cellules épithéliales en surface. Il faut entre une et deux semaines à une cellule souche pour accomplir un cycle de migration complet (Kenyon et al. 1989).

Le renouvellement vertical à partir de cellules souches situées dans la couche basale de l'épithélium cornéen, découle des observations de Majo et coll. (2008). Cette étude a montré que les cellules souches épithéliales sont présentes sur toute la surface oculaire (**Figure 12**). Le renouvellement physiologique de l'épithélium cornéen se ferait à partir des cellules souches se trouvant dans sa couche basale, alors que les LSC interviendraient lors de lésions de l'épithélium cornéen (Majo et al., 2008). En effet, lors des atteintes de la zone limbique, certains patients présentent un épithélium cornéen central normal (Dua et al., 2009).

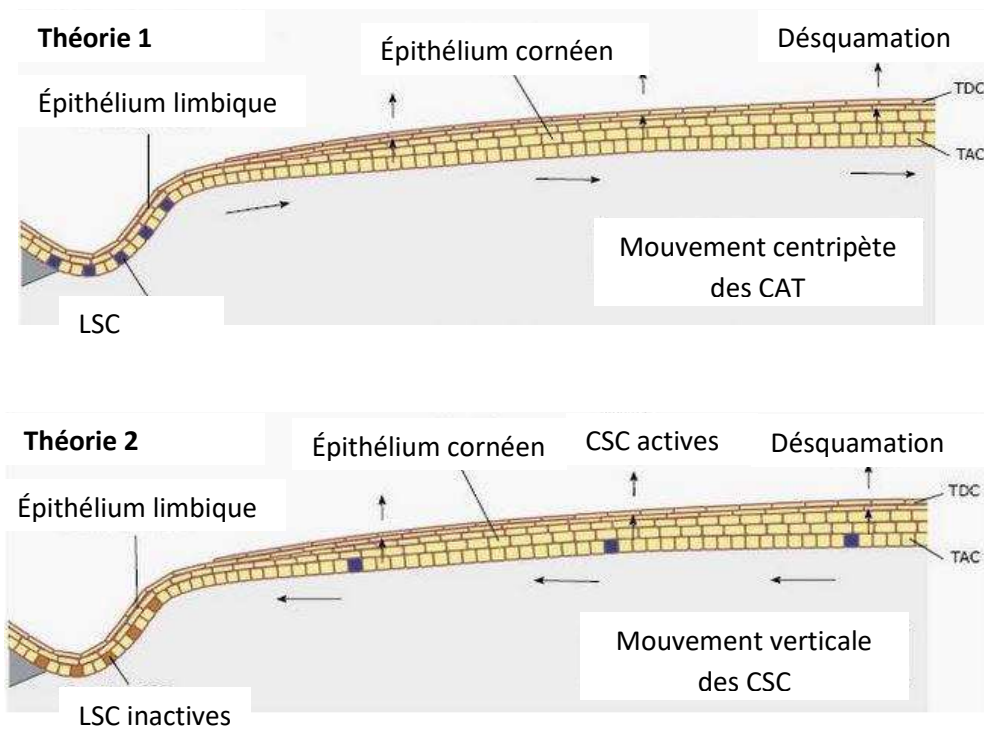


Figure 12. Renouvellement de l'épithélium cornéen. (Adapté de West et al., 2015)

Théorie 1. Représentation schématique du renouvellement de l'épithélium cornéen d'après la théorie de Thoft (X, Y, Z hypothesis).

Théorie 2. Schéma représentant le renouvellement vertical de l'épithélium cornéen (d'après Majo et al. 2008).

TDC: Terminally Differentiated Cells
TAC: Transient Amplifying Cells

2.5 Renouveaulement du stroma cornéen

Les SSC retrouvées dans la partie limbique du stroma cornéen assurent le renouvellement de la matrice extracellulaire de la cornée lors de lésions de nature mécanique, thermique, chimique ou infectieuse (Du et al., 2005. Lwigale et al 2005; Zhang et al., 2015).

Lors d'une lésion épithéliale avec atteinte de la couche de Bowman (**Figure 13**), l'interleukine 1 alpha (IL-1 α) sécrétée par les cellules épithéliales, induit l'apoptose et ou l'activation des kératocytes adjacents. Les kératocytes ainsi activés sécrètent des métalloprotéases (MMPs), des enzymes protéolytiques, qui sont responsables de la dégradation du collagène dans les zones lésées.

L'absence de la couche de Bowman secondaire à une lésion induit la sécrétion du TGF β 2 (Transforming Growth Factor beta 2) par les cellules épithéliales. Le TGF β 2 induit l'activation et la prolifération de myofibroblastes qui participent au remodelage de la matrice extracellulaire. Les myofibroblastes sécrètent un collagène cicatriciel différent de celui retrouvé dans la cornée, ce collagène se caractérise par un changement dans le diamètre des fibrilles et de l'espace interfibrillaire (Hassell et al. 2010). Ce processus de cicatrisation peut prendre des mois, voire des années et cause une diminution de la transparence de la cornée (West-Mays et al. 2006).

Chez la souris, la suppression de l'expression du lumican, un protéoglycane important retrouvé dans la cornée, induit la formation d'une cicatrice et d'une opacité cornéenne provoquée par l'accumulation de fibrilles de collagène d'un diamètre anormalement grand (Hassell et al. 2010). L'injection de cellules souches stromales chez ces souris induit l'expression d'une grande quantité de lumican qui participe au remodelage de la matrice extracellulaire (Du et al. 2009). Le même effet remodelant a été observé par Boote et coll., dans un modèle d'opacité cornéenne créée par grattage mécanique de l'épithélium et du stroma cornéen (Boote et al. 2012).

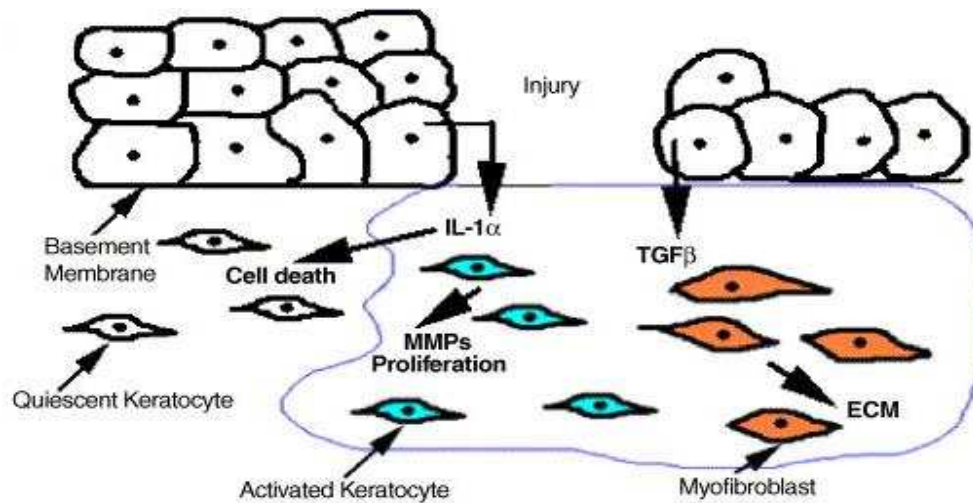


Figure 13. Schéma représentant les étapes de la réponse des kératocytes à une lésion épithéliale. (West-Mays et al. 2006). Un defect dans la membrane basale épithéliale, provoque la pénétration de TGF- β dans le stroma cornéen, ce facteur induit la prolifération des myofibroblastes et l'inhibition de l'interleukine-1 (IL-1). Les myofibroblastes sécrètent de grande quantité de matrice extracellulaire désorganisée provoquant une fibrose stromale et l'IL-1 induit l'apoptose des kératocytes au niveau du site d'injection. Des métalloprotéases (MMPs) sont sécrétées afin de dégrader la matrice extracellulaire (ECM) au niveau du site de la lésion.

2.6 Troubles visuels liés à la cornée

Selon l'OMS, les pathologies de la cornée sont la deuxième cause de cécité dans le monde (Whitcher et al., 2001). La cécité cornéenne affecte environ 10 millions de personnes.

La cornée est susceptible de subir des lésions qui peuvent être d'origines diverses, génétiques (dystrophies), traumatiques, médicamenteuses, infectieuses ou inflammatoires. Quelle que soit leur origine, ces lésions peuvent entraîner des dommages superficiels ou profonds. Dans le premier cas, l'atteinte se limite à l'épithélium, tandis que, dans le deuxième cas, la couche de Bowman, le stroma et même l'endothélium peuvent être affectés. Alors que les lésions superficielles cicatrisent sans laisser de séquelles, une lésion profonde peut entraîner des opacités cornéennes résiduelles (**Figure 14**). La conséquence d'une telle situation est la diminution de la transparence de la cornée ; une perforation est possible dans les maladies les plus graves.

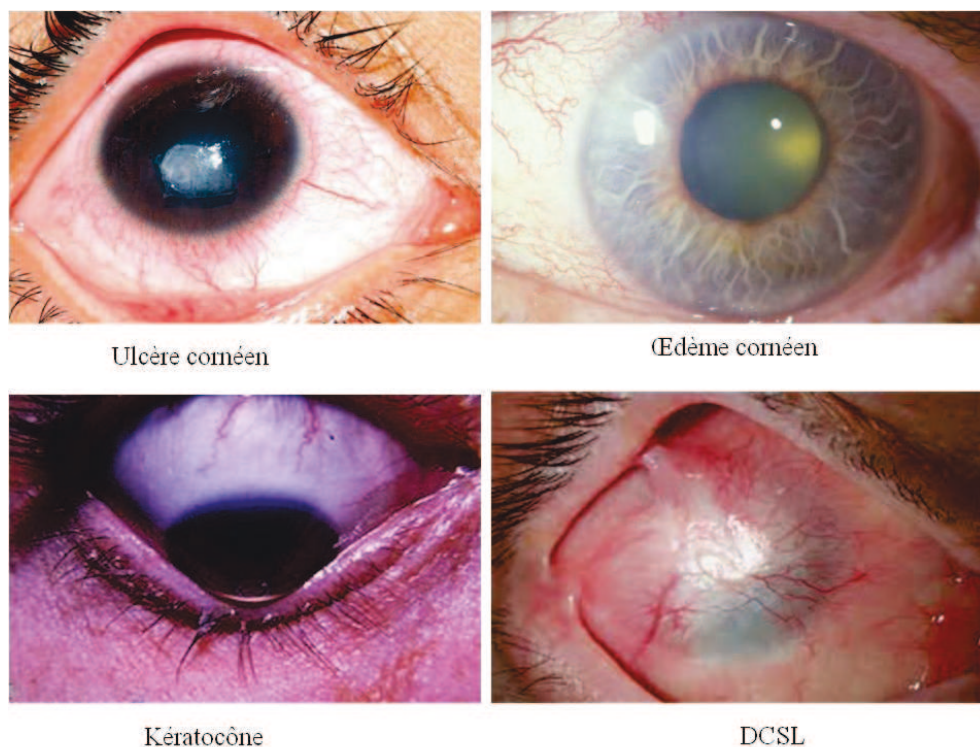


Figure 14. Présentation de quelques pathologies de la cornée. Les ulcères cornéens, les œdèmes cornéens, le kératocône et la DCSL sont tous des pathologies cornéennes induisant des troubles visuelles.

2.6.1 Les ulcères cornéens

Les ulcères cornéens sont caractérisés par l'existence de lésions de l'épithélium cornéen avec inflammation sous-jacente, pouvant rapidement évoluer jusqu'à la perforation du stroma cornéen. Les ulcères de cornée cicatrisent par la formation d'une fibrose tissulaire, responsable d'opacification de la cornée et de la baisse de l'acuité visuelle. Les ulcères peuvent être causés par des agents infectieux (bactéries, virus, champignons, amibes) et des traumatismes mécaniques (Scribbick et al., 1994).

2.6.2 L'œdème cornéen

Pour garder sa transparence, la cornée est maintenue dans un état de relative déshydratation grâce à la fonction de pompe de l'endothélium cornéen. Une altération de cet endothélium peut entraîner la pénétration de l'humeur aqueuse dans la cornée qui devient alors œdémateuse et perd sa transparence (Costagliola et al. 2013).

2.6.3 Déficience en cellules souches limbique (DCSL)

Les brûlures chimiques et les lésions sévères causées par le port excessivement prolongé de lentilles de contact peuvent entraîner des atteintes irréversibles de l'épithélium cornéen. La disparition de la barrière limbique provoque la migration d'un épithélium conjonctivale sur la surface cornéenne et une néovascularisation. Ces pathologies altèrent la cicatrisation et entraînent des opacités cornéennes. L'insuffisance limbique entraîne un handicap fonctionnel majeur, la vision chute en dessous du seuil légal de la cécité (Kocaba et al. 2016).

2.6.4 Les dystrophies cornéennes

Le terme de dystrophie cornéenne englobe un groupe hétérogène de maladies génétiques bilatérales non-inflammatoires qui sont en général limitées à la cornée. Les dystrophies sont caractérisées par l'accumulation de dépôts de protéines insolubles au niveau des couches de la cornée, provenant de la transcription aberrante de protéines due à des mutations génétiques.

Selon la localisation de ces dépôts, les dystrophies cornéennes sont divisées en 4 groupes (Dunaief et al., 2001 ; Santos et al., 2007, Emily et al., 2015 ; Weiss et al. 2015) : **les dystrophies de l'épithélium cornéen et de sa membrane basale**, **les dystrophies épithélio-stromales** causées par une mutation dans le gène TGF β 1 codant la kératoépithéline (Lakshminarayanan et al. 2014), **les dystrophies stromales**, qui peuvent être dues à une mutation dans le gène carbohydre sulfate transférase 6 (CHST6) responsable de la synthèse du kératan sulfate, principal glycosaminoglycane de la cornée (Al-Swailem et al. 2005) et **les dystrophies de l'endothélium** cornéen comme la dystrophie de Fuchs ou cornea guttata caractérisée par la présence de gouttes sur la membrane de Descemet provoquant un œdème cornéen (Riazuddin et al., 2010). Les dystrophies cornéennes provoquent des opacités cornéennes affectant l'acuité visuelle pouvant aller jusqu'à la cécité.

2.6.5 Le kératocône

Le kératocône, pathologie stromale multifactorielle à prédisposition génétique, correspond à une déformation de la cornée qui s'amincit progressivement, en finissant par perdre sa forme sphérique initiale et prendre un aspect de cône irrégulier. Le frottement oculaire régulier peut être responsable de cette déformation. Le kératocône, survenant souvent vers la fin de l'adolescence, engendre des troubles de la vision, tels qu'une vue brouillée et déformée et une mauvaise vision de loin et de près, qui nécessitent le port de lentilles de contact adaptées au kératocône. Sa prévalence serait de 1 sur 2000. Dans de rares cas (moins de 3 %), le kératocône aigu causant l'opacification de la cornée peut survenir, et seule une greffe de cornée peut permettre de restaurer la vue. La qualité et la disponibilité des cornées limitent le traitement de cette affection (Rabinowitz 1998).

2.7 Traitement des pathologies cornéennes

2.7.1 Greffe de cornée

La greffe de cornée est la greffe la plus réalisée à l'échelle mondiale (plus de 100 000 greffes chaque année dans le monde). Pratiquée pour la première fois en 1887 par Arthur Von Hippel, c'est aussi la plus ancienne greffe de tissus effectuée avec succès chez

l'homme, et celle qui a la meilleure survie à long terme (près de 70% de survie du greffon après dix ans).

La greffe de cornée est souvent l'unique traitement envisageable pour améliorer la vision des patients. En fonction de la localisation de l'atteinte, la greffe peut être **transfixiante**, ce qui consiste à remplacer toute l'épaisseur de la cornée ou **lamellaire**, qui permet de remplacer seulement la partie de la cornée qui est malade (**Figure 15**). Lorsqu'elles sont possibles, les greffes lamellaires sont préférées, car elles sont plus respectueuses de la structure oculaire normale et la récupération visuelle est plus rapide.

Les chances de succès d'une greffe de cornée (possibilité de garder un greffon clair permettant de voir) dépendent de la maladie (environ 95% dans le kératocône, 80% dans les œdèmes de cornée) et des anomalies associées, (la présence de vaisseaux sanguins dans la cornée ou d'un glaucome avant l'intervention réduisent les chances de succès de la greffe) (Claesson et al., 2002 ; Borderie et al.2009). De même, la récupération visuelle est fonction de la maladie de départ et des maladies de l'œil associées qui limitent la récupération visuelle (Tseng et al. 1984).

Des thérapies alternatives sont en développement afin de faire face au manque de don de cornée et aux problèmes liés au rejet du greffon. Les patients receveurs sont inscrits sur une liste d'attente en fonction de la gravité de leur atteinte cornéenne et donc visuelle. Si le délai d'attente d'un greffon est assez court dans les grands pays industrialisés, seul un patient sur 70 peut avoir accès à la greffe de cornée à l'échelle mondiale.

2.7.2 Thérapie cellulaire

Les thérapies cellulaires consistent à remplacer les cellules déficientes ou disparues à cause d'une pathologie, par des cellules saines afin de restaurer les fonctions d'un tissu ou d'un organe. Pratiquées depuis de nombreuses décennies pour les greffes de peau ou de moelle, ces thérapies ont bénéficié des avancées scientifiques récentes sur les cellules souches (**Figure 16**).

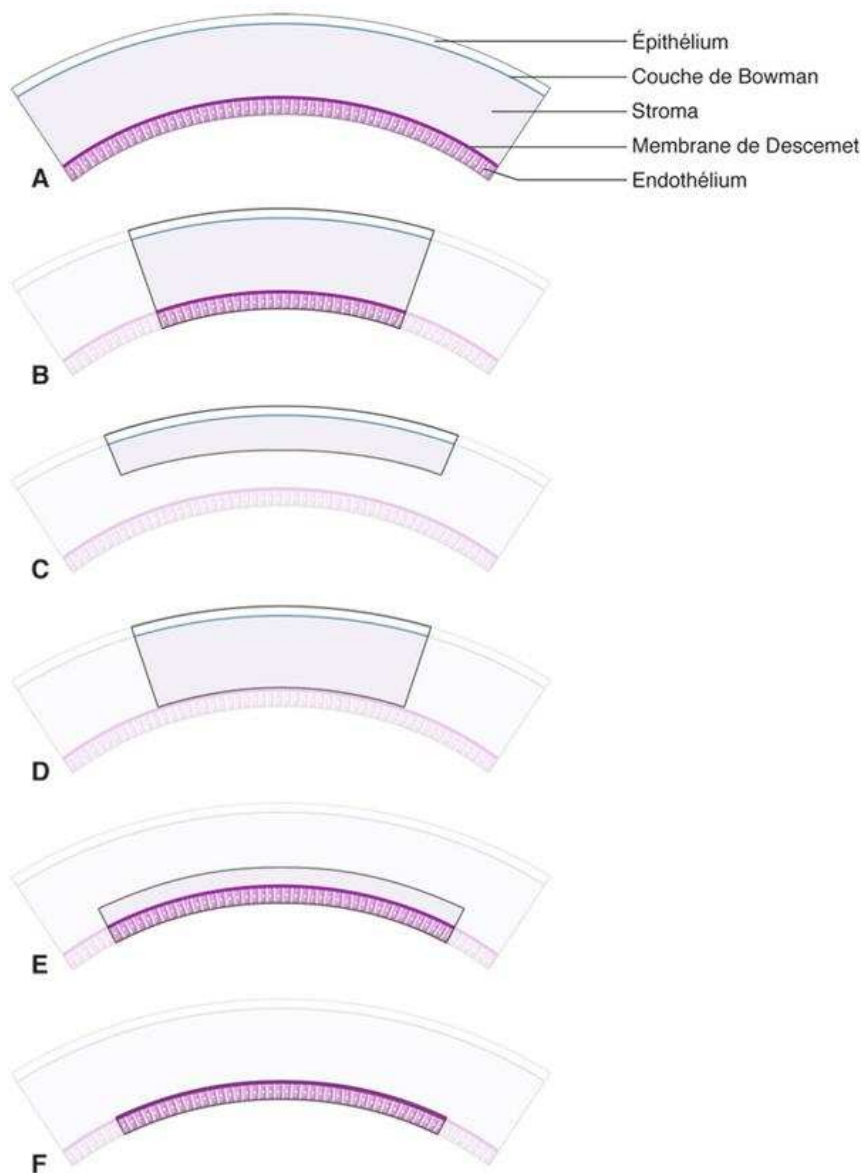


Figure 15. Schéma représentant les différentes greffes de cornée

A. Cornée normale.

B. Greffe transfixiante. Remplacement de la totalité de l'épaisseur cornéenne.

C. Greffe lamellaire antérieure superficielle. Une couche plus ou moins épaisse du stroma cornéen antérieur est remplacée.

D. Greffe lamellaire antérieure profonde. La totalité du stroma cornéen est remplacé.

E. Greffe lamellaire endothéliale DSAEK. L'endothélium et la membrane de Descemet du receveur sont remplacés par un greffon qui contient une lamelle de stroma postérieur.

F. Greffe lamellaire endothéliale DMEK. Le greffon ne comporte que l'endothélium et la membrane de Descemet du donneur, sans stroma postérieur.

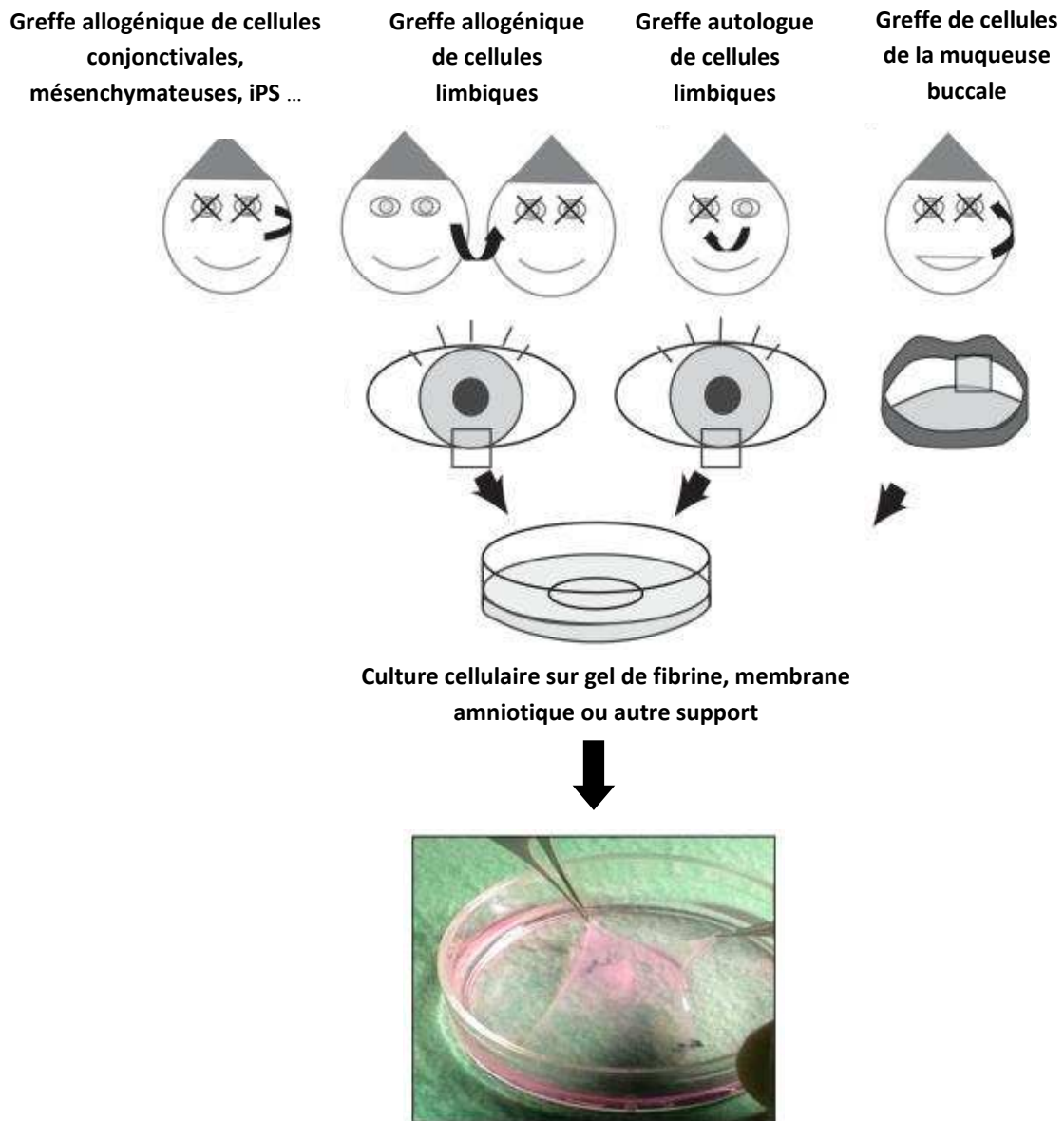


Figure 16. Thérapie cellulaire lors des insuffisances en cellules souches limbiques (Adaptées de Kayama et al. 2007). Obtention d'un tissu pour la greffe contenant des cellules épithéliales capables de repeupler la cornée par l'utilisation de différentes sources de cellules, limbiques, conjonctivales, mésenchymateuses, iPS et buccale.

2.7.2.1 Utilisation des cellules souches épithéliales limbiques

Les progrès dans la compréhension de la physiologie du renouvellement de l'épithélium cornéen ont permis d'introduire une autre approche thérapeutique pour la prise en charge des insuffisances limbiques. Le concept de thérapie cellulaire par culture de cellules épithéliales a été introduit en 1970 (Rheinwald et al. 1975). Cependant cette technique n'a

été appliquée pour la première fois par Pellegrini et coll. qu'en 1997. La greffe de cellules souches limbiques est indiquée en cas de DCSL total afin de restituer un pool cellulaire suffisant au maintien et au renouvellement de l'épithélium cornéen. Les cellules limbiques peuvent avoir deux origines, le patient lui-même si la maladie ne touche qu'un seul œil (autogreffe ou pathologie unilatérale), un greffon cornéen provenant d'un donneur décédé ou d'un parent (donneur vivant) en cas de maladie touchant les deux yeux (allogreffe ou pathologie bilatérale) ou sur œil unique (Pellegrini et al., 1997 ; Schwab et al., 1999 ; Sangwan et al., 2003 ; De Luca et al., 2006). Les LSC peuvent être apportées par une greffe tissulaire limbique ou par celle d'un feuillet épithélial obtenu par culture cellulaire (Pellegrini et al., 1997 ; Tsai et al 2000 ; Schwab et al., 2000 ; Sangwan et al., 2003).

La culture cellulaire *ex vivo* présente l'avantage d'utiliser des cellules immunocompatibles (autogreffe ou allogreffe) tout en réduisant significativement le volume tissulaire prélevé et donc le risque iatrogène. Cependant, elle fait le plus souvent encore appel à l'utilisation de produits animaux (fibroblastes murins, sérum de veau fœtal, sérum de mouton, extrait pituitaire bovin), de tissus humains allogéniques (membrane amniotique) et/ou de biomatériaux non approuvés qui augmentent le risque potentiel d'infection xénobiotique, de réaction immunitaire et de rejet de greffe (De Luca et al., 1990 ; Pellegrini et al., 1997 ; Schwab et al., 1999 ; Tsai et al., 2000 ; Schwab et al., 2000 ; Sangwan et al., 2003 ; Rama et al., 2010).

L'autogreffe présente de meilleurs résultats pour le traitement des insuffisances en cellules souches limbiques, elle permet une meilleure réépithélialisation et présente peu ou pas de réaction inflammatoire (Ang et al. 2007 ; Borderie et al., 2009 ; Sangwan et al. 2011). En revanche, cette technique chirurgicale expose au risque théorique de DCSL iatrogène sur l'œil sain et le choix de la taille du greffon devra permettre de compenser la DCSL de l'œil greffé sans risquer de compromettre l'intégrité de l'œil prélevé.

2.7.2.2 Utilisation d'autres sources de cellules

Des sources alternatives de LSC autologues ont été étudiées dans le but de remplacer les greffes allogéniques chez les patients atteints de DCSL bilatéral, parmi ces sources on retrouve les cellules épithéliales de la muqueuse buccale. Une biopsie de 2-3 mm² est prélevée chez le patient atteint et cultivée sur une membrane amniotique ou sur un support

de culture cellulaire permettant le détachement du feuillet épithélial après changement de température. A confluence, la membrane est suturée sur l'œil atteint (Burillon et al. 2012 ; Nakamura et al. 2003).

Les CS mésenchymateuses de la moelle osseuse ont également été utilisées pour le traitement des DCSL. Les études précliniques sur modèles animaux sont encourageantes, confirmant l'obtention d'un épithélium pluristratifié comparable à l'épithélium cornéen dans 80 % des cas en moyenne. Ces cellules expriment à la fois des marqueurs de différenciation cornéenne (*CK3*, *CK12*) et des marqueurs de progéniteurs cellulaires (*Ki67* et *p63*) (Rohaina et al. 2013).

D'autres sources cellulaires sont utilisées tel que les cellules conjonctivales, les cellules du follicule pileux, les cellules de la pulpe dentaire et les cellules induites à la pluripotence (iPS). Les cornées traitées ne présentent pas de néovascularisation et sont transparentes contrairement aux cornées témoins qui sont opaques (De Luca et al. 1990 ; Gomes et al. 2010 ; Meyer-Blazejewska et al. 2011 ; Hayashi et al. 2012 ; Ricardo et al. 2013 ; Kocaba et al. 2014).

Le taux de succès de ces greffes est estimé entre 50 et 90 %. La persistance du défaut limbique et l'invasion par un tissu fibroblastique de la cornée sont responsables de ce taux de réussite de la greffe relativement faible (Satake et al. 2011 ; Sotozono et al. 2013).

2.7.2.3 Utilisation des cellules souches stromales limbiques

Afin d'étudier la capacité des SSC à restaurer la transparence de la cornée, Du et coll. ont généré des souris *Lum*^{-/-}. Le lumican est un des protéoglycanes de la cornée responsable de l'organisation des fibres de collagène. Chez les souris *Lum*^{-/-}, la désorganisation des fibres de collagène mène à l'opacité cornéenne. Après injection de cellules souches stromales, l'épaisseur du stroma, l'organisation des fibres de collagène ainsi que la transparence de la cornée ont été restaurées (Du et al. 2009). D'autres groupes étudient les mécanismes par lesquelles les SSC empêchent le dépôt de tissu fibrotique et la formation de cicatrice. Hertsenberg et coll. ont montré que les cellules injectées inhibent la migration des neutrophiles, qui sont les premiers sur le site de la lésion et recrutent ainsi les autres molécules inflammatoires. Les SSC sécrètent le TSG 6 (tumor necrosis factor α stimulated gene 6 protein), qui rentre dans la régulation de la migration des neutrophiles. Les SSC empêchent le dépôt de protéines responsables de la fibrose (collagen III, tenascin et

l'actine alpha du muscle lisse) par la sécrétion active d'une matrice extracellulaire organisée (Hertsenberget al., 2017).

Les SSC ont des propriétés immunosuppressives, ce qui permet leur utilisation en thérapie cellulaire et ingénierie tissulaire dans le traitement des pathologies touchant la cornée sans risque de rejet (Koulikovska et al. 2015). Dans une coculture avec des cellules mononucléaires du sang périphérique, les SSC inhibent la prolifération des lymphocytes T seulement après 3 jours en culture. L'activité immunosuppressive des SSC est médiée par plusieurs facteurs, IL-6, IL-10, TGF β , Galectin-1, Leukemia inhibitory factor (LIF) et la Prostaglandine E2 (PGE2) (Vreb et al., 2016 ; Bray et al., 2014).

La récente découverte de ces cellules fait d'elles le sujet de plusieurs travaux de thérapie cellulaires. Lors de la 3^{ème} partie de ma thèse le pouvoir réparateur de ces cellules souches sera étudié sur un modèle animal de lésion stromale développé dans notre laboratoire.

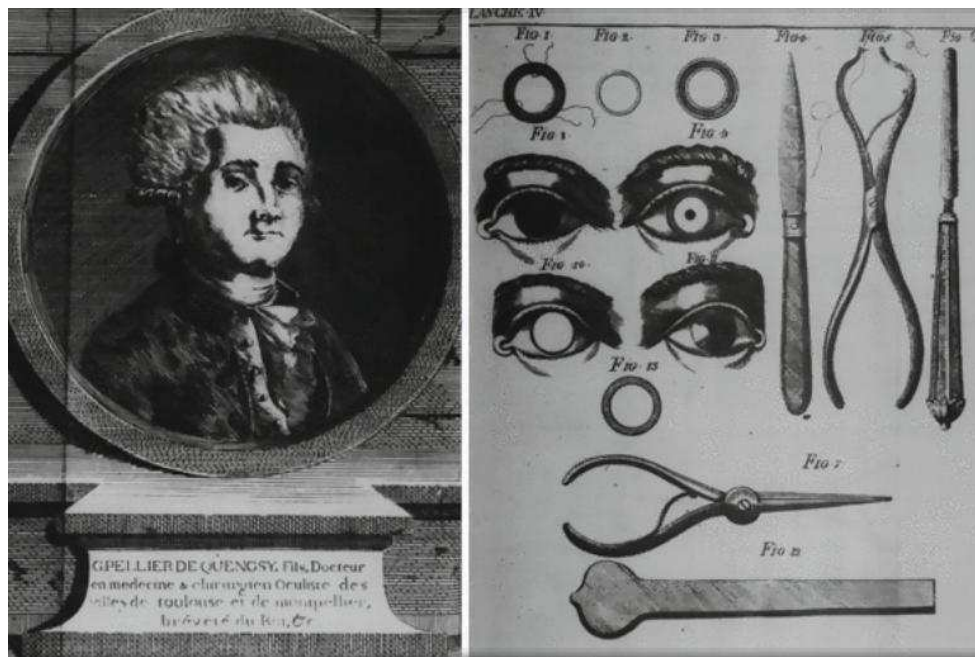


Figure 17. Guillaume Pellier de Quengsy et la description détaillée du matériel proposés pour la greffe des kératoprothèses.

2.7.3 Kératoprothèses (KPros)

La première cornée artificielle a été proposée il y a plus de 200 ans par Guillaume Pellier de Quengsy (Chirila et al. 1999). Cet ophtalmologiste français a décrit pour la première fois le matériel et les étapes de remplacement d'une cornée opaque par une lentille de cristal (**Figure 17**). Par la suite de nombreux ophtalmologistes se sont essayés à la mise au point de ces cornées artificielles. Les premiers dispositifs étaient faits de matériaux rigides, et les complications étaient très nombreuses comme la survenue de réactions inflammatoires et d'infections, l'impossibilité pour les nutriments et l'oxygène de diffuser, et la faiblesse de la bio-intégration ; tout ceci est lié aux nombreux échecs de leur utilisation.

Les KPros utilisées aujourd'hui en clinique (Gomaa et al., 2010 ; Colby and Koo, 2011 ; Jiraskova et al., 2011 ; Griffith et al., 2012) diffèrent selon les matériaux, la forme et le mode d'implantation (**Figure 18**). Parmi celles-ci, les KPros contenant au moins un matériau biocolonisable, la Boston Kpro et l'AlphaCor. (Choyce, 1972). L'AlphaCor™ est constituée d'un polymère biocompatible, le poly (2-hydroxyméthyl méthacrylate) ou pHEMA (Colby and Koo, 2011 ; Hicks et al., 2006). Cette KPro a des propriétés telles que la perméabilité aux nutriments et à l'oxygène et la capacité à être colonisé par les kératocytes de l'hôte (Hicks et al., 2002 ; Griffith et al., 2002).

Il existe aussi les KPros constituées d'un support biologique autologue tel qu'une dent ou de l'os comme les ostéo-odonto-kératoprothèses (OOKP). (Strampelli et al. 1965) et la Boston Kpro constitué d'un tissu conjonctival. (Girard et al. 1969). Ici aussi, la formation d'une membrane fibreuse opaque sur la face postérieure de la prothèse est un frein à l'utilisation de ces KPros (Griffith et al., 2002).

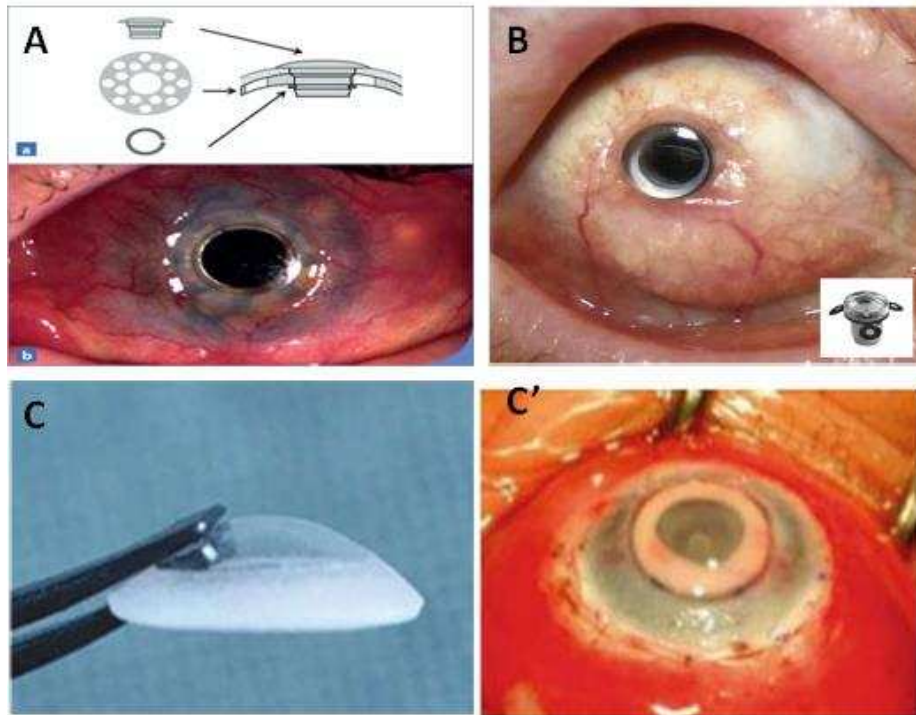


Figure 18. Les kératoprothèses utilisées en cliniques.

A) Œil greffé avec une Boston Kpro.

B) Patient greffé avec une ostéo-odonto-kératoprothèse.

C et C') L'AlphaCor™ constituée de polymère biocompatible le PHEMA.

2.7.4 Cornées décellularisées

La décellularisation de la cornée consiste à enlever les cellules de la cornée à greffer, qui sont potentiellement immunogènes, pour ne garder que la matrice extracellulaire afin qu'elle soit colonisée par les cellules hôtes. Des cornées porcines sont utilisées par plusieurs groupes (Zhang et al., 2015 ; Xu et al., 2008). Celles-ci ont la propriété d'avoir une taille et une épaisseur proche de la cornée humaine et d'être largement disponibles (Choi et al., 2011). Des cornées bovines et des cornées humaines ont aussi été utilisées (Proulx et al., 2009 ; Shafiq et al., 2012). Les protocoles de décellularisation devraient permettre l'élimination de toutes les cellules sans toucher l'organisation de la matrice, ni sa transparence. Gonzalez-Andrades et son équipe ont décrit dans leur étude, que l'utilisation de 1.5M de NaCl pour la décellularisation permet de garder la transparence de la cornée et l'organisation générale de celle-ci, contrairement à l'utilisation du SDS qui perturbe la matrice extracellulaire et provoque une perte de transparence (**Figure 19**) (Gonzalez-

Andrades et al. 2011). Les cornées décellularisées devraient permettre une recolonisation par les cellules de l'hôte (Proulx et al., 2009 ; Shafiq et al., 2012 ; Bayyoud et al., 2012).

La transplantation d'une cornée porcine décellularisée chez le lapin montre une bonne intégration, l'absence d'inflammation et pas de rejet (Du et Wu 2010 ; Pang et al., 2010). L'analyse histologique montre la migration et l'infiltration des cellules à l'intérieur de ces greffons. Une réépithélialisation peut survenir 3 à 8 jours après la greffe. (Huang et al., 2011 ; Li et al., 2011). Les divergences dans les protocoles de décellularisation restent un frein à l'utilisation de ces cornées.

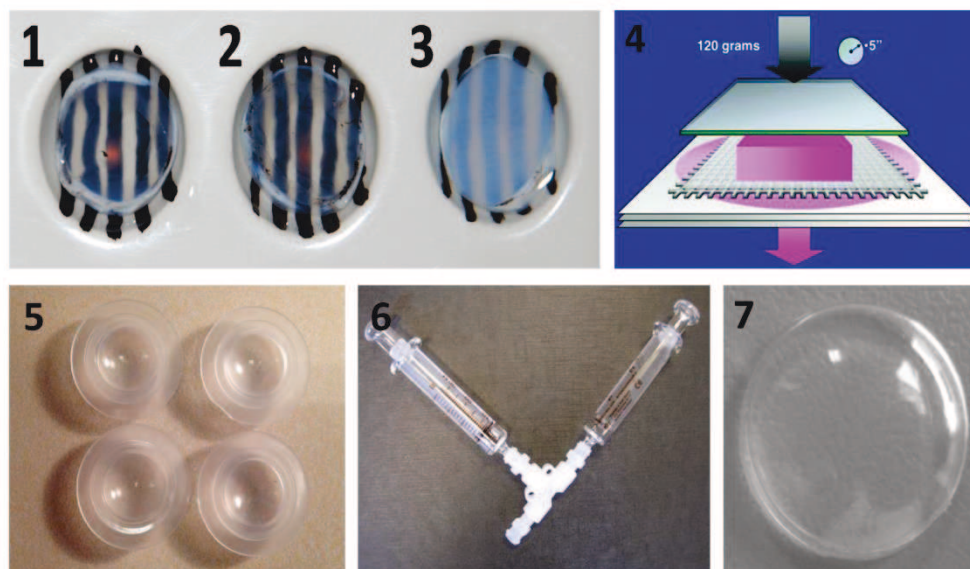


Figure 19. Méthodes de synthèse de cornées artificielles.

1, 2 et 3 représentent le traitement par 1,5 M NaCl et 0,1% SDS des cornées de porcines afin de les décellulariser. Le traitement par le SDS diminue la transparence de la cornée. (Gonzalez-Andrades et al. 2011)

4. représente un schéma de la technique de compression du collagène afin de le déshydrater. (Mi et al., 2013)

5, 6, 7. Réticulation du collagène pour l'obtention d'une matrice résistante mécaniquement, cette technique utilise un moule d'une épaisseur de 500 μm (5), deux seringues pour mélanger le collagène et l'agent réticulant (6), obtention d'une cornée transparente (7). (Islam et al., 2013)

2.7.5 Cornées artificielles

Une autre voie de recherche concerne le développement de cornées artificielles synthétisées intégralement à partir de produits biologiques tel que le collagène de type I (Tidu et al. 2015 ; Fagerholm et al. 2010 ; Poliseti et al. ; 2013) utilisé pour la fabrication de matrices transparentes et bio-colonisables. Le collagène I est bicompatible, biodégradable et non immunogène. Le gel de collagène conventionnel est très difficile à manipuler ; de plus les fibrilles le composant sont dispersées et pas du tout organisées (Chandran et al. 2004). Afin de le stabiliser et d'augmenter sa résistance mécanique, plusieurs techniques sont utilisées telles que la réticulation chimique par création de liaison entre les fibres de collagènes, en utilisant du 1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl) carbodiimide (EDC) ou du N-hydroxysuccinimide (NHS) (Liu et al., 2008 ; Fagerholm et al., 2010) : une greffe lamellaire de ces cornées sur 10 patients, a montré une régénération de l'épithélium, une migration partielle des kératocytes à l'intérieur de l'implant et une croissance partielle des nerfs (Fagerholm et al., 2009 et 2010) .

Une autre technique pour augmenter la résistance mécanique du gel de collagène, est la déshydratation du collagène par compression. Le collagène est ainsi mis entre des lamelles en plastique et du papier absorbant puis comprimé à l'aide d'une lame de verre, la variation dans la concentration en collagène et le temps de compression a permis de déterminer le bon protocole pour obtenir un collagène plus solide mécaniquement et constituer une matrice permettant la culture cellulaire (Mi et al. 2013).

La synthèse d'une matrice extracellulaire par les cellules elles-même est une autre approche en voie de développement (Guo et al., 2007 ; Proulx et al., 2010). Le principe est d'induire la synthèse du collagène par les kératocytes en culture ; l'apport du TGF- β et de l'acide ascorbique au milieu de culture induisent cette sécrétion. L'équipe de Germain a induit la sécrétion de la matrice extracellulaire par des fibroblastes, puis les voiles de matrice obtenue ont été superposés afin d'obtenir un stroma artificiel multistratifié (Proulx et al., 2010). Afin que le collagène sécrété s'organise en fibres parallèles, certains groupes utilisent des plaques de cultures contenant un substrat alignée (Wu et al., 2013 ; Phu et al., 2011) et d'autres le font magnétiquement (Builles et al., 2010). Le tissu produit par ces méthodes est entièrement biologique ; cela permet de réduire les risques de rejet en cas de greffe. Une production autologue de ces tissus est envisageable.

Objectifs

3. Objectifs de la thèse

Afin de répondre au besoin des patients atteints de pathologies cornéennes cécitantes, l'objectif de ce travail est de développer des techniques de thérapie cellulaire et de bio-ingénierie tissulaire pour la production d'une cornée artificielle en alternative à la prise en charge chirurgicale conventionnelle (greffes de tissus allogéniques ou autologues).

Dans un premier temps, nous avons étudiés **les caractéristiques de la niche des cellules souches limbiques** (les palissades de Vogt). La caractérisation de cette niche nous permettra de répondre à notre première interrogation qui est de trouver la région limbique contenant de grande quantité de cellules souches, par la même occasion sa caractérisation nous permettra *in vitro* et par bio-ingénierie tissulaire de reproduire un limbe artificiel, ce qui pourrait procurer un capital important de cellules souches viables et fonctionnelles au patient. Afin d'y répondre une première technique d'imagerie est utiliser, la microscopie à cohérence optique plein champ (FFOCM) suivie de la culture cellulaire des différentes régions limbiques (**Article 1.** Grieve K, Ghoubay D, Georgeon C, Thouvenin O, Bouheraoua N, Paques M, Borderie VM. 2015. Three-dimensional structure of the mammalian limbal stem cell niche. *Exp Eye Res.* Nov; 140:75-84.).

Pour une future utilisation des cellules souches cornéennes en clinique, leurs culture doit se faire sur des milieux ne contenant pas de produits d'origines animale ni n'utilise de cellules nourricières. Dans cette optique notre deuxième objectif a été d'isoler les deux types cellulaires dans des milieux exempts de produits d'origine animale. (**Article 2.** Ghoubay D, De Sousa C, Martos R, Latour G, Schanne-Klein MC, Dupin E, Borderie V. 2017. Easy xeno-free and feeder-free method for isolating and growing limbal stromal and epithelial stem cells of the human cornea. *Plos One*, révision mineure).

Une fois caractérisées, on souhaite savoir si les cellules souches stromales limbiques sont capables *in vivo* de régénérer le stroma après une lésion provoquant une opacification cornéenne? Le pouvoir réparateur/régénérateur des cellules souches stromales a été étudié. La première série d'expérimentations a consisté à mettre au point et à valider un modèle animal d'atteinte cornéenne stromale. Nous avons mis au point un modèle murin de choc thermique cornéen par application d'azote sur le stroma, afin d'induire l'apoptose de kératocytes, perturber le réseau de collagène du stroma et obtenir une opacité cornéenne. La deuxième série d'expérimentations a eu pour but de tester le pouvoir réparateur des

Objectifs

cellules souches limbiques stromales après injection intrastromale dans le modèle animal obtenu. Nous avons étudié, par plusieurs techniques d'imagerie et d'immunohistochimie, le maintien des cellules injectées, leur prolifération, leur migration dans la cornée hôte, la synthèse d'une matrice extracellulaire, la ré-innervation et l'effet sur la transparence cornéenne (**Partie 3**).

La dernière partie de ma thèse a consisté à **élaborer et mettre en forme une matrice à base de collagène I** (collagène majoritaire du stroma cornéen) **contenant les différents types cellulaires retrouvés dans la cornée (Article 3)**. Dans un premier temps nous avons déterminé les conditions chimiques permettant d'atteindre des caractéristiques biomécaniques acceptables tout en préservant la transparence et l'organisation des fibrilles de collagène au sein des matrices. Le développement de cette matrice s'est appuyé principalement sur les expertises et la collaboration étroite avec l'équipe Matériaux et Biologie, Laboratoire de Chimie de la Matière Condensée de Paris, UMR7574-UPMC/CNRS/Collège de France. Par la suite, nous avons cherché à adapter la chimie du matériau de façon à favoriser la culture concomitante des cellules épithéliales et des kératocytes. (Tidu A., Ghoubay-Benallaoua D., Lynch B., Haye B., Illoul C., Allain J.-M., Borderie V.M., Mosser G., 2015. Development of human corneal epithelium on organized fibrillated transparent collagen matrices synthesized at high concentration. *Acta Biomater* 22:50-58).

Résultats

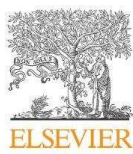
4. Résultats

4.1. Article 1 : Caractérisation de la niche limbique

La connaissance de la structure 3D de la niche limbique est essentielle en thérapie cellulaire et pour la bio-ingénierie tissulaire (Nelson et al., 2006). L'équipe de Daniels, en utilisant du collagène I et une méthode d'absorption du collagène a réussi à mimer la niche limbique. Ses structures sont stables en culture et les cellules souches limbiques repeuplent cette surface en conservant leur caractère indifférencié au sein de cette niche artificielle (Levis et al., 2013). L'impression 3D a aussi été utilisée pour reproduire la niche limbique (Phillippi et al., 2008).

Plusieurs auteurs ont exploré la niche limbique avec plusieurs méthodes: la lampe à fente (Goldberg and Bron, 1982 ; Townsend, 1991), l'histologie (Dua et al., 2005, Shanmuganathan et al., 2007, Nubile et al., 2013 ; Molvær et al 2013), la microscopie confocale (Shortt et al 2007, Yeung et al 2008), la microscopie électronique (Dua et al., 2005, Shanmuganathan et al., 2007 ; Shortt et al., 2007) et la tomographie à cohérence optique (OCT) (Bizheva et al., 2011; Lathrop et al., 2012). Dans notre étude l'exploration des cryptes a été réalisée à l'aide de la microscopie à cohérence optique plein champ. Cette technique permet de réaliser, de façon non invasive, des images à plusieurs centaines de micromètres de profondeur dans les tissus biologiques non fixés et avec une résolution de l'ordre de 1 μm . Elle permet donc une imagerie à l'échelle tissulaire et cellulaire, ce que ne permettent pas la lampe à fente et l'OCT conventionnel. De plus le tissu imagé n'est pas modifié par la fixation et la coloration utilisées en histologie et en microscopie électronique. Enfin elle permet une visualisation de la niche limbique sur 360°, ce qui est impossible en pratique avec la microscopie confocale dont le champ est très étroit. Le nombre de cryptes, leurs orientations ainsi que leurs profondeurs ont été déterminés.

Le but de cette étude était de déterminer les caractéristiques de la niche limbique des mammifères afin de reproduire in vitro et par bio-ingénierie tissulaire un limbe artificiel, ce qui pourrait procurer un capital important de cellules souches viables et fonctionnelles au patient greffé.



Three-dimensional structure of the mammalian limbal stem cell niche



K. Grieve^{a, b, *}, D. Ghoubay^{a, b}, C. Georgeon^a, O. Thouvenin^c, N. Bouheraoua^{a, b},
M. Paques^{a, b}, V.M. Borderie^{a, b}

^a Quinze Vingt National Ophthalmology Hospital, 28 rue de Charonne, 75012 Paris, France

^b Vision Institute, UPMC Université Paris 06, UMR_S 968/INSERM, U968/CHNO des XV-XX/CNRS, UMR_7210, France

^c Institut Langevin, 1 rue Jussieu, 75005 Paris, France

Abstract

Although the existence of the limbal stem cell (LSC) niche is accepted, precise knowledge of its three-dimensional (3D) architecture remains incomplete. The LSC niche was explored on freshly excised and organ-cultured corneoscleral rims from human donors (n=47), pigs (n=15) and mice (n=27) with full-field optical coherence microscopy (FFOCM). Limbal crypt features were detected in 90% of organ-cultured human corneoscleral rims, extending between the palisades of Vogt as radially oriented rectangular (74% of eyes) and/or rounded (23% of eyes) forms, often branching off to, or becoming interconnected by, sub-scleral radially or circumferentially oriented crypts (in 56% of eyes). Mean crypt volume represented 16% of sampled limbal volume on the vertical axis and 8% on the horizontal axis. In pigs, palisades were finer and crypts wider with relatively uniform distribution around the eye, and radial orientation, connecting to numerous narrow criss-crossing invaginations beneath the scleral surface. In mice, only a circumferential limbal trough was detected. Mean crypt volume represented 13% of sampled limbal volume in humans, 9% in pigs and 7% in mice. FFOCM combined with fluorescence, and confocal fluorescence microscopy, showed presence of p63- α^+ cells and cytokeratin-3+ cells in the limbal crypts. To assess colony forming efficiency (CFE), limbal epithelial cells were cultured at low density with mitomycin-arrested 3T3 feeders. CFE increased with limbal crypt volume and was not significantly decreased in organ-cultured cornea, despite degradation of the epithelial roof, suggesting that stem cells remain protected at the base of crypts during organ culture. CFE in human samples was significantly greater than in pig, and CFE in mouse was zero. Crypt architecture in the three species appears associated with eye exposure to light. LSC density increased with percentage limbal volume occupied by crypts.

1. Introduction

The limbal stem cell niche, situated at the anatomic border of the conjunctiva and the cornea (Levis et al 2013, Eberwein et al 2014, Rama et al 2010), provides a microenvironment that contributes to the development and maintenance of the extracellular matrix, resident cells, and their signals that define a stem cell niche (Eberwein et al, 2014, Dua et al, 2005). The distinctive protected environment of the corneoscleral limbus features dense vascularization, innervation, and protection from potential light damage thanks to the presence of melanin pigmentation (Davanger and Evensen, 1971, Goldberg and Bron, 1982 and Townsend, 1991). The corneal transition and limbal palisade regions appear to control growth factor signaling in order to provide a unique microenvironment for corneal epithelial stem and progenitor cells. While constituents of the stem cell compartment in the posterior limbus may provide extrinsic signals that contribute to maintenance of stemness (Tseng, 1996; Morrison et al, 1997; Watt et Hogan, 2000; U. Schlötzer-Schrehardt et al, 2005 et 2007), components of the late progenitor cell compartment in the anterior limbus may regulate the phenotypic changes that are necessary to repopulate the regenerating corneal epithelium (U. Schlötzer-Schrehardt et al, 2007).

The existence of the limbal niche is accepted, but precise knowledge of its 3D architecture remains elusive (Dziasko et al 2014). Exploration of the architecture of the corneal limbus and the limbal crypts has been carried out using different techniques, with different structures found (Goldberg and Bron 1982, Townsend 1991, Dua et al 2005, Shortt et al 2007, Shanmuganathan et al 2007, Miri et al 2012, Lathrop et al 2012, Molvær et al 2013). Both Goldberg and Bron (1982) and Townsend (1991) examined the corneal limbus with a slit lamp and described the palisades of Vogt as a series of radially oriented fibrovascular ridges, concentrated along the upper and lower corneoscleral limbus, separated by interpalisade epithelial rete ridges. They found high variability of the palisade zone from one individual to another and within the same eye, along with high variability of the shape of palisades and interpalisade epithelial crypts, including radially oriented rectangular and/or circular or oval forms, and branching or interconnection of the palisades to produce a trabecular pattern. Indeed, the high variability led Goldberg and Bron (1982) to conclude that the limbal palisade pattern is as individual as a fingerprint. Limbal crypt structure has been explored using histology (Dua et al 2005, Shanmuganathan et al 2007, Nubile et al 2013, Molvær et al 2013), confocal fluorescence microscopy (Shortt et al 2007, Yeung et al 2008), electron microscopy

(Dua et al 2005, Shanmuganathan et al 2007, Shortt et al 2007) in vivo confocal reflectance microscopy (Shortt et al 2007, Miri et al 2012, Deng et al 2012) and optical coherence tomography (OCT) (Bizheva et al 2011, Lathrop et al 2012). Shortt et al (2007) documented the portion of the limbus located toward the cornea using confocal and electron microscopy, and described the presence of both limbal crypts (LCs) between the palisades of Vogt and focal stromal projections (FSPs) at the corneal edge of the limbus, extending in a fingerlike pattern from the palisades and hence appearing circular/oval in the en face imaging plane of confocal microscopy. Dua et al (2005) and Shanmuganathan et al (2007) used histology to document the existence of larger, less frequent crypt structures that they termed limbal epithelial crypts (LECs) that contained radial, circumferential and oblique interconnecting components and descended from the epithelium to beneath the scleral surface. Confocal reflectance microscopy, using for example the HRT II with the Rostock module (Heidelberg, Germany) can perform non-invasive imaging of the limbal region, in ex vivo or in vivo tissues (Miri et al 2012), but its small field size (300 to 400 μm x 300 to 400 μm) prevents viewing of the whole of the limbal region in depth in a single acquisition, and cross-sectional information is not available. In addition, histology and electron microscopy are invasive and require fixation, staining, and slicing of tissue. OCT imaging, along with confocal microscopy, of the 3D structure of the limbus in fixed human corneoscleral rims (Lathrop et al 2012) revealed a combination of the structures described in the literature including the variety of palisade and interpalisade patterns with their intra and inter-individual variability, along with structures that may correspond to LCs, LECs and FSPs. The current study sought to assess stem cell presence in relation to morphology by exploring the 3D structure of the limbal crypts using FFOCM, a technique that allows non-invasive micrometric exploration of the 3D volume in unfixed, unsliced ex vivo tissue without staining.

OCT is an imaging modality analogous to ultrasound but using light reflected from structures inside tissue (Huang et al 1991). Conventional OCT is widely used in ophthalmology to image both the anterior and posterior segment. Axial resolution is typically on the order of 5 μm , and lateral resolution on the order of 10-20 μm .

FFOCM (Beaurepaire et al 1998, Dubois et al 2002) is a variant of conventional OCT in which two dimensional (2D) en face images are captured on a camera and three-dimensional (3D) data sets may be obtained by scanning in the depth direction. This configuration and the use of white light sources allow for higher axial and transverse resolution than conventional OCT, on the order of 1 μm . No contrast agents are required as contrast is entirely endogenous. FFOCM can therefore perform micrometer resolution 3D imaging non-invasively in fresh or

fixed ex vivo biological tissue samples. FFOCM has been used to image ophthalmic tissues including cornea (Ghouali et al 2014, Akiba et al 2006), lens and retina (Grieve et al 2004), as well as skin (Dalimier et al 2012), brain (Assayag et al 2013a), breast (Assayag et al 2013b) and gastrointestinal tissues (Grieve et al 2014).

Here FFOCM was applied to imaging of the limbal region of the corneoscleral rim of humans, pigs and mice, in order to further understanding of the 3D architecture of the limbal stem cell niche in unfixed tissues in these three species.

2 Materials and Methods

2.1 Tissues

This study was carried out according to the tenets of the Declaration of Helsinki and followed international ethical requirements for human tissues, and was approved by our local institutional review board for human experimentation.

Forty seven human corneoscleral rims were imaged, of which 21 were from males, 18 females, 8 sex unknown, and average donor age of 71 (range 40-93).

Of the 47 corneoscleral rims imaged, 43 were organ-cultured and 4 fresh, of which 9 (7 organ-cultured and 2 fresh) were cultured for colony forming assays (CFA).

The forty three human cadaveric corneoscleral rims from donors originated from the Etablissement Français de Sang (EFS) cornea bank at Saint-Antoine Hospital, Paris, and were retained after the central corneas had been used for keratoplasty procedures on patients (8-mm trephination of the donor tissue). The donor corneas were preserved in CorneaMax (EuroBio, France) medium for a maximum of 35 days at 31°C, in accordance with European Eye Banking regulations. They were then placed in CorneaJet (EuroBio, France) medium containing Dextran for deturgescence 48h prior to transplantation, and transferred to the Quinze-Vingts Ophthalmology Hospital where grafts were performed. The corneoscleral rims were retained in CorneaJet (EuroBio, France) medium and imaged within 24h. Following imaging, they were transferred to the cell culture laboratory.

The four fresh cadaver donor corneas were obtained from the Surgery School of the Assistance Publique – Hôpitaux de Paris (AP-HP). These were imaged <24h post-mortem, then transferred to the cell culture laboratory.

All animal manipulation was performed in accordance with the ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research, and was approved by our local institutional review board for animal experimentation.

Fifteen pig eyes (albino English – pigmented Belgian cross-breed) were obtained from a private research facility. Eyes were removed within one hour after sacrifice of the animal and stored in phosphate buffered solution (PBS). On arrival at the FFOCM imaging location (<4 hours post-mortem) they were transferred to DMEM medium and dissected for imaging. The corneoscleral button was removed and relief incisions made in the sclera in order to flatten the cornea for imaging. Of the fifteen pig eyes imaged, all were imaged fresh and one placed in organ-culture for 31 days in a flatmount position, and 3 (2 fresh, plus the one organ-cultured) were cultured for CFA.

Twenty-seven mouse eyes (C57 BL/6, Janvier labs, France) were obtained from the animal facility of the Vision Institute. Of the 27 mouse eyes imaged, 21 were fresh, unfixed tissue prepared for the current study, while six were recuperated from an unrelated study and had been fixed using 4% paraformaldehyde (PFA) and mounted on microscope slides. Mice were deeply anesthetized by pentobarbital and sacrificed by cervical dislocation. After sacrifice, the eyes were immediately removed and dissected to flatmount the cornea for imaging. 8 of the fresh mouse eyes were cultured for CFA. Two of the fresh mouse eyes were organ-cultured for 31 days in a flatmount position, imaged, and then also cultured for CFA.

To resume, 47 human (4 fresh, 43 organ-cultured), 15 pig (15 fresh, of which 1 subsequently organ-cultured) and 27 mouse (22 fresh, of which 2 subsequently organ-cultured, 6 fixed) were imaged; of which 9 human, 3 pig and 10 mouse samples were cultured for CFA.

2.2 FFOCM

The FFOCM instrument used is a commercial system (LLTech, France). It has been described previously (Ghouali et al 2014). Illumination is provided by a halogen source, whose short coherence length leads to an axial resolution of 1 μ m. The full field is illuminated and images are captured on a complementary metal oxide semiconductor (CMOS) camera. The interferometer arms hold a matched pair of microscope objectives in the Linnik configuration. 10X water immersion objectives with 0.3 numerical aperture lead to a lateral resolution of 1.6 μ m. Penetration depth depends on tissue content and transparency and ranges from approximately 200 μ m in sclera to 1000 μ m in cornea. Wide field images can be displayed by automated mosaicing to image samples up to 25mm in diameter, or stacks of images in depth can be captured. A 2 x 2 mm² stitched field is captured in less than five minutes, and a 200 μ m x 1mm x 1mm 3D stack is also captured in less than five minutes.

2.3 Image acquisition

For all species, wide field en face FFOCM images of the whole of each corneoscleral rim were captured along with 3D stacks of images at four equally spaced sampling points around each corneoscleral rim. Each of these stacks could be navigated in multiplanar, video or 3D mode in order to view the crypt structure. A photograph of each corneoscleral rim was also saved.

The wide field stitched image of each corneoscleral rim was captured close to the surface at a depth where the palisades of Vogt were most clearly visible (Fig. 1A). The four wide field image stacks (of depth x width x length of 150 μ m x 2mm x 4mm in human, 200 μ m x 2mm x 4mm in pig, and 150 μ m x 800 μ m x 800 μ m in mouse) were then captured at top, bottom, left and right regions of the corneoscleral rim (Fig. 1A, B, C, D, E), to provide the most complete coverage possible of the limbal region in a reasonable timeframe that yielded manageable datasets.

An incision was made in the sclera to mark 0° for the imaging data, and on transfer to the cell culture laboratory, the corneoscleral rim was cut into eight 45° segments for human and pig, numbered one to eight in a clockwise fashion. Each image data volume straddled two of the segments, so providing a sampling of crypt volume in each cultured explant. The protocol of donor cornea collection for the French Eye Banks and the Surgery School does not include recording information on the orientation of the cornea. In order to determine vertical (superior/inferior) and horizontal (temporal/nasal) axes, the long and short axes of the anterior surface of each cornea were measured on the photographs. Crypt distribution around the 360° circumference of the cornea could therefore be related to location on the vertical (superior/inferior) or horizontal (temporal/nasal) axes.

In mouse, each whole cornea was divided into four explants, each correlated to an image stack. Eye orientation was not recorded.

2.4 Image analysis

2.4.1 Qualitative assessment of crypt-richness of entire corneoscleral rim

The wide-field FFOCM images (Fig. 1A) at a single depth typically 30 μ m below the surface in organ-cultured human samples, 50 μ m in fresh human samples (where intact, thick epithelium meant the palisades of Vogt were located deeper than in organ-cultured samples),

70µm in pigs and 10µm in mouse were assessed to qualitatively determine overall visibility of limbal crypt structures and the palisades of Vogt in each corneoscleral rim, and also to identify potential crypt-rich areas within each corneoscleral rim. The wide-field image depth tended to lie toward the surface of the palisades of Vogt and the interpalisade epithelial crypts, where the typical limbal palisade patterns were most easily recognized, while sub-scleral crypts tended to be deeper. Morphological crypt features including shape (rectangular or rounded) and orientations (radial or circumferential) were tallied for all samples to give a percentage of overall number of samples with a particular feature visible.

2.4.2 Limbal crypt volume

Image processing software (Fiji, National Institutes of Health, USA) was used to perform thresholding and area quantification on slices averaged in 10µm depth bundles in each 3D image stack. Volumes were expressed as the percentage of each stack occupied by crypts:

$$\%V = 100 \times (\sum SA \times 10) / v \quad (2)$$

Where SA = surface area occupied by crypts in each 10µm en face bundle, over volume v = depth x width x length of 150µm x 2mm x 4mm in human, 200µm x 2mm x 4mm in pig, and 150µm x 800µm x 800µm in mouse.

2.5 Fluorescent labeling of epithelial and stem cells

As the contrast mechanism in FFOCM is intrinsic, due to changes in refractive index, fluorescent labels are not detected in FFOCM. In order to demonstrate the presence of stem cells and epithelial cells in the limbal crypt architecture imaged by FFOCM, we labeled and imaged specimens using fluorescence microscopy. We used both an Olympus laser scanning microscope FV-1200 (Olympus France, Rungis) for confocal fluorescence imaging of labeled specimens, with overlay of the fluorescence and FFOCM images in post-processing, and a prototype multimodal optical microscope that allows simultaneous co-located FFOCM and fluorescence imaging. Compared to previous fluorescence-FFOCM setups (Harms et al 2012, Auksoy et al 2012), in the set-up used here, fluorescence is acquired simultaneously with the FFOCM measurements, meaning image capture is faster.

Briefly, this set-up operated in a similar fashion to conventional FFOCM but with the addition of a blue light emitting diode (LED) (Thorlabs, M470L2, 650 mW) centered at 470nm blocked by an excitation filter ($\lambda=500\text{nm}$, Thorlabs, FES0500) to excite fluorophores. The

two illumination beams are combined and focused onto the sample, and in the detection path, FFOCM and fluorescence signals are separated by a Single Edge Dichroic Beamsplitter (BrightLine, $\lambda=593\text{nm}$, Di02-R594-22x27), and captured by two cameras, a CMOS from PhotonFocus for the FFOCM image and a scientific CMOS from PCO.edge to capture the fluorescence image, with additional filters placed in front of the detection cameras to ensure independence of the two paths. As the optical path into the tissue is parallel for the FFOCM and fluorescence channels, an identical region of the sample is captured simultaneously on the FFOCM and fluorescence cameras. 30X, NA 1.05 UPLSAPO oil immersion microscope objectives (Olympus France, Rungis) produced a field size of $260\mu\text{m} \times 260\mu\text{m}$ and a pixel sampling of 255nm per pixel. FFOCM image capture time is 2 ms, at a frame rate of 100 images per second. The fluorescence channel displays only one image, exposed for 800ms.

Corneoscleral rims were first imaged using the LLTech FFOCM system in order to have a wide-field image for correlation with the fluorescence images that cover smaller zones. Corneoscleral rims were then divided into three segments and human progenitor cells were identified with a whole mount immunofluorescence assay. Briefly, after fixation with 4% PFA for 1 hour, the cells were permeabilized and blocked with 0.5% triton X-100 and 0.2% gelatin in PBS for one night at room temperature followed by incubation with the anti cytokeratin 3 antibody (1:100) (monoclonal antibody Clone AE-5; Dako Trappes, France) and anti p63- α polyclonal antibody (1:50) (cell signaling technology, France) for 24 hours at room temperature, and then with the secondary antibody (Alexa Fluor 488, 1:600) for 2 hours at room temperature, and nuclei were counterstained with DAPI. One segment was incubated with phosphate-buffered solution (PBS) instead of the primary antibody to serve as a negative control.

Fluorescence-FFOCM images were taken of all three segments using the multimodal system. As the fluorescence-FFOCM set-up used allows imaging in only the green wavelength band, the Olympus confocal fluorescence microscope was preferred when we wished to label several cell types at once.

2.6 Colony Forming Assays

After FFOCM analysis, 9 human corneoscleral rims (2 fresh, 7 organ-cultured) were divided into 8 explants per rim, 3 pig corneoscleral rims (2 fresh, 1 organ-cultured) into 8 explants per

rim, and 10 mouse whole corneas (8 fresh, 2 organ-cultured) into 4 explants per cornea. According to the protocol described in Ghouby-Benallaoua et al 2013, explants were digested using 1mg/ml collagenase A (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) in cholera toxin-free Green medium at 37°C for 18 hours. Limbal epithelial cells were collected from the incubated tissues and dissociated into single cells by pipetting. The clonal growth ability of cultured limbal epithelial cells was evaluated by determining CFE. Swiss albino murine 3T3 fibroblasts (ATCC, Molsheim, France) were treated with 4µg/ml mitomycin C for 2 hours and then trypsinized and plated at a density of $2 \times 10^4/\text{cm}^2$ onto six-well culture plates. Enzymatically dissociated cells were seeded at low density (1000 cells/well) in six-well culture plates on 3T3 fibroblasts feeder layers (Nakamura et al 2004). Cultures were incubated at 37°C under 5% CO₂. They were observed three times a week by inverted phase-contrast microscopy. Growing epithelial cells were easily differentiated from feeder cells by morphology (i.e., polygonal versus spindle-shaped cells). A colony was defined as a group of eight or more contiguous adherent epithelial cells as described elsewhere (Ang et al 2004, Nakamura et al 2006, Yokoo et al 2008). Given the low density of seeded epithelial cells, colonies were not contiguous. The epithelial colonies were fixed on day 12 and stained with crystal violet and photographed. The CFE was defined as the percentage of cells forming colonies as follows: $\text{CFE (\%)} = (\text{number of counted colonies} / \text{number of seeded cells}) \times 100$. As explants in human and pig corneoscleral rims covered the entire limbal region, and in the mouse covered the entire cornea, the epithelial colonies formed could have originated from any location within these regions, i.e. we could not discriminate between clones originating from the corneal side of the limbus, scleral side of the limbus, or in mouse, central cornea.

2.7 Statistical analysis

One-way ANOVA was used to compare continuous variables between more than 2 groups. The Brown–Forsythe test was used to examine homogeneity of variance between groups. Where a significant difference between groups was detected, a post-hoc analysis was performed with the Tukey post-hoc test where group variance was homogenous and the Games–Howell post-hoc test where group variance was not homogenous. Wilcoxon rank sum test was used to compare continuous variables between 2 groups. Spearman rank correlation coefficient was used to assess correlation between continuous variables.

3 Results

3.1 Human

3.1.1 Description of crypt morphology

Organ-cultured corneas: Limbal crypts were observed in 90% of the organ-cultured human corneoscleral rims. Morphological description tallies indicated that crypt pattern including shape and orientation was highly variable from one individual to another and from one region of the limbus to another in the same subject. In en face views, rectangular shaped, radially oriented interpalisade crypts were seen in 74% of eyes (Fig 1F, G, H, I), rounded interpalisade crypts in 23% of eyes (Fig 1K, L), with interconnecting circumferential crypts in 56% of eyes (Fig 1I, J). Multiple crypt forms and orientations were seen in the same eye in 75% of eyes. Between the palisades of Vogt, crypts rose to the surface at the cornea, corresponding to LCs (interpalisades). Palisades often terminated in FSPs (Fig. 1M, N). On moving outward to the sclera, crypts then invaginated beneath the scleral surface (Fig1O, P, Q) corresponding to LECs. In cross-sectional views, crypts appeared toward the corneal edge as simple valleys between the palisades of Vogt (seen in 79% of eyes), which on moving toward the sclera became enlarged with a narrower epithelial outlet (seen in 41% of eyes), and then invaginated to a cavern beneath a scleral roof at the scleral side of the limbus (seen in 40% of eyes) (Fig 1H, J, P, Q, R, Supp Mat movies). Sub-scleral caverns could usually be followed to their epithelial outlet (Fig 1P, Q, R). On occasions where these sub-scleral caverns appeared to be isolated in surrounding sclera, their path to the epithelium may have passed outside of the imaged zone.

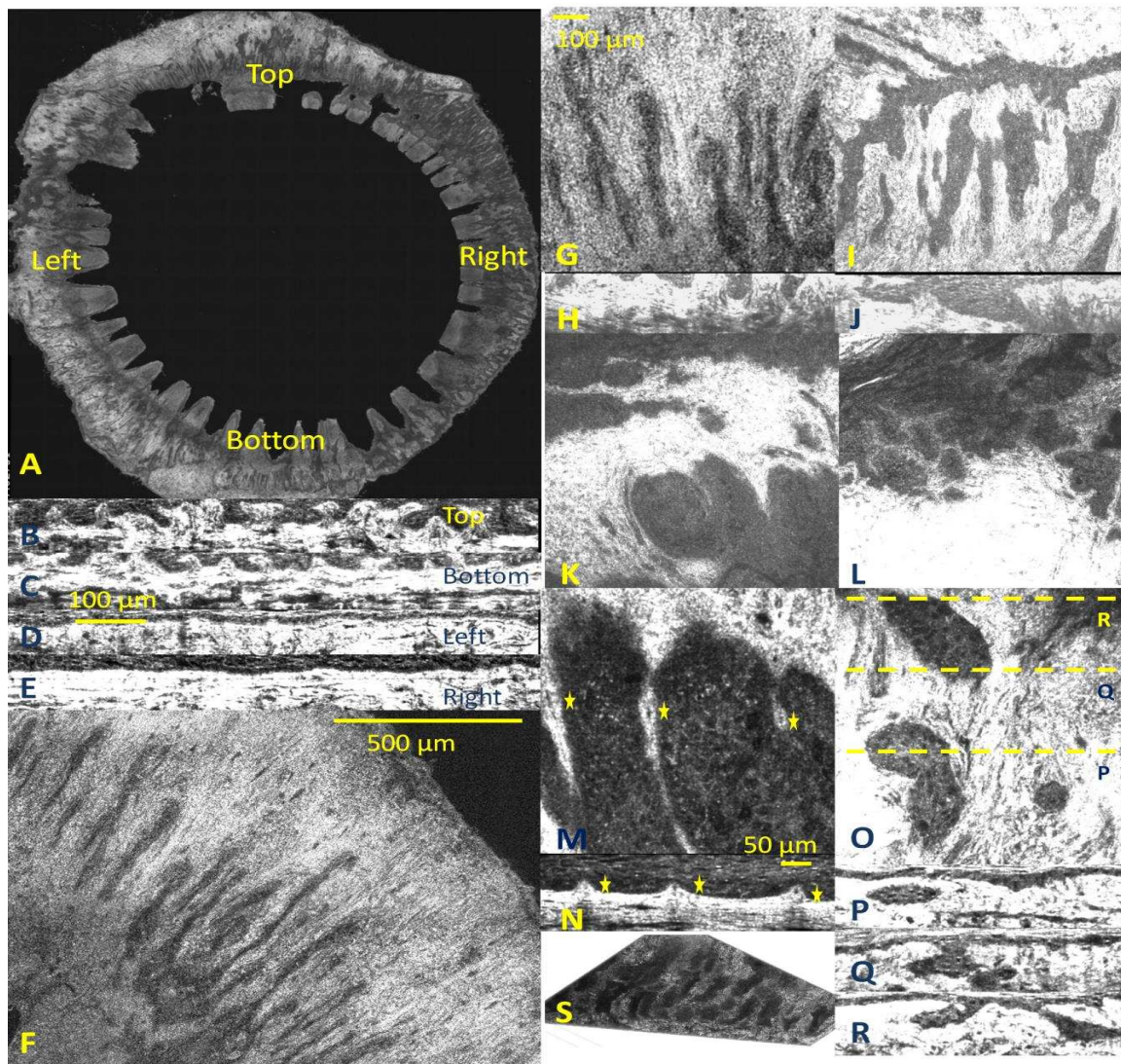


Fig. 1: Morphological features of the human limbal zone. A: entire 360° corneoscleral rim where corneal button has been removed for keratoplasty. B-E show cross-sections at top, bottom, left and right locations revealing that in this sample, crypts were visible on the vertical but not the horizontal axis. F: wide field view of corneoscleral rim portion. In G, I, K, L, M, O, R, sclera is towards top, cornea towards bottom edge of image. G: en face image of limbus with rectangular, radial palisade/interpalisade pattern, with H corresponding cross-section; I: en face image of limbus showing both radial limbal crypt pattern and interconnecting circumferential crypt towards sclera, with J: corresponding cross-section slicing through interconnecting scleral limbal epithelial crypt; examples of K: rounded crypt pattern and L: trabecular palisade pattern; M: zoom on focal stromal projections indicated by yellow stars (fingers of stroma emerging through epithelium, with oval or rounded appearance in some slicing planes), with N: corresponding cross section; O: apparently isolated sub-scleral crypt in the en face view is revealed in a sequence of cross-sections (P, Q, R) to have an epithelial outlet and link to a neighboring crypt; S: 3D representation of limbal zone. Supplementary movies 1 and 2 show en face and cross-sectional fly-throughs respectively corresponding to I, J here.

Fresh corneas: Little difference was observed in the crypt morphology between fresh and organ cultured specimens, aside from epithelial degradation. Fresh cadaver corneas had similar morphological features though had a greater quantity of intact epithelium, so maintaining a thicker epithelial roof with visible cellular details (Fig 2). Indeed, under superficial and wing cells layers, small, highly scattering basal cells with large nuclear to cytoplasmic ratio could be identified clinging to palisade walls and in sub-scleral caverns.

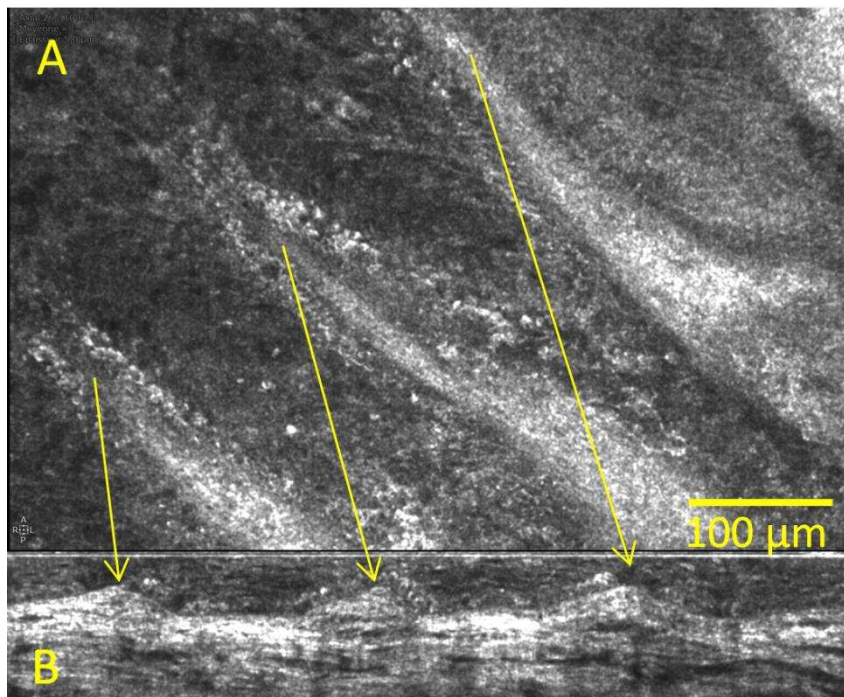


Fig. 2: Fresh human cornea. More intact epithelium can be noted than in organ-cultured cornea of Fig. 1, with epithelial cell details, particularly small, highly scattering basal cells clinging to palisade walls. A: en face view of palisades, with B: cross-sectional view of this zone. See supplementary material movie 3 to view en face movie descending in depth from surface to bottom of crypt structures.

3.1.2 Analysis of crypt distribution, area and volume around the limbus

Crypt distribution around the 360° circumference of the cornea could be related to location on the vertical (superior/inferior) or horizontal (temporal/nasal) axes by measuring the short (vertical) and long (horizontal) axes in each cornea (Fig 1A, B, C, D, E).

Crypts were detected on two opposing sides in 31% of eyes, on two neighboring sides in 18% of eyes, on 3 or 4 sides in 10% of eyes and on only one side in 41%. Average angular spread of crypt clusters was 50° (range 15° to 120°) with an average of 2 clusters per cornea (range 1 to 4) for all corneas with visible crypts. Average crypt depth in humans was 50µm (range 35 µm to 120 µm) and width 50µm (range 15 µm to 150 µm).

Limbal crypt volume per quadrant represented on average 13.0% (range 0 to 62%) of the limbal volume sampled (2mm x 4mm x 150µm). This figure was 15.8% for the vertical location and 8.1% for the horizontal location ($p=0.007$). The 95%-confidence interval of the limbal crypt volume per cornea was 0.0%-29.9%.

%V was significantly greater ($p<0.0001$) in fresh (39.8%, range 23% to 56%) than in organ-cultured tissue. No correlation of %V with age or age group (in 10 year groups) was observed in this study ($p=0.29$).

3.1.3 Fluorescent labeling of cells

Fluorescent labeling confirmed presence of p63- α ⁺ stem cells and epithelial cells with corneal differentiation (i.e., cytokeratin 3⁺ cells) in the crypt architecture (Fig. 3). These are seen to be coincident with the crypt structures viewed with FFOCM (Fig. 3A, B, C, D). Controls were negative (Fig. 3E, F). Imaging with confocal fluorescence microscopy allowed merged viewing of stem cells with other cell populations, showing that both stem and epithelial cells are present in human limbal crypts (Fig. 3G, H), though not colocalized.

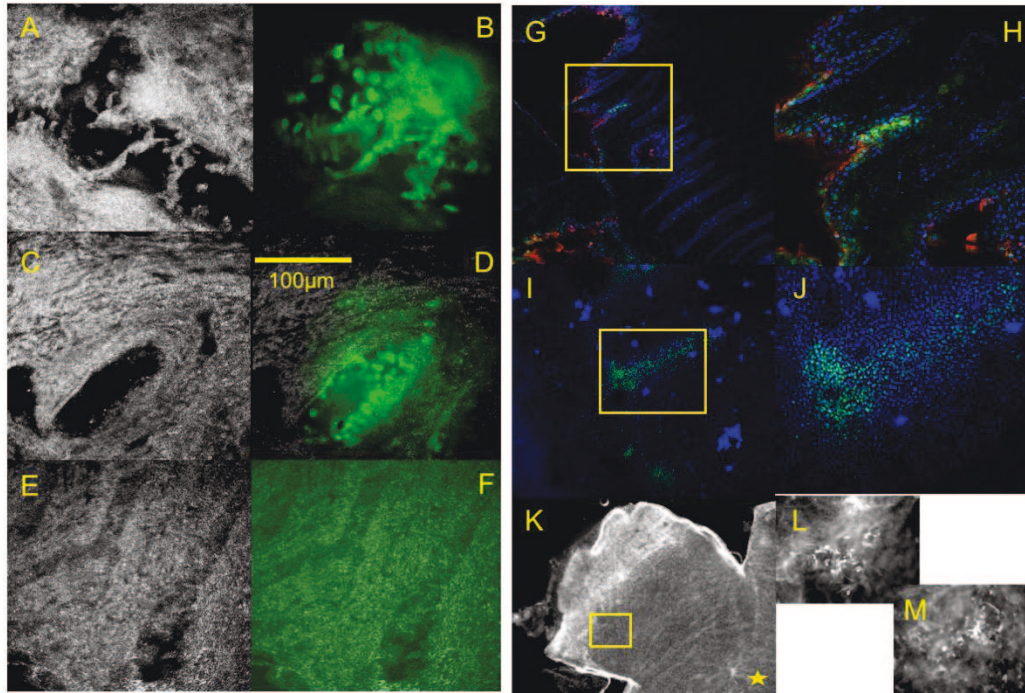


Fig. 3: Fluorescent labeling of stem cells. A, C, E: FFOCM images of crypts (260 μ m x 260 μ m field size) from the fluorescence-FFOCM setup with the fluorescence channel switched off. B, D, F: With the simultaneous fluorescence imaging, the fluorescence-FFOCM combined images show presence of epithelial cells (in green, B) and stem cells (in green, D) in the crypt architecture. Controls (E, F) showed only a uniform noise background in the fluorescence channel (F). G, H: human limbus imaged with a confocal fluorescence microscope with a X10 objective (G) and zoom (H) showing p63- α ⁺ (green), cytokeratin 3⁺ (red) and DAPI (blue) staining, where the sclera lies to the left and the cornea to the right of the image. p63- α ⁺ cells are visible in the base of a few crypts, while cytokeratin 3⁺ cells are not colocalized with p63- α ⁺, and are present in greatest number in higher imaging planes toward the sample surface and toward the cornea. I, J: porcine cornea imaged with a confocal fluorescence microscope with a X10 objective (I) and a X20 objective (J) showing p63- α ⁺ (green), and DAPI (blue) staining, where the sclera lies to the left and the cornea to the right of the image. p63- α ⁺ cells are visible within crypts. K: portion of a flat mounted mouse cornea at 5X, marked with p63- α and DAPI, showing location of central cornea (yellow star) and sclera, L: zoom on limbal region at 20X shows clumps of bright p63- α ⁺ cells, and M: at 20X some p63- α ⁺ cells distributed throughout central cornea.

3.1.4 Correlation between morphology and clone production

Colonies grown from dissociated limbal epithelial cells were associated with areas visibly rich in crypts (Fig. 4). The CFE (%) significantly increased with limbal crypt volume (%V), per segment ($r_s=0.42$, $p=0.001$) and per cornea ($r_s=0.82$, $p=0.02$; Fig. 4B). It should be noted that large %V over the sampled area does not necessarily mean large crypts: large %V can equally mean numerous small crypts.

The average CFE (%) was 1.8% overall, of which 2.4% was on the vertical axis and 1.4% on the horizontal axis ($p=0.17$).

In fresh cadaver corneas, CFE (%) was 2.1% overall, which was not significantly greater than in organ-cultured cornea ($p=0.67$; Fig. 4D).

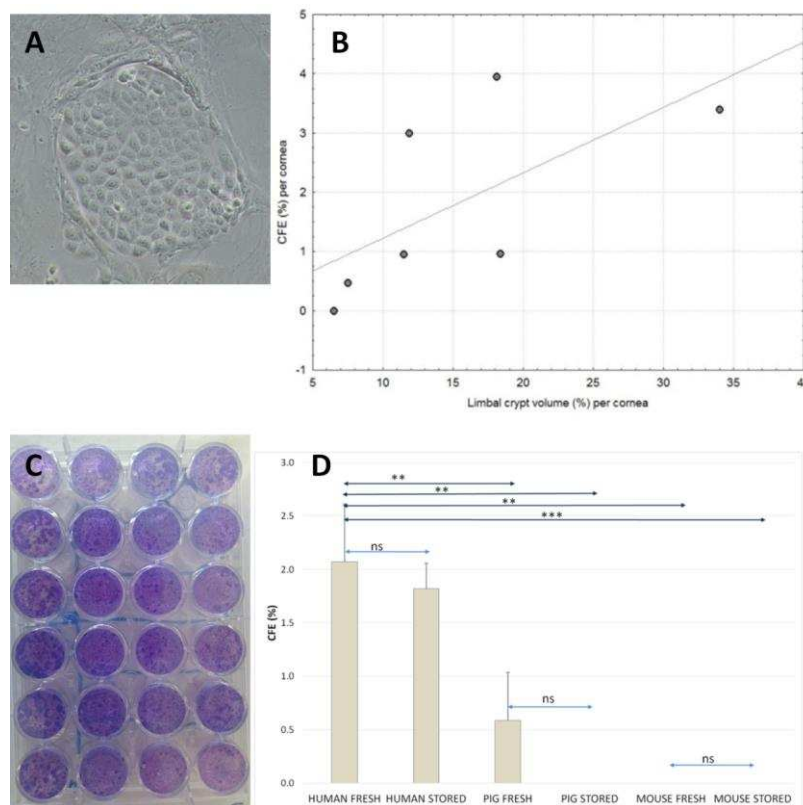


Fig. 4: Relating morphology to colony formation. A: photograph of colony from human sample. B: Colony forming efficiency (CFE%) versus limbal crypt volume per human cornea, showing strong correlation ($r=0.82$, $p=0.02$). C: photograph of colonies formed from 8 pig explants. D: CFE(%) in fresh versus stored (organ-cultured) human, pig, and mouse samples. CFE (%) was significantly higher in human tissue than pig (fresh $p=0.006$; organ-cultured $p=0.002$) and mouse (fresh $p=0.002$; organ-cultured $p<0.001$), while CFE(%) from fresh samples was not significantly greater than organ-cultured samples (human $p=0.62$; pig $p=0.39$; mouse $p=1.00$). Significance is indicated by asterisks (** for $0.01>p>0.001$; *** for $p<0.001$, ns for not significant).

3.2 Pig

In pig eyes (Fig. 5B), the palisade zone was located further toward the scleral than the corneal side of the limbus. Palisades were fine and interpalisade crypts wide and oval, in a uniform radial orientation, connecting to numerous narrow invaginations beneath the sclera in a trabecular pattern. Distribution was relatively uniform and continuous around the 360° of the eye as well as having similar depth (50µm), width (90µm), shape (oval) and orientation (radial) in all eyes. The limbal zone was 1.5mm wide.

Limbal crypt volume represented on average 9.5% (range 3 to 21%) of the limbal volume sampled (200µm x 2mm x 4mm). This figure was 9.2% for the vertical location and 9.8% for the horizontal location ($p=0.67$).

Fluorescent labeling revealed p63- α cells contained within crypts in pig (Fig. 3I, J). CFE (%) in fresh pig samples was 0.59% overall, of which 0.45% was on the vertical axis and 0.70% on the horizontal axis ($p=0.17$).

Organ-cultured pig cornea, after 31 days in organ culture conditions, showed epithelial degradation including detachment and undulations that increased surface scattering from the tissue, thereby decreasing penetration depth of the FFOCM images. The limbal crypt structure was faintly visible beneath the damaged epithelium and the palisade/interpalisade pattern appeared intact, though quantification was not possible due to the degraded image quality. CFE (%) in organ-cultured pig cornea was zero. This was not significantly different from CFE (%) in fresh pig cornea (Fig 5).

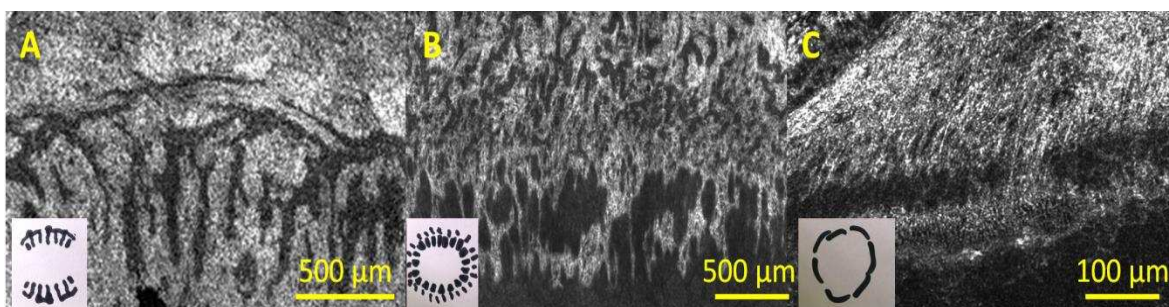


Fig. 5: Interspecies variability: human, pig and mouse limbal morphology. En face FFOCM images, with inset illustrations of geometry of crypt structure around 360° of eye, of A: human, B: pig and C: mouse limbus. FFOCM images are orientated with sclera at top, cornea at bottom. Images scaled to show equivalent region in each cornea (though differently sized due to different eye sizes).

3.3 Mouse

In fresh mouse cornea, the palisades of Vogt were not observed and the limbal region contained only an epithelial trough circumferentially surrounding the cornea (Fig. 5C). %V was therefore evaluated at zero for all mouse samples. Architecture of the limbus appeared unchanged after 31 days in organ culture, though the epithelium had thinned and surface cells were misshapen.

Fluorescent labeling with DAPI and p63- α using confocal fluorescence microscopy showed clumps of p63- α ⁺ cells present in the limbal trough, along with fewer isolated p63- α ⁺ cells distributed throughout the central cornea (Fig. 3K, L, M). CFA was unsuccessful in both fresh and organ-cultured mouse cornea, yielding a CFE (%) of zero for all samples.

3.4 Interspecies variability

Morphology of the limbal stem cell niche differed between species (Fig. 5).

CFE (%) according to tissue characteristics is shown in Fig. 4D. It was significantly higher in human tissues (either fresh or organ-cultured) than in pig and mouse tissues ($p < 0.01$). Differences between pig and mouse tissues were not significant ($p > 0.2$). For all 3 species, there were no significant differences in CFE (%) between fresh and organ-cultured tissues ($p > 0.3$).

4 Discussions

4.1 Crypt architecture

Crypt structures were detected in 90% of the human samples examined. This is in agreement with reported value of visibility of the palisades of Vogt in 80-90% of subjects (Townsend 1991, Patel et al 2006, Dua et al 2006). Visibility of palisades has been shown to be lower in non-pigmented individuals (Miri et al 2012) and to decrease with age (Goldberg and Bron 1982). The corneoscleral rims we obtained had an average age of 71 (range 40 to 93), and although information on each individual's racial origin was not supplied with the donor corneas, racial origin of donors is predominantly European-Caucasian (non-pigmented) in the French Eye Bank network. This may explain why palisades were not detected in 10% of samples imaged.

While Goldberg and Bron (1982) and Townsend (1991) used slit lamp examination to describe the morphology of the limbal region as containing a variety of palisade and

interpalisade patterns and forms, more precise microscopic morphology described by Shortt et al (2007) included the presence of both LCs between the palisades of Vogt and FSPs at the corneal edge of the limbus, while Dua et al (2005) and Shanmuganathan et al (2007) describe the existence of larger, less frequent crypt structures that they term LECs that contained radial, circumferential and oblique components and descended beneath the scleral surface. In the current study, all of the features previously described were seen. FSPs were less frequently detected as distinct features than in previous studies (Shortt et al 2007, Miri et al 2012), possibly due to epithelial degradation in organ-cultured cornea making them appear simply as terminations of the palisades. Miri et al 2012 used laser scanning confocal microscopy to image the limbal zone in vivo, in depth in 46 subjects. They describe a similar crypt architecture to that detected here on the surface, however in depth they suggest that palisades and interpalisade crypts (or epithelial rete pegs) inverse their contrast, so that the structures which interlink the network beneath the conjunctival surface are identified as the palisades. Via 3D navigation of our data sets to the depths at which this contrast inversion was observed, we suggest that the dark regions below palisades are caused by shadowing from the palisades on the surface, and at this depth we are in fact viewing only sclera. We identified interlinking dark structures towards the conjunctiva, at depths between 0 μm and 120 μm , as crypts rather than palisades.

While Goldberg and Bron 1982 and Shortt et al 2007 found that crypt rich areas were most commonly located in superior and inferior regions, where the cells would be best protected by the eyelids, Shanmuganathan et al 2007 found the highest incidence of crypts in a temporal location, followed by an equal frequency superiorly and inferiorly, with least frequent incidence nasally. The current study discovered superior or inferior crypt locations to be double the incidence of a temporal or nasal location. It would be desirable to relate our data on 360° distribution of crypts to temporal/nasal/superior/inferior quadrants, rather than just the axis. This could be achieved by creating a specific protocol for donor cornea removal and storage of the Eye Banking network of France to include orientation information.

The precise non-invasive 3D imaging performed using FFOCM provides information on the morphology of the limbal crypt network on unfixed, unstained, whole tissue samples. This morphological information could be valuable in the design of artificial molds for stem cell culture for artificial limbus fabrication (Levis et al 2013). Our quantitative assessment of the limbal crypts showed that stroma represented the most important component of the niche volume with the epithelial component representing less than 20%.

The data on pig and mouse crypt architecture indicate the differences between species. Radially oriented crypts extending beneath the scleral roof were found in humans and pigs but not in mice. This architecture provides protection from visible light and ultraviolet irradiation. Interestingly, the former species have a diurnal activity whereas the latter has a nocturnal activity. Ultraviolet (UV) B radiation induces damage to the human corneal epithelium, such as epithelial sloughing, decreased mitotic rate, and decreased Langerhans cell density (Borderie et al 1996, Haaskjold et al 1993). Interestingly, the porcine limbus has been shown to share features with the human limbus such as high CFE achieved with epithelial cells harvested from crypt regions and expression of the putative stem cell markers p63- α and integrin β 1 (Notara et al 2011). The absence of regional variation of crypt volume in pigs as compared to humans could be explained by the different orientation of the eyes with respect to the face. The exposure of pig eyes due to their position on the side of the head and the lack of brow may mean that there is less variation in UV and visible radiation over the 360° of the eye. In the nocturnal mouse, protection from light has less importance, and this may be the reason that the stem cells are distributed in a limbal trough close to the epithelial surface as well as distributed throughout the central cornea (Majo et al 2008). Unsuccessful CFA in mouse by the method proposed for human and porcine samples is consistent with the literature (Majo et al 2008).

4.2 Fresh versus organ-cultured samples

Organ culture of human donor corneas is known to induce epithelial sloughing. After the deswelling period in dextran-supplemented medium, the corneal epithelium is reduced to two cell layers (Borderie et al 1995). The remaining epithelial cells appear flattened. They feature normal endoplasmic reticula, glycogen, mitochondria and nuclei, presence of hemidesmosomes on the basal cell membrane of the basal epithelial cells and desmosomes in the epithelium. The epithelial basement membrane is normal (Borderie et al 1997). In the present study, %V was reduced in organ-cultured tissue but CFE was preserved. Reduction in crypt volume in organ-cultured corneas may be explained by the reduced thickness of the limbal epithelium in organ-cultured tissue, while the limbal epithelial progenitors, located in the bottom of crypts, are preserved, thereby maintaining CFE.

4.3 Correlation of fluorescent labeling and FFOCM images

Use of an FFOCM system coupled with a fluorescence channel, that allows coincident and simultaneous OCT and fluorescence images to be acquired, successfully demonstrated presence of stem cells and epithelial cells within the crypt structures detected by FFOCM. Limitations of the multimodal fluorescence-FFOCM system used included lack of depth sectioning and use of a single color wavelength band for excitation and detection, plus low sensitivity in the fluorescence channel, so that the fluorescent signal was often weak in comparison to images obtained with the Olympus confocal fluorescence microscope. For these reasons, we display images from both fluorescence-FFOCM and confocal fluorescence microscopy. Determining the depth of the stem cells could be achieved by adding sectioning capability to the fluorescence-FFOCM system, and merged images using multiple markers at different emission wavelengths could be achieved by adding multiple illumination paths. A system including these upgrades is currently being developed.

4.4 Targeted biopsy

Imaging using FFOCM can provide a quick assessment of whether a corneoscleral rim is rich in crypts, and therefore a good candidate for assessing clone production in culture. This assessment step could improve efficiency in the culture of artificial limbus, by determining optimum samples for CFA. This type of targeted biopsy was previously proposed by Shortt et al 2007 using confocal reflectance microscopy. However we propose that FFOCM can provide such information more quickly and easily. Screening of donor corneas in tissue banks to choose the best candidates for limbal graft could also be performed with FFOCM. Proposed future developments of FFOCM technology include use of a camera allowing far more rapid image acquisition, so improving the efficiency of the technique for ex vivo imaging, but also potentially permitting in vivo imaging in the future (Grieve et al 2005).

5 Conclusion

The architecture of the human corneal limbal region has been explored with FFOCM and appears to show that the crypt structure includes narrow, frequent radial components stretching towards the cornea, between the palisades of Vogt, termed LCs by Shortt et al 2007, as well as larger, wider crypt volumes located toward and extending beneath the sclera in radial, circumferential and oblique directions, termed LECs by Dua et al 2005 and Shanmuganathan et al 2007. Crypts appear interlinked below the conjunctival surface at

depths around 80 μ m. All crypt-related architectural features found in the current study were contained within a 1mm width from cornea to sclera, and 120 μ m depth. Crypts were more likely to be found on the vertical axis than the horizontal axis in human. Limbal architecture in pig resembled that of humans but featured more homogeneous distribution around the 360° of the eye, while mouse limbus contained only a circumferential trough without radial crypts visible. Fluorescent labeling confirmed presence of stem cells in the crypt architecture detected. The architecture of the LSC niche appears to be linked to its density in LSC and species behavior and eye position, i.e. diurnal or nocturnal, and front versus side of the head along with presence or absence of brows. Finally, clone production correlated strongly with the limbal crypt volume in humans indicating that limbal crypts constitute a niche for adult limbal stem cells. FFOCM imaging could assist in assessment of the richness of the limbal crypts for targeted biopsy for cell culture in the fabrication of artificial bioengineered cornea.

4.2. Article 2 : Culture des cellules souches limbiques dans un milieu exempt de produits et cellules d'origine animale

Les premières cultures de cellules souches limbiques utilisent des produits issus d'animaux, telles que, les fibroblastes murins 3T3, le sérum de veau fœtal, la toxine cholérique et d'autres facteurs de croissances d'origine animale ; ces produits semblent bénéfiques pour la prolifération et l'expansion des cellules souches en culture. Le potentiel de transmission d'agents pathogènes, les risques de rejet et les nouvelles mesures impliquant l'utilisation de produits ne contenant pas de produits thérapeutiques annexes issus d'animaux pour la transition en clinique, ont redirigé les recherches afin de trouver des milieux GMP (Good Manufacturing Practice). Plusieurs études vont dans ce sens, en utilisant des fibroblastes humains comme cellules nourricières pour remplacer les 3T3 (Lu et al., 2012 ; Sharma et al., 2012), utilisation de sérum autologue humain, et du sérum du cordon ombilical au lieu du sérum de veau fœtal avec la même efficacité (Shahdadfar et al., 2012 ; Chakraborty et al., 2012 ; Varghese et al., 2010), l'utilisation de milieu de culture commerciaux ne contenant pas de produit d'origine animale, tels que « Iscove's modified Dulbecco's medium » et le « low-calcium Panserin 801 medium » pour la culture d'explant limbique (Na et al., 2015).

En préalable à mon travail de thèse, nous avons développé une technique de culture des cellules souches de l'épithélium cornéen (cellules souches limbiques) sans feeders et avec pour seul produit d'origine animale, du sérum de veau fœtal irradié provenant de pays non touchés par l'encéphalopathie spongiforme bovine. Les principes de cette technique sont les suivants :

1. La culture est une culture primaire réalisée à partir d'un explant limbique mince (Ghouby-Benallaoua et al., 2011)

 *Molecular Vision* 2011; 17:341-354 <<http://www.molvis.org/molvis/v17/a40>>
Received 30 August 2010 | Accepted 26 January 2011 | Published 1 February 2011

© 2011 Molecular Vision

Human epithelial cell cultures from superficial limbal explants

D. Ghouby-Benallaoua,^{1,3} E. Basli,¹ P. Goldschmidt,^{1,2} F. Pecha,^{1,3} C. Chaumeil,² L. Laroche,¹ V. Borderie^{1,3}

¹Institut de la Vision, UPMC Univ Paris 06, UMR_S 968 / INSERM, U968 / CHNO des XV-XX / CNRS, UMR_7210, Paris, France;

²Laboratoire du Centre Hospitalier National d'Ophtalmologie des Quinze-Vingts, Paris, France; ³Banque de Tissus, Établissement Français du Sang, Paris, France

2. Les cellules épithéliales limbiques sont cultivées sans feeders (Ghoubay-Benallaoua et al., 2013)

OPEN ACCESS Freely available online



Kinetics of Expansion of Human Limbal Epithelial Progenitor Cells in Primary Culture of Explants Without Feeders

Djida Ghoubay-Benallaoua^{1*}, Otman Sandali¹, Pablo Goldschmidt², Vincent Borderie^{1,3}

¹ Institut de la Vision, UPMC Université Paris 06, UMR_S 968 / INSERM, U968 / CHNO des XV-XX / CNRS, UMR_7210, Paris, France, ² Laboratoire du Centre Hospitalier National d'Ophthalmologie des Quinze-Vingts, Paris, France, ³ Banque de Tissus, Établissement Français du Sang, Site Saint-Antoine, Paris, France

3. La toxine cholérique est remplacée par de l'isoprotérénol dans le milieu de culture (Ghoubay-Benallaoua D et al., 2012)

Current Eye Research, 37(7), 644–653, 2012
Copyright © 2012 Informa Healthcare USA, Inc.
ISSN: 0271-3683 print/1460-2202 online
DOI: 10.3109/02713683.2012.669510

informa
healthcare

ORIGINAL ARTICLE

Effects of Isoproterenol and Cholera Toxin on Human Limbal Epithelial Cell Cultures

Djida Ghoubay-Benallaoua^{1,2,3}, Florence Pécha^{1,3}, Pablo Goldschmidt^{1,2}, Anne Fialaire-Legendre³, Christine Chaumeil², Laurent Laroche¹, and Vincent M. Borderie^{1,3}

¹Institut de la Vision, UPMC Université Paris 06, UMR_S 968/INSERM, U968/CHNO des XV-XX/CNRS, UMR_7210, Paris, France, ²Laboratoire du Centre Hospitalier National d'Ophthalmologie des Quinze-Vingts, Paris, and ³Banque de Tissus, Établissement Français du Sang, Site Saint Antoine Paris, France

Au cours de ces travaux nous avons pu déterminer que le limbe humain contenait environ 2000 cellules souches limbiques. La technique de culture utilisée a permis l'expansion de ces cellules d'un facteur 10 en 2 semaines (Ghoubay-Benallaoua et al. 2013).

L'objectif de notre projet était de proposer une méthode de culture facile, reproductible et respectant les règles de sécurité sanitaire, indispensables à son utilisation en clinique et permettant la culture des **cellules souches épithéliales et stromales limbiques** à partir d'une petite biopsie limbique. Le milieu que nous proposons ne contient pas de produit d'origine animale, ni ne nécessite l'utilisation de cellules nourricière. Il est facile d'utilisation puisque dans les conditions que nous proposons actuellement aucun additif n'est nécessaire pour la culture des cellules souches. De plus une version du milieu respectant les normes GMP existe sur le marché.

Easy xeno-free and feeder-free method for isolating and growing limbal stromal and epithelial stem cells of the human cornea

Article en révision dans le journal Plos One.

Djida Ghoubay^{1, 2*}, Céline de Sousa³, Raphaël Martos¹, Gaël Latour⁴, Marie-Claire Schanne-Klein⁵, Elisabeth Dupin¹, Vincent Borderie^{1, 2}.

¹ Institut de la Vision, Sorbonne Universités, INSERM, CNRS UMR 7210, UPMC Univ Paris 06, Paris, France ;

² Centre Hospitalier National d'Ophtalmologie des Quinze-Vingts

³ Etablissement Français du Sang – Ile-de-France, Paris, France,

⁴ Laboratoire Imagerie et Modélisation en Neurobiologie et Cancérologie, Univ. Paris-Sud, CNRS, Université Paris-Saclay, Orsay 91400, France,

⁵ Laboratoire d'Optique et Biosciences, Ecole polytechnique, CNRS, INSERM U1182, Université Paris-Saclay, Palaiseau 91120, France.

Abstract

Epithelial and stromal stem cells are required to maintain corneal transparency. The aim of the study was to develop a new method to isolate and grow both corneal stromal (SSC) and epithelial limbal (LSC) stem cells from small human limbal biopsies under culture conditions in accordance with safety requirements mandatory for clinical use in humans. Superficial limbal explants were retrieved from human donor corneo-scleral rims. Human limbal cells were dissociated by digestion with collagenase A, either after epithelial scraping or with no scraping. Isolated cells were cultured with Essential 8 medium (E8), E8 supplemented with EGF (E8+) or Green's medium with 3T3 feeder-layers. Cells were characterized by immunostaining, RT-qPCR, colony forming efficiency, sphere formation, population doubling, second harmonic generation microscopy and differentiation potentials. LSC were obtained from unscraped explants in E8, E8+ and Green's media and were characterized by colony formation and expression of *Pax6*, $\Delta Np63\alpha$, *Bmi1*, *ABCG2*, *Sox9* and *Vimentin*, with a few cells positive for *CK3*. LSC underwent 28 population doublings still forming colonies. SSC were obtained from both scraped and unscraped explants in E8 and E8+ media and were characterized by sphere formation, expression of *Pax6*, *Sox2*, *Bmi1*, *Nestin*, *ABCG2*, *Keratocan*, *Vimentin*, *Sox9*, *Sox10* and *HNK1*, production of collagen fibrils and differentiation into keratocytes, fibroblasts, myofibroblasts, neurons, adipocytes, chondrocytes and osteocytes. SSC underwent 48 population doublings still forming spheres. Thus, this new method allows both SSC and LSC to be isolated from small superficial limbal biopsies and to be primary cultured in feeder-free and xeno-free conditions, which will be useful for clinical purposes.

1 Introduction

The cornea is a transparent window essential for vision, which forms the central part of the ocular surface (Davies et al., 2010). The cornea is composed of three cell layers derived from two embryonic germ tissues: a stratified corneal epithelium of surface ectoderm origin, expressing the cytokeratins 3 and 12 (K3/K12), a stromal layer populated by keratocytes and composed of highly aligned collagen fibrils, and a monolayer of endothelial cells covering the posterior corneal surface (Hassell et al., 2010; Waring et al., 1982; Zhang et al., 2015). The stromal and endothelial layers are derived from the cranial neural crest cells that migrate along the optic vesicles and home to the anterior eye region (Creuzet et al., 2005; Gage et al., 2005; Lwigale et al., 2005; Lwigale et al., 2009; Yoshida et al., 2006).

Epithelial and stromal limbal stem cells, usually referred to as limbal stem cells (LSC) for epithelial cells and stromal stem cells (SSC) for stromal cells, are required to maintain corneal transparency (Nieto-Nicolau et al., 2016). Both stem cell types are located in the limbal niche (Dziasko et al. 2016).

Using full field optical coherence microscopy (FFOCM) coupled with a fluorescence channel, we have shown that LSC are localized in the limbal niche region at the bottom of the limbal crypts, which are located between the palisades of Vogt (Grieve et al. 2016). Through asymmetric division, one LSC generates a daughter LSC that contributes to the maintenance of the stem cell pool, and a transient amplifying cell (TAC) that migrates centripetally in the basal epithelial cell layer to the central cornea in order to replenish the corneal epithelium (Thoft et al., 1983). SSC are located in the corneal limbal region close to the epithelial LSC (Dziasko et al., 2016; Pinnamaneni et al., 2012). After injury of the corneal stroma, quiescent limbal stromal cells probably migrate from the limbal region to the site of injury. Stromal wound healing is a complex process involving cell death at the site of injury, migration of quiescent keratocytes followed by cell proliferation, differentiation and extracellular matrix synthesis and remodeling (Ljubimov et al., 2015).

Both types of corneal stem cells are used in stem cell transplantation assays in animal models and in clinical trials aimed at restoring corneal epithelial function and stromal transparency (Du et al., 2009; Basu et al., 2014; Zakaria et al., 2014). Potential targets are various corneal disorders including limbal deficiency for LSC, keratoconus and other corneal ectasias, and

corneal scars after infectious keratitis or trauma, for SSC. Furthermore, bioengineering technologies are currently developed, based on LSC and SSC, to prepare artificial cornea and limbal niche for transplantation (Levis et al., 2016; Tidu et al., 2015). These artificial tissues would be of interest to replace conventional donor tissues. In fact, there is a lack of cornea donor tissue worldwide, since only one recipient out of 70 can be provided with a human donor tissue (Gain et al., 2016).

Several different culture methods have been used to grow human LSC (Stasi et al., 2014). Each of these methods begins with a small epithelial biopsy grown as explant or dissociated cells, with or without feeder cells or bovine serum (Colabelli et al., 2010; Di Lorio et al., 2010; Thanos et al., 2010). Efforts have been made to investigate xenogeneic and feeder-free culture conditions (Na et al., 2015; Stasi et al., 2014; Varghese et al., 2010; Matthyssen et al., 2017). Small limbal biopsies (of 1-mm length) have been routinely retrieved from healthy donor eyes to isolate and grow LSC: either dissociated LSC are cultured with murine cell feeders, or LSC from limbal explants are grown on human amniotic membrane without feeders, before autologous transplantation in contralateral eyes presenting severe limbal deficiency (Rama et al., 2010; Sangwan et al., 2011). Hundreds of autologous cultured LSC transplantations have been performed in humans and small limbal biopsies taken in healthy donor eyes have been shown to be safe for the donor eye (Zhao et al., 2015).

The present study aimed to devise a method to isolate and grow both LSC and SSC from such biopsies under xeno-free and feeder-free culture conditions in order to meet safety requirements that are mandatory for clinical use in humans.

2 Materials and Methods

2.1 Isolation of human corneal progenitor cells

This study was carried out according to the tenets of the Declaration of Helsinki and followed international ethic requirements for human tissues. It was submitted to the Ethics Committee of the French Society of Ophthalmology (IRB 00008855 Société Française d'Ophthalmologie IRB#1) who waived approval for this type of study. Donor tissue procurement fulfilled all the legal requirements including absence of donor opposition to donation recorded in the French National Registry of Opposition and positive family testimony.

Donor tissue consisted of either corneo-scleral rim obtained during surgery after 8-mm trephination of the graft or corneal grafts discarded during storage due to low endothelial cell counts. All tissues were processed by the EFS -Ile-de-France Cornea Bank (Paris, France). For corneal grafts, an 8-mm trephination was performed to isolate corneo-scleral rims. Six human donor corneas, obtained between March 2016 and January 2017, were used to grow stem cells. The donor age ranged from 48 to 89 years with an average of 74 years.

Superficial limbal explants were prepared under a laminar flow. A stromal dissection between the anterior and mid-stroma was carried out using a 15° blade and sclera was carefully removed with scissors, resulting in superficial limbal rims that included limbal epithelium and superficial limbal stroma (Ghoubay-Benallaoua et al., 2011). The obtained superficial limbal rims were either scraped with a scalpel to remove the limbal epithelium, when the aim was to obtain only stromal cells, or processed with no epithelial scraping, when both stromal and epithelial cells were expected. The rims were then cut into small pieces and incubated overnight at 37°C in 500µL of basal medium, that is, Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Life Technologies, Courtaboeuf, France) containing 1mg/ml collagenase A (Sigma Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). Samples were then centrifuged and the supernatant was removed. One mL of DMEM was added and samples were centrifuged a second time followed by removal of the supernatant. Tissue debris was removed by filtration with a 100µm-pore diameter Macs SmartStrainers (Miltenyi Biotec, Paris, France). After centrifugation at 800g for 5 minutes (min), the cells were resuspended in DMEM and counted with a hemocytometer. Two types of isolated limbal cell (ILC) suspensions were obtained: cells prepared with epithelial scraping (ILC-scraping+) and cells prepared with no epithelial scraping (ILC-scraping-).

2.2 Culture of isolated limbal cells (ILC) in different conditions

The isolated limbal cell suspensions (ILC-scraping+ and ILC-scraping-) were divided into three samples: one for culture with murine cell feeder-layers in Green's medium, one for culture with no feeders in Essential 8 (E8) medium, and the last one for culture with no feeders in E8 medium supplemented with EGF (E8+).

Culture with 3T3 feeders in Green's medium: Swiss albino murine 3T3 fibroblasts (ATCC, Molsheim, France) were treated with 4µg/ml mitomycin C (Sigma Aldrich, St Quentin

Résultats - Culture des Cellules souches limbiques -

Fallavier, France) for 2 hours (hr) and then trypsinized and plated at a density of 3×10^4 cells per cm^2 in 24-well culture plates. The medium used was cholera toxin-free Green medium (Ghoubay-Benallaoua et al., 2013). It is made of a 3:1 mixture of calcium-free DMEM (Dutscher, Brumath, France) and Ham F12 medium (F12) (Life Technologies, Courtaboeuf, France), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Life Technologies), 1 mM/ml HEPES buffer (Life Technologies), 5 $\mu\text{g/ml}$ human recombinant insulin (Actrapid®, Novo Nordisk, Paris, France), 0.4 $\mu\text{g/ml}$ hydrocortisone (Pharmacia, Pfizer, Paris, France), 4 $\mu\text{M/ml}$ L-glutamine (Life Technologies), 2 pM/ml tri-iodo thyronine (Sigma Aldrich), 200 nM/ml adenine (Sigma Aldrich), 100 IU/ml penicillin (Life Technologies), 100 $\mu\text{g/ml}$ streptomycin (Life Technologies), 0.25 $\mu\text{g/ml}$ amphotericin B (Life Technologies), 2 $\mu\text{g/ml}$ isoproterenol (Hospira, Asnières, France) and 10 ng/ml human recombinant Epithelial Growth Factor (EGF) (Sigma Aldrich) (Ghoubay-Benallaoua et al., 2012). Isolated limbal cells were seeded on feeder-layers of 3T3 fibroblasts (2×10^3 /well) and cultured for 10 to 12 days at 37°C under 5% CO_2 . The culture medium was changed three times a week.

Culture with no feeders in E8 medium: Isolated limbal cells were seeded on 24-well culture plates at 10^4 cells/well in E8 medium (Life Technologies). E8 Medium is a xeno-free and feeder-free medium especially formulated for the growth and expansion of human pluripotent stem cells (PSCs) (Chen et al., 2011; Reichman et al., 2017). It is made of DMEM/F12, L-ascorbic acid, selenium, transferrin, NaHCO_3 , insulin, FGF2, and TGF β 2. E8 medium was supplemented with 1.5% Methylcellulose gel matrix (Sigma Aldrich) to prevent re-aggregation of isolated cells (Uchida et al., 2005). Cells were grown for 21 days at 37°C under 5% CO_2 . The culture medium was changed three times a week.

To separate the two types of cells for analysis, the spheres, floating in the E8 medium, were isolated by aspirating the medium while the adherent spheres were scraped away with a cone. The well was washed twice with PBS. Adherent cells outside colonies were then removed with TrypLE (5 min) (Life technologies) followed by washing with PBS. Colonies of polygonal cells were then dissociated with TrypLE (10 min).

Culture with no feeders in E8 medium supplemented with EGF (E8+): Isolated limbal cells were cultured in E8 medium supplemented with 10ng/ml of human recombinant EGF (Sigma Aldrich). Culture conditions were identical to those used for culture with no feeders in E8 medium, except for EGF supplementation of the medium.

2.3 Clonal cultures of isolated limbal cells (ILC)

Three corneas from 3 different donors (donor age ranged from 77 to 89 years) were used for these experiments.

ILC-scraping+ were cloned by limiting dilution. A solution of 0.5 cells per 100µl of E8 medium was prepared. 100µl of this solution were plated in each well of 96-well plates. Following microscopic scoring after 24 hr of culture, only wells containing a single cell were used for further experiments. Cells were grown for two weeks, then enzymatically dissociated and serially subcultured at a density of 10^4 cells per well until senescence.

ILC-scraping- were cloned by limiting dilution on a 3T3 feeder-layer in Green's medium. After microscopic scoring at day 5 of culture, only wells containing one colony were used for further experiments. Cells were grown for 12 days, then enzymatically dissociated and serially subcultured at a density of 10^4 cells per well until senescence.

The number of population doubling was determined at the end of each subculture and calculated with the following formula: $\log(N/N_0)/\log 2$, where N_0 is the number of plated cells and N is the number of cells at the end of culture period.

2.4 In vitro differentiation assays

Keratocyte and fibroblast differentiation: To promote differentiation of cultured cells into keratocytes, the cells dissociated from primary spheres cultured in E8 medium (using collagenase A 0.5mg/ml for 10 min at 37°C) or from adherent colonies (using TrypLE for 10 min at 37°C) cultured in E8 medium, were plated in DMEM/F12 supplemented with 200µM ascorbic acid (Sigma Aldrich). Fibroblastic differentiation was induced in DMEM/F12 supplemented with 10% FBS. After 14 days of culture, cells were fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) for immunostaining.

Neuronal differentiation: For neuronal differentiation, individual primary spheres obtained after 14 days of culture or dissociated colonies, were transferred onto coverslips coated with 100µg/mL poly-D-lysine (Sigma Aldrich) and 50µg/mL laminin (Sigma Aldrich). Cells were cultured for 10 days in E8 medium supplemented with 1% FBS and 2% B27 (Life Technologies), then fixed for immunostaining.

Osteocyte, chondrocyte and adipocyte differentiation: To investigate the differentiation of dissociated spheres and colonies into mesenchymal cell lineages, we used three culture media developed to promote chondrogenic, osteogenic and adipogenic differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs): StemPro® Chondrogenesis, Osteogenesis and Adipogenesis differentiation media, respectively (all from Life Technologies). MSCs from rat adult bone marrow were used as positive controls. Briefly, bone marrow was obtained from femur cavities of 8-week old Long Evans rats (Janvier Laboratories) after flushing in alpha-minimal essential medium, 10% FBS and 1% penicillin/streptomycin (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Cells dissociated from the spheres and colonies as well as control MSCs were plated at a density of 10^5 cells/cm² in the appropriate differentiation medium. After 21 days, cultured cells were fixed with 4% PFA for 30 min, before staining with 1% Alcian Blue (Sigma Aldrich) for 30 min, with 2% Alizarin Red for 2 to 3 min (Sigma Aldrich) or with Oil Red O for 15 min (Sigma Aldrich).

Synthesis of organized extracellular matrix by stromal stem cells: After primary culture of ILC-scraping+ in feeder-free E8 medium, spheres were harvested and plated in an aligned nanofiber substrate in 24-well plates (Sigma Aldrich) in order to promote synthesis of an organized collagen extracellular matrix. After 3 weeks, cultures were fixed with 4% PFA, and examined by confocal microscopy after immunostaining or by multiphoton microscopy without staining.

Multiphoton microscopy: Multiphoton microscopy was performed using a custom-developed laser scanning upright microscope as previously described (Latour et al., 2012). Two-photon excited fluorescence (2PEF) and second harmonic generation (SHG) images were recorded simultaneously in two different detection channels using appropriate spectral filters and they were combined using ImageJ software (NIH, Bethesda, MD, USA). These 2PEF/SHG images were obtained at increasing depths within the cells using a 25x, 1.05 NA objective lens with 0.4 μ m (lateral) x 1.8 μ m (axial) resolutions. Power at focus was 20 mW with 100 kHz pixel rate. The 2PEF images revealed endogenous fluorescence of the cells and SHG images specifically revealed collagen fibrils without any staining (Pavone et al., 2013).

2.5 Immunocytochemistry

Immunocytochemical analysis was performed in primary cultures of ILC-scraping+ and ILC-scraping- and after each in vitro differentiation assay. Briefly, cells were fixed with 4% PFA for 10 min, washed with PBS/Tween 0.25% (PBST), and incubated for 1 hour in PBS containing 0.3% Triton X100 and 0.2% gelatin (PBSGT) to block nonspecific binding. Cells were then incubated overnight at 4°C with primary antibodies diluted in PBST. After washing in PBS, cells were incubated for 1 hr at RT with the appropriate secondary antibodies diluted in PBST: Alexa Fluor 488 IgG (1:200) and Alexa Fluor 594 IgG (1:400) antibodies (Life Technologies). Nuclei were stained with Dapi (1:1000; Molecular Probes). Cells were washed 3 times, 5 min each with PBST followed by mounting with fluoromount-G (Clinisciences, Nanterre, France).

Primary antibodies used were: Human Natural Killer 1 (HNK1, pure hybridoma supernatant), Sox9 (1/400, Millipore, Saint-Quentin en Yvelines, France), Sox10 (1/300, Abcam, Paris, France), Bmi1 (1/200, Abcam), Pax6 (1/100, Millipore), Nestin (1/300, R&D systems, Lille, France), P63 α (1/50, Cell signaling Technology, Leidan, The Netherlands), Sox2 (1/200, R&D systems), Ck14 (1/100, Santa Cruz Biotechnology), Ck15 (1/100, Santa Cruz Biotechnology), Cytokeratin 3 (CK3, 1/100, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany), Lumican (1/200, Sigma Aldrich), Keratocan (1/200, Santa Cruz), α SMA (1/800, Sigma Aldrich), Vimentin (1/200, Dakocytomation, Glostrup, Denmark), β III Tubulin (1/200, R&D Systems), glial fibrillary acidic protein (GFAP, 1/500, Millipore), Tyrosine Hydroxylase (TH, 1/500, Millipore), Collagen I (1/200, Sigma Aldrich), Collagen IV (1/300, Millipore), Collagen V (1/100, Abcam) and Collagen 6A1 (1/300, Sigma).

Stained samples were observed with Olympus FV1000 laser-scanning confocal microscope (Olympus, Rungis, France). Twelve bit images were processed with ImageJ or FIJI, and Z-sections were projected on a single plane using maximum intensity under Z-project function. Images were finally converted in 24 bits RGB color mode and figures were then assembled.

2.6 Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR)

Total RNA was isolated from primary cultured cells in E8 medium, using the ReliaPrep RNA cell Miniprep System (Promega, Charbonnières-les-Bains, France) according to the manufacturer's instructions. The amount of total RNA isolated was quantified by optical

density at 260 nm. cDNA was reverse transcribed from 1 to 2 mg of total RNA with Quantitect Reverse Transcription Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Quantitative polymerase chain reaction (qPCR) of *CK3* (Life Technologies, Cat# Hs00365074-m1), *ΔNP63α* (Life Technologies, Cat# Hs00978337-m1), *KERATOCAN* (Life Technologies, Cat# Hs00559942-m1), *PAX6* (Life Technologies, Cat# Hs01088114-m1) and *SOX2* (Life Technologies, Cat# Hs 01053049-s1) genes was carried out in a 20μL solution containing cDNA and TaqMan Gene Expression Assay Mix (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). The results of real time qPCR were analyzed by the comparative threshold cycle method and normalized by using *18S RNA* (Life Technologies, Cat# Hs 9999991-s1) as an internal control. The amount of relative target gene mRNA was expressed with the following formula: $CT_{\text{gene}} - CT_{\text{internal control}} = \Delta CT$ and $1/\Delta CT$ were calculated.

3 Results

3.1 Isolated limbal cell culture and separation of LSC and SSC

Human limbal cells from 6 donors were dissociated from superficial limbal explants, either after epithelial scraping or with no scraping. The isolated limbal cells (ILC-scraping+ and ILC-scraping-) were plated in three different culture conditions to compare their capacity for formation of spheres and adherent colonies: uncoated wells with Green's medium and 3T3 feeders, E8 medium, and E8 medium supplemented with EGF.

Résultats - Culture des Cellules souches limbiques -

In feeder-free E8 medium (E8) and E8 medium supplemented with EGF (E8+), ILC-scraping+ (Fig 1A and 1B) formed spheres that eventually floated free in the medium, and isolated adherent cells, but no colonies. Compared with E8, the E8+ condition resulted in a lower number of spheres ($235 \pm 285/\text{cm}^2$ versus $657 \pm 256/\text{cm}^2$) and a higher number of adherent cells. ILC-scraping- (Fig 1D and 1E) formed spheres that eventually floated free in the medium, along with isolated adherent cells and few, albeit large individual colonies of polygonal cells, whereas the number of colonies appeared to be similar in E8 and E8+. In Green's medium with 3T3 feeder layer, ILC-scraping+ did not grow, hence only 3T3 fibroblasts could be observed (Fig 1C), whereas ILC-scraping- formed small and numerous colonies of polygonal cells surrounded by 3T3 fibroblasts with no spheres (Fig 1F). As the highest number of spheres was obtained with ILC-scraping+ grown in E8, this culture condition was used to produce stromal stem cells (SSC) in further experiments.

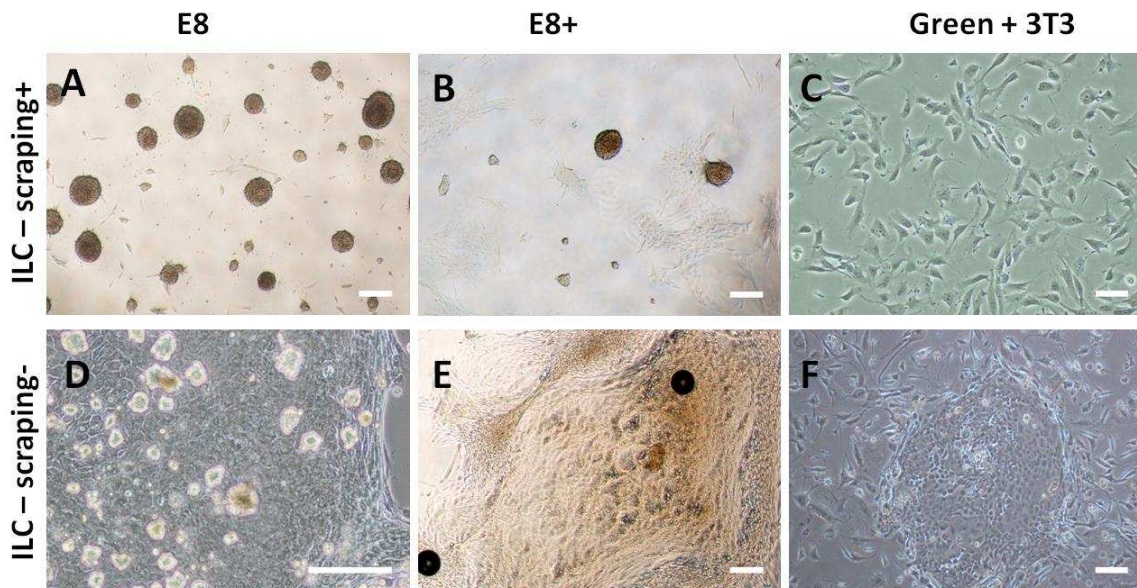


Figure 1. Colonies and spheres were obtained after primary culture of isolated limbal cells (ILC). ILC-scraping+ (A, B, C) and ILC-scraping- (D, E, F) were cultured in E8 (A, D), E8+ (B, E) and Green+ 3T3 (C, F) media. Spheres obtained after culture of ILC-scraping+ in E8 medium (A) are more numerous than in E8+ (B). More adherent cells are observed in E8+ than in E8 medium. No colonies are observed with ILC-scraping+ cultured in Green+3T3 medium and only 3T3 feeders are present (C). Culture of ILC-scraping- results in the presence of both spheres and colonies in E8 (D) and E8+ media (E). Colonies obtained in E8 medium are isolated and spheres float in the medium (D). Colonies obtained in E8+ medium are surrounded with cells (E). Colonies of polygonal cells with no spheres are observed with ILC-scraping- cultured in Green+3T3 medium (F). Bars, 200 μm .

3.2 Clonal growth of isolated SSC and LSC

To examine sphere formation and propagation potential of SSC, ILC-scraping+ were grown in E8 medium in limiting dilution assay. After 2 weeks, cultured cells formed spheres with a 1:1 ratio (i.e., 1 seeded cell formed 1 sphere). The average percentage of cells forming spheres was 4%. To evaluate the self-renewal capacity of SSC, primary spheres were dissociated and passaged under the same culture conditions. Secondary spheres were generated from dissociated primary spheres. In serial subculture, cloned cells could undergo 48 cumulative population doublings while maintaining their ability to form spheres (Fig 2). After 48 population doublings, cultured cells still divided but no longer formed spheres.

Epithelial LSC growth properties were investigated by limiting dilution assay using ILC-scraping- grown in Green's medium with 3T3 feeder layer. After 12 days, cultured cells eventually formed colonies of polygonal cells with a 1:1 ratio, showing that each colony derived from a single cell. The average percentage of cells forming spheres was 1.3%. At confluency, each clone was dissociated and serially subcultured in the same culture conditions. Colonies were obtained at each passage until senescence characterized by cell growth arrest, which occurred after 28 population doublings (Fig 2).

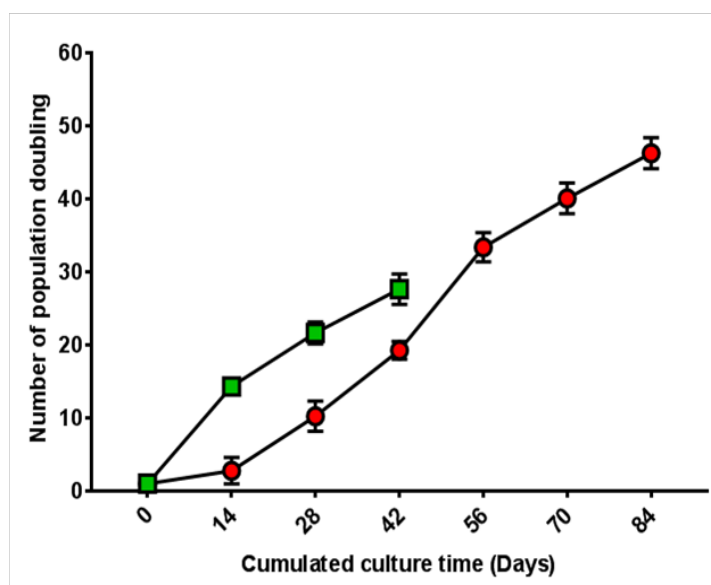


Figure 2. Growth potential of SSC and epithelial LSC. Isolated limbal cells (from 3 donors' corneas) were cloned by limiting dilution. ILC-scraping+ were plated in E8 medium and ILC-scraping- in Green+3T3 medium. Only wells containing 1 cell were used for culture. The potential of SSC (derived from ILC-scraping+) to grow until senescence was 48 population doublings (red), while the potential of LSC (from ILC-scraping-) was 28 population doublings in these culture conditions (Green).

3.3 Stem cell and lineage marker expression in LSC and SSC cultures

To phenotypically characterize cells developing in spheres and colonies derived from limbal explants, we first examined the expression of various markers by immunofluorescence: markers for stem cells (i.e., Pax6, Sox2, Bmi1, Nestin, ABCG2, and P63 α), neural crest cells (HNK1, Sox9 and Sox10), keratocytes (Vimentin and Keratocan) and corneal epithelial cells (CK3). As shown in Fig. 3, spheres were positive for Pax6, Sox2, Bmi1, Nestin, ABCG2, HNK1, Sox9, Sox10, Vimentin and Keratocan, and negative for P63 α and CK3. The colonies of polygonal cells showed immunoreactivity to Pax6 Bmi1, ABCG2, P63 α , Sox9 and Vimentin, with a few cells positive for CK3; in contrast, they were negative for Sox2, nestin, HNK1, Sox10 and Keratocan S1 Fig. shows staining of adherent cells obtained in E8+ medium. Adherent cells express Pax6, Bmi1, Nestin, ABCG2, Vimentin and Keratocan and they were negative for Sox2, P63 α , HNK1, Sox9, Sox10 and CK3. In addition, expression of some of these marker genes was assessed by qPCR analysis of the spheres and colonies. Transcripts of PAX6, KERATOCAN, Δ NP63A, and SOX2 were detected in SSC-derived spheres while the transcript of CK3 were not detected (Fig 4). Primary colonies of epithelial polygonal cells expressed transcripts for PAX6 and Δ NP63A whereas transcript for CK3, SOX2 and keratocan were not detected.

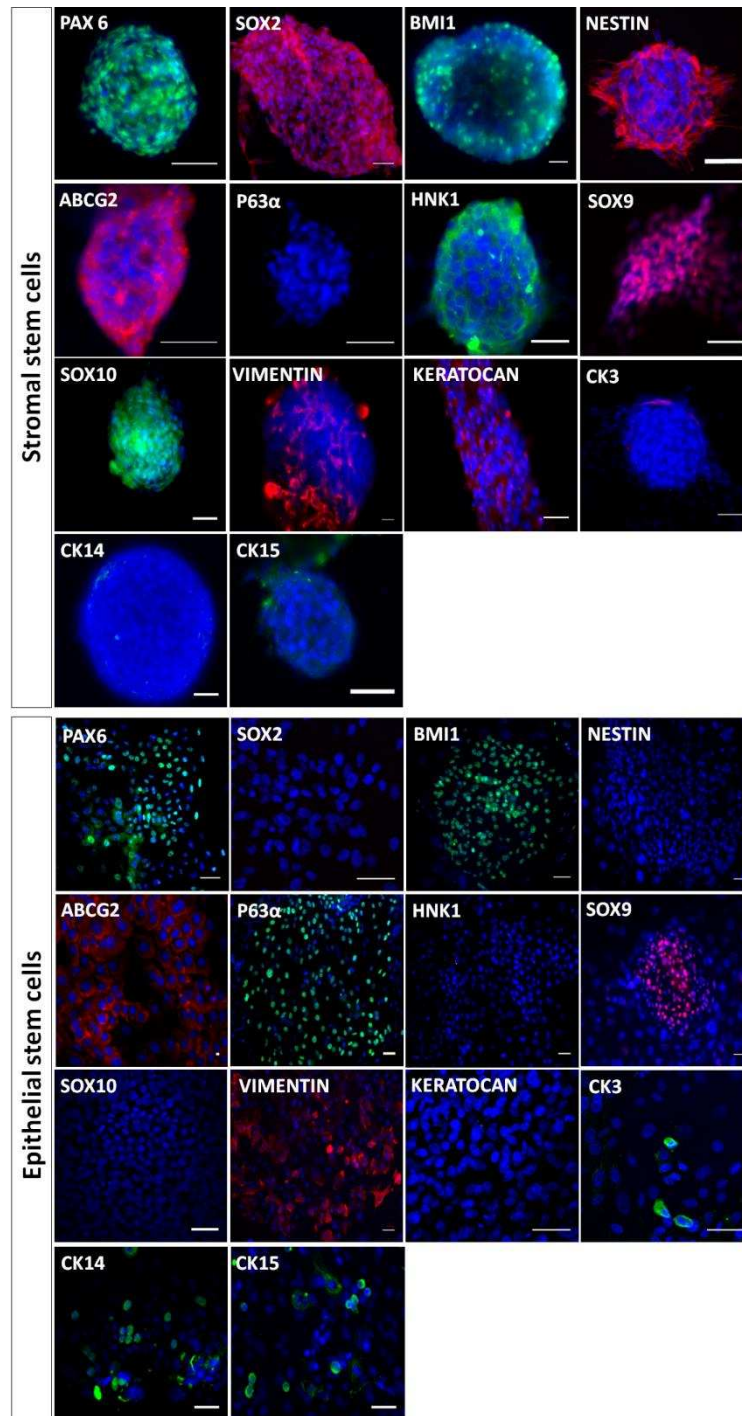


Figure 3. Marker analysis of SSC and LSC cultures by immunofluorescence. Stromal stem cells (spheres) were positive for all stem cell markers (Pax6, Sox2, Bmi1, Nestin and ABCG2) except P63α, and for keratocyte (Vimentin, Keratocan) and neural crest cell markers (HNK1, Sox9, Sox10) but negative for the corneal epithelial cell marker CK3. Epithelial limbal stem cells (colonies) were positive for the stem cell markers Pax6, Bmi1, ABCG2 and P63α but not for Sox2 and nestin. They featured low expression of the corneal epithelial cell marker CK3 and were Positive for Sox and Vimentin but negative for HNK1, Sox10 and Keratocan. Bars, 50μm.

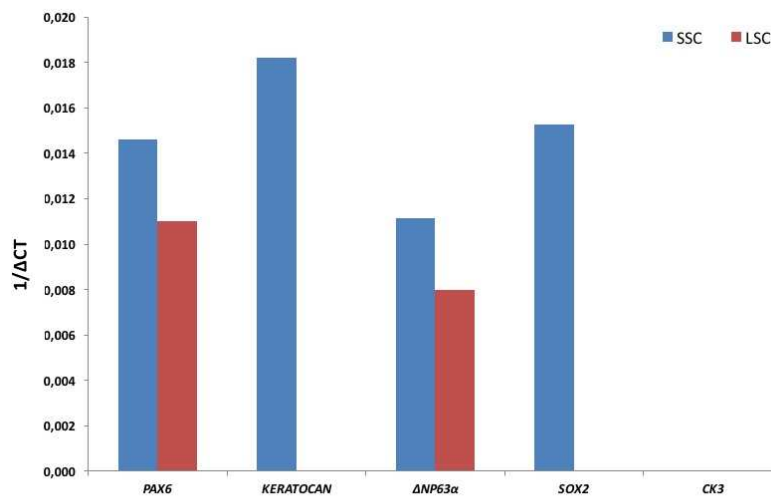


Figure 4. Marker gene expression in SSC and LSC by qRT-PCR analysis. SSC expressed *PAX6*, *KERATOCAN*, *ANP63A*, and *SOX2* while expression of *CK3* was negative. LSC expressed transcripts of *PAX6* and *ANP63A* but no transcripts for *KERATOCAN*, *CK3* and *SOX2* were detected in LSC

3.4 Synthesis of collagen extracellular matrix by stromal stem cells

After primary culture, spheres of SSC produced collagen type I, IV, V and VI with no preferential organization as revealed by immunofluorescence staining of collagens, which was confirmed by SHG microscopy (Fig 5A). In order to promote synthesis of organized collagen fibrils, the spheres of SSC were plated on aligned nanofiber multiwell plates. Phase contrast light microscopy showed that spheres then exhibited an elongated shape parallel to nanofibers. The collagen fibrils were also orientated along the nanofibers as revealed by immunofluorescence staining and polarization-resolved SHG microscopy (Fig 5B).

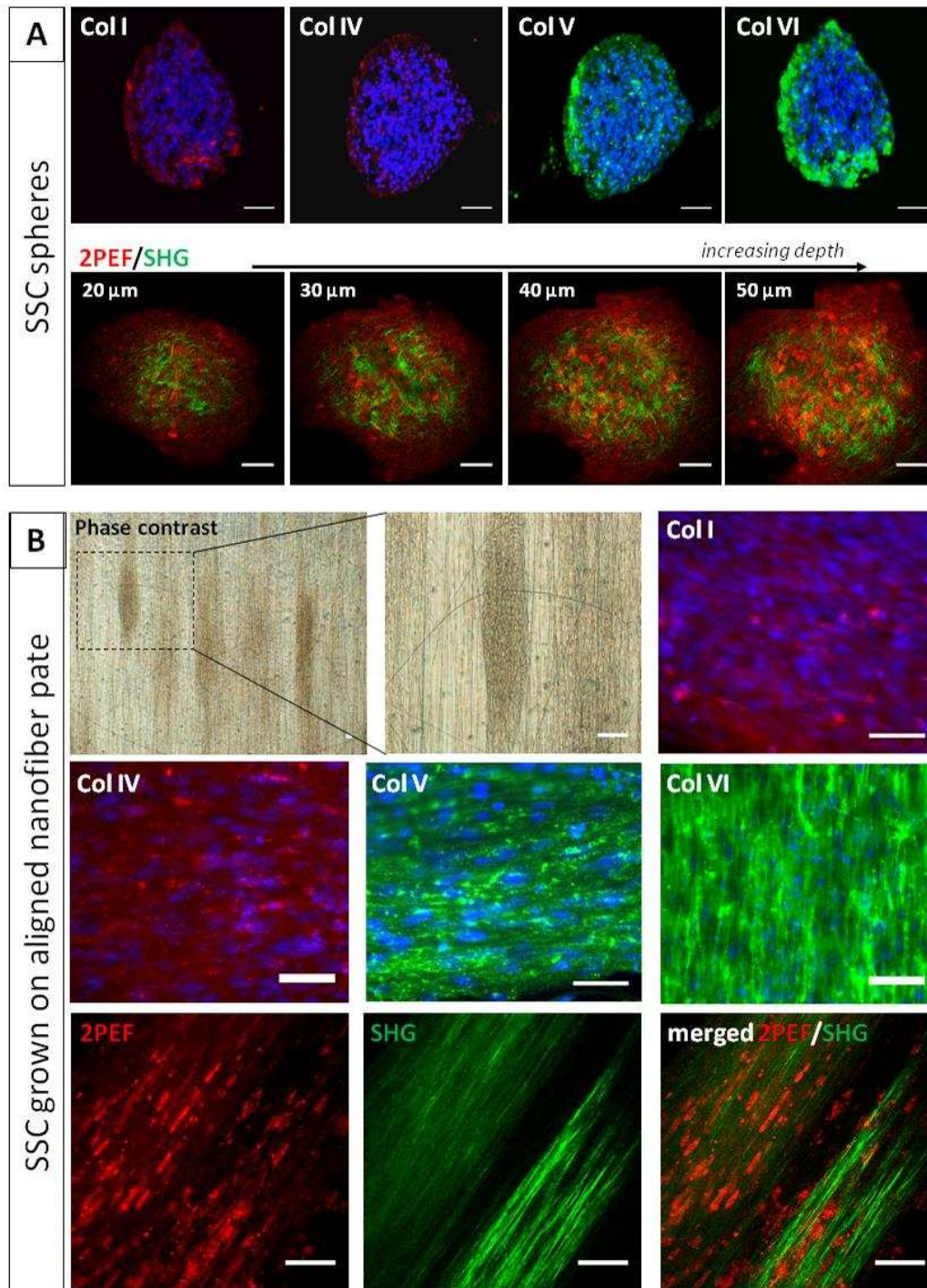


Figure 5. Collagen synthesis by cultured SSC. (A) Spheres derived from SSC produce collagen type I, IV, V and VI (as shown by immunohistochemistry), with no apparent organization. As shown by multiphoton microscopy, these disorganized collagen fibrils (SHG signals in green) are present around cells (endogenous fluorescence, 2PEF in red) along the full depth of spheres of SSC. (B) When spheres of SSC were plated on nanofiber plates to promote synthesis of an organized collagen extracellular matrix, spheres tended to elongate along nanofibers (as shown by phase contrast microscopy). The same feature was evident after immunostaining of collagen type I, IV, V and VI. Aligned collagen fibrils (green) were also evidenced by SHG microscopy. Bars, 50 μm .

3.5 Differentiation potentials of sphere forming SSC and colony forming LSC

After primary culture of ILC-scraping- and ILC-scraping+, spheres and colonies were dissociated and cultured in different differentiation promoting media as described in Materials and Methods.

Keratocyte and fibroblast differentiation

After 14 days of culture in keratocyte differentiation medium, cells with dendritic morphology were observed (Fig 6A). They were positive for LUMICAN and KERATOCAN immunostaining (Fig 6A). In basal medium containing 10% FBS, cells displayed features of fibroblasts and myofibroblasts, including expression of *VIMENTIN* and α -SMA proteins (Fig 6B).

In contrast, cells from dissociated colonies of LSC seeded in the keratocyte and the fibroblast differentiation medium did not adhere and no cell growth was observed (Fig S2 A and B).

Neuronal and glial differentiation

Individual spheres obtained after primary culture of limbal cells in E8 medium, were plated in poly-D-lysine and laminin coated wells. Ten days after plating, cells exhibited a neuronal morphology and staining for the neuronal markers β III TUBULIN and TH (Fig 6C). Cultures also contained glial cells positive for GFAP (Fig 6C).

When colonies of LSC were dissociated, and seeded in the same medium, cells did not adhere and no cell growth was observed (Fig S2 C).

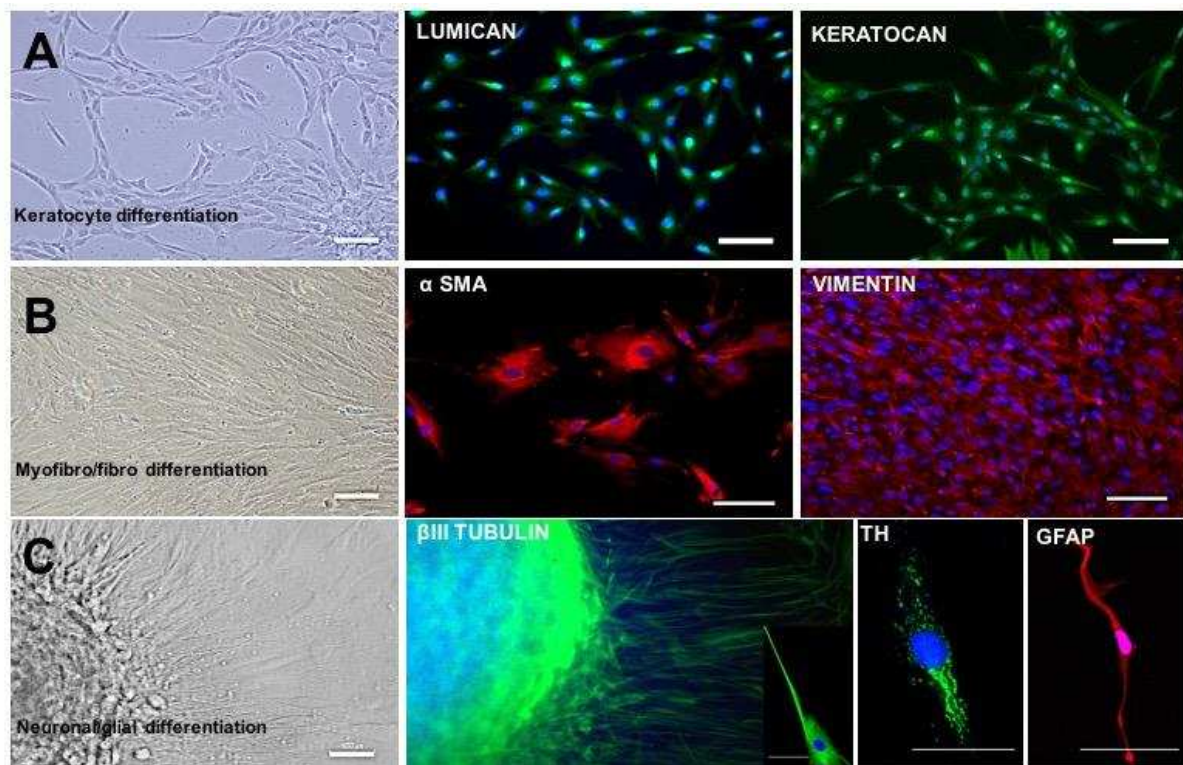


Figure 6. Keratocyte, myofibroblasts/fibroblasts, neuronal and glial differentiation of SSC. When exposed to differentiating medium conditions, SSC are able to differentiate into keratocytes, myofibroblasts, fibroblasts and neurons. Culture in keratocyte specific medium results in cells with dendritic morphology expressing LUMICAN and KERATOCAN (A). In DMEM medium supplemented with 10% serum, cells present a myofibroblastic (large cells) and fibroblastic (elongated cells) morphology and they express α -SMA and *VIMENTIN* respectively (B). Neuronal cells were present with elongated nerve fibers (C) and expression of β III TUBULIN and Tyrosine Hydroxylase (TH); glial cells were detected by expression of GFAP (C). Bars, 50 μ m.

3.6 Trilineage mesenchymal differentiation

SSC and LSC switched to adipogenic, chondrogenic or osteogenic differentiation media were assayed for mesenchymal phenotypes after 3 weeks in culture (Fig 7). MSC cultured in the same conditions were used as positive controls. The staining of SSC cultures showed that SSC had the ability to differentiate into osteocytes (Alizarin Red staining) (Fig 7D), adipocytes (Oil RedO staining) (Fig 7E), and chondrocytes (Alcian Blue staining) (Fig 7F). By contrast, LSC were not able to differentiate into osteocytes, adipocytes and chondrocytes (Fig S2 D, E and F).

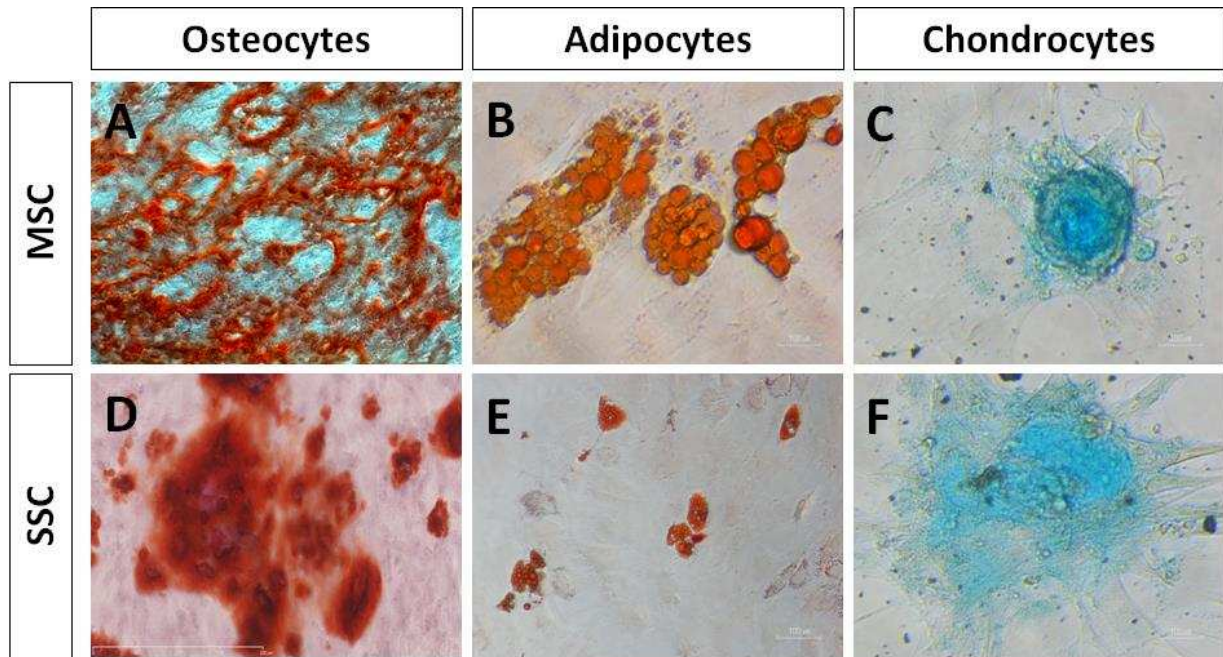


Figure 7. Mesenchymal cell differentiation assays of SSC. After primary culture, MSC (used as positive controls) and SSC were dissociated and plated into osteocyte, adipocyte and chondrocyte differentiating media. MSC (A-C) and SSC (D-F) show the ability to differentiate into osteocytes identified by calcium deposits (A, D; Alizarin Red staining), adipocytes (B, F; lipids stained by Oil RedO) and chondrocytes (C, F; matrix proteoglycans revealed by Alcian Blue staining). Bars, 100µm.

4 Discussion

From small superficial limbal biopsies taken from human donor corneas, we have developed culture methods whereby both LSC and SSC could be isolated with the same medium in primary culture. In E8 medium, scraping of limbal explants resulted in growth of isolated SSC without LSC, whereas cultures derived from non-scraped limbal explants resulted in growth of both LSC and SSC in the same well. LSC and SSC could be separated after removal of SSC by aspirating floating spheres and dissociating adherent ones. Following primary culture, both populations could be further grown as pure cell lineages, by growing LSC in Green's medium with 3T3 feeders, and SSC in E8 medium.

E8 medium has been used previously to grow induced pluripotent stem cells (iPS) and permitted the growth of iPS in feeder-free and xeno-free culture condition (Chen et al., 2011; Nakagawa et al., 2014). E8 medium is commercially available. This is of interest for cell therapy units aimed to standardize cell preparation method for transplantation in patients. Compared with the medium described by others for the culture of SSC, E8 medium is a xeno-free medium, which does not contain FBS (Du et al., 2005; Kureshi et al., 2014), B27

supplement (Li et al., 2015 ; Yoshida et al., 2005) and cholera toxin (Kureshi et al., 2014). To our knowledge, E8 medium has never been used to grow limbal epithelial and stromal stem cells. Our results show that E8 medium allows adult SSC to grow with maintenance of stemness through 48 population doublings together with various differentiation potentials. Sixty-five to 67 cumulative population doublings of SSC isolated from fresh bovine corneas were found by Funderburgh et al. (Funderburgh et al., 2005). As we used elderly donor tissues as a source of isolated limbal cells, the growth potential of our cells was probably limited, although still interesting for therapeutic developments. Interestingly, elderly human donor tissue is routinely used for transplantation, provided the corneal endothelial cell density is higher than 2000 cells/mm². Results of such transplantations of elderly donor corneas are successful (Borderie et al., 1998).

In the present work, the two stem cell populations grown from limbal explants exhibited clear-cut differences regarding phenotype, growth potential and differentiation ability. SSC featured expression of SOX2, NESTIN, HNK1, SOX10 and KERATOCAN, absence of P63 α and CK3 expression, high growth rate, and the capacity to differentiate into various cell lineages, including keratocytes, myo/fibroblasts, neurons, osteocytes, chondrocytes and adipocytes, with no epithelial differentiation potential. In contrast, LSC featured expression of P63 α and CK3 markers, absence of expression of SOX2, NESTIN, HNK1, SOX10 and KERATOCAN, lower growth potential and a unique epithelial differentiation potential. Both stem cell populations expressed PAX6 (these results were also described by others (Funderburgh et al 2005, Li et al 2008; Li et al., 2015), ABCG2, BMI1, SOX9 (Yoshida et al., 2005), and *VIMENTIN* (Li et al., 2015). Our results show that isolated human SSC expressed neural crest markers, displayed stem cell characteristics and were multipotent. They were also able to form spheres. As opposed to SSC, LSC expressed ectoderm together with stem cell markers and were unipotent in our culture conditions. Although they originated from the same donors, the two stem cell populations showed different growth potentials. This could be explained by the very rapid turnover of the corneal epithelium, which probably requires frequent LSC divisions. In a rabbit experimental model, the renewal time of the corneal epithelium has been shown to be 2 to 3 weeks under physiologic conditions (Haddad et al., 2000). Conversely, corneal keratocytes are thought to divide less frequently and SSC divisions are probably less frequent. However, we still lack clinical and experimental data concerning precise *in vivo* assessment of keratocyte turnover. Interestingly, macular dystrophy, which is a genetic corneal disorder with stromal deposits produced by keratocytes,

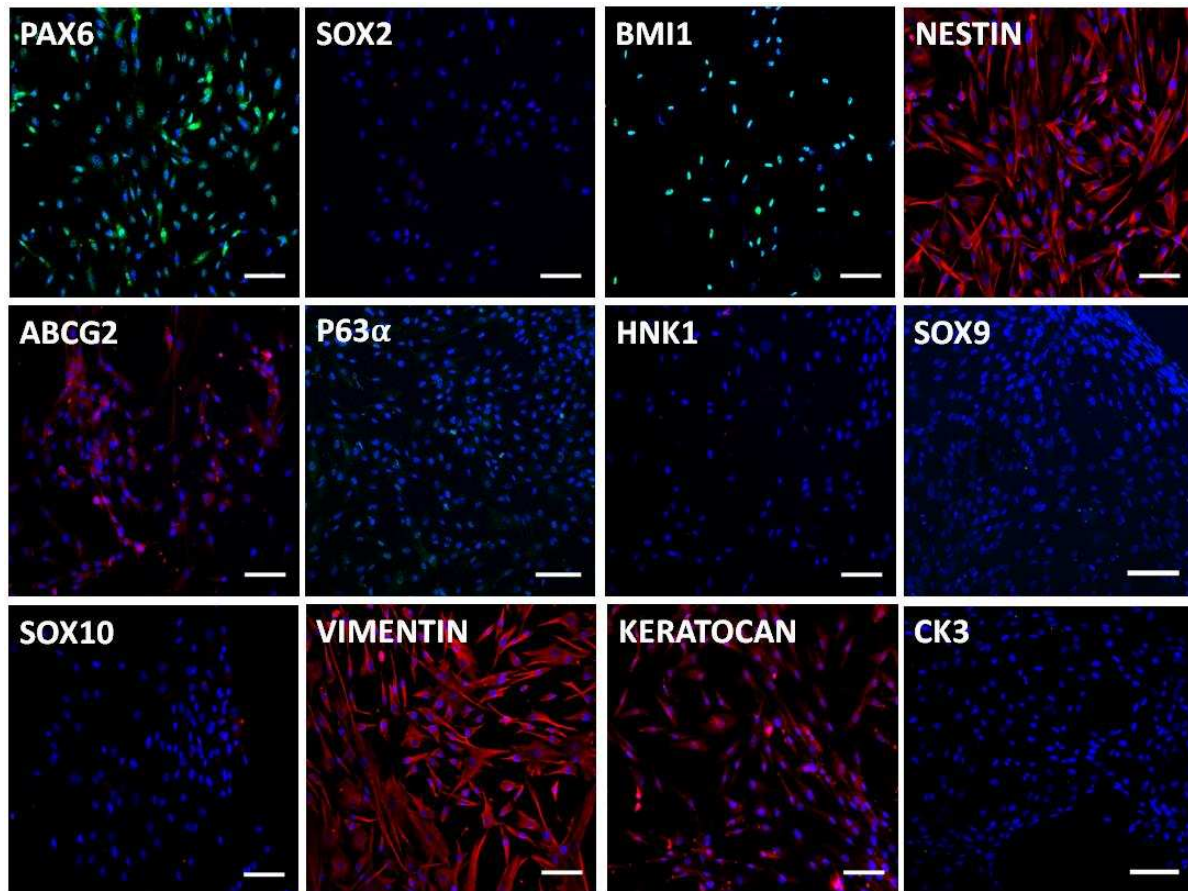
presents rare and slow recurrence after corneal transplantation whereas keratoepithelin-linked dystrophies, which are genetic corneal disorders with corneal deposits originating mainly from the corneal epithelium, exhibit quick and constant recurrence after transplantation (Cheng et al., 2013; Gruenauer-Kloevekorn et al., 2009).

Due to a lack of donor cornea worldwide, development of alternative therapeutics has become an important goal. The study of extracellular matrix deposition by SSC *in vitro* serves to initiate the production of stroma-like tissue. Here, collagen deposition in cultured SSC spheres was revealed by whole mount immunohistochemical analysis and SHG examination. SHG showed that assembled collagen fibrils, not only collagen molecules, were synthesized by SSC. Immunohistochemical analysis revealed the presence of COLLAGEN type I, IV, V and VI, the main components of the human corneal stroma. Furthermore, fibril orientation could be obtained by growing cells on nanofiber plates. In previous studies, a highly aligned PEUU [poly(ϵ -caprolactone)-based poly (ester urethane) urea] nano-fibrous substrate served as a template to initiate and guide the organization of corneal stroma-like tissue from human corneal SSC. The addition of FGF-2 and TGF- β 3 successfully stimulated the production of a stroma-like tissue composed of multilayered lamellae with orthogonally oriented collagen fibrils and an abundance of cornea-specific proteins and proteoglycans (Wu et al., 2012; Wu et al., 2013; Wu et al., 2014).

5 Conclusion

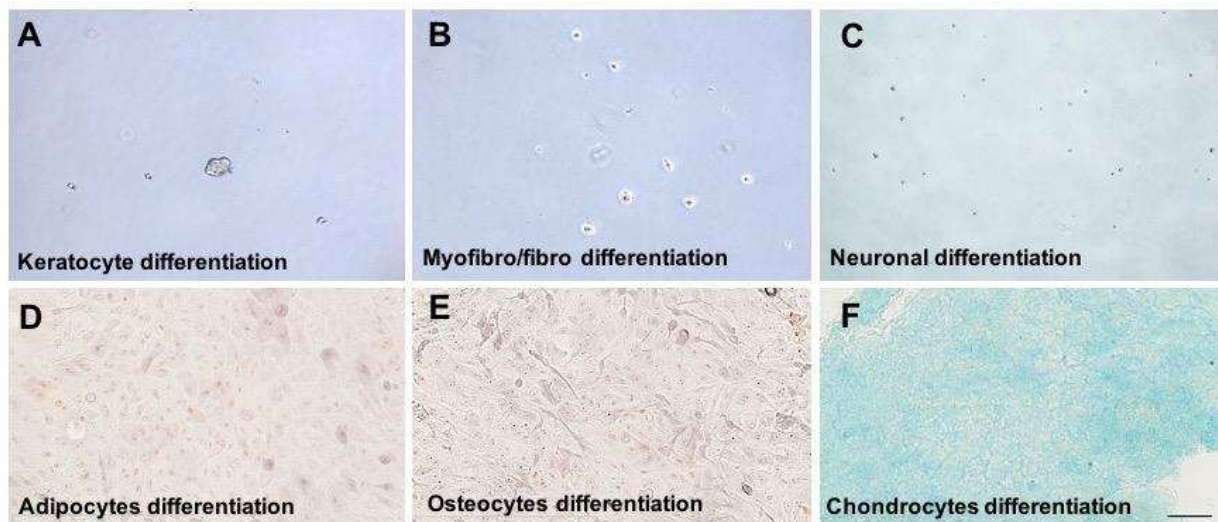
In conclusion, we show that both human adult LSC and SCC can be isolated from small superficial limbal biopsies and primary cultured in the same feeder-free and xeno-free culture conditions. These cultured stem cells feature high growth potential and the expected phenotypes and differentiation potentials in primary culture. Whereas SSC can be subcultured in the same feeder-free and xeno-free conditions LSC still need 3T3 feeders to be subcultured and further developments are needed to maintain their phenotypes after several passages in E8 medium. In case of autologous transplantation, the biopsy required to obtain limbal explants is known to be minimally invasive with no clinical consequences for the donor eye. It can be taken from a human donor cornea in case of allogeneic transplantation. We report a novel method for the isolation of both epithelial and stromal stem cell populations and their primary culture in feeder-free and xeno-free conditions, which will be of significant help for further cell therapy developments.

Supporting information



S1 Fig. Marker analysis of adherent cells (E8 medium) by immunofluorescence.

Adherent cells were positive for PAX6, BMI1, NESTIN, ABCG2 except SOX2 and P63 α , positive for keratocyte markers (*VIMENTIN*, KERATOCAN) and negative for neural crest markers (HNK1, SOX9, SOX10) and epithelial cell markers *CK3*. Bars, 50 μ m.



S2 Fig. Differentiation potential of LSC.

Colonies of LSC obtained after primary culture in E8 medium were seeded in Keratocyte, fibroblaste and neuronal differentiation medium, or the medium was switched to adipocyte, chondrocyte and osteocyte differentiation medium. LSC didn't adhere in keratocyte (A), fibroblast (B) and neural (C) differentiation medium and no growth was obtained. No differentiation to the mesenchymal lineage was observed for LSC (D, E and F). Bars, 100 μ m

4.3. Partie 3 : Utilisation des cellules souches limbiques stromales (SSC) en Thérapie cellulaire

Le stroma cornéen est un tissu dense, composé essentiellement de collagène et peuplé par des kératocytes, qui sont responsables de la sécrétion de la matrice extracellulaire et des protéoglycanes qui permettent son organisation (Kao et al., 2002). Une lésion cornéenne profonde due à une inflammation ou une infection, provoque la différenciation de ces kératocytes en myofibroblastes. Les myofibroblastes sécrètent une matrice extracellulaire désorganisée caractérisée par une diminution dans le diamètre des fibrilles de collagène et une perte de leur organisation spatiale. La désorganisation de la matrice extracellulaire est responsable de la formation de cicatrices et d'une diminution de la transparence cornéenne (Fini et al., 1999).

Dans un modèle d'opacification cornéenne chez la souris, dû à l'absence du lumican, protéoglycane impliqué dans l'organisation de la matrice extracellulaire, l'injection des SSC a permis de restaurer l'épaisseur stromale, le diamètre des fibrilles de collagènes ainsi que la transparence cornéenne (Du et al. 2009). Cet effet est dû à la synthèse d'une nouvelle matrice extracellulaire par les SSC injectées ; en effet les SSC ont la capacité de synthétiser une matrice extracellulaire *in vitro* comportant les différents collagènes rencontrés dans le stroma cornéen ainsi que les protéoglycanes (Karamichos et al., 2014 ; Wu et al., 2014).

L'injection de sphères de SSC *in vitro* dans un explant limbique décellularisé a permis d'observer la migration cellulaire et la repopulation de l'explant limbique par les SSC injectées (Mathan et al., 2016).

Les pathologies cibles d'une thérapie cellulaire par SSC sont essentiellement le kératocône et les cicatrices cornéennes après infection ou traumatisme. Ces pathologies ont en commun la perte kératocytaire, le remodelage de la substance fondamentale et des fibrilles de collagène, la perte de substance stromale et la formation de cicatrices stromales opaques. Le kératocône se caractérise également par une biomécanique cornéenne anormale entraînant la déformation de la cornée en forme de cône.

Afin de mieux caractériser les cornées kératocôniques nous avons étudié en imagerie multimodale une série de cornées humaines kératocôniques prélevées lors de greffes de cornée et nous les avons comparées à des cornées normales (Grieve et al., 2016).

Cette étude nous a permis, grâce à plusieurs techniques d'imagerie *in-vivo* (OCT et IVCN) et *ex-vivo* (FFOCM et histologie), de déterminer les lésions caractéristiques du kératocône. Ces observations nous permettent de mieux caractériser le modèle animal que nous voulons mettre au point en vue d'une thérapie cellulaire utilisant les SSC. En comparaison avec des cornées normales, les cornées kératocôniques présentent un amincissement et ou un épaissement localisés de l'épithélium cornéen, des cellules épithéliales superficielles allongées, des cellules épithéliales basales aplaties, des dépôts de ferritine dans la couche basale de l'épithélium, une membrane basale épithéliale anormale (amincissement et interruptions), des anomalies du plexus nerveux sous-basal, des anomalies de la couche de Bowman (amincissement, ruptures, interruptions, fibrose), une diminution de la densité kératocytaire, une apoptose kératocytaire, des ruptures au niveau des lamelles de collagène du stroma cornéen, un amincissement stromal et la présence de cicatrices stromales. La présence des stries de Vogt est aussi un indicateur clinique du kératocône. Ces stries sont orientées verticalement et partent du stroma postérieur vers le stroma antérieur. Cependant, nous avons mis en évidence la présence de ces stries dans des cornées normales et des cornées pathologiques autres que le kératocône, avec une modification d'orientation. En effet, ces stries ne correspondent plus à des stries verticales, mais à des stries obliques avec une forme en « V » chez les cornées normales et les cornées pathologiques (dystrophie de Fuchs et kératopathie bulleuse). Ces stries correspondent à des zones d'ondulation des lamelles de collagène, qui sont moins rigides que le reste de la cornée (Grieve K, Ghoubay D et al., 2017). Elles sont associées au comportement visco-élastique de la cornée. Le rôle probable de ces stries est d'absorber les chocs dus aux changements de la pression intraoculaire et les chocs extérieurs.

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Stromal striae: a new insight into corneal physiology and mechanics

Kate Grieve^{1,2}, Djida Ghoubay^{1,2}, Cristina Georgeon¹, Gael Latour³, Amir Nahas⁴, Karsten Plamann⁵, Caroline Crotti⁵, Romain Bocheux⁴, Marie Borderie¹, Thu-Mai Nguyen⁴, Felipe Andreiuolo¹, Marie-Claire Schanne-Klein⁶ & Vincent Borderie^{1,2}

Ce projet avait donc pour but, d'utiliser les SSC dans un modèle de lésion stromale, développé chez la souris, avec l'objectif de reproduire les lésions histologiques caractéristiques du kératocône et des cicatrices cornéennes post-infectieuses et post-traumatiques (apoptose kératocytaire, remodelage de la matrice extracellulaire, cicatrices stromales, majoration des stries stromales). Une fois le modèle animal validé, les SSC sont injectées en intrastromal afin d'étudier leurs pouvoir régénérateur

4.3.1. Protocole Expérimental

Cette expérimentation a été autorisée par le comité d'éthique sous le numéro d'agrément A751202.

Le protocole expérimental a comporté trois phases :

- 1) **Développement du modèle murin de lésion stromal** : L'œil gauche des souris est traité afin d'induire les lésions, l'œil droit n'est pas traité et constitue le témoin. Le but était de caractériser les lésions et leur répétabilité.
- 2) **Injection de SSC humaine après lésion stromale** : L'œil gauche des souris était traité afin d'induire les lésions puis, soit injecté avec des SSC, soit injecté avec le véhicule, soit non injecté. Le but était d'évaluer l'effet des SSC humaines sur la cornée normale et sur la cornée lésée et de différencier l'effet lié aux SSC de l'effet lié au véhicule nécessaire à l'injection des cellules. L'œil droit sert de témoin (pas de lésion ni d'injection).
- 3) **Injection de SSC murine après lésion stromale** : Les deux yeux des souris sont traités pour induire la lésion stromale puis l'œil gauche est injecté avec des SSC. Le but était d'évaluer l'effet thérapeutique de l'injection des SSC sur les lésions stromales.

Les souris ont été suivies pendant plusieurs mois et sacrifiées à différents temps après lésion. L'évaluation de l'état cornéen *in vivo* est réalisée après anesthésie des animaux par l'isoflurane.

Cinq techniques ont été utilisées pour évaluer l'état de la cornée *in vivo* pendant la durée du suivi des animaux :

- 1) Observation et photographies de la cornée à **la lampe à fente** en lumière blanche : La formation d'une cicatrice cornéenne opaque est notée à chaque examen.

- 2) Photographies de la cornée après instillation de collyre à la **fluorescéine**. La présence de défauts épithéliaux et d'ulcères est notée.
- 3) **Tomographie en cohérence optique spectral domain** (OCT, Heidelberg Engineering GmbH, Heidelberg, Germany) du segment antérieur de l'œil. Elle permet d'apprécier l'épaisseur cornéenne et la présence d'une hyperréflexivité stromale.
- 4) **Microscopie confocale *in vivo*** (IVCM, Heidelberg Retina Tomograph avec module cornéen Rostock, Heidelberg Engineering GmbH, Heidelberg, Germany). Elle permet une étude quasi-histologique du tissu cornéen avec une mesure de la densité cellulaire.
- 5) **OCT élastographie d'une onde de cisaillement**. L'élastographie consiste à déterminer la rigidité de la cornée à partir de la vitesse de propagation d'une onde de cisaillement dans la cornée. Plus le tissu est rigide plus la vitesse de propagation est rapide. Cette étude est faite en collaboration avec l'équipe Onde et Image au sein de l'Institut Langevin.

Après euthanasie une évaluation complète de l'état cornéen a été réalisée avec les techniques suivantes :

- 1) **Microscopie en cohérence optique plein champ** (FFOCM, LightCT, LLTech, Paris, France). Elle a permis une étude histologique du tissu cornéen *ex vivo* sans fixation ni coloration avec des mesures précises de l'épaisseur épithéliale et stromale.
- 2) **Histologie**, les cornées ont été fixées puis incluses en paraffine. Des coupes sériées transversales de 4 μm ont été montées sur lame et observées en microscopie optique. Des cornées fixées non incluses ont été coupées puis observées en microscopie à fluorescence.
- 3) **Immunomarquages**. Des marqueurs sont utilisés afin d'évaluer dans les cornées traitées et non traitées, la présence de tissu fibrotique (anticorps anti collagène III), de myofibroblastes (anticorps anti actine alpha du muscle lisse (SMA) et de cellules en prolifération (Ki67).
- 4) **Test TUNEL**. L'apoptose des kératocytes est étudiée grâce à la technique TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling).

Le principe de cette technique est de détecter la fragmentation de l'ADN dans les cellules en apoptose. Des dUTP modifiées se fixent aux extrémités 3'OH libres de l'ADN fragmenté.

Des cornées traitées à l'azote et des cornées témoins, ont été fixées avec 4% de PAF puis incluses en paraffine. Des coupes sériées de 4µm sont déposées sur lame. Après déparaffinage, les coupes sont marquées à l'aide du kit click-it Plus TUNEL Assay (Life technologies). Après incorporation des dUTP modifiés dans les ADN fragmentés, la révélation se fait par l'utilisation d'un fluorophore qui se fixe sur le dUTP incorporé. Un témoin positif est généré par traitement préalable d'une coupe de cornée témoin à la DNase I.

- 5) **Microscopie biphotonique (SHG).** Afin d'étudier les caractéristiques de la matrice extracellulaire dans le modèle animal développé, nous avons utilisé une technique d'imagerie : la microscopie optique non-linéaire, également appelée microscopie multiphotonique. Parmi les modes de contraste accessibles par cette technique, la génération de second harmonique (SHG) est spécifique du collagène fibrillaire. L'imagerie de seconde harmonique a été réalisée à l'Ecole polytechnique au sein du laboratoire d'Optique et Biosciences avec un microscope à balayage laser. Cette technique nous a permis de visualiser l'organisation du collagène au sein de la cornée. Le signal SHG du collagène provient des liaisons peptidiques au niveau moléculaire et de l'amplification de ce signal au niveau macromoléculaire du fait de l'organisation non centrosymétrique du collagène fibrillaire. L'excitation est fournie par un laser pulsé femtoseconde réglé à 860 nm. L'intensité SHG moyenne dépend de la densité des fibrilles de collagène et de leur organisation au sein du volume focal.
- 6) **Cytométrie en flux.** La cytométrie en flux permet de mesurer simultanément plusieurs propriétés physiques individuelles des cellules. Les cellules défilent devant un faisceau laser. Au fur et à mesure que chaque cellule passe devant le faisceau laser, le cytomètre enregistre les différents signaux optiques (absorption, diffusion, réfraction, fluorescence) que chaque cellule émet. La réponse inflammatoire dans notre modèle animal est étudiée après 4, 24, 48 et 72h après traitement à l'azote. Une série de 16 souris (3 pour chaque temps d'analyse dont 2 sont traitées à l'azote au niveau de l'œil gauche, l'œil droit va servir de témoin

controlatéral, et une souris témoin qui n'a subi aucun traitement, afin de déterminer le niveau basal de l'inflammation). Après chaque temps de traitement, les souris ont été observées en IVCN. Elles sont ensuite sacrifiées et les cornées dissociées à l'aide de la libérase. La suspension cellulaire obtenue est marquée à l'iodure de propidium (IP) afin de déterminer la viabilité cellulaire. Un marquage CD11b (marqueur des macrophages) est effectué pour observer le taux de réponse inflammatoire en cytométrie en flux.

4.3.2. Développement du modèle animal

4.3.2.1. Animaux utilisés

Des souris C57BL6 âgées de 4 semaines sont utilisées. Après anesthésie des animaux, l'épithélium cornéen est gratté à l'aide d'un scalpel, la cornée gauche de l'animal est ensuite brûlée avec de l'azote (Figure 1). Un coton-tige imbibé d'azote liquide (température : -196°C) est appliqué sur la cornée pendant 5, 8 ou 10 secs. 6 souris par temps d'application sont utilisées pour cette première série d'expérimentation. La cornée droite n'est pas traitée et sert de contrôle.



Figure 1. Développement du modèle animal. Après grattage cornéen, un coton tige imbibé d'azote liquide est appliqué sur la cornée.

4.3.2.2. Examen des souris après traitement

Les souris sont examinées une semaine, 15 jours et tous les mois après application d'azote. Différentes techniques sont utilisées : La lampe à fente (LAF) qui est un biomicroscope qui permet l'analyse de la surface oculaire en lumière blanche sans coloration et en lumière bleue après instillation d'un collyre à la fluorescéine; la microscopie confocale *in vivo* (IVCM) qui permet d'observer les différentes composantes du tissu cornéen : l'épithélium, le stroma et l'endothélium, l'OCT Spectral Domain qui permet d'évaluer l'état et la forme de la cornée et l'histologie.

La Figure 2 résume les résultats obtenus après le traitement à l'azote des cornées de souris. Les observations à la lampe à fente, avec 5 secs de traitement, montrent l'apparition d'une zone opacifiée sur la cornée de l'animal, cette zone présente à l'OCT une hyperreflectivité qui n'est pas observée dans la cornée contrôle controlatérale. L'état de l'endothélium cornéen est vérifié en IVCM : les cellules endothéliales ont gardé leur forme hexagonale caractéristique et semblent ne pas avoir été touchées par le traitement.

Avec 8 secs de traitement à l'azote, la lampe à fente révèle la présence d'une zone très opaque, qui ne se trouve pas au niveau de la cornée mais qui semble toucher le cristallin. A l'OCT, l'épaisseur de la cornée semble très diminuée. L'observation en IVCM, montre un endothélium anormal. Effectivement, les cellules endothéliales sont difficilement visualisables.

Après application d'azote pendant 10 secs, toute la surface de la cornée est opacifiée, l'épaisseur de la cornée est très augmentée. L'endothélium cornéen est touché par le traitement, le froid provoqué par l'azote, a pénétré toute l'épaisseur de la cornée jusqu'à l'endothélium, ce qui explique l'œdème cornéen. En effet, la destruction de la barrière endothéliale par l'azote, a provoqué la pénétration des fluides dans la cornée. En IVCM, les cellules endothéliales, lorsqu'elles sont visibles, présentent des signes d'œdème cellulaire (cellules ballonnées avec un stroma hyporélectif).

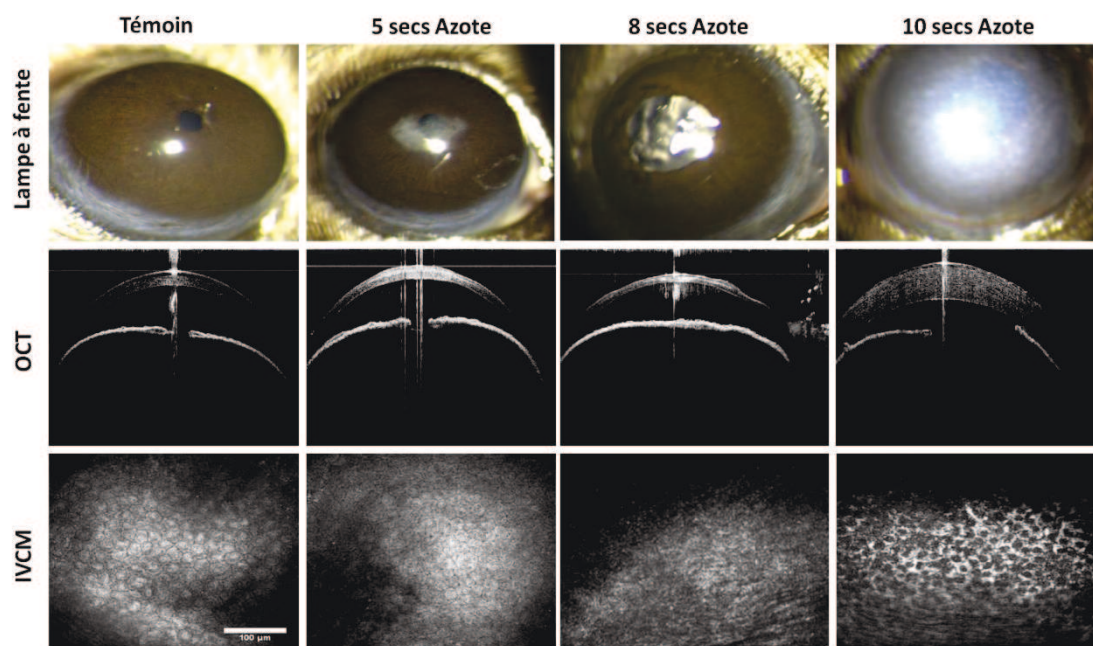


Figure 2. Observation in vivo de la cornée après traitement à l'azote.

Compte-tenu des résultats obtenus après ces premières observations, et comme le modèle animal que nous souhaitons développer ne doit pas présenter d'anomalie au niveau de l'endothélium cornéen, le temps d'application d'azote retenu pour la suite des expériences est de 5 secondes.

4.3.2.3. Caractérisation du modèle animal après application d'azote pendant 5 secondes

4.3.2.3.1 Examen de l'épithélium cornéen

Un examen des cornées en lumière bleue après instillation d'un collyre à la fluorescéine, permet d'apprécier l'intégrité de l'épithélium cornéen : toute ulcération épithéliale est colorée par la fluorescéine qui apparaît alors en vert. Les observations montrent la présence d'un ulcère cornéen au centre de la cornée 4h après traitement (Figure 3B). Ceci est dû au grattage de l'épithélium cornéen avant traitement à l'azote, les cornées non traitées ne montrent aucun signe d'ulcération (Figure 3A). L'ulcère épithélial diminue au cours du temps. 48h après traitement, une kératite ponctuée superficielle (KPS) est observée (Figure 3D, points verts sur l'image).

En IVCN, les cornées normales présentent un épithélium cornéen normal avec la présence des trois assises cellulaires : cellules superficielles (Figure 3E), cellules intermédiaires (Figure 3F) et cellules basales (Figure 3G). Dans les cornées traitées, les cellules superficielles ne sont pas visibles et les cellules basales présentent une hyperréflexivité importante (Figure 3H) qui disparaît quelques jours après traitement. En histologie l'épithélium des cornées traitées à l'azote est épaissi à certains endroits (Figure 3J) et aminci à d'autres endroits (Figure 3K) en comparaison avec l'épithélium des cornées témoins dont l'épaisseur est constante sur toute la surface cornéenne (Figure 3I). L'épaisseur de l'épithélium cornéen est calculée grâce aux images obtenues en FFCM (Figure 3L correspond à la cornée témoin et la Figure 3M correspond à la cornée traitée). Il n'y a pas de différences significatives entre l'épaisseur (moyenne de 5 mesures pour chaque cornée) de l'épithélium des cornées traitées à l'azote et celle des cornées témoins (ANOVA prenant en compte la variabilité inter-individuelle, $p=0.60$; test de Wilcoxon pour échantillons appariés, $p = 0,35$, Figure 3N).

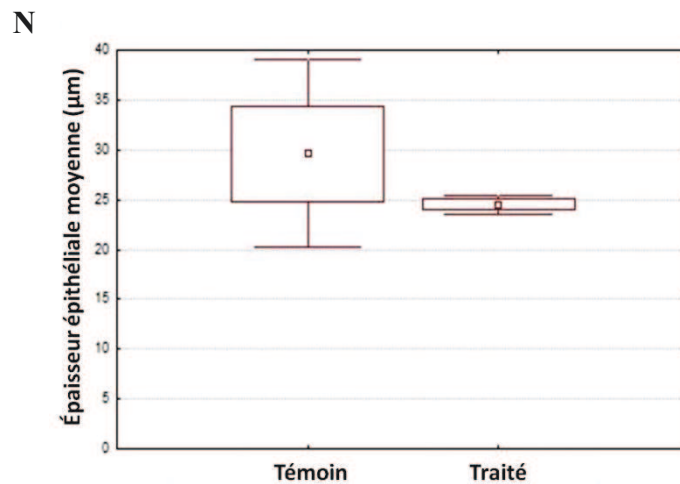
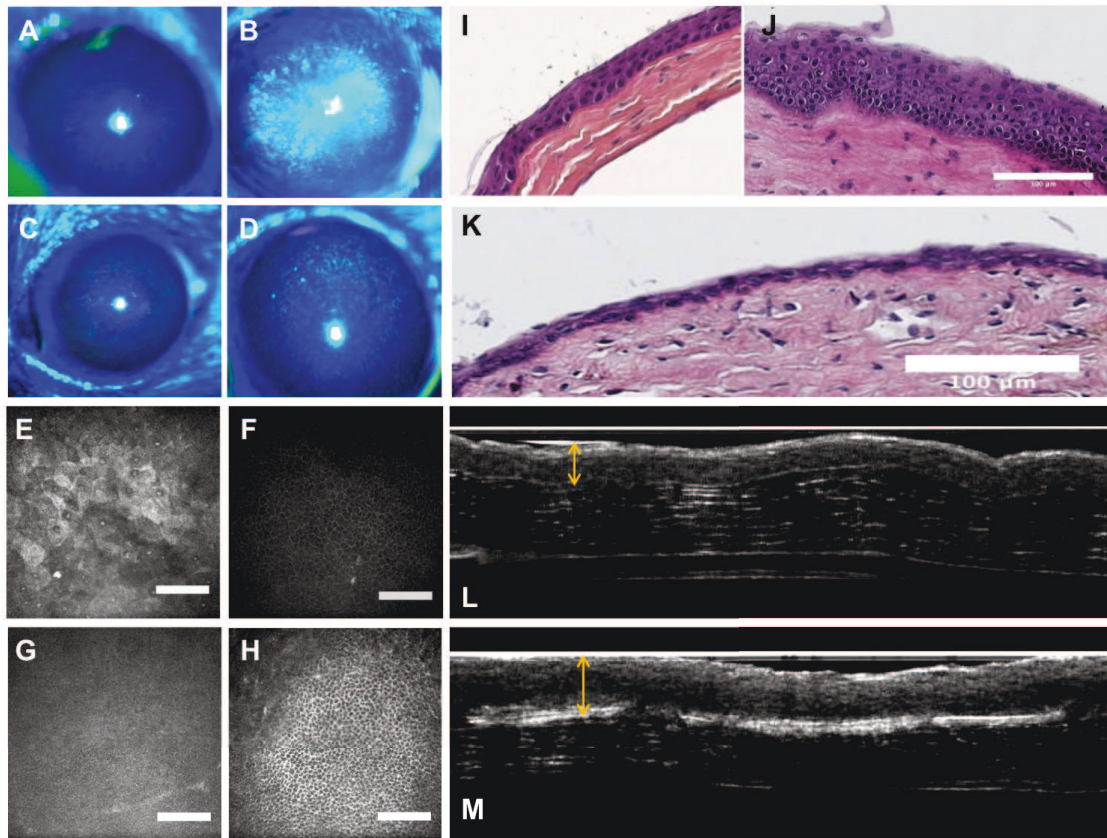


Figure 3. Caractérisation de l'épithélium cornéen des cornées traitées à l'azote pendant 5 secondes et témoins non traitées. Images lampe a fente (A, B, C, D), IVCM (E, F, G, H), histologie par marquage à l'hématoxyline et éosine (I, J, K) et FFOCM (L, M). Mesure de l'épaisseur moyenne de l'épithélium cornéen (N). Cornées témoins non traitées : A, C, E, F, G, I, L. Cornées traitées à l'azote pendant 5 secondes : B, D, H, J, K, M. Barre d'échelle : 100µm.

4.3.2.3.2. Examen du stroma cornéen

En microscopie confocale *in vivo*, au niveau du stroma cornéen, les cornées témoins présentent des stries stromales hyporéflexives parallèles entre elles. Ces stries sont circulaires sur les images en face d'IVCM et verticales, traversant le stroma depuis la membrane de Descemet jusqu'au stroma superficiel, en FFOCM. Les kératocytes ont une forme étoilée avec des noyaux ovales hyperréflexifs. Les nerfs stromaux sont visibles (Figure 4A).

L'observation des cornées traitées en IVCM révèle la présence de cellules hyperréflexives au niveau du stroma cornéen (Figure 4B) ; ces cellules correspondent à des myofibroblastes, la forme activée des kératocytes, caractérisés par un marquage positif pour l'alpha actine du muscle lisse (α -SMA ; Figure 4H). On observe aussi une condensation des noyaux correspondant aux kératocytes en apoptose (Figure 4D). Le marquage TUNEL révèle en effet la présence de cellules en apoptose 2 et 6 semaines après traitement au niveau du stroma des cornées traitées (Figure 4G) ; les cornées témoins ne présentant aucun marquage au test TUNEL (Figure 4E). Les cornées traitées à la DNase I présentent un marquage de toutes les cellules (Figure 4F).

L'aspect des stries stromales est modifié après traitement par l'azote. Des stries sombres et larges apparaissent au niveau du stroma cornéen en IVCM et en FFOCM (Figure 4C et 4L). L'analyse histologique des cornées montre une dissociation des lamelles de collagène du stroma qui prédomine dans la zone traitée (Figure 4J). Cet aspect n'est pas retrouvé dans les cornées témoins (Figure 4I). Une zone hyperréflexive est observée sous l'épithélium des cornées traitées à l'azote (Figure 4M), cette zone correspond à une fibrose stromale caractérisée par la présence de collagène III (Figure 4O) ; le marquage du collagène III est négatif dans les cornées témoins (Figure 4N).

L'épaisseur du stroma cornéen est calculée à partir des images obtenues en FFOCM (la Figure 3K correspond à la cornée témoin et la Figure 3M correspond à la cornée traitée). Il n'y a pas de différences significatives entre l'épaisseur (moyenne de 5 mesures pour chaque cornée) du stroma des cornées traitées à l'azote et celle des cornées témoins (ANOVA prenant en compte la variabilité inter-individuelle, $p=0.75$; test de Wilcoxon pour échantillons appariés, $p = 0,50$, Figure 4P).

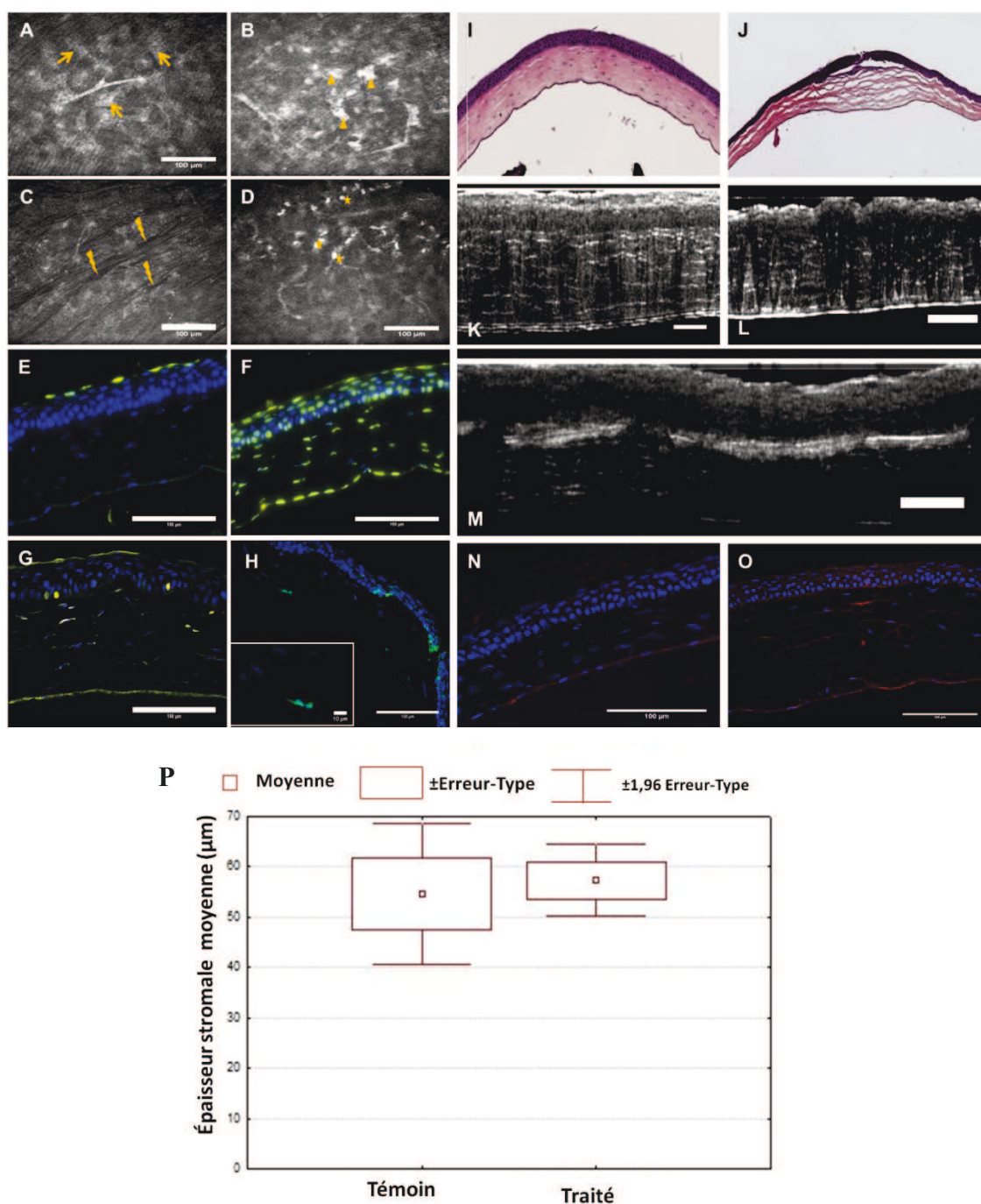


Figure 4. Caractérisation du stroma cornéen des cornées traitées à l'azote pendant 5 secondes et témoins non traitées. Observation en IVCM du stroma cornéen (A, B, C, D). Test TUNEL sur des coupes histologiques (E, F, G). Marquage en immunofluorescence de l' α SMA (H). Marquage hématoxyline et éosine (I, J). Observations FFOCM (K, L, M). Marquage en immunofluorescence du collagène III (N, O). Cornées témoins : A, E, I, K, N. Cornées traitées à l'azote : B, C, D, G, H, J, L, M, O. Cornée traitée à la DNase I : F. Barre d'échelle : 100µm. Epaisseur stromale moyenne calculée par les images obtenue en FFOCM (P).

4.3.2.3.2. Densité kératocytaire

A partir des images IVCN obtenues, nous avons compté le nombre de kératocytes dans toute l'épaisseur du stroma cornéen, nous avons pu ainsi déterminer la densité kératocytaire des cornées normales et celle des cornées traitées à l'azote. 3277 images ont été utilisées pour le comptage des kératocytes.

La Figure 5 montre les densités kératocytaires avant et après traitement. La densité kératocytaire avant traitement diminue de la face antérieure vers la face postérieure de la cornée $r = -0,35$, $p < 0,01$) (Figure 5A). L'analyse de la densité kératocytaire a par la suite été réalisée en distinguant deux couches stromales : le stroma antérieur compris entre 0 et 49% de l'épaisseur stromale et le stroma postérieur compris entre 50 et 100% de l'épaisseur stromale (Figure 5B). L'analyse des densités avant traitement montre un effet individu et un effet couche ($p < 0,0001$). Par contre il n'y a pas de différence significative entre œil droit et œil gauche ($p = 0,34$) (Figure 5C) ce qui montre que la densité, avant traitement, de l'œil à traiter est la même que celle de l'œil témoin controlatéral.

Un mois après traitement, la densité kératocytaire augmente dans le stroma antérieur et dans le stroma postérieur (ANOVA : $p < 0,0001$, Figure 5D)

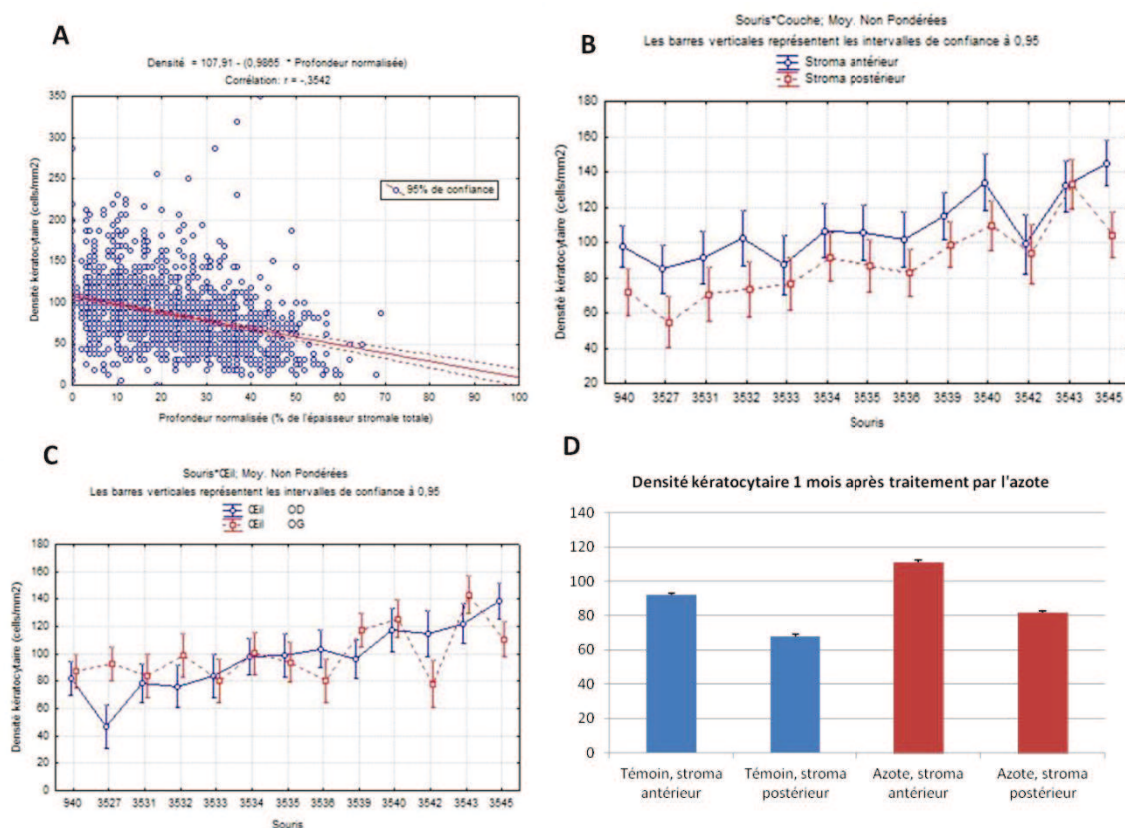


Figure 5 : Densité kératocytaire des souris avant et 1 mois après traitement. Relation entre la profondeur stromale et la densité avant traitement (A). Variations interindividuelles de la densité dans le stroma antérieur et le stroma postérieur avant traitement (B). Variations interindividuelles des yeux droits et gauches avant traitement (C). Les variations interindividuelles et celles liées à la profondeur sont significatives, la latéralité (œil droit versus œil gauche) n'est pas significative. 1 mois après traitement de l'œil gauche par l'azote pendant 5 secondes, une augmentation significative de la densité kératocytaire est observée dans le stroma antérieur et dans le stroma postérieur (D).

4.3.2.3.3. L'application d'azote induit une inflammation

Une inflammation s'installe 4h après traitement à l'azote. Ceci est montré par la présence de cellules inflammatoires sous la membrane basale épithéliale en IVCN (Figure 6). Le nombre de cellules inflammatoires diminue au cours du temps telles que le montrent les images IVCN 24, 48 et 72h après le traitement à l'azote. L'analyse en cytométrie en flux (Figure 6) montre une diminution du pourcentage de cellules marquées au CD11b. Le pourcentage de cellules inflammatoires passe de 48,6% après 4h de traitement à 6,4% à 72h de traitement. Le pourcentage de cellules marquées dans les souris non traitées est de 0%.

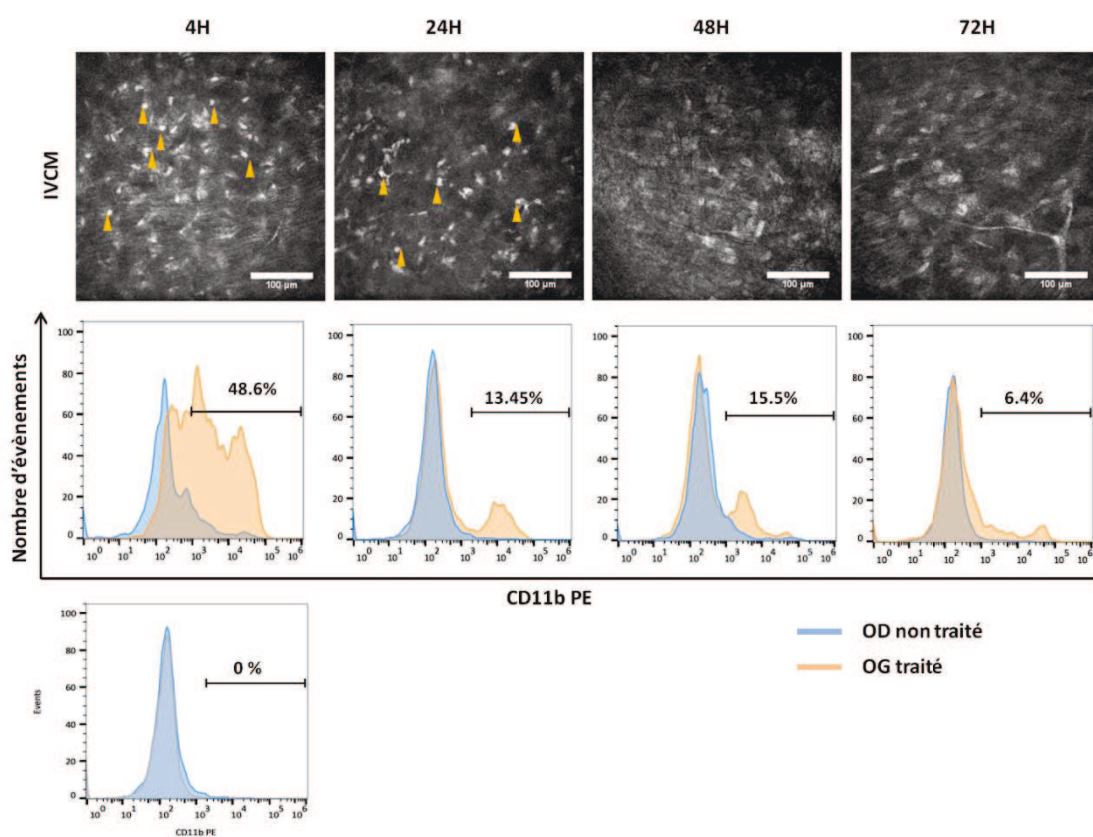


Figure 6. Suivi de l'inflammation induite suite à l'application d'azote. L'œil gauche des souris est traité à l'azote pendant 5 secs. Des cellules inflammatoires sont observées en IVCN 4h et 24h après traitement (têtes de flèche). 48h et 72h après traitement aucune cellule inflammatoire n'est observée en IVCN. Les souris sont sacrifiées et les cornées digérées, les suspensions cellulaires obtenues sont analysées en cytométrie en flux par marquage des macrophages au CD11b. Le pourcentage de cellules marquées au CD11b diminue au cours du temps. Les souris non traitées ne présentent pas de signe d'inflammation en cytométrie en flux.

4.3.2.3.2. Caractérisation de la matrice extracellulaire du stroma cornéen

La figure 7 représente les images obtenues par SHG (Figure 7E et F) ainsi que les informations extraites de la polarimétrie des signaux SHG : orientation des fibrilles de collagène et organisation au sein du volume focal (Latour et al., 2012). La cartographie de l'orientation du collagène dans les cornées témoins (Figure 7A) montre de gros cluster de couleur dont chaque couleur représente une direction différente des fibrilles de collagènes. Cette orientation préférentielle est montrée par l'histogramme de répartition des orientations des fibrilles de collagène sur le champ observé dans la Figure 7C. Dans les cornées traitées cette cartographie est moins homogène, on note l'absence des gros clusters de couleur (Figure 7B). L'histogramme montre bien l'absence d'une orientation préférentielle des fibrilles de collagène et met en évidence une orientation assez dispersée dans les cornées traitées (Figure 7D) contrairement aux cornées témoins (Figure 7C). La mesure d'entropie, c'est-à-dire le degré de désorganisation du collagène, est significativement plus importante dans les cornées traitées que dans les cornées normales (Figure 7G ; $p=0.0068$).

L'intensité du signal SHG, correspondant à la quantité de collagène dans chaque cornée, montre un plus fort signal dans les cornées normales (Figure 7E) que dans les cornées traitées (Figure 7F). La mesure d'anisotropie, qui permet d'accéder à une mesure locale du désordre au sein du volume focal (quelques μm^2), ne montre pas de différence significative entre les cornées contrôles et les cornées témoins (Figure 7H).

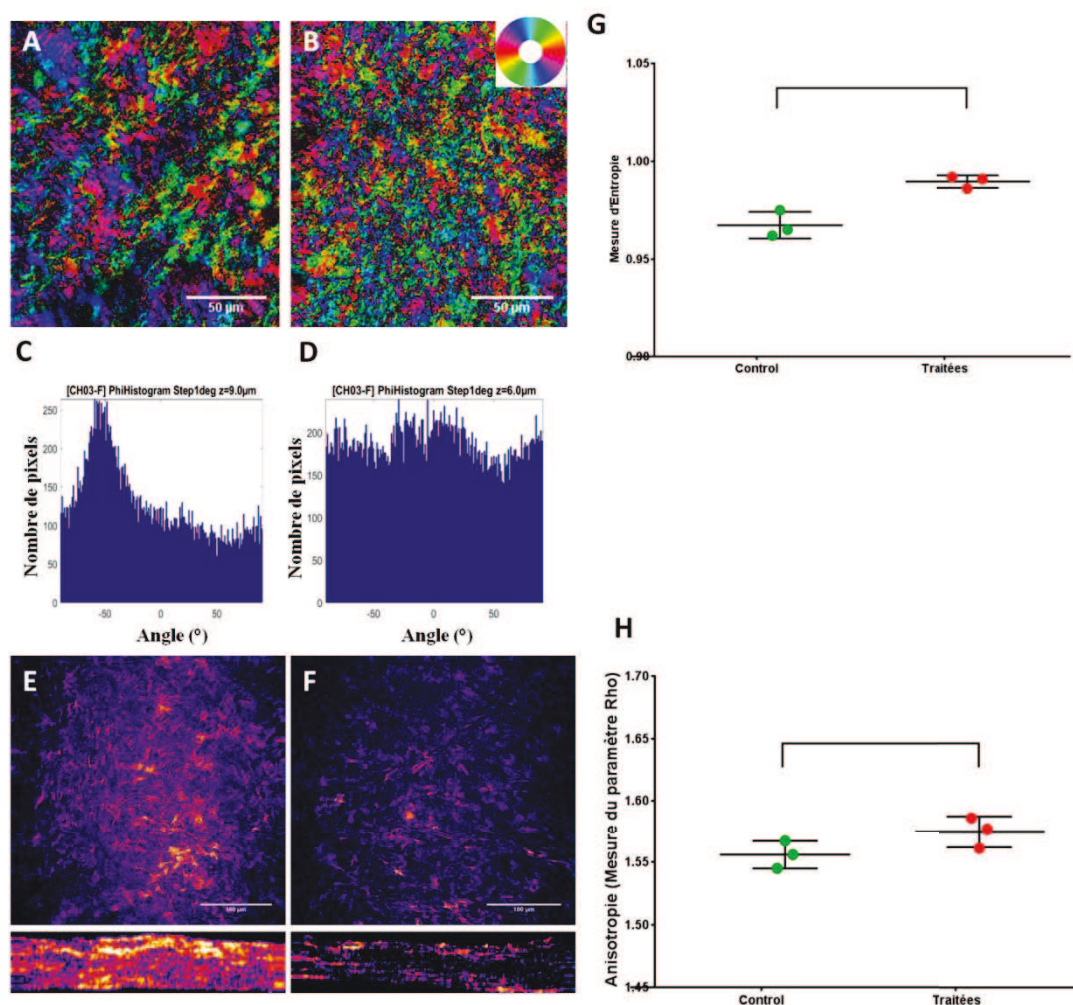


Figure 7. Microscopie SHG de cornées de souris contrôles et traitées à l'azote. Cartographie d'orientation des fibrilles de collagène dans le stroma, Les couleurs représentent l'orientation des fibrilles de collagène en tout pixel de l'image ; le code couleur figure en haut à droite (A-B). Histogramme d'orientation des fibrilles de collagène sur une image en face (C-D). Images de microscopie SHG en face et coupes axiales reconstruites pour des cornées témoins (E) et traitées (F). Mesure de l'entropie (G) et de l'anisotropie (H).

4.3.2.3.2. Etude de la rigidité de la cornée

Avant sacrifice, les souris sont analysées par OCT élastographie d'une onde de cisaillement afin de déterminer si la rigidité de la cornée est modifiée après le traitement à l'azote.

Les souris sont anesthésiées puis placées sous l'OCT, une fine tige métallique vient se positionner au contact de la cornée. On génère l'onde de cisaillement à l'aide de cette tige grâce à un moteur Piézo électrique (Figure 8A).

Les résultats de cette analyse sont représentés dans la Figure 8. Les Figures 8B et 8C représentent les images obtenues par le logiciel et permettent de calculer la vitesse de cisaillement. Comme le montrent les Figures 8B et 8C la vitesse de propagation de l'onde de cisaillement est plus importante dans les cornées traitées que dans les témoins (la couleur rouge correspondant à des vitesses lentes et le jaune à des vitesses rapides). La mesure des vitesses obtenues montre une différence significative ($p= 0.0053$) entre les cornées normales (6.2 ± 0.7) et les cornées traitées à l'azote ($12.3 \pm 1,0$) (Mean $\pm$ SEM) (Figure 8D).

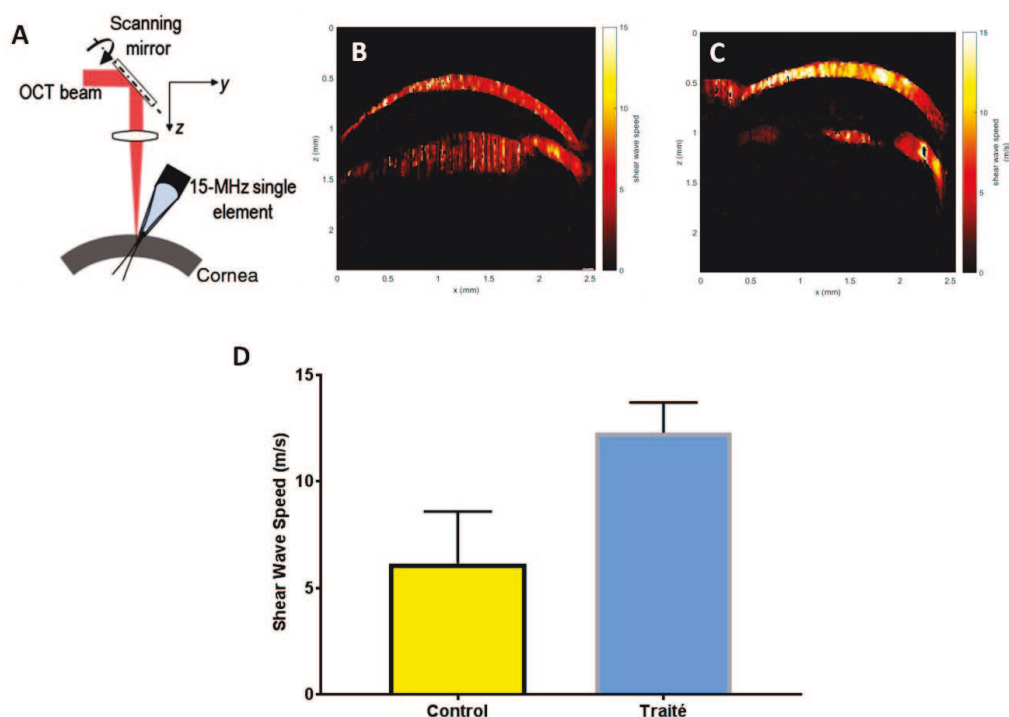


Figure 8. OCT élastographie d'une onde de cisaillement. Représentation schématique du montage expérimental utilisé pour la mesure OCT élastographie (A). Carte de vitesse en m/s d'une cornée normale (B) et d'une cornée traitée à l'azote (C). Histogramme des vitesses cornées normale versus cornée traitée (D). Les cornées traitées à l'azote sont plus rigides que les témoins.

En résumé, le model animal que nous avons mis au point est caractérisé par :

- a) Opacité cornéenne (Lampe a fente, FFOCM)
- b) Apoptose kératocytaire (IVCM, TUNEL)
- c) Perturbation de la matrice extracellulaire (SHG)
- d) Synthèse d'un collagène fibrillaire (Immunomarquage)
- e) Inflammation qui diminue au cours du temps (IVCM, Cytométrie de flux)
- f) Augmentation de la rigidité de la cornée (OCT  lastographie)

4.3.3. Effet des SSC sur la lésion provoquée par l'azote

Dans cette partie du projet, nous avons voulu savoir si les cellules souches stromales avaient un effet sur la régénération du stroma cornéen après la lésion provoquée par l'azote. Nous avons de ce fait, injecté dans la cornée murine des cellules souches stromales humaines ou des cellules souches stromales murines.

4.3.3.1.Culture des SSC

Des explants limbiques humains ou murins sont digérés à l'aide de la collagénase A (1mg/ml), une nuit à 37°C pour les explants limbique humains et 4h à 37°C pour les explants murins. Après une dissociation mécanique, la suspension cellulaire est centrifugée. Les cellules sont mises en culture sur milieu E8 avec ou sans addition d'EDU (10µM). Après 3 semaines de culture, les cellules formant des sphères sont dissociées puis marquées au Vybrant DiO (50 µg/ml) 20 min à 37°C. Les cellules sont lavées puis resuspendues dans un milieu CO₂ indépendant jusqu'au moment de l'injection. Pour les SSC humaines, une seule cornée a été utilisées pour produire les SSC. Pour les SSC murines, 4 cornées murines ont été utilisées pour produire les SSC qui ont été ensuite poolées avant injection.

4.3.3.2.Injection des SSC

Un mois après traitement à l'azote, les souris sont observées à la LAF, en IVCN et en OCT, avant injection des SSC ou du véhicule (milieu CO₂ indépendant seul). 10 souris sont traitées avec une injection de 5µl de suspension cellulaire contenant 50 000 SSC (4 souris avec SSC humaines et 6 souris avec des SSC murines). Afin de déterminer l'efficacité des SSC à régénérer le stroma cornéen, 4 souris supplémentaires ont été injectées avec le véhicule seul et 6 autres souris n'ont reçu aucun traitement. Les souris sont observées régulièrement in vivo.

Juste après injection des SSC humaines dans le stroma cornéen les souris sont observées en microscopie à fluorescence (Micron III) (Figure 9 haut). Cette technique montre bien la présence des cellules marquées dans la cornée après injection. Le suivi de la fluorescence émise par les cellules au cours du temps, montre la persistance des SSC humaines fluorescentes 3 mois après injection. Le marquage disparaît par la suite. Les SSC murines quant à elles ont été observées le lendemain de l'injection et seulement un mois après

injection. Au delà on ne détecte pas de cellules fluorescentes dans les cornées (Figure 9 bas).

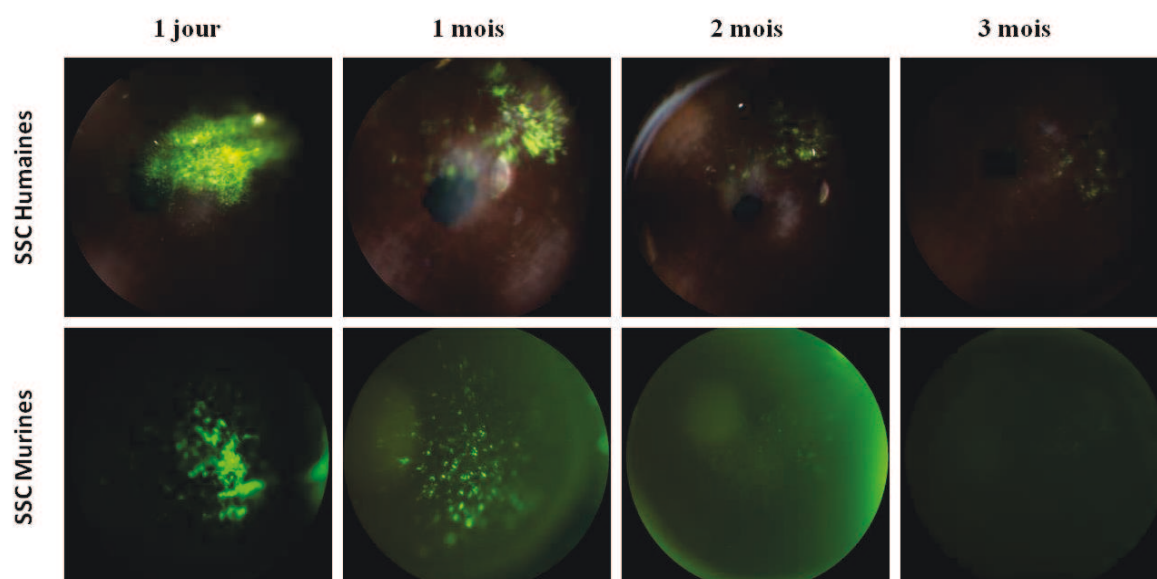


Figure 9. Suivi de la migration des SSC humaines et murines injectées en microscopie à fluorescence *in vivo*. Les SSC humaines (haut) sont observées pendant toute la durée du suivi, la fluorescence des SSC murines disparaît après le premier mois (bas).

Les animaux sont sacrifiés et les cornées fixées puis observées, soit directement en microscopie confocale si les cellules sont marquées au DiO, soit après révélation si les cellules sont marquées à l'EDU. Les figures 10A et 10B confirment la présence des cellules au niveau du site d'injection.

Un mois après injection, le nombre de cellules marquées diminue fortement au niveau du site d'injection (Figure 10C et 10D). Des cellules marquées sont retrouvées non seulement au niveau du site d'injection mais aussi au bord de la cornée (Figure 10C' et 10D').

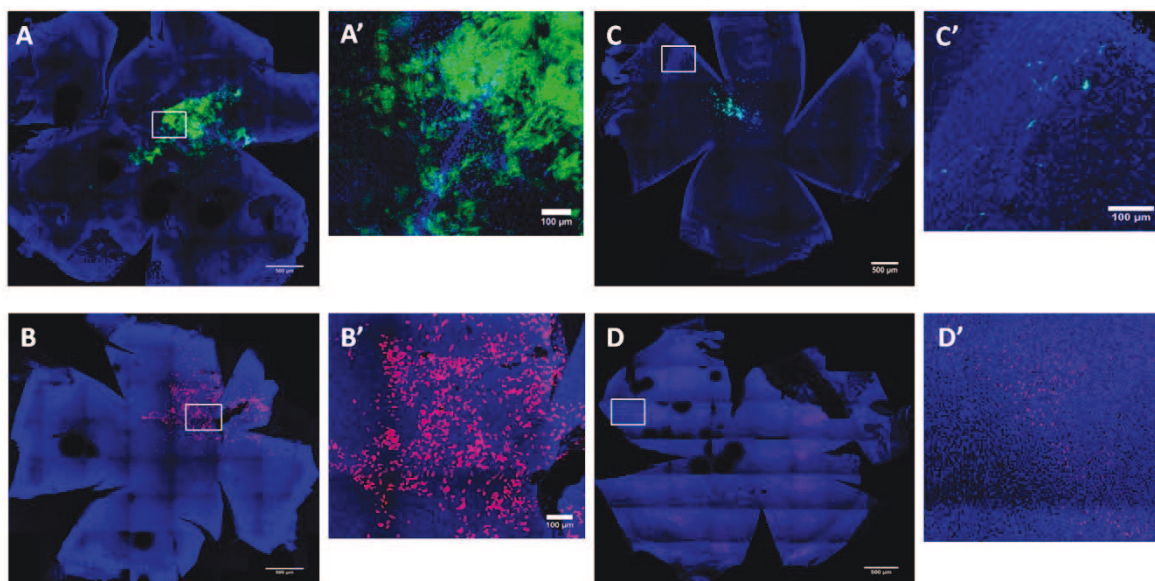


Figure 10. Injection des SSC. Analyse des cornées en microscopie confocale. Les cellules injectées sont observées en microscopie confocale 1 jour (A et B) ou 1 mois après injection (C et D). Les cellules sont présentes au niveau de site d'injection avec les deux techniques de marquage cellulaire, DiO en A et A' et EDU en B et B'. Un mois après injection on observe moins de cellules fluorescentes, mais elles sont présentes à distance du site d'injection (C'et D').

4.3.3.3.Prolifération des SSC injectées

La Figure 11 met en évidence, 1 mois après injection, la présence des SSC marquées au DiO au niveau du stroma cornéen à une profondeur constante (Figure 11B) ce qui montre que les cellules ont essentiellement migré entre deux lamelles de stroma. Ce résultat est confirmé par l'OCT (Figure 11 C) et le FFOCM (Figure 11 D) réalisés 6 mois après l'injection. Les cellules injectées sont marquées positivement au facteur de prolifération Ki67. Les cellules épithéliales adjacentes au SSC injectées présentent un marquage Ki67 positif (Figure 11F-G). Les cellules épithéliales situées à distance des SSC sont Ki67 négatives (Figure 11H) ce qui montre un effet paracrine des SSC sur la prolifération.

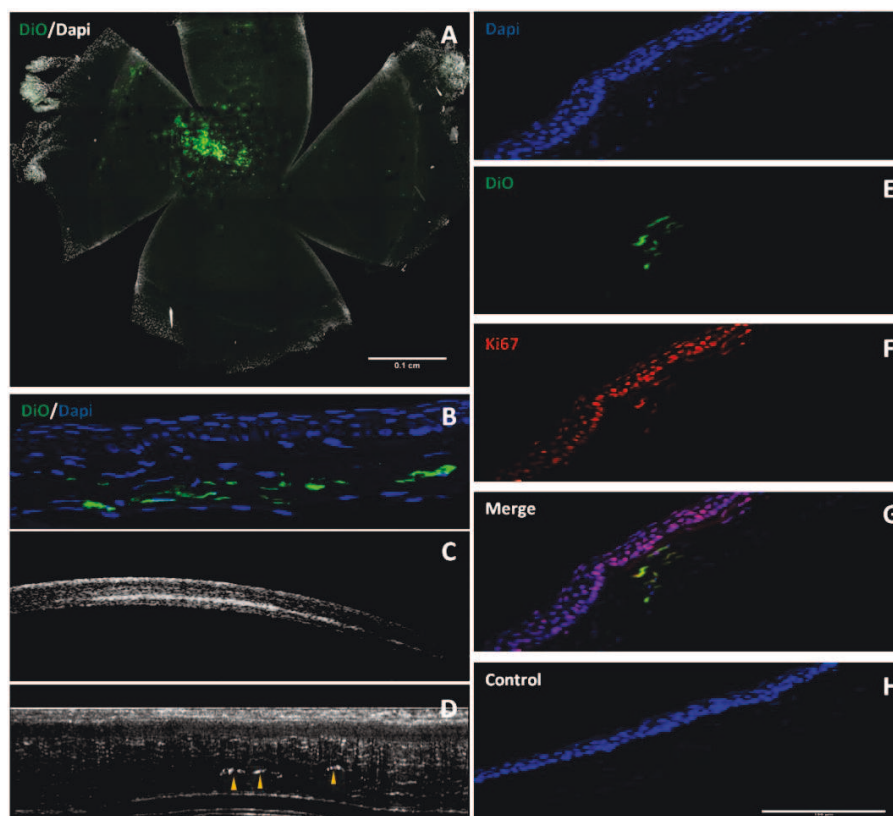


Figure 11. Prolifération des SSC injectées. Observation en microscopie confocale des cornées 1 mois après injection. Les cellules injectées ont migré à distance du site d'injection (A) et se situent dans l'épaisseur du stroma cornéen (B, C, D). Un marquage Ki67 est effectué afin d'évaluer la prolifération cellulaire (E-H). Les cellules injectées ainsi que les cellules épithéliales adjacentes (E-G) sont Ki67 positives. Les cellules épithéliales se trouvant en amont du site d'injection sont Ki67 négatives (F). Les cellules injectées sont localisées à la même profondeur stromale comme le montrent la microscopie confocale (B) et la microscopie en cohérence optique (FFOCM) et l'OCT réalisées 6 mois après l'injection des SSC (C, D).

4.3.3.1.Effet des SSC injectées sur l'opacité cornéenne

La Figure 12 résume les observations faites sur les souris 3 mois après injection des SSC humaines. A la lampe à fente, on observe la présence d'une zone opaque au centre de la cornée qui correspond au point d'application d'azote (Figure 12A et B). Dans les cornées traitées à l'azote le diamètre de la zone opaque augmente avec le temps (Figure 12 C). Dans les cornées traitées à l'azote et injectées avec les SSC humaines la zone opaque semble s'éclaircir (Figure 12D).

En OCT, on observe que 3 mois après traitement à l'azote, les cornées des souris n'ayant reçu aucune injection (ni SSC, ni véhicule) et les cornées des souris ayant reçu comme injection le véhicule s'amincissent progressivement (Figure 12). Les souris injectées avec les SSC présentent une diminution de l'hyperreflectivité liée à la fibrose sans amincissement de la cornée (Figure 12).

L'injection des SSC murines montre des effets semblables à l'injection des SSC humaines (Figure 13). Après une opacification due au traitement à l'azote (Figure 13A), les cornées sont transparentes à la lampe à fente (Figure 13C). L'effet des SSC murines est observé un mois après traitement.

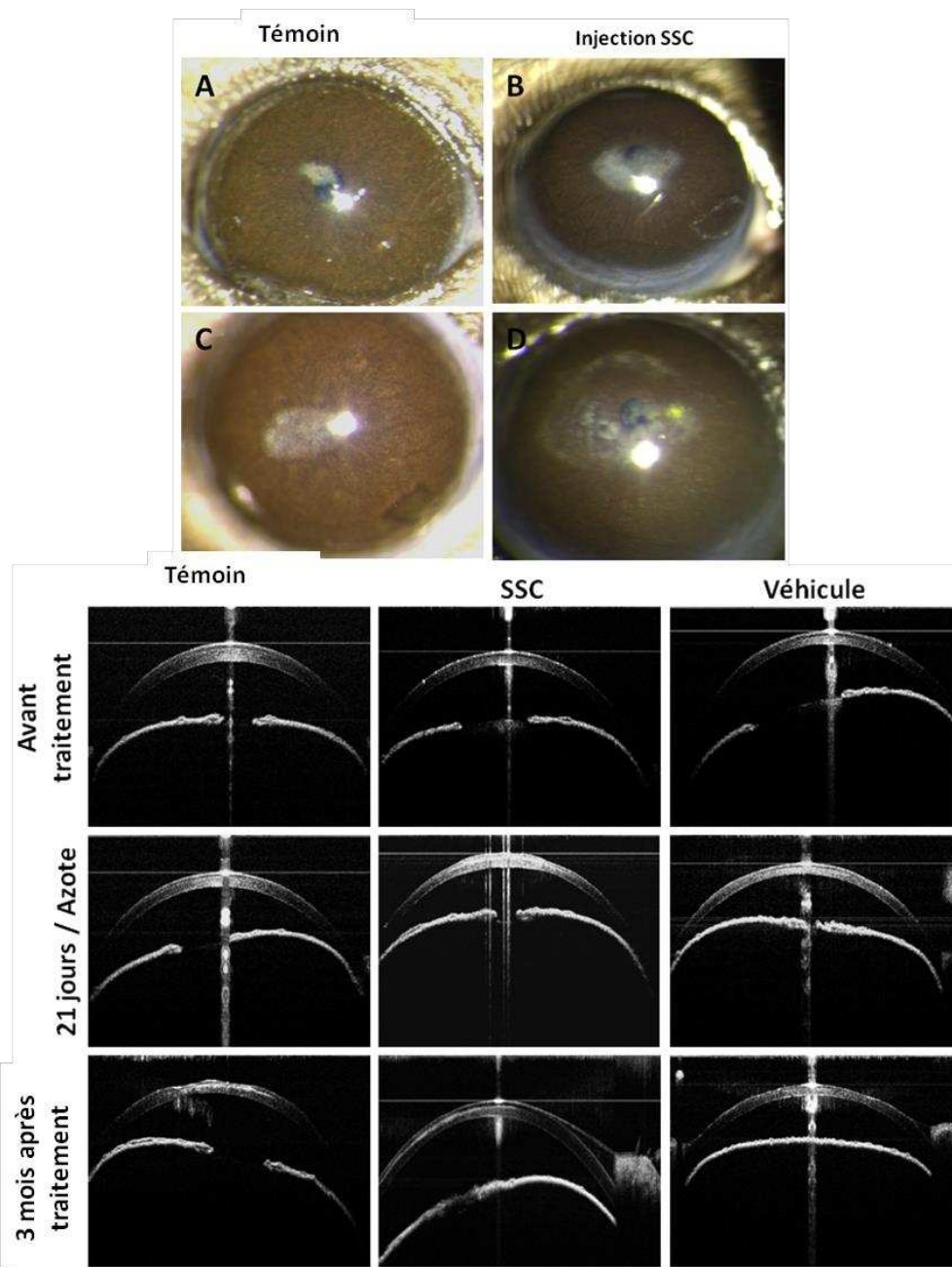


Figure 12. Effet des SSC humaines après injection : Analyse macroscopique et en OCT Spectral Domain. Observation à la lampe à fente (haut,). A et C correspondent à une cornée traitée à l'azote mais non injectée avec les SSC. B et D correspondent à une cornée traitée à l'azote et injectée avec les SSC. OCT des cornées (bas). La cornée « Témoin » correspond à une cornée traitée à l'azote et non injectée. La cornée « SSC » correspond à une cornée traitée à l'azote puis injectée avec les SSC humaines. La cornée « Véhicule » correspond à une cornée traitée à l'azote puis injectée avec le véhicule seul.

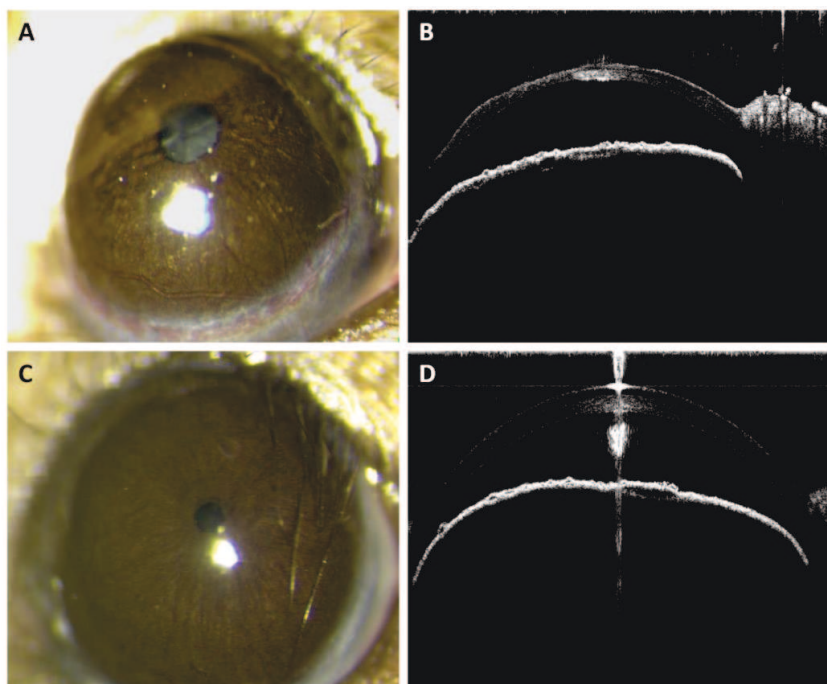


Figure 13. Effet des SSC murines après injection. Après traitement à l'azote, une zone opaque est observée au centre de la cornée (A). En OCT une hyperreflectivité apparaît au niveau du stroma cornéen qui semble aminci (B). Un mois après injection des SSC murines, la cornée est transparente (C) et retrouve son épaisseur normale (D).

4.3.3.2.Épaisseur stromale et densité kératocytaire

En FFOCM (Figure 14), l'épaisseur épithéliale moyenne n'est pas significativement modifiée par l'injection de cellules souches stromales ou de véhicule ($p = 0,60$). De même l'épaisseur stromale moyenne n'est pas significativement modifiée par l'injection de cellules souches stromales ou de véhicule ($p = 0,62$). Inversement la variabilité interindividuelle de l'épaisseur épithéliale et stromale est significative ($p < 0,0001$).

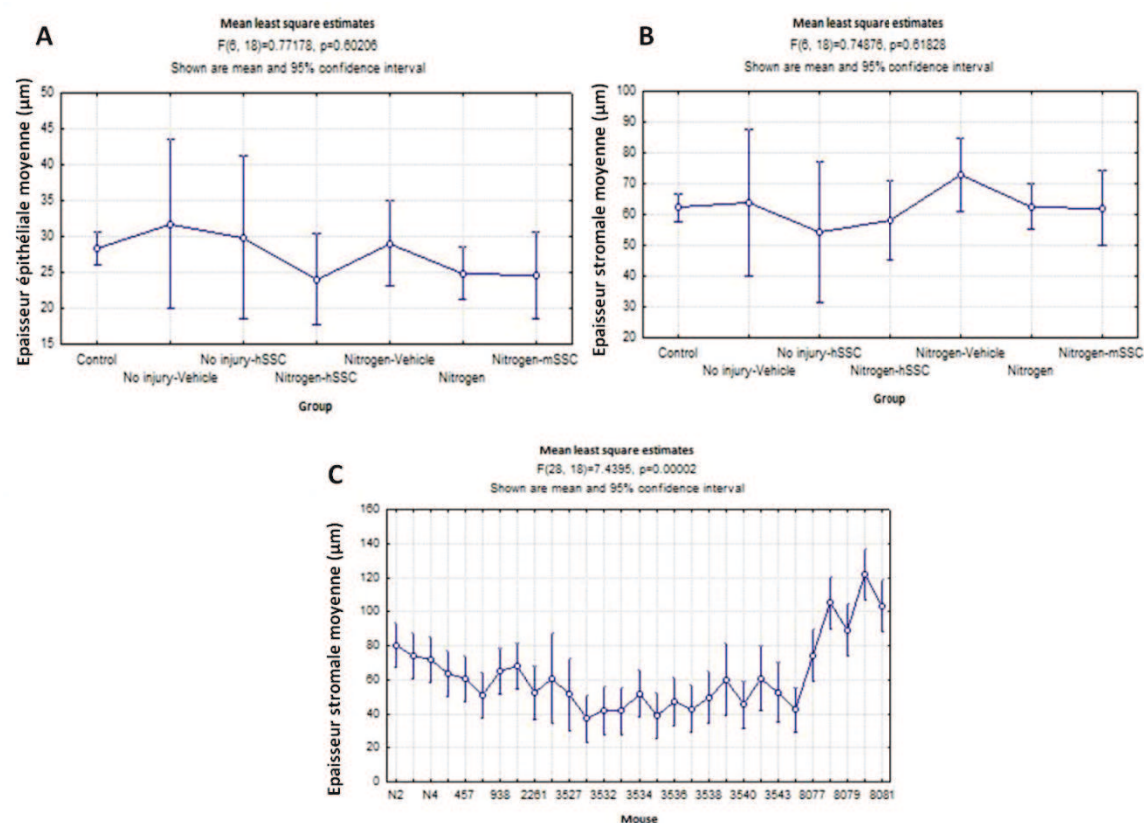


Figure 14. Analyse de l'épaisseur épithéliale et stromale en FFOCM. Les épaisseurs épithéliale (A) et stromale (B) ne sont pas significativement influencées par le traitement, ni par l'injection de cellules. Par contre, il existe une variation significative inter-individuelle de l'épaisseur stromale (C).

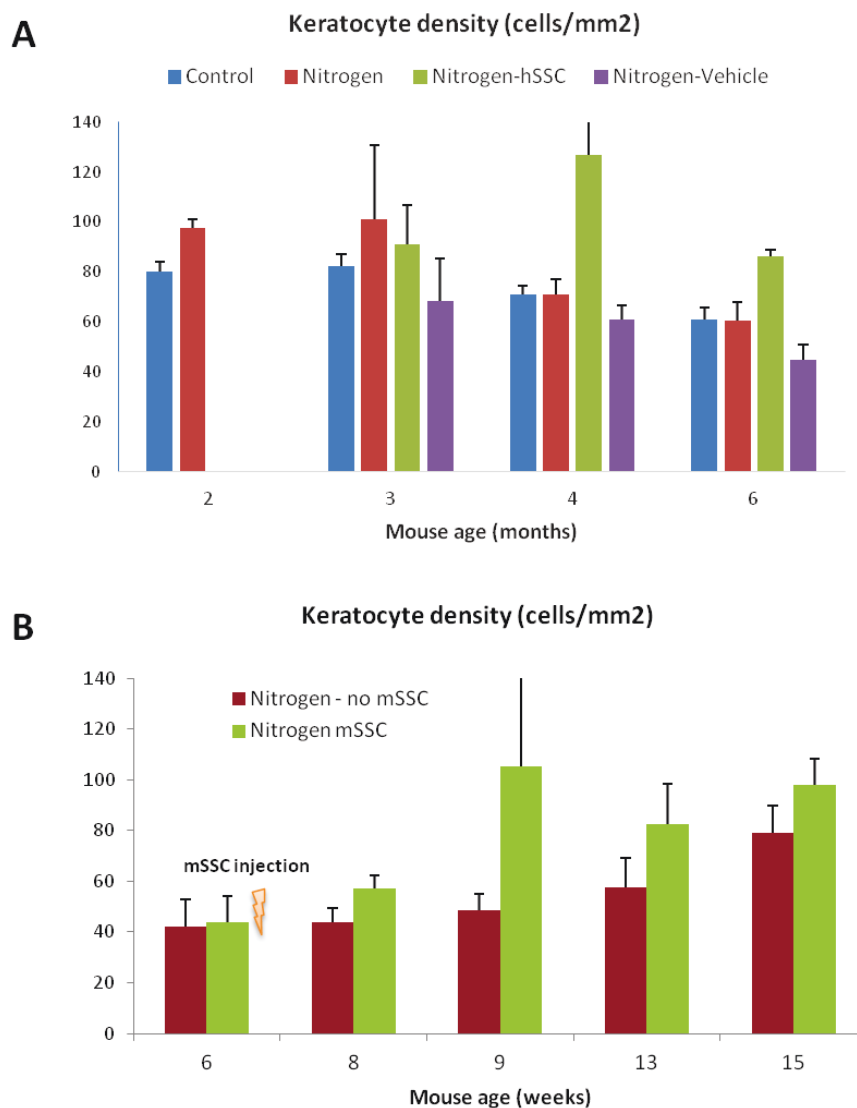


Figure 15. Densité kératocytaire mesurée en IVCN. Les cornées traitées à l'azote puis injectées avec des SSC humaines ont une densité kératocytaire supérieure aux témoins, aux souris traitées à l'azote et non injectées et à celles traitées à l'azote et injectées avec du véhicule deux et quatre mois après injection des cellules (A). La densité kératocytaire des cornées injectées avec des SSC murines après traitement à l'azote est plus élevée que celle des cornées traitées à l'azote sans injection de SSC et des cornées non traitées à l'azote et non injectées (B).

4.3.3.3.Effet des SSC sur l'organisation de la matrice extracellulaire

La microscopie biphotonique en SHG montre que les cornées traitées par l'azote et injectées avec des SSC humaines présentent un meilleur ordonnancement des fibrilles de collagène que les cornées traitées par l'azote et non injectées (Figure 16).

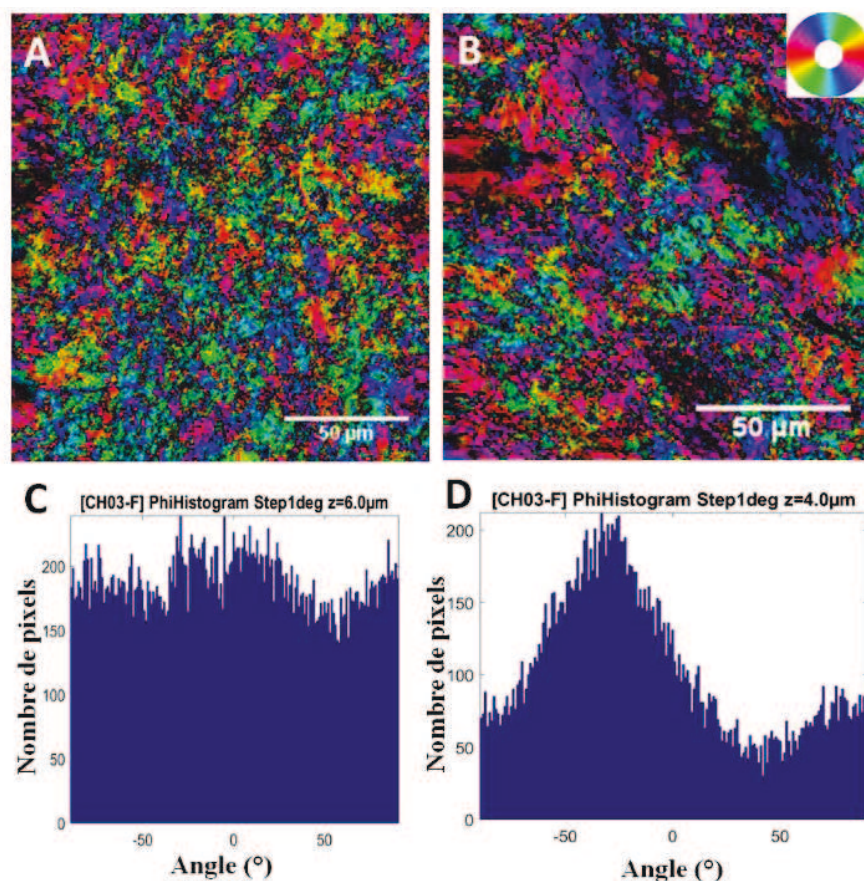


Figure 16. Microscopie SHG de cornées de souris traitées à l'azote avec ou sans injection de SSC humaines. Cornée traitée à l'azote (A, C). Cornée traitée à l'azote puis injectée avec des SSC humaines (B, D). La cartographie d'orientation des fibrilles de collagène dans le stroma (A, B) et l'histogramme d'orientation des fibrilles de collagène montrent que l'organisation des fibrilles de collagène est plus ordonnée dans la cornée traitée par SSC.

4.3.4. Discussion

Afin de tester l'effet thérapeutique des SSC nous avons développé un modèle animal de fibrose stromale. Ce modèle se caractérise par l'apparition d'opacifications cornéennes observées en lampe à fente et en OCT (Figure 2). Cette opacification apparaît suite à une inflammation (Figure 6) et une désorganisation de la matrice extracellulaire (Figure 7). Ces deux phénomènes correspondent à la réponse de la cornée à une lésion épithélio-stromale. En effet, La réponse de la cornée à une lésion se caractérise, après la phase de production de myofibroblastes et la sécrétion de collagène cicatriciel opaque qui permettent la coaptation des berges et le comblement partiel d'une perte de substance, par plusieurs événements qui contribuent à l'amélioration de la transparence cornéenne. Dans certaines conditions, cette réponse est perturbée par plusieurs facteurs qui induisent une perte de transparence cornéenne (Netto et al., 2005 ; Torricelli et al., 2016). Plusieurs auteurs se sont intéressés aux facteurs provoquant cette réponse anormale. Jester et coll. ont identifié les myofibroblastes comme initiateurs de l'opacité cornéenne (Jester et al. 1999). Après une lésion stromale, les myofibroblasts prolifèrent au niveau du site de la lésion en réponse au TGF- β (Masur et al. 1996). Le TGF- β , sécrété par l'épithélium cornéen, pénètre dans le stroma suite à la destruction de la membrane basale épithéliale (Jester et al. 2002). Les myofibroblastes sont des cellules opaques, elles ne produisent pas beaucoup de cristalline cornéennes. Ces protéines jouent un rôle dans le développement et le maintien de la transparence de la cornée grâce à leurs effets sur la diffusion de la lumière et sur l'absorption. (Jester et al. 1999 ; Mohan et al. 2003). En parallèle les myofibroblastes sécrètent de grandes quantités de matrice extracellulaire désorganisée provoquant ainsi une fibrose stromale (Jester et al., 1999). La prolifération des myofibroblastes dans notre modèle animal est constatée *in vivo* par IVCN et *ex vivo* par marquage α SMA (Figure 4).

L'apoptose des kératocytes est observée après grattage de l'épithélium cornéen et application d'azote *in vivo* par IVCN (Figure 4D) et *ex vivo* par le test TUNEL (Figure 4G). Un mois après le traitement, la densité kératocytaire calculée manuellement à partir des images obtenues par IVCN est augmentée (Figure 5D). Cette augmentation de densité cellulaire, malgré l'apoptose induite, pourrait être expliquée par plusieurs phénomènes : une division des cellules restantes pour repeupler le stroma, une migration des cellules périphériques vers la zone lésée, ou une surestimation de la densité cellulaire due au caractère très brillant du noyau des cellules en apoptose visualisées en IVCN. Par la suite, la densité

kératocytaire diminue avec le vieillissement des animaux. Trois mois après application d'azote la densité kératocytaire diminue significativement dans les cornées traitées (Figure 5D). Il a été reporté que la restauration de la membrane basale épithéliale et la diminution du taux de TGF β au niveau stromal joue un rôle dans l'apoptose des myofibroblastes (Netto et al. 2006). Les myofibroblastes se mettent en apoptose en réponse à l'IL-1 α , sécrété soit par les kératocytes activés soit par les myofibroblastes eux même (Wilson et al., 2007).

Les observations OCT élastographie montrent une augmentation de la rigidité de la cornée après traitement à l'azote (Figure 8). Ceci s'explique par la présence du tissu fibrotique déposé par les myofibroblastes lors du processus de réparation. L'OCT élastographie est une technique quantitative à haute résolution développée pour l'estimation des propriétés biomécaniques de la cornée et de la peau (Nguyen et al., 2016). Une application de cette technique a été proposée dans le suivi d'un traitement appelé « *cross-linking* » de collagène cornéen (CXL « *corneal collagen cross-linking* ») sur des cornées de porc *in vivo* (Nguyen 2012). Le CXL vise à rigidifier la cornée en l'exposant à une lumière UV en présence d'un catalyseur de type Riboflavine. Il est utilisé pour freiner l'évolution du kératocône avant le stade de fibrose stromale, une déformation progressive de la cornée qui devient molle (Tomkins and Garzozzi, 2008). Les résultats de ces expériences ont montré que la vitesse de l'onde de cisaillement est augmentée de plus de 50% dans les cornées traitées par CXL (Nguyen 2012).

Notre modèle de lésion de la cornée murine par grattage épithélial et application d'azote pendant 5 secondes induit donc une apoptose des kératocytes et une fibrose stromale caractérisée par la diminution de la transparence cornéenne, l'augmentation de la rigidité cornéenne, une augmentation de la densité cellulaire stromale à 1 mois, la formation de myofibroblastes, la sécrétion de collagène III et la désorganisation des fibrilles de collagène du stroma.

Effet de l'injection des SSC

La thérapie cellulaire utilisant les cellules souches stromales pour la réparation du stroma cornéen a été introduite très récemment par Funderburgh. Ses travaux sur des pathologies cornéenne dans des modèles animaux *Lum*^{-/-} et de grattage cornéen profond (ablation de la membrane basale épithéliale et d'une partie du stroma antérieur), montrent que les SSC sont

capables de prévenir la formation d'un tissu fibrotique et de produire une matrice extracellulaire organisée (Du et al. 2009 ; Basu et al., 2014).

Dans notre étude nous avons souhaité utiliser les SSC dans un modèle animal de fibrose cornéenne. Le but est de voir si les SSC sont capables, par la synthèse d'une matrice extracellulaire organisée, d'éliminer l'effet du tissu fibrotique.

Notre étude montre que les SSC injectées persistent dans la cornée murine 1 mois après injection pour les cellules allogéniques murine et 3 mois pour les cellules xénogéniques humaines (Figure 9) et sont retrouvées sur toute la surface de la cornée (Figure 10). Les cellules migrent donc à partir du site d'injection. Cette migration se fait dans un plan parallèle à la surface cornéenne, entre les lamelles du stroma. L'utilisation d'un marqueur de prolifération montre que les SSC injectées prolifèrent et ont un effet paracrine sur les cellules épithéliales adjacentes (Figure 11). En effet les cellules épithéliales adjacentes aux SSC expriment Ki67 contrairement aux autres cellules épithéliales situées à distance des SSC. L'effet paracrine a été décrit dans l'utilisation des cellules souches mésenchymateuses pour la réparation de l'épithélium cornéen dans des modèles d'atteintes cornéennes chimique. Ces travaux ont montré que les cellules souches mésenchymateuses favorisent la réépithélialisation et la transparençisation de la cornée. Leur activité paracrine leur confère des propriétés ayant des effets bénéfiques sur l'homéostasie des tissus, mais également sur leur réparation (Jiang et al., 2010 ; Ma et al., 2006 ; Rohaina et al., 2014). La prolifération des SSC injectées entraîne une diminution puis une disparition du marquage DiO et EDU. La disparition plus rapide du marquage avec les SSC murines pourrait indiquer qu'elles prolifèrent plus rapidement que les SSC humaines.

Nos résultats montrent l'effet thérapeutique des SSC dans notre modèle de fibrose stromale induite par le grattage épithéliale et l'application d'azote. En effet, les observations à la lampe à fente, en IVCN et à l'OCT montrent 1- une diminution de la zone opacifiée (Figure 12) ce qui suggère que les SSC injectées ont participé au remodelage de la matrice extracellulaire du stroma cornéen (Figure 16) et 2 – une augmentation de la densité kératocytaire (Figure 15). Cet effet est observé après l'injection des SSC humaines et murines (Figure 12 et 13). Cependant l'effet thérapeutique des SSC murines semble plus rapide que celui des SSC humaines. Un mois seulement après injection des SSC murines les cornées perdent le tissu fibrotique observé en OCT contre 3 mois pour les SSC humaines. Cet effet thérapeutique plus

rapide pourrait être lié à une prolifération cellulaire plus importante. Des études ont montré qu'une xéno-transplantation induit une réaction inflammatoire qui se traduit par le rejet du greffon quelques heures à quelques jours après la greffe (Ross et al., 1993 ; Larkin et al., 1995). Ceci ne s'applique pas à une greffe de cellules souches. En effet, dans leur étude Funderburgh et son équipe ont observé une réponse inflammatoire après injection de fibroblastes humains (cellules différenciées) et non après injection de cellules souches humaines (Du et al., 2009). Ceci est dû à l'effet immunosuppresseur des cellules souches adultes démontré surtout au cours de greffe de cellules souches mésenchymateuses. Les cellules souches mésenchymateuses inhibent la prolifération et la différenciation des lymphocytes B ainsi que leur migration au site d'inflammation (Patel et al., 2008). Dans notre modèle une réaction immunitaire a été observée in vivo sous forme d'un anneau de Wessely après injection de SSC xénogéniques humaines sur une souris. Néanmoins, après euthanasie des animaux, les cornées ne présentaient pas de réaction inflammatoire en histologie. L'effet des SSC sur la transparence cornéenne constatée à la lampe à fente et en OCT est associé à une meilleure organisation des fibrilles de collagène en SHG.

D'autres analyses sont en progression, telles que l'observation de l'innervation dans les cornées contrôles, dans les cornées traitées à l'azote et dans les cornées injectées avec des SSC. Une analyse des stries larges et sombres observées à l'IVCM et au FFOCM avec des méthodes de calculs statistiques. Une autre série d'injection de SSC est prévue afin d'avoir un nombre de souris suffisant pour confirmer l'effet thérapeutique des SSC.

Plusieurs améliorations sont aussi à prévoir, notamment dans la préparation des cellules souches. Nous avons utilisé des cellules souches issues de la culture primaire pour l'injection dans le modèle animal ; la limite de cette utilisation est le faible nombre de cellules obtenues. Des efforts dans la culture clonale avec une méthode d'amplification permettant de garder une ploïdie (contenu en chromosomes) normale et sans acquérir de caractère tumoral est nécessaire. Ceci nous permettra sûrement dans le futur, d'utiliser les mêmes SSC issues d'un seul donneur pour plusieurs receveurs.

Une autre amélioration est liée à l'utilisation de la souris comme modèle pour l'étude de la cornée. A cause du stress provoqué par l'application d'azote et comme les animaux vivent à 4 ou 5 par cage, les souris se grattent les yeux et ont tendance à se blesser la cornée entre elles ; ceci est un réel frein pour exploiter les cornées témoins qui développent des opacités

cornéennes et des hyperréflexivités observée à l'OCT. L'utilisation d'un modèle de gros rongeur pourrait peut-être améliorer cet aspect. Enfin la souris, à la différence de l'homme, est dépourvue de couche de Bowman et présente une épaisseur stromale fine comparée à son épaisseur épithéliale.

4.3.5. Conclusion

Les résultats de ce travail permettent de conclure que l'injection de SSC permet de faire régresser le processus de fibrose stromale cornéenne dans notre modèle murin. Le processus de fibrose caractérise le stade évolué du kératocône et des cicatrices secondaires à des infections ou des traumatismes cornéens. Ce processus est contemporain d'une baisse de vision profonde qui conduit à poser l'indication d'une greffe de cornée. L'injection de SSC est une thérapeutique à priori peu invasive par rapport à la greffe de cornée car elle ne comporte pas de soustraction du tissu du receveur et le produit de thérapie cellulaire est dépourvu de cellules immunogènes. Nous proposons donc, qu'au terme de ce travail, une translation vers la clinique soit envisagée sous forme d'un essai clinique de phase I/II visant à évaluer l'effet des SSC allogéniques humaines sur la fibrose stromale au cours du kératocône de stade IV et des autres cicatrices cornéennes post-infectieuses et post-traumatiques.

4.4. Article 4

4.4.1. Synthèse d'une cornée artificielle à partir de collagène I et de cellules souches cornéennes

Toujours dans le souci de trouver des thérapies alternatives au manque de dons de cornée, différentes approches visant à reproduire des cornées artificielles *in vitro* sont en cours de développement. Etant le composé majoritaire de la matrice extracellulaire de la cornée, le collagène I est largement utilisé pour la reconstitution *in vitro* d'une matrice artificielle mimant les caractéristiques de la cornée. Du collagène est utilisé à faible concentration ; afin de le rendre transparent et d'augmenter ses propriétés biomécaniques des agents telles que les glycosaminoglycanes et l'EDC sont utilisés.

Le projet qui suit décrit une méthode d'obtention d'une matrice composée uniquement de collagène I sans addition d'aucune molécule favorisant sa transparence ni ses propriétés biomécaniques. Comme citées précédemment, le développement de cette matrice s'est appuyé principalement sur les expertises et la collaboration étroite avec l'équipe Matériaux et Biologie, Laboratoire de Chimie de la Matière Condensée de Paris, UMR7574-UPMC/CNRS/Collège de France. L'originalité du projet est de tirer parti des propriétés cristal-liquides et d'auto-assemblage du collagène. La stabilisation de cette phase cristal-liquide par fibrillogenèse conduit à la formation d'une matrice transparente organisée et manipulable. De notre côté nous avons étudié la capacité de ces matrices à être colonisée par des cellules épithéliales et par des kératocytes cornéen.



Development of human corneal epithelium on organized fibrillated transparent collagen matrices synthesized at high concentration



Aurélien Tidu^a, Djida Ghoubay-Benallaoua^{b,c,d,e}, Barbara Lynch^f, Bernard Haye^a, Corinne Illoul^a, Jean-Marc Allain^f, Vincent M. Borderie^{b,c,d,e}, Gervaise Mosser^{a,*}

^aSorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, CNRS, Collège de France, UMR 7574, Chimie de la Matière Condensée de Paris, F-75005 Paris, France

^bSorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UMR_S 968, Institut de la Vision, Paris F75012, France

^cINSERM, U968, Paris F75012, France

^dCNRS, UMR_7210, Paris F75012, France

^eCentre Hospitalier National d'Ophtalmologie des Quinze-Vingts, DHU View Maintain, INSERM-DHOS CIC 1423, Paris F-75012, France

^fSolids Mechanics Laboratory, Ecole Polytechnique, Centre National de la Recherche Scientifique, Palaiseau, France

ABSTRACT

Several diseases can lead to opacification of cornea requiring transplantation of donor tissue to restore vision. In this context, transparent collagen I fibrillated matrices have been synthesized at 15, 30, 60 and 90 mg/mL. The matrices were evaluated for fibril organizations, transparency, mechanical properties and ability to support corneal epithelial cell culture. The best results were obtained with 90 mg/mL scaffolds. At this concentration, the fibril organization presented some similarities to that found in corneal stroma. Matrices had a mean Young's modulus of 570 kPa and acellular scaffolds had a transparency of 87% in the 380–780 nm wavelength range. Human corneal epithelial cells successfully colonized the surface of the scaffolds and generated an epithelium with characteristics of corneal epithelial cells (i.e. expression of cytokeratin 3 and presence of desmosomes) and maintenance of stemness during culture (i.e. expression of δN p63 α and formation of holoclones in colony formation assay). Presence of cultured epithelium on the matrices was associated with increased transparency (89%).

Keywords: collagen; liquid-crystal; transparent matrices; Human corneal epithelium; limbal stem cell; mechanical tests.

1. Introduction

Cornea, the outer layer of the eye, is a transparent tissue. Its high refractive power contributes to 2/3 of the eye optical power. It consists of several distinct layers, including corneal epithelium and stroma (Herlers and Hjordal, 2005). The stroma accounts for approximately 90% of the corneal thickness. It is mainly composed of collagen type I, with minor quantities of collagen type V and other types of collagen and biomolecules such as proteoglycans and glycosaminoglycans (Hulmes, 2004; Ihanamäki et al., 2004). Distinctive features of the collagen fibrils are the narrow size distribution of around 30 nm in diameter, the regular spacing and the layer structure that is reminiscent of plywood – all of them assumed to contribute to the transparency of the tissue and its mechanical properties (Hassell et al., 2010; Muller, 2001; Young et al., 2002; Birk et al., 1986; Daxer et al., 1998). Stromal keratocytes show high metabolic activities accounting for renewal of the extracellular matrix by synthesizing collagens and keratan sulfate proteoglycans (Hassel and Birk, 2010; Birk and Trelstad, 1998). Keratocytes show a dendritic morphology thus minimizing light diffusion (Hassel and Birk, 2010). They are supplied with nutrients by molecular diffusion across the corneal stroma. The lack of vascularization contributes to the relative immune privilege of the cornea, meaning that antigens introduced at this site are tolerated to a certain degree without provoking an immune response (Larkin, 1994). For this reason, allogeneic corneal transplantation is the standard treatment of corneal stromal diseases that lead to a loss of vision such as: keratoconus, stromal scars after infectious keratitis or trauma, stromal dystrophies. In about 20% of cases, transplantation of allogenic donor tissue induces an inflammatory reaction, despite the corneal immune privilege, that may eventually lead to rejection and destruction of the donor cells (Guilbert et al., 2013). In these cases, and for the treatment of severe inflammatory ocular surface diseases, such as Stevens-Johnson syndrome or ocular cicatricial pemphigoid, alternative treatment options such as synthetic corneal implants provide higher success rates (Coster et al., 2010). These medical devices include keratoprosthesis made of polymethylmethacrylate or polyhydroxyethylmethacrylate and artificial cornea substitutes also derived from synthetic polymers. Limits of these therapeutic approaches include lack of true integration to the surrounding tissue that may lead to rejection of the implanted material. To overcome the disadvantages of synthetic materials for corneal repair, collagen-based implants are being developed by several research groups across the world (Calderón-Colón et al., 2012; Liu et al., 2006; Liu et al., 2012; Merrett et al., 2009;

Tanaka et al. 2011; Hakett et al., 2010; Torbet et al., 2007) with promising results (Fagerholm and al., 2014; Chae et al., 2015).

Current collagen corneal implants are generally made of collagen I or III at low concentration together with additional components such as glycosaminoglycan to ensure transparency and chemical cross-linkers such as 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide and N-Hydroxysuccinimide to improve the mechanical properties of the artificial scaffold (Fagerholm and al., 2014). The key idea of our approach is to propose a new type of acellular dense collagen matrix that could be either seeded with stem cells, or used for direct implantation allowing the recipient peripheral corneal cells to migrate and proliferate into the implanted matrix and leading to reconstruction of the original native corneal structure. It is known that lyotropic liquid crystal properties of acidic collagen solution can be used to generate opaque dense organized matrices (Besseau et al., 2002; Maeda et al., 2000, De Sa Peixoto et al., 2013; De Sa Peixoto et al., 2011; Gobeaux et al., 2008). We describe here, for the first time, the process to get transparent dense collagen matrices using only collagen I without any cross-linkers or additional biological molecule. Ruberti *et al.* used similar procedure but with the use of additional molecules (Saedi et al. 2012). The transparent collagen I scaffolds are then checked for the potentiality to host human limbal explants. Cell viability and growth as well as maintenance of stemness were assessed after 14 days of culture. The scaffolds have been analyzed before and after cell culture by transmission electron and light microscopies and mechanical tests were conducted on acellular matrices.

2. Materials and Methods

2.1. Collagen I Purification

Type I collagen was extracted from young Wistar or Sprague-Dawley rat-tails and purified following published protocols (Gobeaux et al., 2008). Collagen solutions purified in 500 mM acetic acid were kept at 4 °C and centrifuged at 41,000×g for 4 h before use. Sample purity was assessed by SDS-PAGE electrophoresis. Collagen concentration was determined from the acidic solution by assessing the amount of hydroxyproline (Bergman et al., 1963).

2.2. Sample preparation

Collagen solution (3.16 mg/mL) prepared in 500 mM acetic acid was dialyzed to obtain a final solution in 75 mM acetic acid and 1.25 mM hydrochloric acid (pH 2.55). The solution was subsequently concentrated at fixed concentrations (15, 30, 60 and 90 mg/mL) by centrifugation-filtration using Vivaspın (30 kD cutoff) on a variable angle Beckman-Coulter J26-XP centrifuge (4500 rpm – 4922 g, 10 °C). The concentrated solutions have a gel-like consistency. They are transferred into a sterile syringe and centrifuged to withdraw air bubbles. Approximately 200 µl of the concentrated solution is put into a ceramic mold that roughly mimics the anterior shape of the cornea. A plastic counter part roughly mimicking the shape of the posterior part of the cornea is set on the small collagen ball and press on to it. The moulds were then submitted to ammonia vapor at saturation for 17 hours at 20 °C to induce fibrillogenesis of collagen (Besseau and Giraud-Guille, 1995). After 17 hours, the samples were collected and immersed in Milli-Q water and stored at 20 °C until use.

2.3. Cell Culture

This study was carried out according to the tenets of the Declaration of Helsinki and it followed international ethic requirements for human tissues. Human organ-cultured donor corneas and amniotic membrane were obtained from the EFS - Ile-de-France tissue bank (Paris, France).

Six human corneas were used in this study. The average donor age was 77 years (range 68 to 83 years). Time from donor death to tissue procurement ranged from 10 to 48 hours (mean, 27h). Donor corneas were organ-cultured in CorneaMax medium (Eurobio, Courtaboeuf, France) at 31°C for 14–35 days (mean, 21 days) as previously described (Borderie et al., 1998; Borderie et al., 1995). The central part of the donor cornea was transplanted to the scheduled recipient and the remaining corneoscleral rim was used for cell culture.

Amniotic membranes were obtained from two female donors undergoing caesarean section. Donors featured negative serology for hepatitis B, hepatitis C, HTLV, HIV, and syphilis. The placenta was first washed with saline solution containing antibiotics for two hours and rinsed with sterile water. The membrane was separated from the placenta after removal of its border with scissors and placed in nitrocellulose surface, cut into pieces and stored in a 1:1 mixture of RPMI medium (Eurobio) and glycerol (Haemonetics, Lyon, France) at -80°C for 2 years. Before culture amniotic membrane grafts were thawed at room temperature and rinsed with

phosphate buffer saline. There was no selection of the amniotic membrane area used for the experiments.

Superficial limbal explants were prepared as previously described (Ghoubay-Benallaoua et al., 2011). Six human limbal rims were divided in 2 parts. Each semi-rim was divided in 3 explants. For each donor cornea, five explants were cultured for 14 days on the surface of five different carriers (i.e., 15, 30, 60, and 90 mg/mL collagen matrices and human amniotic membrane as control). Collagen scaffolds were rinsed first with Milli-Q water and culture medium to remove all ammonia residues before cell proliferation test. Human donor cornea explants were then stitched on top of the scaffolds, epithelial side up, to induce close contact to the scaffold and allow for cell migration from explants to matrix as described in Fig. SI-1. The setup was immersed entirely in the Green's medium composed of a 3:1 mixture of calcium-free Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Dutscher, Brumath, France) and Ham F12 medium (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) with 10% fetal bovine serum (Invitrogen), 1 mM/ml HEPES buffer (Invitrogen), 5 µg/ml human recombinant insulin (Actrapid®; Novo Nordisk, Paris, France), 0.4 µg/ml hydrocortisone (Pharmacia, Pfizer, Paris, France), 4 µM/ml L-glutamine (Invitrogen), 2 pM/ml tri-iodo thyronine (Sigma, Saint Quentin en Yvelines, France), 200 nM/ml adenine (Sigma), 100 IU/ml penicillin (Invitrogen), 100 µg/ml streptomycin (Invitrogen), 0.25 µg/ml amphotericin B (Invitrogen), and 10 ng/ml human recombinant Epithelial Growth Factor (EGF; Sigma) and incubated for 14 days at 37°C in presence of CO₂. These culture conditions were shown to be optimal for expansion of progenitors (Ghoubay-Benallaoua et al. 2011). The culture medium was changed three times a week. At the end of the culture period the scaffolds were used for further investigations. Samples were not pooled.

2.4. Mechanical Tests

Mechanical tests were conducted on a custom-made uniaxial device set up at the "Laboratoire de Mécanique des Solides" at the Ecole Polytechnique (Palaiseau, France) (Gusachenko et al., 2012). This device was composed of two motors (drl42pa2g-04; Oriental Motor, Tokyo, Japan) and two force sensors (Futek, LPM200, 2lb) on both sides of the sample. The device is symmetric, with a motor and a sensor on each side of the sample in order to enable continuous imaging of the central region.

Samples were cut into a dumbbell-shaped in order to obtain a homogenous uniaxial tensile load in the central testing portion. Displacement of the motors was imposed and the resulting

force measured every second. To correct for sample unfolding and possible sliding, the actual displacement was obtained using Digital Image Correlation (DIC). To create the pattern necessary for DIC, polystyrene microbeads (Dynoseeds TS40, Microbeads) were attached to the surface of the sample using polylysine: the dumbbell-shaped samples were covered with 1 mL polylysine (Sigma-Aldrich) at 2% concentration for 20 minutes. The polylysine solution was then removed and the sample covered with 1 mL of Milli-Q water containing the microbeads (diameter: 40µm). Microbeads glued to the sample's surface thanks to the polylysine. The sample was then rinsed thoroughly in Milli-Q water to wash away unattached beads. A picture of the sample was taken every 1 second and a home-made software (CorrelManuV, developed by Michel Bornert (Bornert et al., 2010)) was used to determine the actual displacement field of the surface of the sample, allowing us to correct the stress-strain curve. The lateral dimensions of each sample are quantified with a digital calliper, the thicknesses were assumed to be approximately 500 µm for all samples: thickness measurements of such soft and thin samples are inaccurate and not reproducible. The nominal stress is calculated relating the tensile force to the initial cross-section of the sample; the nominal strain is given as:

$$\varepsilon = \frac{\Delta l}{l_0}$$

l_0 being the initial sample length and δl the change in length

The slope of the stress-strain curve for small deformations corresponds to the Young's modulus of the material (see Fig. SI-2). The ultimate tensile strength is determined to compare the mechanical resistance of samples as a function of their concentration.

2.5. Transparency measurement

In order to assess the transparency of the collagen a central stripe was cut from the collagen matrix and placed on the side of a transparent cuvette (MAKE) filled with water. The measurement was achieved using a UVIKON XL spectrophotometer. All the stripes were about 500 µm thick and 3 mm wide. An identical cuvette filled only with water served as a reference.

The absorbance of the sample was calculated as:

$$A_{\text{sample}}(\lambda) = A_{\text{measured}}(\lambda) - A_{\text{water}}(\lambda)$$

Taking in account the sample thickness d (in meter), the optical density of the sample was defined as

$$D(\lambda) = \frac{A_{\text{Sample}}(\lambda)}{d}$$

The mean optical density of a sample was defined as the average of $D(\lambda)$ for λ between 380 and 780nm:

$$D_m = \frac{\sum_{\lambda=380}^{\lambda=780} D(\lambda_i)}{\sum i}$$

Eventually, the transparency of one sample was calculated as:

$$T = 10^{-D_m * 0.0005}$$

The thickness was fixed at 500 μm . The same procedure was used to measure the transparency of our matrices and human cornea.

2.6. Transmission Electron Microscopy

Samples with or without cells were fixed using 3.63% glutaraldehyde in cacodylate/saccharose buffer solution (0.05 M/0.3 M, pH 7.4) for 1 h at 48C. After fixation, samples were postfixed with 2% osmium tetroxide in cacodylate/saccharose buffer solution. Then they were washed in cacodylate/saccharose solution, dehydrated in successive ethanol baths, and finally embedded in araldite. Embedded samples were sectioned on an Ultracut Reichert Jung as already described (De Sa Peixoto et al., 2013). Thin sections (0.5 μm) were contrasted with toluidine blue and observed on a Nikon Eclipse E600Pol microscope equipped with a 40 $\times$ /0.65 NA objective and a DXM 1200 CCD camera. Ultrathin sections (70 nm) were stained with uranyl acetate and observed on a transmission electron microscope FEI Tecnai spirit G2 operating at 120 kV. Images were recorded on a CCD Camera (Orius Gatan 832 digital).

2.7. Cell phenotyping

At the end of culture limbal explants were removed and cells grown on the five types of carriers (i.e., 15, 30, 60, and 90 mg/mL matrices and amniotic membrane) were enzymatically dissociated with 0.5% trypsin for 8 minutes and counted with a Kova Slide after staining with trypan blue to exclude non-viable cells. They were characterized by means of colony formation assay, immunocytochemistry, and RNA Extraction, Reverse Transcription, and Quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR) as previously described (Ghoubay et al. 2013) (see supplementary document SI-3 for detailed description). The number of replicates performed per type of carrier was 6 for colony formation assay and immunocytochemistry and 9 for RT-qPCR

2.8. Statistical analysis

One-way ANOVA was used to compare continuous variables between groups. The Brown–Forsythe test was used to examine homogeneity of variance between groups. Where a significant difference between groups was detected by one-way ANOVA, a post-hoc analysis was performed using the Tukey post-hoc test where group variance was homogenous. Otherwise the Games–Howell post-hoc test was employed. Statistical analysis was performed using a software program (Statistica version 6.1; StatSoft France, Maisons-Alfort, France)

3. RESULTS

The concentrated collagen solutions were pressed into a cornea-like shape and submitted to ammonia vapors for 17 hours. At the end of the process we obtained dense transparent matrices (Fig. 1) that were further analyzed.

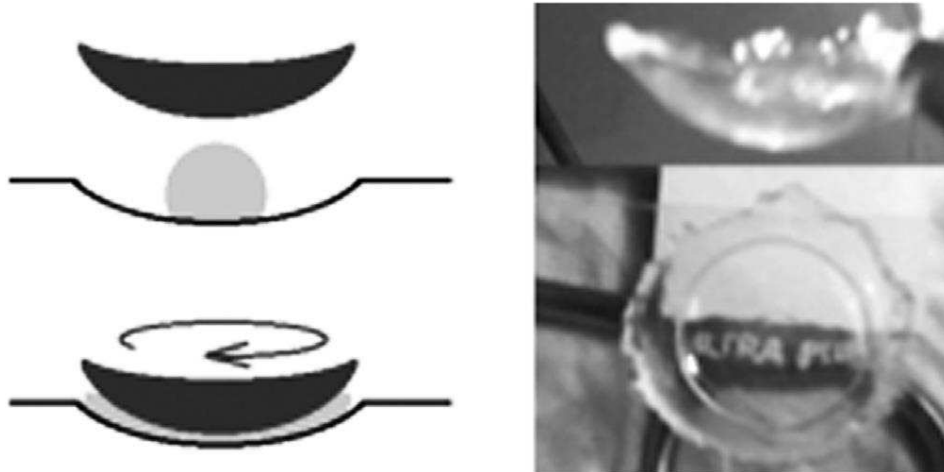


Figure 1: Photo of a transparent collagen matrix at 90mg/mL. Left side illustrates the molding of collagen dense solution prior setting into ammonia vapors. Right side shows the collagen matrix after fibrillogenesis

3.1. Transmission electron microscopy

Transmission electron microscopy revealed the presence of collagen fibrils and their distribution throughout the sample at the four concentrations used (Fig. 2). Fibril density and fibril organization increased with collagen concentration (2A-D, 2E-H left). At 90 mg/mL, we observed layers of fibrils cut laterally and transversally alternating (Fig. 2D&H). All samples presented fibrils with the 67 nm characteristic striations (Fig. 2E–H right).

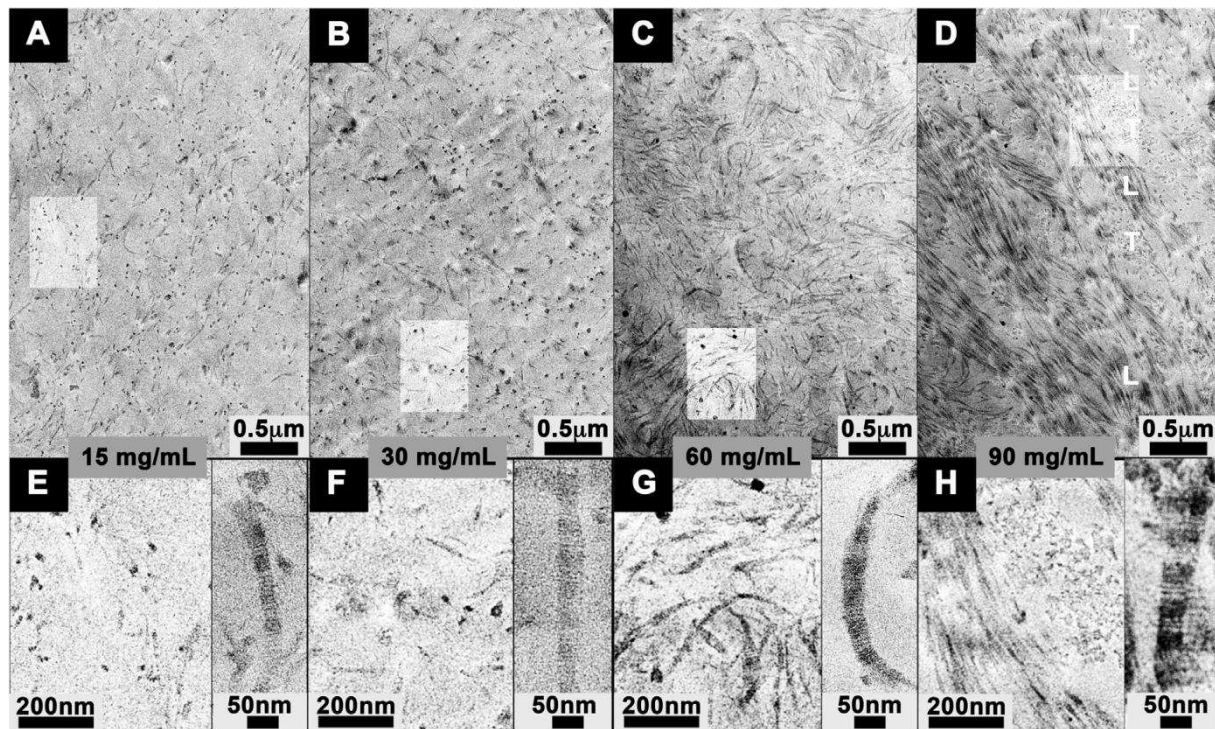


Figure 2: Characterization of the matrices by transmission electron microscopy. Ultrathin sections of fixed and embedded samples reveal the collagen fibrils, their distribution and organization within the matrices at four different concentrations: 15 mg/mL (A+E), 30 mg/mL (B+F), 60 mg/mL (C+G), 90 mg/mL (D+H). A–D) low magnification, E–H left) analytical zoom on the area delimited in (A–D). All concentrations reveal 67 nm cross-striated fibrils with diameters ranging from 20 nm to 50 nm (E–H right). The density of fibrils increases with increasing concentration. D) At 90 mg/mL layers of fibrils cut transversally (T) alternate with layers of fibrils cut laterally (L) indicating changes of directions.

3.2. Mechanical tests

Three samples were tested at each of the three concentrations: 30, 60, 90 mg/mL. At 15 mg/mL only one sample resisted the manipulation. Mechanical tests showed an increase of the Young's modulus and the maximum stress at rupture with increased collagen concentration (Fig. 3). The matrix at 15 mg/mL showed a Young modulus of 15 kPa, a maximum stress of around 6 kPa and an elongation at rupture of 70%. For matrices at 30, 60, and 90 mg/mL, we measured mean Young's modulus respectively 77 ± 3 , 315 ± 17 , 576 ± 32 kPa (Fig. 3A). The mean maximum stresses were 64 ± 4 kPa for the 30 mg/mL and 258 ± 19 kPa both for the 60 and 90 mg/mL (Fig. 3B). The mean percentage of elongations at rupture for the 30, 60, and 90 mg/mL matrices were respectively 99 ± 2 , 81 ± 5 and $54 \pm 3\%$ (Fig. 3C). As internal reference, identical mechanical tests have been performed on seven amniotic membranes giving a Young modulus of $24 \text{ MPa} \pm 3$ and a maximum stress at rupture of $2.9 \pm 0.5 \text{ MPa}$ for an elongation of $22.1 \pm 3.5\%$.

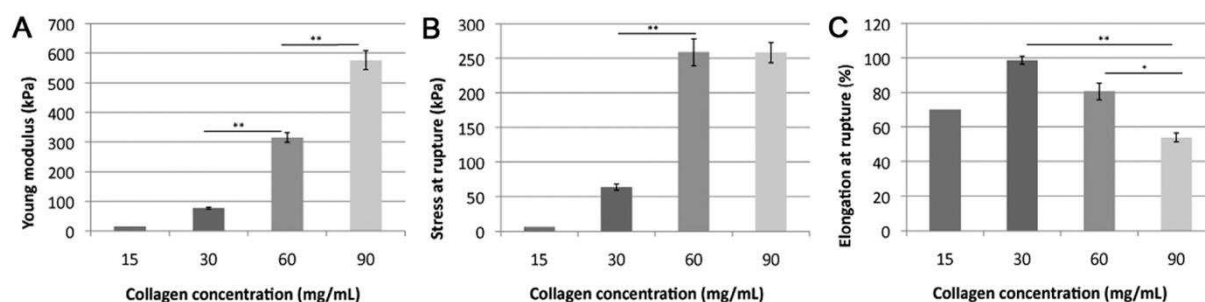


Figure 3: Mechanical tests. The results of the mechanical tests show equivalent properties at 15 and 30 mg/mL. Then, from 30 mg/mL upward, the Young modulus and the stress at rupture increase with collagen concentration ranging respectively from 77 ± 5.7 kPa to 576 ± 56 kPa and from $64 \text{ kPa} \pm 11 \text{ kPa}$ to $258 \pm 44 \text{ kPa}$. The strain at rupture decreases with increasing collagen concentration. It varies from $90 \pm 20\%$ at low concentrations (15 and 30 mg/mL) to $50 \pm 12\%$ at high concentrations (60 and 90 mg/mL). The number of replicates is 1 at 15 mg/mL and 3 at 30, 60 and 90 mg/mL. Error bars correspond to SEM. Data at 15 mg/mL were not considered in statistical analysis. * (resp. **) indicates $p < 0.05$ (resp. $p < 0.01$).

3.3. Cell culture and characterization

After 14 days of culture, a layer of polygonal cells was observed on collagen matrices surface (Fig. 4A & B). Semithin sections (Fig. 5) as well as transmission electron microscopy (Fig. 6) revealed layers of cells (C1 & C2) set on the matrices (M). Those cells presented many interdigitations (Fig. 6B) and desmosomes (Fig. 6C-D). There were no significant differences in the number of cells grown outside the explant on the surface of the scaffolds between the five different carriers (15, 30, 60, and 90 mg/mL collagen matrices and human amniotic membrane).

After primary culture, cells were dissociated and cultured with mitomycin-arrested 3T3 murine feeders for 12 days. Colonies were obtained on 15, 30, 60 and 90 mg/mL matrices and human amniotic membrane (Fig. 4C & 4D) with no significant differences in Colony Forming Efficiency between carriers ($p = 0.35$). Immunocytochemical analysis of the cells revealed the presence of p63 α , cytokeratin 3, and *Vimentin* markers in all cultures (Fig. 7). Quantitative real time PCR showed transcript expression for CK-3, ABCG2 and Δ Np63 α (Fig. 8). The expression of transcript for Δ Np63 α and cytokeratin 3 was significantly higher for 60 mg/mL matrices compared with all other carriers. The expression of transcript for *Vimentin* was significantly higher for 15 mg/mL matrices compared with all other carriers.

Finally, there were no significant differences in cell growth or in cell phenotype according to donor characteristics including donor sex and age.

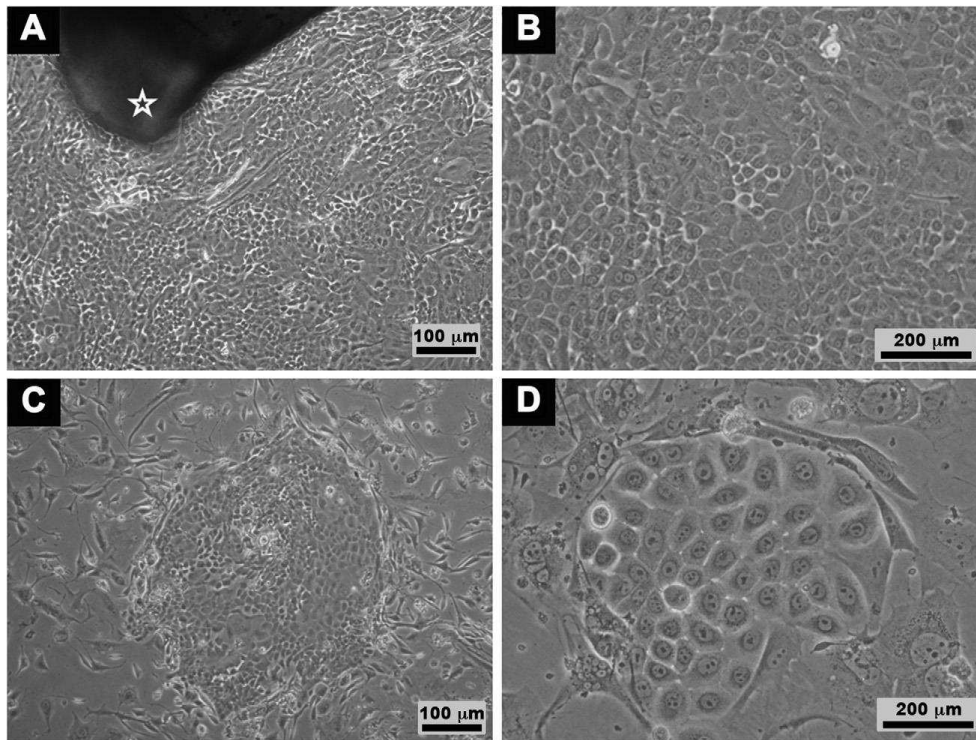


Figure 4: Phase contrast light microscopy of limbal epithelial cells grown from the explants sutured on the matrices (A & B) and clonal growth of dissociated limbal epithelial cells on a 3T3 feeder cell layer (C & D). The characteristic cobble-stone morphology of human corneal epithelial cells is found both with cells grown from explant on collagen matrix (A & B) and with dissociated cells grown with feeders after culture on collagen matrix (C & D). A rounded colony of polygonal epithelial cells surrounded by 3T3 fibroblasts can be observed in C & D
* = limbal explant.

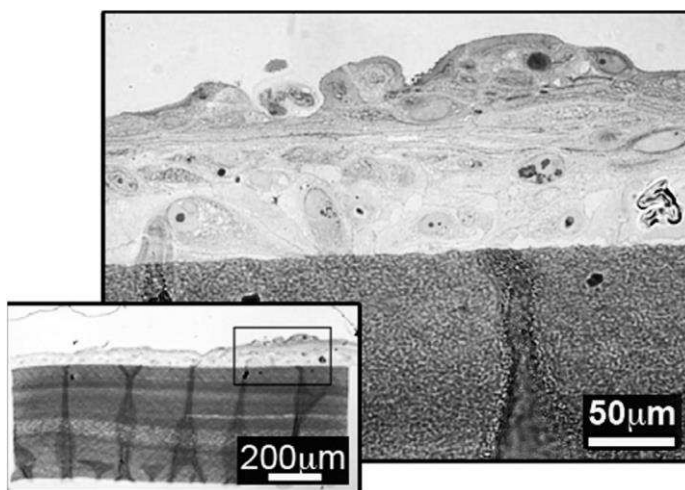


Figure 5: Optical analysis of cell culture. Low and high magnifications of a thin section of fixed and embedded cell cultured samples on a 90 mg/mL collagen matrix. A stratified epithelium, 50 to 100 μm thick, can be observed by optical microscopy.

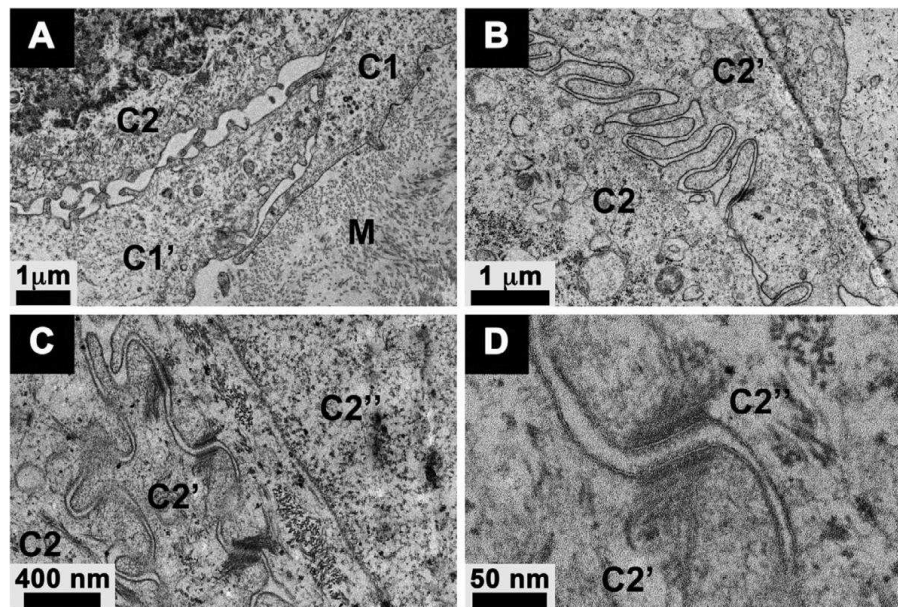


Figure 6: Transmission electron microscopy analysis of cell cultured samples. A: Two layers of cells (C1 & C2) are seen on the matrix (M). B: Interdigitations characteristics of corneal epithelial cells are observed between two adjacent cells (C2 & C2'). C & D: Series of desmosomes are seen ensuring the junction between cells (C2' & C2'').

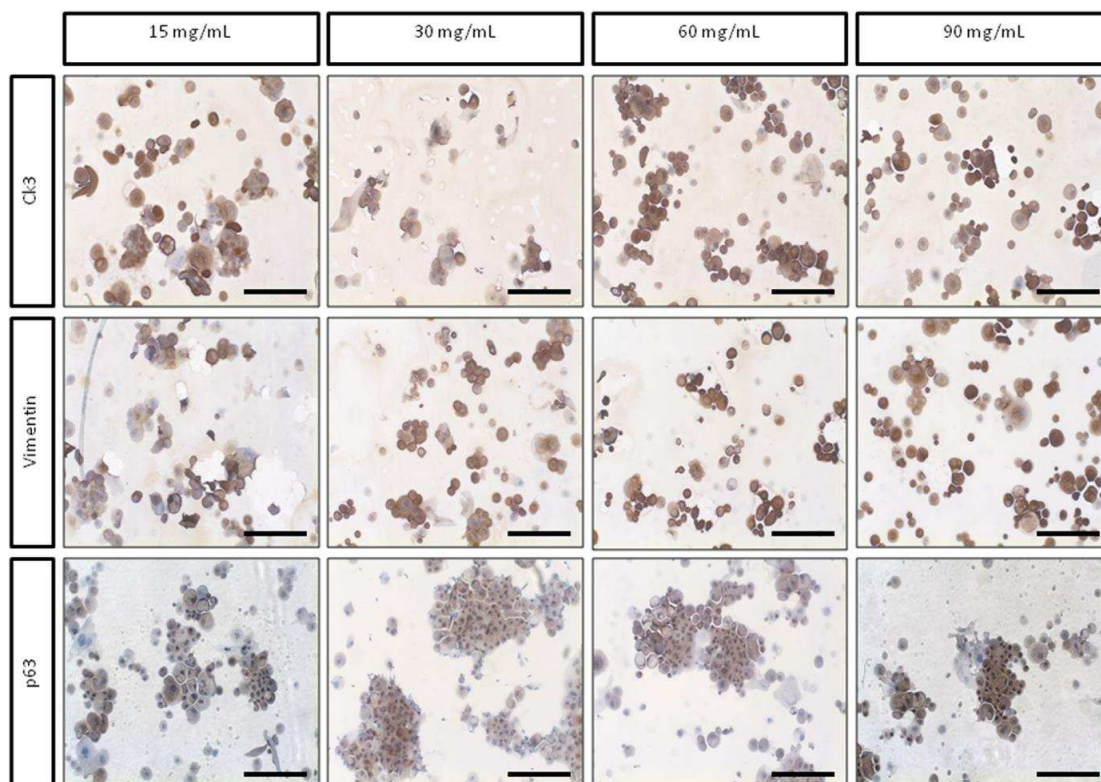


Figure 7: Immunocytochemistry of limbal epithelial cells grown on the collagen matrices. Cells featured cytoplasmic staining with the anti-cytokeratin 3 and anti-*Vimentin* antibodies and nuclear staining with the anti-p63 antibody. Bars: 200μm.

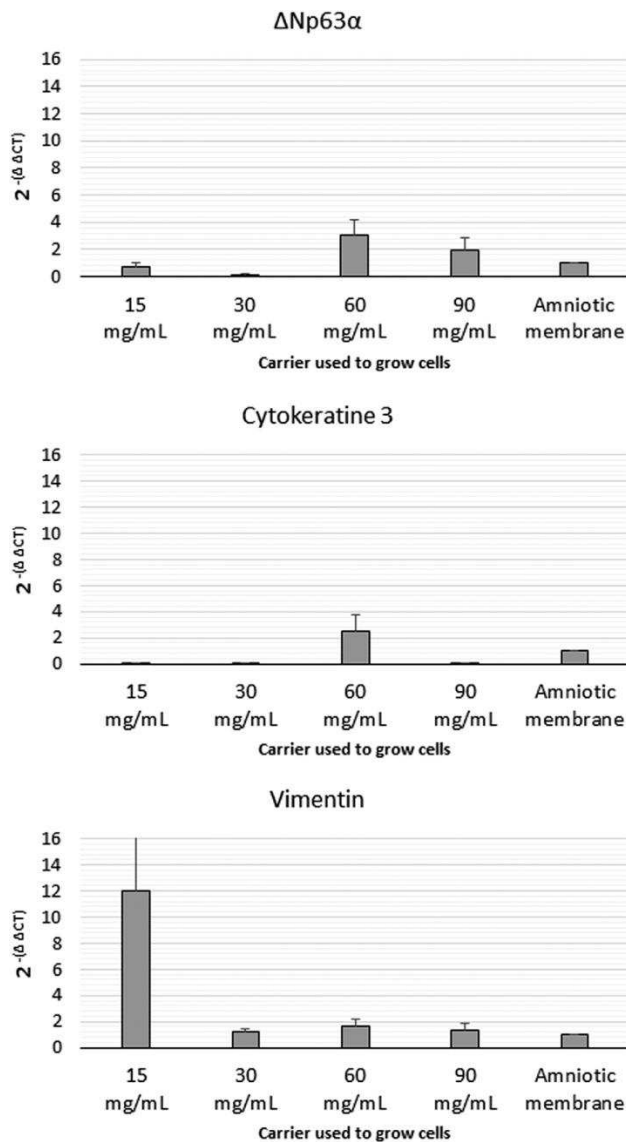


Figure 8: Quantitative real time PCR of limbal epithelial cells grown on the collagen matrices and human amniotic membrane (number of replicates = 9). The human amniotic membrane was considered as the control with a level of transcript expression (i.e., $2^{-\Delta\Delta CT}$) set at 1 for the three assessed mRNAs. Analysis of variance showed significant differences between carriers for $\Delta Np63\alpha$ ($p = 0.02$), cytokeratin 3 ($p = 0.02$), and *Vimentin* ($p = 0.04$). The post-hoc tests showed that the expression of transcript for $\Delta Np63\alpha$ (Games–Howell post-hoc test versus 15, 30, 90 mg/mL matrices and amniotic membrane: $p < 0.04$) and cytokeratin 3 (Games–Howell post-hoc test versus 15, 30, 90 mg/mL matrices and amniotic membrane: $p < 0.04$) was significantly higher for the 60 mg/mL matrices compared with all other carriers. The expression of transcript for *Vimentin* was significantly higher for the 15 mg/mL matrices compared with all other carriers (Games–Howell post-hoc test versus 30, 60, 90 mg/mL matrices and amniotic membrane: $p < 0.02$). All other post-hoc tests were not significant.

3.4. Transparency

At both concentrations, 60 and 90 mg/mL, transparency measurements for wavelengths in the visible range (380 to 780 nm) were conducted 5 times for the acellular matrices at 90 mg/mL (Figure 9) and once for matrices at 60 mg/mL and those with cells (Figure 9). For the acellular matrices, the curves were almost the same each time at 90 mg/mL giving mean values of 87% at 90 mg/mL. After 14 days of cell culture, we obtained mean transmittances of 75, 91, 90, 89% for matrices at 15, 30, 60, 90 mg/mL respectively (Figure 9). The figure shows the results for one experiment conducted after 14 days of culture.

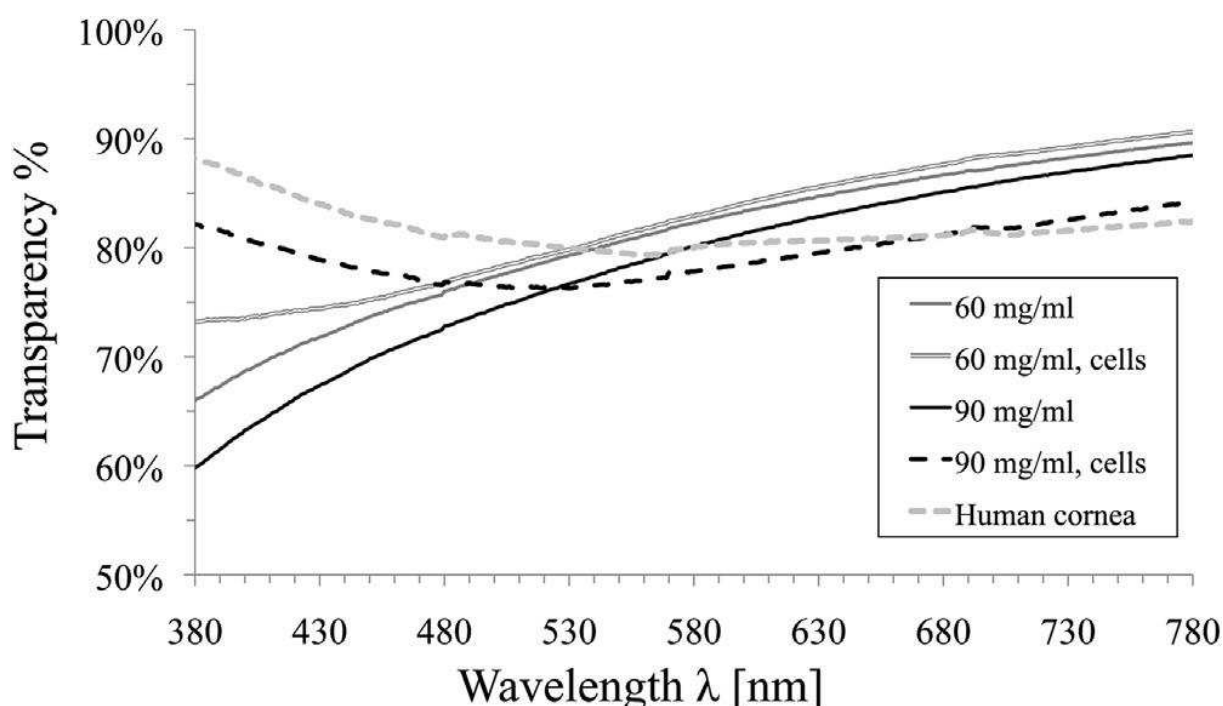


Figure 9: Transparency measurements. Transparency was assessed from 380 to 730 nm with and without cells. In between 530 and 730 nm and in absence of cells, the transparency varies at lowest from 75% up to 88% at 90 mg/mL and from 80% to 90% at 60 mg/mL. In presence of cells the transparency varies from 75% to 84% at 90 mg/mL and remains nearly unchanged at 60 mg/mL. In the low range of wavelength (<530nm), at both concentrations, the transparency increases in the presence of cells. The effect is stronger at 90 mg/mL with the transparency increasing from 60% without cells to 82% with cells.

4. DISCUSSION

4.1. Structure and organization

Transparent fibrillated collagen I scaffolds were prepared at concentrations up to 90 mg/mL without the use of additives such as proteoglycans or cross-linkers. The process used allowed the shaping of the matrices into cornea-like shape neither inferring on transparency nor losing local organization set in the liquid crystalline state. All samples presented fibrils with the 67nm characteristic striation indicating good fibrillogenesis. As already reported (Gobeaux et al., 2008; Mosser et al., 2005), fibril density and fibril organization increased with collagen concentration. The increase in fibril organization was striking when passing from 60 mg/mL to 90 mg/mL where layers of fibrils cut laterally and transversally alternated roughly resembling that seen in normal corneal stroma. However, the pitch of the alternation of orientation is much lower than that of corneal stroma. Further works are currently in progress to improve this organization.

4.2. Mechanical issue

As expected, the mechanical tests showed that increasing collagen concentration increased both the Young's modulus and the maximum stress at rupture. The mechanical characteristics of our toughest matrices, (those at 90 mg/mL, mean Young's modulus of 570 kPa, with mean maximum stress and elongation at rupture of 270 kPa and 55%) are lower than that of amniotic membranes (24.3 MPa) and are similar or lower as that published on human cornea and competitor scaffolds (0.9 kPa -10 MPa) (Colderon-Colon et al., 2012; Liu et al., 2006; Tanaka et al., 2011; Merette et al., 2008; Mi et al., 2011; Ahn et al., 2013; Hamilton et al., 2008). Thus, although our matrices present already reasonable mechanical properties, we may need to improve them to reach the range of MPa reported for some human corneas and some competitors' scaffolds. Although, this should not be too difficult since, our matrices are synthesised in absence of crosslinkers, this last objective may not be mandatory if recipient keratocytes migrate into the implanted collagen matrix and renew the extracellular matrix leading to better biomechanical properties.

4.3. Development of corneal epithelium

Although all matrices were made in the same chemical condition (75 mM acetic acid and 1.25 mM hydrochloric acid, pH 2.55) our results showed variations from one concentration to the other; hierarchical organizations and mechanical properties varied due to density of fibril

(Gobeaux et al., 2008; Mosser et al. 2006). Since both nanoscale surface topography and scaffold mechanical properties are important features influencing basic cell characteristic (Fiedler et al., 2013; Engler et al., 2006; Discher et al., 2005), we checked the propensity of cells to colonize the matrices.

The layered cells found on the matrices together with their interdigitations and desmosomes observed by transmission electron microscopy on ultrathin section are characteristics of corneal epithelial cells (Hogan et al., 1971). Moreover, cell phenotyping proved that cultured cells had a corneal epithelial phenotype since expression of cytokeratin 3 was revealed by immunochemistry and RT-PCR. Furthermore, stemness was also maintained during culture as shown by presence of holoclones in colony formation assay, expression of p63 α in immunochemistry, and transcript expression for Δ N p63 α at the end of the culture period. The Colony Forming Efficiency was not higher with human amniotic membrane, which is routinely used to grow limbal epithelial stem cells for transplantation compared with collagen matrices. The mRNA level of Δ Np63 α was higher with cells grown on the 60 mg/mL collagen matrices. It has been previously suggested that stem cells could be significantly influenced by both the chemical and physical aspects of their microenvironment (Engler et al., 2007) . In addition, carbodiimide cross-linked amniotic membrane has been shown to preserve limbal progenitor cells (Lai et al., 2014). Further studies are needed to investigate the relationships between matrix collagen concentration, their nano-structure and maintenance of limbal stem cells in culture.

Combined, those data suggest that collagen matrices support maintenance of LSC stemness, as does human amniotic membrane, despite the differences in mechanical properties. Thus, our data proved that cells were viable, proliferated and migrated from the native cornea explants onto our collagen scaffolds and formed an epithelial cell sheet on top of it.

4.4. Transparency

The data demonstrate that our matrices present good transparency at all concentrations and that this transparency was little affected by the epithelial cells and the culture conditions. The 75 to 91 % transparencies we obtained over the visible range (380-780 nm) are comparable to results found in literature (75 – 90.5 %) and to the 80 % value that we found for human cornea (Table 1, and (Calderón-Colón et al., 2012; Liu et al., 2006; Liu et al., 2012; Merrett et al., 2009; Tanaka et al. 2011).

Group	Transparency	λ range	Thickness
Present Investigation	75-91%	380-780	0.5 mm
Liu et al., 2006	90.5%	VIS	0.5 mm
Liu et al. 2012	90.0%	450-600nm	no data
Merette et al., 2008	89.8%	no data	no data
Calderon-Colon et al., 2012	84.2%	550 nm	0.05 mm
Tanaka et al., 2010	75.0%	550 nm	no data
Human cornea	80%	VIS	0.5 mm

Table 1: Transparency values in bibliography. Table enabling the comparison of transparency values obtained in different laboratory on scaffold obtained by different methods.

Noticeably at the end of the culture period, both samples (60 and 90 mg/mL) exhibited a transparency slightly increased at short wavelengths near UV in presence of cells. This slight improvement is unlikely due to profound modification of the scaffolds microstructure by cells since they do not penetrate into the sample. However, the epithelium could act as a protecting layer against further transverse growth of collagen fibrils localized on the surface due to the pH of the cell culture media (pH 7.5). The influence of pH over fibril diameter has already been shown for such dense collagen matrices (Gobeau et al., 2008). The cell-protecting layer would reduce the surface roughness and consequently improve the transmittance. The fact that the presence of cells improves the transmittance only at lower wavelengths suggests that the transversal growth of the fibrils due to culture media is, nevertheless, limited; the smaller the modifications of the fibril diameter, the lower the wavelength affected will be. Thus, our results indicate that: 1) the transparency of the matrices is preserved in physiological conditions, 2) by spreading over the surface of the scaffold, the cells may have a protecting effect against variation of the fibril diameter upon cell culture conditions.

5. Conclusion

Pure collagen I transparent fibrillated matrices can be prepared using liquid crystal-phase of highly concentrated collagen solutions prepared in 75 mM acetic acid and 1.25 mM hydrochloric acid (pH 2.55). It is the first time that we report the synthesis of transparent concentrated collagen I matrices made in absence of any biochemical additives such as proteoglycans or cross-linkers. The highest collagen concentration (90 mg/mL) gave better overall results than lower concentrations. They presented the highest mechanical properties

(580 kPa) and a high mean transparency over the whole visible range (89%). At this concentration, the hierarchical organization of the fibrils presents some similarities as that of corneal stroma. Furthermore, those matrices stand culture of epithelial cells coming from a human limbal explant and remain transparent during the culture. This constitutes a promising result for further development and *in vivo* application.

Supplementary data

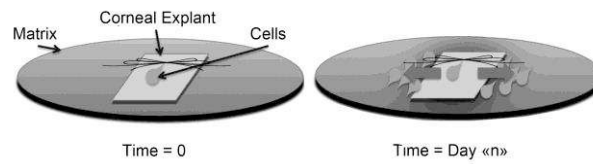


Figure SI-1

Figure S1: Cell culture scheme. The superficial layer of human corneal limbal explants is stitched on collagen matrices then covered by culture media and set in an incubator at 37 °C. With time, the limbal epithelial cells will descend on the matrix and colonize it.

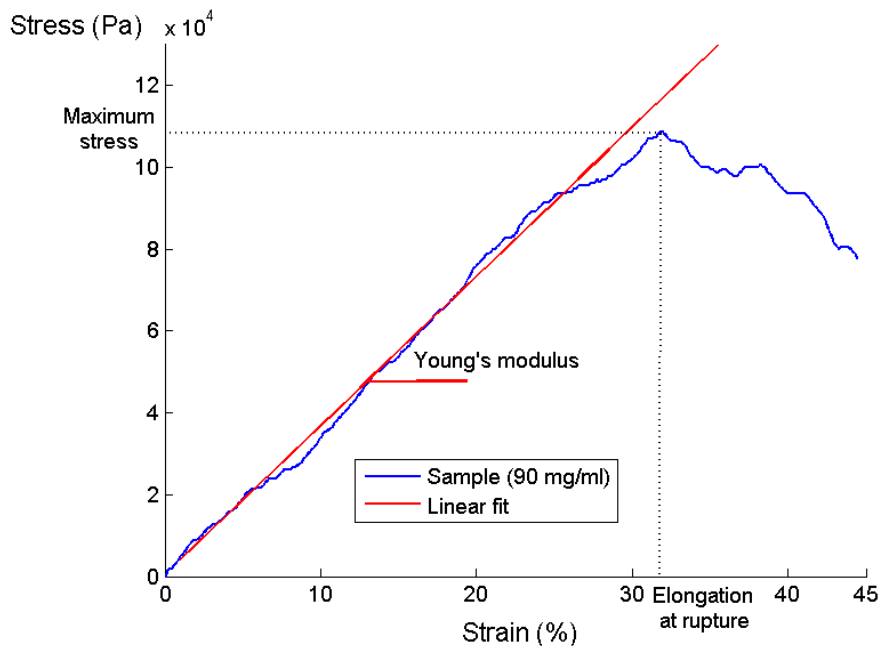


Figure SI-2

Figure 2: Stress-strain curves. Measured stress-strain curve for the sample at 90mg/ml. Stress is obtained by dividing the force by the initial cross-section of the sample. The strain in the traction direction is obtained through the tracking of beads glued on the surface. Linear fit of the initial part gives the Young's modulus. The maximum stress and elongation at rupture are obtained at the maximal value of the stress.

Supplementary 5: Cell phenotyping detailed protocol

Colony Formation Assay

The clonal growth ability of cultured limbal epithelial cells on collagen matrices was evaluated by determining colony-forming efficiency (CFE). Swiss albino murine 3T3 fibroblasts (ATCC, Molsheim, France) were treated with 4 µg/ml mitomycin C for 2 hours and then trypsinized and plated at a density of $2 \times 10^4/\text{cm}^2$ onto six-well culture dishes. Cultured cells were seeded at a density of 1000 cells/well in six-well culture dishes on 3T3 fibroblasts feeder layers. Cultures were incubated at 37°C under 5% CO₂. A colony was defined as a group of eight or more contiguous cells as described elsewhere. The colonies were fixed on day 12 and stained with crystal violet and photographed. The CFE was defined either as the percentage or the absolute number of cells forming colonies as follows: CFE (%) = (number of counted colonies / number of seeded cells) x 100, CFE (N) = CFE (%) x number of living cells at the end of primary culture.

Immunocytochemistry:

Cultured cells were enzymatically dissociated and concentrated by cytopsin. After washing in PBS, cells were fixed for 10 min with 4% paraformaldehyde and incubated for 30 min in PBS containing 1% bovine serum albumin (BSA) and 0.3% Triton X 100 to permeabilize cells and to block L5A non-specific staining. The endogenous peroxidases were quenched with 0.3% H₂O₂ during 10 mins. Cells were incubated for 30 mins at room temperature with primary antibodies against cytokeratin 3 1:200 (Clone AE-5; Dako Trappes, France), ΔNp63 α (Cell Signaling Technologie, Denvers, USA) followed by incubation with the biotinylated secondary antibody using a LSAB2 system-HRP Kit (Dako) according to the manufacturer's instructions. DAB was used as peroxidase substrate and specimens were counterstained with haematoxylin.

RNA Extraction, Reverse Transcription, and Quantitative Polymerase Chain Reaction (PCR) :

Total RNA was isolated from primary cultured human limbal epithelial cells, from enzymatically dissociated cells, using the ReliaPrep RNA cell Miniprep system (Promega, Charbonnières, France) according to the manufacturer's instructions. The amount of total RNA isolation was quantified by optical density at 260 nm. cDNA was reverse-transcribed from 1 to 2 mg of total RNA by QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). Quantitative polymerase chain reaction (qPCR) amplification of different genes (CK3, ΔNp63 α, ABCG2) was carried out in a 20 µL solution containing cDNA, TaqMan Gene Expression Assay and TaqMan gene Expression Master Mix (Life Technologie, St

Aubin, France). The results of quantitative real time PCR were analyzed by the comparative threshold cycle method and normalized by β -actin as an internal control. The β -actin gene was used as an endogenous reference for each reaction to correct differences in the amount of total cDNA added. Relative change in gene expression was analyzed by the comparative threshold cycle (Ct) method using results obtained for each gene for dissociated cells as a reference. To normalize the amount of target gene in each sample, the difference in Ct (Δ Ct) was calculated by subtracting the average Ct of β -actin from that of each gene. The amount of relative target gene mRNA was expressed relative to the amount present in the reference using the following formula: $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

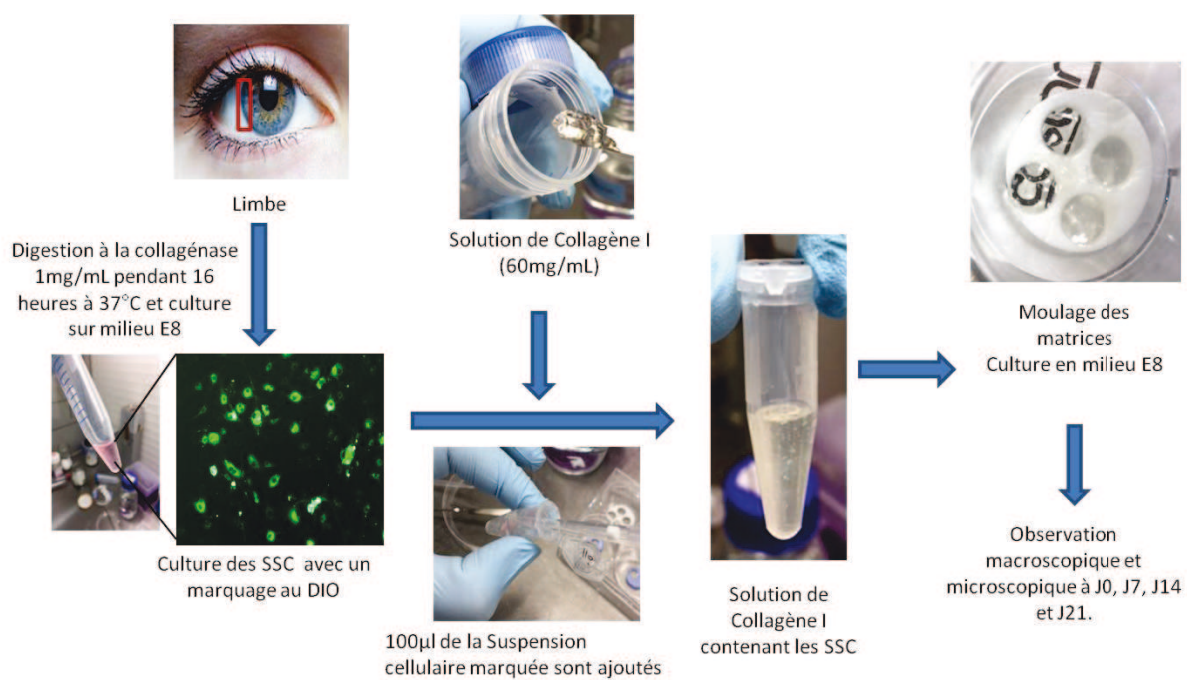


Figure 1. Protocole expérimental pour l'encapsulation des kératocytes.

4.4.2. Encapsulation des kératocytes au sein des matrices de collagène : Résultats préliminaires

La cornée artificielle que nous souhaitons développer doit contenir des kératocytes à l'intérieur des matrices de collagène, des cellules épithéliales à la face antérieure et des cellules endothéliales à la face postérieure. Dans leur modèle de compression du collagène, l'équipe de Mi a encapsulé les kératocytes dans les matrices de collagène et ils ont observé que celles-ci formaient un bon support pour la culture des cellules souches limbiques et la formation d'un épithélium pluristratifié (Mi et al., 2013). D'autres équipes ont travaillé sur l'encapsulation des cellules afin de former un stroma artificiel (Kilic et al., 2014 ; Vrana et al., 2007 et 2008).

L'encapsulation des kératocytes dans les matrices pourrait amorcer la synthèse d'une matrice extracellulaire par ces cellules afin de remplacer le collagène apporté comme support. Cette approche paraît intéressante d'autant plus qu'une production autologue de ces matrices serait possible.

Procédure expérimentale

Après la culture primaire des cellules souches stromales (obtenues dans les mêmes conditions que la section 4.2), les sphères de cellules ont été dissociées, marquées au DiO puis comptées. Le DiO est un marqueur cytoplasmique qui permet de suivre la migration cellulaire en culture au sein des matrices constituées. 5 µl de DiO sont ajoutés à la suspension cellulaire puis celle-ci est incubée 20 minutes à 37°C. Après deux lavages, les cellules sont observées sous microscope et une suspension cellulaire de 50 000 cellules/100 µl est préparée (**Figure 1**). La solution de collagène utilisée est concentrée à 60 mg/mL. Afin de constituer un stroma artificiel, les cellules sont mélangées avec la solution de collagène. Nous avons préparé au préalable un système en plastique dans lequel nous avons fait des cercles à l'aide d'un trépan de 8 mm de diamètre (**Figure 2**). Dans un puits de boîte de culture, du collagène est déposé à l'intérieur des cercles ; la construction est mise en culture à 37°C avec 5% de CO₂.

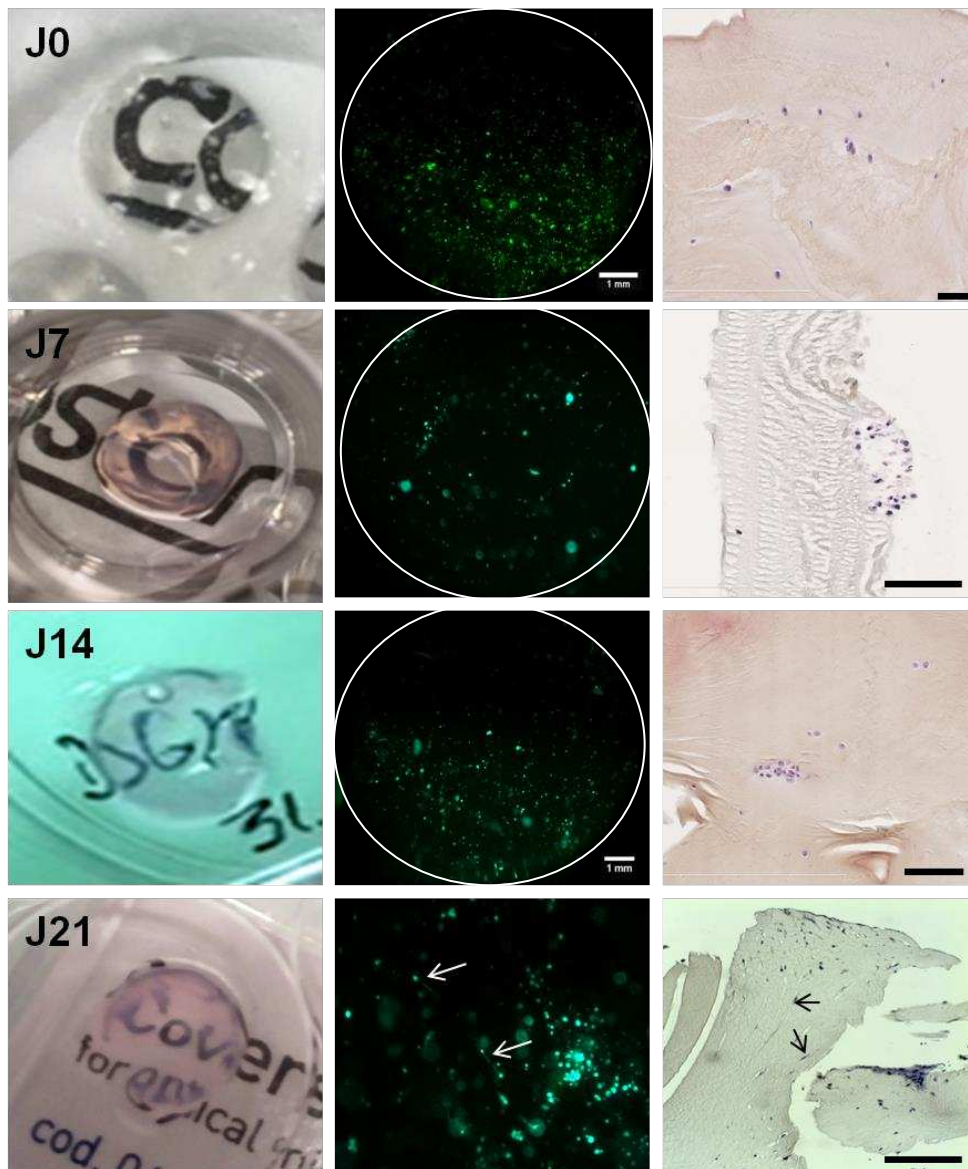


Figure 2. Observation des matrices à différents temps de culture.

Les observations macroscopiques révèlent que les matrices gardent leur transparence même après 3 semaines en culture. En microscopie confocale à fluorescence, les cellules marquées au DiO se retrouvent sur toute la surface de la matrice (le cercle blanc délimite la surface de la matrice). En histologie, au marquage hématoxyline et éosine, on observe que les cellules se retrouvent dans l'épaisseur de la matrice et non à sa surface. Les flèches montrent la présence de cellules allongées au niveau des matrices après 3 semaines de culture. Barre d'échelle : 100µm.

Résultats

Les matrices de collagène obtenues sont observées. A J0 (Figure 2), macroscopiquement les matrices sont transparentes, on observe, sous microscope à fluorescence, que les cellules recouvrent toute la surface de la matrice. En histologie, les cellules sont bien présentes à l'intérieur des matrices et non à la surface de celles-ci et sont arrondies (Figure 2).

A J7 et J14 les cellules semblent toujours arrondies et ne prolifèrent pas (Figure 2), ceci est probablement dû à l'environnement hostile dans lequel elles se trouvent. En effet, la solution de collagène utilisé a un pH de 3.5. Un pré-conditionnement des cellules a été réalisé avant encapsulation : le pH du milieu dans lequel prolifèrent les cellules a été abaissé progressivement au cours de la culture jusqu'à arriver à un pH 4, afin de les habituer à des pH acides. Pendant cette culture nous avons constaté que les cellules continuent à proliférer dans ces conditions acides.

A J21, les matrices apparaissent toujours transparentes. Des cellules allongées sont observées au sein des matrices (Figure 2), les coupes histologiques montrent aussi des cellules de forme allongée à l'intérieur des matrices (Figure 2, Flèches).

Après 21 jours de culture, des immunomarquages ont été réalisés pour identifier les cellules en prolifération à l'intérieur des matrices. Les cellules sont positives pour la *Vimentine* et le *Lumican*, marqueurs des kératocytes.

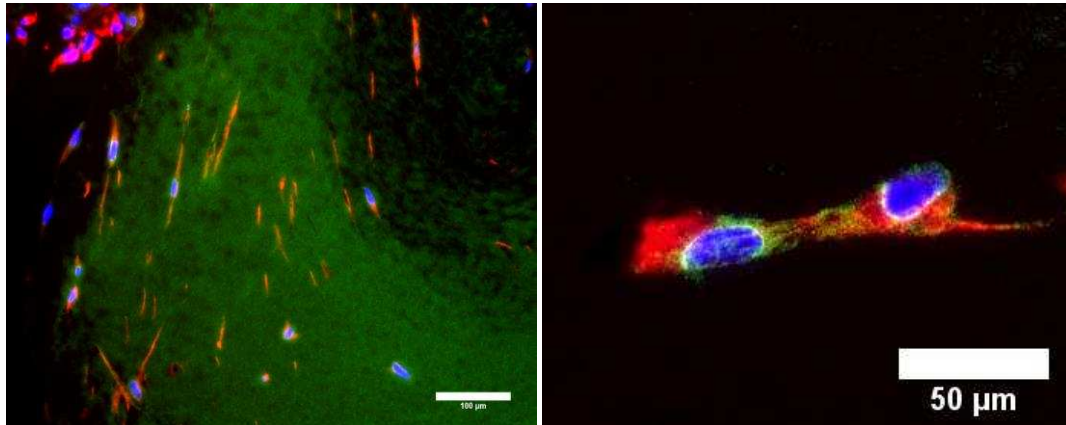


Figure. Identification des kératocytes dans les matrices de Collagène I par immunofluorescence. Les cellules encapsulées expriment des marqueurs de kératocytes, la *Vimentine* en rouge et le *Lumican* en Vert. Les Noyaux sont marqués au Dapi.

Conclusion

Notre technique d'encapsulation semble donner des résultats satisfaisants, les cellules se trouvent bien à l'intérieur des matrices qui restent transparentes même après 3 semaines de culture. Les cellules s'adaptent à ce nouvel environnement et commencent à proliférer. Des améliorations restent à prévoir pour le procédé de fabrication, comme l'obtention de moules sur mesure afin de standardiser le diamètre et l'épaisseur des matrices obtenues, la quantité de cellules à encapsuler, le milieu de culture et les facteurs de croissance à utiliser.

Conclusion Générale

5. Conclusion générale

Ce travail de thèse avait pour but de contribuer au développement de nouvelles approches thérapeutiques pour le traitement des pathologies cornéennes afin de faire face au manque de donneurs de cornées (seul 1 patient sur 70 peut bénéficier d'un greffon cornéen à l'échelle mondiale). Dans un premier temps, nous avons observé, à l'aide de la microscopie en cohérence optique plein champs et de la culture cellulaire, que les cellules souches épithéliales cornéennes sont localisées dans la niche limbique sur toute la partie périphérique de la cornée avec une prédominance pour l'axe vertical de l'œil où elles sont protégées par les paupières. La structure de la niche limbique est complexe chez l'homme, caractérisée notamment par la présence de cryptes épithéliales limbiques invaginées dans le stroma limbique et scléral. Les cellules souches limbiques participent au renouvellement des différentes couches de l'épithélium cornéen par migration vers les sites lésés. La richesse en cellules souches limbiques augmente avec le volume de la niche limbique. Cette partie du projet constitue une avancée significative dans le domaine clinique en permettant un bon échantillonnage lors du prélèvement limbique sur un œil donneur en vue d'une greffe de cellules souches épithéliales limbiques (thérapie cellulaire ou greffe tissulaire). En effet, afin de ne pas risquer d'induire un déficit en cellules souches limbiques sur l'œil donneur, un seul prélèvement de petite taille est effectué dans l'axe vertical de l'œil. Afin d'assurer un apport en cellules souches épithéliales suffisant, critère important pour la réussite de la greffe, il est important que ce prélèvement soit réalisé dans une zone riche en cellules souches limbiques. La microscopie en cohérence optique plein champs permet de guider utilement le prélèvement limbique.

Dans le but de pouvoir transposer les résultats obtenus au laboratoire à la clinique humaine, nous avons développé dans un deuxième temps une technique de culture des deux types connus de cellules souches de la cornée (cellules souches limbiques pour l'épithélium et cellules souches stromales pour les kératocytes) respectant les bonnes pratiques de fabrication. La culture *ex vivo* des cellules souches cornéennes est possible dans un milieu exempt de produits et de cellules d'origines animales permettant leur utilisation en clinique. Notre étude a permis d'isoler les deux types de cellules souches à partir du même prélèvement limbique de petite taille tout en gardant leur caractère indifférencié. Les cellules souches cornéennes adultes ainsi cultivées se caractérisent par un potentiel de croissance élevé et par

Conclusion générale

leur potentiel de différenciation. Les cellules souches épithéliales limbiques sont unipotentes ; elles se différencient en cellules épithéliales cornéennes. Les cellules souches stromales sont multipotentes ; elles se différencient en kératocytes, cellules neurales, adipocytes, ostéocytes et chondrocytes. Ceci permettra, dans le cadre d'un développement clinique, l'obtention des deux types de cellules souches à partir d'une petite biopsie limbique faite sur l'œil controlatéral sain afin de réparer l'épithélium et le stroma cornéen du patient. La limitation du nombre de prélèvements et de la taille du prélèvement est un élément important de la sécurité de la thérapie cellulaire.

Le pouvoir réparateur des cellules souches stromales a été démontré dans la troisième partie de cette thèse, lors de leur injection dans un modèle murin de fibrose stromale. Un modèle animal a été mis au point par grattage de l'épithélium cornéen et application d'azote liquide. Ce modèle crée des lésions proches de celles observées dans des pathologies cornéennes telles que le kératocône, les infections cornéennes et les pathologies liées à un traumatisme (brûlures chimiques, port de lentilles de contact ...). Ces lésions comportent une apoptose des kératocytes stromaux, une perturbation de la matrice extracellulaire avec perte de l'organisation spatiale des fibrilles de collagène, une synthèse d'un collagène fibrillaire de type III, une augmentation de la rigidité de la cornée et la formation d'opacités cornéennes. Elles ont été mises en évidence par test TUNEL, microscopie biphotonique, immunofluorescence, OCT-élastographie d'une onde de cisaillement, microscopie en cohérence optique plein champs, OCT spectral domain et examen à la lampe à fente. L'injection des cellules souches stromales a permis la régénération du stroma avec régression des lésions et amélioration de la transparence cornéenne. L'effet thérapeutique des cellules souches stromales sur la pathologie créée chez la souris est évident et permet par la suite un développement en vue de son introduction comme traitement des pathologies stromales chez l'homme.

Enfin, l'utilisation des propriétés cristal-liquide du collagène de type 1, dans des conditions physico-chimiques déterminées, a permis de produire des matrices de collagène fibrillaire transparentes qui ont pu être colonisées par les cellules souches cornéennes en vue d'une production de cornées artificielles par bio-ingénierie tissulaire. Les cellules souches épithéliales limbiques reforment un épithélium cornéen sur les matrices et nos travaux préliminaires montrent la capacité des cellules souches stromales à être encapsulées à l'intérieur des matrices tout en conservant la transparence des matrices.

Conclusion générale

En conclusion, nos résultats démontrent le potentiel régénératif des cellules souches stromales ainsi que la capacité des cellules souches cornéennes épithéliales et stromales à coloniser des matrices transparentes de collagène I. Ceci ouvre de nouvelles voies pour la prise en charge des pathologies cornéennes entraînant une perte de la transparence cornéenne par thérapie cellulaire et bio-ingénierie tissulaire en remplacement de l'allogreffe de cornée.

Références bibliographiques

Références Bibliographiques

6. Références bibliographiques

- Ahn JI, Kuffova L, Merrett K, Mitra D, Forrester JV, Li F, Griffith M. Crosslinked collagen hydrogels as corneal implants: Effects of sterically bulky vs. non-bulky carbodiimides as crosslinkers. *Acta Biomater* 2013; 9:7796–805.
- Akiba M, Maeda N, Yumikake K, Soma T, Nishida K, Tano Y, Chan KP. Ultrahigh-resolution imaging of human donor cornea using full-field optical coherence tomography. *J Biomed Opt* 2007;12:041202.
- Albert R, Veréb Z, Csomós K, Moe MC, Johnsen EO, Olstad OK, Nicolaissen B, Rajnavölgyi E, Fésüs L, Berta A, Petrovski G. Cultivation and characterization of cornea limbal epithelial stem cells on lens capsule in animal material-free medium. *PLoS One*. 2012 ;7(10): e47187.).
- Al-Swailem SA, Al-Rajhi AA, Wagoner MD. Penetrating Keratoplasty for Macular Corneal Dystrophy. *Ophthalmology*. 2005; 112: 220-224.
- Ang LP, Sotozono C, Koizumi N, Suzuki T, Inatomi T, Kinoshita S. A comparison between cultivated and conventional limbal stem cell transplantation for Stevens-Johnson syndrome. *Am J Ophthalmol*. 2007. 143(1):178-80.
- Ang LP, Tan DT, Beuerman RW, Lavraker RM. Development of a conjunctival epithelial equivalent with improved proliferative properties using a multistep serum-free culture system. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:1789–1795.
- Assayag O, Antoine M, Sigal-Zafrani B, Riben M, Harms F, Burcheri A, Grieve K, Dalimier E, Le Conte de Poly B, Boccara C. Large field, high resolution full field optical coherence tomography: a pre-clinical study of human breast tissue and cancer assessment. *Technol Cancer Res Treat Exp* 2013;1: 21-33.
- Assayag O, Grieve K, Devaux B, Harms F, Pallud J, Chretien F, Boccara C, Varlet P. Imaging of non-tumorous and tumorous human brain tissue with full-field optical coherence tomography. *Neuroimage Clin* 2013; 2: 549-557.
- Auksorius E, Bromberg Y, Motiejūnaitė R, Pieretti A, Liu L, Coron E, Aranda J, Goldstein AM, Bouma BE, Kazlauskas A, Tearney GJ. Dual-modality fluorescence and full-field optical coherence microscopy for biomedical imaging applications. *Biomed Opt Exp* 2012 ; 3(3):661-667.
- Barbaro V, Testa A, Di Iorio E, Mavilio F, Pellegrini G, De Luca M. C/EBPdelta regulates cell cycle and self-renewal of human limbal stem cells. *J Cell Biol*. 2007 Jun 18; 177(6):1037-49.
- Barrandon Y, Green H. Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1987; 84: 2302–2306
- Basu S, Hertsenberg AJ, Funderburgh ML, Burrow MK, Mann MM, Du Y, Lathrop KL, Syed-Picard FN, Adams SM, Birk DE, Funderburgh JL. Human limbal biopsy-derived stromal stem cells prevent corneal scarring. *Sci Transl Med*. 2014; 266:266ra172.
- Bayyoud, S. Thaler, J. Hofmann, C. Maurus, M.S. Spitzer, K.-U. Bartz-Schmidt, P. Szurman, E. Yoeuruek. Decellularized bovine corneal posterior lamellae as carrier matrix for cultivated human corneal endothelial cells *Curr. Eye Res*. 2012; 37, pp. 179-186

Références Bibliographiques

- Beaurepaire E, Boccara AC, Lebec M, Blanchot L, Saint-Jalmes H. Full-field optical coherence microscopy. *Opt Lett*. 1998; 23(4):244-246.
- Becker AJ, McCulloch EA, Till JE. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature*. 1963; 197:452-4.
- Beebe DC, Masters BR. Cell lineage and the differentiation of corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1996; 37(9):1815-25.
- Benedek, G. Why the eye lens is transparent. *Nature*. 1983; 302, 383-384.
- Bergman I, Loxley R. Two improved and simplified methods for the spectrophotometric determination of hydroxyproline. *Anal Chem* 1963; 35:1961-5.
- Bergmanson J.P., Horne J., Doughty M.J., Garcia M., Gondo M. Assessment of the number of lamellae in the central region of the normal human corneal stroma at the resolution of the transmission electron microscope. *Eye Contact Lens*. 2005. 31:281-287.
- Besseau L, Coulomb B, Lebreton-Decoster C, Giraud-Guille M-M. Production of ordered collagen matrices for three-dimensional cell culture. *Biomaterials*. 2002; 23:27-36.
- Besseau L, Giraud-Guille M-M. Stabilization of fluid cholesteric phases of collagen to ordered gelled matrices. *J Mol Biol*. 1995; 251:197-202.
- Bettelheim, F. A.. Physical basis of lens transparency. In *The Ocular Lens, Structure, Function and Pathology* (ed. H. Mailsel) 1985; pp. 265-300. Marcel Dekker, Inc., New York and Basel.
- Birk DE, Fitch JM, Linsenmayer TF. Organization of collagen types I and V in the embryonic chicken cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1986;27 :1470-7.
- Birk DE, Trelstad RL. Extracellular compartments in matrix morphogenesis: collagen fibril, bundle, and lamellar formation by corneal fibroblasts. *J Cell Biol* 1984;99:2024-33.
- Bizheva K, Hutchings N, Sorbara L et al. In vivo volumetric imaging of the human corneo-scleral limbus with spectral domain OCT. *omed Opt Exp* 2011;2(7):1794-1802
- Boote, C., Du, Y., Morgan, S., Harris, J., Kamma-Lorger, C. S., Hayes, S., Meek, K. M. Quantitative Assessment of Ultrastructure and Light Scatter in Mouse Corneal Debridement Wounds. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2012; 53(6), 2786-2795.
- Borderie V, Kantelip BM, Delbosc BY, Oppermann MT, Laroche L. Morphology, histology and ultrastructure of human C31 organ-cultured corneas. *Cornea*. 1995; 14:300-10.
- Borderie V, Touzeau O, Bourcier T, Laroche L. 2005. Physiology of the cornea. *EMC Ophtalmology*, 130-117.
- Borderie VM, Baudrimont M, Lopez M, Carvajal S, Laroche L. Evaluation of the deswelling period in dextran-containing medium after corneal organ culture. *Cornea* 1997; 16: 215.
- Borderie VM, Boelle PY, Touzeau O, Allouch C, Boutboul S, Laroche L. 2009. Predicted long-term outcome of corneal transplantation. *Ophthalmology*; 116:2354-60.

Références Bibliographiques

- Borderie VM, Kantelip BM, Genin PO, Masse M, Laroche L, Delbosc BY. Modulation of HLA-DR and CD1a expression on human cornea with low-dose UVB irradiation. *Curr Eye Res* 1996; 15:669-79.
- Borderie VM, Scheer S, Touzeau O, Védie F, Carvajal-Gonzalez S, Laroche L. Donor organ cultured corneal tissue selection before penetrating keratoplasty *Br J Ophthalmol*. 1998. 82:382-388
- Bornert M, Vales F, Gharbi H, Nguyen Minh D. Multiscale Full-Field Strain Measurements for Micromechanical Investigations of the Hydromechanical Behaviour of Clayey Rocks. *Strain* 2010;46:33–46.
- Bray LJ, Heazlewood CF, Munster DJ, Hutmacher DW, Atkinson K, Harkin DG. Immunosuppressive properties of mesenchymal stromal cell cultures derived from the limbus of human and rabbit corneas. *Cytherapy*. 2014 Jan; 16(1):64-73).
- Bruce R. Ksander, Paraskevi E. Kolovou, Brian J. Wilson, Karim R. Saab, Qin Guo, Jie Ma, et al. 2014. ABCB5 is a limbal stem cell gene required for corneal development and repair. *Nature*. (7509): 353–357.
- Builles, N., Janin-Manificat, H., Malbouyres, M., Justin, V., Rovere, M.R., Pellegrini, G., Torbet, J., Hulmes, D.J., Burillon, C., Damour, O., Ruggiero, F., Use of magnetically oriented orthogonal collagen scaffolds for hemi-corneal reconstruction and regeneration. *Biomaterials*. 2010; 31, 8313e8322.
- Burillon C, Huot L, Justin V, Nataf S, Chapuis F, Decullier E, Damour O.. Invest Cultured autologous oral mucosal epithelial cell sheet (CAOMECS) transplantation for the treatment of corneal limbal epithelial stem cell deficiency. *Ophthalmol Vis Sci*. 2012; 13; 53(3):1325-31.
- Calderón-Colón X, Xia Z, Breidenich JL, Mulreany DG, Guo Q, Uy OM, Tiffany JE, Freund DE, McCally RL, Schein OD, Elisseff JH, Trexler MM. Structure and properties of collagen vitrigel membranes for ocular repair and regeneration. *biomaterials*. 2012; 07.062.
- Chae JJ, McIntosh Ambrose W, Espinoza FA, Mulreany DG, Ng S, Takezawa T, et al. Regeneration of corneal epithelium utilizing a collagen vitrigel membrane in rabbit models for corneal stromal wound and limbal stem cell deficiency. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 2015;93 :e57–66.
- Chakraborty A., Dutta J., Das S., Datta H. Effect of cord blood serum on ex vivo human limbal epithelial cell culture. *J Ocul Biol Dis Inform*. 2012; 5:77–82.
- Chandran PL, Barocas VH. Microstructural mechanics of collagen gels in confined compression: poroelasticity, viscoelasticity and collapse. *J Biomech Eng*. 2004; 126:152–166
- Chen G, Gulbranson DR, Hou Z, Bolin JM, Ruotti V, Probasco MD, Smuga-Otto K, Howden SE, Diol NR, Propson NE et al. Chemically defined conditions for human iPSC derivation and culture. *Nat Methods*. 2011. 8:424-429.
- Chen S, Lewallen M, Xie T. Adhesion in the stem cell niche: biological roles and regulation. *Development (Cambridge, England)*. 2013 ; 140(2):255-265)
- Chen Y., Thompson D.C., Koppaka V., Jester J.V., Vasiliou V. Ocular aldehyde dehydrogenase: protection against ultraviolet damage and maintenance of transparency for vision. *Prog. Retin. Eye Res*. 2013. 33:28–39

Références Bibliographiques

- Cheng J, Qi X, Zhao J, Zhai H, Xie L. Comparison of penetrating keratoplasty and deep lamellar keratoplasty for macular corneal dystrophy and risk factors of recurrence. *Ophthalmology*. 2013. 120 :34-39
- Chirila TV, Hicks CR. The origins of the artificial cornea: Pellier de Quengsy and his contribution to the modern concept of keratoprosthesis. *Gesnerus*. 1999. 56(1-2):96-106.
- Choi, M.K. Kim, H.J. Lee, J.H. Ko, S.H. Jeong, J.I. Lee, B.C. Oh, H.J. Kang, W.R. Wee Efficacy of pig-to-rhesus lamellar corneal xenotransplantation Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2011; 52, pp. 6643-6650
- Choyce DP. The present status of keratoprosthesis. *Isr J Med Sci*. 1972; 8 : 1285-9.
- Chung EH, DeGregorio PG, Wasson M, Zieske. Expression of alpha-enolase in stem and transient amplifying cells. *JD Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1995. 36(7):1336-4)3,
- Claesson M., Armitage W.J., P Fagerholm P., U Stenevi U. Visual outcome in corneal grafts: a preliminary analysis of the Swedish Corneal Transplant Register. *Br J Ophthalmol*. 2002. 86:174–180.
- Colabelli Gisoldi RA, Pocobelli A, Villani CM, Amato D, Pellegrini G. Evaluation of molecular markers in corneal regeneration by means of autologous cultures of limbal cells and keratoplasty. *Cornea*. 2010; 29 :715-722.
- Colby KA, Koo EB. Expanding indications for the Boston keratoprosthesis. *Curr Opin Ophthalmol*. 2011; 22(4):267-73.
- Costagliola C, Romano V, Forbice E, Angi M, Pascotto A, Boccia T, Semeraro F. Corneal oedema and its medical treatment. *Clin Exp Optom*. 2013 Nov; 96(6):529-35.
- Coster D J, Jessup C F, Williams K A. Mechanisms of Corneal Allograft Rejection and the Development of New Therapies. *Cornea Extern. Eye Dis. Springer, Berlin: Th. Reinhard & F. Larkin*; 2010, p. 13–22.
- Cotsarelis, G., Cheng, S. Z., Dong, G., Sun, T. T. & Lavker, R. M. Existence of slow cycling limbal epithelial basal cells that can be preferentially stimulated to proliferate: implications on epithelial stem cells. *Cell*. 1989; 57, 201–209
- Creuzet S, Couly G, Le Douarin NM. Patterning the neural crest derivatives during development of the vertebrate head: insights from avian studies. *J Anat*. 2005a; 207(5):447-59.
- Creuzet S, Vincent C, Couly G. Neural crest derivatives in ocular and periocular structures. *Int J Dev Biol*. 2005b;49(2-3):161-71.
- Cursiefen C, Chen L, Saint-Geniez M, Hamrah P, Jin Y, Rashid S, Pytowski B, Persaud K, Wu Y, Streilein JW, Dana R. Nonvascular VEGF receptor 3 expression by corneal epithelium maintains avascularity and vision. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006. Jul 25; 103(30):11405-10.
- Cuthbertson RA, Tomarev SI, Piatigorsky J. Taxon-specific recruitment of enzymes as major soluble proteins in the corneal epithelium of three mammals, chicken, and squid. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992. 89:4004
- Dalimier E, Salomon D. Full-field optical coherence tomography: a new technology for 3D high-resolution skin imaging. *Dermatology* 2012; 224:84–92.

Références Bibliographiques

- Davanger M, Evensen A. Role of the pericorneal papillary structure in renewal of corneal epithelium. *Nature*. 1971; 229(5286):560-1.
- Davies SB, Di Girolamo N.. Corneal stem cells and their origins: significance in developmental biology. *Stem Cells Dev*. 2010; 19:1651-1662.
- Daxer A, Misof K, Grabner B, Ettl A, Fratzl P. Collagen fibrils in the human corneal stroma: structure and aging. *Invest Ophthalmol VisSci*. 1998. 39:644–648.
- De Luca M, Albanese E, Megna M, Cancedda R, Mangiante PE, Cadoni A, Franzi AT. Evidence that human oral epithelium reconstituted in vitro and transplanted onto patients with defects in the oral mucosa retains properties of the original donor site. *Transplantation*. 1990. 50: 454-9.
- De Luca M., Pellegrini G., Green H. Regeneration of squamous epithelia from stem cells of cultured grafts *Regen Med*. 2006; 1: 45-57
- De Sa Peixoto P, Deniset-Besseau A, Schanne-Klein M-C, Mosser G. Quantitative assessment of collagen I liquid crystal organizations: role of ionic force and acidic solvent, and evidence of new phases. *Soft Matter*. 2011; 7:11203.
- De Sa Peixoto P, Deniset-Besseau A, Schmutz M, Anglo A, Illoul C, Schanne-Klein M-C, et al. Achievement of cornea-like organizations in dense collagen I solutions: clues to the physico-chemistry of cornea morphogenesis. *Soft Matter* 2013; 9:11241.
- Deng S, Sejpal K, Tang Q et al. Characterization of Limbal Stem Cell Deficiency by In Vivo Laser Scanning Confocal Microscopy. *Arch Ophthalmol*. 2012; 130(4):440-445.
- Di Iorio E, Ferrari S, Fasolo A, Böhm E, Ponzin D, Barbaro V. Techniques for culture and assessment of limbal stem cell grafts. *Ocul Surf*. 2010; 8 :146-153.
- Di Iorio E, V Barbaro, A Ruzza, D Ponzin, G Pellegrini and M De Luca. 2005. Isoforms of DeltaNp63 and the migration of ocular limbal cells in human corneal regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:9523–9528).
- Discher DE, Janmey P, Wang Y. Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science* 2005; 310:1139–43.
- Du Y, Carlson EC, Funderburgh ML, Birk DE, Pearlman E, Guo N, Kao WW, Funderburgh JL. Stem cell therapy restores transparency to defective murine corneas. *Stem Cells*. 2009; 27 :1635-1642.
- Du Y, Funderburgh ML, Mann MM, SundarRaj N, Funderburgh JL. Multipotent stem cells in human corneal stroma. *Stem Cells*. 2005; 23:1266-1275.
- Du Y, Sundarraj N, Funderburgh ML, Harvey SA, Birk DE, Funderburgh JL. Secretion and organization of a cornea-like tissue in vitro by stem cells from human corneal stroma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007 Nov; 48(11):5038-45.
- Du, X. Wu. Development and characterization of a full-thickness acellular porcine cornea matrix for tissue engineering *Artif. Organs*. 2011, pp. 691-705
- Dua HS, Faraj LA, Said DG, Gray T, Lowe J. Human corneal anatomy redefined: a novel pre-Descemet's layer (Dua's layer). *Ophthalmology*. 2013; 120:1778-85

Références Bibliographiques

- Dua HS, Kulkarni B, Singh R. Quest for limbal stem cells. *Clin Experiment Ophthalmol*. 2006;34:1-2.
- Dua HS, Miri A, Alomar T, Yeung AM, Said DG. The role of limbal stem cells in corneal epithelial maintenance: testing the dogma. *Ophthalmology*. 2009; 116(5):856-63.
- Dua HS, Shanmuganathan V, Powell-Richards A et al. Limbal epithelial crypts: a novel anatomical structure and a putative limbal stem cell niche. *Br J Ophthalmol* 2005;89:529-532.
- Dubois A, Vabre L, Boccara A et al. High-resolution full-field optical coherence tomography with a Linnik microscope. *Appl Opt* 2002;41:805-812.
- Dunaief JL, Ng EW, Goldberg MF. Corneal dystrophies of epithelial genesis: the possible therapeutic use of limbal stem cell transplantation. *Arch Ophthalmol*. 2001. 119(1):120-2.
- Dziasko MA, Armer HE, Levis HJ, Shortt AJ, Tuft S, Daniels JT. Localisation of epithelial cells capable of holoclone formation in vitro and direct interaction with stromal cells in the native human limbal crypt. *PLoS One*. 2014; Apr 8;9(4):e94283).
- Dziasko MA, Daniels JT. Anatomical Features and Cell-Cell Interactions in the Human Limbal Epithelial Stem Cell Niche. *Ocul Surf*. 2016; 14:322-330.
- Eberwein P, Reinhard T, Sundmacher R. Re: Gore et al.: Peripheral hypertrophic subepithelial corneal degeneration: nomenclature, phenotypes, and long-term outcomes *Ophthalmology*. 2014; 121(5): e23.
- Eberwein P, Reinhard T. The Role of Biomechanics in the Limbal Stem Cell Niche: New Insights for our Understanding of this Structure. *Stem Cells*. 2015 Mar;33(3):916-24.
- Ehlers N, Hjortdal J. The Cornea: Epithelium and Stroma. *Adv. Organ Biol. - Biol. Eye*, vol. X. Amsterdam: Elsevier, Amsterdam: Elsevier; 2005, p. 83–111.
- Elodie Collomb. Le tégument des vertèbres et la spécification de l'épithélium corneen. *Embryologie et organogenèse*. Université de Grenoble, 2010.
- Emily S. Birkholz, Nasreen A. Syed, and Michael D. Wagoner. Epithelial-Stromal and Stromal Corneal Dystrophies: A Clinicopathologic Review. *Ophthalmology and Visual Science*. 2015.
- Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE. Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification. *Cell*. 2006;126 :677–89.
- Engler, H.L. Sweeney, D.E. Discher, J.E. Schwarzbauer. Extracellular matrix elasticity directs stem cell differentiation. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2007; 7(4):335
- Erickson AC, Couchman JR. Still more complexity in mammalian basement membranes. *J Histochem Cytochem*. 2000; Oct;48(10):1291-306.
- Espana EM, Di Pascuale MA, He H, Kawakita T, Raju VK, Liu CY, Tseng SC. Characterization of corneal pannus removed from patients with total limbal stem cell deficiency. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004; 45(9):2961-6.
- Fagerholm P, Lagali NS, Merrett K, Jackson WB, Munger R, Liu Y, Polarek JW, Söderqvist M, Griffith M. A biosynthetic alternative to human donor tissue for inducing corneal regeneration: 24-month follow-up of a phase 1 clinical study. *Sci Transl Med*. 2010; 2: 46ra61.

Références Bibliographiques

- Fagerholm P, Lagali NS, Carlsson DJ, Merrett K, Griffith M. Corneal regeneration following implantation of a biomimetic tissueengineered substitute. *Clin Transl Sci*. 2009; 2: 162–164
- Fagerholm P, Lagali NS, Ong JA, Merrett K, Jackson WB, Polarek JW, et al. Stable corneal regeneration four years after implantation of a cell-free recombinant human collagen scaffold. *Biomaterials*. 2014; 35: 2420–7.
- Fiedler J, Özdemir B, Bartholomä J, Plettl A, Brenner RE, Ziemann P. The effect of substrate surface nanotopography on the behavior of multipotent mesenchymal stromal cells and osteoblasts. *Biomaterials*. 2013;34:8851–9.
- Fini ME. Keratocyte and fibroblast phenotypes in the repairing cornea. *Prog Retin Eye Res*. 1999;18:529–551
- Fitch J, Mentzer A, Mayne R, Linsenmayer T. Acquisition of type IX collagen by the developing avian primary corneal stroma and vitreous *Dev. Biol.*, 1988. 128: 396-40.
- Funderburgh ML, Du Y, Mann MM, SundarRaj N, Funderburgh JL. PAX6 expression identifies progenitor cells for corneal keratocytes. *FASEB J*. 2005. 19:1371-1373.
- Gage PJ, Rhoades W, Prucka SK, Hjalt T. Fate maps of neural crest and mesoderm in the mammalian eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005; 46 :4200-4208.
- Gain P, Jullienne R, He Z, Aldossary M, Acquart S, Cognasse F, Thuret G. Global Survey of Corneal Transplantation and Eye Banking. *JAMA Ophthalmol*. 2016. 134:167-73.
- Ghouali W, Grieve K, Bellefqih S, Sandali O, Harms F, Laroche L, Paques M, Borderie V. Full-field optical coherence tomography of human donor and pathological corneas. *Cur Eye Res* 2014;1-9.
- Ghoubay-Benallaoua D, Basli E, Goldschmidt P, Pecha F, Chaumeil C, Laroche L, Borderie V.. Human epithelial cell cultures from superficial limbal explants. *Mol Vis*. 2011;17:341-354.
- Ghoubay-Benallaoua D, Pécha F, Goldschmidt P, Fialaire-Legendre A, Chaumeil C, Laroche L, Borderie VM.. Effects of isoproterenol and cholera toxin on human limbal epithelial cell cultures. *Curr Eye Res*. 2012; 37:644-653.
- Ghoubay-Benallaoua D, Sandali O, Goldschmidt P, Borderie V. Kinetics of expansion of human limbal epithelial progenitor cells in primary culture of explants without feeders. *PLoS One*. 2013; 8:e81965.
- Girard LJ, Moore CD, Soper JW, O'Bannon WO. Prosthetosclerokeratoplasty-implantation of a keratoprosthesis using full thickness onlay sclera and sliding conjunctival flap. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngology*; 1969; 73 : 936-61.
- Gobeaux F, Mosser G, Anglo A, Panine P, Davidson P, Giraud-Guille M-M, et al. Fibrillogenesis in Dense Collagen Solutions: A Physicochemical Study. *J Mol Biol* 2008;376:1509–22.
- Goldberg MF, Bron AJ. Limbal palisades of Vogt. *Trans Am Ophthalmol Soc*. 1982; 80: 155–171
- Gomaa A, Comyn O, Liu C. Keratoprostheses in clinical practice - a review. *Clin Exp Ophthalmol*. Mar. 2010; 38(2):211-24.
- Gomes JA, Gerald Monteiro B, Melo GB, Smith RL, Cavenaghi Pereira da Silva M, Lizier NF, Kerkis A, Cerruti H, Kerkis I. Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets

Références Bibliographiques

- composed of human immature dental pulp stem cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*; 2010. 51: 1408-14.
- Gonzalez-Andrades M, de la Cruz Cardona J, Ionescu AM, Campos A, Del Mar Perez M, Alaminos M. Generation of bioengineered corneas with decellularized xenografts and human keratocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011 Jan 5;52(1):215-22.
- Grieve K, Dubois A, Simonutti M et al. In vivo anterior segment imaging in the rat eye with high speed white light full-field optical coherence tomography. *Opt Exp* 2005;13(16):6286-6295. doi: 10.1364/OPEX.13.006286
- Grieve K, Georgeon C, Andreiuolo F, Borderie M, Ghoubay D, Rault J, Borderie V. Microscopic features of keratoconic corneal morphology observed with multiple imaging modalities and with histology *Cornea* 2016;35:1621-30.
- Grieve K, Ghoubay D, Georgeon C, Latour G, Nahas A, Plamann K, Crotti C, Bocheux R, Borderie M, Nguyen TM, Andreiuolo F, Schanne-Klein MC, Borderie M. Stromal striae: a new insight 1 into corneal physiology and mechanics. *Sci Rep*. 2017 Oct 19;7(1):13584.
- Grieve K, Ghoubay D, Georgeon C, Thouvenin O, Bouheraoua N, Paques M, Borderie VM. Three-dimensional structure of the mammalian limbal stem cell niche. *Exp Eye Res*. 2015. 140:75-84.
- Grieve K, Palazzo L, Dalimier E et al. A feasibility study of full-field optical coherence tomography for rapid evaluation of EUS-guided microbiopsy specimens. *Gastrointest Endosc* 2014:1-9.
- Grieve K, Paques M, Dubois A et al. Ocular tissue imaging using ultrahigh-resolution, full-field optical coherence tomography. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:4126-4131.
- Griffith M, Hakim M, Shimmura S, Watsky MA, Li F, Carlsson D, Doillon CJ, Nakamura M, Suuronen E, Shinozaki N, Nakata K, Sheardown H. 2002. Artificial human corneas: scaffolds for transplantation and host regeneration. *Cornea*. Oct;21(7 Suppl): S54-61.
- Griffith, M., Polisetti, N., Kuffova, L., et al., 2012. Regenerative approaches as alternatives to donor allografting for restoration of corneal function. *Ocul. Surf.* 10, 170-183.
- Gruenauer-Kloevekorn C, Braeutigam S, Froster UG, Duncker GI. (2009). Surgical outcome after phototherapeutic keratectomy in patients with TGFBI-linked corneal dystrophies in relation to molecular genetic findings. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 247 :93-99.
- Guilbert E, Bullet J, Sandali O, Basli E, Laroche L, Borderie VM. Long-term Rejection Incidence and Reversibility After Penetrating and Lamellar Keratoplasty. *Am J Ophthalmol* 2013;155:560–9.e2.
- Guo, X., Hutcheon, A.E., Melotti, S.A., et al. Morphologic characterization of organized extracellular matrix deposition by ascorbic acid-stimulated human corneal fibroblasts. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 2007 .48, 4050–4060.
- Gusachenko I, Tran V, Houssen YG, Allain J-M, Schanne-Klein M-C. Polarization-Resolved Second-Harmonic Generation in Tendon upon Mechanical Stretching. *Biophys J* 2012;102:2220–9.
- Haaskjold E, Olsen WM, Bjerknes R et al. Early cell kinetic effects of a single dose of narrow-banded ultraviolet B irradiation on the rat corneal epithelium. *Photochem Photobiol* 1993;57:663-6.

Références Bibliographiques

- Hackett JM, Lagali N, Merrett K, Edelhauser H, Sun Y, Gan L, et al. Biosynthetic Corneal Implants for Replacement of Pathologic Corneal Tissue: Performance in a Controlled Rabbit Alkali Burn Model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;52:651–7.
- Haddad A. Renewal of the rabbit corneal epithelium as investigated by autoradiography after intravitreal injection of 3H-thymidine. *Cornea*; 2000. 19:378-383.
- Hamilton KE, Pye DC. Young's modulus in normal corners and the effect on applanation tonometry. *Optom Vis Sci* 2008;85:445–50.
- Han B, Chen SY, Zhu YT, Tseng SC. 2014. Integration of BMP/Wnt signaling to control clonal growth of limbal epithelial progenitor cells by niche cells. *Stem Cell Res.*12:562–73)
- Harms F, Dalimier E, P. Vermeulen et al. Multimodal Full-Field Optical Coherence Tomography on biological tissue: toward all optical digital pathology. Proceedings of Multimodal Biomedical Imaging VII, San Francisco, USA, 21-26 January 2012, Proc SPIE 8216.
- Hart GW. 1976. Biosynthesis of glycosaminoglycans during corneal development. *J Biol Chem.* Nov 10;251(21):6513-21.
- Hassell JR, Birk DE. The molecular basis of corneal transparency. *Exp Eye Res*; 2010. 91:326-335.
- Hay ED, Revel JP. Fine structure of the developing avian cornea. *Monogr Dev Biol.*; 1969.1:1-144.
- Hayashi R, Ishikawa Y, Ito M, Kageyama T, Takashiba K, Fujioka T, Tsujikawa M, Miyoshi H, Yamato M, Nakamura Y, Nishida K. Generation of corneal epithelial cells from induced pluripotent stem cells derived from human dermal fibroblast and corneal limbal epithelium. *PLoS One.*; 2012. 7(9): e45435.
- He J, Bazan HEP. Neuroanatomy and Neurochemistry of Mouse Cornea. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 2016; 57(2):664-674.
- He Z, Campolmi N, Ha Thi B-M, et al.. Optimization of immunolocalization of cell cycle proteins in human corneal endothelial cells. *Molecular Vision.* 2011;17 :3494-3511.
- Hendrix MJ, Hay ED, von der Mark K, Linsenmayer TF. Immunohistochemical localization of collagen types I and II in the developing chick cornea and tibia by electron microscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* Mar; 1982. 22(3):359-75.
- Henriksson J, McDermott A, Bergmanson J. Dimensions and Morphology of the Cornea in Three Strains of Mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50(8):3648-3654. doi: 10.1167/iovs.08-2941
- Hertsenbergh AJ, Shojaati G, Funderburgh ML et al. Corneal stromal stem cells reduce corneal scarring by mediating neutrophil infiltration after wounding. *PLoS One.* 2017;12: e0171712).
- Hicks C. R., Crawford G. J., Tan D. T., Snibson G. R., Sutton G. L., Gondhowiardjo, T. D., et al. 2002. Outcomes of implantation of an artificial cornea, AlphaCor: effects of prior ocular herpes simplex infection. *Cornea*, 21:685-690.
- Hirata A, Utikal J, Yamashita S, Aoki H, Watanabe A, Yamamoto T, Okano H, Bardeesy N, Kunisada T, Ushijima T, Hara A, Jaenisch R, Hochedlinger K, Yamada Y. Dose-dependent roles for canonical Wnt signalling in de novo crypt formation and cell cycle properties of the colonic epithelium. *Development.* 2013. Jan 1;140(1):66-75.

Références Bibliographiques

- Hogan M, John, Alvadorado JA, Esperson Weddell J. HISTOLOGY OF THE HUMAN EYE An Atlas and Textbook. W. B. Saunders Company; 1971.
- Huang D, Swanson EA, Lin CP et al. Optical coherence tomography. *Science* 1991; 254(5035):1178-1181.
- Huang J, Nguyen-McCarty M, Hexner EO, et al. 2012. Maintenance of hematopoietic stem cells through regulation of Wnt and mTOR pathways. *Nat Med.* ;18:1778–1785)
- Huang, N. Li, Z. Wu, P. Wan, X. Liang, W. Zhang, X. Wang, C. Li, J. Xiao, Q. Zhou, Liu, Z. Wang. Using acellular porcine limbal stroma for rabbit limbal stem cell microenvironment reconstruction. *Biomaterials*, 32 (2011), pp. 7812-7821.
- Hulmes D. Collagen Diversity, Synthesis and Assembly. *Collagen Struct. Mech.* Springer, New York: P. Fratzl; 2008, p. 15–74.
- Ihanamäki T, Pelliniemi LJ, Vuorio E. Collagens and collagen-related matrix components in the human and mouse eye. *Prog Retin Eye Res* 2004;23:403–34.
- Islam MM, Griffith M, Merrett K. Fabrication of a human recombinant collagen-based corneal substitute using carbodiimide chemistry. *Methods Mol Biol.* 2013;1014:157-64.
- Jester J.V., Moller-Pedersen T., Huang J.Y., Sax C.M., Kays W.T., Cavanagh H.D., Petroll W.M., Piatigorsky J. 1999. The cellular basis of corneal transparency: evidence for 'corneal crystallins'. *J. Cell Sci.*; 112:613–622.
- Jester JV, Huang J, Petroll WM, Cavanagh HD. TGF beta induced myofibroblast differentiation of rabbit keratocytes requires synergistic TGF beta, PDGF and integrin signaling. *Exp Eye Res* 2002;75:645–657.
- Jiang TS, Cai L, Ji WY, Hui YN, Wang YS, Hu D, Zhu J. Reconstruction of the corneal epithelium with induced marrow mesenchymal stem cells in rats. *Mol Vis.* 2010 Jul 14;16:1304-16.
- Jiraskova, N., Rozsival, P., Burova, M., Kalfertova, M., 2011. AlphaCor artificial cornea: clinical outcome. *Eye* 25, 1138–1146.
- Jones DL, Wagers AJ. 2008. No place like home: anatomy and function of the stem cell niche. *Nat Rev Mol Cell Biol.*; 9:11-21.
- Joyce NC. 2003. Proliferative capacity of the corneal endothelium. *Prog Retin Eye Res.* May; 22(3):359-89.
- Jumblatt MM, Maurice DM, McCulley JP. 1978. Transplantation of tissue-cultured corneal endothelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 17(12):1135-41.
- Kao WW, Liu CY. Roles of lumican and keratocan on corneal transparency. *Glycoconj J.* 2002 May-Jun; 19(4-5):275-85
- Karamichos D, Funderburgh ML, Hutcheon AE, Zieske JD, Du Y, Wu J, Funderburgh JL. A role for topographic cues in the organization of collagenous matrix by corneal fibroblasts and stem cells. *PLoS One.* 2014 Jan 21 .

Références Bibliographiques

- Kayama M, Kurokawa MS, Ueno H, Suzuki N. Recent advances in corneal regeneration and possible application of embryonic stem cell-derived corneal epithelial cells. *Clinical ophthalmology* (Auckland, NZ). 2007;1(4):373-382.
- Kenyon KR, Tseng SC. 1989. Limbal autograft transplantation for ocular surface disorders. *Ophthalmology*. 96(5):709-22;
- Kiatpongsan S. 2007. From embryonic stem cells to functioning germ cells: science, clinical and ethical perspectives. *J Med Assoc Thai*. 90(10):2233-7.
- Kilic C, Girotti A, Rodriguez-Cabello JC, Hasirci V. A collagen-based corneal stroma substitute with micro-designed architecture. *Biomater Sci*. 2014 Feb 3;2(3):318-29 ;
- Kinoshita S, Friend J, Thoft RA. 1981. Sex chromatin of donor corneal epithelium in rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci*; 21: 434-441.
- Kocaba V, Damour O, Auxenfans C, Burillon C. [Limbal stem cell deficiency management. A review]. *J Fr Ophtalmol*. 2016 Nov;39(9):791-803.
- Kocaba V, Thépot A, Yamato M, et al. 2014. Long-Term results of cultured autologous oral mucosa epithelial cell-sheet (CAOMECS) graft for the treatment of blindness due to bilateral limbal stem cell deficiency. *J Stem Cell Res Ther*; 181.
- Koulikovska M, Rafat M, Petrovski G, Veréb Z, Akhtar S, Fagerholm P, Lagali N. Enhanced regeneration of corneal tissue via a bioengineered collagen construct implanted by a nondisruptive surgical technique. *Tissue Eng Part A*. 2015 Mar; 21(5-6):1116-30.
- Kruse FE. 1994. Stem cells and corneal epithelial regeneration. *Eye*; 8 : 170-83.
- Ksander BR, Kolovou PE, Wilson BJ, Saab KR, Guo Q, Ma J, McGuire SP, Gregory MS, Vincent WJ, Perez VL, Cruz-Guilloty F, Kao WW, Call MK, Tucker BA, Zhan Q, Murphy GF, Lathrop KL, Alt C, Mortensen LJ, Lin CP, Zieske JD, Frank MH, Frank NY. 2014. ABCB5 is a limbal stem cell gene required for corneal development and repair. *Nature*. Jul 17;511(7509):353-7.
- Kureshi AK, Funderburgh JL, Daniels JT. (2014). Human corneal stromal stem cells exhibit survival capacity following isolation from stored organ-culture corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 55:7583-7588.
- Lai J-Y, Wang P-R, Luo L-J, Chen S-T. Stabilization of collagen nanofibers with l-lysine improves the ability of carbodiimide cross-linked amniotic membranes to preserve limbal epithelial progenitor cells. *Int J Nanomedicine* 2014:5117.
- Lakshminarayanan R, et al. 2014. Clinical and genetic aspects of the TGFBI-associated corneal dystrophies. *Ocul Surf*; 12 (4): 234-251.
- Larkin D F,P. Corneal allograft rejection. *Br J Ophthalmol* 1994;78:649–52.
- Larkin DFP, Takano T, Stansfield SD, Williams KA. Experimental orthotopic corneal xenotransplantation in the rat. Mechanisms of graft rejection. *Transplantation* 1995; **60**: 491.
- Lathrop K, Gupta D, Kagemann L et al. Optical Coherence Tomography as a Rapid, Accurate, Noncontact Method of Visualizing the Palisades of Vogt. *IOVS* 2012;53(1):1381-1387.

Références Bibliographiques

- Latour G, Gusachenko I, Kowalczyk L, Lamarre I, Schanne-Klein MC. (2012). In vivo structural imaging of the cornea by polarization-resolved second harmonic microscopy. *Biomed Opt Express*. 3:1-15.
- Lauweryns B, van den Oord JJ, De Vos R, Missotten L. 1993. A new epithelial cell type in the human cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. May; 34(6):1983-90;
- Lehrer MS, Sun TT, Lavker RM. 1998. Strategies of epithelial repair: modulation of stem cell and transit amplifying cell proliferation. *J Cell Sci*. 111 (Pt 19):2867-75.
- Levis HJ, Daniels JT. Recreating the Human Limbal Epithelial Stem Cell Niche with Bioengineered Limbal Crypts. *Curr Eye Res*. 2016; 41:1153-1160.
- Levis HJ, Massie I, Dziasko MA, Kaasi A, Daniels JT. Rapid tissue engineering of biomimetic human corneal limbal crypts with 3D niche architecture. *Biomaterials*. 2013 Nov;34(35):8860-8.
- Levis HJ, Menzel-Severing J, Drake RA, Daniels JT. 2013. Plastic compressed collagen constructs for ocular cell culture and transplantation: a new and improved technique of confined fluid loss. *Curr Eye Res*. 38(1):41-52.
- Li G, Xu F, Zhu J, Krawczyk M, Zhang Y, Yuan J, Patel S, Wang Y, Lin Y, Zhang M, et al. (2015). Transcription Factor PAX6 (Paired Box 6) Controls Limbal Stem Cell Lineage in Development and Disease. *J Biol Chem*. 290 :20448-20454.
- Li G-G, Chen S-Y, Xie H-T, Zhu Y-T, Tseng SCG. 2012. Angiogenesis Potential of Human Limbal Stromal Niche Cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*.;53(7):3357-3367.
- Li G-G, Zhu Y-T, Xie H-T, Chen S-Y, Tseng SCG. Mesenchymal Stem Cells Derived from Human Limbal Niche Cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2012;53(9):5686-5697).
- Li H, Dai Y, Shu J, Yu R, Guo Y, Chen J. (2015). Spheroid cultures promote the stemness of corneal stromal cells. *Tissue Cell*. 47:39-48.
- Li W, Chen YT, Hayashida Y, Blanco G, Kheirkah A, He H, Chen SY, Liu CY, Tseng SC. (2008). Down-regulation of Pax6 is associated with abnormal differentiation of corneal epithelial cells in severe ocular surface diseases. *J Pathol*. 214:114-22.
- Li, X. Wang, P. Wan, M. Huang, Z. Wu, X. Liang, Y. Liu, J. Ge, J. Huang, Z. Wang. Tectonic lamellar keratoplasty with acellular corneal stroma in high-risk corneal transplantation. *Mol. Vis.*, 17 (2011), pp. 1909-1917
- Liu W, Merrett K, Griffith M, Fagerholm P, Dravida S, Heyne B et al (2008) Recombinant human collagen for tissue engineered corneal substitutes. *Biomaterials* 29:1147–1158 ;
- Liu Y, Griffith M, Watsky MA, Forrester JV, Kuffová L, Grant D, et al. Properties of Porcine and Recombinant Human Collagen Matrices for Optically Clear Tissue Engineering Applications. *Biomacromolecules* 2006;7:1819–28.
- Liu Y, Ren L, Yao H, Wang Y. Collagen films with suitable physical properties and biocompatibility for corneal tissue engineering prepared by ion leaching technique. *Mater Lett* 2012;87:1–4.
- Ljubimov AV, Saghizadeh M. (2015). Progress in corneal wound healing. *Prog Retin Eye Res* 49:17-45.

Références Bibliographiques

- Lu R., Bian F., Lin J. Identification of human fibroblast cell lines as a feeder layer for human corneal epithelial regeneration. *PLoS One*. 2012;7:e38825.
- Lwigale PY, Bronner-Fraser M. (2009). Semaphorin3A/neuropilin-1 signaling acts as a molecular switch regulating neural crest migration during cornea development. *Dev Biol* 336 :257-265.
- Lwigale PY, Cressy PA, Bronner-Fraser M. (2005). Corneal keratocytes retain neural crest progenitor cell properties. *Dev Biol* 288, 284-93.
- Ma Y, Xu Y, Xiao Z, Yang W, Zhang C, Song E, Du Y, Li L. Reconstruction of chemically burned rat corneal surface by bone marrow-derived human mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2006 Feb;24(2):315-21.
- Maeda H. Observation of Spatially Rhythmic Patterns from Evaporating Collagen Solution Droplets. *Langmuir* 2000;16:9977–82.
- Majo F., Rochat A., Nicolas M., Jaoude G.A., Barrandon Y. 2008. Oligopotent stem cells are distributed throughout the mammalian ocular surface *Nature* 456: 250-254
- Marfurt CF, Cox J, Deek S, Dvorscak L. 2010. Anatomy of the human corneal innervation. *Exp Eye Res*. 90(4):478-92.
- Masur S, Dewal HS, Dinh TT, Erenburg I, Petridou S. Myofibroblasts differentiate from fibroblasts when plated at low density. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:4219–4223.
- Mathan JJ, Ismail S, McGhee JJ, McGhee CN, Sherwin T. Sphere-forming cells from peripheral cornea demonstrate the ability to repopulate the ocular surface. *Stem Cell Res Ther*. 2016 Jun 1.
- Matic M, Petrov IN, Chen S, Wang C, Dimitrijevič SD, Wolosin JM. 1997. Stem cells of the corneal epithelium lack connexins and metabolite transfer capacity. *Differentiation*. May; 61(4):251-60).
- Matthyssen S, Ní Dhubhghaill S, Van Gerwen V, Zakaria N. Xeno-Free Cultivation of Mesenchymal Stem Cells From the Corneal Stroma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2017, 1;58(5):2659-2665.
- Maurice DM. 1957. The structure and transparency of the cornea. *J Physiol*; 136:263-86
- McLaren A. 2001. Ethical and social considerations of stem cell research. *Nature* 1;414(6859):129-31
- Meek K.M., Elliott G.F., Nave C. 1986. A synchrotron X-ray diffraction study of bovine cornea stained with cupromeronic blue. *Coll. Relat. Res.*; 6:203–218
- Meek KM, Knupp C. 2015. Corneal structure and transparency. *Progress in Retinal and Eye Research.*; 49:1-16
- Merrett K, Fagerholm P, McLaughlin CR, Dravida S, Lagali N, Shinozaki N, et al. Tissue-engineered recombinant human collagen-based corneal substitutes for implantation: performance of type I versus type III collagen. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49:3887–94.
- Merrett K, Liu W, Mitra D, Camm KD, McLaughlin CR, Liu Y, et al. Synthetic neoglycopolymer-recombinant human collagen hybrids as biomimetic crosslinking agents in corneal tissue engineering. *Biomaterials* 2009;30:5403–8.

Références Bibliographiques

- Meyer-Blazejewska EA, Call MK, Yamanaka O, et al. 2011. From hair to cornea: toward the therapeutic use of hair follicle-derived stem cells in the treatment of limbal stem cell deficiency. *Stem Cells*; 29: 57-66.
- Mi S, Connon CJ. The formation of a tissue-engineered cornea using plastically compressed collagen scaffolds and limbal stem cells. *Methods Mol Biol*. 2013 ;1014 :143-55.
- Mi S, Khutoryanskiy VV, Jones RR, Zhu X, Hamley IW, Connon CJ. Photochemical cross-linking of plastically compressed collagen gel produces an optimal scaffold for corneal tissue engineering. *J Biomed Mater Res A* 2011;99A:1–8.
- Miri A, Al-Aqaba M, Otri AM et al. In vivo confocal microscopic features of normal limbus. *Br J Ophthalmol* 2012;96:530-536.
- Mohan RR, Hutcheon AE, Choi R, Hong J, Lee J, Mohan RR, Ambrósio R Jr, Zieske JD, Wilson SE. Apoptosis, necrosis, proliferation, and myofibroblast generation in the stroma following LASIK and PRK. *Exp Eye Res*. 2003 Jan; 76(1):71-87
- Moll, R., et al., 1982. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 31(1): p. 11-24
- Molvær RK, Andreasen A, Heegaard S et al. Interactive 3D computer model of the human corneolimbal region: crypts, projections and stem cells. *Acta Ophthalmol* 2013;91(5):457-462.
- Morrison SJ, Shah NM, Anderson DJ. Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell* 1997;88:287–298.
- Mort RL, Bentley AJ, Martin FL, Collinson JM, Douvaras P, Hill RE, Morley SD, Fullwood NJ, West JD. Effects of aberrant Pax6 gene dosage on mouse corneal pathophysiology and corneal epithelial homeostasis. *PLoS One*. 2011;6(12):e28895.
- Mosser G, Anglo A, Helary C, Bouligand Y, Giraud-Guille M-M. Dense tissue-like collagen matrices formed in cell-free conditions. *Matrix Biol* 2006;25:3–13.
- Müller LJ, Marfurt CF, Kruse F, Tervo TM. 2003. Corneal nerves: structure, contents and function. *Exp Eye Res*. 76(5):521-42.
- Müller LJ, Pels L, Vrensen GF. 1995. Novel aspects of the ultrastructural organization of human corneal keratocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 36(13):2557-67.
- Muller LJ. The specific architecture of the anterior stroma accounts for maintenance of corneal curvature. *Br J Ophthalmol* 2001;85:437–43.
- Myung PS, Takeo M, Ito M, Atit RP. Epithelial Wnt ligand secretion is required for adult hair follicle growth and regeneration. *J Invest Dermatol*. 2013; 133:31–41;
- Na KS, Mok JW, Joo CK. Ex vivo human corneal epithelial cell expansion from a xeno-feeder-free system. *Ophthalmic Res*. 2015; 53, 217-24.
- Nakagawa M, Taniguchi Y, Senda S, Takizawa N, Ichisaka T, Asano K, Morizane A, Doi D, Takahashi J, Nishizawa M, et al. A novel efficient feeder-free culture system for the derivation of human induced pluripotent stem cells. *Sci Rep*. 2014; 8; 4:3594.

Références Bibliographiques

- Nakamura T, Ang LP, Rigby H et al. The use of autologous serum in the development of corneal and oral epithelial equivalents in patients with Stevens-Johnson syndrome. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47:909–916.
- Nakamura T, Endo K, Cooper LJ, Fullwood NJ, Tanifuji N, Tsuzuki M, Koizumi N, Inatomi T, Sano Y, Kinoshita S. 2003. The successful culture and autologous transplantation of rabbit oral mucosal epithelial cells on amniotic membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 44(1):106-16.
- Nakamura T, Inatomi T, Sotozono C et al. Successful primary culture and autologous transplantation of corneal limbal epithelial cells from minimal biopsy for unilateral severe ocular surface disease. *Acta Ophthalmol Scand* 2004;82:468–471.
- Nakatsu MN, Ding Z, Ng MY, Truong TT, Yu F, Deng SX. Wnt/ β -catenin signaling regulates proliferation of human cornea epithelial stem/progenitor cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52:4734-41
- Nelson, J. Tien Microstructured extracellular matrices in tissue engineering and development *Curr Opin Biotechnol*, 17 (2006), pp. 518-523).
- Netto MV, Mohan RR, Ambrósio R Jr, Hutcheon AE, Zieske JD, Wilson SE. Wound healing in the cornea: a review of refractive surgery complications and new prospects for therapy. *Cornea*. 2005 Jul; 24(5):509-22
- Netto MV, Mohan RR, Sinha S, Sharma A, Dupps W, Wilson SE. Stromal haze, myofibroblasts, and surface irregularity after PRK. *Exp Eye Res* 2006a;82:788–97.
- Nguyen TM, Zorgani A, Lescanne M, Boccara C, Fink M, Catheline S. Diffuse shear wave imaging: towards passive elastography using low-frame rate spectral-domain optical coherence tomography. *J Biomed Opt* 2016 ;21(12) 126013.
- Niemann, C., Owens, D.M., Hulsken, J., Birchmeier, W., and Watt, F.M. 2002. Expression of DeltaN Δ 1 in mouse epidermis results in differentiation of hair follicles into squamous epidermal cysts and formation of skin tumours. *Development (Cambridge, England)* 129 :95-109.
- Nieto-Nicolau N, Martinez-Conesa EM, Casaroli-Marano RP. (2016). Limbal Stem Cells from Aged Donors Are a Suitable Source for Clinical Application. *Stem Cells Int* 3032128.
- Notara M, Schrader S, Daniels JT. The porcine limbal epithelial stem cell niche as a new model for the study of transplanted tissue-engineered human limbal epithelial cells. *Tissue Eng Part A*. 2011;17(5-6):741-50.
- Nubile M, Curcio C, Dua H et al. Pathological changes of the anatomical structure and markers of the limbal stem cell niche due to inflammation. *Mol Vis* 2013;19:516-525.
- Paladini, R.D. and P.A. Coulombe. 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(5): p. 1185-201
- Pang, L. Du, X. Wu. A rabbit anterior cornea replacement derived from acellular porcine cornea matrix, epithelial cells and keratocytes. *Biomaterials*, 31 (2010), pp. 7257-7265.
- Partanen TA, Arola J, Saaristo A, Jussila L, Ora A, Miettinen M, Stacker SA, Achen MG, Alitalo K. 2000. VEGF-C and VEGF-D expression in neuroendocrine cells and their receptor VEGFR-3, in fenestrated blood vessels in human tissues *FASEB J*. 14(13):2087 96.

Références Bibliographiques

- Patel DV, Sherwin T, McGhee CN. Laser scanning in vivo confocal microscopy of the normal human corneoscleral limbus. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47:2823-2827.
- Patel SA, Sherman L, Munoz J, Rameshwar P. Immunological properties of mesenchymal stem cells and clinical implications. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2008 Jan Feb;56(1):1-8.
- Pavone FS, Campagnola PJ. (2013). *Second Harmonic Generation Imaging*, editors: (Taylor and Francis).
- Pellegrini G, E Dellambra, O Golisano, E Martinelli, I Fantozzi, S Bondanza, D Ponzin, F McKeon and M De Luca. 2001. p63 identifies keratinocyte stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:3156–3161.
- Pellegrini G, Golisano O, Paterna P, Lambiase A, Bonini S, Rama P, De Luca M. Location and clonal analysis of stem cells and their differentiated progeny in the human ocular surface. *J Cell Biol*. 1999 May 17; 145(4):769-82)
- Pellegrini G, Traverso CE, Franzi AT, Zingirian M, Cancedda R, De Luca M. 1997. Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium. *Lancet*. Apr 5; 349(9057):990-3.
- Phillippi, E. Miller, L. Weiss, J. Huard, A. Waggoner, P. Campbell. Microenvironments engineered by inkjet bioprinting spatially direct adult stem cells toward muscle- and bone-like subpopulations *Stem Cells*, 26 (2008), pp. 127-134,
- Phu, D., Wray, L.S., Warren, R.V., Haskell, R.C., Orwin, E.J., 2011. Effect of substrate composition and alignment on corneal cell phenotype. *Tissue Eng. A* 17, 799e807.
- Pinnamaneni N, Funderburgh JL. (2012). Stem cells in the corneal stroma. *Stem Cells* 30, 1059-1063.
- Polisetti N, Islam MM, Griffith M. 2013. The artificial cornea. *Methods Mol Biol.*; 1014:45-52.
- Proulx, C. Audet, J. Uwamaliya, A. Deschambeault, P. Carrier, C.J. Giasson, I. Brunette, L. Germain. Tissue engineering of feline corneal endothelium using a devitalized human cornea as carrier *Tissue Eng. A*, 15 (2009), pp. 1709-1718;
- Proulx, S., D'arc Uwamaliya, J., Carrier, P., et al., 2010. Reconstruction of a human cornea by the self-assembly approach of tissue engineering using the three native cell types. *Mol. Vis.* 16, 2192–2201.
- Rabinowitz YS. Keratoconus. *Surv Ophthalmol*. 1998 Jan-Feb;42(4):297-319. Review.
- Rama P, Matuska S, Paganoni G, Spinelli A, De Luca M, Pellegrini G. (2010). Limbal stem-cell therapy and long-term corneal regeneration. *N Engl J Med*. 363, 147-55.
- Ramaesh T, Collinson JM, Ramaesh K, Kaufman MH, West JD, Dhillon B. Corneal abnormalities in Pax6^{+/-} small eye mice mimic human aniridia-related keratopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003 May; 44(5):1871-8).
- Reconstruction of limbal stem cell deficient corneal surface with induced human bone marrow mesenchymal stem cells on amniotic membrane. *Transl Res*. 2014 Mar;163(3):200-10.
- Reichman S, Slembrouck A, Gagliardi G, Chaffiol A, Terray A, Nanteau C, Potey A, Belle M, Rabesandratana O, Duebel J, et al. (2017). Generation of Storable Retinal Organoids and

Références Bibliographiques

- Retinal Pigmented Epithelium from Adherent Human iPS Cells in Xeno-Free and Feeder-Free Conditions. *Stem Cells* 35, 1176-1188.
- Rheinwald JG, Green H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell*. 1975; 6(3):331-343.
- Riazuddin SA, Zaghoul NA, Al-Saif A, et al. 2010. Missense mutations in TCF8 cause late-onset Fuchs corneal dystrophy and interact with FCD4 on chromosome 9p. *Am J Hum Genet.* ;86(1):45-53)
- Ricardo JR, Cristovam PC, Filho PA, et al. 2013. Transplantation of conjunctival epithelial cells cultivated ex vivo in patients with total limbal stem cell deficiency. *Cornea*; 32: 221-8.
- Rohaina CM, Then KY, Ng AM, et al. 2013. Reconstruction of limbal stem cell deficient corneal surface with induced human bone marrow mesenchymal stem cells on amniotic membrane. *Translational research: the journal of laboratory and clinical medicine*; 163: 200-10.
- Ross JR, Howell DN, Sanfilippo FP. Characteristics of corneal xenograft rejection in a discordant species combination. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1993 Jul;34(8):2469-76.
- Saedi N, K.P. Karmelek, J.A. Paten, R.Zareian, E. DiMasi, J.W. Ruberti. Molecular crowding of collagen: a pathway to produce highly-organized collagenous structures *Biomaterials*, 33 (2012), pp. 7366-7374
- Sangwan VS, Basu S, Vemuganti GK, Sejpal K, Subramaniam SV, Bandyopadhyay S, Krishnaiah S, Gaddipati S, Tiwari S, Balasubramanian D. (2011). Clinical outcomes of xeno-free autologous cultivated limbal epithelial transplantation: a 10-year study. *Br J Ophthalmol*. 95, 1525-1529.
- Sangwan V.S., Vemuganti G.K., Singh S., Balasubramanian D. 2003. Successful reconstruction of damaged ocular outer surface in humans using limbal and conjunctival stem cell culture methods *Bio Sci Rep*; 23: 169-174.
- Santos LN, Fernandes BF, de Moura LR, Cheema DP, Maloney S, Logan P, Burnier MN Jr. 2007. Histopathologic study of corneal stromal dystrophies: a 10-year experience. *Cornea*.;26(9):1027-31.
- Satake Y, Higa K, Tsubota K, Shimazaki J. 2011. Long-term outcome of cultivated oral mucosal epithelial sheet transplantation in treatment of total limbal stem cell deficiency. *Ophthalmology*. 118(8):1524-30.
- Schermer, A., Galvin, S. & 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.
- Schlötzer-Schrehardt U, Dietrich T, Saito K, Sorokin L, Sasaki T, Paulsson M, Kruse FE. 2007. Characterization of extracellular matrix components in the limbal epithelial stem cell compartment. *Exp Eye Res*. Dec ;85(6):845-60).
- Schlötzer-Schrehardt U, Kruse FE. Identification and characterization of limbal stem cells. *Exp Eye Res*. 2005 ;81(3):247-64.
- Schofield R. 1978. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells*. ;4 :7-25).

Références Bibliographiques

- Schwab IR, Reyes M, Isseroff RR. 2000. Successful transplantation of bioengineered tissue replacements in patients with ocular surface disease. *Am J Ophthalmol*. 130(4):543-4,
- Schwab I.R. 1999. Cultured corneal epithelia for ocular surface disease *Trans Am Ophthalmol Soc*; 97 : 891-986
- Scribbick AT, Scribbick FW. Right-eye pain. Corneal ulcer (infectious keratitis). *Acad Emerg Med*. 1994 Jul-Aug;1(4):391, 412-3.
- Shafiq, R.A. Gemeinhart, B.Y. Yue, A.R. Djalilian. Decellularized human cornea for reconstructing the corneal epithelium and anterior stroma *Tissue Eng. C*, 18 (2012), pp. 340-348 ;
- Shahdadfar A., Haug K., Pathak M. Ex vivo expanded autologous limbal epithelial cells on amniotic membrane using a culture medium with human serum as single supplement. *Exp Eye Res*. 2012;97:1–9.
- Shanmuganathan V, Foster T, Kulkarni B et al. Morphological characteristics of the limbal epithelial crypt. *Br J Ophthalmol* 2007;91:514-519.
- Sharma S.M., Fuchsluger T., Ahmad S. Comparative analysis of human-derived feeder layers with 3T3 fibroblasts for the ex vivo expansion of human limbal and oral epithelium. *Stem Cell Rev*. 2012;8:696–705
- Shimano K, Satake M, Okaya A, Kitanaka J, Kitanaka N, Takemura M, Sakagami M, Terada N, Tsujimura T. Hepatic oval cells have the side population phenotype defined by expression of ATP-binding cassette transporter ABCG2/BCRP1. *Am J Pathol*. 2003 Jul; 163(1):3-9.
- Shortt AJ, Secker GA, Munro PM, Khaw PT, Tuft SJ, Daniels JT. 2007. Characterization of the limbal epithelial stem cell niche: novel imaging techniques permit in vivo observation and targeted biopsy of limbal epithelial stem cells. *Stem Cells*. Jun;25(6):1402-9.
- Silverman B, Alexander RJ, Henley WL. 1981. Tissue and species specificity of BCP 54, the major soluble protein of bovine cornea. *Exp Eye Res.*; 33:19.
- Siminovitch I, McCulloch EA, Till JE. 1963. The distribution of colony-forming cells among spleen colonies. *J Cell Comp Physiol*. 62:327-36.
- Song X., Xie T. 2002. DE-cadherin-mediated cell adhesion is essential for maintaining somatic stem cells in the *Drosophila* ovary. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 14813–14818.
- Sotozono C, Inatomi T, Nakamura T, Koizumi N, Yokoi N, Ueta M, Matsuyama K, Miyakoda K, Kaneda H, Fukushima M, Kinoshita S. 2013. Visual improvement after cultivated oral mucosal epithelial transplantation. *Ophthalmology*. 120(1):193-200.
- Spradling A, Drummond-Barbosa D, Kai T. Stem cells find their niche. *Nature*. 2001 Nov 1;414(6859):98-104.
- Staal FJ, Luis TC. 2010. Wnt signaling in hematopoiesis: crucial factors for self-renewal, proliferation, and cell fate decisions. *J Cell Biochem*. Apr 1;109(5):844-9.
- Stasi K, Goings D, Huang J, Herman L, Pinto F, Addis RC, Klein D, Massaro-Giordano G, Gearhart JD. (2014). Optimal isolation and xeno-free culture conditions for limbal stem cell function. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 55, 375-86.

Références Bibliographiques

- Steinert, P.M. and D.R. Roop. 1988. Molecular and cellular biology of intermediate filaments. *Annu Rev Biochem*,57: p. 593-625.
- Strampelli B, Valvo A, Tusa E. 1965. Osteo-odonto-keratoprosthesis in a case treated for anchylobepharon and total simbleraphon. *Ann Ottalmol Clin Ocul* ; 91 : 462-79.
- Susaimanickam J, Savitri Maddileti S, Pulimamidi VK, Boyinpally SR, Naik RR, Naik MN, Reddy GB, Sangwan VS and Mariappan I. 2017. Generating minicorneal organoids from human induced pluripotent stem cellsPraveen. *Human Development* 144, 2338-2351.
- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. Nov 30;131(5):861-72.
- Takahashi K, Yamanaka S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*.;126:663–676.
- Tanaka Y, Baba K, Duncan TJ, Kubota A, Asahi T, Quantock AJ, et al. Transparent, tough collagen laminates prepared by oriented flow casting, multi-cyclic vitrification and chemical cross-linking. *Biomaterials* 2011;32:3358–66.
- Thanos M, Pauklin M, Steuhl KP, Meller D. (2010). Ocular surface reconstruction with cultivated limbal epithelium in a patient with unilateral stem cell deficiency caused by Epidermolysis bullosa dystrophica hallopeau-Siemens. *Cornea* 29, 462-464.
- Thèse d'Uwamaliya Jeanne d'Arc. 2009. Reconstruction d'une cornée humaine par la méthode d'auto-assemblage à partir des trois types de cellules.
- Thoft RA, Friend J. The X, Y, Z hypothesis of corneal epithelial maintenance. (1983). *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 24, 1442–1443.
- Thoft S. 2005. The cornea—scientific foundations and clinical practice. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia.
- Thomasy, S. M., Krishna Raghunathan, V., Winkler, M., Reilly, C. M., Sadeli, A. R., Russell, P., ... Murphy, C. J. 2014. Elastic modulus and collagen organization of the rabbit cornea: epithelium to endothelium. *Acta Biomaterialia*, 10(2), 785–791.
- Thomson JA, Marshall VS. 1998. Primate embryonic stem cells. *Curr Top Dev Biol*.; 38:133-65. Review
- Thu-Mai Nguyen. Elastographie haute-resolution pour l'evaluation des proprietes elastiques de la cornee et de la peau. *Optique [physics.optics]*. Universite Paris-Diderot - Paris VII, 2012.
- Tidu A, Ghoubay-Benallaoua D, Lynch B, Haye B, Illoul C, Allain JM, Borderie VM, Mosser G. (2015). Development of human corneal epithelium on organized fibrillated transparent collagen matrices synthesized at high concentration. *Acta Biomater*. 22, 50-58.
- Till JE, McCulloch EA. 1961. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat. Res.*, 14, 213-222.
- Till JE, McCulloch EA. 1963. Early repair processes in marrow cells irradiated and proliferating in vivo. *Radiat Res*. Jan; 18:96-105.

Références Bibliographiques

- Tomkins O and H. J. Garzozzi, "Collagen cross-linking: Strengthening the unstable cornea.," *Clinical ophthalmology*, vol. 2, no. 4, pp. 863–867, Dec. 2008.
- Torbet J, Malbouyres M, Builles N, Justin V, Roulet M, Damour O, et al. Orthogonal scaffold of magnetically aligned collagen lamellae for corneal stroma reconstruction. *Biomaterials* 2007;28:4268–76.
- Torricelli AAM, Santhanam A, Wu J, Singh V, Wilson SE. The corneal fibrosis response to epithelial-stromal injury. *Experimental eye research*. 2016;142:110-118.
- Townsend WM. The limbal palisades of Vogt. 1991. *Transactions of the American Ophthalmological Society*;89:721-756).
- Tsai RJ, Li LM, Chen JK. 2000. Reconstruction of damaged corneas by transplantation of autologous limbal epithelial cells. *N Engl J Med*, 343(2):86-93
- Tseng SC, Hatchell D, Tierney N, Huang AJ, Sun TT. 1984. Expression of specific keratin markers by rabbit corneal, conjunctival, and esophageal epithelia during vitamin A deficiency. *J Cell Biol*. 99(6):2279-86
- Tseng SCG. Regulation and clinical implications of corneal epithelial stem cells. *Mol Biol Rep*. 1996;23:47–58.
- Uchida S, Yokoo S, Yanagi Y, Usui T, Yokota C, Mimura T, Araie M, Yamagami S, Amano S. (2005). Sphere formation and expression of neural proteins by human corneal stromal cells in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 46, 1620-5.
- Varghese VM, Prasad T, Kumary TV. (2010). Optimization of culture conditions for an efficient xeno-feeder free limbal cell culture system towards ocular surface regeneration. *Microsc Res Tech*. 73, 1045-52.
- Veréb Z, Póliska S, Albert R, Olstad OK, Boratkó A, Csontos C, Moe MC, Facskó A, Petrovski G. Role of Human Corneal Stroma-Derived Mesenchymal-Like Stem Cells in Corneal Immunity and Wound Healing. *Sci Rep*. 2016 May 19; 6:26227.
- Vrana E, Builles N, Hindie M, Damour O, Aydinli A, Hasirci V. Contact guidance enhances the quality of a tissue engineered corneal stroma. *J Biomed Mater Res A*. 2008 Feb; 84(2):454-63.
- Vrana E, Builles N, Kocak H, Gulay P, Justin V, Malbouyres M, Ruggiero F, Damour O, Hasirci V. EDC/NHS cross-linked collagen foams as scaffolds for artificial corneal stroma. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2007;18(12):1527-45.
- Wagers AJ, Weissman IL. 2004. Plasticity of adult stem cells. *Cell*. 116(5):639-48. Review
- Waring GO 3rd, Bourne WM, Edelhauser HF, Kenyon KR. (1982). The corneal endothelium. Normal and pathologic structure and function. *Ophthalmology* 89, 531-90.
- Watanabe K, K Nishida, M Yamato, T Umemoto, T Sumide, K Yamamoto, N Maeda, H Watanabe, T Okano and Y Tano. (2004). Human limbal epithelium contains side population cells expressing the ATP-binding cassette transporter ABCG2. *FEBS Lett* 565:6–10.
- Watt FM, Hogan BL. Out of eden: stem cells and their niches. *Science* 2000;287:1427–1430. doi:10.1126/science.287.5457.1427

Références Bibliographiques

- Weiss JS, Moller HU, Aldave AJ, Seitz B, Bredrup C, Kivela T, Munier FL, Rapuano CJ, Nischal KK, Kim EK, Sutphin J, Busin M, Labbe A, Kenyon KR, Kinoshita S, Lisch W. 2015. IC3D classification of corneal dystrophies--edition 2. *Cornea*; 34:117-59
- West JD, Dorà NJ, Collinson JM. 2015. Evaluating alternative stem cell hypotheses for adult corneal epithelial maintenance. *World J Stem Cells*. 7(2):281-99.
- West-Mays JA, Dwivedi DJ. 2006. The keratocyte: corneal stromal cell with variable repair phenotypes. *Int J Biochem Cell Biol.*;38(10):1625-31. Epub 2006 Apr 3
- Whitcher J.P., Srinivasan M., Upadhyay P.M., 2001. Corneal blindness: a global perspective, *Bulletin of the World Health Organization*, 79:214–221.
- Wilson SE, Chaurasia SS, Medeiros FW. Apoptosis in the initiation, modulation and termination of the corneal wound healing response. *Exp Eye Res* 2007;85:305–311
- Wu J, Du Y, Mann MM, Funderburgh JL, Wagner WR. (2014). Corneal stromal stem cells versus corneal fibroblasts in generating structurally appropriate corneal stromal tissue. *Exp Eye Res*. 120, 71-81.
- Wu J, Du Y, Mann MM, Yang E, Funderburgh JL, Wagner WR. (2013). Bioengineering organized, multilamellar human corneal stromal tissue by growth factor supplementation on highly aligned synthetic substrates. *Tissue Eng Part A*. 19, 2063-2075.
- Wu J, Du Y, Watkins SC, Funderburgh JL, Wagner WR. (2012). The engineering of organized human corneal tissue through the spatial guidance of corneal stromal stem cells. *Biomaterials* 33, 1343-1352.
- Xie HT, Chen SY, Li GG, Tseng SC. 2011. Limbal epithelial stem/progenitor cells attract stromal niche cells by SDF-1/CXCR4 signaling to prevent differentiation. *Stem Cells*. Nov;29(11):1874-85.
- Xu YG ; Xu YS Huang C Feng Y Li Y Wang W . Development of a rabbit corneal equivalent using an acellular corneal matrix of a porcine substrate. *Mol Vis*. 2008;14:2180–2189.)
- Yamamoto, M. C., L. Johkura, K. Asanuma, K. Okouchi, Y. Ogiwara, N. Sasaki, K. 2006. "Branching ducts similar to mesonephric ducts or ureteric buds in teratomas originating from mouse embryonic stem cells." *Am J Physiol Renal Physiol* 290 (1): F52- 60.
- Yang A, R Schweitzer, D Sun, M Kaghad, N Walker, RT Bronson, C Tabin, A Sharpe, D Caput, C Crum and F McKeon. 1999. p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. *Nature* 398:714–71.
- Yeung A, Schlötzer-Schrehardt U, Kulkarni B et al. Limbal Epithelial Crypt: A Model for Corneal Epithelial Maintenance and Novel Limbal Regional Variations. *Arch Ophthalmol* 2008;126(5):665-669. doi:10.1001/archophth.126.5.665.
- Yokoo S, Yamagami S, Usui T et al. Human corneal epithelial equivalents for ocular surface reconstruction in a complete serum-free culture system without unknown factors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49(6):2438-2443.
- Yoshida S, Shimmura S, Nagoshi N, Fukuda K, Matsuzaki Y, Okano H, Tsubota K. (2006). Isolation of multipotent neural crest-derived stem cells from the adult mouse cornea. *Stem Cells* 24, 2714-22.

Références Bibliographiques

- Yoshida S, Shimmura S, Shimazaki J, Shinozaki N, Tsubota K. (2005). Serum-free spheroid culture of mouse corneal keratocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 46, 1653-1658.
- Young BB, Zhang G, Koch M, Birk DE. The roles of types XII and XIV collagen in fibrillogenesis and matrix assembly in the developing cornea. *J Cell Biochem* 2002;87:208–20.
- Zakaria N, Possemiers T, Ni Dhubhgaill S, Leysen I, Rozema J, Koppen C et al. Results of a phase I/II clinical trial: standardized, non-xenogenic, cultivated limbal stem cell transplantation. *Journal of Translational Medicine.* 2014, 12:58;
- Zhang J, Upadhy D, Lu L, et al. 2015. Fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) is required for corneal epithelial cell proliferation and differentiation during embryonic development. *PLoS One*;10: e0117089.
- Zhang Y, Li C, Jiang X, Zhang S, Wu Y, Liu B, Tang P, Mao N. Human placenta-derived mesenchymal progenitor cells support culture expansion of long-term culture-initiating cells from cord blood CD34+ cells. *Exp Hematol.* 2004 Jul; 32(7):657-64.
- Zhang, M.C., Liu, X., Jin, Y., et al., 2015. Lamellar keratoplasty treatment of fungal corneal ulcers with acellular porcine corneal stroma. *Am. J. Transplant.* 15, 1068–1075. ;
- Zhao C., Deng W., Gage F. H. 2008. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell* 132, 645–660)
- Zhao Y, Ma L. (2015). Systematic Review and Meta-analysis on Transplantation of Ex Vivo Cultivated Limbal Epithelial Stem Cell on Amniotic Membrane in Limbal Stem Cell Deficiency. *Cornea* 34, 592-600.
- Zhou S, Schuetz JD, Bunting KD, Colapietro AM, Sampath J, Morris JJ, Lagutina I, Grosveld GC, Osawa M, Nakauchi H, Sorrentino BP. The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nat Med.* 2001 Sep; 7(9):1028

Résumé

Les agressions graves de la surface oculaire peuvent se compliquer d'ulcérations cornéennes épithéliales, de néovascularisation, d'opacification et d'inflammation chroniques, échappant à tout traitement médical. Les progrès dans la compréhension de la physiologie du renouvellement de l'épithélium et du stroma cornéen ont permis d'introduire une approche thérapeutique, la greffe de cellules souches. L'objectif de notre étude est d'apporter une source de cellules souches cornéennes par thérapie cellulaire afin de restituer une fonction épithéliale et stromale permettant l'obtention d'une cornée claire chez l'animal. Les cellules souches épithéliales limbiques (LSC) et les cellules stromales limbiques (SSC) ont été isolées dans un milieu exempt de produits animaux tout en gardant leur caractère indifférencié. L'effet régénérateur des SSC a été étudié *in vivo* dans un modèle de fibrose cornéenne chez la souris. Les SSC ont été injectées dans le stroma cornéen et ont permis la restitution d'un stroma organisé et d'une cornée transparente. Le projet a aussi consisté à élaborer et mettre en forme une matrice à base de collagène I afin de favoriser la culture concomitante de tous les types cellulaires présents dans la cornée tout en préservant organisation, transparence et propriétés mécaniques. La connaissance des conditions physico-chimique du collagène a permis de produire des matrices transparentes qui ont pu être colonisées par les SSC et les LSC. Notre étude ouvre de nouvelles perspectives dans le traitement des pathologies provoquant des opacités cornéennes afin de faire face au manque de dons de cornée.

Mots clés : Cornée, Cellules souches cornéennes, thérapie cellulaire, cornée artificielle

Treatment of corneal diseases by cell therapy and tissue-engineered artificial cornea

Abstract

Cornea, the outer part of the eye, features high transparency crucial for good vision. The maintenance of a healthy cornea is linked to the presence of corneal stem cells in the limbus (peripheral region of the cornea). Several diseases can lead to its opacification requiring transplantation of donor tissue to restore vision. Although corneal transplantation has achieved clinical success, there is a shortage of donor corneas worldwide. To solve this problem, cell therapy and tissue-engineered artificial cornea are promising approaches that could eventually outperform current treatment. Corneal epithelial stem cells (LSC) and stromal stem cells (SSC) were isolated in feeder free and xeno free medium. The therapeutic effect of SSC was investigated *in vivo* by their injection in mouse cornea treated with liquid nitrogen. SSC have the ability to restore the extracellular matrix organization and corneal transparency. Transparent collagen I fibrillated matrices have been synthesized and were evaluated for fibril organization, transparency, mechanical properties and their ability to be repopulated by corneal stromal stem cells and to support limbal epithelial stem cell growth. We show that the matrices were organized and transparent. SSC and LSC were able to repopulate and to grow into the collagen matrix. These cells present a potential for stem cell-based treatment of corneal blindness.

Key Words: Cornea, corneal stem cells, cell therapy, artificial cornea.