



**HAL**  
open science

# Analyse protéomique et propriétés de ré-épithélialisation des membranes amniotiques humaines en vue d'une greffe de la surface oculaire

Parvin Sadat Nazari Hashemi

## ► To cite this version:

Parvin Sadat Nazari Hashemi. Analyse protéomique et propriétés de ré-épithélialisation des membranes amniotiques humaines en vue d'une greffe de la surface oculaire. Organes des sens. Normandie Université, 2019. Français. NNT : 2019NORMR085 . tel-02457769

**HAL Id: tel-02457769**

**<https://theses.hal.science/tel-02457769>**

Submitted on 28 Jan 2020

**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.



Normandie Université

**Pour obtenir le diplôme de doctorat**

**Spécialité : Science de la Vie et de la Santé**

**Préparée au sein de l'Université de Rouen Normandie**

**Analyse protéomique et propriétés de ré-épithélialisation des membranes amniotiques humaines après lyophilisation en vue d'une greffe de la surface oculaire**

**Présentée et soutenue par  
Parvin NAZARI HASHEMI**

**Thèse soutenue publiquement le 11 décembre 2019  
devant le jury composé de**

Mme Sophie CANDON	PU-PH CHU de Rouen, Université de Rouen Normandie	Présidente du jury
M. Éric GABISON	PU-PH Fondation Rothschild, Université Paris Diderot, APHP	Rapporteur
M. Gilles THURET	PU-PH CHU de Saint-Étienne, Université de Saint-Étienne	Rapporteur
Mme Laurence BARNOUIN	DR Tissue Bank of France	Examineur
Mme Julie GUEUDRY	DR CHU de Rouen	Examineur
M. Marc MURAINÉ	PU-PH CHU de Rouen, Université de Rouen	Directeur de thèse

**Thèse dirigée par M. Marc MURAINÉ, laboratoire Inserm 1234**



## REMERCIEMENTS

Ce travail de recherche a été réalisé au sein de l'Unité INSERM 1234 « PANTHER : Physiopathologie, Autoimmunité, Maladies Neuromusculaires et THERapies Régénératrices » dirigée par le Pr. Olivier BOYER.

Je tiens tout d'abord à remercier les institutions ayant rendu possible la réalisation de ce travail : Normandie Université, l'École Doctorale Normande de Biologie Intégrative, Santé et Environnement, l'INSERM, l'ONG Ophtalmo Sans Frontière ainsi que la Fondation de l'Avenir pour le financement de ce travail de thèse. Ce projet a également été cofinancé par l'Union Européenne et la région Normandie. L'Europe s'engage en Normandie avec le Fonds Européen de Développement Régional.

Je remercie le Pr. Olivier BOYER de m'avoir fait confiance et de m'avoir accueillie au sein du laboratoire. Merci pour le soutien que vous avez témoigné dans la réalisation de ce projet de recherche.

Je remercie mon directeur de thèse, le Pr. Marc MURAIN de m'avoir confié ce sujet de thèse. Merci pour les conseils, la confiance et l'autonomie que vous m'avez accordés dans la réalisation de mes protocoles de recherche.

Je remercie le Pr. Sophie CANDON, vice directrice de notre unité, de m'avoir fait l'honneur d'accepter d'être la présidente de mon jury de thèse.

Je remercie le Pr. Éric GABISON et le Pr. Gilles THURET d'avoir accepté de juger mon travail et d'apporter leur expertise. C'est un honneur pour moi de vous avoir en tant que rapporteurs.

Je remercie le Dr. Laurence BARNOUIN et le Dr. Julie GUEUDERY d'évaluer mon travail et d'avoir accepté de siéger dans mon jury de thèse en tant qu'examinatrices.

Un merci particulier au Dr. Aurélie BISSON, de m'avoir guidé dans ce projet. Un grand merci pour le temps que tu m'as accordé et tous les conseils que tu m'as apportés tout au long de ma thèse.

*Merci à la banque de tissus du CHU de Rouen:*

Un immense merci à Mme Fanny CHAVENTRE, ma collaboratrice de la banque de tissus. Tu as été indispensable pour la réalisation de ce projet. Merci pour ta disponibilité et ton aide.

Un chaleureux merci à Mme Sabine LEFEVRE. Merci pour ton aide si précieuse tout au long de ce projet et ainsi que pour ta gentillesse.

Merci à David TOUBEAU ; pour ton aide à la bonne réalisation de ce projet.

*Un grand merci à tous les collaborateurs :*

Merci à la plateforme PISSARO et plus particulièrement au Pr. Pascal COSETTE et au Dr Clément GUILLOU. Je vous remercie pour le temps que vous m'avez accordé, pour vos explications et pour la génération d'autant de données.

Merci à la plateforme PRIMACEN et plus spécifiquement au Dr. Sophie BERNARD. Merci pour ta patience, tes explications et ta bonne humeur.

Merci aux ressources Biologiques de l'Université de Rouen. Dr. Arnaud ARABO et Mme Julie MAUCOTEL, merci pour votre aide si précieuse et votre patience.

*A tous mes collègues de l'unité Inserm U1234 :*

Un grand merci au Dr. Laurent DROUOT, merci pour tes précieux conseils scientifiques prodigués tout au long de ma thèse et pour ton soutien.

Merci au Dr. Catalina ABAD pour ta gentillesse et toutes les discussions scientifiques et moins scientifiques qu'on a eu.

Merci aux Pr. Isabelle DUBUS, Dr. Manu FRERET Dr. Marie-Laure GOLINSKI, pour vos conseils au cours de différentes étapes de ce projet.

Merci à Mme Chantal Barou, M. Christophe ARNOULT, Pr. Jean-Baptiste LATOUCHE, M. Gaëtan RIOU, Dr. Laetitia JEAN, Dr. Sahil ADRIOUCH, Dr Sébastien CALBO, Dr. Maud MAHO, Dr. Yossan Var TAN, Dr. Marine MALLETER, M. Rachid ZOUBAIRI pour votre soutien et les échanges et la bonne humeur ambiante dans le laboratoire.

Un immense merci à mes collègues de bureau Audrey, Marie, Baptiste. Merci pour les fous rires et surtout les coups de folie. Merci pour votre soutien et de m'avoir supportée ces trois années. Merci aux doctorants de la « team autre bureau », Mélanie, Henri, Allan, Sara, notre post doc préféré Romain, notre ancienne doctorante adorée Laurine et ma chère Justine de la « team biothérapie ». Merci pour les moments de joies partagées et les beaux moments de discussions.

Un grand merci à l'Expérimentarium et son équipe, Élise, Claire et Claire, pour votre bienveillance, votre positivité et vos encouragements. Merci pour cette sacrée aventure !

*Enfin, merci à mes amies et à mes proches :*

Un merci à Bérénice, mon amie de thèse, d'Expérimentarium et de Crossfit. Merci pour avoir été toujours présente pour m'écouter, ta bonne humeur, ton soutien et pour l'anticorps secondaire !

Merci à Damien, de m'avoir épaulée et soutenue tout au long de cette aventure. Merci de m'avoir soutenue dans mes moments d'angoisse et d'être tout simplement à mes côtés.

Merci à ma sœur que j'admire, Parisa. Merci pour ton soutien inconditionnel et de m'avoir soutenue face aux obstacles que j'ai pu rencontrer, de m'avoir permis de réaliser mes rêves et pour ton aide si précieuse. Tu es une personne exceptionnelle.

A mes parents, merci pour votre soutien et votre patience tout au long de ma thèse. Merci à toi Zahra, de m'avoir épaulée et de croire en moi. Merci à toi Reza de m'avoir donné l'envie d'apprendre. Je vous remercie d'avoir supporté mon absence et de votre compréhension. Merci pour votre amour infaillible et toute l'énergie que vous arrivez à me donner.

## **TABLE DES MATIERES**

<b>TABLE DES MATIERES .....</b>	<b>6</b>
<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>8</b>

<b>LISTE DES TABLEAUX .....</b>	<b>10</b>
<b>RESUME .....</b>	<b>13</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>15</b>
<b>ABREVIATIONS.....</b>	<b>17</b>
<b>I. INTRODUCTION.....</b>	<b>20</b>
1. Le Globe oculaire.....	21
2. La Cornée .....	24
2.1. Le Film lacrymal.....	26
2.2. L'Épithélium.....	26
2.3. La Membrane de Bowman.....	29
2.4. Le Stroma .....	30
2.5. La Couche de Dua .....	31
2.6. La Membrane de Descemet .....	31
2.7. L'Endothélium .....	31
3. L'Ulcère de la cornée .....	32
4. La greffe de cornée.....	36
5. La membrane amniotique.....	37
5.1. La Structure de la membrane amniotique .....	37
5.2. Les Propriétés de la membrane amniotique .....	38
6. Étude I Lyophilisation de la membrane amniotique.....	56
6.1. Introduction aux méthodes de conservation de la membrane amniotique humaine. ....	56
6.1.1. La Congélation.....	57
6.1.2. La Lyophilisation .....	58
7. Étude II Mapping de la membrane amniotique .....	63
8. Étude III Matrice de collagène.....	63
<b>II. OBJECTIFS .....</b>	<b>67</b>
<b>III. RESULTATS.....</b>	<b>70</b>
<b>1. Étude I LYOPHILISATION DE LA MEMBRANE AMNIOTIQUE.....</b>	<b>71</b>
1.1. MATERIELS ET METHODES .....	71
1.1.1. Prélèvement de la membrane amniotique Humaine (MAH) .....	71
1.1.2. Conservation de la membrane amniotique humaine (MAH).....	71
1.1.3. Analyse protéomique de la MAH .....	72
1.1.4. Analyse structurale de la MAH par microscopie électronique à transmission .....	75
1.1.5. Culture primaire des cellules épithéliales .....	76
1.1.6. Caractérisation des cellules épithéliales .....	77
1.1.7. Analyse in vivo.....	80
1.1.8. Analyses statistiques.....	82

1.2.	RESULTATS .....	82
1.2.1.	Étude in vitro de la capacité d'épithélialisation des MAH L et MAH C .....	82
1.2.2.	Étude comparative protéomique des MAH L versus MAH C .....	92
1.2.3.	Étude de la structure par Microscopie électronique à transmission.....	99
1.2.4.	Étude comparative de la capacité d'épithélialisation IN VIVO des MAH L et MAH C.....	101
1.3.	CONCLUSION .....	108
<b>2.</b>	<b>Étude II MAPPING DE LA MEMBRANE AMNIOTIQUE .....</b>	<b>111</b>
<b>3.</b>	<b>Étude III IMPLANTATION DE LA MATRICE DE COLLAGENE.....</b>	<b>127</b>
3.1.	MATERIELS ET METHODES .....	127
3.1.1.	Implantation de matrice de collagène.....	127
3.1.2.	Histologie .....	128
3.2.	RESULTATS .....	128
3.3.	CONCLUSION .....	131
<b>IV.</b>	<b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>134</b>
<b>1.</b>	<b>Lyophilisation de la membrane amniotique.....</b>	<b>135</b>
1.1.	Capacité d'épithélialisation équivalente entre les MAH L et les MAH C .....	135
1.2.	Analyses structurelles.....	137
1.3.	Expression protéique.....	137
1.4.	Implantation In vivo.....	138
<b>2.</b>	<b>Mapping de la membrane amniotique.....</b>	<b>139</b>
<b>3.</b>	<b>Implantation de matrice de collagène.....</b>	<b>140</b>
<b>V.</b>	<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>143</b>

## LISTE DES FIGURES

Figure 1	Schéma général du globe oculaire. ....	21
Figure 2	Schéma des différentes couches de la rétine. ....	24
Figure 3	Schéma des différentes couches de la cornée humaine.....	25
Figure 4	Différentiation des cellules souches limbiqes en cellules épithéliales. ....	29

Figure 5 Histologie de la membrane amniotique. ....	38
Figure 6 Activation de la voie NF- $\kappa$ B par l'EGF. ....	40
Figure 7 La voie de signalisation activée par les facteurs de croissance HGF et KGF dans les cellules épithéliales de la cornée. ....	44
Figure 8 La voie de signalisation du TGF- $\beta$ Smad dépendante et indépendante. ....	48
Figure 9 Un grand nombre de facteurs de croissance et de cytokine sont produits dans le processus de cicatrisation des cellules épithéliales de la cornée. ....	49
Figure 10 Différentes méthodes de greffe de la membrane amniotique. ....	55
Figure 11 Schéma de notre lyophilisateur se trouvant à la banque de tissus du CHU de Rouen. ....	59
Figure 12 Étapes de lyophilisation. ....	61
Figure 13 Courbe caractéristique de la lyophilisation. ....	62
Figure 14 Comparaison de la culture cellulaire dans le milieu KSFM avec SVF et sans SVF ....	86
Figure 15 Nombre de cellules à aspect épithélial obtenues par les méthodes de digestion enzymatique et d'explant de la cornée. ....	87
Figure 16 RT-PCR des ARN codant la CK3 et la CK12 des cellules obtenues à partir des deux méthodes d'extraction. ....	88
Figure 17 Marquage par immunofluorescence des CK3 et CK12 des CEC. ....	89
Figure 18 MAH avant et après déépithélialisation par la trypsine. ....	90
Figure 19 Culture d'explant sur les MAH C et MAH L. ....	91
Figure 20 Expression des CK3 par les cellules mises en culture sur les MAH. ....	92
Figure 21 Taux de protéines extraites des MAH L et MAH C issues des 3 lots de MAH. ....	93
Figure 22 Facteurs de croissance des MAH issus des trois différents lots, ELISA. ....	94
Figure 23 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide 10% réalisé sur les extraits protéiques de patches de MAH L et de MAH C issus de chaque lot. ....	95
Figure 24 Reproductibilité intra-groupe. ....	97
Figure 25 <i>Clustering</i> sur les protéines significativement dérégulées entre les MAH L et les MAH C. ....	98
Figure 26 Analyse <i>StringProt</i> des protéines différentiellement exprimées entre les MAH C et les MAHL. ....	98
Figure 27 Analyse comparative de la microstructure des MAHL et MAH C par microscopie électronique ....	100
Figure 28 Protocole 1 des greffes des MAH L et des MAH C ....	102
Figure 29 Suivi d'épithélialisation de la cornée et coupe histologique ....	103
Figure 30 Protocole 1 bis des greffes des MAH L et des MAH C. ....	104
Figure 31 Suivi de l'épithélialisation de la cornée et coupe histologique des greffes de 3 couches de MAH L ....	105
Figure 32 Protocole 2 des greffes des MAH L et des MAH C ....	106
Figure 33 Suivi d'épithélialisation de la cornée et coupe histologique du protocole 2. ....	107
Figure 34 Expression de la CK3 par les cellules épithéliales à la suite des greffes de MAH L et de MAH C. ....	108
Figure 35 Schéma explicatif d'implantation Inlay et Onlay des matrices de collagènes. ....	129
Figure 36 Schéma explicatif du protocole d'implantation des matrices de collagène. ....	129
Figure 37 Suivi des lapins étant implantés avec la matrice de collagène à 100 mg/mL et 80 mg/mL en Inlay et Onlay. ....	130

## **LISTE DES TABLEAUX**

Tableau 1 Évaluation du prélèvement de cornée 2012-2017.....	36
Tableau 2 Évaluation de la liste d'attente et du devenir des candidats à la greffe de cornée 2012-2017.....	36
Tableau 3 Résumé de l'emplacement et du type de collagènes retrouvés dans les différentes couches de la cornée.....	64

Tableau 4 Différents protocoles de culture et d'expansion des CEC.....	84
Tableau 5 Marqueur des différents types cellulaires de la cornée.....	88
Tableau 6 Échantillons utilisés pour l'analyse globale par label free.....	95
Tableau 7 Nombre de protéines détectées par échantillon. ....	96
Tableau 8 Épaisseur des matrices de collagène post-opératoire à J90 .....	131



## RESUME

La greffe de Membrane Amniotique Humaine (MAH) permet la cicatrisation des ulcères pré-perforants de la cornée et de sauver un nombre significatif d'yeux victimes de brûlures chimiques. La MAH est un matériel biologique, son utilisation pour le traitement des maladies de la surface oculaire donne de bons résultats en raison de sa capacité à réduire l'inflammation et promouvoir une épithélialisation rapide. Pour son utilisation en clinique, la MAH doit bien évidemment être stérile, mais aussi facile à transporter du centre préleveur au centre greffeur, et stockable longtemps et facilement. Actuellement en routine à la banque de tissus de Rouen, la membrane amniotique est séparée de l'amnios puis dénudée de leur couche spongieuse. Par la suite cette membrane est conservée par cryopréservation (congélation à  $-80^{\circ}\text{C}$ ) ce qui complique potentiellement l'acheminement des membranes. Par conséquent, dans le cadre de cette étude avec la Banque Normande de Cornées du CHU de Rouen nous avons développé la lyophilisation des MAH pour faciliter son utilisation et sa distribution. L'étude du *mapping* de la MAH permettra également de déterminer si le taux de facteurs de croissance est homogène dans la MAH ou s'il dépend sa distance par rapport au cordon ombilical.

L'étude de la biocompatibilité *in vivo* d'un deuxième matériau composé de collagène nous permet également d'envisager une alternative pour une implantation du stroma.

Nos analyses protéiques (*ELISA et Label-free*) des MAH lyophilisées ne montrent pas de différence significative en terme de quantité et de qualité protéique. L'approche protéomique est complétée par l'analyse de la capacité des cellules épithéliales de cornée humaines (CEC) à se multiplier sur la membrane amniotique lyophilisée *in vitro*. Nous n'avons pas observé de différence entre la croissance des cellules épithéliales sur la MAH lyophilisée ou congelée. L'analyse du total de protéines extraites montre également que la lyophilisation ne dégrade pas les MAH au niveau protéique.

Au niveau structurel les résultats de la microscopie électronique ont montré que la structure du stroma de la MAH est impactée par la lyophilisation.

La greffe des MAH a été réalisée sur les ulcères cornéens chez le lapin. Au cours de l'expérimentation les lapins n'ont pas montré de signe d'inflammation, les analyses histologiques ont mis en évidence l'épithélialisation de la surface oculaire.

Ce projet est en collaboration avec l'association ophtalmo sans frontière pour qu'à terme le développement de l'utilisation clinique des MAHL répondant notamment à des besoins humanitaires (Cameroun).

Notre étude de la cartographie de la MAH a également montré qu'une variabilité en termes de quantité de protéine existe entre les différents donneurs. Dans cette étude nous avons également montré que la couche spongieuse est une source de facteurs de croissance importante dans le processus de cicatrisation des ulcères cornéens.

**Mots-clés : Renouveaulement de l'épithélium cornéen, ulcère, membrane amniotique, protéomique, matrice de collagène.**



## ABSTRACT

The Human Amniotic Membrane (HAM) graft allows the healing of corneal ulcers and rescues a significant number of eyes with chemical burn. HAM is a biological material, its use for the treatment of ocular surface diseases gives good results because of its ability to reduce inflammation and promote rapid epithelialization. For its clinical use, the HAM must of course be sterile, but also easy to transport from the sampling center to the transplant center, and easily storable and for a long time. Currently on routine in the tissue bank of Rouen, the amniotic membrane is separated from the amnion and denuded of its spongy layer. Subsequently this membrane is stored by cryopreservation (freezing at  $-80^{\circ}\text{C}$ ) which potentially complicates the delivery of membranes. Consequently, as part of this study with the Banque Normande de Cornées of Rouen University Hospital, we have developed freeze-drying of HAM to facilitate its use and distribution. The HAM mapping study will also determine whether the level of growth factors is homogeneous in the HAM or whether it depends on its distance from the umbilical cord.

The study of the *in vivo* biocompatibility of a second material composed of collagen also allows us to consider an alternative for implantation at the level of the stroma.

Our protein analyzes (ELISA and Label-free) of freeze-dried HAM do not show any significant difference in terms of quantity and protein quality. The proteomic approach is complemented by the analysis of the ability of human corneal epithelial cells (CECs) to multiply on the freeze-dried amniotic membrane *in vitro*. We did not observe any difference between the epithelial cells growths on freeze-dried or frozen HAM. The analysis of the extracted protein total also shows that freeze-drying does not degrade the HAM at the protein level.

At the structural level the electron microscopy results showed that the structure of the MAH stroma is impacted by freeze-drying.

The MAH transplant performed on corneal ulcers in rabbits was performed. During the experiment the rabbits did not show any sign of inflammation, the histological analyzes highlighted the epithelialization of the ocular surface.

This project is in collaboration with OSF association for the development of the clinical use of MAHL responding in particular to humanitarian needs (Cameroon).

Our study of HAM mapping also showed that variability in terms of amount of protein exists between different donors. We have also shown that the spongy layer is an important source of important growth factor in the healing process of corneal ulcers.

**Keywords: Corneal epithelium renewal, ulcer, amniotic membrane, proteomics, collagen matrix.**



## ABREVIATIONS

**3T3:** 3-day transfer, inoculum 3×10<sup>5</sup> cells

**AA:** Acides Aminés

**ACN:** Acétonitrile

**ADN:** Acide Désoxyribonucléique

**AKT:**

**ARN:** Acide RiboNucléique

**ARNm:** ARN messenger

**BCA:** *Bicinchoninic Acid Protein*

**BSA:** *Bovine Serum Albumin*

**CD :** Cluster de Différentiation

**CEC :** Cellules Épithéliales de Cornée

**CGRP:** *Calcitonin Gene-Related Peptide*

**CK:** Cytokératine

**CMH:** Complexe Majeur  
d'Histocompatibilité

**DMEK:** *Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty*

**DMEM:** *Eagle's Minimal Essential Medium*

**DSAEK:** *Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty*

**DTT:** *Dithiothréitol*

**EGF:** *Epidermal Growth Factor*

**EGFR:** *Epidermal Growth Factor Receptor*

**ELISA:** Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

**Erk:** *Extracellular Signal-Regulated Kinase*

**eTAC:** *Early Transient Amplifying Cell*

**FGF 7:** *Fibroblast Growth Factor*

**FGFR 2b:** *Fibroblast Growth Factor Receptor2b*

**GMA:** Greffe de la Membrane Amniotique

**HES:** Hématoxyline Eosine Safran

**HGF:** *Hepatocyte Growth Factor*

**HLA:** *Human leucocyte Antigen*

**HPLC:** *High-Performance Liquid Chromatography*

**HRP:** *Horseradish peroxidase*

**HSPG:** Héparines Sulfates Proteoglycans

**IL-1:** Interleukin-1

**kDA:** Kilo Dalton

**KGF:** *Keratinocyte Growth Factor*

**KSFM:** *Keratinocyte Serum-Free Medium*

**LM:** *Laminin*

**LTBP:** *Latent TGF- $\beta$  Binding Protein*

**MAH C:** Membrane Amniotique Humaine Congelée

**MAH L:** Membrane Amniotique Humaine Lyophilisée

**MAH:** Membrane Amniotique Humaine

**MAPK:** *Mitogen-Activated Protein Kinase*

**MEC:** Matrices Extracellulaires

**MMP:** *Matrix Metalloproteinases*

**NF- $\kappa$ B:** *Nuclear factor  $\kappa$ B*

**NF- $\kappa$ B:** *Nuclear Factor-KappaB*

**NGF:** *Nerve Growth Factor*

**OOKP:** *Osteo-Odonto-Keratoprosthesis*

**PAX6:** *Paired Box Protein*

**PBS:** *Phosphate buffered saline*

**PDGF:** *Platelet-Derived Growth Factor*

**PI3K:** *Phosphatidylinositol 3-Kinase*

**PSM :** *Poste de Sécurité Microbiologique*

**RIPA:** *Radioimmunoprecipitation assay buffer*

**RT-PCR :** Reverse transcription polymerase chain reaction

**SDS-PAGE :** *Sodium Dodecyl Sulfate–Polyacrylamide Gel Electrophoresis*

**SLC:** *Small Latent Complex*

**TAC:** *Transient Amplifying Cell*

**SLR:** *Small Leucine-Riche Proteoglycan*

**SVF:** *Sérum de Veau Fœtal*

**TDGF:** *Tetratcarcinom  $\alpha$ -derived growth factor*

**TFA:** *Acide Trifluoroacétique*

**TGF- $\beta$ :** *Transforming Growth Factor beta*

**TIMP:** *Tissue Inhibitors of Metalloproteinases*

**TNF:** *Tumor Necrosis Factor*

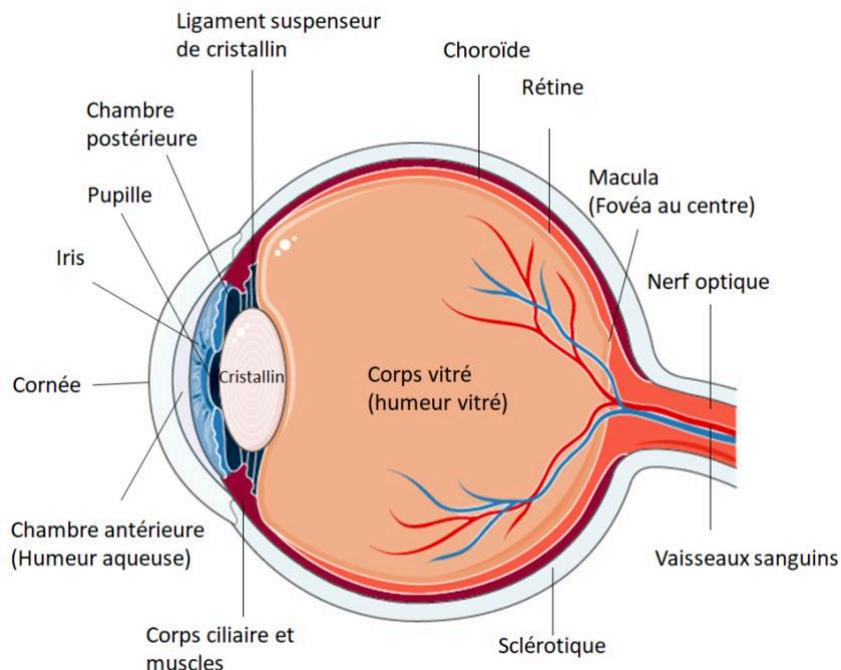
**VIH:** *Virus de l'Immunodéficience Humaine*



# I. INTRODUCTION

## 1. Le Globe oculaire

Le globe oculaire, communément appelé l'œil, correspond à l'organe de la vue. Il est placé à l'intérieur de l'orbite et est enrobé, avec les muscles de l'œil et les nerfs optiques, par le corps adipeux de l'orbite. Sur sa partie externe, il est recouvert par les paupières supérieure et inférieure. Le diamètre d'un œil sain est d'environ 2,5 cm avec un poids de 7 à 8 grammes. La lumière captée de l'environnement externe par l'œil est transmise au cerveau grâce au nerf optique afin que celui-ci puisse les interpréter (Remington and Goodwin, 2011), (Figure 1).



**Figure 1 Schéma général du globe oculaire.**

La cornée humaine est divisée en trois tuniques. Cornéo-sclérale, composée de la sclère et de la cornée. Uvée, composée de la choroïde, du corps ciliaire, de l'iris centré par la pupille et la rétine. Figure originale.

Le globe oculaire peut être divisé en 3 tuniques :

1- La tunique la plus externe, corneo-sclérale, est constituée à 85% de la sclère et à 15% de la cornée.

- a. La sclère est une capsule conjonctive épaisse, blanche, opaque et avasculaire dans laquelle sont insérés les 6 muscles oculomoteurs permettant le mouvement de l'œil dans l'orbite. Elle est principalement constituée de fibres de collagène et en plus faible quantité de fibres élastiques. Ses fibres de collagène, majoritairement des types I et II et minoritairement des types V et VI sont très ressemblantes à celles de la peau. Contrairement à la cornée,

ces fibres sont plus larges et entremêlées, ce qui confère à la sclère une opacité. L'espace entre les fibres est constitué des protéoglycanes riches en leucine, de décorines et de biglycanes. La sclère étant avasculaire, l'oxygène et les nutriments arrivent par la choroïde, la capsule de Tenon et l'épiscière. La sclère n'a pas de rôle optique, elle permet le maintien de la forme et de la pression du globe oculaire et joue également un rôle mécanique via les muscles oculomoteurs qui permettent le mouvement de l'œil (Meek, 2008; Meek and Fullwood, 2001).

- b. La cornée est située sur la face antérieure du globe oculaire. Elle permet par sa forme et sa transparence de capter la lumière. Elle est également en grande partie responsable de la réfraction des rayons de lumière. La cornée sera plus détaillée ultérieurement (DelMonte and Kim, 2011a).

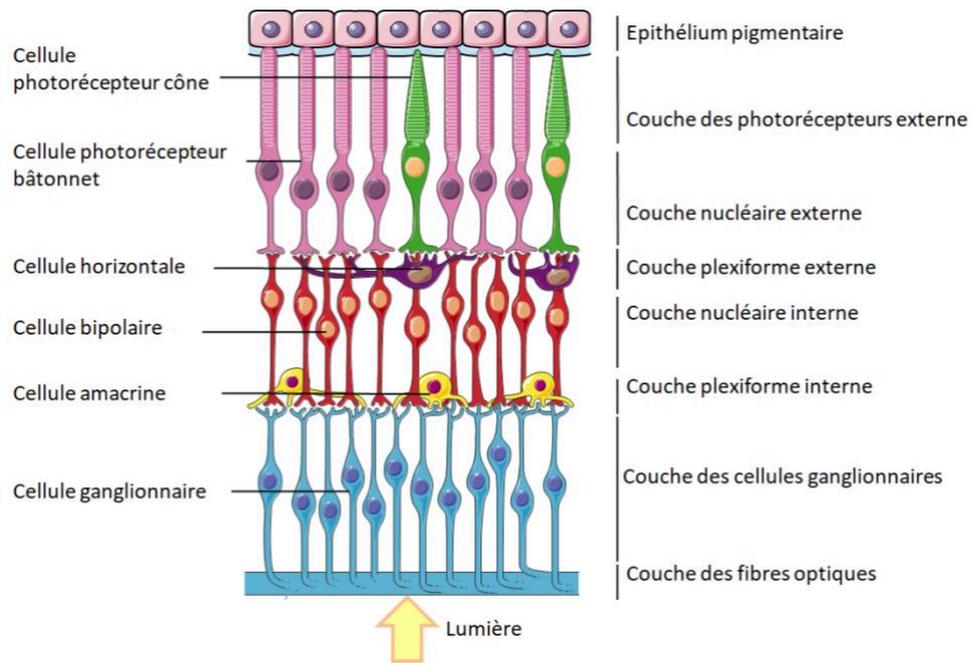
2- La tunique médiane du globe oculaire est l'uvée. Elle est composée de la choroïde, du corps ciliaire, de l'iris et de la pupille.

- a. La choroïde tapisse l'intérieur du globe oculaire. Elle est hyper vascularisée, et est considérée comme la couche nourricière du globe oculaire. Elle permet l'apport en oxygène et en nutriments de la sclère et des photorécepteurs de la rétine. Elle s'étend des marges du nerf optique au corps ciliaire placé vers l'avant de l'œil (Nickla and Wallman, 2010).
- b. Le corps ciliaire est le lieu d'insertion des fins ligaments, Zonules, auxquels le cristallin (lens) est attaché. Ces filaments permettent le contrôle de la courbure du cristallin grâce à la contraction des muscles ciliaires. Les cellules épithéliales recouvrant le corps ciliaire produisent l'humeur aqueuse qui permet de fournir l'apport nutritif et l'oxygène nécessaire au cristallin et à la cornée avasculaire. (Delamere, 2005).
- c. Le cristallin est situé derrière l'iris. Il est transparent, avasculaire et est responsable de 30% de la réfraction des rayons lumineux.
- d. L'iris se situe entre la cornée et le cristallin et est immergé dans l'humeur aqueuse. Il est constitué de deux couches cellulaires, l'épithélium hautement pigmenté et le stroma vascularisé contenant les mélanocytes, les granules de mélanine et les chromatophores. Il est responsable de la contraction de la

pupille et permet donc le contrôle de l'intensité des rayons lumineux qui peuvent atteindre la rétine.

- e. La pupille est une ouverture circulaire dans le centre de l'iris. Elle laisse passer les rayons lumineux.

3- La tunique la plus interne du globe oculaire est la rétine. La rétine est composée de deux feuillets, un feuillet externe pigmentaire et un feuillet interne nerveux, et de 5 types cellulaires. Le feuillet pigmentaire est l'épithélium contenant la mélanine. Il réduit la rétrodiffusion de la lumière pénétrant à l'intérieur de l'œil. Par la suite, débute le feuillet nerveux. La lumière transmise par la cornée est captée au niveau des photorécepteurs spécialisés de la rétine, les bâtonnets et les cônes. Les bâtonnets sont responsables de la vision crépusculaire, en noir et blanc, et les cônes sont responsables de la vision pendant le jour. Ils sont apposés sur l'épithélium pigmentaire et s'étendent jusqu'à la couche plexiforme externe. A ce niveau on retrouve également les cellules horizontales, responsables des connexions horizontales entre les cellules présentes dans cette couche via leurs axones. Les signaux lumineux captés par les photorécepteurs sont traduits en signaux électrochimiques et transmis aux cellules bipolaires. Ces dernières captent le signal au niveau de la couche plexiforme externe et les transmettent aux cellules ganglionnaires de la couche du même nom. Ces cellules ganglionnaires se connectent pour donner naissance au nerf optique. Les cellules ganglionnaires sont également connectées entre elles au niveau de la couche plexiforme interne via les dendrites des cellules amacrines. Enfin, le nerf optique est dirigé vers l'encéphale pour le traitement des informations reçues (Purves et al., 2001). La macula ou tache jaune est la zone de la rétine la plus riche en photorécepteurs (Figure 2).



**Figure 2 Schéma des différentes couches de la rétine.**

La rétine est la tunique la plus interne du globe oculaire. Elle est composée de deux feuillets : un feuillet externe pigmentaire et un feuillet interne nerveux. Il existe également 5 types cellulaires au niveau de la rétine. Figure originale.

Le globe oculaire par sa fonction peut également être divisé en deux parties, les chambres antérieure et postérieure. La chambre antérieure est formée du corps ciliaire, de l'iris, du cristallin et de l'humeur aqueuse. Ces éléments permettent la focalisation de la lumière au niveau de la rétine, qui avec la choroïde et le corps vitré forment la chambre postérieure.

## 2. La Cornée

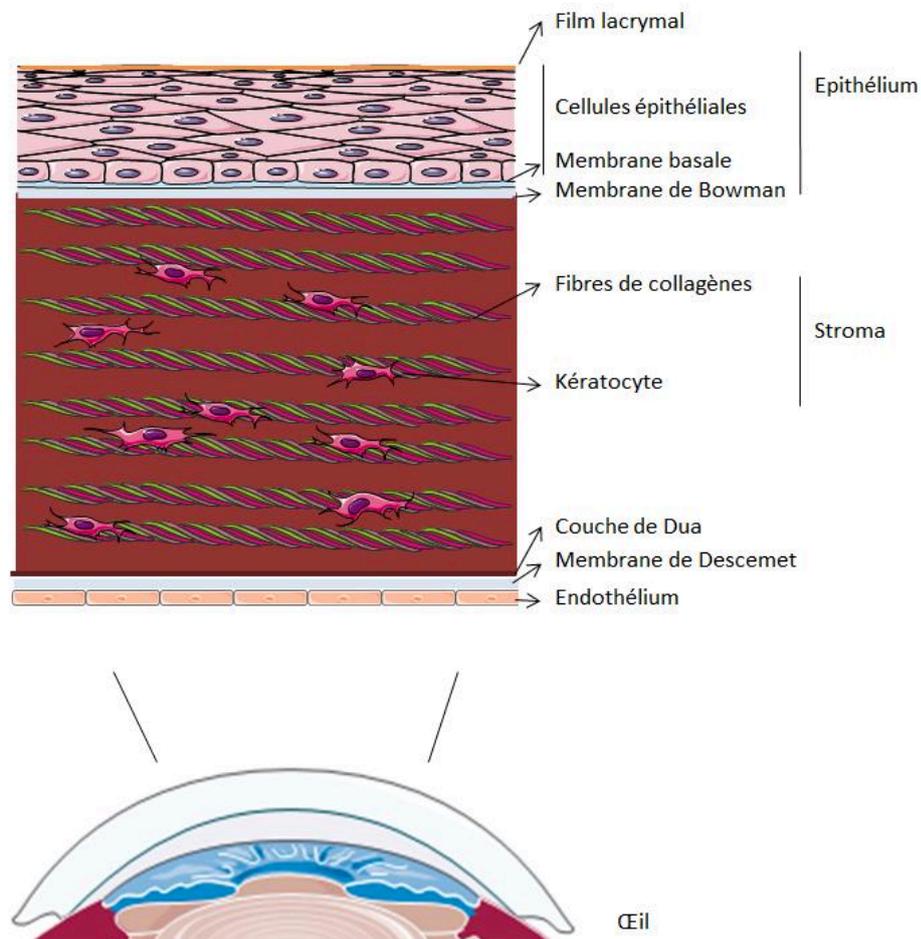
La cornée contrairement à la sclère est transparente. Son emplacement à la surface de l'œil l'expose au contact direct avec l'environnement extérieur et de ce fait elle constitue la première barrière anti-infectieuse de la surface oculaire (DeMonte and Kim, 2011b).

Son épaisseur est d'environ 500  $\mu\text{m}$  au centre et 700  $\mu\text{m}$  au niveau du limbe (périphérie de la cornée). La cornée est responsable de 75 % de la réfraction de la lumière. La plus grande majorité de l'épaisseur de la cornée, environ 90%, est constituée de son stroma. Sa forme incurvée, l'augmentation de son épaisseur vers les périphéries ainsi que sa capacité à être transparente permettent la focalisation des rayons lumineux vers la rétine avec une dispersion minimale (Meek and Knupp, 2015).

La cornée est un tissu extrêmement innervé, ses terminaisons nerveuses jouent un rôle important dans le maintien et la protection de l'intégrité et de la sensation cornéenne. Elle

possède 80 faisceaux nerveux contenant 900 à 15 000 axones. Ces faisceaux sont retrouvés au niveau de la membrane de Bowman et de la membrane basale de l'épithélium. Ces terminaisons nerveuses atteignent les couches les plus superficielles de l'épithélium. L'altération de ces terminaisons nerveuses entraîne la perte de la sensation cornéenne et peut engendrer de graves pathologies (Yang et al., 2018).

Au niveau structurel, la cornée est constituée de plusieurs couches. La couche la plus interne est l'endothélium qui est en contact directe avec la chambre antérieure (contenant l'humeur aqueuse), la membrane de Dua, la membrane de Descemet, le stroma, la membrane de Bowman et de l'épithélium qui est la couche cellulaire en contact avec l'environnement externe, recouvert d'un film lacrymal (Figure 3).



**Figure 3 Schéma des différentes couches de la cornée humaine.**

L'épithélium posé sur sa membrane basale, la membrane de Bowman, le stroma comprenant les fibroblastes, la membrane de Dua, la membrane de Descemet et l'endothélium. Figure originale.

## 2.1. Le Film lacrymal

Le film lacrymal est la première barrière de protection de la cornée contre la dessiccation, les lésions et les agents pathogènes. Il recouvre l'épithélium cornéen ainsi que l'épithélium de la conjonctive. Cette fine couche d'environ 4  $\mu\text{m}$  est sécrétée par les glandes lacrymales. Sa composition est très variable selon les personnes et est également différente selon les moments de la journée, mais de façon générale elle est composée d'une couche lipidique sur sa partie externe, d'une couche d'eau puis d'une couche de mucine en contact avec l'épithélium.

La couche lipidique, sécrétée en grande partie par les glandes de Meibomius, joue deux rôles principaux : éviter l'évaporation de la phase aqueuse et également empêcher la fixation des agents pathogènes en constituant une barrière à la surface cornéo-conjonctivale (Knop et al., 2011; Hodges and Dartt, 2013).

La couche d'eau sécrétée par les glandes lacrymales principales et accessoires est composée dans sa majorité d'eau, de protéine, d'hydrocarbure et de sel.

La couche de mucine (phase mucoïde) est sécrétée par les cellules épithéliales caliciformes de la conjonctive, de la cornée et des glandes lacrymales (Gipson, 2004). Cette mucine sécrétée est diffuse dans la couche aqueuse. Elle est présente sous deux formes, une première forme attachée à la membrane des cellules épithéliales de surface présentes dans la couche la plus interne du film lacrymal et une seconde forme soluble plus diffuse et présente avec un gradient plus faible dans les couches externes. Ces deux formes de mucine sont essentielles pour le maintien de l'humidité de la surface oculaire en permettant l'homéostasie, l'osmolarité, la stabilité et le dynamisme du film lacrymal (Baudouin et al., 2018).

## 2.2. L'Épithélium

L'épithélium cornéen est la première couche cellulaire de la cornée et a une épaisseur d'environ 50  $\mu\text{m}$ . Il est composé de 5 à 7 couches cellulaires pavimenteuses stratifiées et non kératinisées, ce qui constitue 10% de l'épaisseur totale de la cornée. Son renouvellement total est fait tous les 7 à 10 jours (DelMonte and Kim, 2011a; Schlötzer-Schrehardt et al., 2015).

Il est constitué de trois types de cellules épithéliales :

- 1- La couche la plus interne est composée d'une monocouche de cellules épithéliales. Ces cellules basales sous forme cylindrique sont comme leur nom l'indique ancrées grâce aux hémidesmosomes dans la membrane basale et sont liées entre elles et aux cellules de la couche supérieure (couche intermédiaire) grâce aux desmosomes (Forrester et al., 2016). Suite à de multiples cycles de division cellulaire, leur contact avec la membrane basale devient plus faible, puis elles se dirigent vers la surface et se différencient en cellules épithéliales de cornée.
- 2- Les cellules intermédiaires, *wing cell*, constituent environ trois couches cellulaires. Ce sont des cellules polygonales en transition entre les cellules basales et les cellules superficielles. Ces cellules montrent des jonctions serrées entre elles (Eghrari et al., 2015).
- 3- La couche la plus superficielle de l'épithélium cornéen est composée de 2 à 3 couches de cellules épithéliales plates et complètement différenciées. Ces cellules superficielles sont en contact direct avec le film lacrymal. La membrane cytoplasmique apicale de ces cellules est hérissée de microvillosités et de microplis soutenus par des filaments d'actine. Le rôle des microvillosités et des microplis n'est pas totalement identifié. Ils entraîneraient une augmentation de la surface membranaire favorisant ainsi les échanges avec le film lacrymal. De plus, ils pourraient servir de points d'ancrage au film lacrymal car ces cellules expriment du glycocalyx qui permet la fixation des mucines du film lacrymal. Ces cellules sont également liées par des jonctions serrées afin d'éviter que les toxines, les larmes et les bactéries puissent atteindre l'intérieur de l'œil (Chen et al., 2018). Ces cellules épithéliales différenciées expriment les cytokératines 3 et 12.

Les Cytokératines (CK) sont des protéines de la famille des filaments intermédiaires du cytosquelette. Elles s'accrochent sur les plaques des desmosomes et hémidesmosomes et sont importantes dans l'adhésion et l'intégrité cellulaires (Steinert and Roop, 1988). Elles sont exprimées dans le cytoplasme des cellules épithéliales kératinisées et non kératinisées. Ces filaments sont constitués de kératine acide et basique, type I et type II respectivement (Eichner, 1986). L'expression des différentes cytokératines est spécifique à chaque type de cellule épithéliale mais deux cytokératines sont au minimum exprimées (un

de type I et un de type II) dans ces cellules (Van Muijen et al., 1987). Les cellules épithéliales de la cornée sont reconnues notamment par l'expression des cytokératines 3 (64 kDa) et 12 (55kDa) (Kinoshita et al., 1983; Kurpakus et al., 1992; Li et al., 2007).

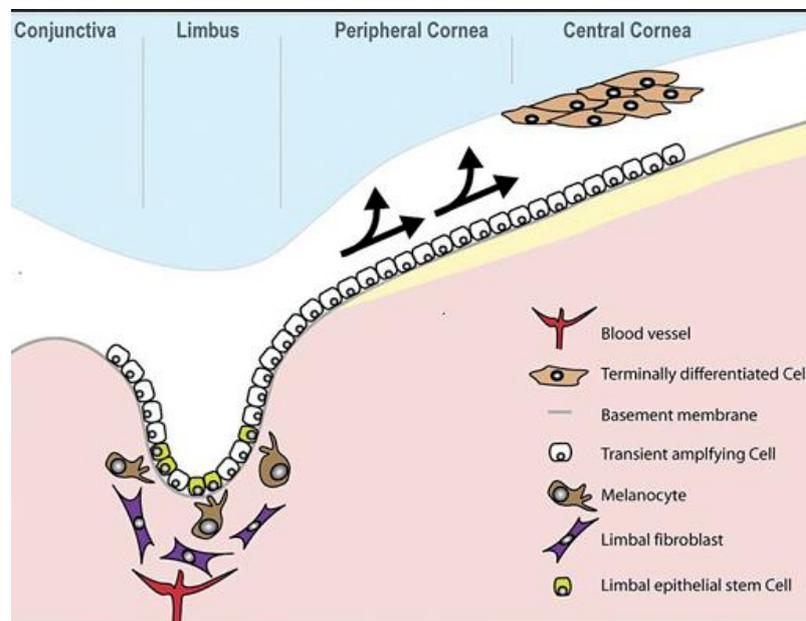
Les cellules épithéliales cornéennes sont issues de la prolifération puis de la différenciation des cellules souches (multipotentes) limbiques.

### 2.2.1. Le Limbe

Cette niche de régulation des cellules épithéliales de la cornée se trouve au niveau des Palissades de Vogt, en périphérie de la structure cornéenne et avant la sclère en formant un anneau (Goldberg and Bron, 1982; Bizheva et al., 2017). Elle constitue la limitation entre les cellules épithéliales de la conjonctive et de la cornée et fait 1,5 mm de large. Au niveau basal du limbe sont retrouvées les cellules souches limbiques (*Limbal Stem Cells-LSC*), ces cellules permettent le renouvellement de l'épithélium cornéen mais également d'autres types cellulaires tels que les mélanocytes et les cellules de Langerhans (Baum, 1970; Davanger and Evensen, 1971; Higa et al., 2005). Les cellules souches limbiques ont une taille plus petite, un nombre de mitochondries plus élevé et n'expriment pas les marqueurs de différenciation des cellules épithéliales de la cornée CK 3/12 (Romano et al., 2003; Kurpakus et al., 1994; Schermer et al., 1986). Comme la plupart des cellules souches, elles sont reconnues par l'expression des facteurs de transcription tels que le p63 ou le transporteur ABCG2 (Chen et al., 2004; Pellegrini et al., 2001). L'importance de cette niche est telle qu'une déficience en cellules limbiques entraîne la conjonctivalisation de la cornée, ce qui engendre une vascularisation, une inflammation chronique et la perte de vue (Dua et al., 2000).

Il est pensé que les cellules souches limbiques, sous l'effet de l'environnement, entreprennent une division asymétrique donnant naissance d'une part à une cellule souche limbique et d'autre part à une cellule de transition jeune, eTAC (*Early Transient Amplifying Cell*). Ces cellules eTACs migrent vers la couche basale de l'épithélium cornéen en se différenciant en cellules de transition (TAC). Ces cellules basales ont en premier un mouvement centripète avec une vitesse de 1.7 à 32  $\mu\text{m}$  par jour (Auran et al., 1995). Par la suite elles entreprennent un mouvement vers la surface supra basal et puis superficielle de l'épithélium (Sartaj et al., 2017). Ces cellules se différencient complètement en cellules épithéliales de la cornée en exprimant les CK 3 et CK 12. Plus une cellule épithéliale est rapprochée du centre de la cornée, plus elle sera différenciée (Allouch-Nahmias et al., 2011).

Ces cellules arrivent à sénescence et meurent finalement par apoptose (Mohan et al., 1997; Yamamoto et al., 2001). Par ce mécanisme le renouvellement des cellules épithéliales de la cornée est réalisé (Figure 4).



**Figure 4 Différenciation des cellules souches limbiqes en cellules épithéliales.**

La division asymétrique des cellules souches limbiqes donne naissance à une cellule souche et à une cellule eTAC. Ces cellules ampliatrices de transition migrent vers le centre de la cornée et ont également un mouvement vers les couches les plus externes de l'épithélium afin de donner naissance aux cellules épithéliales différenciées (Daniels, 2009).

### 2.2.2. La Membrane basale

L'épithélium cornéen est placé sur une membrane basale composée de collagènes de types III, IV et V ainsi que de laminine, de fibronectine, d'héparines sulfates protéoglycans (HSPG) et de nidogènes (Merke, 1994; Timpl and Brown, 1996; Tuori et al., 1996). Cette membrane joue également le rôle d'une barrière empêchant la pénétration d'une trop grande quantité de TGF- $\beta$  (*Transforming growth factor bêta*) et de TDGF (*Tetratcarinom  $\alpha$ -derived growth factor*) au niveau du stroma. Ces facteurs de croissance sont produits par les cellules épithéliales et permettent de stimuler le développement des myofibroblastes et de maintenir la viabilité une fois que ces myofibroblastes matures sont générés dans le stroma (Singh et al., 2011).

### 2.3. La Membrane de Bowman

La membrane de Bowman est une couche fine de 8 à 15 microns située entre la membrane basale de la couche épithéliale et le stroma. Au niveau structurel, elle est très ressemblante au stroma mais est acellulaire. L'hypothèse est que cette absence de cellule(s)

est probablement due aux effets de régulation d'un équilibre par la production des cellules épithéliales de cytokines telles que l'IL-1 et le PDGF (*platelet-derived growth factor*). Il a été montré que l'IL-1 a un effet répulsif *in vivo* et *in vitro*, et le PDGF quant à elle a un effet attractif sur les keratocytes (Johnston et al., 1979; Singh et al., 2011). La membrane de Bowman est retrouvée au stade adulte chez les primates et les oiseaux (Pouliquen et al., 1966; Bettman, 1970; Tisdale et al., 1988). Elle est constituée de fibres de collagènes, essentiellement des collagènes de types I, III, V et du collagène de type VII en plus faible quantité. Ces filaments de collagène ont un diamètre plus petit que ceux du stroma et sont répartis de façon aléatoire dans une couche de mucoprotéines (Marshall et al., 1991a, 1991b). La membrane de Bowman s'affine avec l'âge et en cas de déchirure elle ne peut se régénérer (DelMonte and Kim, 2011a). Le rôle principal de cette membrane est l'aide au maintien de la forme de la cornée. Néanmoins, l'importance de sa présence dans la cornée nécessite plus d'étude.

## 2.4. Le Stroma

Le stroma constitue 80% de l'épaisseur de la cornée. Il est composé de trois éléments : le collagène, les protéoglycans et des cellules (Schlötzer-Schrehardt et al., 2015). Il est principalement composé de collagène, mais l'organisation de ses fibrilles diffère des autres structures de collagène du corps humain de façon à permettre à la cornée de garder sa transparence (Maurice, 1970). En effet, les fibrilles de collagène du stroma sont disposées de façon hélicoïdale avec un diamètre uniforme ( $30.8 \pm 0.8$  nm) et sont positionnées avec une épaisseur intra fibrillaire régulière (d'environ 31 nm) (Meek and Leonard, 1993; Michelacci, 2003; Meek, 2009).

Les fibres de collagène du stroma sont en majorité du collagène de type I liées de façon hétéromère avec le collagène de type V. Ces complexes sont entourés par les protéoglycans. Le stroma cornéen contient le plus grand ratio de collagènes de type V/type I du corps humain. Ces structures sont distribuées de façon homogène avec un petit diamètre d'environ 25 nm dans le stroma (DelMonte and Kim, 2011a; Chen et al., 2015). Ces fibrilles de collagène sont organisées en faisceaux ou fibres régulièrement emmêlés. Elles fusionnent entre elles et forment des couches empilées, appelées lamelles. Cette structure lamellaire régulière du stroma permet une diffusion minimale de la lumière et une transparence maximale de la cornée (Benedek, 1971; Farrell et al., 1973; Maurice, 1957).

Les kératocytes sont des cellules fibroblastiques colonisant le stroma. Elles sont reconnues par l'expression du Cluster de différenciation 38 (CD38). Elles sont en faible nombre et ont une morphologie compacte et longue. Ces caractéristiques leur permettent d'être exposées à minima à la lumière, ce qui diminue la diffusion de la lumière par la cornée (Watsky, 1995).

Ces cellules synthétisent les molécules de la matrice extracellulaire (MEC) telles que le collagène, les glycosamines ainsi que les métalloprotéases (MMPs) afin de garder l'homéostasie. Cette matrice extracellulaire leur sert de site d'ancrage dans le stroma. Dans un état physiologique normal, c'est-à-dire en l'absence d'ulcère, les fibroblastes ont peu ou pas de connexion qu'elle soit intercellulaires ou avec la MEC et ont une production faible de matrice extracellulaire (Tomasek et al., 2002). En cas d'ulcère ces cellules deviennent des protomyofibroblast, elles acquièrent des fibres de stress contractiles composées d'actines cytoplasmiques et deviennent des myofibroblastes. Ces myofibroblastes augmentent leur sécrétion de MEC et contribuent à la réparation du tissu (Hinz et al., 2007).

## **2.5. La Couche de Dua**

La couche de Dua, ou couche pré-Descemet, est placée entre le stroma postérieur et la membrane de Descemet. Cette fine couche a une épaisseur de 10 à 20 µm et est acellulaire. Elle est composée de 5 à 8 couches lamellaires de collagènes de type I et de type VI (Dua et al., 2013).

## **2.6. La Membrane de Descemet**

La membrane de Descemet est une couche fine et acellulaire de 3 microns. Elle est sécrétée de façon continue par les cellules endothéliales à partir de 8 semaines. Au stade adulte cette membrane est distincte, contrairement à la membrane sécrétée après la naissance qui elle a une structure plus amorphe et moins distincte. Avec l'âge l'épaisseur de cette membrane peut atteindre les 10 microns (DelMonte and Kim, 2011a).

## **2.7. L'Endothélium**

L'endothélium est constitué d'une seule couche de cellules polygonales reposant sur la membrane de Descemet. Ces cellules ont un rôle important dans le transport actif vésiculaire intracytoplasmique. Elles possèdent des organites caractéristiques des cellules

impliquées dans le transport et synthétisent de nombreuses protéines. Elles ont également un rôle important dans le maintien de la transparence de la cornée par la régulation des mouvements d'eau dans la cornée et par le maintien d'un bon fonctionnement d'une déturgescence cornéenne (DelMonte and Kim, 2011a; Laing et al., 1975). Grâce à leurs nombreux canaux  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ , les cellules endothéliales maintiennent l'hydratation des couches supérieures. A la naissance la densité des cellules endothéliales est de 6000 cellules/ $\text{mm}^2$ , ce nombre diminue d'environ 0,6% par an. Le nombre minimum de cellules nécessaire à une hydratation efficace des couches supérieures de la cornée est de 500 - 800 cellules/ $\text{mm}^2$  (Bourne, 2003).

### **3. L'Ulçère de la cornée**

Les ulcères cornéens peuvent être causés par différents éléments comme une infection, une brûlure, une sécheresse sévère de la surface oculaire ou une autre pathologie oculaire (dystrophie cornéenne, Distichiasis ...).

Chez le patient les symptômes peuvent se traduire par une douleur oculaire, une rougeur de l'œil, un sentiment de gêne au niveau de l'œil, une sensibilité à la lumière, un gonflement de la paupière ou une tache blanche sur la cornée.

Ces ulcères peuvent être traités par l'utilisation de collyre antibiotique, antiviral ou antifongique. Afin de faciliter la cicatrisation, ces médicaments peuvent être complétés par l'utilisation de collyre stéroïde ou anti-inflammatoire (Turbert, 2018). Si le traumatisme causé est tel que la régénération de l'épithélium cornéen ne peut se faire correctement et afin d'éviter une greffe de cornée, une greffe de la membrane amniotique (GMA) est réalisée.

#### **3.1. La Cicatrisation de la cornée**

Un ulcère peut s'étendre aux différentes couches de la cornée. Il se traduit, en fonction de sa sévérité, en une perturbation de l'épithélium cornéen, incluant le stroma et également l'endothélium dans certain cas, suivi d'une inflammation. En fonction de sa sévérité le processus de cicatrisation se traduit par une ré-épithélialisation cornéenne qui se fait par la migration et la prolifération des cellules épithéliales de la cornée, un réarrangement de la matrice extracellulaire du stroma et un remplacement des cellules endothéliales existantes.

### 3.1.1. La Cicatrisation de l'épithélium

En cas de blessure cornéenne, la première zone touchée est l'épithélium. Il est important que cette zone épithéliale soit rapidement réparée de façon à empêcher les agents pathogènes d'atteindre les couches plus profondes de la cornée et également empêcher la conjonctivation de la cornée. Les lésions superficielles de la couche épithéliale sont normalement réparées en 24 heures. Les cellules mortes perdent leur attachement à la membrane basale, ce qui permet une migration cellulaire plus rapide vers ces zones. Le déclenchement de la ré-épithélialisation se fait au niveau du limbe. Comme expliqué précédemment, les cellules souches limbiques représentent un réservoir pour le remplacement des cellules épithéliales de la cornée en sénescence. Dans un état physiologique normal ces cellules souches se trouvant au niveau du limbe ont un cycle cellulaire très lent. Lors de leur division elles donnent naissance à deux cellules : une cellule souche et une cellule eTA (*Early Transite Amplifying cell*). Ces cellules eTA migrent du limbe vers la cornée en se différenciant en cellule TA. Les cellules TA ont un cycle cellulaire normal et sont localisées au niveau de la périphérie et au centre de la cornée. Les jeunes cellules TA qui peuvent se multiplier au minimum 2 fois et sont situées au niveau de la périphérie de la cornée tandis que les cellules plus matures se trouvant au niveau du centre de la cornée ont une capacité de prolifération plus faible et ne se divisent qu'une seule fois avant de devenir des cellules matures différenciées (post-mitotiques). Dans un état physiologique normal afin de renouveler l'épithélium, toutes les cellules TA n'utilisent pas la totalité de leur capacité de division pour devenir des cellules matures différenciées.

Une fois stimulée la ré-épithélialisation des tissus cornéens peut se faire avec 3 stratégies. Le recrutement de plus de cellules souches avec des cycles cellulaires plus rapide, plus de division et de production des cellules TA. Il peut également induire les jeunes cellules TA de la périphérie cornéenne à utiliser leur potentiel complet de division afin de donner des cellules matures. Il peut également augmenter l'efficacité de division des cellules TA par le raccourcissement de leur cycle cellulaire.

Finalement ces trois stratégies ont pour but de produire plus de cellules différenciées post-mitotiques, afin de restaurer les couches cellulaires les plus superficielles de l'épithélium (Lehrer et al., 1998).

Au niveau de la matrice extracellulaire, une matrice temporaire (une première membrane basale) se crée afin de faciliter la migration des cellules épithéliales. Durant la phase terminale de cicatrisation de l'épithélium, les cellules génèrent de nouveaux hémidesmosomes afin de s'ancrer dans la couche plus basale. Au cours du processus de cicatrisation la création d'une première membrane basale de l'épithélium cornéen permet de limiter la fibrose du stroma. Comme expliqué précédemment, ce mécanisme se fait par la régulation de la disponibilité du TGF- $\beta$ 1 et du PDGF, d'autres facteurs de croissance et des composants de la matrice extra cellulaire au niveau du stroma et donc permet la régulation de l'activité des myofibroblastes. Dans le sens inverse, il peut également réguler le taux de KGF (keratinocyte growth factor) qui est produit par les myofibroblastes et ainsi agir sur la prolifération, la migration et la différenciation des cellules épithéliales cornéennes (Wilson et al., 1994).

La régénération épithéliale est également influencée par les nerfs qui jouent le rôle de contrôle du renouvellement des cellules épithéliales. Pour cela les nerfs cornéens fournissent des facteurs comme la substance P, la CGRP (*calcitonin gene-related peptide*) et le NGF (*nerve growth factors*) (Lambiase et al., 2000; Mikulec and Tanelian, 1996; Nakamura et al.; Reid et al., 1993).

### 3.1.2. La Cicatrisation du stroma

A la suite d'une blessure touchant la membrane de Bowman et le stroma, les cellules épithéliales sécrètent des cytokines telles que l'IL-1  $\alpha$  et  $\beta$ , le TNF  $\alpha$  et Fas-ligand induisant l'apoptose des kératocytes et laissant un site vide de cellules (Mohan et al., 1997, 2000; Ambrósio et al., 2009; Wilson et al., 2001). Environ 6 h après la blessure les kératocytes adjacents du site acellulaire s'activent en fibroblaste et migrent vers le site de la blessure, sous l'effet des cytokines telles que le TGF- $\beta$  et l'EGF, également sécrétées par les cellules épithéliales (Andresen et al., 1997; Fini, 1999). La migration de ces cellules se fait de façon parallèle aux filaments de collagène et assez rapidement (24h). Le but de cette migration est la reconstitution rapide de la structure du stroma. En effet, le plus important dans le cas où une blessure touche le stroma est la réorganisation des fibres de collagène afin de maintenir la transparence de la cornée. La matrice extracellulaire synthétisée en premier lieu est une matrice dite provisoire avec des diamètres et des espaces inter fibrillaire différents de la

matrice dite normale (Hassell, 2010). Une fois cette matrice extracellulaire ré-synthétisée le nombre de fibroblastes diminue. Même si la reconstitution de la matrice provisoire reste rapide la régénération complète du stroma grâce au remplacement de la matrice provisoire et désorganisée (matrice cicatricielle) par une matrice réorganisée dans le but d'obtenir une transparence égale à avant la blessure peut prendre quelques années (Cintron et al., 1990). Il est pensé que les cytokines, TGF- $\beta$  et PDGF, responsables de l'activation et de la migration des fibroblastes sont également responsables de la transdifférenciation des fibroblastes en myofibroblastes (Andresen et al., 1997; Jester et al., 1999; Singh et al., 2011). Les fibroblastes migrent grâce à la contraction des filaments d'actine du cytosquelette, les myofibroblastes quant à eux expriment l' $\alpha$ -SMA (*alpha-Smooth Muscle Actin*), un élément contractile du cytosquelette qui génère une force contractile plus forte et une migration plus rapide (Hinz et al., 2001). Des études indiquent que les myofibroblastes ne sont pas uniquement générés par la prolifération et la transformation de fibroblastes locaux, mais proviennent en grande partie de cellules de la moelle osseuse recrutées dans la cornée, comme observé dans une certaine mesure dans la peau (Barbosa et al., 2010; Singh et al., 2012; Torricelli and Wilson, 2014). Une récente étude a également démontré que la présence de myofibroblastes et non de fibroblastes, inhibe la régénération neuronal au niveau du stroma (Jeon et al., 2018).

La cornée n'étant pas vascularisée, l'activation des plaquettes ne fait pas partie des étapes de cicatrisation. Cependant les facteurs de croissances tels que le PDGF sont produit par les cellules épithéliales (Fini and Stramer, 2005). De façon à garder la transparence de la cornée le processus de cicatrisation n'inclut pas la formation de nouveaux vaisseaux sanguins même si dans les cas chroniques une réponse angiogéniques est observée.

### 3.1.3. La Cicatrisation de l'endothélium

Dans les cas où la blessure touche les cellules endothéliales, il existe 2 réponses. Si cette blessure est légère les cellules restantes migrent afin d'agrandir le champ de recouvrement et ainsi rétablir une bonne réhydratation de la cornée. Si cette blessure est plus importante et qu'un grand nombre de cellules endothéliales sont atteintes, ces cellules ne seront pas remplacées. Dans ce cas la réhydratation des couches supérieures de la cornée ne se fera plus et la cornée deviendra opaque. La solution pour restaurer une bonne réhydratation de

la cornée est une intervention chirurgicale, la keratoplastie (greffe de la cornée) DSAEK (*Descemet's stripping automated endothelial keratoplasty*) ou DMEK (*Descemet's membrane endothelial keratoplasty*).

#### 4. La greffe de cornée

La transplantation cornéenne est un acte chirurgical utilisé dans le cas des pathologies ou des blessures de la cornée. Ces transplantations sont réalisées à partir de cornées de donneurs sains afin de remplacer les tissus endommagés chez le receveur.

Cette opération peut se faire dans le but de remplacer chez le receveur la cornée dans sa totalité ou simplement une ou deux couches de celle-ci. D'après le rapport de l'agence de la biomédecine 11 425 cornées ont été prélevées auprès de 5 738 donneurs en 2017. Parmi ces greffes 4 928 greffes ont été réalisées au bénéfice de 4 582 receveurs en 2017. Le nombre de donneurs a augmenté de 2,5% comparé à l'année 2016 et une hausse de 15,2% a été observée entre 2012 et 2017 (Tableau 1).

**Tableau 1 Évaluation du prélèvement de cornée 2012-2017.**

Activité cornée	2012	2013	2014	2015	2016	2017
Nombre de donneurs de cornée par année	4 982	5 004	5 414	5 717	5 600	5 738
Nombre de cornées prélevées	9 893	9 935	10 761	11 372	11 137	11 425

Tableau issu du rapport de l'agence de la biomédecine, source : Cristal.

Le nombre de candidats à la greffe était de 9 620 en 2017 dont 6 337 demandeurs de greffes étaient de nouveaux inscrits. Ce chiffre a augmenté de 7,2% comparé à 2016. Une hausse de 33,6% a également été observée entre 2012 et 2017. Parmi les candidats, 3 283 étaient déjà en liste d'attente au premier janvier 2017 dont une hausse de 13,6% comparé à 2016 et une augmentation de 243,1% des personnes en liste d'attente entre 2012 et 2017 (Tableau 2).

**Tableau 2 Évaluation de la liste d'attente et du devenir des candidats à la greffe de cornée 2012-2017.**

	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018
En attente au 1er janvier de l'année	2 668	2 634	2 595	2 593	2 890	3 283	3 680
Nouveaux inscrit	4 742	4 931	4 353	5 667	5 913	6 337	ND
Greffes	3 892	4 058	4 058	4 528	4 577	4 928	ND
Patients Greffés	ND	ND	ND	ND	4 166	4 582	ND
Sortis de liste	883	912	970	840	940	1 012	ND

\* ND : Non disponible

Tableau issu du rapport de l'agence de la biomédecine, source : GLAC.

Le nombre de patients inscrits et greffés la même année a diminué de 3,2% entre 2012 et 2017. L'ensemble des indicateurs affichés par l'agence de la biomédecine révèlent

que le besoin en greffe augmente chaque année sans qu'une augmentation proportionnelle du nombre de greffons soit observée.

Ces chiffres montrent la nécessité de trouver des alternatives à la greffe de cornée issue de donneur. L'utilisation de biomatériaux dans le cadre où la cornée ne nécessite pas d'être remplacée dans sa totalité est une alternative à cette pénurie. Une des solutions de plus en plus utilisée et qui donne de bons résultats particulièrement dans le cas des ulcères cornéens est la GMA.

## 5. La membrane amniotique

### 5.1. La Structure de la membrane amniotique

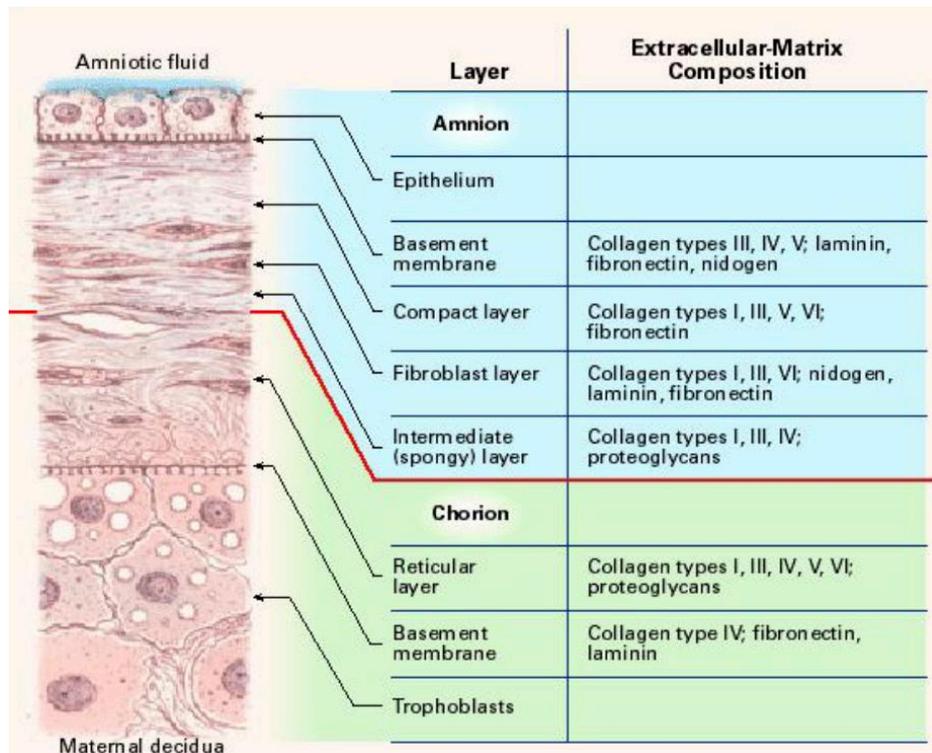
La membrane amniotique est la couche la plus interne des membranes fœtales. Cette membrane est placée en contact direct avec le liquide amniotique devant le chorion (couche externe de la membrane fœtale). Elle est translucide, avasculaire et sans terminaison nerveuse.

La membrane amniotique a une épaisseur variante de 0,002 à 0,5 mm. Elle est constituée de trois couches : l'épithélium qui est la couche plus interne, la membrane basale et le stroma, couche la plus externe.

L'épithélium de la membrane amniotique est constitué d'une monocouche de cellules cuboïdales posée sur la membrane basale. Ces cellules possèdent des microvilli sur leur surface apicale ayant probablement comme rôle la sécrétion et le transport intra et trans-cellulaire (Pollard et al., 1976).

La couche la plus externe de la membrane amniotique est le stroma. Elle est riche en collagènes et en protéoglycanes tels que le lumécane (Yeh et al., 2005). Sa composition est très proche de celle de la membrane basale, mais elle est colonisée par des cellules mésenchymateuses de type fibroblastiques (Figure 5).

Une zone spongieuse et acellulaire est également présente entre la membrane amniotique et le chorion. Cette couche également appelé couche intermédiaire sera définie plus en détail dans l'article intitulé « *Mapping of proteomic profile and effect of the spongy layer in the human amniotic membrane* ».



**Figure 5 Histologie de la membrane amniotique.**

La membrane amniotique et le chorion constituent les deux couches placentaires. Dans la membrane amniotique, on constate la présence d'une monocouche des cellules épithéliales posées sur une membrane basale et d'un stroma comprenant les fibroblastes. La membrane basale et le stroma sont constitués en grande majorité de collagènes et de protéoglycans. Issu de (Niknejad et al., 2008).

## 5.2. Les Propriétés de la membrane amniotique

L'épithélium ainsi que le stroma de la membrane amniotique contiennent différents facteurs de croissance tels que l'EGF (*Epidermal growth factor*), le KGF (*keratinocytes growth factor*), le NGF (*Nerve growth factor*), le HGF (*hepatocyte growth factor*) et le TGF (*transforming growth factor*) ainsi que d'autres cytokines (Rodríguez-Ares et al., 2009). Ces facteurs de croissance ont un rôle très important dans le processus de cicatrisation. La membrane basale, quant à elle, est constituée de laminine, de fibronectine et de collagène III, IV, V, VII (Wolf et al., 1991; Allen et al., 2013). Ces propriétés permettent la différenciation, le développement et la croissance des cellules épithéliales de la cornée lors de la greffe du tissu (Yamada et al., 2003). Outre ces facteurs, la membrane amniotique n'exprime pas les molécules *Human leukocytes antigen* (HLA-A, B, C et DR) ainsi que la  $\beta$ 2-microglobuline, et exprime des molécules immuno-régulatrices telles que le HLA-G et le Fas-ligand lui conférant une faible immunogénicité (Adinolfi et al., 1982; Kubo et al., 2001). Ces caractéristiques permettent une parfaite tolérance de la greffe de membrane amniotique.

La membrane amniotique a également des propriétés anti-inflammatoires par l'expression des cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10, l'antagoniste du récepteur de l'IL-1 mais aussi l'expression d'inhibiteurs de métalloprotéase (TIMP) (Solomon et al., 2001). Elle exprime également des protéines anti-angiogéniques telles que la thrombospondine-1, l'endostatine et les TIMP (Hao et al., 2000). Il a également été démontré que la greffe de la membrane amniotique dans un modèle de déficit limbique chez le lapin présente une récurrence moins marquée de la néovascularisation (Kim and Tseng, 1995b). La cornée étant un tissu non vascularisé, cette propriété reste intéressante dans la GMA dans le cas des atteintes de la surface oculaire. La persistance de l'avascolarisation de la cornée est cruciale pour la clarté de la vision et une vascularisation peut être la cause de certaines maladies inflammatoires (Chang et al., 2016).

L'ensemble de ces caractéristiques décrites; l'expression des facteurs de croissance, l'augmentation de la capacité d'adhésion et de prolifération, le caractère non immunogène, et la possibilité d'obtention de plusieurs patches à partir d'un seul placenta ; démontrent les bénéfices de l'utilisation de la MAH dans le traitement des atteintes de la surface oculaire comprenant les ulcères. La facilité d'obtention de ce bio-matériel permet la création de banques de MAH dans le but de traiter de nombreux patients à partir des patches obtenus d'un même placenta.

#### 5.2.1. Les Facteurs de croissances

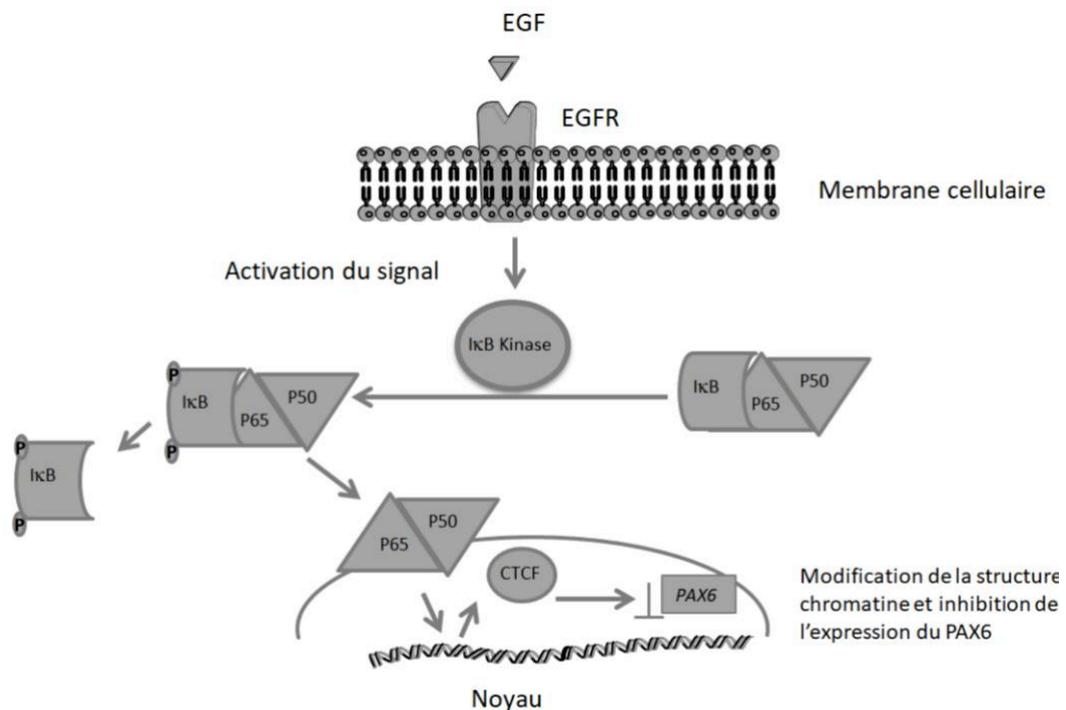
Les facteurs de croissance ont un rôle très important dans la cicatrisation de la surface oculaire. Parmi ces facteurs l'EGF, le HGF, le NGF, le KGF et le TGF- $\beta$  sont les facteurs les plus connus et également les plus importants dans ce processus (Blanco-Mezquita et al., 2013; Liu and Kao, 2015).

##### 5.2.1.1. L'EGF

L'EGF est un petit polypeptide de 6 kDa. Ce facteur de croissance est d'abord synthétisé sous forme de précurseur protéique de 1 217 Acides Aminés (AA) puis clivé pour donner sa forme active de 53 AA. Il a été localisée pour la première fois au niveau des glandes submandibulaires chez la souris (Cohen and Elliott, 1963).

Ce facteur de croissance a un rôle important dans la migration et la prolifération des cellules épithéliales de la cornée. L'EGF agit par la stimulation des signaux intra cellulaires tels que les voies de signalisation NF- $\kappa$ B (*nuclear factor-kappaB*), le PI3K/AKT

(*phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B*) et la MAPK/Erk (*mitogen-activated protein kinases/extracellular signal-regulated kinase*). Les facteurs de transcription de la famille du NF- $\kappa$ B peuvent réguler l'expression d'un grand nombre de gènes importants dans la croissance et le développement cellulaire, l'apoptose ainsi que dans les réponses inflammatoires (Li, 2002; Li and Lu, 2007). Wang et coll. ont montré qu'en activant cette voie l'EGF exerce un effet mitogénique sur la prolifération cellulaire. Une fois la protéine I $\kappa$ B phosphorylée par I $\kappa$ B kinase, elle se dégrade et le complexe P65/P50 libéré peut se fixer sur le promoteur du gène *CTCF* et active la transcription de la protéine CTCF (CCCTC-binding factor). Une augmentation de l'activité de celle-ci promeut la motilité et la migration cellulaire (Figure 6). Chez les souris *knockout* pour NF- $\kappa$ B P50, le processus de cicatrisation est beaucoup plus lent (Wang et al., 2013). Le facteur de transcription CTCF agit en se liant à un site spécifique de l'ADN (motif CCCTC), modifie la structure tridimensionnelle de la chromatine et par ce biais réprime l'expression du facteur de transcription PAX6. La surexpression de celle-ci a un effet inhibiteur sur la prolifération cellulaire (Li and Lu, 2005; Lu et al., 2010).



**Figure 6 Activation de la voie NF- $\kappa$ B par l'EGF.**

L'activation du récepteur de l'EGF (EGFR) induit la phosphorylation d'I $\kappa$ B par la kinase I $\kappa$ B. Le complexe P65/P50 est libéré et peut se fixer sur le promoteur du gène *CTCF* et activer la transcription de cette protéine qui, en se liant au motif CCCTC, modifie la structure tridimensionnelle de la chromatine et réprime l'expression du facteur de transcription PAX6. Figure originale.

Au niveau des cellules épithéliales, les voies de signalisation MAPK/Erk, NF- $\kappa$ B et PI3K/AKT peuvent également être activées par d'autres facteurs de croissance et agir sur la régulation du taux d'expression de CTCF qui sera déterminante dans le processus de cicatrisation. En effet, le rôle de CTCF dans la régulation épigénétique des gènes ne se limite pas qu'à l'EGF (Li and Lu, 2005; Lu et al., 2010; Wang and Lu, 2011).

Dans la cornée, l'EGF est produit par les cellules épithéliales mais est également présent dans la couche lacrymale favorisant la régénération des cellules épithéliales (Klenkler et al., 2007). Lors d'une lésion, l'EGF déjà présent au niveau de la cornée pourra agir immédiatement sur la prolifération cellulaire.

La fixation de l'EGF sur son récepteur (EGFR) participe à la prolifération et à la stratification de la couche épithéliale durant la cicatrisation mais semble également participer à la maintenance de l'épaisseur de la couche épithéliale dans un état physiologique normal de la cornée (Nakamura et al., 2001).

Dans une cornée saine, l'EGFR est retrouvé de façon plus abondante au niveau basal des cellules limbiques. Il a également été montré qu'au cours du processus de cicatrisation, la capacité de prolifération des cellules limbiques de l'épithélium est plus forte que celle des cellules épithéliales au niveau du centre de la cornée (Cotsarelis et al., 1989; Zieske and Wasson, 1993).

Nakamury et coll. ont montré que même en l'absence d'ulcère en inhibant le récepteur de l'EGF la couche épithéliale devenait plus fine, ce qui est probablement dû à l'inhibition de la prolifération des cellules épithéliales. Le TGF- $\alpha$  qui est aussi un ligand pour l'EGFR semble également jouer un rôle dans le maintien de la prolifération des cellules épithéliales en activant ce récepteur (Nakamura et al., 2001).

#### 5.2.1.2. L'HGF

L'HGF est une glycoprotéine connue depuis une trentaine d'années. Ce facteur de croissance permet la régénération du foie même après une ablation de 70% de celui-ci, il est également impliqué dans la régénération d'autres tissus épithéliaux (Nakamura and Mizuno, 2010). Au niveau de la cornée, l'HGF est produit par les cellules mésenchymateuses comme par les fibroblastes.

Il est d'abord synthétisé sous forme inactive, le pré-pro HGF composé de 728 AA (84 kDa), puis le peptide signal de 31 AA est dégradé donnant le pro HGF. La forme active du

HGF n'est obtenue qu'après l'hydrolyse de la liaison entre l'Arginine 494 et la Valine 495. La forme active et mature de l'HGF est une molécule hétérodimérique contenant deux sous-unités de 69 kDa pour la sous-unité  $\alpha$  et de 34 kDa pour la sous-unité  $\beta$ . Ces deux sous-unités sont reliées par un pont disulfure.

A la suite d'une lésion, l'HGF est produit par les cellules fibroblastiques (Wilson et al., 1993). Il se fixe au récepteur C-Met (*tyrosine-protein kinase Met*) ou également nommé HGFR (*HGF receptor*) et induit la phosphorylation du domaine tyrosine kinase de ce récepteur et déclenche la voie de signalisation mitogénique MAPK (*Mitogenic activated protéine kinase*), (Li et al., 1996; Nakamura et al., 2011) (Figure 7). Il peut également jouer un rôle dans l'activation de l'EGFR (Spix et al., 2007).

Ce facteur de croissance agit de façon paracrine sur les cellules épithéliales de la cornée. Son rôle est bien établi dans la migration de ces cellules, leur prolifération et l'inhibition de l'apoptose (Wilson et al., 1993; Daniels et al., 2003; Kakazu et al., 2004). Outre l'épithélium, l'HGF et le C-Met sont exprimés de façon abondante au niveau du stroma et également de façon moins abondante au niveau de l'endothélium et des glandes lacrymales (Li et al., 1996; Kim et al., 1999; Wilson et al., 1999). Il a été supposé qu'en plus de son effet paracrine, l'HGF a également une action autocrine. Son récepteur C-Met est exprimé au niveau de l'épithélium, du stroma et de l'endothélium, mais l'HGF n'induit pas la prolifération des fibroblastes cornéens. Bien que le mécanisme autocrine HGF/C-Met soit connu dans d'autres types cellulaires, l'action de l'HGF dans la cicatrisation du stroma n'est pas réellement connue (Sheehan et al., 2000; Warn et al., 2001).

Dans le cas où la cicatrisation ne peut se faire correctement, une fibrose est observée dans le tissu. L'HGF est un agent anti-fibrotique connu qui contrebalance le facteur de croissance TGF- $\beta$ 1 en réduisant la fibrose. Il agit par l'activation de Smad7, protéine inhibitrice de la voie de transduction Smad qui entre en compétition avec les effecteurs Smad2 et Smad3 par leur liaison au récepteur du TGF- $\beta$ . Cela empêche la phosphorylation de Smad 2 et inhibe ainsi l'activation de la voie du TGF- $\beta$  (Shukla et al., 2009), (voir également la figure 8). Une autre activité anti-fibrotique de l'HGF connue chez la souris au niveau pulmonaire passe par l'activation des métalloprotéases matricielles (MMPs). Ces MMPs assurent la dégradation de la matrice extracellulaire (MEC) notamment la fibronectine essentielle à l'ancrage des myofibroblastes. Il en résulte l'apoptose de ces myofibroblastes (Mizuno et al., 2005).

### 5.2.1.3. Le KGF

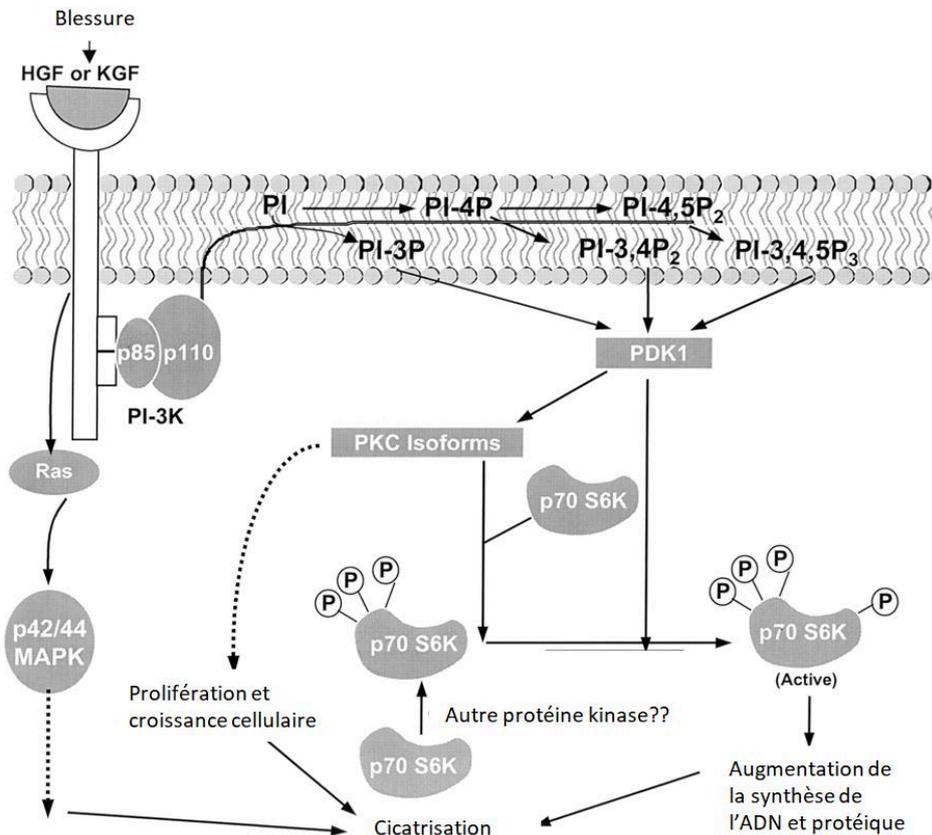
Le KGF est une glycoprotéine également connue en tant que FGF7 (*fibroblast growth factor*) de 163 AA. Cette petite molécule de 18 kDa fait partie de la famille des facteurs de croissance FGF qui en compte 22 au sein des vertébrés et dont le poids moléculaire est de 17 à 34 kDa avec 13 à 70% d'AA identiques (Ornitz and Itoh, 2001). Le KGF a été isolé et purifié pour la première fois par Rubin en 1989 à partir d'un milieu conditionné d'une lignée cellulaire de fibroblastes embryonnaires (Rubin et al., 1989). La plupart des membres de cette famille sont exprimés au niveau embryonnaire, cependant certains membres sont également exprimés dans les tissus au stade adulte et permettent l'homéostasie tissulaire. Ils sont également impliqués dans le processus de cicatrisation (Klagsbrun, 1989). Les membres de la famille FGF ont une grande affinité pour les héparines sulfate protéoglycanes et nécessitent du sulfate d'héparane afin d'activer l'un de leurs 4 récepteurs (Ornitz and Itoh, 2001).

Le KGF, par le biais d'une molécule du sulfate d'héparane, se fixe au récepteur FGFR2b (*fibroblaste growth factor receptor 2b*). En plus de son rôle dans la régulation du développement embryonnaire, il est également impliqué la prolifération et la différenciation des cellules épithéliales des différents tissus tels que l'intestin, le thymus, la peau et la cornée (Danilenko, 1999; Ornitz et al., 1996; Zhang et al., 2006; Rossi et al., 2007).

Le KGF, comme le HGF cité plus haut, agit de façon paracrine et autocrine. A la suite d'une lésion cornéenne, il est produit par les fibroblastes. Au niveau de la cornée, il permet la prolifération des cellules mais pas leur migration (Wilson et al., 1994). Plusieurs études ont montré que le récepteur du KGF est exprimé plus fortement au niveau des cellules limniques (Li and Tseng, 1995; Wilson et al., 1993).

Le KGF, ainsi que l'HGF, activent la voie de signalisation de PI3K/p70 S6 kinase dans les cellules épithéliales de la cornée (Chandrasekher et al., 2001). Les cellules épithéliales traitées avec le KGF ont une meilleure stratification mais forment une couche plus fine qu'un épithélium de cornée normale. Une sur-expression ou une administration de KGF trop importante engendre un développement anormal des cellules épithéliales de la cornée (Lovicu et al., 1999).

La voie de signalisation par laquelle agissent le HGF et le KGF est présentée de façon schématique dans la figure 7.



**Figure 7 La voie de signalisation activée par les facteurs de croissance HGF et KGF dans les cellules épithéliales de la cornée.**

L'activation du récepteur tyrosine kinase par l'HGF et le KGF favorise le recrutement de la PI3K et cause l'activation de la sous unité catalytique p110. L'activation de la PI3K génère la 3'-phosphoinositides. Ces lipides se fixent aux kinases regroupant la *pleckstrin homology domain* (*30-phosphoinositide binding region*), probablement PDK1, un kinase participant à la phosphorylation spécifique de p70 S6K, induisant le changement de conformation et l'activation de l'enzyme (Tudan et al., 1998). Dans ce schéma p70 S6K peut également être phosphorylée par d'autres kinases comme l'isoforme de PKC qui peut s'activer par PDK1. Le résultat de cette voie de signalisation induit la prolifération, la synthèse de protéines et le processus de cicatrisation. Issu de (Chandrasekher et al., 2001) et modifié.

#### 5.2.1.4. Le NGF

Le NGF est un polypeptide de la famille des neurotrophines dont le  $\beta$ -NGF est la forme active, 13 kDa (120 AA). Il a été identifié pour la première fois par Rita Levi-Montalcini et Stanley Cohen en 1956 pour ses effets sur le pancréas (Cohen and Levi-Montalcini, 1956).

Ces récepteurs sont les molécules membranaires TrkA (*tropomyosine receptor A*) et NGFR (*NGF receptor*), qui une fois activées via leur tyrosine kinase, régulent la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire. Il a également été démontré que le NGF inhibe l'action des MMP (Levi-Montalcini, 1987; Wijeyewickrema et al., 2010). Par l'activation du récepteur p75NTR, il peut également induire la mort cellulaire par apoptose (Chao, 1994).

Le traitement *in vivo* avec le NGF chez la poule et la souris accélère la ré-épithélialisation de la cornée. Ces résultats ont également été confirmés *in vitro* avec la

lignée cellulaire HCLEs (Blanco-Mezquita et al., 2013; Pal-Ghosh et al., 2011). La prescription du NGF chez les malades avec un ulcère neurotrophique, après une cataracte ou dans le traitement des inflammations a montré de bons résultats (Aloe et al., 2008; Cellini et al., 2006; Lambiase et al., 2000; Tan et al., 2006).

Le NGF agit de façon paracrine et autocrine, permettant le renouvellement des progéniteurs des cellules épithéliales de la cornée (Qi et al., 2007). Lors d'une lésion, le récepteur de NGF, TrkA, est surexprimé et ce taux augmente dans les cornées traitées avec le facteur de croissance. Une fois le TrkA activé via la fixation du NGF, celui-ci induit la diffusion des cellules épithéliales et la migration par la sur-régulation de la MMP-9. La MMP-9 clive l'ectodomaine de l'intégrine  $\beta$ -4 ce qui facilite la migration des cellules épithéliales (Micera et al., 2006; Pal-Ghosh et al., 2011; Blanco-Mezquita et al., 2013). Une fois la ré-épithélialisation de la surface de la cornée rétablie, le taux de NGF diminue afin d'éviter une trop grande activation de la MMP-9 (Blanco-Mezquita et al., 2013).

#### 5.2.1.5. Le TGF- $\beta$

Les TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor-beta) sont une superfamille de polypeptides d'environ 25 kDa, sous forme active, impliquée dans de nombreux mécanismes physiologiques et exprimée par la plupart des types cellulaires : cellules endothéliales, fibroblastes et cellules épithéliales. En 1978, ils sont reconnus et nommés SGF (*Sarcoma growth factor*) pour être sécrétés par les fibroblastes induits par le virus du sarcome de souris (*Mouse sarcoma virus*) (de Larco and Todaro, 1978). Par la suite, en 1983, ils sont décrits par Anzano pour leur capacité « à transformer » les fibroblastes (Anzano et al., 1983; Klenkler and Sheardown, 2004). Cette super-famille comprend les isoformes de TGF- $\beta$ , les activines, la *Mullerian inhibiting substance*, Nodal, GDFs (*growth differentiation factor*) et plusieurs BMP (*bone morphogenetic proteins*) (Kondaiah et al., 1990; Jakowlew et al., 1992; Wrana, 2013).

Les isoformes du TGF- $\beta$  sont le TGF- $\beta$ 1, 2 et 3 chez les vertébrés, 4 et 5 chez les oiseaux et amphibiens, elles ont une structure très conservée entre les espèces avec une identité d'environ 64 à 82%. Les TGF- $\beta$ 1, 2 et 3 participent aux processus de cicatrisation, d'inflammation, d'angiogenèse, de prolifération des fibroblastes, de synthèse de collagène et de remodelage de la MEC (Kim et al., 2003; Schiller et al., 2004). Les TGF- $\beta$  2 et 3 sont impliqués dans le développement embryonnaire et le TGF- $\beta$ 1 a un rôle plus important dans

la cicatrisation (Ahamed et al., 2008; Saika et al., 2009; Wrana, 2013). Une dérégulation de l'expression du TGF- $\beta$ 1 peut également induire la fibrose dont il est l'un des facteurs les plus importants. L'expression du TGF- $\beta$ 1 est souvent inhibée dans les tissus ayant une lésion chronique non cicatrisante (Kim et al., 2003; Pastar et al., 2010).

Le TGF- $\beta$  est sécrété sous forme de dimère associé à la protéine LAP (*Latency-associated peptide*). La protéine LAP est liée de façon covalente au TGF- $\beta$  constituant un petit complexe inactif nommé *small latent complex* (SLC) (Miyazono et al., 1991; Kinoshita et al., 2001). Les *latent TGF- $\beta$  binding proteins* (LTBPs) sont une famille de *fibrillin-like* molécules qui se lient de façon non covalente au SLC. Le LTBPs régule la biodisponibilité du TGF- $\beta$  et également son activité. Ils facilitent la sécrétion de sa forme inactive et permettent la fixation du TGF- $\beta$  à la MEC et régulent l'activation de sa forme latente (Saharinen et al., 1999; Rifkin, 2005). Les TGF- $\beta$  et les autres membres de cette famille ont comme récepteurs des récepteurs transmembranaires à activité sérine thréonine kinase, T $\beta$ R-I et T $\beta$ R-II (Massague 1998). Ils se lient d'abord aux récepteurs T $\beta$ R-II et par la suite cet hétérodimère (TGF- $\beta$  + T $\beta$ R-II) se lie au T $\beta$ R-I. Cette dimérisation de 2 T $\beta$ R-I et de 2 T $\beta$ R-II entraîne l'activation de ces derniers (Klass et al., 2009). Lors de la fixation de son ligand, le T $\beta$ R-II (constamment phosphorylé) phosphoryle la région riche en glycine sérine du récepteur T $\beta$ R-I (Annes, 2003). L'activation du T $\beta$ R-I entraîne la phosphorylation du complexe intracellulaire R-Smads (Smad2 et 3). Smad2/3 se lie au co-Smad 4 et migre vers le noyau et ainsi régule l'expression de certains gènes. Le TGF- $\beta$  peut également activer d'autres voies de signalisation sans activation des molécules Smads. Cependant ces voies nécessitent d'être mieux étudiées (Figure 8) (Klass et al., 2009). Une des voies de signalisation indépendante de Smad passe par la phosphorylation de Par6 liée au T $\beta$ R-I et est phosphorylé par T $\beta$ R-II. Cette voie permet la dissolution des jonctions serrées des cellules épithéliales (Ozdamar et al. 2005). Un troisième récepteur est également connu, le T $\beta$ R-III qui n'a pas d'activité kinase. Son rôle dans l'inhibition de la voie de signalisation Smad 2/3 du TGF- $\beta$  dans la lignée cellulaire MDA-MA-231 a été montré (Tazat et al., 2015).

Le TGF- $\beta$ 1 et TGF- $\beta$ 2 sont exprimés au niveau de l'épithélium et du stroma cornéen avec une expression plus forte du TGF- $\beta$ 2 au niveau des larmes mais également dans différents segments de l'œil. Cela montre l'importance du TGF- $\beta$  au niveau de l'œil (Nishida et al., 1994; Koli et al., 2001). L'ARN messenger du TGF- $\beta$ 3 est également détecté chez la

cornée du rat au niveau de l'épithélium et l'endothélium (Pasquale et al., 1993; Joyce and Zieske, 1997).

Dans les cas pathologiques comme une cicatrice hypertrophique, une altération de la voie de signalisation du TGF- $\beta$  est observée. L'augmentation de l'expression et la phosphorylation du Smad-2 et/ou du Smad-3 et la non surexpression de Smad 7 (action préventive empêchant la contraction du collagène en inhibant les Smads) en réponse au TGF- $\beta$ 1 peuvent être la cause de cette dégénérescence de la cicatrisation (Kopp et al., 2005; Xie et al., 2008). Chez les enfants développant une cicatrisation hypertrophique le taux de TGF- $\beta$  dans le plasma peut être un indicateur de cette pathologie (Rorison et al., 2010).

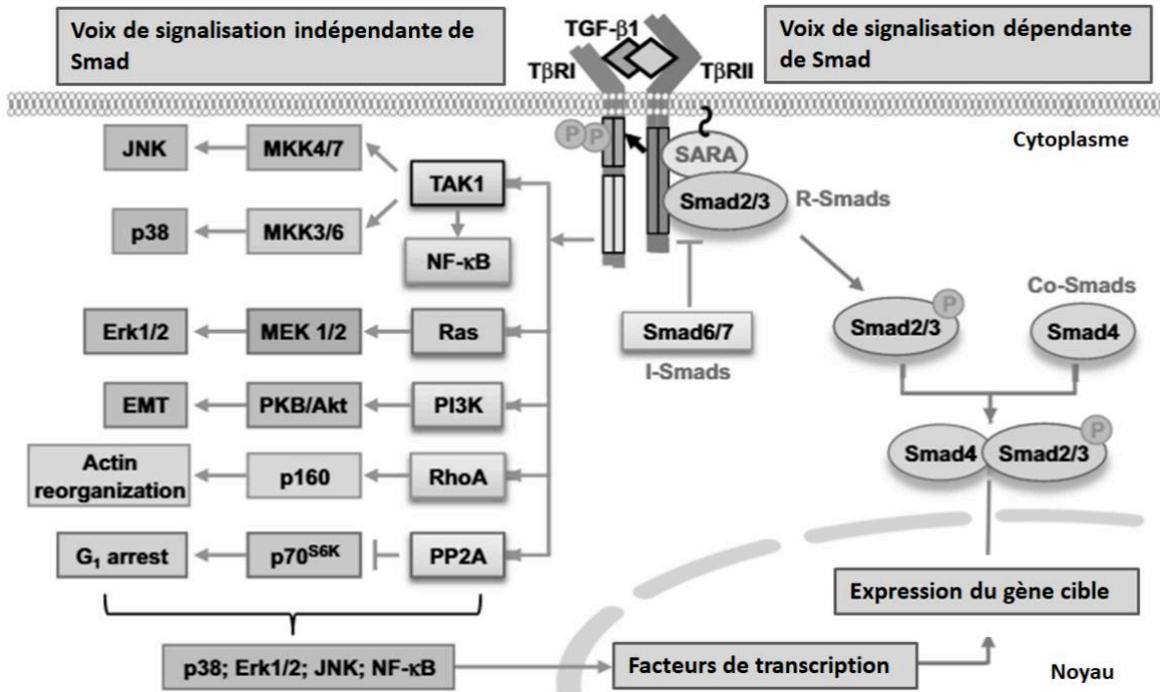
Chez un modèle de souris déficient pour Smad3, une augmentation du processus de cicatrisation et de la ré-épithélialisation de la peau ainsi qu'une diminution des effets de l'infiltration des monocytes est observée (Ashcroft et al., 1999).

Les effets du TGF- $\beta$  au niveau de la cornée sont variés et parfois contradictoires, les TGF- $\beta$ 1 et 2 inhibent la prolifération des CEC (cellule épithéliale de la cornée), mais le TGF- $\beta$ 1 stimule la prolifération des fibroblastes du stroma (Mishima et al., 1992; Kay et al., 1998; Pancholi et al., 1998; Yanai et al., 2006). Le TGF- $\beta$  stimule également la migration chimiotactique des cellules épithéliales, les fibroblastes et les cellules endothéliales dans un modèle in vitro de la chambre de Boyden mais il inhibe la migration des fibroblastes (kératocytes) dans le gel de collagène (Grant et al., 1992; Andresen et al., 1997). Le TGF- $\beta$  induit également l'activation et la transformation des myofibroblastes en kératocytes (Jester et al., 1996).

Carrington et coll. ont démontré que dans un modèle de cicatrisation en organo-culture de cornée, le TGF- $\beta$ 1 retarde le processus de ré-épithélialisation (Carrington et al., 2006).

Les effets du TGF- $\beta$  sont également très influencés par les autres facteurs de croissance dans le processus de ré-épithélialisation. Mishima et collègues ont montré que le TGF- $\beta$  est un antagoniste de la prolifération, de l'adhésion et de la migration des cellules épithéliales de la cornée induite par l'EGF (Mishima et al., 1992). Honma et coll. ont également montré que les TGF- $\beta$ 1 et 2 inhibent la prolifération des CEC induits par le KGF et l'HGF, et ont effet à diminuer la prolifération de ces cellules induites par l'EGF (Honma et al., 1997). Cependant le TGF- $\beta$  améliore la prolifération des kératocytes induits par l'EGF (Hongo et al., 1992).

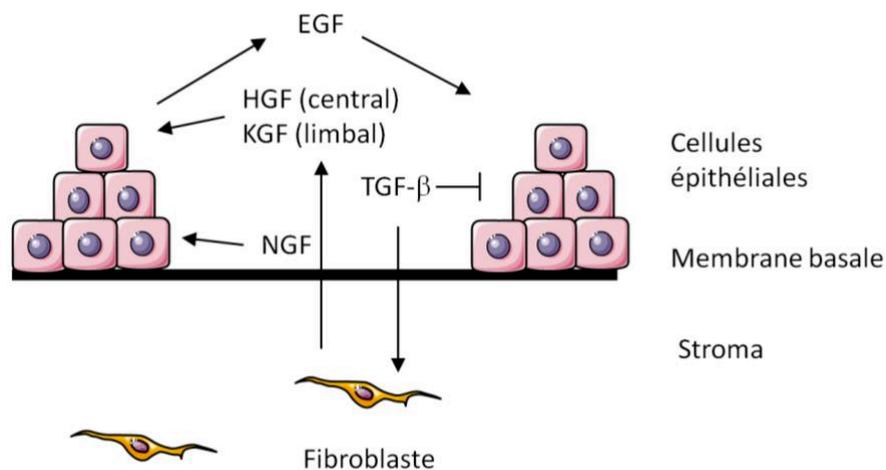
La membrane amniotique diminue le taux d'expression du TGF- $\beta$  ainsi que l'expression de son récepteur ce qui réduit le risque de fibrose, permettant d'avoir un tissu reconstitué et la production d'un tissu cicatriciel (Trelford et al., 1975).



**Figure 8 La voie de signalisation du TGF- $\beta$ Smad dépendante et indépendante.**

Initiation de l'activation de la cascade de signalisation après fixation du TGF- $\beta$  et la formation du dimère T $\beta$ RI et II. Le T $\beta$ RII phosphoryle les résidus sérine/thréonine du T $\beta$ RI. L'activation de du T $\beta$ RI active différentes voies de signalisation dépendante ou indépendante des Smads. La voie de signalisation dépendante des protéines Smad commence par la phosphorylation de Smad 2/3 par le T $\beta$ RI. Le recrutement de Smad2/3 au récepteur se fait à l'aide de protéines auxiliaires telle que SARA. Smad2/3 sont libérés et interagissent avec le co-Smad 4 et permettent ainsi la transmission du signal du TGF- $\beta$ . Le TGF- $\beta$  peut également activer d'autres voies de signalisation indépendante de Smad représentée dans ce schéma (Kim and Choi, 2012).

Les différents effets des facteurs de croissances cités sont résumés schématiquement ci-dessous (Figure 9).



**Figure 9 Un grand nombre de facteurs de croissance et de cytokine sont produits dans le processus de cicatrisation des cellules épithéliales de la cornée.**

Ces facteurs jouent un rôle primordial dans les interactions épithéliales-stromals et pour une cicatrisation complète. Le KGF et l'HGF sont produits par les kératocytes pour moduler les cellules épithéliales. Le NGF permet le renouvellement des cellules épithéliales. La famille des EGF et du TGF- $\beta$  régule l'épithélium, le stroma et communique avec plusieurs autres facteurs de croissance afin d'assurer le processus de ré-épithélialisation. Issu de (Yu et al., 2010) modifié.

### 5.2.2. Les Molécules de la matrice extracellulaire

La membrane amniotique en plus des différents facteurs de croissances cités qui lui confèrent une bonne capacité de cicatrisation, est également un très bon tissu de maintien. Ce tissu joue le rôle de matrice qui permet la croissance et la migration cellulaire.

#### 5.2.2.1. Le Collagène

Le collagène est un membre de la famille des protéines de structure. Il possède une masse moléculaire de 300 kDa et est présent sous forme de fibrilles dans la MEC dont il est l'un des principaux composants. Il existe 26 types de collagènes qui sont tous constitués d'une structure principale en triple hélice (Kerr, 2010). En fonction du type de tissu, os, tendon ou cartilage le collagène présent peut être plus ou moins rigide. Comme décrit précédemment le stroma et la membrane basale de la MAH sont en majorité composés de collagène. La composition en collagène de ces deux membranes est très proche.

Au niveau de la cornée la membrane basale ainsi que la membrane de Bowman sont des fines couches de collagène se situant directement entre la couche épithéliale de la cornée et le stroma. Elles sont principalement composées de collagènes de types IV, VII, XVII et XVIII pour la membrane basale et de collagènes de types I, III, V en majorité et VII en plus faible quantité pour la membrane de Bowman. Le stroma quant à lui est également un tissu

conjonctif riche en collagène de type I et est aussi composé des collagènes de types V, VI, XII, XIII, XIV et XXIV (Ihanamäki et al. 2004).

La membrane amniotique est essentiellement composée de collagènes de type I et de type V qui sont retrouvés ensemble et composent une fibrille hétérodimère (Birk et al., 1986; Birk, 2001). Elle comporte également les collagènes de types III, IV et VI (Niknejad et al., 2008).

Un des types de collagène retrouvé dans la membrane basale de l'épithélium cornéen et également dans la membrane amniotique est le collagène de type IV. Il est principalement composé de trimères d'hélice  $\alpha$ . La présence de la chaîne alpha  $\alpha$ 5 du collagène IV dans les membranes est un des facteurs améliorant la ré-épithélialisation cornéenne par la membrane amniotique (Endo et al., 2004). Cette structure proche et riche en collagène facilite la prolifération ainsi que la migration des cellules épithéliales de la cornée sur la MAH.

#### 5.2.2.2. L'Élastine

L'élastine également composante de la MEC est une protéine structurale moins rigide que le collagène. Elle donne des propriétés élastiques aux tissus. L'élastine est retrouvée en abondance dans la paroi des moyens et gros vaisseaux. Cette protéine est également retrouvée dans la membrane amniotique. Cependant dans un état physiologique normal l'élastine n'est pas exprimée dans la cornée (Rodriguez Cabello, 2018). Les effets de matrice à base d'élastine sur l'amélioration de la cicatrisation des brûlures du derme ont été prouvés. Toutefois il n'existe pas d'étude à notre connaissance sur l'éventuel rôle que l'élastine pourrait avoir sur la cicatrisation de la surface oculaire (Rnjak et al., 2011).

#### 5.2.2.3. Les Protéoglycanes

Les protéoglycanes sont des composants de la MEC. Ils sont constitués de protéines et de glycosaminoglycanes (polymère glucidique linéaire). En plus du rôle structurel dans l'organisation des fibrilles de collagène, ces molécules permettent la biodisponibilité des facteurs de croissance tels que le TGF- $\beta$  dans la matrice extra cellulaire. Ci-dessous quelques exemples des protéoglycanes présents dans la membrane amniotique sont cités :

#### 5.2.2.3.1. Le Lumicane

Le lumicane est une molécule présente de façon abondante dans le placenta et également au niveau du stroma de la membrane amniotique. C'est un protéoglycane de la famille des *small leucine-rich proteoglycan* (SLR) de 54 kDa. L'ajout de lumicane soluble favorise la prolifération et ainsi le processus de cicatrisation chez la souris (Yeh et al., 2005). Il est également supposé que le lumicane agit en aidant la présentation des cytokines à leurs récepteurs comme d'autres protéoglycanes tels que la fibromoduline, le biglycane et le bicorine le font avec le facteur de croissance TGF- $\beta$  (Yamaguchi et al., 1990; Ruoslahti and Yamaguchi, 1991). Yamanaka et coll. ont démontré que le lumicane se fixe directement sur le récepteur du TGF- $\beta$ 1 induisant la phosphorylation de ERK1/2 et Smad2 et 3 en culture de cellules épithéliales de cornée (Yamanaka et al., 2011). Le lumicane et la fibromoduline se fixent au même site sur le collagène de type I (Kalamajski and Oldberg, 2007). Il a également été démontré que l'altération du lumicane induit la dystrophie cornéenne maculaire (Praillet et al., 1998).

#### 5.2.2.3.2. Le Biglycane

Le biglycane est l'un des protéoglycanes de la membrane amniotique possédant une masse moléculaire d'environ 41,65 kDa et faisant partie de la famille des SLR. L'expression du biglycane est observée dans les cultures de kératocytes en transdifférentiation vers les myofibroblastes après traitement avec le TGF- $\beta$  (Funderburgh et al., 2001).

#### 5.2.2.3.3. Le Nidogène

Le nidogène est une glycoprotéine présente dans la membrane basale et le stroma de la membrane amniotique. Les nidogènes 1 et 2 permettent la liaison entre la laminine et le collagène de type IV au niveau de la membrane basale (Yurchenco, 2011). Il est pensé que pendant le processus de cicatrisation de la cornée les nidogènes 1 et 2 sont produits par les kératocytes dans le stroma proche de la membrane basale et de la membrane de Decemets (Medeiros et al., 2018; Gallego-Muñoz et al., 2019). Les deux nidogènes ont la même fonction et sont capables de se remplacer dans le processus de cicatrisation. L'apport de nidogène par la membrane amniotique peut être très

intéressant dans les cas où le stroma cornéen et donc les kératocytes sont touchés par la lésion.

#### 5.2.2.4. La laminine

La laminine est l'une des principales protéines de la MEC. Son poids moléculaire est entre 400 à 1000 kDa selon le type de laminine. Elle possède 3 chaînes alpha, beta et gamma. Dans la MEC de la membrane basale cette protéine est associée avec le collagène (collagène de type IV), le nidogène, l'agrine et le perlécan (Timpl and Brown, 1996; Aumailley et al., 2005; Ko and Marinkovich, 2010). La principale isoforme de la laminine au niveau de la cornée est la laminine 5 (LM3A32) et les laminines LM511, LM3A11 et LM3B32 sont retrouvés de façon minoritaire. Dans le processus de cicatrisation, la laminine est un substrat permettant aux cellules épithéliales de couvrir la blessure en formant une couche épithéliale intacte (Schittny and Yurchenco, 1990; Kariya et al., 2004; Hamill, 2009). La laminine semble la première protéine de la MEC à être produite dans le processus de cicatrisation (Kurpakus et al., 1990; Ryan et al., 1999).

La laminine est souvent associée à d'autres protéines telles que la nétrine. Chez la souris, au niveau de la cornée la nétrine-4 joue un rôle de régulateur de la prolifération des cellules épithéliales. Son absence montre une augmentation de la prolifération de ces cellules (Li et al., 2012). Il a également été observé que la nétrine-1 et son récepteur (UNC5B) augmentent l'expression de l'EGF et accélèrent le processus de ré-épithélialisation, ils ont également un rôle dans l'inhibition de la néovascularisation (Han et al., 2012).

Dans la membrane amniotique la laminine 5 est également un des composants majeurs de la membrane basale (Kurpakus-Wheater, 2001). Lors d'une greffe de la membrane amniotique, la laminine facilitera l'adhésion, la production d'hémidesmosome et la migration cellulaire (Carter et al., 1991; Baker et al., 1996; Giannelli et al., 1997). La laminine comporte un domaine ressemblant à l'EGF, par ce biais elle peut activer directement le l'EGFR et donc activer la prolifération cellulaire (Folkman et al., 1988).

#### 5.2.2.5. La Fibronectine

La fibronectine comme les autres protéines de la MEC est une grosse protéine d'environ 500 kDa. Elle est retrouvée sous forme de fibrilles dans la matrice extracellulaire (Poulouin et al., 1997). Elle peut se lier à la fois au collagène mais également interagir avec les intégrines.

Les intégrines sont des récepteurs d'adhésion cellulaire qui permettent l'attachement des cellules à la MEC et la transduction de signaux entre la MEC et les cellules.

Au niveau de la cornée la fibronectine est retrouvée dans la membrane basale de l'épithélium ainsi que dans la membrane de Descemet. En 1981, deux équipes ont montré la présence de cette protéine au niveau des lésions et sa disparition après le processus de cicatrisation chez le lapin (Fujikawa et al., 1981; Suda et al., 1981). Au cours du processus de cicatrisation, la fibronectine retrouvée au niveau du stroma permet la fabrication d'une MEC temporaire afin de faciliter la migration des cellules épithéliales et la formation des différentes couches de l'épithélium.

Il a été montré *in vitro* que la production des fibronectines se fait par les trois types cellulaires de la cornée (Awata et al., 1989). La production de fibronectine est stimulée par l'EGF. Cependant dans l'organo culture de cornée de rat l'ajout de fibronectine n'améliore pas la capacité de ré-épithélialisation de cornée induite par l'EGF. Les auteurs ont donc conclu que le rôle principal de la fibronectine est l'augmentation de l'adhésion cellulaire au substrat de la MEC (Soong et al., 1989; Sawicka et al., 2015). Dans une autre étude Kim et collaborateurs ont montré l'efficacité de traitement avec la fibronectine chez 9 patients qui ne répondent pas à la thérapie habituelle (Kim et al., 1990).

### 5.2.3.L'Utilisation clinique de la membrane amniotique

Le premier cas d'utilisation de la membrane amniotique en clinique a concerné le traitement des brûlures cutanées par Davis en 1910. Dans sa publication il rapporte avoir utilisé la « doublure interne de la poche amniotique » pour une greffe de peau mais sans résultat convaincant. Cependant il dit également que « le matériel est intéressant et si une technique donnant des résultats favorables est développée, il peut être d'une grande utilité » (Davis, 1910). La membrane amniotique a été utilisée pour la première fois en ophtalmologie en 1940. De Röth a utilisé le chorion ainsi que la membrane amniotique chez 10 patients dont 8 ayant un symblépharon avec un taux de réussite de 1/10 (Rötth, 1940). Le patient ayant donné un résultat satisfaisant souffrait d'une brûlure chimique et avait reçu une greffe de la membrane amniotique. Par la suite, il a pu proposer l'utilisation de la membrane amniotique comme un traitement des dommages du tissu conjonctif. Ainsi en 1946 la membrane amniotique a été utilisée avec succès chez 58 patients souffrant de brûlure chimique (Sorsby and Symons, 1946). Malgré son efficacité, les publications

concernant l'utilisation de la membrane amniotique dans les greffes oculaires ont été laissées à l'abandon jusqu'au début des années 1990. En 1995, Kim et Tseng ont réintroduit son utilisation, d'abord comme substrat dans la reconstruction du limbe chez le lapin, puis chez l'homme dans le traitement de déficiences épithéliales réfractaires ainsi que dans la reconstruction de la surface conjonctivale (Kim and Tseng, 1995a). En 1997, Shimazaki et Tsubota ont évalué chez l'homme son utilisation dans le traitement des brûlures cornéennes (Shimazaki et al., 1997). Depuis, la GAM suscite un intérêt grandissant et est utilisée par de nombreuses équipes qui continuent à l'employer pour des pathologies de la surface oculaire.

Outre l'ophtalmologie et la dermatologie, les différentes propriétés de la membrane amniotique ont suscité un grand intérêt pour son utilisation dans d'autres domaines. Récemment, son utilité a également été démontrée dans la régénération dentaire (Kumar et al., 2017). L'aspect anti-inflammatoire et anti-fibrotique de la membrane amniotique a également été constaté par son utilisation comme patch au niveau clinique dans les pathologies cardiaques. La membrane amniotique est une bonne matrice pour la culture des cellules pluripotentes dérivées des cardiomyocytes (Parveen, 2019).

#### 5.2.4. La Greffe de la membrane amniotique en ophtalmologie

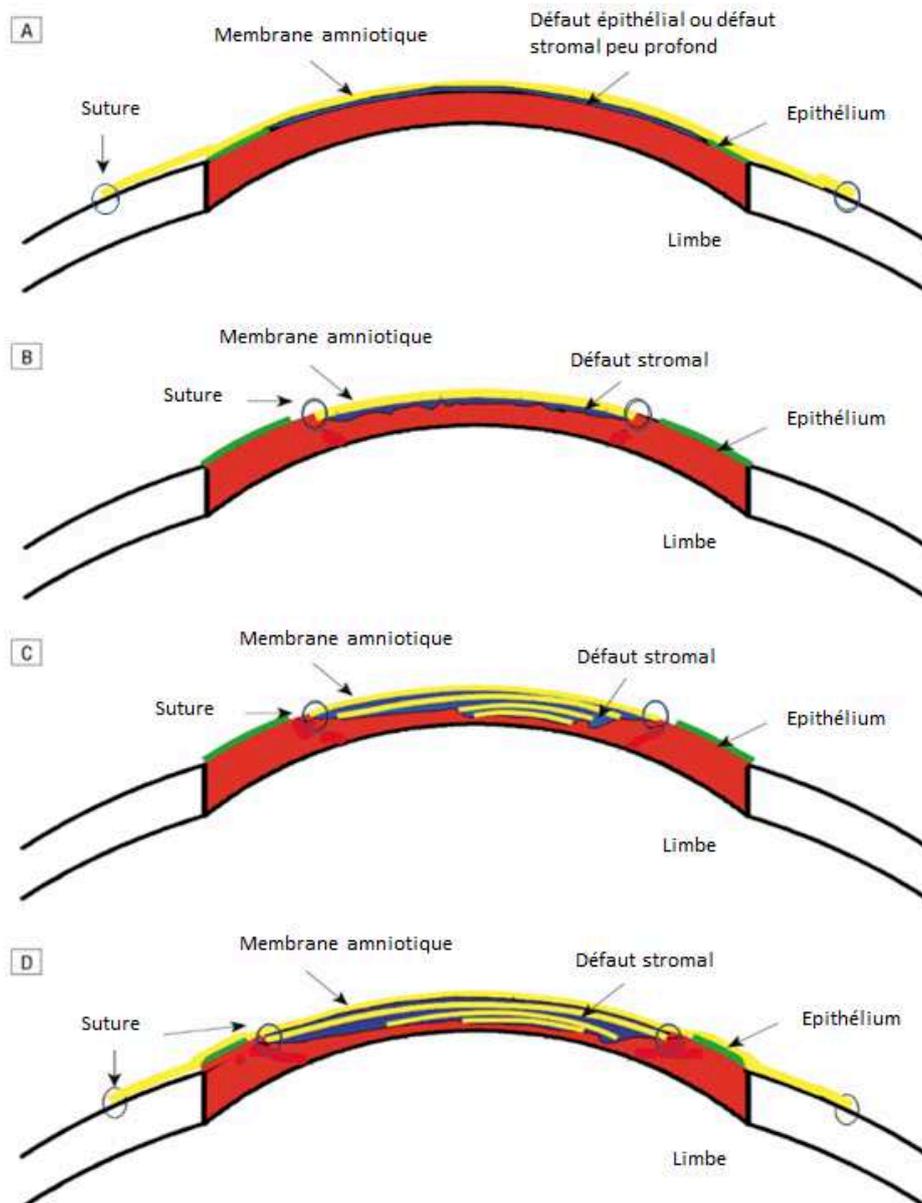
La GAM est une intervention de la surface oculaire. Grâce aux propriétés décrites précédemment les risques de rejet de la GAM sont extrêmement faibles. La MAH est utilisée seule ou en complément avec l'allogreffe de limbe dans les cas de destructions et ou de déficiences importantes (Tseng et al., 1998). Suivant les indications, la MAH peut être utilisée en greffe ou en patch.

Dans le premier cas, elle est suturée coté épithélium vers l'extérieur. En effet sa membrane basale est un substrat qui permet la ré-épithélialisation, le renforcement de l'adhésion et la différenciation des cellules épithéliales de la cornée. Dans ce cas la greffe ne dépasse pas la limite du limbe sclérocornéen (Masson, 2019).

Dans le deuxième cas (patch), la MAH est suturée côté épithélium vers l'intérieur de façon à délivrer les facteurs biologiques importants dans la cicatrisation. Dans ce cas elle recouvre en totalité la cornée pathologique en jouant à la fois un rôle de pansement biologique et également ayant un effet antalgique (Masson, 2019).

La MAH peut être également utilisée pour combler des ulcères profonds en apposant plusieurs couches les unes sur les autres dont la plus superficielle est suturée face épithéliale

vers l'extérieur. Elle peut également être utilisée pour combler une perte de substance conjonctivale. La taille de la greffe est adaptée à la taille du déficit ex : « déficits conjonctivaux après brûlures », (Figure 10).



**Figure 10 Différentes méthodes de greffe de la membrane amniotique.**

La membrane amniotique est placée épithélium vers le haut. A) Patch onlay ; utilisé pour les défauts de l'épithélium ou les défauts peu profonds du stroma. La membrane est suturée du limbe au limbe. La couche épithéliale cornéenne doit coloniser la surface oculaire. B) greffe inlay monocouche, utilisée dans les défauts peu profonds du stroma. Suté en périphérie de l'ulcère. La couche épithéliale de la cornée a été retirée avant la greffe, elle épithélialisera la surface de la cornée. La membrane amniotique joue le rôle de la membrane basale. C) Greffe inlay multicouche, utilisée pour des défauts profonds du stroma. Des bouts plus petits de la membrane amniotique sont placés en multicouche afin de remplir les profondeurs de l'ulcère. Ils sont suturés, puis une membrane amniotique plus large est placée au-dessus et suturée à la périphérie de l'ulcère. La cornée a été dé-épithéalisée avant la greffe afin que les cellules épithéliales re-colonisent la surface cornéenne et non sous la greffe. D) Greffe sandwich, constituée d'une ou plusieurs greffes de membrane amniotique, utilisée pour l'ulcère avec un épithélium non stable ou les kératopathies bulleuses ulcérantes ou les kératouveites ulcérantes avec une décompensation endothéliale complète ou une infiltration stromale. L'épithélium retiré avant la greffe sera remplacé par la ré-épithélialisation de la surface oculaire grâce à la membrane amniotique. Issu de (Seitz et al, 2006) modifié.

La ré-épithélialisation de la membrane amniotique par les cellules épithéliales de la cornée mais également de la conjonctive se fait plus facilement sur la membrane basale mais elle peut également se faire sur le stroma (Hu et al., 2003).

La GAM a également démontré son efficacité égale sur le temps et la qualité de ré-épithélialisation de la cornée dans les kératopathies infectieuses ou non infectieuse due à ses propriétés de promotion de la ré-épithélialisation et également ses propriétés anti-infectieuses (Tracogna, 2016).

Les différentes techniques d'application de la MAH peuvent être combinées les unes aux autres en fonction de l'état oculaire.

A ce jour, la plupart des causes d'ulcère cornéen sont les ulcères cornéens trophiques (perforés ou non), les brûlures chimiques, la décompensation cornéenne bulleuse, les kératoconjunctivites sèches très sévères avec défaut épithéliaux persistants, les insuffisances de cellules limbiques et les pathologies conjonctivales telles que les tumeurs limbiques et conjonctivales, les symblépharons cicatriciels de pemphigoïdes oculaires et les ptérygions sont des indications à la GAM.

Les cas d'échec de GAM sont extrêmement rares. Le patient greffé avec une MAH lyophilisée peut montrer une réaction qui se traduit par une gêne au niveau de la vue et également une sensation de présence de corps étranger superficiel dans l'œil. Dans les cas les plus graves, l'échec peut se traduire par une infiltration au niveau de la périphérie de la cornée, une hyperhémie conjonctivale, un œdème des paupières, une augmentation de la pression intra oculaire et des douleurs insupportables. Chez les patients avec un échec de la MAH congelée le rejet dû à une épithéliopathie est plus diffuse. Ces symptômes peuvent apparaître que quelques heures après la greffe (Vance). L'incapacité de la membrane amniotique à induire la ré-épithélialisation dans des cas de brûlure chimique très sévère a également été reportée (Joseph et al., 2001).

## **6. Étude I Lyophilisation de la membrane amniotique**

### **6.1. Introduction aux méthodes de conservation de la membrane amniotique humaine.**

Les premières tentatives de conservation de la membrane amniotique pour une application dans les lésions assez larges ont été la conservation de la membrane amniotique dans du pétrole ou dans du sel. Le temps de conservation était court et la greffe devait être

réalisée dans les 48 à 72 h post prélèvement (Stern, 1913). Depuis, d'autres méthodes de conservation de la membrane amniotique ont été mises en place. La congélation, méthode la plus répandue et plus récemment la lyophilisation.

### 6.1.1. La Congélation

La congélation est une méthode connue de longue date et très largement répandue pour la conservation des produits alimentaires ou des produits plus complexes à usage pharmaceutique ou de biothérapie (des biomatériaux). Cette méthode bien que facile pour une conservation et une utilisation dans le même lieu des biomatériaux, tels que les hôpitaux ayant une banque de tissus à proximité, nécessite une organisation assez complexe quand il s'agit de transporter ce type de produits vers d'autres centres. Afin de garder la chaîne du froid intacte et donc de conserver la qualité du produit, ces biomatériaux doivent être gardés à la même température tout le long du trajet. Une fois arrivés dans le centre receveur, les biomatériaux doivent être stockés de suite et dans les mêmes conditions que le centre donneur. La stabilité des produits dépendra du maintien de la chaîne du froid. Pour les transports de produits biologiques avec un risque moindre et dans des parcours courts des bacs isothermes sont généralement utilisés, mais cela n'est pas applicable aux produits moins stables et au cours de trajets plus longs (quelques heures).

Il existe actuellement deux méthodes de conservation par congélation à  $-80^{\circ}\text{C}$  afin de garder les lots de membranes pendant 6 mois ou à  $-20^{\circ}\text{C}$  pour une conservation de 6 semaines (Ashraf et al., 2015). A la banque de tissus de Rouen (comme au sein de la plupart des banques de tissus en France) les membranes sont conservées à  $-80^{\circ}\text{C}$  dans un rapport de 1:1 de milieu de culture et de glycérol (cryoprotecteur) pendant un an. L'utilisation de cryoprotecteur permet le maintien de la structure et également des facteurs de croissance. Le cryoprotecteur minimise la formation des cristaux de glace et permet donc de diminuer l'altération de la structure de la membrane amniotique (Thomasen et al., 2011). Wagner et collaborateur ont montré qu'une conservation sans ajout de conservateur n'altère pas plus la structure de la membrane amniotique congelée qu'avec l'ajout du glycérol. Le taux de FGF est également sans différence entre les deux méthodes pour une conservation à 1 et 6 mois. Cependant ce taux est plus fort dans les MAH conservées avec du milieu glycérolé à 3 mois (Wagner et al., 2018).

Bien que cette méthode de conservation de la membrane ait montré ses résultats au niveau clinique, les contraintes pour son transport et sa conservation détaillées dans le paragraphe précédent sont multiples et onéreuses. Pour cela une alternative à la cryopréservation de la membrane amniotique a commencé à voir le jour, la lyophilisation.

### 6.1.2. La Lyophilisation

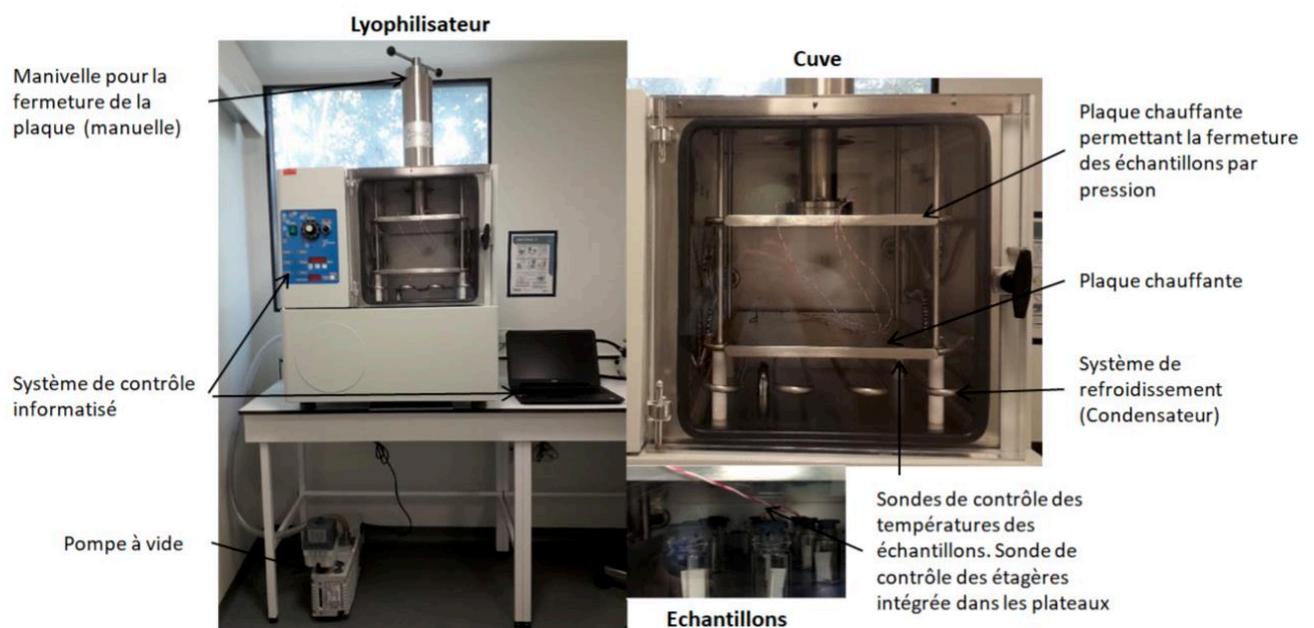
La lyophilisation, également retrouvée sous le terme anglais freeze-drying, est une méthode de préservation par sublimation d'eau ou d'autres solvants. Cette méthode de conservation est connue depuis la préhistoire, les Eskimos l'utilisaient pour la préservation du poisson qui par déshydratation dans les températures très basses de l'arctique pouvait être conservé. Entre 1250 et 850 av J.-C. les Incas avaient remarqué qu'en déposant leur récoltes telles que les pommes de terre au-dessus du Machu Pichu ils pouvaient les conserver. Cela s'explique par les températures et la pression de l'air tellement basses à cette hauteur qui permet à l'eau de s'évaporer et de conserver ainsi les récoltes par lyophilisation. Tout au long de l'histoire humaine cette méthode de conservation avait également été utilisée par d'autres peuples tels que les vikings, les peuples sud-américains vivant dans les Cordillères des Andes et les Monks vivant sur le Koya (montagne sacrée dans le bouddhisme) au Japon (Varshney and Singh, 2015).

Plus récemment, en 1935 le procédé de lyophilisation a également été mis en place par Flosdorf et Mudd pour un stockage à long terme du plasma sanguin (Flosdorf and Mudd, 1935). Cependant le terme lyophilisation tel qu'on le connaît actuellement est utilisé grâce au travail de Rey en 1976. Rey caractérise un produit déshydraté ayant la capacité d'absorption rapide d'un solvant (Rey, 1976). De nos jours cette méthode peut s'appliquer en pharmacologie pour la conservation des substances fragiles en solution aqueuse (principalement des échantillons d'origine biologique) afin d'obtenir une stabilité chimique, une conservation de la structure et de la qualité des tissus animaux et est également très utilisée dans le domaine de l'agroalimentaire. Les avantages de cette méthode de conservation sont multiples car elle permet une facilitation du transport, du stockage et une praticité d'utilisation.

A ce jour les lyophilisateurs existent en plusieurs tailles. Les lyophilisateurs de paillasse sont le plus souvent utilisés dans les laboratoires de recherche et les lyophilisateurs plus grands pouvant atteindre plusieurs mètres carrés sont retrouvés majoritairement dans

l'industrie. Cependant leur principe reste le même, en résumé un lyophilisateur est composé de (figure 11) :

- Une cuve comportant des étagères pour déposer les échantillons.
- Un système de refroidissement ou frigorifique qui est en circuit fermé. Le condensateur dans ce système transforme la vapeur d'eau à son contact en glace afin de garder une pression optimale. Cela est nécessaire pour que le processus de sublimation se fasse de façon efficace.
- Une pompe à vide qui permet l'évacuation des molécules d'air de la cuve.
- Un système de contrôle afin d'afficher la température du produit, des plateaux et également la pression dans la cuve. Il permet de prévenir l'utilisateur du bon fonctionnement du cycle de lyophilisation.



**Figure 11 Schéma de notre lyophilisateur se trouvant à la banque de tissus du CHU de Rouen.**

Ce lyophilisateur est composé d'une pompe à vide et de systèmes de contrôle d'une cuve. A l'intérieur de la cuve sont retrouvés les deux plateaux chauffants avec un système de caloporteur (huile) et une sonde de température intégrée. La plaque chauffante du dessus est amovible afin de réaliser le bouchage des échantillons en tournant la manivelle. Le condensateur permet la cristallisation des molécules d'eau à sa surface.

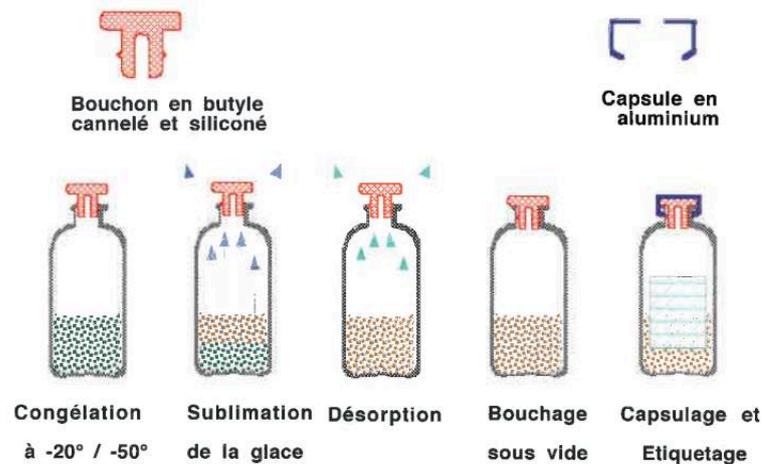
Le cycle de lyophilisation se réalise de façon générale en 3 phases : une congélation, une sublimation (dessiccation primaire) et une désorption (dessiccation secondaire) (Figure 12). Pour ce faire les échantillons sont placés à l'intérieur des flacons dans un environnement stérile, par exemple sous PSM et sont transférés au lyophilisateur. Le cycle de lyophilisation peut commencer :

- Congélation : La congélation est la première étape du cycle de lyophilisation. Elle consiste à une diminution de la température de la cage du lyophilisateur à une vitesse de 1 à 10°C par minute. A cette étape les échantillons passent d'abord par une phase de cristallisation de l'eau dite libre. La température finale de la phase de congélation est entre -20°C et -80°C selon le type d'échantillon. A ce stade des cristaux de glace se forment et une augmentation de la température du produit est observée. Cette première phase est la phase la plus dure à mettre en place. Les paramètres de température utilisés sont très variables selon la nature de l'échantillon, cela peut varier en rapport avec le taux d'eau (ou de solvant) du produit. La température et le temps de congélation de cette étape sont déterminants pour l'aspect du produit final. La phase de congélation doit être assez rapide afin de limiter la formation de gros cristaux de glace qui peuvent laisser des espaces trop grands et fragiliser la structure du produit après la déshydratation finale.

- Sublimation : La sublimation est la première étape de déshydratation. Cette étape se fait par l'induction d'une chaleur constante aux échantillons grâce à l'étagère chauffante. L'augmentation de la température des étagères se fait par la circulation de liquide caloporteur au sein de celles-ci. Cette étape permet la sublimation de la glace créée dans l'étape de congélation. Pendant la phase de sublimation, le piégeage des molécules d'eau ainsi que leur évacuation par la pompe doit se faire au fur et à mesure afin de garder une pression basse dans l'enceinte de la cuve du lyophilisateur. La différence de température des échantillons et du piège est également importante dans ce procédé. Le piège doit être à une température plus basse que l'échantillon pour que la tension de vapeur (la pression des molécules d'eau) au-dessus de l'échantillon soit plus forte que la pression des molécules d'eau de l'atmosphère environnant l'échantillon. Cela facilite fortement l'évaporation des cristaux de glace.

- Désorption : L'étape de désorption est la deuxième étape de déshydratation. A ce stade l'eau résiduelle liée avec l'échantillon est réduite au minimum afin de permettre une préservation longue de la membrane. Cette deuxième phase de déshydratation est nécessaire car certains cristaux de glace formés dans les régions plus basses de l'échantillon peuvent être piégés en traversant les couches plus hautes. Cette dernière phase doit se faire à des températures plus élevées que la déshydratation primaire mais qui maintiennent la stabilité du produit. Au final, le flacon comportant l'échantillon est bouché sous vide et prêt au capsulage et à l'étiquetage.

Enfin et après le capsulage et l'étiquetage de l'échantillon, les lyophilisats peuvent être conservés à température ambiante (Pisano et al., 2010).



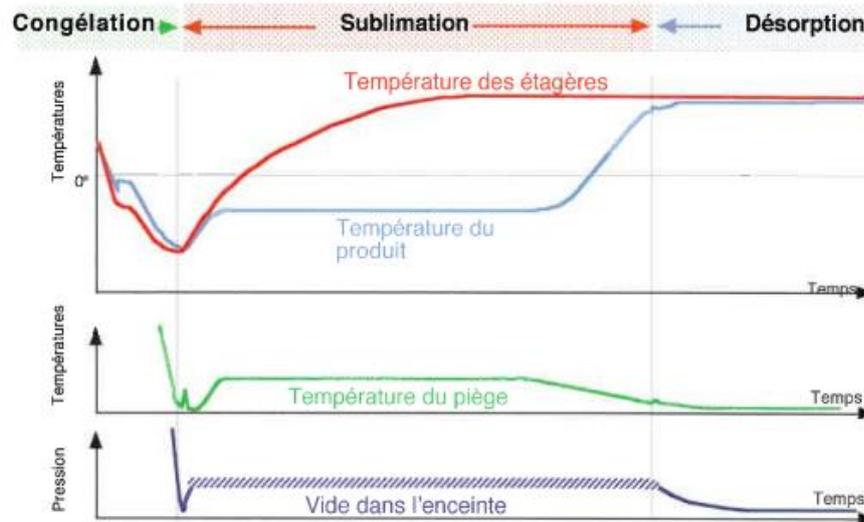
**Figure 12 Étapes de lyophilisation.**

Le cycle de lyophilisation comporte une étape de congélation de l'eau ou du solvant suivie par une sublimation et une désorption afin d'enlever l'eau résiduelle. Les flacons comportant les échantillons sont fermés sous vide. Les échantillons sont sortis de la cuve de lyophilisation et étiquetés.

Le cycle complet de lyophilisation peut durer de quelques heures (8h) à plusieurs jours. Il est représenté sous forme de courbe sur laquelle les différents paramètres importants dans la lyophilisation sont montrés, (Figure 13) :

- Température du produit et de l'étagère
- Température du piège
- Pression à l'intérieure de la cuve

Les différentes phases de lyophilisation ainsi que les courbes représentées sont communes quelle que soit la nature de l'échantillon. L'aspect de la courbe reflète la qualité du cycle complet de lyophilisation.



**Figure 13** Courbe caractéristique de la lyophilisation.

La courbe de lyophilisation représente les températures des étagères, du produit et du piège et de la pression dans la cuve. Cette courbe de lyophilisation est caractérisée par une descente en température au moment de la congélation et une augmentation de celle-ci représentée par un petit pic au niveau de l'échantillon. Ce pic représente l'augmentation naturelle de la température au sein de l'échantillon après la congélation. Ce phénomène est observé dans tous les types d'échantillons. Par la suite les deux phases de dessiccation sont observées par une augmentation de la température de l'étagère durant la première phase de déshydratation, une augmentation de la température de l'échantillon observé à la suite de la première déshydratation et une diminution de la pression pour une déshydratation complète à la deuxième phase de déshydratation. Ces différents paramètres sont importants pour une lyophilisation optimale. (Floc'h, 2011)

La mise en place des méthodes de lyophilisation de la membrane amniotique afin qu'elle puisse garder les mêmes propriétés que la membrane congelée a intéressé de nombreuses équipes de recherche. Rodriguez-Ares et coll. ont montré que la structure de la membrane basale de la membrane amniotique lyophilisée qui est un facteur important dans le processus de cicatrisation n'était pas altérée par la lyophilisation. Cependant le taux de facteurs de croissance important dans la cicatrisation avait beaucoup diminué dans les membranes lyophilisées par rapport aux congelées (Rodríguez-Ares et al., 2009). Cette diminution du taux de facteurs de croissance est également observée par d'autres groupes (López-Valladares et al., 2010). Cependant Allen et collègues ont démontré qu'avec l'utilisation de lyoprotecteur la diminution du taux de ces facteurs est évitable dans les membranes lyophilisées, mais que la structure de ces membranes pouvait être altérée (Allen et al., 2013).

Tous ces résultats confirment que la méthode de lyophilisation de la membrane amniotique nécessite une amélioration, mais que son utilisation reste bénéfique dans la cicatrisation de la surface cornéenne et est également intéressante au niveau économique.

## 7. Étude II Mapping de la membrane amniotique

La membrane amniotique est un tissu avec des propriétés très intéressantes dans le domaine de la cicatrisation. Les membranes amniotiques utilisées dans les greffes de la surface oculaire sont issues de placentas de donneurs sains. Ces placentas sont collectés et traités par antibiotique au sein des banques de tissus. Les donneurs sélectionnés sont séronégatifs (pour le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), de l'Hépatite B, de l'Hépatite C et de la Syphilis) et sans pathologie liée au placenta. Cependant aucun test n'est réalisé sur la qualité et la teneur en facteurs de croissance de ces membranes collectées. Comme expliqué plus haut, les facteurs de croissance présents dans la membrane amniotique jouent un rôle très important dans le processus de cicatrisation. Différentes études ont montré une variation de l'expression de l'EGF et du TGF- $\beta$  entre différents donneurs et également entre les différentes zones de la membrane amniotique (Hopkinson et al., 2006; Gicquel et al., 2009). Dans notre étude, nous avons analysé le taux des facteurs de croissance d'intérêt (HGF, EGF, KGF, NGF, TGF- $\beta$ ) dans différentes membranes amniotiques issues de placenta après césarienne ou accouchement par voie basse. Nous nous sommes également intéressés à l'analyse de la probable variation en teneur de ces facteurs au sein du même placenta.

De façon conventionnelle en France les membranes préparées pour la greffe sont dénudées de leur couche spongieuse (couche présente entre l'amnios et le chorion). Hopkinson et coll. ont également observé une variation du taux de TGF- $\beta$  selon la méthode de préparation de la membrane qui permettait de garder ou non la couche spongieuse. Dans cette étude, nous avons regardé si cette variation est également observée avec les autres facteurs de croissance.

Les résultats de cette étude sont présentés sous forme d'article dans la partie résultats.

## 8. Étude III Matrice de collagène

La recherche de nouveaux implants artificiels est depuis longtemps un sujet d'étude, que cela soit pour une utilisation chez la cornée ou d'autres parties du corps. La première publication concernant la possibilité de remplacer une cornée malade remonte au 18<sup>ème</sup> siècle par Pellier De Quengsy. Il publia dans un ouvrage « Précis ou Cours d'Opération sur la Chirurgie des Yeux » la possibilité de remplacer la cornée par une cornée artificielle faite à

partir de verre entouré d'un anneau d'argent puis suturée à la sclère avec des fils de cotons. Par la suite, d'autres modèles d'implants ont été réalisés qui étaient pour la plus part des matériaux inertes et rigides entraînant une inflammation post opératoire. Ces matériaux ne permettaient pas une hydratation et un apport suffisant en nutriments ainsi qu'en oxygène.

A ce jour de nouveaux implants sont commercialisés qui donnent de bons résultats. Les kératoprothèses font partie des premières générations de cornée artificielle qui ont montré leur bienfait au niveau clinique (Griffith et al., 2002; Hicks et al., 2002). Ces prothèses sont des biomatériaux tels que la Boston KPro issu du tissu conjonctif ou que l'osteo-odonto-keratoprothesis (OOKP) issu de l'os ou de la dent (Gomaa et al., 2010; Colby and Koo, 2011). La Boston KPro est la prothèse la plus utilisée mondialement. D'autres implants à base de collagène incorporant un antibiotique, la vancomycine, ont été testés chez le lapin avec une keratitis bactérienne, *staphylococcus aureus* (Riau, 2016). L'utilisation des peptides antimicrobiens (AMPs) dans les implants a également montré une efficacité anti-infectieuse. Contrairement à l'antibiotique ces peptides entraînent un risque de développer des résistances microbiennes (Tan et al., 2014).

Le collagène par sa présence en grande majorité dans le tissu cornéen est un très bon candidat pour une greffe d'implant. Zieske et coll. ont représenté les différents types de collagènes dans le tableau 3.

**Tableau 3** Résumé de l'emplacement et du type de collagènes retrouvés dans les différentes couches de la cornée.

Component	Localization
Collagen I	Collagen fibrils
Collagen II	Primary corneal stroma <sup>†</sup>
Collagen III	Corneal scars
Collagen IV	Basement membrane
Collagen V	Collagen fibrils
Collagen VI	Stromal beaded filaments
Collagen VII	Anchoring fibrils
Collagen VIII	Descemet membrane
Collagen IX	Primary corneal stroma <sup>†</sup>
Collagen XII	Fibril associated
Collagen XIII	Posterior stroma
Collagen XIV	Fibril associated <sup>†</sup>
Collagen XVII	Hemidesmosomes

(Zieske).

Cette protéine est naturellement présente dans la MEC de la cornée, La transparence et la facilité d'accès à ce matériel sont des points positifs à son utilisation. Le collagène peut être directement obtenu *in vivo* ou bien être complètement synthétisé *in vitro*. Certaines équipes ont obtenu un stroma stratifié par la superposition de matrice extracellulaire produite par les fibroblastes en culture (Proulx et al., 2010). Dans certaines étude, le collagène est également lié à une molécule anti-inflammatoire afin d'éviter le rejet des biomatériaux tels que 2-méthacryloyloxyethylphosphorycholine, MPC (Jangamreddy et al., 2019). Le collagène de type I est non-immunogène et est un très bon candidat pour la réalisation de ce type d'implant car est présent en grande quantité dans le stroma cornéen. Dans notre étude *in vivo* de biocompatibilité, en collaboration avec le docteur Gervaise Mosser à l'université Paris 6 et la satt lutech, nous avons utilisé une matrice de collagène I non couplée à d'autres molécules. Différentes concentrations de collagènes ont été testées. La concentration de collagènes doit être de telle manière que la matrice reste transparente et assez rigide mais pour autant facilement manipulable pour une transplantation réussie au niveau de la cornée. La concentration de cette matrice est également un facteur très important dans le sens où une fois implantée elle puisse être colonisée par les cellules de la cornée de l'hôte et idéalement être dégradée et remplacée par la MEC naturelle de la cornée sécrétée par les fibroblastes.



## **II. OBJECTIFS**

La membrane amniotique est un bio matériel connu depuis longtemps et utilisée pour son efficacité dans le processus de cicatrisation. Dans le cadre de ce travail, l'objectif principal est la validation de l'usage clinique des Membranes Amniotiques Humaines lyophilisées (MAHL) à la banque de tissus du CHU de Rouen pouvant répondre à un besoin humanitaire (collaboration avec ophtalmo sans frontière).

L'utilisation de MAHL en thérapie tissulaire implique une caractérisation de ces membranes.

- 1- Analyser les propriétés physicochimiques et biologiques des MAHL par deux approches : l'une structurale et l'autre protéomique sont réalisées.
  - a. Protéomique : une méthode ciblée, la méthode ELISA, par le dosage des facteurs de croissance et une méthode globale de dosage protéique, label-free.
  - b. Structurel : Une analyse histologique par coloration HES et une analyse plus précise de la structure de la membrane basale et du stroma par microscopie électronique des membranes amniotiques est réalisée.
- 2- Évaluer la capacité des MAHL à promouvoir l'épithélialisation par des cellules cornéennes humaines isolées :
  - a. Caractériser les cellules épithéliales cornéennes isolées sur le plan phénotypique (immunofluorescence) et transcriptionnelle (RT-PCR).
  - b. Évaluer la ré-épithélialisation des MAHL dénudées par des cellules épithéliales de cornée in vitro.

Le deuxième objectif étant d'obtenir une cartographie de l'expression des facteurs de croissance d'intérêt de la membrane amniotique (Mapping) et également de la couche spongieuse existant entre l'amnios et le chorion.

- Un dosage de facteurs de croissance d'intérêt dans les membranes amniotiques fraîches issues de césarienne et voie basse par ELISA est réalisé.

Dans le cadre d'une collaboration avec le Docteur Gervaise Mosser de l'université Pierre et Marie Curie et la Satt Lutech, l'analyse in vivo de la biocompatibilité d'une matrice de collagène I est réalisée.

- Des implantations Inlay et Onlay ont été réalisées avec cette matrice au niveau de la cornée des lapins.



### **III. RESULTATS**

# 1. Étude I LYOPHILISATION DE LA MEMBRANE AMNIOTIQUE

## 1.1. MATERIELS ET METHODES

### 1.1.1. Prélèvement de la membrane amniotique Humaine (MAH)

Le placenta a été prélevé après l'accord de la mère, au cours d'une césarienne programmée. Il a été décontaminé 24 à 48 heures dans du tampon phosphate saline (PBS) comportant 0.2 µg/mL de pénicilline et d'amoxicilline. Avant la manipulation le placenta a été rincé avec du PBS, puis étalé sur une coupole de 200 mm de diamètre. La MAH a été clivée du placenta et découpée en 20 à 30 carrés d'environ 3 cm<sup>2</sup> puis appliquée face stroma contre un support de nitrocellulose. Les membranes découpées ont ensuite été conservées soit par congélation (méthode standard utilisée en clinique) soit par lyophilisation (méthode en cours de développement).

Ces MAH ont été mises en quarantaine dans l'attente des résultats des analyses de sérologies (recherche du virus de l'immunodéficience humaine-VIH, du virus de l'hépatite C, du virus de l'hépatite B et de la Syphilis), des contrôles microbiologiques (bactériologiques et fongiques) et de l'analyse histologique. L'ensemble des résultats négatifs permettent la validation de l'utilisation en clinique du lot de membranes amniotiques.

### 1.1.2. Conservation de la membrane amniotique humaine (MAH)

#### 1.1.2.1. Cryoconservation

Les MAH ont été congelées dans un milieu contenant du Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) [Gibco], du glycérol [Panpharma], de la pénicilline 50µg/ml [Panpharma], de l'amikacyne 50 µg/ml [Mylan], de la gentamycine 100 µg/ml [Panpharma], de l'amphotéricine B 2,5 µg/ml [Bristol-Myers] et de l'amoxicilline [Panpharma] puis placées à -80°C.

#### 1.1.2.2. Lyophilisation

Les échantillons de MAH ont été placés dans la chambre étanche du lyophilisateur [Cryotec] sur le plateau dans lequel circule le liquide caloporteur afin d'amener les échantillons aux températures nécessaires aux différentes étapes de lyophilisation. La recette de lyophilisation a été entrée dans l'outil informatique, la procédure de lyophilisation a été mise en route et a pu être suivie en temps réel. Une fois le cycle de lyophilisation fini,

les contenants des échantillons ont été mis sous vide et fermés manuellement directement dans la cuve du lyophilisateur grâce à la manivelle prévue à cet effet (voir figure 11).

### 1.1.3. Analyse protéomique de la MAH

#### 1.1.3.1. Extraction Protéique

Les MAH C ont été décongelées à température ambiante pendant 20 minutes. Puis les MAH C décongelées et les MAH L ont été placées dans 5 mL de PBS [Gibco] pendant 10 minutes avec un changement de bain de PBS au bout des 5 premières minutes. Les membranes de nitrocellulose ont été retirées pour chacune des conditions testées et les surplus de PBS ont été éliminés par une centrifugation de 2 minutes à 800 g à température ambiante. Les MAH ont ensuite été pesées. Par la suite chaque échantillon a été placé dans 0,5 mL de tampon RIPA (Radioimmunoprecipitation assay buffer) [Sigma] contenant des inhibiteurs de protéases et de phosphatases [Thermo scientifique]. La dilacération du tissu a été effectuée à l'aide de billes de silice [Precellys®] avec l'appareil Precellys 24 [Bertin] : 4 à 5 cycles de 6000 tours pendant 30 secondes. Entre chaque tour les échantillons ont été placés dans de la glace afin de décanter la mousse produite par l'agitation. Les tubes ont été centrifugés à 16 000 g pendant 7 minutes et 30 secondes à température ambiante et le surnageant contenant les protéines a été récupéré et dosé ou conservé à -80°C.

#### 1.1.3.2. Dosage des protéines totales

Le dosage des protéines totales a été effectué par colorimétrie à l'aide du kit BCA (*Bicinchoninic Acid Protein*) [Thermo Fisher Scientific] et d'une gamme étalon de BSA (*Bovine Serum Albumin*) de 0 à 2 000 µg/mL puis une lecture au spectrophotomètre [*Eppendorf, Biphotometre*] à 562 nm a été réalisée.

#### 1.1.3.3. ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*)

L'analyse protéomique ciblée a été réalisée par ELISA avec un kit commercial selon les instructions du kit [Biotechne, R&D systems]. Les facteurs de croissance ciblés ont été l'EGF, le HGF, le KGF, le NGF et le TGF-β1. Les anticorps (Ac) de capture ont été *coatés* dans des puits de plaque ELISA pendant la nuit à température ambiante. Par la suite une étape de lavage a été réalisée en 3 fois avec du PBS [Eurobio] et 0.05% de Tween 20 [Fisher Scientifique]. Par la suite les Ac de capture ont été bloqués avec 1% de BSA Tween 20 (*block buffer*) pendant 1 heure à température ambiante. L'Ac de capture du TGF-β1 a été bloqué

avec du PBS Tween 20 à 5%. S'en est suivi l'étape de lavage et l'incubation avec l'anticorps de détection pendant 1 heure à température ambiante. Après une étape de lavage, la Streptavidine-HRP a été ajoutée et incubée à l'obscurité pendant 20 minutes à température ambiante. La solution de substrat (1/1 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + Tetramethylbenzidine) a été ajoutée et incubée pendant 20 minutes à température ambiante. La réaction a été arrêtée avec de l'acide sulfurique à 2N. Les résultats ont été lus à densité optique (DO) de 450 nm avec le spectromètre [Multiskan FC microplate reader, Thermo Fisher].

#### 1.1.3.4. *Label-Free*

L'approche « Label-free » est une technique de quantification des protéines par spectrométrie de masse en haute résolution. Cette approche consiste à comparer la quantité relative des peptides résultants d'une protéolyse globale entre plusieurs échantillons. L'ensemble des expérimentations présentées ci-dessous a été réalisé en collaboration avec la plateforme de protéomique PISSARO (IRIB).

Dans un premier temps, une extraction protéique sur les tissus « Congelés » (n=15) et « Lyophilisés » (n=14) a été réalisée. La technologie FastPrep [MP Biomedicals™, instrument FastPrep-24™ 5G], permettant un broyage mécanique simultané et homogène de tous les échantillons, a été utilisée. Brièvement, les tissus ont été lavés au PBS 1X puis placés dans un tube de matrice de lyse [Matrix Lysis D, MP Biomedicals™] dans 500µL d'un tampon de solubilisation 2R2D (Urée 7 M, Thiourée 2M, DTT 20 Mm, C7BzO 0.5% Chaps 2% et TBF 0.005%). Le broyage a été effectué en 4 cycles de 40 secondes à 6m/s. Les broyats ont ensuite été centrifugés (10000g, 8min, 4°C) et la fraction protéique présente dans le surnageant a été récupérée et conservée à 4°C pour les analyses ultérieures.

Dans un second temps, la concentration protéique de chaque échantillon a été calculée avec la méthode Bradford et lu à 595nm [Victor3 1420, Perkin Elmer]. Afin de valider les dosages protéiques, un gel SDS-PAGE (12,5% d'acrylamide) sur 6 échantillons aléatoires (5 µg) a été réalisé. Après migration, la coloration au NiAg du gel a permis de vérifier l'intensité des bandes protéiques pour chaque échantillon et ainsi écarter l'hypothèse d'une mauvaise estimation de la concentration protéique. Cette étape est primordiale car une erreur de concentration d'un échantillon engendrerait des différences majeures lors de l'analyse quantitative différentielle.

Dès lors que le dosage Bradford a été réalisé et validé, le protocole « Label free » peut alors être entrepris. Pour chaque échantillon, 25µg de protéine ont été déposés sur un gel de polyacrylamide 7% puis une migration (10mA/gel pendant 1h10) a été lancée afin de « piéger » l'ensemble des protéines dans un volume minimum de matrice « gel ». Une étape de coloration et de décoloration au bleu de Coomassie a permis de visualiser les bandes protéiques qui ont ensuite été découpées, prélevées dans un tube Eppendorf, puis lavées à l'aide de plusieurs bains d'eau milliQ. A la suite de cette migration, la digestion trypsique a été lancée.

Le protocole de digestion permet de découper les protéines au niveau des résidus aminés lysine et arginine pour obtenir un pool peptidique. Brièvement, les bandes protéiques ont dans un premier temps été réduits (DTT 5mM) puis alkylés (Iodoacétamide 20mM). Cette étape évite la formation de pont disulfure difficile à appréhender lors des analyses de spectrométrie de masse. Dans un second temps les bandes ont été déshydratées (Acétonitrile (ACN) 100%) puis séchées au Speedvac. Puis, elles ont été incubées toute la nuit à 37°C en présence de trypsine (ratio 1:20). Ensuite, les peptides obtenus lors de l'incubation ont été récupérés à l'aide de bains successifs de TFA 0,1% puis d'ACN 100%. Les fractions peptidiques obtenues ont à leur tour été séchées et conservées à température ambiante jusqu'à l'analyse par spectrométrie de masse.

A ce stade les échantillons ont été gardés à température ambiante en attendant d'être analysés.

Avant de lancer les analyses de spectrométrie, les fractions peptidiques séchées ont été reprises dans de l'acide formique 0,1% à une concentration de 1µg/µL puis dilué au 1/5ème. Les échantillons ont alors été placés dans une puits spécifique puis injectés (1µL) dans une chaîne chromatographique (HPLC) couplée à un spectromètre de masse haute résolution [Orbitrap, Thermo]. Les méthodes de chromatographie et de masse ont été réalisées et validées par la plateforme PISSARO. Les datas obtenus suite à cette analyse ont été traités par deux logiciels différents. L'analyse d'identification a été réalisé grâce au logiciel Proteome Discoverer™ et les analyses de quantifications par la logiciel Progenesis.

#### 1.1.4. Analyse structurale de la MAH par microscopie électronique à transmission

La microscopie électronique est une technique de microscopie utilisant des faisceaux d'électron de haute énergie traversant un échantillon très mince. Cette technique permet une analyse de la microstructure des échantillons avec une résolution très haute pouvant aller jusqu'à une résolution atomique. L'ensemble des expérimentations présentées ci-dessous a été réalisé en collaboration avec la plateforme d'imagerie PRIMACEN.

La fixation a été réalisée avec un mélange de PAF 2% (Paraformaldehyde), Glutamate 2% dans du tampon cacodylate (0.1M à pH 7.2) pendant 2 heures. S'en est suivie une première étape de rinçage au tampon Caco 0.1M et la post fixation avec de l'OsO<sub>4</sub> 1% dans du tampon cacodylate pendant 1 heure.

Un deuxième rinçage dans du tampon cacodylate a été réalisé, à ce stade la fixation était complète.

L'étape de la déshydratation est importante car la résine ne polymérise pas avec l'eau. La déshydratation s'est faite par l'utilisation de différents bains d'éthanol, 50%, 70%, 95% et finalement de 100%.

L'enrésinement s'est fait sous agitation et à température ambiante avec du *Spurr resin* [Electron Microscopie] à différentes concentrations sur deux jours. Le premier jour un bain de Spurr à 50% sur la journée suivi d'un bain de Spurr à 70% sur la nuit a été réalisé. Le bain de Spurr 100% a été fait sur la deuxième journée (24 heures).

La mise en moule a été faite dans des moules cylindriques à fond plat. Les échantillons ont été mis à plat dans le moule pré rempli à 1/3 de résine puis complété avec la même résine. La polymérisation a été faite à 60°C pendant 24 heures.

Après le démoulage la résine contenant l'échantillon a été coupée en rond.

Les échantillons enrésinés ont été placés de façon verticale dans un moule et la résine a été ajoutée sur les échantillons. La polymérisation s'est faite à 60°C pendant 24 heures.

Les échantillons ont été à nouveau démoulés. A ce stade les échantillons étaient prêts pour la phase de dégrossissement.

Les étapes de dégrossissement et de lissage avec les différents couteaux ont été réalisées avec l'ultra microtome UC7 ou UC6 [Leica]. Les échantillons ont été dégrossis avec une lame puis lissés au couteau de verre à une épaisseur de 500 nm. Les coupes ont été sur

une goutte de poly-L-lysine 0,01% puis séchées et colorées au bleu de Toluidine (0,5%). Elles ont été vérifiées sous loupe et l'emplacement sur l'échantillon pour réaliser la coupe ultra a été choisi. Les échantillons ont été à nouveau dégrossis afin de n'avoir que la partie d'intérêt. Par la suite ils ont été lissés avec un couteau de diamant histo [DiATOME] avec des coupes à 500nm. La coupe ultra a été réalisée à une épaisseur de 90 nm avec un couteau de diamant ultra à 45° [DiATOME] et ces coupes ont été placées dans les grilles pour l'étape de contraste.

Le contraste des grilles a été réalisé dans un bain d'acétate d'uranyle pendant 10 minutes, suivi d'une première étape de lavage avec l'eau ultra pure. Par la suite les grilles ont subi un deuxième bain de 10 minutes de citrate de plomb. Après une deuxième étape de lavage, les grilles ont été laissées sécher pendant la nuit.

Les échantillons ont été analysés sous microscope électronique à transmission [TENAI – SCUEOR-RDC-108 – SB, MLFG].

#### 1.1.5. Culture primaire des cellules épithéliales

La culture primaire des cellules épithéliales a été réalisée à partir de cornées de donneur décédés (Banque de tissu de Rouen) et non utilisables en thérapeutique. Cette culture a été réalisée par deux stratégies. Isolement de cellules épithéliales à la suite d'une extraction enzymatique de cornée ou culture directe d'explants limbiques.

Dans les deux cas, les milieux de culture utilisés ont été : Soit le DMEM/F12 [Lonza], SVF 10% [Gibco], glutamin 1X [Gibco], insuline 5 µg/mL [Lilly], EGF 10 ng/mL [Preprotech] et gentamycine 50 µg/mL [Panpharma], soit le D-KSFM [Gibco], SVF 10% et gentamycine 50 µg/mL.

Culture à partir d'extraction enzymatique des cellules de cornée :

Le milieu de conservation des cornées, Cornemax [Eurobio], a été éliminé et les cornées ont été lavées 2 fois avec du PBS. La sclère ainsi que le centre de la cornée ont été séparés à l'aide d'un scalpel. La partie correspondant au limbe a ensuite été digérée à l'aide d'une solution contenant de la Dispase II 50 mg/mL [Roche] pendant 2 heures à 37°C ou pendant 18 heures à 4°C en présence de 100 mM de sorbitol. Par la suite, la surface de l'explant a été doucement grattée avec une pince ronde de façon à détacher le feuillet épithélial. L'épithélium obtenu a été centrifugé à 2000 rpm pendant 5 minutes à température ambiante. Le culot a été repris dans de la trypsine-EDTA 0,05% [Gibco] et

incubé à 37°C et 5% CO<sub>2</sub> pendant 10 minutes. L'action de la trypsine a été stoppée par l'addition de 0,5 mL de SVF puis la suspension cellulaire a été centrifugée. Les cellules ont été comptées sur la lame de Malassez avec une coloration préalable au bleu de trypan [Sigma]. Les cellules ont été ensuiteensemencées dans des puits de plaque de culture ou sur la MAH étalée.

Culture à partir d'explants (sans digestion enzymatique) :

Le milieu de conservation des cornées a été éliminé et les cornées ont été lavées 2 fois avec du PBS. La région correspondant au limbe, qui se situe entre la sclère et la cornée, a été séparée à l'aide d'un scalpel ou de ciseaux. Par la suite, des explants limbiques d'environ 3 mm ont été découpés ; chaque explant a été positionné face épithéliale vers le haut et laissé sous le PSM pour adhérer à 1 puits d'une plaque de culture ou à la MAH étalée. Une goutte de milieu de culture a été déposée sur chaque explant et incubée à 37°C et 5% CO<sub>2</sub> pendant la nuit. Cette étape permet une adhésion plus forte de l'explant à la plaque tout en empêchant son dessèchement qui causerait la mort cellulaire. Le lendemain, 1 mL de milieu de culture a été ajouté par puits. Le milieu de culture a été changé tous les 2 à 3 jours.

#### 1.1.5.1. Culture des CEC sur MAH

Les cellules épithéliales cornéennes isolées ont été cultivées sur une membrane amniotique dénudée. Les MAH ont été dénudées via une incubation de 20 minutes dans une solution de Trypsine puis l'épithélium a été éliminé de façon mécanique à l'aide d'un grattoir. Après dé-épithélialisation, la MAH a été séparée de sa membrane de nitrocellulose et placée au fond d'un puit d'une plaque 6 puits. L'efficacité de la dé-épithélialisation a pu être contrôlée sous microscope optique. Un temps de pose de minimum 2 heures a été nécessaire pour que la MAH adhère à la plaque de culture. Ces MAH ont pu être incubées avec le milieu de culture à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub> et ont été utilisables pendant 4 jours.

La culture de cellules épithéliales sur membrane amniotique a été réalisée soit à partir de cellules extraites enzymatiquement, soit à partir d'explant comme précisé ci-dessus. La capacité d'adhésion a ensuite été observée sous microscope optique.

#### 1.1.6. Caractérisation des cellules épithéliales

##### 1.1.6.1. Immunofluorescence

L'immunofluorescence est une méthode de détection d'expression et de localisation d'un antigène grâce à l'utilisation d'anticorps couplé à un fluorochrome. Dans le cadre de ce projet, cette méthode nous a permis de détecter et de déterminer la localisation des cytokératines 3 et 12.

Pour ce faire, les cellules ou explants ont été cultivées sur des labtek ou des plaques de cultures [Thermo Fisher Scientifique] ou sur MAH. Dans tous cas les cellules ont été fixées à l'éthanol absolu pendant 10 à 15 minutes. L'alcool a été éliminé par retournement et les cellules ont été perméabilisées avec du PBS-Tween 0,1% pendant 30 minutes à température ambiante, puis rincées avec du PBS. Le PBS-SVF 1% a été ajouté pendant 30 minutes à température ambiante. Un lavage de 5 minutes au PBS a été réalisé, les anticorps primaires (CK3, CK12) ont été ajoutés, suivi d'une dilution au 50ème avec du PBS-BSA 1%. Après 1 heure d'incubation à température ambiante les lames ont été rincées 3 fois avec du PBS-Tween 0,1%. Les anticorps secondaires ont été ajoutés avec une dilution au 1000ème dans du PBS-BSA 1% et placés 1 heure à l'obscurité à température ambiante, anti-mouse dilution fluorochrome Alexa fluor 647 [Invitrogen], anti-rabbit dilution fluorochrome Alexa fluor 488 [Abcam].

Les puits ont été rincés 3 fois avec du PBS-Tween 0,1%. Un contre marquage Hoescht a été réalisé pour marquer les noyaux cellulaires. Le Hoescht [Sigma] a été dilué au 10 000ème dans du PBS et incubé pendant 5 minutes à l'obscurité. Les puits ont été à nouveau rincés 3 fois, puis 3 gouttes de milieu de montage [Immuno concepts] ont été ajoutées par lame et une lamelle a été déposée. Les lames ont été lues au microscope à fluorescence [Aoptom], par le logiciel Zen.

#### 1.1.6.2. RT-PCR

La Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction est une méthode d'analyse de recherche d'expression d'ARNm. Ici, l'objectif était de caractériser les cellules épithéliales cornéennes par l'expression de différents ARNm.

Les séquences des ARNm ont été obtenues de la data base de nucléotide NCBI et le design des amorces a été réalisé à l'aide du logiciel primer3.ut.ee. Les séquences des différentes amorces utilisées sont : CK3 5'-TGGACCTGGACAGCATCATT-3', 3'-TGCTTCTTGACACCCTCGAT-5' 220 ; CK12 5'-TGGAGATTGAGACCTACCGC-3', 3'-ACCATTCACCATCTCCTGCA-5' 170 ; Connexine 43 5'-AAAGTACCAAACAGCAGCGG-3', 3'-

CTCCAGCAGTTGAGTAGGCT-5' 213 ; S100A4 5'-ATGCAGGACAGGAAGACACA-3', 3'-ATGCAGGACAGGAAGACACA-5' 203; ABCG2 5'-GCTACACCACCTCCTTCTGT-3', 3'-GGAAGAAGAGAACCCAGCT-5' 195; Vimentine 5'- GAGTCCACTGAGTACCGGAG-3', 3'-ACGAGCCATTTCTCCTTCA-5' 192;

Extraction et dosage des ARN : L'extraction des ARN a été réalisée à partir des cellules d'intérêts reprises dans 1 mL de TRIzol® [Invitrogen®], qui contient une solution de phénol et de thiocyanate de guanidium permettant la lyse et la séparation des constituants cellulaires (acides nucléiques, protéines). Après une incubation de 5 minutes à température ambiante, le chloroforme a été ajouté, le tout a été mélangé par retournement puis laissé à température ambiante pendant 3 minutes et centrifugé à 12 000 G pendant 15 minutes à 4°C. La phase supérieure contenant les ARNs a été mélangée avec l'isopropanol par retournement, incubée durant 10 minutes à température ambiante puis centrifugée à 12 000 G pendant 10 minutes à 4°C. Le culot d'ARNs a été lavé avec de l'éthanol 75%, centrifugé pendant 5 minutes à 7 500 G à 4°C et séché avant d'être suspendu dans de l'eau stérile. La qualité et la quantité des ARNs ont été contrôlées sur l'Agilent 2100 Bioanalyser à l'aide du kit RNA 600 Nano Assay® [Agilent Technologies, Waldbronn]. Il permet une séparation électrophorétique en gel dans un réseau de micro-capillaires et la détection par fluorescence des fragments d'ARN. Il a ainsi permis d'analyser la taille des différents fragments présents et d'obtenir la concentration en ARN des échantillons par comparaison avec le marqueur RNA Ladder [Ambion]. Les ARNs à analyser ont été dénaturés à 70°C pendant 2 minutes et le mix gel-dye (0,5 µL de RNA 6000 Nano dye concentrate et 32,5 µL de RNA 6000 Nano gel matrice) ont été placés dans le puits G de la RNA 6000 Nano LabChip®. La puce avait été déposée dans une station permettant de faire le vide et de répartir le gel dans le réseau de microcapillaires. Ensuite, 9 µL de ce gel a été réparti dans les deux autres puits G (réservoirs) et l'*RNA 6000 Nano Marker* a été alors distribués dans chacun des 13 puits restants. L'ARNs à analyser avait été placé dans les puits et RNA 6000 ladder et déposé dans le dernier puits.

La RT-PCR, transcription inverse des ARN messagers en ADNc a été réalisée en utilisant une amorce l'oligo dT qui s'hybride avec la queue polyA des ARNm, permettant d'initier la synthèse d'ADNc par la Moloney-Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (M-MLV RT) [Invitrogen®, Breda] à partir d'ARN. Un mélange réactionnel d'oligodT à 10 mM, le dNTP à 10 mM, l'ARN et l'eau ont été mis à incuber pendant 5 minutes à 65°C, puis placés

à 4°C. Le mélange contenant du tampon 5X (250 mM Tris HCl pH 8,3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>), du DTT à 0,1 M et de l' RNase OUT à 40 U/μL a été ajouté à l'ARN et placé 2 minutes à 37°C. 1 Du M-MLV a ensuite été ajouté et l'ensemble a été incubé 1 heure à 37°C. Un tube témoin négatif, ne contenant pas d'ARN, a été réalisé, permettant de vérifier qu'il n'y avait pas de contamination. La PCR a été réalisée à partir des ADNc obtenues et diluées au 10ème. Le mélange réactionnel utilisé était constitué de MgCl<sub>2</sub> à 1,5 mM, dNTP (10 mM), des amorces sens et anti-sens (0,5 μL à 20 μM), tampon 10X [Thermo scientifique] 0,1 μL de TAQ polymérase ABgene (0,5 unités) [Thermo scientifique] et de l'eau stérile en qsp 25 μL. 2 μL d'ADNc dilué au 10ème sont ajoutés. Un contrôle négatif sans matrice a été effectué pour chaque réaction de PCR et par couple d'amorces. Le mélange a ensuite été placé dans le thermocycleur [Applied Biosystems] pour subir les étapes de dénaturation (94°C, 36 cycle d'une minute), d'hybridation (60°C ,35 cycles d'une minute) et d'extension (72°C, 35 cycles de 30 secondes et un cycle de 5 minutes). La réaction de PCR a ensuite été vérifiée grâce à la réalisation d'un gel d'agarose 2 %. La présence de l'ADN a été contrôlée par une exposition aux rayons UV sur un transilluminateur. L'utilisation d'un marqueur de poids moléculaire a permis de déterminer la taille des fragments obtenus.

#### 1.1.7. Analyse in vivo

##### 1.1.7.1. Greffe de la membrane amniotique

Le modèle utilisé a été le lapin New Zealand [Charles Rivers].

L'anesthésie générale a été réalisée par l'utilisation de l'isoflurane [Belamont] à 5% pour l'induction et à 2.5% pour le maintien. Le gaz utilisé avec l'isoflurane a été l'air comprimé du fait de la courte durée de l'anesthésie.

Les lapins ont été opérés uniquement sur l'œil gauche, l'autre œil étant nécessaire à la bonne qualité de vie du lapin.

La procédure chirurgicale a été réalisée par le Pr Marc MURAINÉ sous microscopie opératoire.

Après la désinfection locale par Bétadine ophtalmique 5% [MEDA] le blépharostat a été mis en place. Une anesthésie locale par collyre de chlorhydrate d'oxybuprocaine [Théa] a été réalisée.

Une trépanation très superficielle de la cornée sur un diamètre de 5 ou 6 mm a été réalisée, puis l'épithélium et une couche très superficielle de stroma cornéen (100 – 150 µm) ont été retirés à l'aide d'une spatule à dissection lamellaire.

Une membrane amniotique de 5 ou 6 mm de diamètre (lyophilisée ou congelée) a alors été positionnée en regard de l'ulcère créé puis maintenue par un point de suture d'éthylon 10.0. Une injection sous conjonctivale de Kenacort Retard a été réalisée à la fin de l'opération. L'anesthésie par masque a été retirée et le lapin a été sous observation pendant environ 2 heures après l'opération.

Par la suite les lapins ont reçu un traitement par une pommade ophtalmique Sterdex [Théa], anti-inflammatoire et antibactérienne, pendant une période de 4 jours, une à deux fois par jour. Les lapins ont été examinés deux fois par semaine à l'œil nu ou avec un biomicroscope couplé à un système de photographie et de vidéo. La ré-épithélialisation a été vérifiée par l'instillation de fluorescéine 0.5% [SERB].

#### 1.1.7.2. Histologie

Après le sacrifice des lapins, les cornées ont été fixées à la paraffine et coupées au microtome à 5 µm. La coloration Hématoxyline Éosine Safran (HES) a été réalisée. Ces étapes ont été réalisées au CHU de Rouen.

#### 1.1.7.3. Immunohistochimie

L'immunohistochimie est une méthode de détection, par un anticorps, d'une protéine recherchée dans un tissu. Les résultats peuvent être lus par un microscope optique.

Les coupes ont été déparaffinées par différents bains, 2 bains de Xylène pendant 5 minutes, 2 bains d'éthanol 100% pendant 5 minutes, 2 bains d'éthanol à 96% pendant 5 minutes, un bain à l'éthanol à 70% pendant 5 minutes puis un bain rapide à l'eau milliQ.

Les coupes ont été recouvertes avec le *Bloxall Endogenous Peroxidase and Alkaline Phosphates Blocking Solution* [Vector SP 6000], puis ont été incubées pendant 10 minutes à température ambiante suivi d'un lavage rapide au PBS.

Du sérum normal de cheval à 6% dans du PBS [Vector Vectastain ABC kit Mouse Immunoglobuline G, IgG, PK-6102] a été ajouté et laissé incuber pendant 10 minutes à température ambiante.

L'excès de solution a été retiré et l'anti-CK 3 [Gibco] dilué au 1/100 dans du sérum de cheval à 1,5% a été ajouté. Une incubation de 2 heures à température ambiante suivi d'un lavage avec du PBS a été réalisée.

L'anticorps secondaire biotinylé, cheval anti immunoglobuline G souris [Vector Vectastain ABC Kit Mouse IgG PK-6102] a été dilué dans du sérum de cheval à 1,5% et les coupes ont été incubées pendant 10 minutes à température ambiante.

L'Avidine DH a été ajoutée dans 1 ml de PBS puis dans de l'Horseradish Peroxidase H Biotinylé (Reagent B) [Vector Vectastain ABC kit Mouse IgG PK-6102]. Les lames ont été laissées à température ambiante pendant 10 minutes puis lavées au PBS.

Du *Buffer Stock Solution* avec de l'AEC Stock Solution et 16 µl de Hydrogen Peroxide Solution dans 1 ml d'eau distillée a été ajouté et laissé incuber pendant 20 minutes.

La contre coloration avec *Hematoxylin QS Nuclear Counterstain* [Vector H-3404] a été réalisé et les lames ont été rincées à l'eau distillée.

Le montage avec le milieu de montage aqueux [VectaMount AQ Mounting medium Vector H-5501] a été réalisé et les lames ont été laissées sécher à température ambiante.

### 1.1.8. Analyses statistiques

Les données issues des différentes expériences ont été saisies à l'aide du logiciel GraphPad Prism® v.5.00. Les tests statistiques effectués sont des two-way ANOVA avec un post-test de Bonferroni. \* p value <0.05, \*\* p value <0.01, \*\*\* p value <0.001.

## 1.2. RESULTATS

### 1.2.1. Étude *in vitro* de la capacité d'épithélialisation des MAH L et MAH C

L'étude *in vitro* de la capacité d'épithélialisation des MAH L et MAH C a été réalisée en deux étapes. La première étape a été la mise au point de la culture en plaque des CEC suivie de leur caractérisation. Une fois la méthode de culture des CEC validée, la seconde étape a consisté à la mise en culture des CEC sur les MAH L et MAH C.

#### 1.2.1.1. Mise au point de la culture primaire des CEC

Afin de mettre en place la culture primaire des CEC, deux paramètres ont été pris en compte : le milieu de culture et la méthode d'extraction des cellules à partir de la cornée.

##### 1.2.1.1.1. Milieu de culture

Les milieux de culture les plus utilisés pour la culture des CEC sont souvent composés soit d'un mélange des deux milieux de culture le Dulbecco's Modified Eagle Medium / Ham F12, auxquels a été ajoutée de l'EGF, du SVF à 10%, de l'insuline, de la transferrine, de l'hydrocortisone et de la toxine de choléra appelé SHER, soit des milieux commerciaux tels que le KSFM (*keratinocyte free serum medium*) et Opti-MEM®. Dans la littérature, l'utilisation des cellules 3T3 (fibroblastes immortalisés issus d'embryon de souris) en culture avec les cellules épithéliales dans un système de Transwell est également mentionnée.

Dhamodaran et coll ont résumé dans leur publication de 2016 les milieux les plus souvent utilisés pour la culture primaire des CEC (tableau 4) (Dhamodaran et al., 2016).

Tableau 4 Différents protocoles de culture et d'expansion des CEC.

Matrix	Feeder layer	Culture technique	Culture components	Outcome	Citations
Human amniotic membrane	—	Explant	DMEM: Ham's F12 (1:1), hEGF, insulin; 10% autologous serum/FBS  1. DMEM/Ham F12 (3:1), insulin, hydrocortisone, glutamine, hEGF and FBS 10%, 2. DMEM, insulin, hydrocortisone, glutamine and FBS (10%) Minimal essential medium: Ham's F12, EGF, cholera toxin and insulin; 10% autologous serum/FBS DMEM and Ham's F12, dimethyl sulfoxide, mouse EGF, bovine insulin, cholera toxin and 5% FBS DMEM, Glutamine, ABAM, EGF, Hydrocortisone, Cholera toxin and FCS	Experimental use Clinical use	Dhamodaran et al., 2015 [21] Mariappan et al., 2010 [15] Sharma et al., 2011 [32] Sangwan et al., 2003, 2006 [63,64] Tsai et al., 2000 [65] Schwab et al., 1999 [66]
Soft/therapeutic contact lens	3T3 Feeder layer	Explant/trypsin digestion	DMEM: Ham's F12, insulin, cholera toxin, EGF and 10% FBS DMEM or SHEM containing bicarbonate and F-12, dimethyl sulfoxide, mouse EGF, insulin, transferrin, selenium, hydrocortisone, cholera toxin, 5% FBS	Experimental use	Koizumi et al., 2002 [67] Sun et al., 2006 [68]; Li et al., 2006 [69]; He et al., 2006 [70]
Soft/therapeutic contact lens	3T3-12 cells	Explant/trypsin digestion	Dulbecco-Vogt Eagle's: Ham's F12 media (3:1), insulin, transferrin, adenine, hydrocortisone, cholera toxin, triiodothyronine, EGF, glutamine and 10% FBS Eagle's MEM, 2% CO <sub>2</sub> and 10 % autologous serum or FBS	Clinical use	Pellegrini et al. 1997 [7]
Electrospun/Fibrin scaffolds	—	Explant passaged culture			Di Girolamo et al., 2009 [71]; Bobba et al., 2015 [72]
Fibrin	3T3 Feeder layer	Trypsin digestion	DMEM: Ham's F-12 (2:1), L-glutamin, Antibiotic-Antimycotic, insulin, adenine, hydrocortisone, cholera toxin, triiodothyronine, EGF and 10% FBS	Experimental use	Tominac et al., 2015 [38]
Fibrin	—	Explant/dispase digestion	DMEM: Ham's F12 medium, insulin, adenine, cholera toxin, dimethylsulfoxide, L-glutamine		Talbot M et al. 2006 [73]
Corneal stroma	—	Dispase, trypsin digestion	DMEM: Ham's F12 medium, dimethylsulfoxide, mouse EGF, insulin, transferrin, selenium, hydrocortisone, cholera toxin A, 5% FBS <i>In vivo</i> study		España et al. 2003 [74] Zhao, 2014 [75]
Acellular conjunctiva matrix	—	Dispase, trypsin digestion			
Meblogel	—	Explant	DMEM: Ham's F12, 3% FBS and 10% CO <sub>2</sub> MEM: Ham's F12 (3:1 ration), EGF and insulin		Sitalakshmi et al., 2009 [76]; Sudha et al., 2006 [77] Dravida et al., 2008 [78]
Collagen scaffolds	—	Explant	DMEM: Ham's F12 (3:1), insulin, hydrocortisone, glutamine, hEGF and FBS 10%, 2. DMEM, insulin, hydrocortisone, glutamine and FBS (10%) Minimal essential medium: Ham's F12, EGF, cholera toxin and insulin; 10% autologous serum/FBS DMEM and Ham's F12, dimethyl sulfoxide, mouse EGF, bovine insulin, cholera toxin and 5% FBS DMEM, Glutamine, ABAM, EGF, Hydrocortisone, Cholera toxin and FCS		Figueira et al., 2007 [79] Loureiro et al., 2013 [34]
Culture dish	—	Explant	DMEM (a modified Eagle's medium, hormone and growth factor-free), L-glutamine; insulin, transferrin and selenium mixture 1. SHEM, a combination of DMEM/Ham's F12 (1:1) calcium, crystalline bovine insulin, cholera-toxin, EGF, dimethyl sulfoxide, hydrocortisone, sodium selenite, Apo-transferrin, and 10% FBS 2. Keratinocyte serum-free medium, calcium, pituitary bovine extract, EGF and 10% FBS. 3. Epilife medium, calcium, human corneal growth supplement, pituitary bovine extract, bovine insulin, hydrocortisone, bovine transferrin, EGF and 5% FBS		

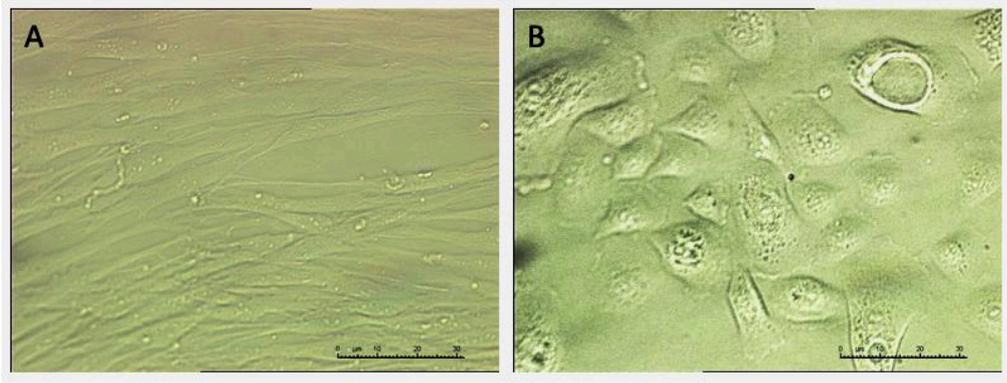
FBS, fetal bovine serum; FCS, fetal calf serum; hEGF, human epidermal growth factor; SHEM, supplemental hormonal epithelial medium.

(Dhamodaran et al., 2016).

Pour le développement de la culture des CEC au laboratoire, nous avons eu recours à deux milieux, le SHEM (milieu DMEM/F12 complétement) et le KSFM. Le premier milieu, SHEM, contenant du SVF a été utilisé au début du projet. La présence de deux types cellulaires avec un aspect distinct a été observée : une première population de cellules pollygonaux ayant un aspect épithélial, une seconde population avec un aspect fibroblastique, aplati et fusiforme. Au fur et à mesure des changements de milieux, le nombre de cellules ayant un aspect fibroblastique a augmenté tandis que le nombre de cellules ayant un aspect épithélial a diminué.

Afin d'obtenir une culture pure de cellules avec un aspect épithélial, nous avons effectué la technique de *pre plating*. Cette méthode se base sur le principe que les fibroblastes adhèrent plus rapidement à la plaque que les cellules épithéliales. De ce fait, la culture se fait en deux temps. Les cellules sont mises en culture dans une première plaque puis transférées dans une seconde plaque. La différence entre le temps d'adhésion de ces deux types cellulaires permet d'avoir une culture moins contaminée par les fibroblastes et plus riche en cellules épithéliales. Cependant, à long terme cette méthode ne permet pas de garder une culture primaire pure en CEC.

Pour ces raisons, nous avons décidé d'utiliser un deuxième milieu commercial, le KSFM. Le KSFM est un milieu de culture spécifique des CEC et est exempt de SVF. Ce milieu permet d'obtenir une culture primaire pure de cellules à aspect épithélial ; cependant la croissance cellulaire y est plus lente. L'ajout de SVF a permis d'obtenir une croissance plus rapide des cellules. L'analyse comparative entre la culture cellulaire utilisant le milieu KSFM avec SVF et sans SVF montre que le SVF induit chez les cellules issues du même pool de cornée, au premier passage (p1), une croissance des cellules d'aspect fibroblastique, à la différence des cellules issues de la même culture n'ayant pas reçues de SVF (figure 14). L'ajout de la toxine de choléra (ayant un effet inhibiteur sur le cycle cellulaire des fibroblastes) au milieu KSFM + SVF n'empêche pas la croissance des cellules d'aspect fibroblastique dans ces cultures.



**Figure 14 Comparaison de la culture cellulaire dans le milieu KSFM avec SVF et sans SVF.**

a) KSFM SVF 10%, b) KSFM. Au 9ème jour, nous avons observé un aspect fibroblastique (cellules plates et fusiformes) des cellules en culture dans le milieu KSFM SVF 10%. Comparaison réalisée en duplicat.

L'absence de SVF permet d'avoir une culture plus homogène et réduit fortement la croissance des fibroblastes. Cependant la croissance des CEC est également plus lente et le nombre de passages très limité.

#### 1.2.1.1.2. Méthode d'extraction

Nous avons également réalisé une étude comparative entre les différentes méthodes d'extraction des CEC, c'est-à-dire par digestion enzymatique et par explant.

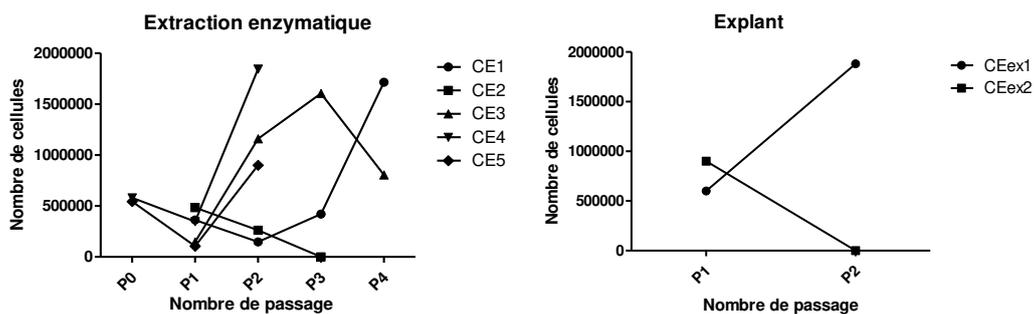
La méthode d'extraction par digestion enzymatique est réalisée par l'utilisation de la Dispase II à 1U/mL. La Dispase II est une métalloprotéase permettant la dissociation de la couche épithéliale de sa membrane basale. Cette enzyme clive la fibronectine, le collagène IV et le collagène I. Par la suite le feuillet épithélial obtenu est digéré par la trypsine. Cette peptidase agit en dissociant les jonctions intercellulaires et permet d'avoir une suspension cellulaire disparate.

La méthode de culture explant se fait par la mise en culture directe d'un explant de cornée comprenant le limbe et la cornée.

Les résultats de la comparaison de ces deux méthodes d'extraction tendent à montrer qu'un nombre plus élevé de cellules ainsi qu'un plus grand nombre de passages cellulaires peuvent être obtenus en utilisant la méthode d'extraction enzymatique (n=5 cultures ayant atteint au minimum 2 passages) par rapport à la méthode par explant (n=2 cultures ayant atteint au minimum 2 passages) (figure 15). Cependant il faut noter que les cellules obtenues par la méthode d'extraction enzymatique sont issues d'un pool de cellules obtenues à partir de 3 à 4 cornées. L'utilisation de plusieurs cornées pour réaliser les

cultures avec la méthode d'extraction enzymatique peut expliquer le nombre plus élevé de passages.

Les résultats obtenus de la culture cellulaire montrent que les cellules mises en culture dans le milieu KSFM gardent un aspect épithélial. Même si ces résultats tendent à privilégier l'utilisation de la méthode d'extraction enzymatique, le nombre faible de cultures ayant atteint plus que deux passages avec les deux méthodes d'extraction ne permettent pas de valider une méthode par rapport à l'autre.



**Figure 15** Nombre de cellules à aspect épithélial obtenues par les méthodes de digestion enzymatique et d'explant de la cornée.

Le nombre de cellules illustrées représente les cellules mises en culture par les méthodes de digestion enzymatique (n=5) et d'explant (n=2) ayant atteint au minimum 2 passages.

### 1.2.1.2. Caractérisation des CEC

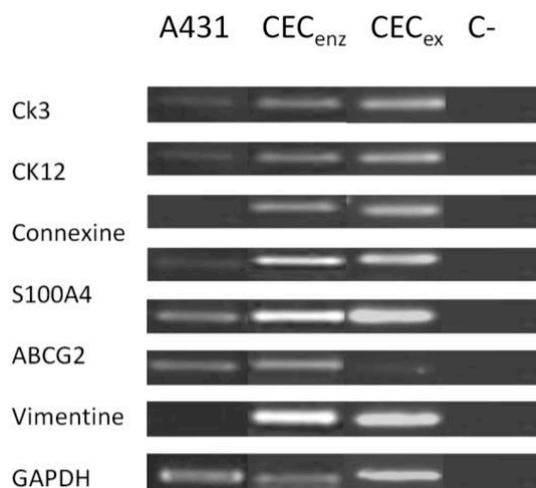
La culture primaire des cellules issues de la cornée ayant un aspect épithélial a été optimisée. La méthode d'extraction optimale ne pouvant pas être validée, par la suite nous avons vérifié l'expression des protéines spécifiquement exprimées dans les CEC (les CK3 et les CK12) issues des deux méthodes d'extraction.

#### 1.2.1.2.1. RT-PCR (*RetroTranscription- polymerase chain reaction*)

L'expression de l'ARN codant les protéines CK3 et CK12 des cellules à aspect épithélial a été vérifiée par la RT-PCR (non quantitative). La lignée A431 exprimant la CK3 a été utilisée en tant que contrôle positif (figure 16).

**Tableau 5 Marqueur des différents types cellulaires de la cornée.**

Cellules épithéliales de la cornée	Cellules limbiques souches	Fibroblastes
CK3/CK12	ABCG2	S100A4
Connexine 43	Vimentine	
Vimentine		



**Figure 16 RT-PCR des ARN codant la CK3 et la CK12 des cellules obtenues à partir des deux méthodes d'extraction.**

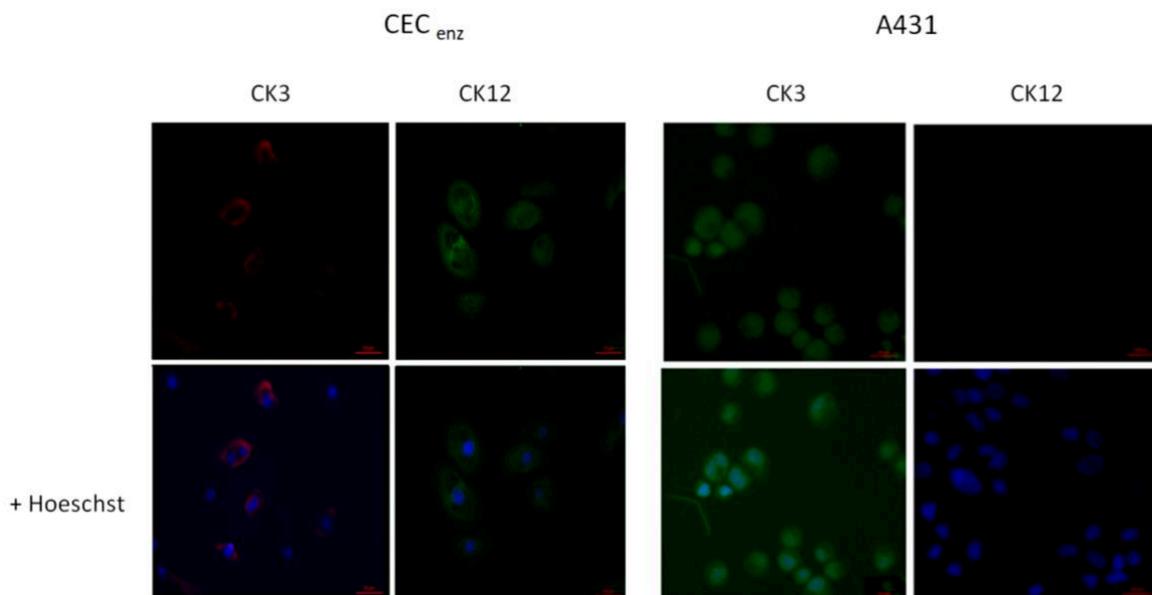
L'expression au niveau transcriptionnel de la CK3, de la CK12 ainsi que de la Connexine 43 pour les extraits d'ARN de CEC<sub>enz</sub> (méthode d'extraction enzymatique, n=3, passage 2 à 3) et de CEC<sub>ex</sub> (méthode explant, n=2, passage 1). L'expression au niveau transcriptionnel des marqueurs des fibroblastes, S100A4, des cellules souches limbiques, ABCG2 et Vimentine, ont également été observé chez les CEC<sub>enz</sub> et CEC<sub>ex</sub>. La lignée A431, qui est une lignée de carcinome exprimant la CK3 est utilisée en tant que contrôle positif et l'eau purifiée est utilisée en tant que contrôle négatif (C-). Le gène de ménage GAPDH est le témoin positif de la validation de la RT-PCR.

Nous avons également observé que ces cellules expriment l'ARN codant pour la Connexine 43 qui est une protéine impliquée dans les liaisons de type jonction serrée exprimée par les cellules supra-basales de la cornée (CEC) et du limbe (Chen et al., 2006). L'expression au niveau transcriptionnel de la Vimentine, protéine exprimée par les CEC en état de cicatrisation et par les cellules souches limbiques a aussi été observée (Castro-Muñozledo et al., 2017; Schlötzer-Schrehardt and Kruse, 2005). L'ARN codant la protéine transmembranaire ABCG2 (transporteurs à *ATP Binding Cassette*) a été utilisé en tant que marqueur des cellules souches limbiques (de Paiva et al., 2005). L'expression de l'ARN de la protéine S100A4 (*S100 calcium-binding protein A4*) qui est un marqueur des fibroblastes en état cicatriciel et des cellules endothéliales, a également été retrouvée (Ryan et al., 2003; Thakore-Shah and Deng, 2014) (figure 16).

L'expression des ARN codants pour la protéine ABCG2, marqueur des cellules souches, a été plus faible chez les cellules issues d'explant que chez celles issues d'extraction enzymatique, ce qui laisse penser que ces cellules sont dans un état de différenciation plus avancée. Nous avons également retrouvé une plus grande quantité d'ARN codants pour la Vimentine dans les deux types de culture. La Vimentine étant également exprimée par les CEC, ces résultats tendent à montrer que les cellules issues de la culture d'explant ont moins un aspect souche et sont plus différenciées. Cependant notre analyse étant non quantitative cette hypothèse nécessite d'être confirmée par l'utilisation d'autres marqueurs de cellules souches tels que la P63 ou la CK19.

#### 1.2.1.2.2. Immunofluorescence

Le nombre de cultures issues d'explant ayant atteint deux passages étant faibles, nous avons réalisé le simple marquage des CK3 et CK12 sur les cellules issues de la digestion enzymatique par IF (Figure 17). La lignée A431 exprimant la CK 3 a été utilisée en tant que contrôle positif pour l'optimisation du marquage par l'anti CK3.



**Figure 17 Marquage par immunofluorescence des CK3 et CK12 des CEC.**

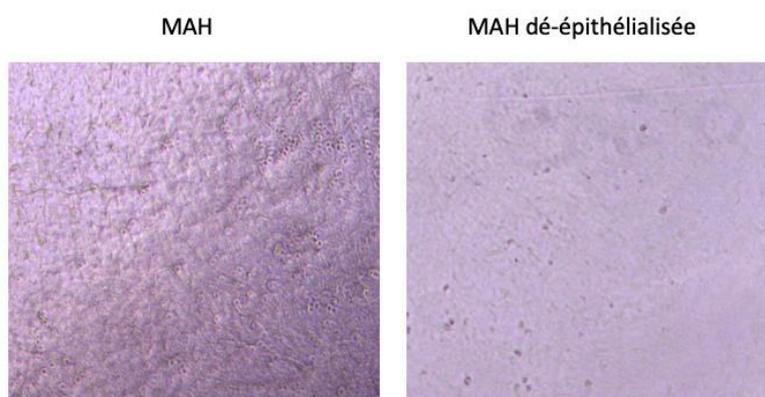
Ces cellules ont été marquées en simple marquage avec l'anti-CK3 et l'anti-CK12. L'expression de la CK3 et de la CK12 est détectée dans les CEC. La lignée A431 est utilisée en tant que contrôle positif de l'expression de la CK3. La coloration Hoeschst est utilisée pour marquer l'ADN.

Les cellules mises en culture extraites par la méthode enzymatique expriment les deux protéines CK3 et CK12.

### 1.2.1.3. Culture des CEC sur MAH

A ce stade nous avons établi deux méthodes de culture des cellules issues de la cornée exprimant les marqueurs des CEC. Cependant ces deux méthodes ne permettent qu'une expansion cellulaire limitée, cette limitation est plus remarquée chez le CEC<sub>ex</sub> que chez les CEC<sub>enz</sub>. Par la suite et afin de vérifier la capacité de ré-épithélialisation des cellules épithéliales par la MAH L en comparaison avec la MAH C, nous avons mis en culture ces cellules sur les MAH issues de trois placentas différents.

Afin de faciliter l'adhérence des CEC à la MAH et d'éviter la contamination de ces cellules par les cellules épithéliales de la MAH, nous avons dans un premier temps enlevé la couche épithéliale des MAH en utilisant la trypsine (figure 18).



**Figure 18** MAH avant et après déépithélialisation par la trypsine.

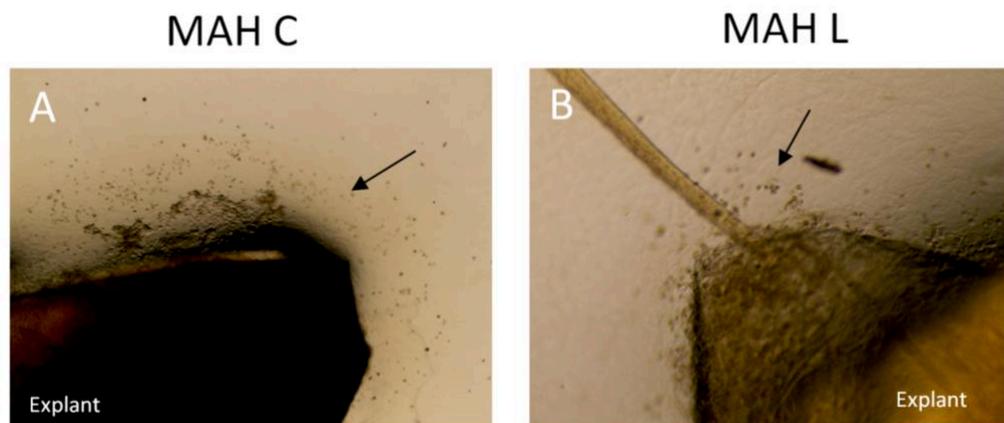
La monocouche épithéliale de la MAH a été éliminée par l'action de la trypsine (20 min à 37°C) suivi par l'élimination mécanique à l'aide de râteau. A gauche la MAH avant l'action de la trypsine et à droite la MAH dé-épithélialisée. Microscope optique, grossissement x50.

Par la suite, dans le but de comparer la capacité d'épithélialisation des MAH L et MAH C, nous avons dans un premier temps mis en culture les CEC extraites par la digestion enzymatique sur les MAH dé-épithélialisées. Le choix de ces cellules était basé sur le fait que nous avons obtenu un plus grand nombre de cellules avec plus de passages et que nous avons également une meilleure caractérisation de ces cellules (IF et RT-PCR). Nous avons rapidement constaté que ces cellules adhéraient difficilement à la MAH. Les CEC se concentraient autour de la membrane et non sur la membrane même. Ce phénomène est probablement dû au micromouvement de la MAH dans le milieu de culture. Bien que les MAH aient été plaquées au fond de la plaque de culture avec un insert, elles ne restaient pas complètement fixes et immobiles au fond du puit. En raison de la difficulté de manipulation des MAH, l'utilisation de la colle de fibrine n'a également pas permis de coller la MAH à la

plaque. En effet la MAH est une membrane très fine qui s'enroule assez facilement sur elle-même et une fois positionnée sur la plaque, elle doit être étalée à l'aide de pinces.

Pour ces raisons, nous avons choisi d'opter pour la méthode de culture par explant de cornée. Pour ce faire nous avons directement placé l'explant en culture sur la MAH L et la MAH C. Cette méthode permet aux CEC issues de l'explant d'adhérer directement à la MAH.

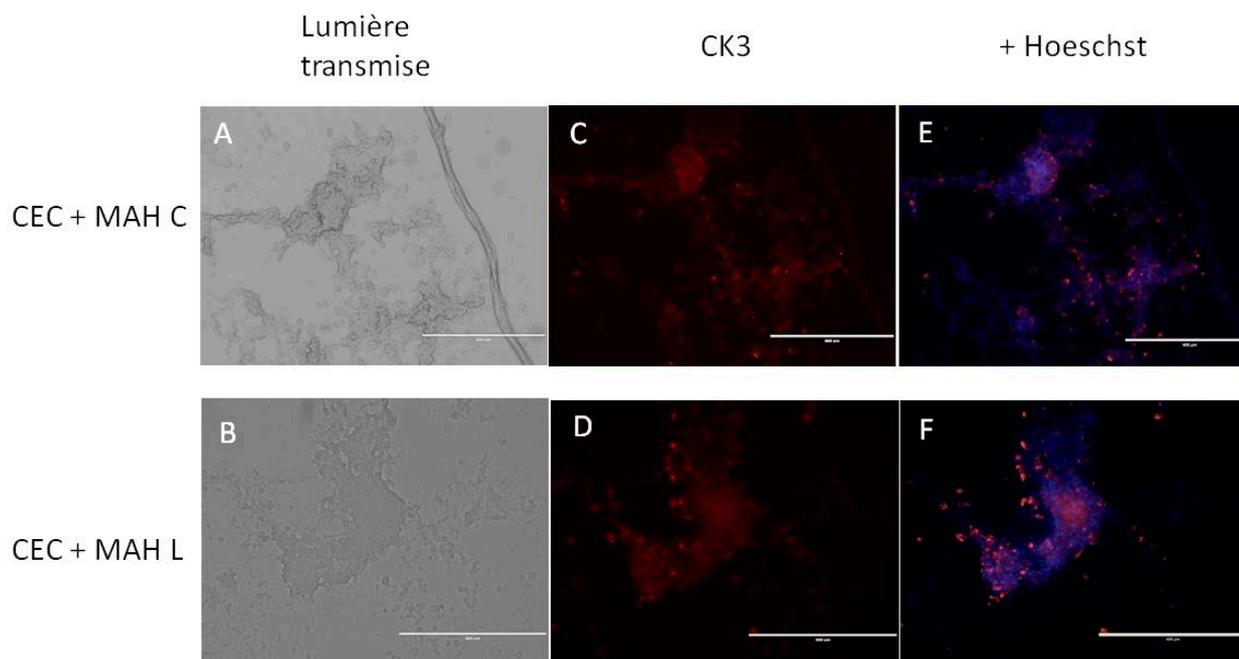
Nous avons observé que dans la culture sur les MAH C et les MAH L, les cellules commençaient à migrer de l'explant en moyenne à j6. Ces explants ont été gardés environ 25 jours en culture sur les MAH C et les MAH L (figure 19).



**Figure 19 Culture d'explant sur les MAH C et MAH L**

Les explants de cornée ont été mis en culture sur les MAH C (A) et les MAH L (B). Les flèches représentent la migration des CEC sur la MAH. Figure représentative de 4 cultures à J23. Grossissement à X50.

L'expression de la CK3 par ces CEC est vérifiée en IF (figure 20).



**Figure 20 Expression des CK3 par les cellules mises en culture sur les MAH.**

Les explants de cornée sont mis en culture sur les MAH C (A, C, E) et MAH L (B, D, F). Les cellules sont observées sous microscope à lumière transmise (A, B), marquées avec l'anti-CK3 (C,D) et le noyau est observé par la coloration de l'ADN par l'Hoeschst (E,F). Figure représentative du marquage par l'anti-CK3 de culture d'explant sur 3 MAH L et 3 MAH C issues de 3 placentas.

Nous n'avons pas remarqué de différence entre l'expression de la CK3 chez les deux cultures. L'expansion des cellules était trop faible, le feuillet épithélial ainsi que la MAH se décollaient avec l'explant. L'utilisation d'une méthode enzymatique aurait également agi sur les cellules de l'explant, ce qui aurait faussé les résultats. Pour ces raisons nous n'avons pas pu réaliser la RT-PCR sur ces cellules.

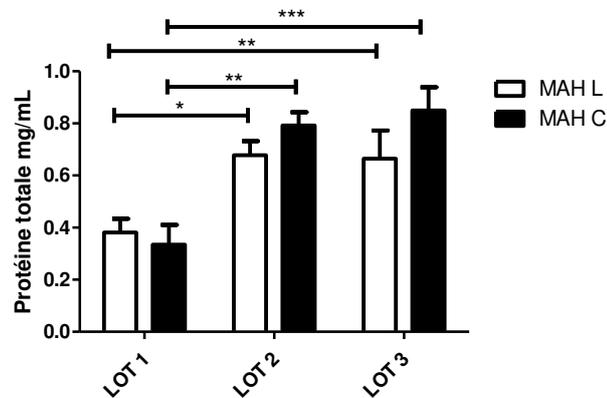
Au final la prolifération des CEC sur MAH ne semble pas être différente entre les membranes lyophilisées et congelées.

### 1.2.2. Étude comparative protéomique des MAH L versus MAH C

Dans notre étude, afin de comparer le taux protéique des MAH L et MAH C, deux types d'analyses protéiques ont été réalisées. Une première analyse a été faite par ELISA ciblant les facteurs de croissance connus dans la littérature pour avoir un rôle majeur dans le processus de cicatrisation et d'épithélialisation de la cornée. Une deuxième analyse plus globale par *label-free* a été réalisée dans le but de comparer la stabilité protéique des MAH dans le processus de lyophilisation par rapport à la congélation.

### 1.2.2.1. Analyse des facteurs de croissance ciblés par ELISA

Les facteurs de croissance HGF, EGF, KGF, NGF, TGF- $\beta$  sont des cytokines importantes dans le processus d'épithélialisation de la cornée. Dans un premier temps, nous avons comparé au sein des 3 lots le taux total des protéines extraites de 5 patchs issus des MAH L et de 5 patchs issus des MAH C (figure 21). Nous n'avons pas remarqué de différence significative entre la quantité totale des protéines extraites des MAH L et la quantité de protéines extraites des MAH C au sein de chaque lot. Nous avons constaté que l'expression protéique semblait être différente entre les 3 lots. En effet un taux plus élevé de protéine a été retrouvé dans les lots 2 et 3 par rapport au lot 1 avec la même méthode d'extraction.

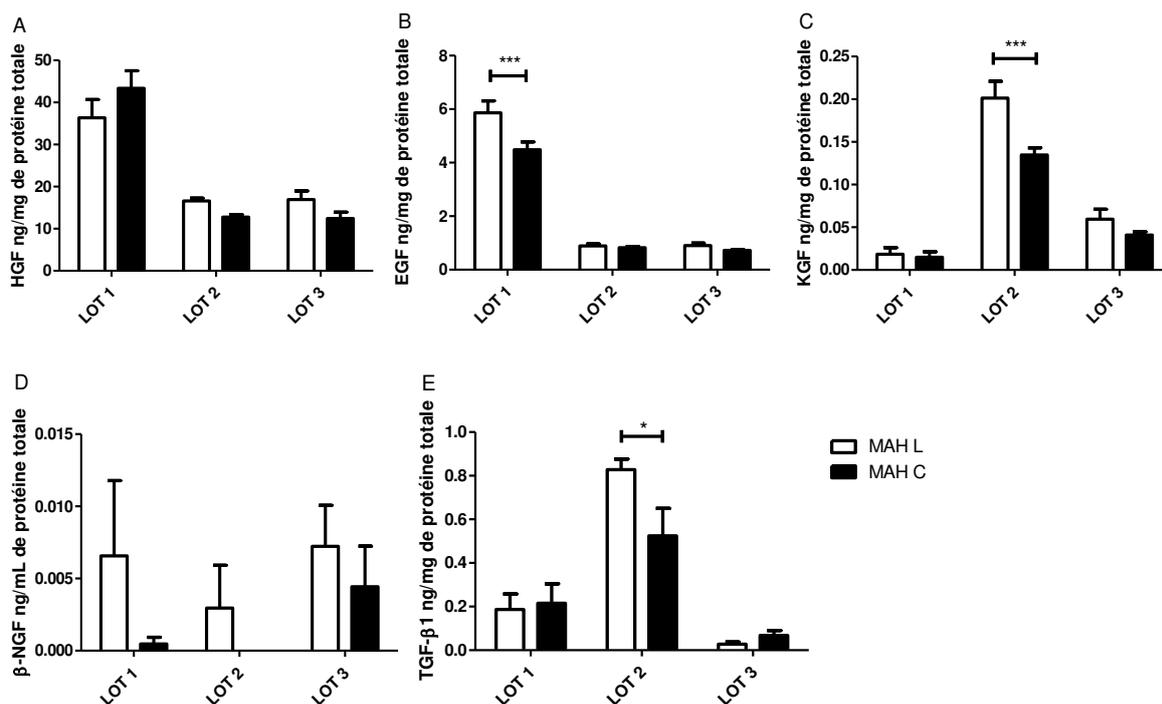


**Figure 21 Taux de protéines extraites des MAH L et MAH C issues des 3 lots de MAH.**

Le taux total de protéines est obtenu par la méthode BCA. 5 patchs issus de MAH L et 5 patchs issus de MAH C sont comparés dans chaque lot. Les résultats sont exprimés en moyenne +/- SEM.

Le taux d'expression des facteurs de croissance cités précédemment a été analysé par un dosage ELISA (figure 22). Ce taux a été normalisé par rapport au taux total de protéines issues des MAH L et MAH C de chaque lot. L'HGF et l'EGF sont les facteurs de croissance les plus exprimés dans les MAH et le taux de  $\beta$ -NGF est très faible dans les 3 lots.

Nous avons observé une expression significativement plus forte du taux de KGF et de TGF- $\beta$ 1 dans les membranes du lot 2, cependant leur expression reste assez faible dans tous les lots. Le taux d'EGF est significativement plus fort dans la MAH L du lot 1.



**Figure 22 Facteurs de croissance des MAH issus des trois différents lots, ELISA.**

Le taux des facteurs de croissance (A) HGF (B) EGF (C) KGF (D) β-NGF (E) TGF-β1 est obtenu par la méthode ELISA. 5 patches issus de MAH L et 5 patches issus de MAH C sont comparés dans chaque lot. Analyse réalisée en duplicata. Chaque lot a été analysé au minimum 2 fois. Les résultats sont exprimés en moyenne +/- SEM. \*p<0.05 ; \*\*\*p<0.001.

Enfin le taux de deux facteurs de croissance, le HGF et le β-NGF, sur les 5 facteurs ciblés est resté inchangé dans les MAH L par rapport au MAH C dans les 3 lots analysés. Nous avons remarqué une variation d'expression de 3 facteurs de croissance entre les différents lots. En effet l'EGF (dans le lot 1), le KGF et le TGF-β1 (dans le lot 2) avaient été moins dégradés par la lyophilisation que par la congélation. Cette différence est significative que dans un des 3 lots de MAH. Ces résultats tendent à montrer que l'expression de ces facteurs de croissance est placenta dépendante, cependant afin de confirmer ces résultats l'analyse d'un plus grand nombre de MAH est nécessaire.

#### 1.2.2.2. Analyse globale par label-free

Dans le but de vérifier si d'autres protéines peuvent être affectées par le processus de lyophilisation, une analyse quantitative différentielle par *label-free* globale a été réalisée entre les MAH L et les MAH C dans les 3 lots. Cette approche a été réalisée au sein de la plateforme PISSARO de l'Université de Rouen Normandie.

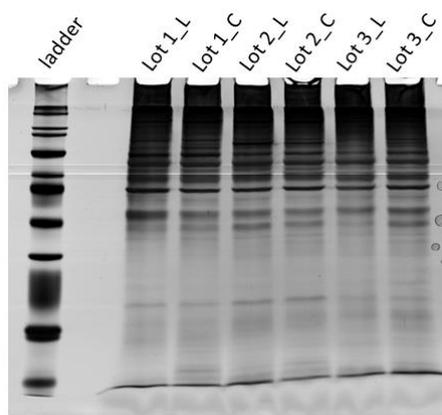
Pour cette analyse 29 échantillons (patches de MAH) issus des 3 lots ont été analysés (tableau 6) :

**Tableau 6** Échantillons utilisés pour l'analyse globale par label free.

Numéro du lot de placenta	Méthode de conservation	Nombre d'échantillons (patches de MAH)
Lot 1	Lyophilisation	4
	Congélation	5
Lot 2	Lyophilisation	5
	Congélation	5
Lot 3	Lyophilisation	5
	Congélation	5

Dans un premier temps, un gel d'électrophorèse a été réalisé pour obtenir un profil protéique sur un réplica de chaque lot de chaque condition (figure 23). Les protéines majoritairement présentes dans les extraits ont un poids moléculaire élevé. Cette observation était en adéquation avec la composition de la MAH. En effet la MAH est majoritairement composée de protéine de la MEC comme le collagène et la laminine qui sont des protéines de haut poids moléculaire.

L'intensité équivalente des profils de migration de chaque extrait protéique avait également validé l'étape suivante : la réalisation du « *label free* » et l'injection de quantité équivalente de chaque échantillon dans le spectromètre de masse.



**Figure 23** Électrophorèse sur gel de polyacrylamide 10% réalisé sur les extraits protéiques de patches de MAH L et de MAH C issus de chaque lot.

Un patch de MAH L et un patch de MAH C de chaque lot sont déposés sur le gel d'électrophorèse. L : lyophilisée, C : congelée. Gel réalisé 2 fois à 12.5% et 10% d'acrylamide.

Les analyses par spectrométrie de masse et le traitement des données ont été réalisés par la plateforme PISSARO. Le logiciel *Protéome Discover* a permis dans un premier

temps d'identifier en moyenne 747 protéines par échantillon. Afin d'affiner les protéines présentes, nous n'avons pris en compte que les protéines retrouvées au minimum 2 fois pour chacune des conditions et pour chaque lot. Les résultats du nombre de protéines identifiées sont présentés dans le Tableau 7.

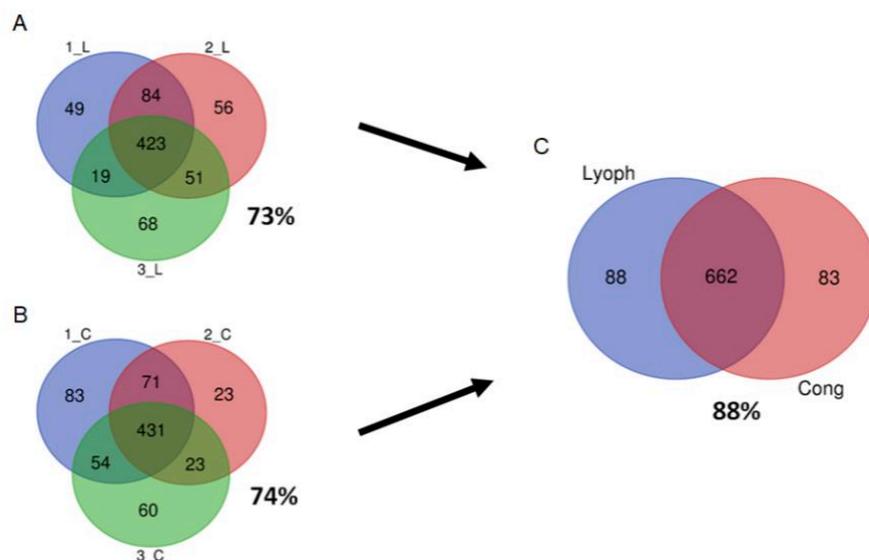
**Tableau 7 Nombre de protéines détectées par échantillon.**

		Nombre de protéines	Nombre de protéines retrouvées au moins dans 2 réplias
Lot 1	Lyophilisée	795	575
	Congelée	822	639
Lot 2	Lyophilisée	843	614
	Congelée	668	548
Lot 3	Lyophilisée	681	561
	Congelée	675	568

n=29

A partir de ces données, des diagrammes de Venn ont permis de mettre en évidence la reproductibilité. Une reproductibilité de 73 % a été constatée pour les MAH L et une reproductibilité de 74% a été constatée pour les MAH C (figure 24 A et B). Ces chiffres indiquent une bonne reproductibilité de la méthode d'analyse.

Concernant maintenant la reproductibilité entre les 2 conditions « Lyophilisées » et « Congelées », 662 protéines identifiées sont identiques chez les MAH L et les MAH C issues des 3 lots, soit 88% des protéines identifiées (figure 24 C). Ce pourcentage indique une forte similarité entre les 2 conditions analysées ce qui laisse à penser que les 2 méthodes de conservation sont assez similaires d'un point de vue protéique. Afin de confirmer cette hypothèse, une analyse quantitative a été réalisée en parallèle.



**Figure 24 Reproductibilité intra-groupe.**

Diagramme de Venn réalisé sur les protéines retrouvées au moins 2 fois dans chaque échantillon. (A) 73% des protéines retrouvées sont communs entre les 3 lots de MAH L (1\_L, 2\_L, 3\_L) et (B) 74% pour les protéines extraites des 3 lots de MAH C (1\_C, 2\_C, 3\_C). (C) 88% des protéines sont en commun entre les MAH L (Lyoph) et les MAH C (Cong)

Les résultats de cette analyse différentielle montre que 57 protéines sont significativement dérégulées ( $p$  value < 0,05). 15 protéines sont surreprésentées chez les MAH C dont une seule protéine avec un *fold change* supérieur à 2. 42 protéines sont surreprésentées chez les MAH L dont 17 protéines avec un *fold change* supérieur à 2. L'ensemble de ces 57 protéines permettent de bien reclasser les 2 groupes « Congelé » et « Lyophilisé » comme le montre le *clustering* réalisé sur la figure 25. Seulement 2 échantillons « Congelé » se trouvent mal classés. D'un point de vue général, le nombre de protéines dérégulées est faible et les différences d'expression entre les 2 conditions montrent des *fold change* majoritairement inférieur à 2. Comme nous l'avons pressenti lors des analyses d'identification, ces observations indiquent que les 2 conditions étudiées sont semblablement équivalentes d'un point de vue protéique.

57 protéines (p value < 0.05)

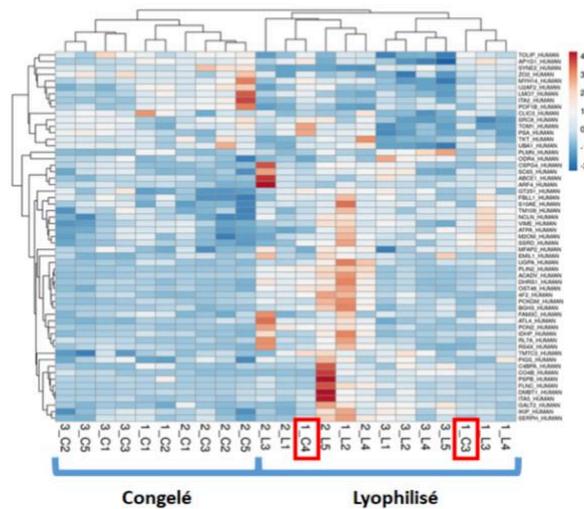


Figure 25 Clustering sur les protéines significativement dérégulées entre les MAH L et les MAH C.

57 protéines communes sont dérégulées entre les MAH L et MAH C des 3 lots. L'abondance des protéines est représentée par la variation de l'intensité des couleurs ; rouge : protéines surreprésentées ; bleu : protéine sous-exprimée.

En se focalisant un peu plus précisément sur les 57 protéines différentiellement exprimées, des analyses des voies de signalisation peuvent être entreprises, notamment avec le logiciel *StringProt* (figure 26).

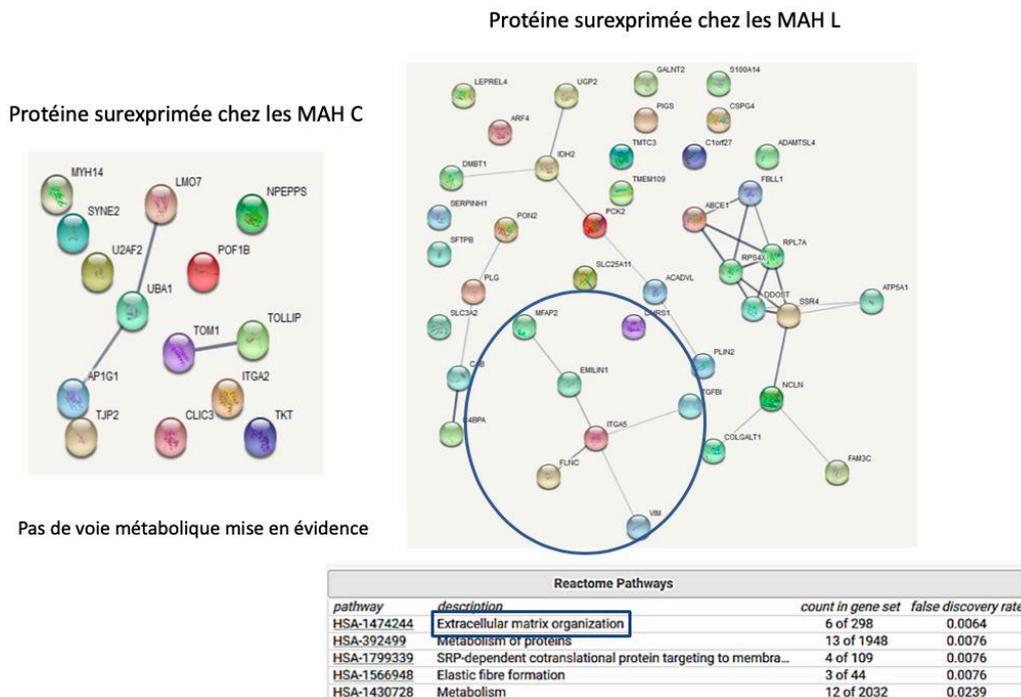


Figure 26 Analyse *StringProt* des protéines différentiellement exprimées entre les MAH C et les MAHL.

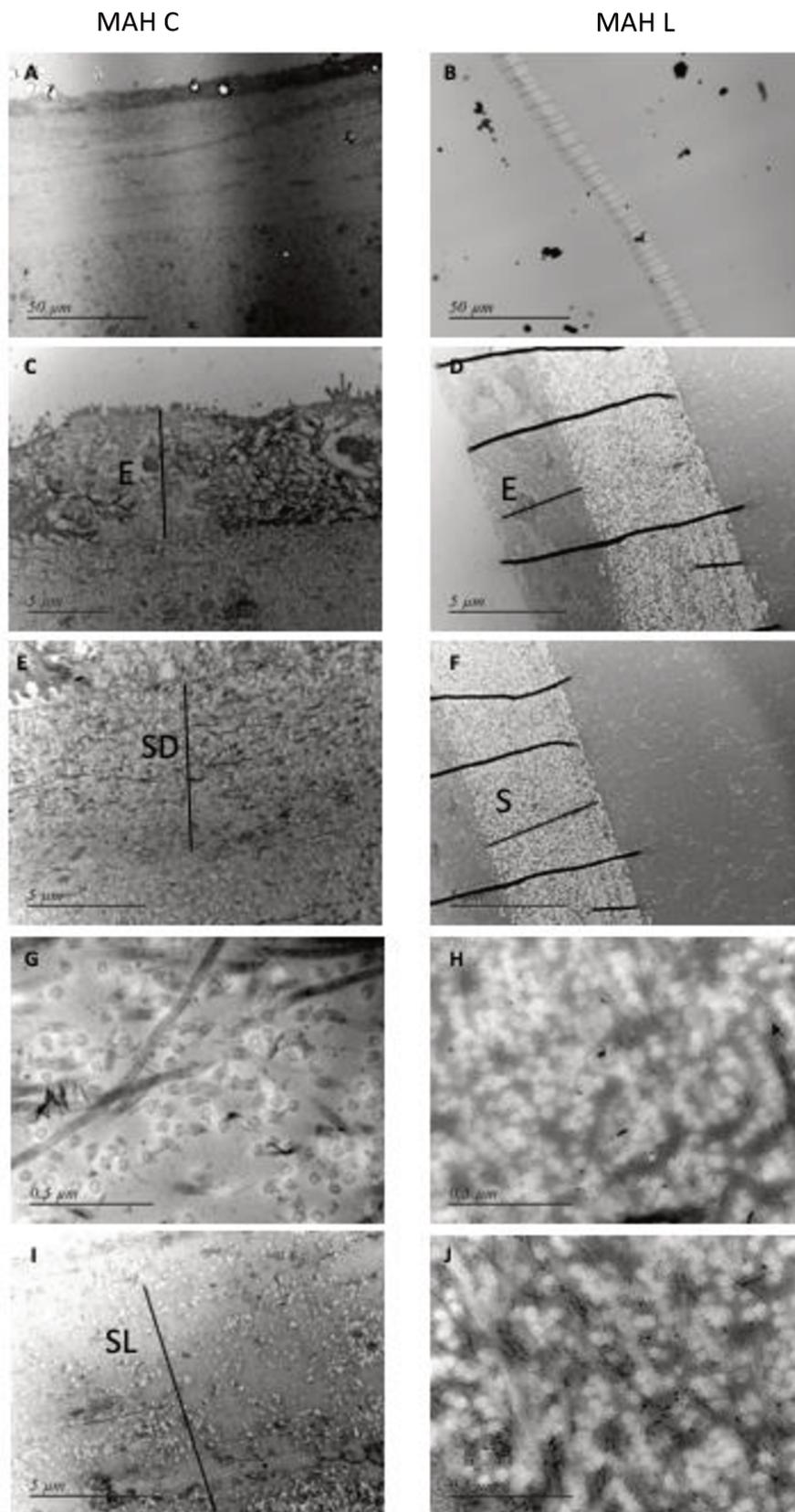
A gauche : analyse des 14 protéines sur 15 ont été reconnues pour le MAH C par le logiciel *string prot* et 41 sur 42 pour les protéines des MAH L.

Concernant les protéines surreprésentées chez les MAH C, peu de protéines interagissent entre elles ce qui ne permet pas de mettre en évidence une voie métabolique dérégulée. Concernant les protéines surreprésentées chez les MAH L, quelques voies métaboliques ont été allumées, notamment l'organisation de la matrice extracellulaire. En effet, on retrouve des protéines telles que la *Procollagen galactosyltransferase 1* (COLGALT1) et la protéine *EMILIN-1* qui sont des protéines connues pour leur rôle dans l'adhésion cellulaire. Il est également intéressant de noter la présence de la surexpression d'une sous-unité du TGF $\beta$ 1, *Transforming Growth Factor beta induced protein ig h3*.

Ces résultats montrent que la plupart des protéines ne sont pas plus dégradées par la lyophilisation que la congélation.

### 1.2.3. Étude de la structure par Microscopie électronique à transmission

Dans le but d'étudier si la lyophilisation peut altérer la structure des MAH, j'ai suivi pendant 6 mois une formation allant de la préparation des échantillons à l'analyse par microscopie électronique. Les structures des MAH L et MAH C ont été comparées par microscopie électronique à transmission (TEM). Pour cela 12 MAH (6 MAH L et 6 MAH C) issues de chaque lot ont été analysées à deux endroits différents (figure 27).



**Figure 27 Analyse comparative de la microstructure des MAHL et MAH C par microscopie électronique.**

MAH C (A,C,E,G,I) MAH L (B,D,F,H,J). Figure représentative de 6 MAH C et 6 MAH L. (A, B) observation des MAHC et MAH L à 50  $\mu\text{m}$ . (C et D) E monocouche épithéliale des MAH C et MAH L. (E) SD couche stromale dense du MAH C. (F) S stroma du MAH L. (G et H) couches correspondant à la partie dense du stroma des MAH C et MAH L avec un grossissement X60000 (I) SL couche stromale lâche, couche des cellules fibroblastes du MAH C. Les images positionnées côte à côte sont au même grossissement représentant les mêmes couches de la MAH C et MAH L.

Nous avons observé que l'épaisseur des MAH L était beaucoup plus fine que celle des MAH C. La structure de la MAH C était bien organisée, la monocouche épithéliale, le stroma et la couche spongieuse étaient très bien définies.

Nous avons également observé la présence de la couche spongieuse dans une MAH des trois lots analysés. Cette couche est normalement retirée au moment de la préparation des patches de MAH au sein la banque de tissus.

Les deux couches du stroma, le stroma dense et la couche plus lâche comprenant les fibroblastes ont également été observés au niveau du stroma de la MAH C.

Concernant la MAH L nous avons observé la monocouche de cellules épithéliales et le stroma. Cependant le stroma était désorganisé et les deux couches dense et fibroblastique n'étaient pas distinctes.

Les structures des protéines de la MEC telles que le collagène et les fibres élastiques ont bien été observées dans les MAH C. Au niveau de la MAH L, la MEC était complètement désorganisée.

Le processus de lyophilisation semble altérer la structure de la MAH. En comparaison avec les MAH C la structure de la MAH L, principalement au niveau du stroma, était complètement désorganisée.

#### 1.2.4. Étude comparative de la capacité d'épithélialisation *IN VIVO* des MAH L et MAH C

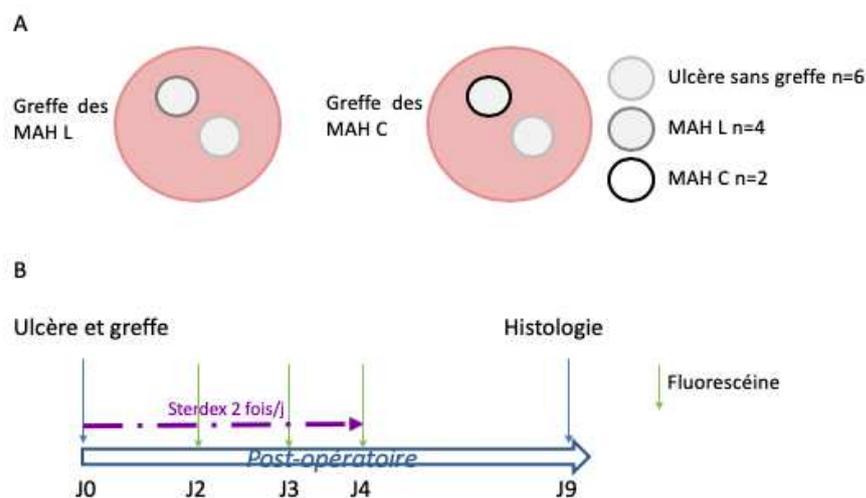
Dans le but de comparer la capacité d'épithélialisation des MAH C et des MAH L *in vivo*, les MAH ont été greffées au niveau de la cornée chez le lapin. Ce modèle a été choisi car premièrement la taille de la cornée est proche de celle de l'homme et secondairement la cornée du lapin étant très sensible, les signes d'inflammation sont visibles très rapidement. Au total, dans cette étude 18 lapins ont été greffés avec les 3 lots de MAH. Pour toutes les greffes, deux ulcères ont été créés mécaniquement sur un seul œil (œil gauche) de chaque lapin et les MAH L ou les MAH C ont été greffées immédiatement après.

##### Protocole 1 de la greffe des MAH:

Le premier protocole a été réalisé sur 6 lapins. Deux ulcères ont été créés sur l'œil gauche au niveau de la cornée. 4 lapins ont reçu une greffe de MAH L sur un ulcère et 2 lapins une greffe de MAH C également sur un ulcère. Le deuxième ulcère de chaque cornée est le contrôle négatif et n'a pas reçu de greffe (figure 28 A).

Pendant l'acte chirurgical les MAH L avaient tendance à adhérer spontanément à la cornée, pour cette raison ces greffes (n=4) n'ont pas été suturées. Les MAH C (n=2) quant à elles n'adhèrent pas de façon spontanée à la cornée et afin d'éviter que ces membranes ne se déplacent, les greffes ont été suturées. Un lapin sur les deux lapins ayant reçu une greffe de MAH C a également reçu une lentille.

A la fin de la greffe et pendant les 4 jours qui ont suivi la greffe, les lapins ont reçu à raison de deux fois par jour de la pommade anti-inflammatoire/antibactérienne, Sterdex. L'état des lapins a été suivi pendant 4 jours post opération puis toutes les 48 heures jusqu'à la fin du protocole (Figure 28 B). L'épithélialisation des cornées a été suivie par l'instillation de goutte de fluorescéine.



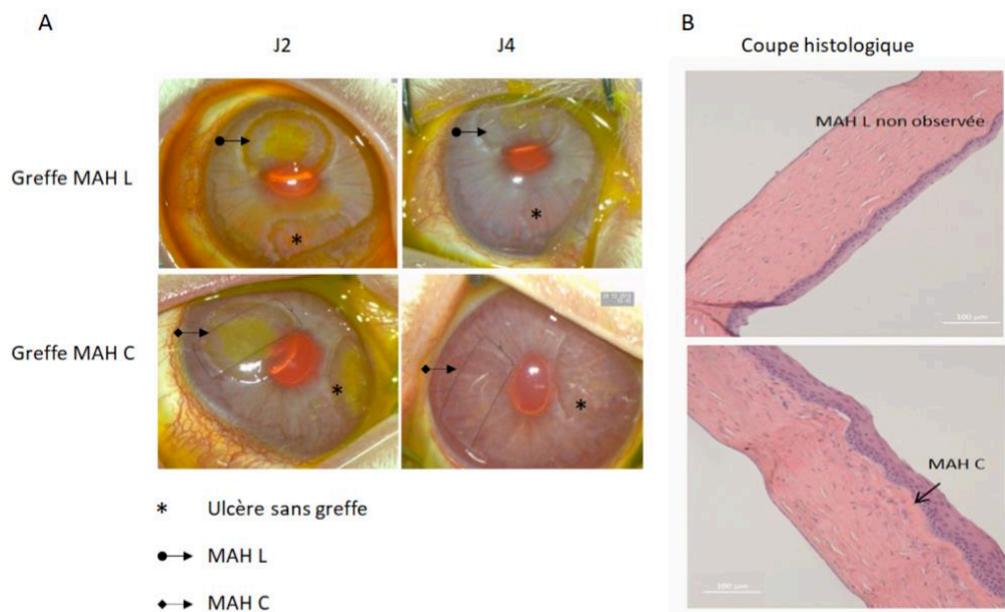
**Figure 28 Protocole 1 des greffes des MAH L et des MAH C.**

(A) Schéma de la greffe, (B) protocole de suivi de la greffe. Le premier protocole de greffe a été réalisé chez 6 lapins. Greffe de MAH L n=4 et greffe de MAH C n=2. Les ulcères sans greffe sont des contrôles négatifs. Une pommade Sterdex (anti-inflammatoire et antibactérienne) a été appliquée 2 fois par jour pendant 4 jours. L'épithélialisation a été vérifiée par instillation d'une goutte de fluorescéine.

Au deuxième jour post-opératoire le lapin ayant reçu une lentille l'avait perdue. L'observation de l'épithélialisation par l'instillation d'une goutte de fluorescéine au niveau des greffes et des ulcères contrôles indique que l'épithélialisation de la cornée avait déjà commencé au niveau de la périphérie des ulcères greffés mais également chez le contrôle (figure 29 A). A J4 les points de suture des MAH C ont été retirés. Les ulcères greffés et le contrôle semblent être complètement épithélialisés. Les cornées ayant été épithélialisées à J4, afin de respecter le bien-être de l'animal nous n'avons pas continué l'instillation des gouttes de fluorescéine les jours suivants. A la fin du protocole (J9) l'expérimentation a pris fin pour 4 lapins (greffe de MAH L n=2 et de MAH C n=2) sur 6 et les cornées ont été

prélevées. En effet nous avons observé que sur les 4 greffes de MAH L, 2 lapins n'avaient plus de MAH L. Ces deux lapins ont été greffés avec 3 couches de MAH L (protocole 1 bis décrit ultérieurement).

Les 4 cornées prélevées ont été gardées dans du formol pour les analyses histologiques (figure 29 B).



**Figure 29 Suivi d'épithélialisation de la cornée et coupe histologique.**

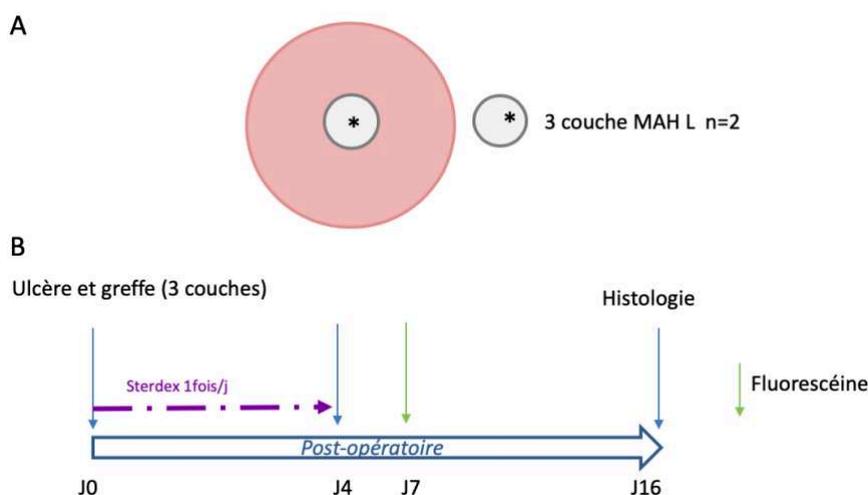
L'ulcère greffé avec la MAH L est indiqué avec ●→, l'ulcère greffé avec la MAH C est indiqué avec ◆→ et l'ulcère non greffé (contrôle négatif) avec \*. (A) suivi de l'épithélialisation des cornées greffées avec la MAH L (n=4) et la MAH C (n=2). (B) Coupes histologiques et coloration HES des MAH L (n=2) et MAH C (n=2).

Les MAH L n'ont pas été vues au niveau des coupes histologiques, les MAH C ayant été suturées pendant 4 jours ont bien été observées dans ces coupes. Nous n'avons pas constaté de différence entre la vitesse d'épithélialisation des ulcères greffés avec la MAH C, la MAH L et l'ulcère de contrôle. Ce constat est dû au fait que les ulcères ont été réalisés chez des cornées saines. En effet les cornées de ces lapins n'ayant pas de pathologie peuvent s'épithélialiser sans l'aide de la MAH. La comparaison de la vitesse d'épithélialisation ne peut être faite entre les MAH C et les MAH L car la présence des MAH L n'a pas été observées au niveau histologique.

Aucun signe d'inflammation n'a également été observé chez les lapins au cours de l'expérimentation. Les MAH étaient également d'aspect assez transparent.

### Protocole 1 bis de la greffe des MAH:

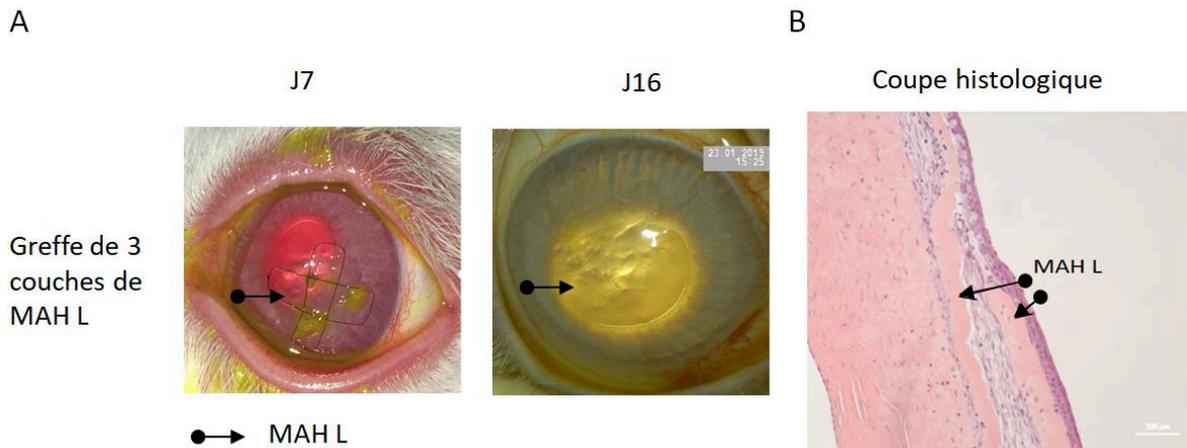
Comme expliqué précédemment sur les 6 lapins greffés au cours du protocole 1, l'absence de MAH L était visuellement bien établie à J9. Ces 2 lapins ont été gardés pour une seconde greffe avec 3 couches de MAH L (figure 30 A). La greffe a été suturée afin de ne plus perdre les MAH. Les lapins du précédent groupe n'ayant pas de signe d'inflammation nous avons diminué l'utilisation de la pommade Sterdex à une fois par jour pendant 4 jours. Le protocole a duré 16 jours (figure 30 B).



**Figure 30 Protocole 1 bis des greffes des MAH L et des MAH C.**

(A) Schéma de la greffe, (B) protocole de suivi de la greffe. La greffe de 3 couches de MAH L a été réalisée chez 2 lapins après ulcération. Une pommade Sterdex (anti-inflammatoire et antibactérien) a été appliquée 1 fois par jour pendant 4 jours. L'épithélialisation a été vérifiée par instillation d'une goutte de fluorescéine à J7.

Les modifications apportées dans ce protocole sont représentatives des ulcères plus profonds. Le but était seulement d'évaluer la tolérance et non l'efficacité de l'épithélialisation. A j7 90% de la cornée des lapins avait été épithélialisée (figure 31 A). Les coupes histologiques montrent la présence de 2 couches de MAH L avec une probable infiltration de fibroblastes entre les deux couches (figure 31 B).



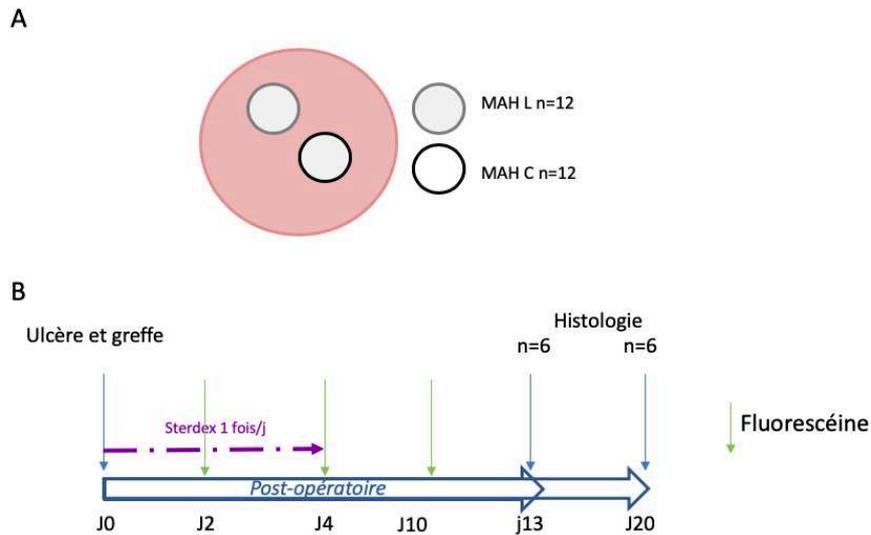
**Figure 31 Suivi de l'épithélialisation de la cornée et coupe histologique des greffes de 3 couches de MAH L**  
 L'ulcère greffé avec la MAH L est indiqué avec ●→. (A) Suivi de l'épithélialisation des cornées greffées avec la MAH L (n=2).  
 (B) Coupes histologiques et coloration HES des MAH L (n=2). Figure représentative des deux greffes.

Tout au long du protocole aucun signe d'inflammation n'a été observé et les MAH étaient restées transparentes.

#### Protocole 2 de la greffe des MAH:

Les premières protocoles de greffe (protocoles 1 et 1 bis) nous ont permis d'observer le comportement des MAH L dans la cornée et donné une idée sur le temps d'épithélialisation des cornées dans notre modèle.

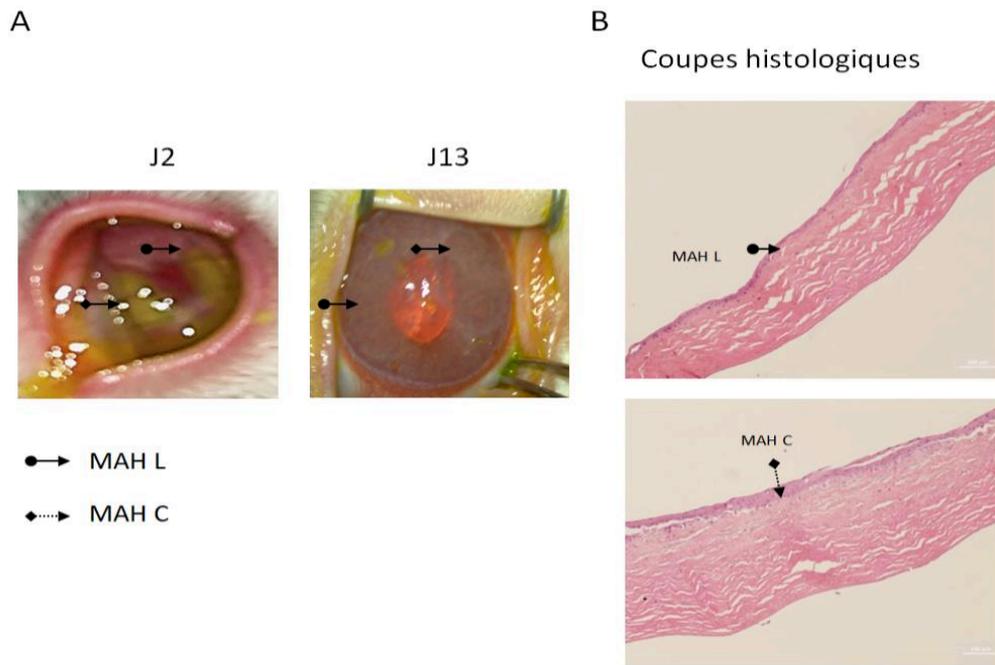
Le deuxième protocole a été réalisé sur 12 lapins. 2 ulcères ont été créés sur l'œil gauche de chaque lapin. Un ulcère a été greffé avec la MAH C et un avec la MAH L (figure 32 A). Les observations du premier lot de greffe ont montré la formation d'une fine couche de cellules épithéliales sur la cornée greffée. Afin d'observer si cette épithélialisation donnait un épithélium plus épais à plus long terme dans le deuxième protocole, les lapins ont été gardés plus longtemps, 13 (n=6) et 20 (n=6) jours (figure 32 B). Toutes les membranes ont également été suturées.



**Figure 32 Protocole 2 des greffes des MAH L et des MAH C.**

(A) Schéma de la greffe, (B) protocole de suivi de la greffe. Les greffes de MAH L et de MAH C ont été réalisés chez 12 lapins après ulcération. Une pommade Sterdex (anti-inflammatoire et antibactérienne) a été appliquée 1 fois par jour pendant 4 jours. L'épithélialisation a été vérifiée par instillation d'une goutte de fluorescéine à J2, 4 et 10 ou 13. La fin du protocole est à J13 pour n=6 lapins et J20 pour n=6 lapins.

Le suivi de l'épithélialisation avec la fluorescéine a montré que l'épithélialisation commence par la périphérie entre J2 et J4 puis devient complète entre 10 et 13 jours, pour 8/12 greffes de MAH L et pour 9/12 greffes de MAH C (figure 33 A). 3/12 des greffes de MAH C avaient été complètement épithélialisées à la fin du protocole (J20). 2/12 MAH L n'avaient pas été épithélialisées à la fin du protocole de 13 jours et 2 autres à la fin du protocole de 20 jours. Nous avons également observé que deux lapins montraient des signes d'angiogenèse au niveau de la périphérie des MAH L et MAH C à J7, ces signes avaient régressé à J13. Au niveau histologique 11/12 MAH L et 11/12 MAH C ont été observées (figure 33 B).



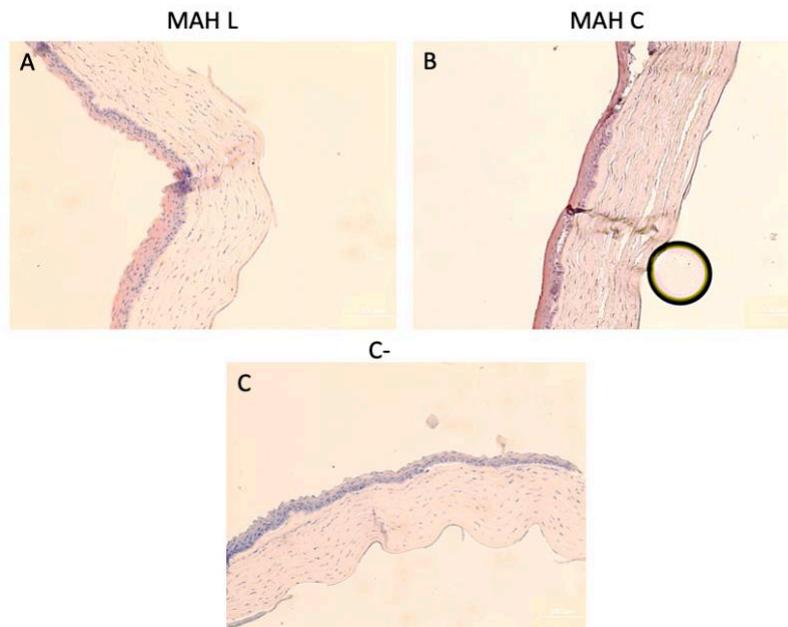
**Figure 33 Suivi d'épithélialisation de la cornée et coupe histologique du protocole 2.**

L'ulcère greffé avec la MAH L est indiqué avec ●→ et l'ulcère greffé avec la MAH C est indiqué avec ◆→. (A) Suivi de l'épithélialisation des cornées greffées avec la MAH L (n=12) et la MAH C (n=12). (B) Coupes histologiques et coloration HES représentative de 11/12 MAH L et 11/12 MAH C.

Au cours du protocole, les lapins n'ont pas montré de signe d'inflammation visible et les MAH semblent être bien tolérées.

#### Immunohistochimie

Le suivi des greffes et les analyses histologiques ont montré une épithélialisation des cornées à la suite des différentes greffes de MAH. L'aspect des cellules en coloration HES montre bien un épithélium stratifié. Afin d'observer si ces cellules sont bien différenciées au niveau supra-basale en CEC comme dans une cornée normale, le marquage des CEC a été réalisé par immunohistochimie (figure 34).



**Figure 34** Expression de la CK3 par les cellules épithéliales à la suite des greffes de MAH L et de MAH C.

. L'expression de la CK3 est observée chez les cornées greffées avec la MAH L et la MAH C issues des différents protocoles. (A) épithélialisation par la MAH L, (B) épithélialisation par la MAH C et (C) contrôle négatif.

Nous avons observé l'expression de la CK3 au niveau intermédiaire et supra-basale de l'épithélium cornéen des lapins. Ces résultats montrent que les MAH n'altèrent pas la bonne différenciation des CEC.

### 1.3. CONCLUSION

Nous avons en premier lieu mis au point la culture des CEC en plaque. La mise au point de la culture des CEC n'a pas été simple. Le nombre faible de cellules obtenues par les deux méthodes a été un facteur limitant dans nos analyses. Malgré ce nombre faible de cellules, les cellules en cultures avaient bien un aspect épithélial et exprimaient les marqueurs des CEC.

Par la suite, afin de comparer la capacité d'épithélialisation des MAH C et MAH L, nous avons mis en culture les explants de cornée sur ces membranes en respectant les conditions de culture des CEC que nous avons mises en place. Une des problématiques auxquelles nous nous sommes confrontés était que même fixées par des inserts, les micromouvements au sein de la culture rendaient la migration et l'adhésion des CEC sur les MAH difficile. Malgré cela, une migration des CEC a été observée sur les MAH par la méthode explant.

Les analyses d'IF ont montré l'expression de la CK3 par ces cellules. Cependant le nombre faible de cellules n'a pas permis de confirmer l'expression au niveau transcriptionnel des ARN codants pour la CK3 et la CK12.

Au niveau structurel le processus de lyophilisation a complètement désorganisé les protéines de la MEC au niveau du stroma des MAH. La congélation quant à elle a conservé de façon beaucoup plus importante la structure des protéines de la MEC.

Le taux total des protéines semblait être différent entre les 3 lots analysés, mais est resté cependant très semblable entre les MAH C et les MAH L de chaque lot. Les analyses des protéines d'intérêt par ELISA n'ont également pas montré de différence significative entre les MAH L et les MAH C issues de chaque lot. Cependant nous avons observé une variation d'expression de ces facteurs entre les différents lots.

En effet sur les 5 facteurs de croissance analysés le taux de 2 facteurs de croissance, l'HGF et le  $\beta$ -NGF, est resté inchangé dans la comparaison des deux méthodes de conservation. L'EGF et le KGF semblent être mieux conservés par la lyophilisation que par la congélation même si cette différence n'est significative que dans un lot.

L'analyse par *label-free* des extraits protéiques des MAH L et MAH C a permis de détecter un grand nombre de protéines. En moyenne, 584 protéines (détectées au minimum deux fois dans les échantillons) ont été identifiées dans les MAH L et les MAH C. 88 % des protéines identifiées sont en commun entre les MAH L et les MAH C. Ces résultats indiquent que la lyophilisation comparée à la méthode de référence (congélation) ne semble pas altérer les MAH.

D'un point de vue quantitatif, l'analyse différentielle a mis en évidence très peu de protéines différentiellement exprimées. Parmi les 57 protéines caractérisées, 42 protéines sont surreprésentées dans les MAH L et 15 protéines sont surreprésentées dans les MAH C. Nous n'avons pas retrouvé de protéine ayant un rôle important dans la cicatrisation parmi les protéines surreprésentées dans les MAH C. Concernant les protéines surreprésentées dans les MAH L nous avons retrouvé le TGF- $\beta$ 1, ce qui est en cohérence avec les résultats de l'ELISA. Nous avons également observé que deux protéines, la *Procollagen galactosyltransferase* et la EMILIN-1, ayant un rôle dans le processus d'adhésion cellulaire sont surreprésentées dans les MAH L.

L'ensemble des résultats des analyses protéomiques couplé aux résultats obtenus lors de l'analyse de l'expression des facteurs de croissance démontrent que la lyophilisation et la

congélation sont 2 méthodes sensiblement équivalentes en ce qui concerne la dégradation de la MAH au niveau protéique. Nos résultats vont également dans le sens de l'hypothèse selon laquelle la lyophilisation préserve mieux les propriétés protéiques des MAH que la méthode de référence.

Afin de valider la capacité de la MAH L à épithélialiser la cornée des greffes de MAH ont été réalisées chez le lapin. Au cours du protocole *in vivo*, les résultats de la greffe de la MAH chez le lapin n'ont pas montré de signe visuel d'inflammation. Nous n'avons également pas remarqué de différence entre la vitesse d'épithélialisation des MAH L et MAH C. Dans les deux cas l'épithélium reformé exprime bien la CK3. Cependant même à 20 jours après la greffe nous observons que l'épithélium reste assez fin, cela est également observé chez les MAH C.

La MAH C est actuellement utilisée en clinique et donne de très bons résultats. Nos résultats ne montrent pas de différence entre la vitesse de ré-épithélialisation des MAH L et MAH C. Afin de pouvoir valider ces résultats un plus grand nombre de placentas doivent être analysés.

## 2. Étude II MAPPING DE LA MEMBRANE AMNIOTIQUE

### **Mapping of proteomic profile and effect of the spongy layer in the human amniotic membrane**

Parvin NAZARI HASHEMI<sup>1</sup>, Fanny CHAVENTRE<sup>2</sup>, Aurelie BISSON<sup>1, 3</sup>, Julie GUEUDRY<sup>2</sup>, Olivier BOYER<sup>1, 3</sup> and Marc MURAINÉ<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup>Normandie Université, UNIROUEN, IRIB, INSERM, U1234, Rouen, France ; <sup>2</sup>Rouen University Hospital, Department of Ophtalmology, Rouen, France <sup>3</sup> ; Rouen University Hospital, Laboratory of Biotherapy, Rouen, France

#### **Introduction**

The Human Amniotic Membrane (HAM) is the inner layer of the placenta, which surround the fetus and is in contact with the amniotic liquid. The HAM has been used for a long time in the treatment of chemical skin burn (Davis 1910) and since 1999 widely used in corneal ulcer (Kim and Tseng 1995). This biological material has anti-inflammatory and antiangiogenic properties by expressing molecules like IL10 and Thrombospondin-1 (Hao et al. 2000) . Its basal membrane composed of collagen III, IV, V and VI, fibronectin and laminin plays a role as matrix for cell growth (Schmidt 1992; Malak et al. 1993; Parry and Strauss 1998). The presence of growth factors like EGF, HGF, KGF, NGF and TGF beta1 in HAM, which plays an important role in promoting of cell growth and proliferation in the process of wound healing, is the other interesting feature of use HAM in the process of wound healing (Koizumi et al. 2000). TGF beta plays a regulatory role in tight junction expression, HGF activates the proliferation of epithelial cells (Pierucci-Alves et al. 2012; Miyagi et al. 2018). NGF accelerates the process of wound healing by binding to its receptor TrkA present in the cornea (Lambiase et al. 2000). KGF is involved in the acceleration of wound healing process by increasing the proliferation of epithelial stem cell in the limbus area and EGF promotes cell migration and proliferation ( Sotozono et al. 1995; Wang et al. 2013). All these described properties make the amniotic membrane a very interesting biological tissue for tissue therapy in ophthalmology.

In conventional method for clinical use, the HAM is denuded from its spongy layer and is fractionated in different sample positioned on nitrocellulose membrane and frozen at -80 ° C until graft. The results of graft are not always constant and in certain patient with severe

ocular burns the processes of wound healing are not effectively done in the cornea (Joseph et al. 2001; Clare et al. 2012).

It seems to be important to understand why this heterogeneity occurs in the response to human amniotic membrane graft in certain patient. To our knowledge, there are no studies which were interested in the question of inter or intra donor difference of growths factor expression in HAM. For that the aim of our study was to provide a general view of this protein expression in the HAM by 2 making a mapping of these growth factors in order to determine if there were sites to privilege in the whole amnion for graft according to the severity of the ulcer. In addition to see if there is an intra-donor difference in HAM growths factor expression the variety of protein expression between different placentas was also studied, the intra-donor variation could explain the difference in the processes of wound healing in some patient.

We also were interested in spongy layer; this layer is an intermediate layer between the chorion and the amnion which is removed in the process of preparing the human amniotic membrane patch for grafts (Mamede et al. 2012) . It's supposed that this layer can be an important source of growth factors like it's already known for TGF beta (Hopkinson et al. 2006) . We think that it seems important to know if by removing the spongy layer we deprive the HAM patch from an important source of growth factor which was beneficial for the process of wound healing in patient's cornea.

The result of the mapping of HAM will determine if it is better to use a specific zone of the amnion, with or without spongy layer, for graft (GAM) in patients with more serious corneal ulcers.

### **Materials and methods:**

#### Amniotic membrane procurement and handling:

For this study, human placentas were obtained from healthy women, not usable for clinical use, after vaginal delivery (n=4) or caesarean section (n=2) after signing the consent form. Local ethics committee approval was obtained, and the study complied with the tenets of the Declaration of Helsinki.

The placentas were handled under laminar flow hood after being treated with antibiotic (0.2 µg/mL + penicillin and amoxicillin) for 24h. The placenta is washed with PBS and the chorion layer is separated. Then the amnion is divided in 2 equal parts, one containing its spongy

layer and another without its spongy layer (conventional part). Each part is turned over and spread on a stainless steel cup of 200 mm in diameter and divided in 3 zones depending on the distance from the umbilical cord and 7 patches of 3 cm<sup>2</sup> were obtained from each zone. The spongy layer removed from the conventional part was also kept for protein analysis. The schema of amnion handling is explained in Fig.1a.

Protein extraction patches were immediately put in precellys lysing tube (Bertin Technologie, France) pre filled with RIPA buffer (Sigma, France) containing protease inhibitor (Thermo fisher, France). They were lysed mechanically using the Precellys lysing Kit (Ozym). The lysis product was transferred into 3 Eppendorf and centrifuged at 16000 g for 7 min 30. The supernatant containing proteins was stored at -80°C for analysis.

#### Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

The proteomic analysis done by ELISA targeting growth factors EGF, HGF, KGF, NGF and TGF- $\beta$ 1 and the pro inflammatory cytokine TNF- $\alpha$  (Biotechne, R&D systems, France) using the commercial protocol. Briefly the capture antibody was coated over night at room temperature. The capture antibodies were incubated in blocked solution for one hour. After that the protein extracted from each patch were incubated two hours and the second antibody was added. Streptavidin-HRP was added and incubated for 20 min at room temperature. The result is revealed by adding stabilized hydrogen peroxidase and stabilized tetramethylbenzidine (1/1) and the reaction is stopped with 2N sulfuric acid. The optical density is read in 450 nm by Multiskan FC microplate reader (Thermo Fisher, France).

#### Statistical analysis

Data from different experiments were analyzed using GraphPad Prism<sup>®</sup> software v.5.00. The statistical tests performed were two-way ANOVA with a Bonferroni post-test. \* p value <0.05, \*\* p value <0.01, \*\*\* p value <0.001.

### **Results:**

#### Variability of total protein amount in the HAM

We were interested to know if there is a difference in total protein amount between donors (inter donors difference), and are these differences seen between caesarian and natural birth. The process of HAM handling is schematically represented below (Fig.1).

The mean of protein extract from the part with the spongy layer, shows a large variation of inter donor's protein amount and not just between caesarean and natural birth (Fig.2a).

To know further about the eventually interest of keeping the spongy layer, we compare the conventional part (without spongy layer) with its spongy layer. We observed that the spongy layer provided a greater amount of protein; however this difference is statically significant only in HAM5 (Fig.2b).

We also observed this same tendency of the spongy layer to contain more protein, between the different zones in comparison with the protein levels extract from conventional patch in these same zones (Fig.2c).

Taken together these results showed inter donor difference in total protein extract; the total amount of protein seems to be more important in the spongy layer in one of five amnions.

Thus we investigated whatever the same variation of total protein expression, between different donors and zones of HAM was also observed in the amount of growth factors (GF) that play roles in process of wound healing. Thereafter, in order to realize the mapping of these factors, we studied their expression in the different zone of the HAM and the spongy layer. We observe that there is no significant difference in the amount of GF per mg of total protein in conventional HAM and in the spongy layer and also that there is no difference whether one is in the middle center or the periphery (Fig.3).

We also do not see a variation of HGF, NGF and TGF beta 1 in the conventional HAM and or spongy layer in different donors (supplementary Fig.1). The main GF express in the HAM are HGF and EGF, but in the spongy layer no presence of EGF was detected in our study. This result suggests that the spongy layer can bring more GF of intereste (excepted EGF) and it would be interesting to keep this layer for faster and better wound healing process.

#### Effect of proinflammatory cytokine TNF alpha in the rate of HAM growth factors

In the process of pregnancy the pro-inflammatory cytokines rate changes (Christian and Porter 2014). So we sought to understand if this variation of pro-inflammatory cytokines had an effect on the rate of growth factor in the HAM. This information is helpful in the way that it can guide to detect one parameter that can be chosen to help to select a HAM with more growth factor and so a better and faster wound healing process in severe ulcer.

In our study, we were interested in the pro-inflammatory cytokine TNF alpha which seems to be express in all placentas (Basu et al. 2016). We analyze if its expression is different in placenta from caesarean (HAM1 and 2) and natural birth (HAM 3-5) (Fig.4a). We

observe a low expression of TNF-alpha in the HAM and there is no difference in its expression in HAM from caesarean and spontaneous delivery. We also do not see any correlation in the amount of TNF-alpha present in HAM and the growth factors of interested (Fig.4b). We conclude that the pro-inflammatory cytokine TNF-alpha can't be a marker to choose the placenta with more growth factors in it.

Effect of different delivery and mother parameters in the amount of HAM growth factors

Then we were interested to know if there is any correlation between different donor's parameters and the growth factor of interested. We found a correlation between the KGF and NGF with the time of labor, this correlation seems to be more important with NGF, and no correlation with others GF (Fig.5). We also do not find any correlation between the donor age, gestational age and the level of HGF, EGF, KGF, NGF and TGF beta (Supplementary Fig.2). Taken together, these data suggest that the expression of growth factor in placenta is variable and donors dependent.

#### **Discussion:**

The graft of human amniotic membrane is a well-known graft use for wound healing in the cornea. The wound healing process with amniotic membrane graft can take longer in some patients and may give less effective results. This difference in wound healing can be caused by difference of expression of growth factor important in this process due to inter or intra donor variation. For that, in this study, we were investigating if the protein expression in the amniotic membrane is hetero or homogenous. To our knowledge, there are no studies of mapping of human amniotic membrane for all those growth factors. We also quantify the growth factor expression in HAM handled conventionally (without spongy layer) and the spongy layer. The importance of protein expression in this layer is not well known.

In this study, we observed significant difference in the total amount of protein extract between the different donors. We do not observe a significant difference in the GF level between the conventional HAM and the spongy layer, this result suggest that the amount of GF in the spongy layer is as important that in conventional HAM. This amount of growth factors in spongy layer can potentially lead to a better wound healing process in patient. Hopkinson et al.2006 had shown that TGF beta1 is the most isoform of TGF beta family found in human placenta but its rate is less in AM than in the chorion. They also found that there is a variation of TGF beta in different donors. In this study, we choose to measure the

TGF beta 1 which is the most isoform expressed in placentas as said above. In our founding the expression of TGF beta 1 is not significantly different in conventional HAM and the spongy layer. So in the process of handling the removal of the TGF beta 1 present in this layer may have no effect in the wound healing process.

The rate of TGF beta found in our study was low, which is beneficial because of its simulative affected on expression of some MMP by human corneal epithelial (Kim et al. 2004,)), but its presence is also important because of its role in regulation of tight junction protein expression and distribution (Contreras-Ruiz et al. 2012).

Gicquel et al. 2009 also show the inter donor variation of EGF and its variation of expression in different zone of placenta (Gicquel et al. 2009). In our results we also observe the inter donor variation, but we do not find a significant difference in expression of growth factor in different zone of HAM.

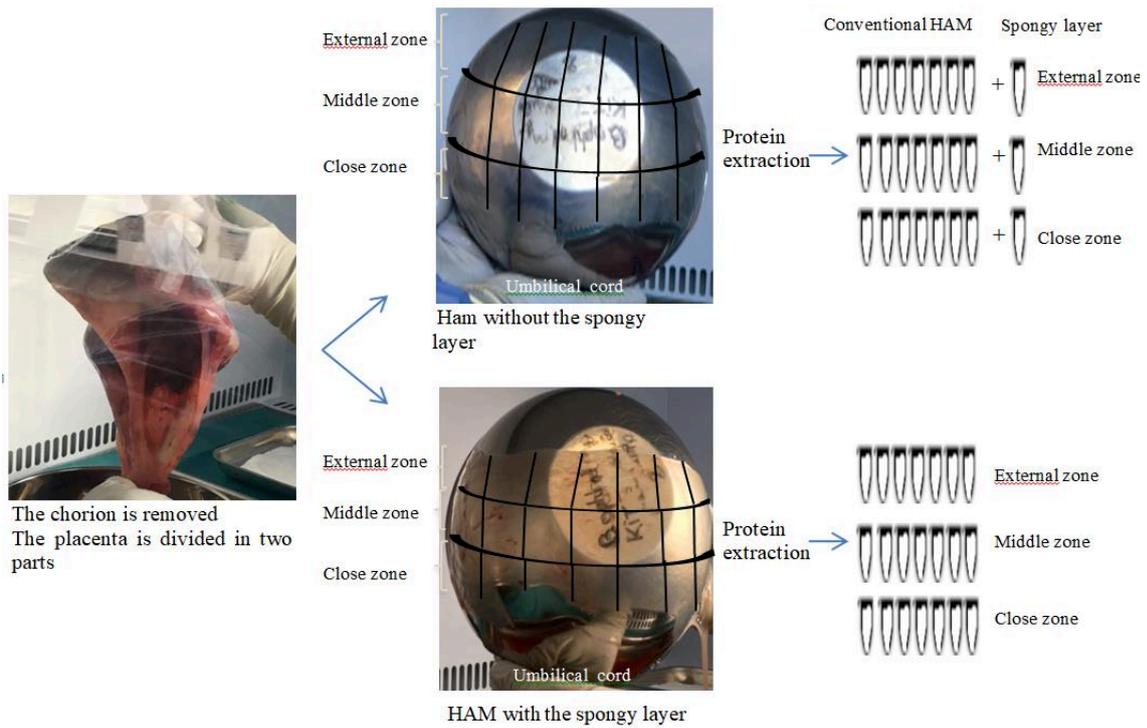
No variation was observed in the expression of HGF, KGF and NGF in different zone of HAM and neither between conventional HAM and spongy layer in each zone.

Mitchell et al., 1990 have demonstrated that release of TNF-alpha can stimulate the production of prostaglandin in placenta, in our study we verified if this cytokine can have an effect in the growth factors of interest but the result does not show a correlation in their expression (Mitchell et al. 1990). Lopez et al show that the gestational age and the donor age influence the growth factor levels (López-Valladares et al. 2010). In our study we also looked at different parameters, time of labor, gestational age, age and number of births that can play on all these GF in order to find a criterion of HAM selection that will be richer in growth factors. We have not seen a correlation between these different parameters and the level of GF expression.

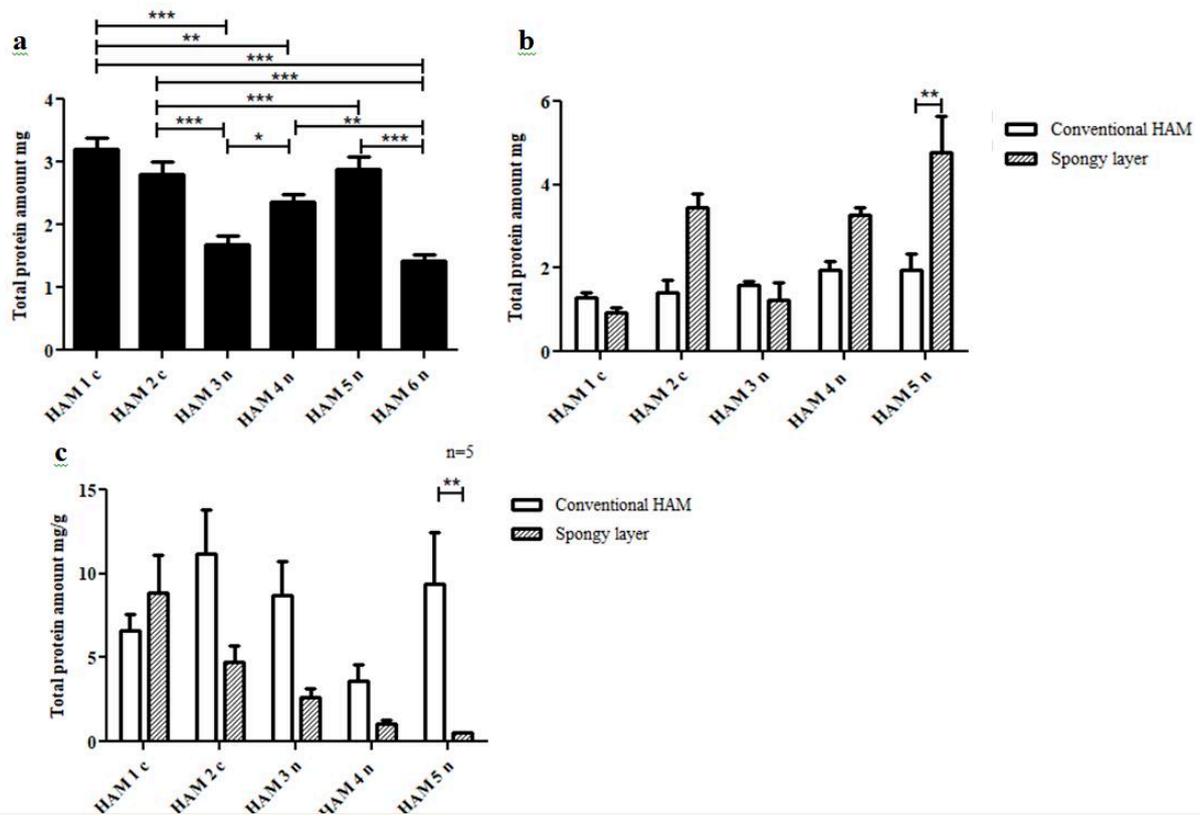
In conclusion, in our study we demonstrated that keeping the spongy layer in conventional method of handling HAM can add more GF, and so probably have a positive affect the wound healing process. Variation in some growth factors expression has been observed between the placentas and therefore this may explain the variation in clinical results. No indicator for the selection of placentas with a higher rate of growth factor was found.

**Acknowledgments**

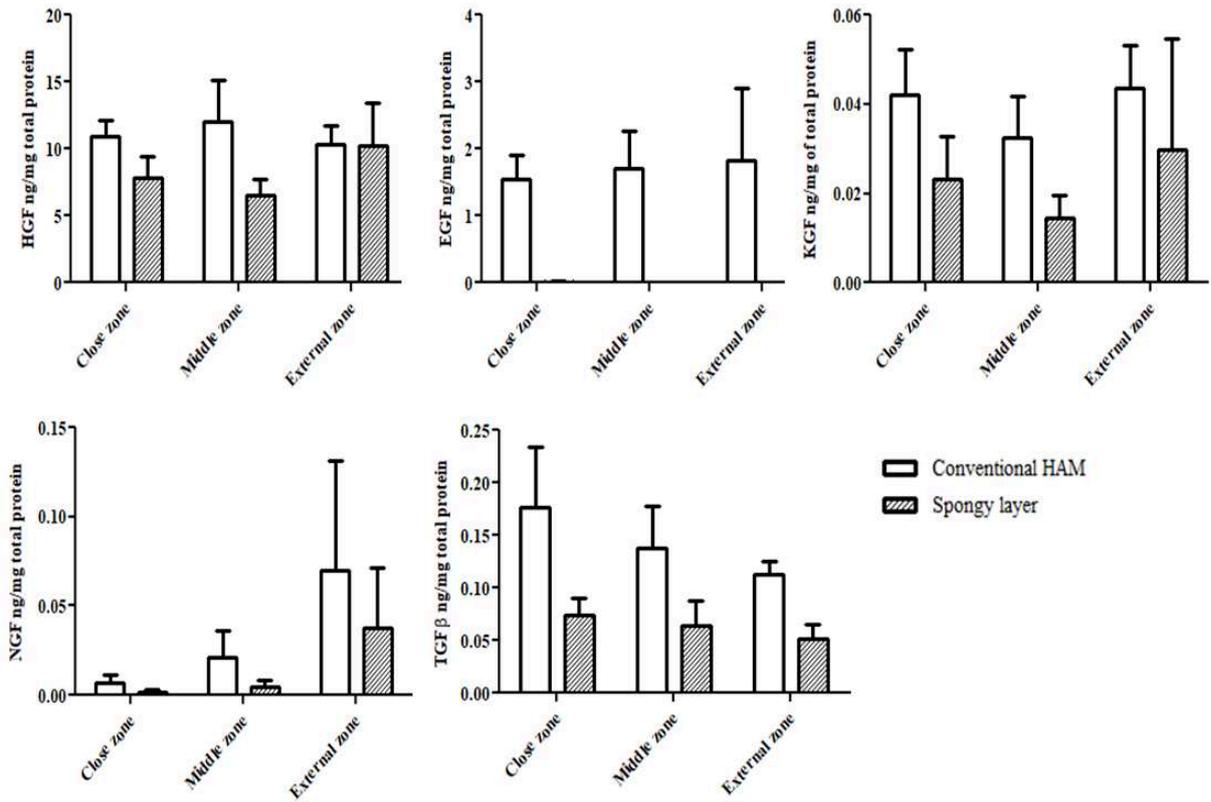
Thanks to Charlotte QUETTEVILLE for the help she has provided in recruiting placentas. This work was co-supported by European Union and Normandy Regional Council Europe gets involved in Normandy with European Regional Development Fund (ERDF).



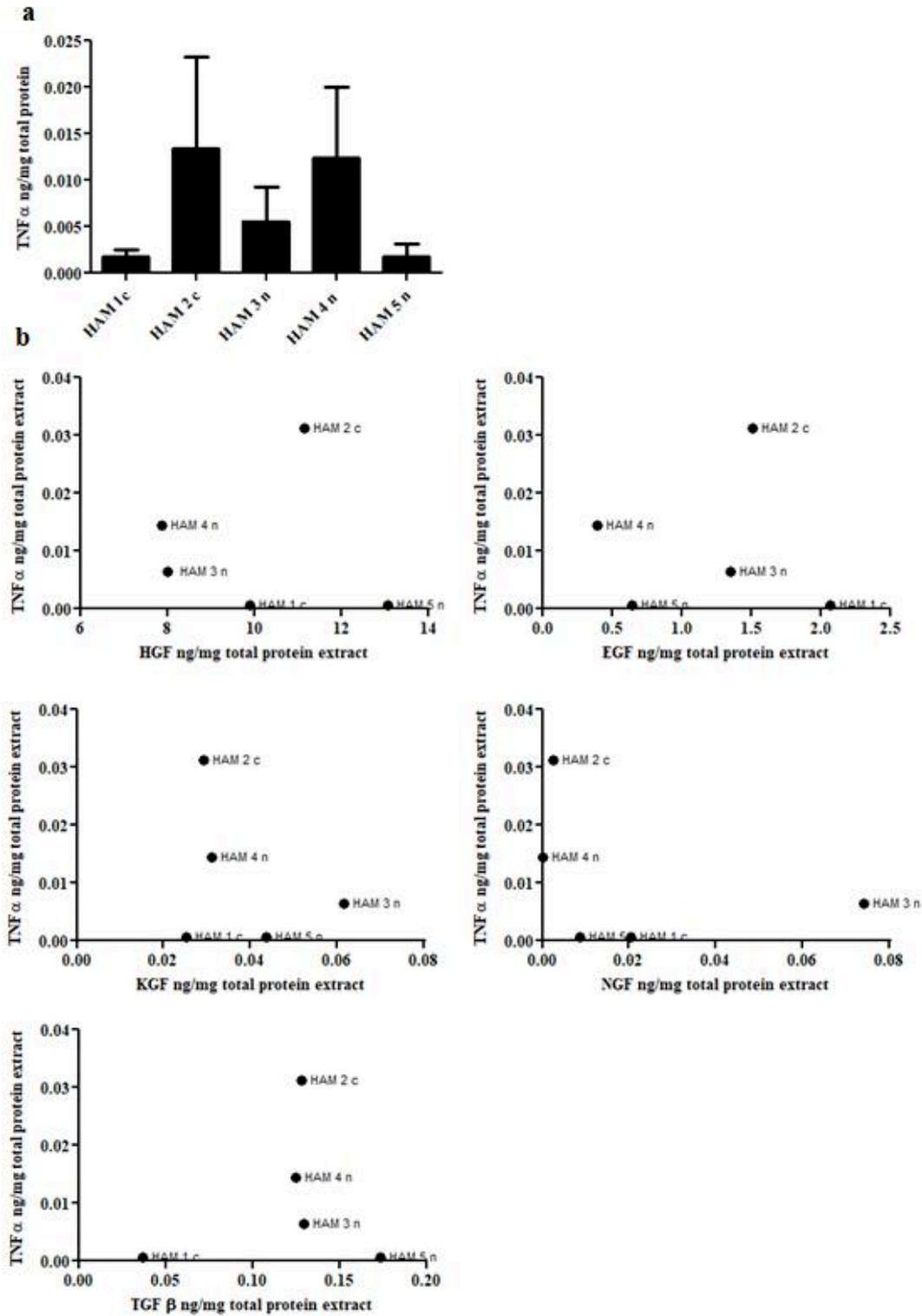
**Fig.1 Schema of amniotic membrane process for protein extraction.** To simplify the dissection and have a well spread Amnios, the HAM is turned over and spread on the convexity of a stainless steel cup. We used a stainless steel cup of 200 mm in diameter. The HAM has been cut in two equal parts and divided in 3 zones depending on the distance from the umbilical cord.



**Fig.2 Total protein amount extracted in Human Amniotic Membrane (HAM).** Totale amount of protein in differents HAM (n=6, HAM 1 and 2 from caesarean and HAM 3-6 from natural delivery) (**a**); Totale protein extracted in conventional HAM (without spongy layer) and its spongy layer (n=5, HAM 1 and 2 from caesarean and HAM 3-5 from natural delivery) (**b**); Total amount of protein in different zone of conventional HAM versus spongy layer from thoses zones (n=5, HAM 1 and 2 from caesarean and HAM 3-5 from natural delivery) (**c**). The data are present on average  $\pm$  SEM, ANOVA statistical test, bonferroni post test, \* p value <0.05, \*\* p value <0.01, \*\*\* p value <0.001.



**Fig.3 Growth factor expression in Human Amniotic Membrane (HAM) and spongy layer.** Totale amount of growth factor of interest in different zones of HAM (n=5). No difference in the level of growth factors (GF) of interest is seen in HAM and spongy layer. No significant difference of GF in different zones is seen. The data are present on average  $\pm$  SEM, ANOVA statistical test, bonferroni post test, \* p value <0.05, \*\* p value <0.01, \*\*\* p value <0.001.



**Fig.4 Effect of TNF alpha on the expression of growth factors implicated in wound healing process.** Expression of TNF-alpha in HAM from different donor (HAM 1 and 2 are from cesarean and HAM 3,4,5 from spontaneous delivery) (a); Correlation between TNF alpha and growth factors (b); Inter donors TNF alpha analyze is present on average  $\pm$  SEM, ANOVA statistical test, bonferroni post test, \* p value <0.05, \*\* p value <0.01, \*\*\* p value <0.001. Correlation datas are present on Pearson.

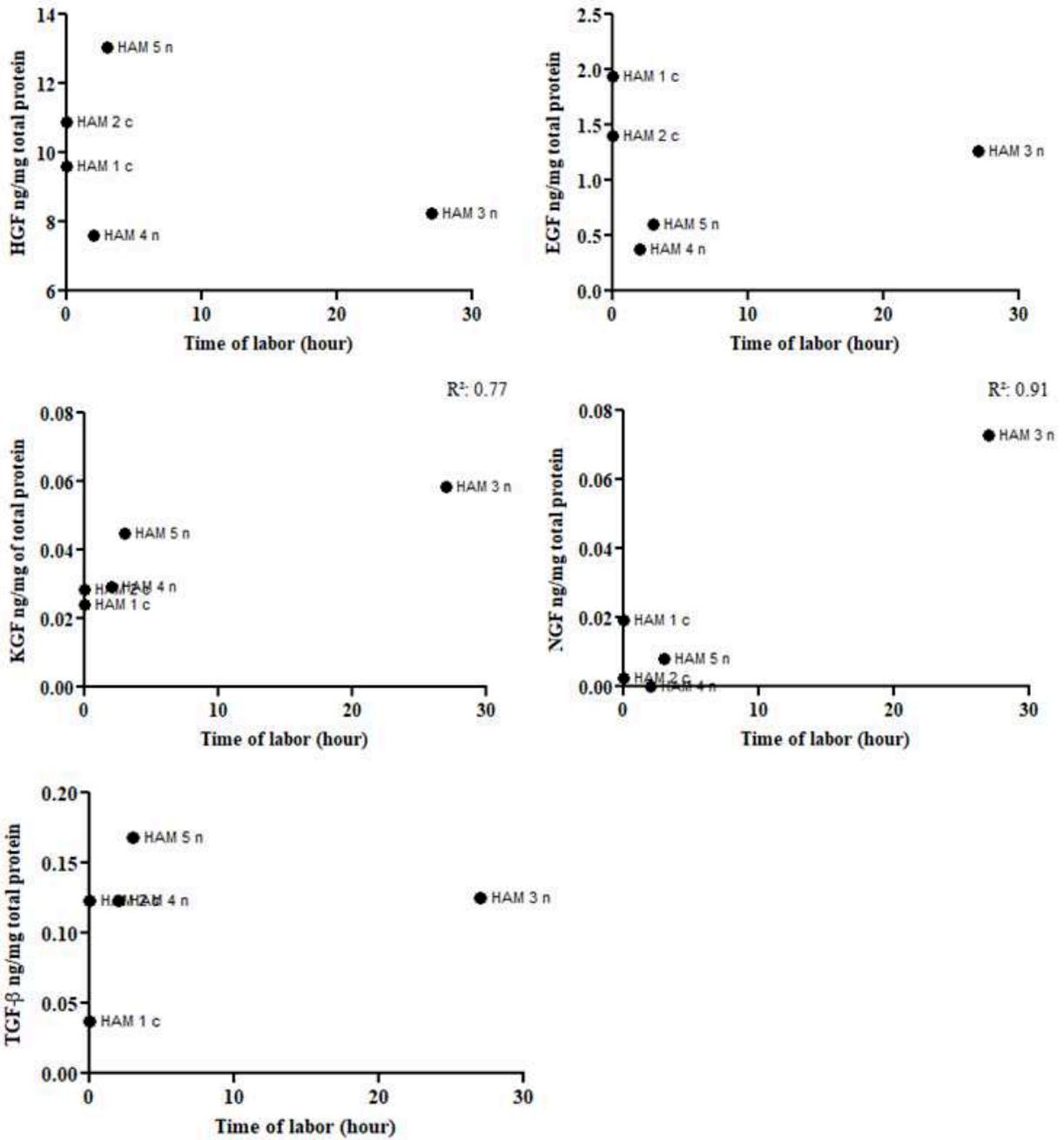
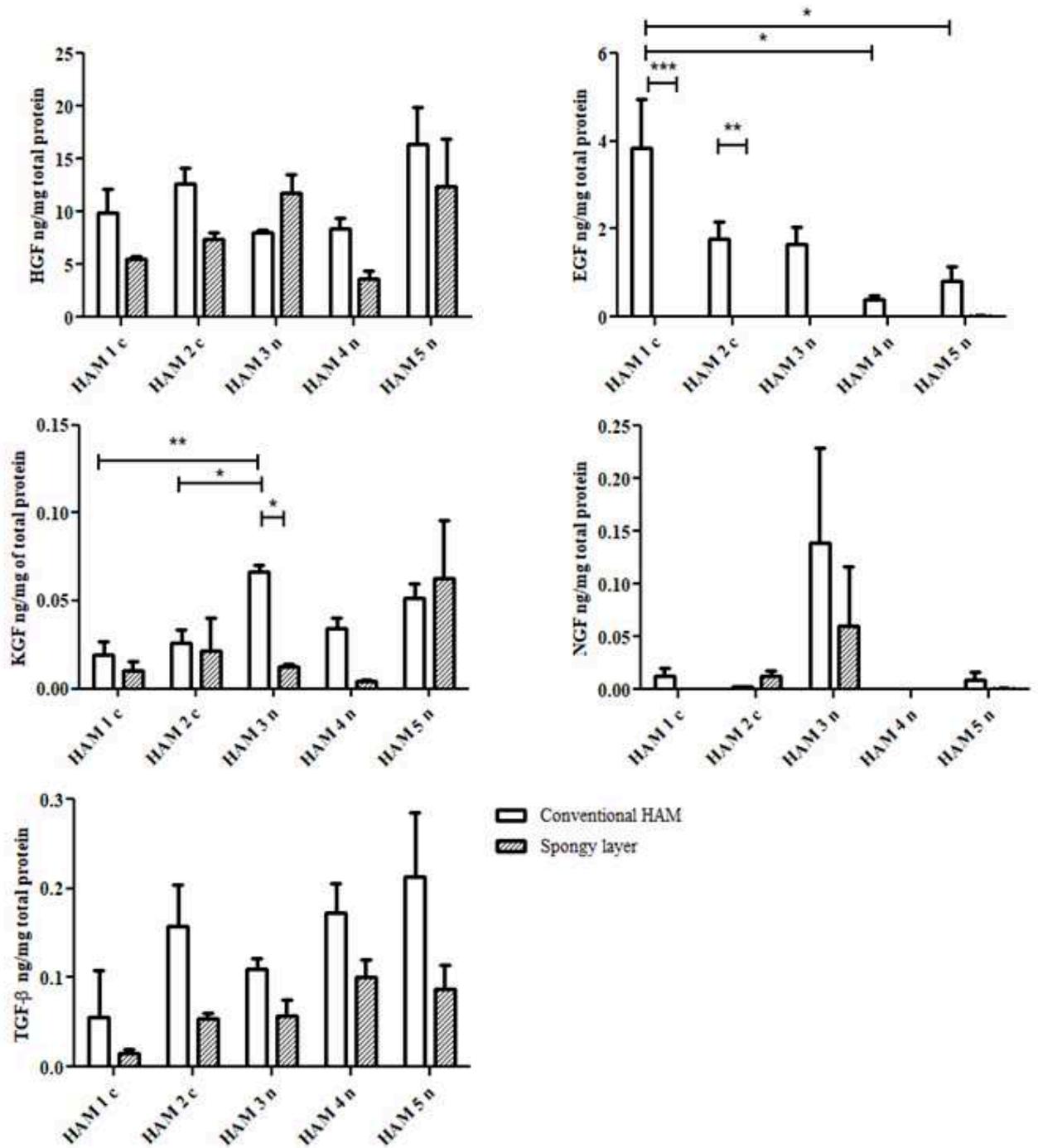
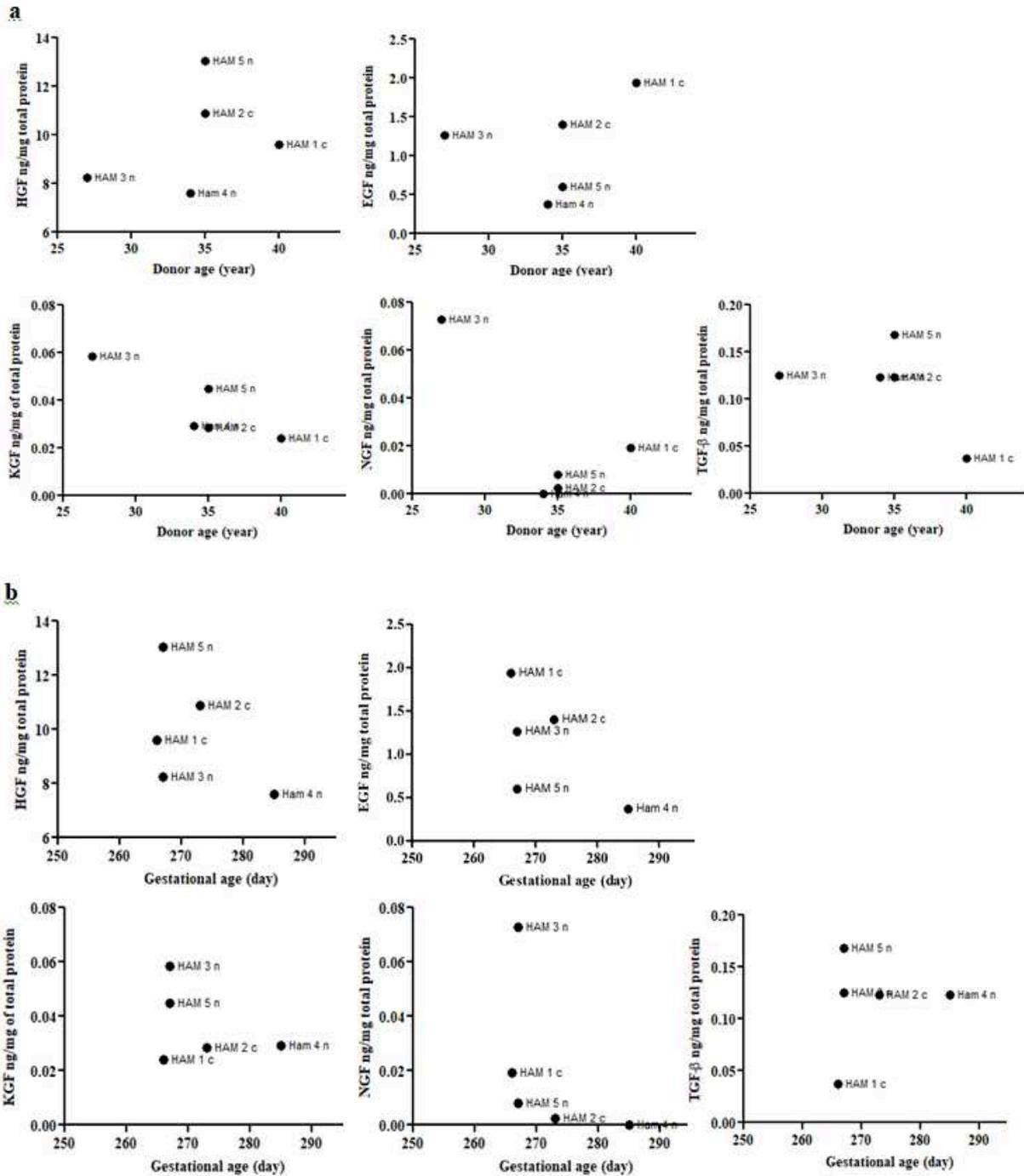


Fig.5 Correlation between time of labor and growth factors. The time of labor is demonstrated by hour. For caesarean the time of labor is equal 0 (n=5 placentas). Correlation data are present on Pearson.



**Supplementary Fig.1 Growth factors expression in the extract of different HAM and spongy layer.** Totale amount of growth factor of interest in the HAM of different donors (n=5). The data are presented on average  $\pm$  SEM, ANOVA statistical test, Bonferroni post test, Graphpad Prism software, \* p value <0.05, \*\* p value <0.01, \*\*\* p value <0.001.



**Supplementary Fig.2 Correlation between donor age (a), gestational age (b), with growth factors.** The time of labor is demonstrated by hours, zero for caserian and the gestational age in day (n=5). Correlation data are present on Pearson.

## Bibliography

Basu J, Agamasu E, Bendek B, et al (2016) Placental tumor necrosis factor- $\alpha$  protein expression during normal human gestation. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine* 29:3934–3938.

Christian LM, Porter K (2014) Longitudinal changes in serum proinflammatory markers across pregnancy and postpartum: Effects of maternal body mass index. *Cytokine* 70:134–140.

Clare G, Suleman H, Bunce C, Dua H (2012) Amniotic membrane transplantation for acute ocular burns. *Cochrane Database of Systematic Reviews*.

Contreras-Ruiz L, Schulze U, García-Posadas L, et al (2012) Structural and Functional Alteration of Corneal Epithelial Barrier Under Inflammatory Conditions. *Current Eye Research* 37:971–981.

Davis JW (1910) Skin transplantation with a review of 550 cases at the Johns Hopkins Hospital. *Johns Hopkins Med J* 15:307–396

Gicquel J-J, Dua HS, Brodie A, et al (2009) Epidermal Growth Factor Variations in Amniotic Membrane Used for Ex Vivo Tissue Constructs. *Tissue Engineering Part A* 15:1919–1927.

Hao Y, Ma DH, Hwang DG, et al (2000) Identification of antiangiogenic and antiinflammatory proteins in human amniotic membrane. *Cornea* 19:348–352

Hopkinson A, McIntosh RS, Tighe PJ, et al (2006) Amniotic Membrane for Ocular Surface Reconstruction: Donor Variations and the Effect of Handling on TGF- $\beta$  Content. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 47:4316.

Joseph A, Dua HS, King AJ (2001) Failure of amniotic membrane transplantation in the treatment of acute ocular burns. *British Journal of Ophthalmology* 85:1065–1069.

Kim H-S, Shang T, Chen Z, et al (2004) TGF- $\beta$ 1 stimulates production of gelatinase (MMP-9), collagenases (MMP-1, -13) and stromelysins (MMP-3, -10, -11) by human corneal epithelial cells. *Experimental Eye Research* 79:263–274.

Kim JC, Tseng SC (1995) Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas. *Cornea* 14:473–484

Koizumi N, Inatomi T, Sotozono C, et al (2000) Growth factor mRNA and protein in preserved human amniotic membrane. *Current Eye Research* 20:173–177.

Lambiase A, Manni L, Bonini S, et al (2000) Nerve Growth Factor Promotes Corneal Healing: Structural, Biochemical, and Molecular Analyses of Rat and Human Corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41:1063–1069

López-Valladares MJ, Rodríguez-Ares MT, Touriño R, et al (2010) Donor age and gestational age influence on growth factor levels in human amniotic membrane. *Acta Ophthalmologica* 88:e211–e216.

Liu CY, Kao WWY (2015) Corneal Epithelial Wound Healing. p12.

Malak TM, Ockleford CD, Bell SC, et al (1993) Confocal immunofluorescence localization of collagen types I, III, IV, V and VI and their ultrastructural organization in term human fetal membranes. *Placenta* 14:385–406.

Mamede AC, Carvalho MJ, Abrantes AM, et al (2012) Amniotic membrane: from structure and functions to clinical applications. *Cell Tissue Res* 349:447–458.

Mitchell MD, Edwin S, Romero RJ (1990) Prostaglandin biosynthesis by human decidual cells: effects of inflammatory mediators. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 41:35–38

Miyagi H, Thomasy SM, Russell P, Murphy CJ (2018) The role of hepatocyte growth factor in corneal wound healing. *Experimental Eye Research* 166:49–55.

Parry S, Strauss JF (1998) Premature Rupture of the Fetal Membranes. *New England Journal of Medicine* 338:663–670.

Pierucci-Alves F, Yi S, Schultz BD (2012) Transforming Growth Factor Beta 1 Induces Tight Junction Disruptions and Loss of Transepithelial Resistance Across Porcine Vas Deferens Epithelial Cells. *Biol Reprod* 86:. doi: 10.1095/biolreprod.111.092262.

Schmidt W (1992) The amniotic fluid compartment: the fetal habitat. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 127:1–100.

Sotozono C, Inatomi T, Nakamura M, Kinoshita S (1995) Keratinocyte growth factor accelerates corneal epithelial wound healing in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36:1524–1529.

Wang L, Wu X, Shi T, Lu L (2013) Epidermal Growth Factor (EGF)-induced Corneal Epithelial Wound Healing through Nuclear Factor  $\kappa$ B Subtype-regulated CCCTC Binding Factor (CTCF) Activation. *J Biol Chem* 288:24363–24371.

### **3. Étude III IMPLANTATION DE LA MATRICE DE COLLAGÈNE**

Cette étude est une collaboration avec le Dr Gervaise MOSSER de l'Université Paris 6, financée par la Satt Lutech. Le but est d'analyser la biocompatibilité des matrices de collagène du type I conçues par le Dr Gervaise MOSSER, dans la cornée. Comme précisé précédemment la cornée est un tissu très riche en collagène surtout au niveau de son stroma. Le développement de l'utilisation de ces matrices constituées seulement de collagène et transparente pour une implantation en Inlay ou Onlay peut être intéressant dans le cas des altérations du stroma. Pour cela les matrices ayant différentes concentrations ont été implantées au niveau de la cornée chez 12 lapins.

#### **3.1. MATÉRIELS ET MÉTHODES**

##### **3.1.1. Implantation de matrice de collagène**

Les matrices ont été préparées à partir de collagène de type I à différentes concentrations (40, 60, 80 et 100 mg/mL) par le Dr MOSSER à l'Université Paris 6 et envoyées au sein de notre unité de recherche.

Le modèle utilisé était le lapin New Zealand [Charles Rivers].

L'acte chirurgical s'est fait au sein de l'animalerie centrale située sur le Campus de Mont-Saint-Aignan.

Le protocole d'implantation des cornées a été réalisé de la façon suivante :

Dans le cadre d'une anesthésie générale, l'isoflurane [Belamont] à 5% pour l'induction et à 2.5% pour le maintien ont été utilisés. Du fait de la courte durée de l'anesthésie, le gaz utilisé avec l'isoflurane était l'air comprimé.

Les lapins ont été opérés uniquement sur l'œil gauche, l'autre œil étant nécessaire à la bonne qualité de vie du lapin.

La procédure chirurgicale a été réalisée par le Pr Marc MURAINÉ sous microscopie opératoire. Après la désinfection locale par Bétadine ophtalmique 5% [MEDA] le blépharostat a été mis en place. Une anesthésie locale par collyre de chlorhydrate d'oxybuprocaine a été réalisée. Par la suite, pour les greffe Inlay, le chirurgien a réalisé une incision cornéenne jusqu'à la moitié de l'épaisseur de la cornée. Puis une dissection lamellaire à l'aide d'une spatule, créant ainsi une poche lamellaire intra stromale, a été réalisée. Concernant les greffes Onlay, une trépanation très superficielle de la cornée sur un

diamètre de 5 ou 6 mm a été réalisée, puis l'épithélium et le stroma antérieure ont été retirés à l'aide d'une spatule à dissection lamellaire.

Puis le lenticule de collagène de 6 mm a été glissé au niveau du stroma. Une injection sous conjonctivale de Kenacort [Retard Bristol-Myers Squibb] a été réalisée à la fin de l'opération.

Pour le réveil des lapins le masque d'anesthésie a été retiré et les lapins sont restés sous observation pendant environ 2 heures après l'opération.

Pour le suivi post-opératoire, les lapins ont reçu un traitement par une pommade ophtalmique anti-inflammatoire et antibactérienne, Sterdex [Théa], pendant une période de 2 semaines, une fois par jour. Les lapins ont été examinés plusieurs fois par semaine à l'œil nu ou avec un biomicroscope couplé à un système de photographie et de vidéo. La ré-épithélialisation a été vérifiée par instillation de fluorescéine 0.5% (SERB).

### **3.1.2. Histologie**

Après sacrifice des lapins, les cornées implantées ont été gardées dans du formol et fixées à la paraffine. Elles ont été coupées au microtome à 5 µm. La coloration habituelle à Hématoxyline Éosine (HE) a été réalisée. Ces étapes ont été réalisées au CHU de Rouen.

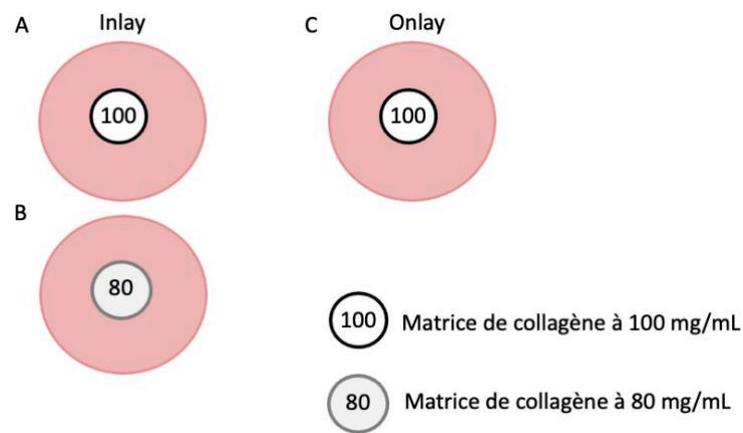
## **3.2. RESULTATS**

Le but de cette étude consistait à analyser la biocompatibilité des implants de matrice de collagène de type I au niveau du stroma cornéen. Ces matrices pourraient être des matériaux intéressants pour le remplacement du stroma. Pour cela les matrices ont été greffées chez 12 lapins de façon Inlay (n=6) ou Onlay (n=6). Plusieurs concentrations de matrices de collagène avaient été choisies, 40 mg/mL, 60 mg/mL, 80 mg/mL et 100 mg/mL. Les matrices avec des concentrations plus faibles pouvaient être plus facilement colonisées par les fibroblastes, cependant une concentration plus forte facilitait la manipulation de ces matrices. Les matrices avec des concentrations plus faibles que 80 mg/mL ont été très dures à manipuler car ces matrices avaient une tenue proche d'un gel. Pour ces raisons nous avons réalisé les greffes avec les matrices à 80 mg/mL et 100 mg/mL.

6 lapins ont reçu un implant de matrice de collagène de façon Inlay, dont 3 qui ont été implantés avec une matrice à 80 mg/mL et 3 avec une matrice à 100 mg/mL (figure 35 A et B). Les matrices avec une concentration à 80 mg/mL ont uniquement été utilisées pour les

greffes Inlay. Ce choix a été fait dans le but d'observer si cette concentration favorisait la colonisation de cette matrice par les fibroblastes.

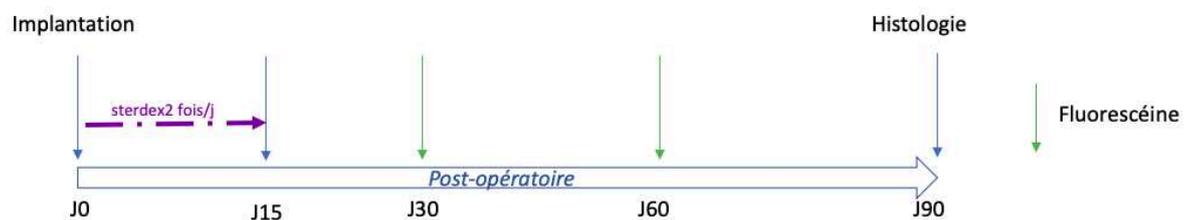
6 autres lapins ont reçu une implantation Onlay des matrices de collagène ayant une concentration à 100 mg/mL (figure 35 C).



**Figure 35 Schéma explicatif d'implantation Inlay et Onlay des matrices de collagènes.**

(A-C) Implantation Inlay des matrices de collagène (A) à concentration à 100 mg/mL, n=3. (B) à concentration à 80 mg/mL, n=3. (C) Implantation Onlay des matrices de collagène à concentration à 100 mg/mL, n=6.

Afin d'avoir une vue à long terme du comportement de ces matrices dans la cornée, les lapins ont été gardés 90 jours après l'opération. Ils ont reçu une pommade Sterdex deux fois par jour pendant deux semaines et l'état de l'œil des lapins a été vérifié approximativement toutes les 72 heures (Figure 36). Ces observations étaient dans le but de détecter si la matrice pouvait provoquer une gêne, une inflammation ou une opacité au niveau de la cornée des lapins. L'état d'épithélialisation des cornées a été vérifié tous les 30 jours avec la fluorescéine.

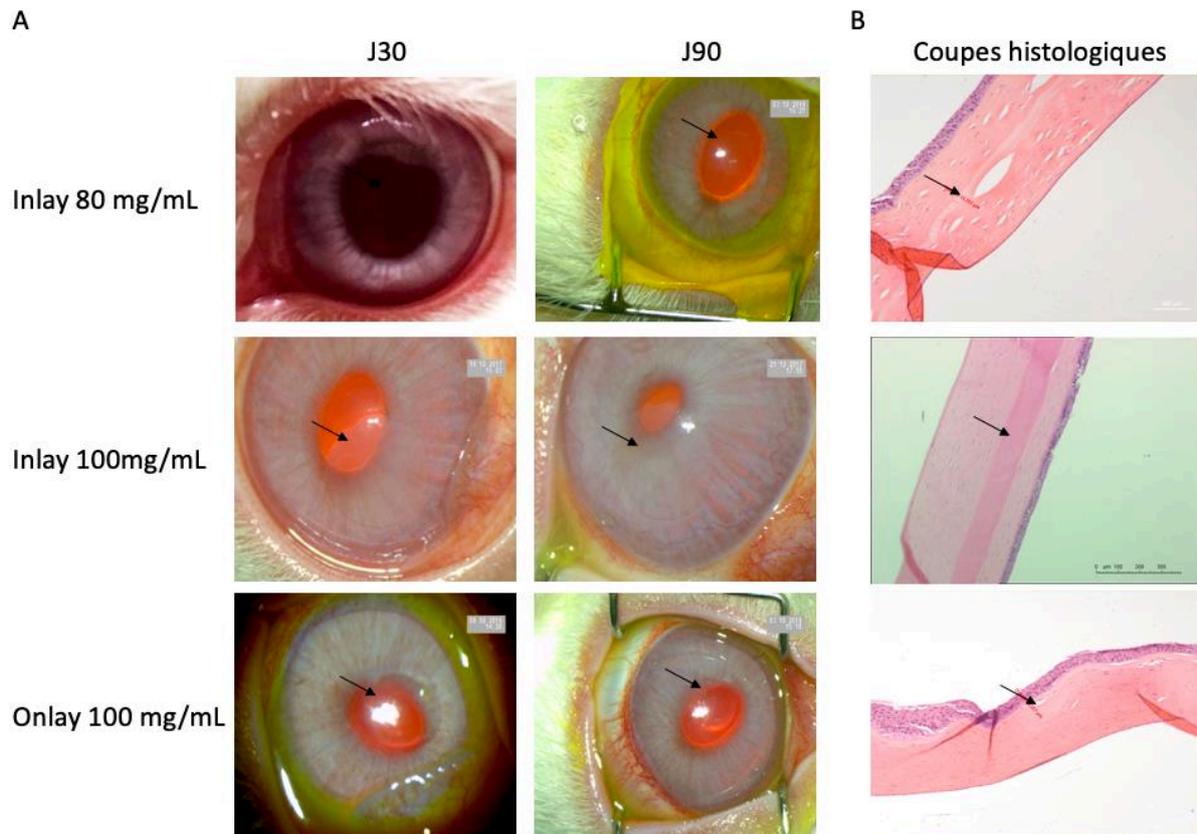


**Figure 36 Schéma explicatif du protocole d'implantation des matrices de collagène.**

Le protocole a été d'une durée de 90 jours. Les lapins recevaient du Sterdex (anti-inflammatoire et antibactérienne) tous les jours pendant deux semaines. L'état d'épithélialisation de la cornée a été vérifié en utilisant de la fluorescéine à J30, 60 et 90. A 90 jours les cornées ont été gardées pour l'analyse histologique

L'état général des cornées des lapins a été vérifié plusieurs fois par semaine pendant 15 jours puis tous les 15 jours. L'épithélialisation a été vérifiée par l'instillation d'une goutte

de fluorescéine à J30, J60 et J90 (Figure 37 A). L'expérimentation a été arrêtée à J90 et les coupes histologiques ont été réalisées et suivies par une coloration HES (figure 37 B).



**Figure 37 Suivi des lapins étant implantés avec la matrice de collagène à 100 mg/mL et 80 mg/mL en Inlay et Onlay.**

(A) Observation de l'épithélialisation de la cornée des lapins par fluorescéine à J30 post-opératoire et à J90. (B) coupes histologiques et coloration HES. Figure représentative des greffes de matrice de façon Onlay avec une matrice à 100 mg/mL, n=6 et des greffes de matrice de façon Inlay avec une matrice à 100 mg/mL n=3 et 80 mg/mL, n=3. Les flèches représentent l'implant.

Les lapins n'ont pas montré de signe d'inflammation du début jusqu'à la fin du protocole.

Concernant les greffes Onlay, un lapin a perdu son implant et un deuxième n'a pas eu une épithélialisation complète de sa cornée à J90. La moyenne de l'épaisseur des implants était de 20,5  $\mu\text{m}$ .

Concernant les greffes Inlay avec une matrice de 100 mg/mL, les implants n'étaient pas complètement transparents mais plutôt translucides. La moyenne de l'épaisseur de 3 implants était de 72,6  $\mu\text{m}$  (71, 84 et 63  $\mu\text{m}$ ). Les matrices à 80 mg/mL semblaient très transparentes et avaient une épaisseur de 16  $\mu\text{m}$  (14, 18 et 15  $\mu\text{m}$ ).

L'épaisseur des matrices est résumée dans le tableau 8.

**Tableau 8 Épaisseur des matrices de collagène post-opératoire à J90.**

Implant	Transparence de la matrice	Moyenne de l'épaisseur à J 90
Inlay 80 mg/mL	Transparente	16 $\mu\text{m}$
Inlay 100 mg/mL	Translucide	72.6 $\mu\text{m}$
Onlay 100 mg/mL	Transparente	20.5 $\mu\text{m}$

L'épaisseur des matrices préparée était environ à 300  $\mu\text{m}$ .

Finalement les 2 expérimentations (Inlay et Onlay) réalisées *in vivo* chez le lapin confirment une très bonne tolérance du matériau lorsqu'il est utilisé en intra stromal, mais également lorsqu'il est utilisé en overlay. Dans les deux situations, nous n'observons pas de cellules inflammatoires trois mois après la greffe, ni de signe inflammatoire à l'examen biomicroscopique normal. Nous avons également observé une très bonne épithélialisation de ces matrices. La matrice paraît plus transparente à des concentrations de 80 mg/mL que 100 mg/mL.

Les matrices ont été préparées avec une épaisseur d'environ 300  $\mu\text{m}$ . Cependant nous avons observé une résorption très importante de ces matrices à J90 au niveau des coupes histologiques.

### 3.3. CONCLUSION

Le but de cette étude consistait à analyser la biocompatibilité des implants de matrice de collagène de type I dans les implantations au niveau stromal. Ces matrices étaient implantées de façon Inlay ou Onlay au niveau du stroma cornéen. Sur les 4 concentrations (40, 60, 80 et 100 mg/mL) que nous souhaitions implanter, deux concentrations (80 et 100 mg/mL) étaient manipulables. La matrice à 100 mg/mL semble être la plus adaptée à une utilisation en chirurgie.

Le suivi des lapins a montré que les matrices de collagène étaient très bien tolérées au niveau de la cornée. Nous n'avons pas observé de signe d'inflammation ou de sensation de gêne chez les lapins. Les matrices à 80 mg/mL en Inlay et de 100 mg/mL en onlay étaient restées transparentes tout au long du protocole. Cependant les matrices n'avaient pas été colonisées par les fibroblastes. Nous avons également observé que la couche épithéliale

était très bien formée au niveau des implantations de matrices comme pour une greffe de la MAH.

Ces résultats sont très encourageants. Du fait de leur transparence et de la facilité de manipulation, les matrices de 80 mg/mL peuvent être à long terme utilisées dans les implantations intra stromal. Ces matrices pourront être implantées en remplacement d'une partie du stroma ou sa totalité. Elles sont également des candidats intéressants pour les implantations réfractives intra stromal.



## **IV. DISCUSSION ET PERSPECTIVES**

## 1. Lyophilisation de la membrane amniotique

Au cours de cette étude nous avons établi au sein de la banque de tissu du CHU de Rouen la lyophilisation de la membrane amniotique humaine (MAH). Ce travail de recherche a initialement été réalisé dans un but humanitaire avec Ophtalmo sans frontières qui nous ont permis d'acquérir un lyophilisateur.

La MAH est un tissu connu pour sa capacité de cicatrisation. Depuis les années 1990 et après sa réintégration par Kim et Tseng en ophtalmologie, elle a été largement utilisée pour les greffes d'ulcères cornéens et les déficiences limbiques. Cette caractéristique est due à la teneur riche en protéines des MAH mais aussi à son rôle comme matrice qui facilite l'épithélialisation. Pour ces raisons il est très important que ces caractéristiques soient conservées dans les MAH L. Afin d'analyser l'efficacité de notre méthode de lyophilisation nous avons analysé ses différentes propriétés dans nos MAH L et comparé avec la MAH C actuellement utilisée en clinique.

### 1.1.Capacité d'épithélialisation équivalente entre les MAH L et les MAH C

La première démarche de notre étude a été d'évaluer la capacité des MAH à favoriser la prolifération des cellules épithéliales *in vitro*. Pour cela dans un premier temps nous avons mis en place la culture des cellules épithéliales sur plaque. Cette étape a été assez difficile, les cellules en culture dans le premier milieu utilisé, SHEM, prenaient rapidement un aspect fibroblastique. En effet les fibroblastes sont des cellules avec une capacité de prolifération forte ce qui génère des contaminations dans de nombreuses cultures primaires, telles que les cultures des kératinocytes (Linge et al., 1989)

Loureiro et coll avaient montré qu'en utilisant un milieu de culture ressemblant à notre milieu SHEM, ils obtenaient des CEC avec un aspect épithélial. Cependant dans notre étude après quelques jours de culture la majorité des cellules avaient un aspect fibroblastique (Loureiro et al., 2013). Dans cette étude ils avaient également comparé la culture des CEC dans deux autres milieux de culture, le KSFM et l'Epilife. L'aspect des CEC était beaucoup mieux défini dans ces deux milieux que dans le milieu SHEM. Nous avons également observé que les cellules en culture dans le milieu KSFM avaient une forme cuboïdale et mieux définie que dans notre milieu SHEM. Nous n'avons pas utilisé le milieu Epilife.

Le milieu KFSM est un milieu avec une concentration faible en calcium, cela favorise le maintien du profil souche des cellules (Ma and Liu, 2011). Cependant Loureiro et coll, comme dans notre étude, ont retrouvé l'expression de la CK3 marqueur des CEC différenciées dans ces cultures. Nous avons également observé dans ces cultures l'expression de la CK12, autre marqueur des CEC, aux niveaux transcriptomique et protéomique. L'utilisation de ce milieu qui permet de garder le profil souche afin d'avoir un renouvellement plus long des cellules en culture mais qui n'empêche également pas la différenciation en CEC nous a semblé être un bon choix.

La culture des CEC mise au point, nous avons comparé la capacité d'épithélialisation de ces cellules sur les MAH L et les MAH C. Le but de notre étude étant la comparaison de la prolifération des CEC sur la MAH et la MAH C, nous avons dénudé enzymatiquement nos MAH de leur couche épithéliale. En effet Koizummi et coll, ont montré que les cellules mises en culture sur les MAH dénudées favorisent le phénotype épithélial de ces cellules. La culture des cellules extraites enzymatiquement sur les MAH n'a pas été concluante. Ces cellules se sont retrouvées à côté de la MAH et peu de cellules ont adhéré à la MAH. La culture des explants est une méthode fréquemment utilisée depuis la démonstration de son efficacité par Pellegrini (Pellegrini et al., 1999). La culture des explants sur MAH nous a permis d'avoir des cellules adhérant directement sur la MAH. Les cellules ont commencé à proliférer du limbe à environ 6 jours après les mises en culture, Mariappan et coll ont également observé le début de la prolifération des cellules du limbe entre J4 et J5 (Mariappan et al., 2010). Cependant ils ont également observé une confluence des cellules en monocouche entre J10 et J14, ce qui n'a pas été observé dans notre étude. Nous avons également observé une prolifération asymétrique des CEC du limbe. La prolifération des cellules issues du limbe a été faible dans notre expérience et nous avons observé plusieurs couches de cellules dans certaines cultures.

Nous n'avons pas observé de différence entre la capacité d'épithélialisation des MAH L et des MAH C. Cependant le nombre faible de cellule ayant proliféré sur les deux types de MAH permet difficilement de conclure sur la capacité d'épithélialisation des MAH L.

## 1.2. Analyses structurales

En plus de l'importance de son rôle pour l'apport des protéines importantes dans l'épithélialisation, la MAH a également un rôle de matrice afin de faciliter l'épithélialisation. Dans le but d'étudier si la structure de la MAH est impactée par la lyophilisation nous avons analysé la MAH par microscopie électronique.

La monocouche épithéliale de la cornée n'a pas été impactée par le processus de lyophilisation. Nous retrouvons dans les deux MAH (lyophilisée et congelée) une couche intacte de cellules épithéliales avec une forme cuboïdale et nous retrouvons également les microvillis présents à la surface de ces cellules (Allen et al., 2013). En comparaison avec l'étude de Rodriguez et coll, dans lequel ils avaient observé l'impact de la lyophilisation sur la structure de la MAH, nous ne retrouvons pas les structures aussi bien définies dans les MAH L (Rodríguez-Ares et al., 2009). Dans notre étude les MAH L ont une structure des protéines de la MEC désorganisée. Cela peut poser des problèmes quant au rôle de la MAH comme une matrice pour la croissance cellulaire. Dans notre étude nous n'avons pas utilisé de lyoprotecteur, un Lyoprotecteur tel que tréhalose pourrait conserver la structure de la MAH.

La comparaison des différentes recettes de lyophilisation reste compliquée d'un point de vue technico-économique, cependant durant notre étude nous avons pu optimiser nos paramètres de lyophilisation suite à nos échanges avec le Docteur Laurence BARNOUIN directrice générale de la banque de tissus TBF basée à Mions.

## 1.3. Expression protéique

Le deuxième aspect important de la MAH L est sa teneur en facteurs de croissance. En effet la membrane amniotique est un tissu riche en facteurs de croissance tels que l'HGF, l'EGF, le KGF, le  $\beta$ -NGF et le TGF-  $\beta$ 1.

Dans notre étude nous avons retrouvé un taux total de protéines avec une moyenne de 0,7mg/mL de protéines par MAH. Dans une autre étude ce taux retrouvé était en moyenne de 0,4 mg/mL (sur 13 donneurs) (López-Valladares et al., 2010). Le taux de protéines total était très variable selon les placentas. Nous avons également remarqué les mêmes résultats dans notre étude de *mapping*.

Sur les 5 facteurs de croissance analysés, le taux de 2 facteurs de croissance, l'HGF et  $\beta$ -NGF, reste inchangé dans la comparaison des deux méthodes de conservation. L'EGF et le

KGF semblent être mieux conservés par la lyophilisation que par la congélation même si cette différence n'est significative que dans un lot.

L'HGF et l'EGF sont les facteurs de croissance les plus exprimés dans les 3 lots de MAH. Ces deux facteurs ont un rôle primordial dans le processus de cicatrisation et d'épithélialisation de la cornée. Le taux faible d'expression du TGF- $\beta$ 1 a un effet favorable sur l'épithélialisation de la cornée, car comme expliqué précédemment le TGF- $\beta$ 1 inhibe la prolifération des CEC (Honma et al., 1997; Carrington et al., 2006). Cependant la présence d'un faible taux de TGF- $\beta$ 1 est intéressante pour son effet sur la stimulation des fibroblastes au niveau du stroma (Kay et al., 1998).

L'analyse par *label-free* des extraits protéiques des MAH L et MAH C a permis de détecter un grand nombre de protéines. 74% de ces protéines sont en commun entre les MAH C dans les trois lots et ce pourcentage est égal à 73% pour les MAH L. La conservation des MAH par congélation étant une méthode validée (notre référence), la proximité de ces pourcentages de conservation protéique entre les 3 lots valide la reproductibilité de la méthode d'analyse et de lyophilisation des 3 lots. Nous avons également observé que 88 % des protéines identifiées sont en commun entre les MAH L et les MAH C, indiquant que le nombre de protéines identifiées dans les deux méthodes ne diffère que de 12%. Ces résultats indiquent que la lyophilisation n'altère pas plus de protéines que la méthode de référence (congélation).

Parmi les protéines identifiées dans les MAH C et les MAH L, nous n'avons pas retrouvé de protéines importantes dans la cicatrisation étant surreprésentées par la MAH C. Concernant les protéines surreprésentées dans les MAH L nous avons retrouvé le TGF- $\beta$ 1, ce qui est en cohérence avec les résultats de l'ELISA. Nous avons également observé que deux protéines, la Procollagen galactosyltransferase et la EMILIN-1, ayant un rôle dans le processus d'adhésion cellulaire sont surreprésentées dans les MAH L.

#### **1.4. Implantation In vivo**

Afin de comparer la capacité des MAH L et des MAH C à épithélialiser la cornée *In vivo* nous avons réalisé deux protocoles chez le lapin. Dans le premier protocole les lapins (n=6) avaient eu deux ulcères sur la même cornée. Un ulcère avait été greffé avec la MAH L (n=4) ou la MAH C (n=2), l'autre n'avait pas été greffé (contrôle). Nous n'avons pas observé de différence entre la vitesse d'épithélialisation des MAH L, MAH C et le contrôle. Libera et coll,

n'avaient également pas observé de différence entre la vitesse d'épithélialisation des MAH L, MAH C et le groupe contrôle (Libera et al., 2008). Ces résultats montrent que la MAH L est aussi bien tolérée que la MAH C au niveau de la cornée. Les cornées des lapins étaient des cornées saines, il est donc normal de retrouver la même capacité d'épithélialisation entre les MAH et le contrôle.

Dans le deuxième protocole nous avons réalisé la greffe de MAH C et de MAH L sur la même cornée. Les lapins n'ont pas montré de signes d'inflammation au cours du protocole.

Au final ces résultats montrent une bonne tolérance de la MAHL. Elles ne montrent également pas de différence entre la capacité de d'épithélialisation des MAH C et MAH L.

Notre étude a été réalisée dans un environnement stérile, cependant pour une utilisation en clinique le tissu doit être soit irradié ( $\gamma$  ou  $\beta$  irradiation) soit chimiquement viro-inactivé. Ces étapes peuvent altérer les propriétés de la MAH. Il est donc important que les analyses réalisées soient reproduits sur les MAH L après ces étapes.

## 2. Mapping de la membrane amniotique

L'étude du *mapping* a été réalisée dans le but de cartographier l'expression des différents facteurs de croissance importants dans l'épithélialisation dans différentes zones de la membrane amniotique. 3 zones avaient été choisies en fonction de la distance par rapport au cordon ombilical, zone proche du cordon, zone intermédiaire et zone externe. Nous avons également voulu observer l'importance de garder ou non la couche spongieuse. Cette couche spongieuse, placée entre l'amnios et le chorion, est éliminée dans la préparation des patches de MAH.

Hopkinson et coll, ont montré une variation de l'expression du TGF- $\beta$ 1 entre les différents donneurs (Hopkinson et al., 2006). Ils ont également observé un taux plus faible de ce facteur dans l'amnios que le chorion. Dans notre étude nous avons observé que le taux de TGF- $\beta$ 1 était faiblement exprimé que ce soit au niveau de la couche spongieuse ou au niveau de la MAH conventionnelle. Le taux faible d'expression du TGF- $\beta$ 1 a un effet favorable sur l'épithélialisation de la cornée, car il inhibe la prolifération des CEC (Honma et al., 1997; Carrington et al., 2006). Un taux faible de TGF- $\beta$ 1 permettrait la facilitation de la cicatrisation par la stimulation des fibroblastes au niveau du stroma (Kay et al., 1998).

Giquel et coll, ont également montré la variation de l'expression de l'EGF entre les donneurs et entre les différentes zones. Nous retrouvons également une variation inter donneur de ce facteur mais cette différence n'a pas été observée entre les différentes zones.

Nous n'avons également pas retrouvé de différence d'expression de l'HGF, du KGF et du NGF entre les différentes zones. Ces résultats indiquent que les patches peuvent être prélevés au niveau de toutes les zones du placenta sans influencer les résultats de la GMA.

Mitchell et coll, ont démontré que le TNF- $\alpha$  stimule la production de la prostaglandine dans le placenta. Dans notre étude nous avons vérifié si cette cytokine pouvait avoir un effet sur le taux des facteurs de croissance d'intérêt. Nos résultats n'ont pas montré de corrélation entre l'expression de ces facteurs et le TNF- $\alpha$ .

Lopez et coll, ont montré l'influence du temps de grossesse de la future mère sur le taux de facteurs de croissance (López-Valladares et al. 2010). Dans notre étude en plus de ce paramètre nous avons également regardé la corrélation avec d'autres paramètres tels que le temps de travail, le nombre de grossesses et l'âge de la mère.

Au final les résultats de cette étude ont montré que la couche spongieuse contient un taux élevé de facteurs de croissance. Le fait de garder cette couche dans la préparation des MAH pourrait être un point positif facilitant la cicatrisation des CEC.

Nous avons également observé une variation d'expression du taux des facteurs de croissance entre les placentas. Les corrélations avec différents paramètres n'ont pas permis de choisir un facteur permettant la sélection de placentas avec un taux plus élevé de facteurs de croissance.

### **3. Implantation de matrice de collagène**

Cette étude est une collaboration avec le Dr Gervaise MOSSER de l'Université Paris 6 et est financée par la Satt Lutech. Le but de ce projet consistait à analyser la biocompatibilité des implants de matrice de collagène de type I au niveau du stroma cornéen. Ces matrices sont des matériaux intéressants pour un remplacement du stroma cornéen dans sa totalité ou dans une partie. Pour cela les matrices doivent être colonisables par les cellules de la cornée et également transparentes.

Dans notre protocole les matrices avaient été implantées soit de façon Inlay avec une concentration de 80 et 100 mg/mL soit de façon Onlay avec une concentration de 100 mg/mL.

Les résultats obtenus de cette étude sont très encourageants surtout dans les implantations intra stromal où les matrices de 80 mg/mL étaient très facilement manipulables et étaient restées transparentes tout au long du protocole.

Ces observations montrent que ces matrices peuvent à plus long terme être utilisées dans les greffes intra stomales. Nous pouvons également envisager à plus long terme que cette matrice puisse remplacer les greffes de cornée, cependant pour cela il faut une amélioration de la matrice. En effet pour que la matrice puisse être considérée comme utilisable en remplacement de la greffe de cornée il faut qu'elle soit colonisable, transparente et également cicatrisée facilement.

Malgré ces résultats positifs la résorption de la matrice en post-opératoire doit être expliquée. Nous proposons deux hypothèses. La première étant qu'il s'agirait d'un amincissement progressif de semaine en semaine et qui va se solder à la longue par la disparition totale du matériau. La deuxième hypothèse est, qu'il s'agirait d'une diminution de la concentration en eau du biomatériau avec un amincissement de celui-ci survenant rapidement après l'intervention, et restant ensuite stable pendant des mois.

Afin d'analyser ces hypothèses il serait intéressant d'effectuer un deuxième protocole d'implantation chez le lapin. L'épaisseur de l'implant serait vérifiée à plusieurs temps J2, J7, J15, J30 et si besoin J60 et J90. Cela nous permettra d'observer si l'implant s'amincit progressivement ou si elle se produit directement après l'implantation à J2. Dans le but de réduire le nombre de lapins utilisés nous proposons que deux lapins soient sacrifiés à chaque temps donné. Cela permettra de n'intégrer que 12 lapins dans ce protocole.



## **V. BIBLIOGRAPHIE**

- Adinolfi, M., Akle, C.A., McColl, I., Fensom, A.H., Tansley, L., Connolly, P., Hsi, B.L., Faulk, W.P., Travers, P., and Bodmer, W.F. (1982). Expression of HLA antigens, beta 2-microglobulin and enzymes by human amniotic epithelial cells. *Nature* 295, 325–327.
- Ahamed, J., Burg, N., Yoshinaga, K., Janczak, C.A., Rifkin, D.B., and Coller, B.S. (2008). In vitro and in vivo evidence for shear-induced activation of latent transforming growth factor-beta1. *Blood* 112, 3650–3660.
- Allen, C.L., Clare, G., Stewart, E.A., Branch, M.J., McIntosh, O.D., Dadhwal, M., Dua, H.S., and Hopkinson, A. (2013). Augmented Dried versus Cryopreserved Amniotic Membrane as an Ocular Surface Dressing. *PLoS One* 8.
- Aloe, L., Tirassa, P., and Lambiase, A. (2008). The topical application of nerve growth factor as a pharmacological tool for human corneal and skin ulcers. *Pharmacological Research* 57, 253–258.
- Ambrósio, R., Kara-José, N., and Wilson, S.E. (2009). Early Keratocyte Apoptosis after Epithelial Scrape Injury in the Human Cornea. *Exp Eye Res* 89, 597–599.
- Andresen, J.L., Ledet, T., and Ehlers, N. (1997). Keratocyte migration and peptide growth factors: the effect of PDGF, bFGF, EGF, IGF-I, aFGF and TGF-beta on human keratocyte migration in a collagen gel. *Curr. Eye Res.* 16, 605–613.
- Annes, J.P. (2003). Making sense of latent TGFbeta activation. *Journal of Cell Science* 116, 217–224.
- Anzano, M.A., Roberts, A.B., Smith, J.M., Sporn, M.B., and De Larco, J.E. (1983). Sarcoma growth factor from conditioned medium of virally transformed cells is composed of both type alpha and type beta transforming growth factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80, 6264–6268.
- Ashcroft, G.S., Yang, X., Glick, A.B., Weinstein, M., Letterio, J.J., Mizel, D.E., Anzano, M., Greenwell-Wild, T., Wahl, S.M., Deng, C., et al. (1999). Mice lacking Smad3 show accelerated wound healing and an impaired local inflammatory response. *Nature Cell Biology* 1, 260.
- Ashraf, N.N., Siyal, N.A., Sultan, S., and Adhi, M.I. (2015). Comparison of Efficacy of Storage of Amniotic Membrane at -20 and -80 Degrees Centigrade. 25, 4.
- Aumailley, M., Bruckner-Tuderman, L., and Carter, W. (2005). A simplified laminin nomenclature. - PubMed - NCBI.
- Auran, J.D., Koester, C.J., Kleiman, N.J., Rapaport, R., Bomann, J.S., Wirotsko, B.M., Florakis, G.J., and Koniarek, J.P. (1995). Scanning Slit Confocal Microscopic Observation of Cell Morphology and Movement within the Normal Human Anterior Cornea. *Ophthalmology* 102, 33–41.
- Awata, T., Nishida, T., Nakagawa, S., and Manabe, R. (1989). Differential regulation of fibronectin synthesis in three different types of corneal cells. *Jpn. J. Ophthalmol.* 33, 132–143.
- Baker, S.E., Hopkinson, S.B., Fitchmun, M., Andreason, G.L., Frasier, F., Plopper, G., Quaranta, V., and Jones, J.C. (1996). Laminin-5 and hemidesmosomes: role of the alpha 3

chain subunit in hemidesmosome stability and assembly. *J. Cell. Sci.* 109 ( Pt 10), 2509–2520.

Barbosa, F.L., Chaurasia, S.S., Cutler, A., Asosingh, K., Kaur, H., de Medeiros, F.W., Agrawal, V., and Wilson, S.E. (2010). Corneal Myofibroblast Generation From Bone Marrow-derived Cells. *Exp Eye Res* 91, 92–96.

Baudouin, C., Rolando, M., Benitez Del Castillo, J.M., Messmer, E.M., Figueiredo, F.C., Irkec, M., Van Setten, G., and Labetoulle, M. (2018). Reconsidering the central role of mucins in dry eye and ocular surface diseases. *Progress in Retinal and Eye Research*.

Baum, J.L. (1970). Melanocyte and Langerhans cell population of the cornea and limbus in the albino animal. *Am. J. Ophthalmol.* 69, 669–676.

Benedek, G.B. (1971). Theory of transparency of the eye. *Appl Opt* 10, 459–473.

Bettman, J.J. (1970). Nature of Bowman's Layer. *New England Journal of Medicine* 282, 344–344.

Bizheva, K., Tan, B., MacLellan, B., Hosseinaee, Z., Mason, E., Hileeto, D., and Sorbara, L. (2017). In-vivo imaging of the palisades of Vogt and the limbal crypts with sub-micrometer axial resolution optical coherence tomography. *Biomed Opt Express* 8, 4141–4151.

Blanco-Mezquita, T., Martinez-Garcia, C., Proença, R., Zieske, J.D., Bonini, S., Lambiase, A., and Merayo-Llodes, J. (2013). Nerve Growth Factor Promotes Corneal Epithelial Migration by Enhancing Expression of Matrix Metalloprotease-9. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 54, 3880.

Bourne, W.M. (2003). *Biology of the corneal endothelium in health and disease* (Nature Publishing Group).

Carrington, L.M., Albon, J., Anderson, I., Kamma, C., and Boulton, M. (2006). Differential Regulation of Key Stages in Early Corneal Wound Healing by TGF- $\beta$  Isoforms and Their Inhibitors. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 47, 1886–1894.

Carter, W.G., Ryan, M.C., and Gahr, P.J. (1991). Epiligrin, a new cell adhesion ligand for integrin alpha 3 beta 1 in epithelial basement membranes. *Cell* 65, 599–610.

Castro-Muñozledo, F., Meza-Aguilar, D.G., Domínguez-Castillo, R., Hernández-Zequinely, V., and Sánchez-Guzmán, E. (2017). Vimentin as a Marker of Early Differentiating, Highly Motile Corneal Epithelial Cells. *J. Cell. Physiol.* 232, 818–830.

Cellini, M., Bendo, E., Bravetti, G.O., and Campos, E.C. (2006). The use of nerve growth factor in surgical wound healing of the cornea. *Ophthalmic Res.* 38, 177–181.

Chandrasekher, G., Kakazu, A.H., and Bazan, H.E.P. (2001). HGF- and KGF-induced Activation of PI-3K/p70 S6 Kinase Pathway in Corneal Epithelial Cells: its Relevance in Wound Healing. *Experimental Eye Research* 73, 191–202.

Chang, J.-H., Huang, Y.-H., Cunningham, C.M., Han, K.-Y., Chang, M., Seiki, M., Zhou, Z., and Azar, D.T. (2016). Matrix metalloproteinase 14 modulates signal transduction and angiogenesis in the cornea. *Surv Ophthalmol* 61, 478–497.

- Chao, M.V. (1994). The p75 neurotrophin receptor. *J. Neurobiol.* 25, 1373–1385.
- Chen, S., Mienaltowski, M.J., and Birk, D.E. (2015). Regulation of corneal stroma extracellular matrix assembly. *Experimental Eye Research* 133, 69–80.
- Chen, Z., Paiva, C.S. de, Luo, L., Kretzer, F.L., Pflugfelder, S.C., and Li, D.-Q. (2004). Characterization of Putative Stem Cell Phenotype in Human Limbal Epithelia. *STEM CELLS* 22, 355–366.
- Chen, Z., Evans, W.H., Pflugfelder, S.C., and Li, D.-Q. (2006). Gap Junction Protein Connexin 43 Serves as a Negative Marker for a Stem Cell-Containing Population of Human Limbal Epithelial Cells. *Stem Cells* 24, 1265–1273.
- Chen, Z., You, J., Liu, X., Cooper, S., Hodge, C., Sutton, G., Crook, J.M., and Wallace, G.G. (2018). Biomaterials for corneal bioengineering. *Biomed. Mater.* 13, 032002.
- Cintron, C., Covington, H.I., and Kublin, C.L. (1990). Morphologic analyses of proteoglycans in rabbit corneal scars. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 31, 1789–1798.
- Cohen, S., and Elliott, G.A. (1963). The Stimulation of Epidermal Keratinization by a Protein Isolated from the Submaxillary Gland of the Mouse\*\*From the Department of Biochemistry and the Department of Pathology, Vanderbilt University School of Medicine, Nashville, Tennessee. *Journal of Investigative Dermatology* 40, 1–5.
- Cohen, S., and Levi-Montalcini, R. (1956). A nerve growth-stimulating factor isolated from snake venom. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 42, 571–574.
- Colby, K., and Koo, E. (2011). Expanding indications for the Boston keratoprosthesis. *Current Opinion in Ophthalmology* 22, 267–273.
- Cotsarelis, G., Cheng, S.Z., Dong, G., Sun, T.T., and Lavker, R.M. (1989). Existence of slow-cycling limbal epithelial basal cells that can be preferentially stimulated to proliferate: implications on epithelial stem cells. *Cell* 57, 201–209.
- Daniels (2009). Limbal epithelial stem cells of the cornea. *StemBook*.
- Daniels, J.T., Limb, G.A., Saarialho-Kere, U., Murphy, G., and Khaw, P.T. (2003). Human corneal epithelial cells require MMP-1 for HGF-mediated migration on collagen I. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44, 1048–1055.
- Danilenko, D.M. (1999). Preclinical and Early Clinical Development of Keratinocyte Growth Factor, an Epithelial-Specific Tissue Growth Factor. *Toxicol Pathol* 27, 64–71.
- Davanger, M., and Evensen, A. (1971). Role of the pericorneal papillary structure in renewal of corneal epithelium. *Nature* 229, 560–561.
- Davis, J.W. (1910). Skin transplantation with a review of 550 cases at the Johns Hopkins Hospital. *Johns Hopkins Med J* 15, 307–396.
- Delamere, N.A. (2005). Ciliary Body and Ciliary Epithelium. *Adv Organ Biol* 10, 127–148.

- DelMonte, D.W., and Kim, T. (2011a). Anatomy and physiology of the cornea. *Journal of Cataract & Refractive Surgery* 37, 588–598.
- DelMonte, D.W., and Kim, T. (2011b). Anatomy and physiology of the cornea. *Journal of Cataract & Refractive Surgery* 37, 588–598.
- Dhamodaran, K., Subramani, M., Matalia, H., Jayadev, C., Shetty, R., and Das, D. (2016). One for all: A standardized protocol for ex vivo culture of limbal, conjunctival and oral mucosal epithelial cells into corneal lineage. *Cytherapy* 18, 546–561.
- Dua, H.S., Saini, J.S., Azuara-Blanco, A., and Gupta, P. (2000). Limbal stem cell deficiency : Concept, aetiology, clinical presentation, diagnosis and management. *Indian Journal of Ophthalmology* 48, 83.
- Dua, H.S., Faraj, L.A., Said, D.G., Gray, T., and Lowe, J. (2013). Human corneal anatomy redefined: a novel pre-Desemet’s layer (Dua’s layer). *Ophthalmology* 120, 1778–1785.
- Eghrari, A.O., Riazuddin, S.A., and Gottsch, J.D. (2015). Chapter Two - Overview of the Cornea: Structure, Function, and Development. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, J.F. Hejtmancik, and J.M. Nickerson, eds. (Academic Press), pp. 7–23.
- Eichner, R. (1986). The role of keratin subfamilies and keratin pairs in the formation of human epidermal intermediate filaments. *The Journal of Cell Biology* 102, 1767–1777.
- Endo, K., Nakamura, T., Kawasaki, S., and Kinoshita, S. (2004). Human Amniotic Membrane, Like Corneal Epithelial Basement Membrane, Manifests the  $\alpha 5$  Chain of Type IV Collagen. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 45, 1771–1774.
- Farrell, R.A., McCally, R.L., and Tatham, P.E.R. (1973). Wave-length dependencies of light scattering in normal and cold swollen rabbit corneas and their structural implications\*. *The Journal of Physiology* 233, 589–612.
- Fini, M.E. (1999). Keratocyte and fibroblast phenotypes in the repairing cornea. *Progress in Retinal and Eye Research* 18, 529–551.
- Fini, M., and Stramer, B. (2005). How the Cornea Heals: Cornea-specific Repair Mechanisms Affecting Surgical Outcomes. *Cornea* 24.
- Floc’h, L.L. (2011). *Traité pratique de lyophilisation* (QUALECO Editions).
- Flosdorf, E.W., and Mudd, S. (1935). Procedure and Apparatus for Preservation in “Lyophile” form of Serum and Other Biological Substances. *The Journal of Immunology* 29, 389–425.
- Folkman, J., Klagsbrun, M., Sasse, J., Wadzinski, M., Ingber, D., and Vlodavsky, I. (1988). A heparin-binding angiogenic protein--basic fibroblast growth factor--is stored within basement membrane. *Am. J. Pathol.* 130, 393–400.
- Forrester, J.V., Dick, A.D., McMenemy, P.G., Roberts, F., and Pearlman, E. (2016). Chapter 1 - Anatomy of the eye and orbit. In *The Eye (Fourth Edition)*, J.V. Forrester, A.D. Dick, P.G. McMenemy, F. Roberts, and E. Pearlman, eds. (W.B. Saunders), pp. 1-102.e2.

- Fujikawa, L.S., Foster, C.S., Harrist, T.J., Lanigan, J.M., and Colvin, R.B. (1981). Fibronectin in healing rabbit corneal wounds. *Lab. Invest.* 45, 120–129.
- Funderburgh, J.L., Funderburgh, M.L., Mann, M.M., Corpuz, L., and Roth, M.R. (2001). Proteoglycan expression during transforming growth factor beta -induced keratocyte-myofibroblast transdifferentiation. *J. Biol. Chem.* 276, 44173–44178.
- Gallego-Muñoz, P., Lorenzo-Martín, E., Fernández, I., Herrero-Pérez, C., and Martínez-García, M.C. (2019). Nidogen-2: Location and expression during corneal wound healing. *Exp. Eye Res.* 178, 1–9.
- Giannelli, G., Falk-Marzillier, J., Schiraldi, O., Stetler-Stevenson, W.G., and Quaranta, V. (1997). Induction of cell migration by matrix metalloprotease-2 cleavage of laminin-5. *Science* 277, 225–228.
- Gicquel, J.-J., Dua, H.S., Brodie, A., Mohammed, I., Suleman, H., Lazutina, E., James, D.K., and Hopkinson, A. (2009). Epidermal Growth Factor Variations in Amniotic Membrane Used for *Ex Vivo* Tissue Constructs. *Tissue Engineering Part A* 15, 1919–1927.
- Goldberg, M.F., and Bron, A.J. (1982). Limbal palisades of Vogt. *Trans Am Ophthalmol Soc* 80, 155–171.
- Gomaa, A., Comyn, O., and Liu, C. (2010). Keratoprostheses in clinical practice – a review. *Clinical & Experimental Ophthalmology* 38, 211–224.
- Grant, M.B., Khaw, P.T., Schultz, G.S., Adams, J.L., and Shimizu, R.W. (1992). Effects of epidermal growth factor, fibroblast growth factor, and transforming growth factor-beta on corneal cell chemotaxis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 33, 3292–3301.
- Griffith, M., Hakim, M., Shimmura, S., Watsky, M.A., Li, F., Carlsson, D., Doillon, C.J., Nakamura, M., Suuronen, E., Shinozaki, N., et al. (2002). Artificial human corneas: scaffolds for transplantation and host regeneration. *Cornea* 21, S54-61.
- Hamill, Kevin.J. (2009). Laminin deposition in the extracellular matrix: a complex picture emerges | *Journal of Cell Science*.
- Han, Y., Shao, Y., Lin, Z., Qu, Y.-L., Wang, H., Zhou, Y., Chen, W., Chen, Y., Chen, W.-L., Hu, F.-R., et al. (2012). Netrin-1 Simultaneously Suppresses Corneal Inflammation and Neovascularization. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 53, 1285–1295.
- Hao, Y., Ma, D.H., Hwang, D.G., Kim, W.S., and Zhang, F. (2000). Identification of antiangiogenic and antiinflammatory proteins in human amniotic membrane. *Cornea* 19, 348–352.
- Hassell, J. (2010). *The Molecular Basis of Corneal Transparency*.
- Hicks, C.R., Crawford, G.J., Tan, D.T., Snibson, G.R., Sutton, G.L., Gondhowiardjo, T.D., Lam, D.S.C., and Downie, N. (2002). Outcomes of implantation of an artificial cornea, AlphaCor: effects of prior ocular herpes simplex infection. *Cornea* 21, 685–690.

- Higa, K., Shimmura, S., Miyashita, H., Shimazaki, J., and Tsubota, K. (2005). Melanocytes in the corneal limbus interact with K19-positive basal epithelial cells. *Experimental Eye Research* 81, 218–223.
- Hinz, B., Mastrangelo, D., Iselin, C.E., Chaponnier, C., and Gabbiani, G. (2001). Mechanical tension controls granulation tissue contractile activity and myofibroblast differentiation. *Am. J. Pathol.* 159, 1009–1020.
- Hinz, B., Phan, S.H., Thannickal, V.J., Galli, A., Bochaton-Piallat, M.-L., and Gabbiani, G. (2007). The Myofibroblast. *Am J Pathol* 170, 1807–1816.
- Hodges, R.R., and Dartt, D.A. (2013). Tear Film Mucins: Front Line Defenders of the Ocular Surface; Comparison with Airway and Gastrointestinal Tract Mucins. *Exp Eye Res* 117, 62–78.
- Hongo, M., Itoi, M., Yamaguchi, N., and Imanishi, J. (1992). Distribution of epidermal growth factor (EGF) receptors in rabbit corneal epithelial cells, keratocytes and endothelial cells, and the changes induced by transforming growth factor-beta 1. *Exp. Eye Res.* 54, 9–16.
- Honma, Y., Nishida, K., Sotozono, C., and Kinoshita, S. (1997). Effect of Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 and - $\beta$ 2 on in vitro Rabbit Corneal Epithelial Cell Proliferation Promoted by Epidermal Growth Factor, Keratinocyte Growth Factor, or Hepatocyte Growth Factor. *Experimental Eye Research* 65, 391–396.
- Hopkinson, A., McIntosh, R.S., Tighe, P.J., James, D.K., and Dua, H.S. (2006). Amniotic Membrane for Ocular Surface Reconstruction: Donor Variations and the Effect of Handling on TGF- $\beta$  Content. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 47, 4316–4322.
- Hu, D.J., Basti, S., Wen, A., and Bryar, P.J. (2003). Prospective Comparison of Corneal Re-Epithelialization Over the Stromal and Basement Membrane Surfaces of Preserved Human Amniotic Membrane. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44, 3151–3151.
- Jakowlew, S.B., Ciment, G., Tuan, R.S., Sporn, M.B., and Roberts, A.B. (1992). Pattern of expression of transforming growth factor-beta 4 mRNA and protein in the developing chicken embryo. *Dev. Dyn.* 195, 276–289.
- Jangamreddy, J.R., Haagdoorens, M.K.C., Islam, M.M., Lewis, P., Samanta, A., Fagerholm, P., Lyszka, A., Ljunggren, M.K., Buznyk, O., Alarcon, E.I., et al. (2019). Corrigendum to “Short peptide analogs as alternatives to collagen in pro-regenerative corneal implants” [*Acta Biomater.* 69 (2018) 120–130]. *Acta Biomaterialia* 88, 556–557.
- Jeon, K.-I., Hindman, H.B., Bubel, T., McDaniel, T., DeMagistris, M., Callan, C., and Huxlin, K.R. (2018). Corneal myofibroblasts inhibit regenerating nerves during wound healing. *Sci Rep* 8, 1–15.
- Jester, J.V., Barry-Lane, P.A., Cavanagh, H.D., and Petroll, W.M. (1996). Induction of alpha-smooth muscle actin expression and myofibroblast transformation in cultured corneal keratocytes. *Cornea* 15, 505–516.
- Jester, J.V., Huang, J., Barry-Lane, P., Kao, W.W.-Y., Petroll, W.M., and Cavanagh, H.D. (1999). Transforming Growth Factor $\beta$ -Mediated Corneal Myofibroblast Differentiation Requires Actin and Fibronectin Assembly | IOVS | ARVO Journals.

- Johnston, M.C., Noden, D.M., Hazelton, R.D., Coulombre, J.L., and Coulombre, A.J. (1979). Origins of avian ocular and periocular tissues. *Exp. Eye Res.* 29, 27–43.
- Joseph, A., Dua, H.S., and King, A.J. (2001). Failure of amniotic membrane transplantation in the treatment of acute ocular burns. *British Journal of Ophthalmology* 85, 1065–1069.
- Joyce, N.C., and Zieske, J.D. (1997). Transforming growth factor-beta receptor expression in human cornea. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 38, 1922–1928.
- Kakazu, A., Chandrasekher, G., and Bazan, H.E.P. (2004). HGF protects corneal epithelial cells from apoptosis by the PI-3K/Akt-1/Bad- but not the ERK1/2-mediated signaling pathway. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 45, 3485–3492.
- Kalamajski, S., and Oldberg, A. (2007). Fibromodulin binds collagen type I via Glu-353 and Lys-355 in leucine-rich repeat 11. *J. Biol. Chem.* 282, 26740–26745.
- Kariya, Y., Yasuda, C., Nakashima, Y., Ishida, K., Tsubota, Y., and Miyazaki, K. (2004). Characterization of laminin 5B and NH2-terminal proteolytic fragment of its alpha3B chain: promotion of cellular adhesion, migration, and proliferation. *J. Biol. Chem.* 279, 24774–24784.
- Kay, E.P., Lee, M.S., Seong, G.J., and Lee, Y.G. (1998). TGF-beta s stimulate cell proliferation via an autocrine production of FGF-2 in corneal stromal fibroblasts. *Curr. Eye Res.* 17, 286–293.
- Kerr, A. (2010). *Introductory Biomechanics E-Book* (Elsevier Health Sciences).
- Kim, J.C., and Tseng, S.C. (1995a). Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas. *Cornea* 14, 473–484.
- Kim, J.C., and Tseng, S.C.G. (1995b). The effects on inhibition of corneal neovascularization after human amniotic membrane transplantation in severely damaged rabbit corneas. *Korean Journal of Ophthalmology* 9, 32–46.
- Kim, S.I., and Choi, M.E. (2012). TGF- $\beta$ -activated kinase-1: New insights into the mechanism of TGF- $\beta$  signaling and kidney disease. *Kidney Research and Clinical Practice* 31, 94–105.
- Kim, B.-C., Kim, H.T., Park, S.H., Cha, J.-S., Yufit, T., Kim, S.-J., and Falanga, V. (2003). Fibroblasts from chronic wounds show altered TGF- $\beta$ -signaling and decreased TGF- $\beta$  Type II Receptor expression. *Journal of Cellular Physiology* 195, 331–336.
- Kim, K.S., Oh, J.S., Kim, I.S., and Jo, J.S. (1990). Topical fibronectin treatment in persistent corneal epithelial defects and corneal ulcers. *Korean J Ophthalmol* 4, 5–11.
- Kim, W.J., Mohan, R.R., Mohan, R.R., and Wilson, S.E. (1999). Effect of PDGF, IL-1alpha, and BMP2/4 on corneal fibroblast chemotaxis: expression of the platelet-derived growth factor system in the cornea. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 40, 1364–1372.
- Kinoshita, S., Friend, J., Kiorpes, T.C., and Thoft, R.A. (1983). Keratin-like proteins in corneal and conjunctival epithelium are different. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 24, 577–581.

Kinoshita, S., Adachi, W., Sotozono, C., Nishida, K., Yokoi, N., Quantock, A.J., and Okubo, K. (2001). Characteristics of the Human Ocular Surface Epithelium. *Progress in Retinal and Eye Research* 20, 639–673.

Klagsbrun, M. (1989). The fibroblast growth factor family: Structural and biological properties. *Progress in Growth Factor Research* 1, 207–235.

Klass, B.R., Grobbelaar, A.O., and Rolfe, K.J. (2009). Transforming growth factor  $\beta$ 1 signalling, wound healing and repair: a multifunctional cytokine with clinical implications for wound repair, a delicate balance. *Postgraduate Medical Journal* 85, 9–14.

Klenkler, B., and Sheardown, H. (2004). Growth factors in the anterior segment: role in tissue maintenance, wound healing and ocular pathology. *Experimental Eye Research* 79, 677–688.

Klenkler, B., Sheardown, H., and Jones, L. (2007). Growth Factors in the Tear Film: Role in Tissue Maintenance, Wound Healing, and Ocular Pathology. *The Ocular Surface* 5, 228–239.

Knop, E., Knop, N., Millar, T., Obata, H., and Sullivan, D.A. (2011). The International Workshop on Meibomian Gland Dysfunction: Report of the Subcommittee on Anatomy, Physiology, and Pathophysiology of the Meibomian Gland. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52, 1938–1978.

Ko, M.S., and Marinkovich, M.P. (2010). Role of dermal-epidermal basement membrane zone in skin, cancer, and developmental disorders. *Dermatol Clin* 28, 1–16.

Koli, K., Saharinen, J., Hyytiäinen, M., Carita Penttinen, and Keski-Oja, J. (2001). Latency, activation, and binding proteins of TGF- $\beta$ . *Microscopy Research and Technique* 52, 354–362.

Kondaiah, P., Sands, M.J., Smith, J.M., Fields, A., Roberts, A.B., Sporn, M.B., and Melton, D.A. (1990). Identification of a novel transforming growth factor-beta (TGF-beta 5) mRNA in *Xenopus laevis*. *J. Biol. Chem.* 265, 1089–1093.

Kopp, J., Preis, E., Said, H., Hafemann, B., Wickert, L., Gressner, A.M., Pallua, N., and Dooley, S. (2005). Abrogation of Transforming Growth Factor- $\beta$  Signaling by SMAD7 Inhibits Collagen Gel Contraction of Human Dermal Fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 280, 21570–21576.

Kubo, M., Sonoda, Y., Muramatsu, R., and Usui, M. (2001). Immunogenicity of Human Amniotic Membrane in Experimental Xenotransplantation. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 42, 1539–1546.

Kumar, K.A., Chakravarthy, M., Selvarajan, S., Ramakrishnan, T., and Ari, G. (2017). Use of an amniotic membrane as a novel barrier in a tooth with a questionable prognosis. *J Indian Soc Periodontol* 21, 237–240.

Kurpakus, M.A., Stock, E.L., and Jones, J.C. (1990). Analysis of wound healing in an in vitro model: early appearance of laminin and a 125 x 10(3) Mr polypeptide during adhesion complex formation. *J. Cell. Sci.* 96 ( Pt 4), 651–660.

Kurpakus, M.A., Stock, E.L., and Jones, J.C. (1992). The role of the basement membrane in differential expression of keratin proteins in epithelial cells. *Dev. Biol.* 150, 243–255.

- Kurpakus, M.A., Maniaci, M.T., and Esco, M. (1994). Expression of keratins K12, K4 and K14 during development of ocular surface epithelium. *Curr. Eye Res.* *13*, 805–814.
- Kurpakus-Wheater, M. (2001). Laminin-5 is a component of preserved amniotic membrane. *Curr. Eye Res.* *22*, 353–357.
- Laing, R.A., Berrospi, R., and Leiuowitz, M. (1975). Changes in the Corneal Endothelium as a Function of Age. *8*.
- Lambiase, A., Bonini, S., Aloe, L., Rama, P., and Bonini, S. (2000). Anti-inflammatory and healing properties of nerve growth factor in immune corneal ulcers with stromal melting. *Arch. Ophthalmol.* *118*, 1446–1449.
- de Larco, J.E., and Todaro, G.J. (1978). Growth factors from murine sarcoma virus-transformed cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *75*, 4001–4005.
- Lehrer, M.S., Sun, T.T., and Lavker, R.M. (1998). Strategies of epithelial repair: modulation of stem cell and transit amplifying cell proliferation. *Journal of Cell Science* *111*, 2867–2875.
- Levi-Montalcini, R. (1987). The nerve growth factor 35 years later. *Science* *237*, 1154–1162.
- Li, T. (2002). Ultraviolet-induced junD Activation and Apoptosis In Myeloblastic Leukemia ML-1 Cells. *Journal of Biological Chemistry* *277*, 32668–32676.
- Li, D.-Q., and Tseng, S.C.G. (1995). Three patterns of cytokine expression potentially involved in epithelial-fibroblast interactions of human ocular surface. *Journal of Cellular Physiology* *163*, 61–79.
- Li, T., and Lu, L. (2005). Epidermal Growth Factor-induced Proliferation Requires Down-regulation of Pax6 in Corneal Epithelial Cells. *J. Biol. Chem.* *280*, 12988–12995.
- Li, T., and Lu, L. (2007). Functional role of CCCTC binding factor (CTCF) in stress-induced apoptosis. *Experimental Cell Research* *313*, 3057–3065.
- Li, Q., Weng, J., Mohan, R.R., Bennett, G.L., Schwall, R., Wang, Z.F., Tabor, K., Kim, J., Hargrave, S., Cuevas, K.H., et al. (1996). Hepatocyte growth factor and hepatocyte growth factor receptor in the lacrimal gland, tears, and cornea. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *37*, 727–739.
- Li, W., Hayashida, Y., Chen, Y.-T., and Tseng, S.C. (2007). Niche regulation of corneal epithelial stem cells at the limbus. *Cell Res* *17*, 26–36.
- Li, Y.N., Pinzón-Duarte, G., Dattilo, M., Claudepierre, T., Koch, M., and Brunken, W.J. (2012). The Expression And Function Of Netrin-4 In Murine Ocular Tissues. *Exp Eye Res* *96*, 24–35.
- Libera, R.D., Melo, G.B. de, Lima, A. de S., Haapalainen, E.F., Cristovam, P., and Gomes, J.A.P. (2008). Assessment of the use of cryopreserved x freeze-dried amniotic membrane (AM) for reconstruction of ocular surface in rabbit model. *Arq Bras Oftalmol* *71*, 669–673.
- Linge, C., Green, M.R., and Brooks, R.F. (1989). A method for removal of fibroblasts from human tissue culture systems. *Exp. Cell Res.* *185*, 519–528.

- Liu, C.-Y., and Kao, W.W.-Y. (2015). Corneal Epithelial Wound Healing. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, (Elsevier), pp. 61–71.
- López-Valladares, M.J., Rodríguez-Ares, M.T., Touriño, R., Gude, F., Silva, M.T., and Couceiro, J. (2010). Donor age and gestational age influence on growth factor levels in human amniotic membrane. *Acta Ophthalmologica* 88, e211–e216.
- Loureiro, R.R., Cristovam, P.C., Martins, C.M., Covre, J.L., Sobrinho, J.A., Ricardo, J.R. da S., Hazarbassanov, R.M., Höfling-Lima, A.L., Belfort, R., Nishi, M., et al. (2013). Comparison of culture media for ex vivo cultivation of limbal epithelial progenitor cells. *Mol Vis* 19, 69–77.
- Lovicu, F.J., Kao, W.W.-Y., and Overbeek, P.A. (1999). Ectopic gland induction by lens-specific expression of keratinocyte growth factor (FGF-7) in transgenic mice. *Mechanisms of Development* 88, 43–53.
- Lu, L., Wang, L., Li, T., and Wang, J. (2010). NF- $\kappa$ B Subtypes Regulate CCCTC Binding Factor Affecting Corneal Epithelial Cell Fate. *J. Biol. Chem.* 285, 9373–9382.
- Ma, X.-L., and Liu, H.-Q. (2011). Effect of calcium on the proliferation and differentiation of murine corneal epithelial cells in vitro. *Int J Ophthalmol* 4, 247–249.
- Mariappan, I., Maddileti, S., Savy, S., Tiwari, S., Gaddipati, S., Fatima, A., Sangwan, V.S., Balasubramanian, D., and Vemuganti, G.K. (2010). In vitro culture and expansion of human limbal epithelial cells. *Nat Protoc* 5, 1470–1479.
- Marshall, G.E., Konstas, A.G., and Lee, W.R. (1991a). Immunogold fine structural localization of extracellular matrix components in aged human cornea. I. Types I-IV collagen and laminin. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 229, 157–163.
- Marshall, G.E., Konstas, A.G., and Lee, W.R. (1991b). Immunogold fine structural localization of extracellular matrix components in aged human cornea. II. Collagen types V and VI. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 229, 164–171.
- Masson, E. (2019). Intérêt des greffes de membranes amniotiques dans les pathologies oculaires de surface.
- Maurice, D.M. (1957). The structure and transparency of the cornea. *The Journal of Physiology* 136, 263–286.
- Maurice, D.M. (1970). The transparency of the corneal stroma. *Vision Res.* 10, 107–108.
- Medeiros, C.S., Lassance, L., Saikia, P., Santhiago, M.R., and Wilson, S.E. (2018). Posterior stromal cell apoptosis triggered by mechanical endothelial injury and basement membrane component nidogen-1 production in the cornea. *Exp. Eye Res.* 172, 30–35.
- Meek, K.M. (2008). The Cornea and Sclera. In *Collagen: Structure and Mechanics*, P. Fratzl, ed. (Boston, MA: Springer US), pp. 359–396.
- Meek, K.M. (2009). Corneal collagen—its role in maintaining corneal shape and transparency. *Biophys Rev* 1, 83–93.

- Meek, K.M., and Fullwood, N.J. (2001). Corneal and scleral collagens—a microscopist's perspective. *Micron* 32, 261–272.
- Meek, K.M., and Knupp, C. (2015). Corneal structure and transparency. *Prog Retin Eye Res* 49, 1–16.
- Meek, K.M., and Leonard, D.W. (1993). Ultrastructure of the corneal stroma: a comparative study. *Biophysical Journal* 64, 273–280.
- Merke, H. (1994). Morphology of the basement membrane. - PubMed - NCBI.
- Micera, A., Lambiase, A., Puxeddu, I., Aloe, L., Stampachiacchiere, B., Levi-Schaffer, F., Bonini, S., and Bonini, S. (2006). Nerve growth factor effect on human primary fibroblastic-keratocytes: Possible mechanism during corneal healing. *Experimental Eye Research* 83, 747–757.
- Michelacci, Y.M. (2003). Collagens and proteoglycans of the corneal extracellular matrix. *Braz J Med Biol Res* 36, 1037–1046.
- Mikulec, A.A., and Tanelian, D.L. (1996). CGRP Increases the Rate of Corneal Re-Epithelialization in an *In Vitro* Whole Mount Preparation. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics* 12, 417–423.
- Mishima, H., Nakamura, M., Murakami, J., Nishida, T., and Otori, T. (1992). Transforming growth factor-beta modulates effects of epidermal growth factor on corneal epithelial cells. *Curr. Eye Res.* 11, 691–696.
- Miyazono, K., Olofsson, A., Colosetti, P., and Heldin, C.H. (1991). A role of the latent TGF-beta 1-binding protein in the assembly and secretion of TGF-beta 1. *EMBO J.* 10, 1091–1101.
- Mizuno, S., Matsumoto, K., Li, M.-Y., and Nakamura, T. (2005). HGF reduces advancing lung fibrosis in mice: a potential role for MMP-dependent myofibroblast apoptosis. *FASEB J.* 19, 580–582.
- Mohan, R.R., Liang, Q., Kim, W.-J., Helena, M.C., Baerveldt, F., and Wilson, S.E. (1997). Apoptosis in the Cornea: Further Characterization of Fas/Fas Ligand System. *Experimental Eye Research* 65, 575–589.
- Mohan, R.R., Mohan, R.R., Kim, W.-J., and Wilson, S.E. (2000). Modulation of TNF- $\alpha$ -Induced Apoptosis in Corneal Fibroblasts by Transcription Factor NF- $\kappa$ B. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41, 1327–1336.
- Nakamura, T., and Mizuno, S. (2010). The discovery of Hepatocyte Growth Factor (HGF) and its significance for cell biology, life sciences and clinical medicine. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 86, 588–610.
- Nakamura, M., Chikama, T., and Nishida, T. Up-Regulation of Integrin  $\alpha$ 5 Expression by Combination of Substance P and Insulin-like Growth Factor-1 in Rabbit Corneal Epithelial Cells. *BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS* 246, 6.

- Nakamura, T., Sakai, K., Nakamura, T., and Matsumoto, K. (2011). Hepatocyte growth factor twenty years on: Much more than a growth factor. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 26, 188–202.
- Nakamura, Y., Sotozono, C., and Kinoshita, S. (2001). The Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR): Role in Corneal Wound Healing and Homeostasis. *Experimental Eye Research* 72, 511–517.
- Nickla, D.L., and Wallman, J. (2010). The multifunctional choroid. *Progress in Retinal and Eye Research* 29, 144–168.
- Niknejad, H., Peirovi, H., Jorjani, M., Ahmadiani, A., Ghanavi, J., and Seifalian, A.M. (2008). Properties of the amniotic membrane for potential use in tissue engineering. *Eur Cell Mater* 15, 88–99.
- Nishida, K., Kinoshita, S., Yokoi, N., Kaneda, M., Hashimoto, K., and Yamamoto, S. (1994). Immunohistochemical localization of transforming growth factor-beta 1, -beta 2, and -beta 3 latency-associated peptide in human cornea. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 35, 3289–3294.
- Ornitz, D.M., and Itoh, N. (2001). Fibroblast growth factors. *Genome Biology* 2, reviews3005.1.
- Ornitz, D.M., Xu, J., Colvin, J.S., McEwen, D.G., MacArthur, C.A., Coulier, F., Gao, G., and Goldfarb, M. (1996). Receptor Specificity of the Fibroblast Growth Factor Family. *J. Biol. Chem.* 271, 15292–15297.
- de Paiva, C.S., Chen, Z., Corrales, R.M., Pflugfelder, S.C., and Li, D.-Q. (2005). ABCG2 Transporter Identifies a Population of Clonogenic Human Limbal Epithelial Cells. *Stem Cells* 23, 63–73.
- Pal-Ghosh, S., Blanco, T., Tadvalkar, G., Pajooohesh-Ganji, A., Parthasarathy, A., Zieske, J.D., and Stepp, M.A. (2011). MMP9 cleavage of the  $\beta$ 4 integrin ectodomain leads to recurrent epithelial erosions in mice. *J Cell Sci* 124, 2666–2675.
- Pancholi, S., Tullo, A., Khaliq, A., Foreman, D., and Boulton, M. (1998). The effects of growth factors and conditioned media on the proliferation of human corneal epithelial cells and keratocytes. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 236, 1–8.
- Parveen, S. (2019). Amniotic membrane as novel scaffold for human iPSC-derived cardiomyogenesis | SpringerLink.
- Pasquale, L.R., Dorman-Pease, M.E., Luttly, G.A., Quigley, H.A., and Jampel, H.D. (1993). Immunolocalization of TGF-beta 1, TGF-beta 2, and TGF-beta 3 in the anterior segment of the human eye. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 34, 23–30.
- Pastar, I., Stojadinovic, O., Krzyzanowska, A., Barrientos, S., Stuelten, C., Zimmerman, K., Blumenberg, M., Brem, H., and Tomic-Canic, M. (2010). Attenuation of the transforming growth factor beta-signaling pathway in chronic venous ulcers. *Mol. Med.* 16, 92–101.
- Pellegrini, G., Golisano, O., Paterna, P., Lambiase, A., Bonini, S., Rama, P., and De Luca, M. (1999). Location and Clonal Analysis of Stem Cells and Their Differentiated Progeny in the Human Ocular Surface. *J Cell Biol* 145, 769–782.

Pellegrini, G., Dellambra, E., Golisano, O., Martinelli, E., Fantozzi, I., Bondanza, S., Ponzin, D., McKeon, F., and Luca, M.D. (2001). p63 identifies keratinocyte stem cells. *PNAS* 98, 3156–3161.

Pisano, R., Fissore, D., Velardi, S.A., and Barresi, A.A. (2010). In-Line Optimization and Control of an Industrial Freeze-Drying Process for Pharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 99, 4691–4709.

Pollard, S.M., Aye, N.N., and Symonds, E.M. (1976). Scanning electron microscope appearances of normal human amnion and umbilical cord at term. *Br J Obstet Gynaecol* 83, 470–477.

Pouliquen, Y., Faure, J.P., Bisson, J., and Offret, G. (1966). [The sub-epithelial acellular fibrillar zone of the cornea of the embryo. Its relation to the formation of the epithelial basal membrane and Bowman's membrane]. *Arch Ophthalmol Rev Gen Ophthalmol* 26, 59–68.

Poulouin, L., Gallet, O., and Imhoff, J.M. (1997). La fibronectine : propriétés et fonctions de la molécule native et de ses fragments. *Fibronectin : properties and functions of the native molecule and its fragments*.

Praillet, C., Grimaud, J., and Lortat-Jacob, H. (1998). Les protéoglycanes. (II) Rôles en pathologie. *Med Sci (Paris)* 14, 421.

Proulx, S., d'Arc Uwamaliya, J., Carrier, P., Deschambeault, A., Audet, C., Giasson, C.J., Guérin, S.L., Auger, F.A., and Germain, L. (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.

Purves, D., Augustine, G.J., Fitzpatrick, D., Katz, L.C., LaMantia, A.-S., McNamara, J.O., and Williams, S.M. (2001). *The Retina. Neuroscience. 2nd Edition*.

Qi, H., Chuang, E.Y., Yoon, K.-C., de Paiva, C.S., Shine, H.D., Jones, D.B., Pflugfelder, S.C., and Li, D.-Q. (2007). Patterned expression of neurotrophic factors and receptors in human limbal and corneal regions. *Mol. Vis.* 13, 1934–1941.

Reid, T.W., Murphy, C.J., Iwahashi, C.K., Foster, B.A., and Mannis, M.J. (1993). Stimulation of epithelial cell growth by the neuropeptide substance P. *J. Cell. Biochem.* 52, 476–485.

Remington, L.A., and Goodwin, D. (2011). *Clinical Anatomy of the Visual System E-Book* (Elsevier Health Sciences).

Rey, L.R. (1976). Glimpses into the fundamental aspects of freeze-drying. *Dev. Biol. Stand.* 36, 19–27.

Riau, A. (2016). *Frontiers | Performance of collagen-based corneal implant with anti-infective capability in rabbit model of infectious keratitis*.

Rifkin, D.B. (2005). Latent Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) Binding Proteins: Orchestrators of TGF- $\beta$  Availability. *J. Biol. Chem.* 280, 7409–7412.

Rnjak, J., Wise, S.G., Mithieux, S.M., and Weiss, A.S. (2011). Severe burn injuries and the role of elastin in the design of dermal substitutes. *Tissue Eng Part B Rev* 17, 81–91.

- Rodríguez Cabello, J.C. (2018). Peptides and Proteins as Biomaterials for Tissue Regeneration and Repair (Elsevier).
- Rodríguez-Ares, M.T., López-Valladares, M.J., Touriño, R., Vieites, B., Gude, F., Silva, M.T., and Couceiro, J. (2009). Effects of lyophilization on human amniotic membrane. *Acta Ophthalmologica* 87, 396–403.
- Romano, A.C., Espana, E.M., Yoo, S.H., Budak, M.T., Wolosin, J.M., and Tseng, S.C.G. (2003). Different Cell Sizes in Human Limbal and Central Corneal Basal Epithelia Measured by Confocal Microscopy and Flow Cytometry. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44, 5125–5129.
- Rorison, P., Thomlinson, A., Hassan, Z., Roberts, S.A., Ferguson, M.W.J., and Shah, M. (2010). Longitudinal changes in plasma Transforming growth factor beta-1 and post-burn scarring in children. *Burns* 36, 89–96.
- Rossi, S.W., Jeker, L.T., Ueno, T., Kuse, S., Keller, M.P., Zuklys, S., Gudkov, A.V., Takahama, Y., Krenger, W., Blazar, B.R., et al. (2007). Keratinocyte growth factor (KGF) enhances postnatal T-cell development via enhancements in proliferation and function of thymic epithelial cells. *Blood* 109, 3803–3811.
- Rötth, A. de (1940). Plastic repair of conjunctival defect with fetal membranes. *Arch Ophthalmol* 23, 522–525.
- Rubin, J.S., Osada, H., Finch, P.W., Taylor, W.G., Rudikoff, S., and Aaronson, S.A. (1989). Purification and characterization of a newly identified growth factor specific for epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 802–806.
- Ruoslahti, E., and Yamaguchi, Y. (1991). Proteoglycans as modulators of growth factor activities. *Cell* 64, 867–869.
- Ryan, D.G., Taliana, L., Sun, L., Wei, Z.-G., Masur, S.K., and Lavker, R.M. (2003). Involvement of S100A4 in Stromal Fibroblasts of the Regenerating Cornea. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44, 4255–4262.
- Ryan, M.C., Lee, K., Miyashita, Y., and Carter, W.G. (1999). Targeted disruption of the LAMA3 gene in mice reveals abnormalities in survival and late stage differentiation of epithelial cells. *J. Cell Biol.* 145, 1309–1323.
- Saharinen, J., Hyytiäinen, M., Taipale, J., and Keski-Oja, J. (1999). Latent transforming growth factor- $\beta$  binding proteins (LTBPs)—structural extracellular matrix proteins for targeting TGF- $\beta$  action. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 10, 99–117.
- Saika, S., Yamanaka, O., Okada, Y., Tanaka, S.-I., Miyamoto, T., Sumioka, T., Kitano, A., Shirai, K., and Ikeda, K. (2009). TGF beta in fibroproliferative diseases in the eye. *Front Biosci (Schol Ed)* 1, 376–390.
- Sartaj, R., Zhang, C., Wan, P., Pasha, Z., Guaiquil, V., Liu, A., Liu, J., Luo, Y., Fuchs, E., and Rosenblatt, M.I. (2017). Characterization of slow cycling corneal limbal epithelial cells identifies putative stem cell markers. *Sci Rep* 7, 3793.

- Sawicka, K.M., Seeliger, M., Musaev, T., Macri, L.K., and Clark, R.A.F. (2015). Fibronectin Interaction and Enhancement of Growth Factors: Importance for Wound Healing. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 4, 469–478.
- Schermer, A., Galvin, S., and Sun, T.-T. (1986). Differentiation-related expression of a major 64K corneal keratin in vivo and in culture suggests limbal location of corneal epithelial stem cells. *J Cell Biol* 103, 49–62.
- Schiller, M., Javelaud, D., and Mauviel, A. (2004). TGF- $\beta$ -induced SMAD signaling and gene regulation: consequences for extracellular matrix remodeling and wound healing. *Journal of Dermatological Science* 35, 83–92.
- Schittny, J.C., and Yurchenco, P.D. (1990). Terminal short arm domains of basement membrane laminin are critical for its self-assembly. *The Journal of Cell Biology* 110, 825–832.
- Schlötzer-Schrehardt, U., and Kruse, F.E. (2005). Identification and characterization of limbal stem cells. *Exp. Eye Res.* 81, 247–264.
- Schlötzer-Schrehardt, U., Bachmann, B.O., Tourtas, T., Torricelli, A.A.M., Singh, A., González, S., Mei, H., Deng, S.X., Wilson, S.E., and Kruse, F.E. (2015). Ultrastructure of the Posterior Corneal Stroma. *Ophthalmology* 122, 693–699.
- Sheehan, S.M., Tatsumi, R., Temm-Grove, C.J., and Allen, R.E. (2000). HGF is an autocrine growth factor for skeletal muscle satellite cells in vitro. *Muscle Nerve* 23, 239–245.
- Shimazaki, J., Yang, H.Y., and Tsubota, K. (1997). Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction in patients with chemical and thermal burns. *Ophthalmology* 104, 2068–2076.
- Shukla, M.N., Rose, J.L., Ray, R., Lathrop, K.L., Ray, A., and Ray, P. (2009). Hepatocyte growth factor inhibits epithelial to myfibroblast transition in lung cells via Smad7. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 40, 643–653.
- Singh, Santhiago, M., Barbosa, F., Agrawal, Singh, N., Ambati, B., and Wilson, S. (2011). Effect of TGF $\beta$  and PDGF-B blockade on corneal myofibroblast development in mice. *Exp Eye Res* 93, 810–817.
- Singh, Agrawal, Santhiago, M., and Wilson, S. (2012). Stromal fibroblast–bone marrow-derived cell interactions: Implications for myofibroblast development in the cornea. *Exp Eye Res* 98, 1–8.
- Solomon, A., Rosenblatt, M., Monroy, D., Ji, Z., Pflugfelder, S., and Tseng, S. (2001). Suppression of interleukin 1 $\alpha$  and interleukin 1 $\beta$  in human limbal epithelial cells cultured on the amniotic membrane stromal matrix. *Br J Ophthalmol* 85, 444–449.
- Soong, H.K., Hassan, T., Varani, J., Huang, S.C., and Brennan, M. (1989). Fibronectin does not enhance epidermal growth factor-mediated acceleration of corneal epithelial wound closure. *Arch. Ophthalmol.* 107, 1052–1054.
- Sorsby, A., and Symons, H.M. (1946). Amniotic membrane grafts in caustic burns of the eye". *Br J Ophthalmol* 30, 337–345.

- Spix, J.K., Chay, E.Y., Block, E.R., and Klarlund, J.K. (2007). Hepatocyte growth factor induces epithelial cell motility through transactivation of the epidermal growth factor receptor. *Exp. Cell Res.* 313, 3319–3325.
- Steinert, P.M., and Roop, D.R. (1988). Molecular and Cellular Biology of Intermediate Filaments. *Annual Review of Biochemistry* 57, 593–625.
- Stern, M. (1913). The grafting of preserved amniotic membrane to burnes and ulcerated surfaces, substituting skin graft: A preliminary report. *JAMA* 60, 973–974.
- Suda, T., Nishida, T., Ohashi, Y., Nakagawa, S., and Manabe, R. (1981). Fibronectin appears at the site of corneal stromal wound in rabbits. *Curr. Eye Res.* 1, 553–556.
- Tan, M.H., Bryars, J., and Moore, J. (2006). Use of nerve growth factor to treat congenital neurotrophic corneal ulceration. *Cornea* 25, 352–355.
- Tan, X.W., Goh, T.W., Saraswathi, P., Nyein, C.L., Setiawan, M., Riau, A., Lakshminarayanan, R., Liu, S., Tan, D., Beuerman, R.W., et al. (2014). Effectiveness of Antimicrobial Peptide Immobilization for Preventing Perioperative Cornea Implant-Associated Bacterial Infection. *Antimicrob Agents Chemother* 58, 5229–5238.
- Tazat, K., Hector-Greene, M., Blobe, G.C., and Henis, Y.I. (2015). T $\beta$ RIII independently binds type I and type II TGF- $\beta$  receptors to inhibit TGF- $\beta$  signaling. *Mol Biol Cell* 26, 3535–3545.
- Thakore-Shah, K., and Deng, S.X. (2014). Gene Expression in Human Corneal Endothelial Cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 55, 528–528.
- Thomasen, H., Pauklin, M., Noelle, B., Geerling, G., Vetter, J., Steven, P., Steuhl, K.-P., and Meller, D. (2011). The effect of long-term storage on the biological and histological properties of cryopreserved amniotic membrane. *Curr. Eye Res.* 36, 247–255.
- Timpl, R., and Brown, J.C. (1996). Supramolecular assembly of basement membranes. *Bioessays* 18, 123–132.
- Tisdale, A.S., Spurr-Michaud, S.J., Rodrigues, M., Hackett, J., Krachmer, J., and Gipson, I.K. (1988). Development of the anchoring structures of the epithelium in rabbit and human fetal corneas. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 29, 727–736.
- Tomasek, J.J., Gabbiani, G., Hinz, B., Chaponnier, C., and Brown, R.A. (2002). Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 3, 349.
- Torricelli, A.A.M., and Wilson, S.E. (2014). Cellular and extracellular matrix modulation of corneal stromal opacity. *Exp Eye Res* 0, 151–160.
- Tracogna, B. (2016). Efficacité des greffes de membrane amniotique humaine dans les pathologies cornéennes.
- Trelford, J.D., Hanson, F.W., Anderson, D.G., and Mendel, V. (1975). Wound healing and the amniotic membrane. *J Med* 6, 383–388.

- Tseng, S.C.G., Prabhasawat, P., Barton, K., Gray, T., and Meller, D. (1998). Amniotic Membrane Transplantation With or Without Limbal Allografts for Corneal Surface Reconstruction in Patients With Limbal Stem Cell Deficiency. *Arch Ophthalmol* 116, 431–441.
- Tuori, A., Uusitalo, H., Burgeson, R.E., Terttunen, J., and Virtanen, I. (1996). The immunohistochemical composition of the human corneal basement membrane. *Cornea* 15, 286–294.
- Turbert, D. (2018). What Is a Corneal Ulcer?
- Van Muijen, G.N., Ruiter, D.J., and Warnaar, S.O. (1987). Coexpression of intermediate filament polypeptides in human fetal and adult tissues. *Lab. Invest.* 57, 359–369.
- Vance, C. T86.890 Amniotic Membrane Allograft Rejection.
- Varshney, D., and Singh, M. (2015). History of Lyophilization. In *Lyophilized Biologics and Vaccines: Modality-Based Approaches*, D. Varshney, and M. Singh, eds. (New York, NY: Springer New York), pp. 3–10.
- Wagner, M., Walter, P., Salla, S., Johnen, S., Plange, N., Rütten, S., Goecke, T.W., and Fuest, M. (2018). Cryopreservation of amniotic membrane with and without glycerol additive. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology* 256, 1117–1126.
- Wang, Y., and Lu, L. (2011). Activation of Oxidative Stress-Regulated Bcl-3 Suppresses CTCF in Corneal Epithelial Cells. *PLoS ONE* 6, e23984.
- Wang, L., Wu, X., Shi, T., and Lu, L. (2013). Epidermal Growth Factor (EGF)-induced Corneal Epithelial Wound Healing through Nuclear Factor  $\kappa$ B Subtype-regulated CCCTC Binding Factor (CTCF) Activation. *J. Biol. Chem.* 288, 24363–24371.
- Warn, R., Harvey, P., Warn, A., Foley-Comer, A., Heldin, P., Versnel, M., Arakaki, N., Daikuhara, Y., Laurent, G.J., Herrick, S.E., et al. (2001). HGF/SF Induces Mesothelial Cell Migration and Proliferation by Autocrine and Paracrine Pathways. *Experimental Cell Research* 267, 258–266.
- Watsky, M.A. (1995). Keratocyte gap junctional communication in normal and wounded rabbit corneas and human corneas. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 36, 2568–2576.
- Wijeyewickrema, L.C., Gardiner, E.E., Gladigau, E.L., Berndt, M.C., and Andrews, R.K. (2010). Nerve Growth Factor Inhibits Metalloproteinase-Disintegrins and Blocks Ectodomain Shedding of Platelet Glycoprotein VI. *J Biol Chem* 285, 11793–11799.
- Wilson, S.E., Walker, J.W., Chwang, E.L., and He, Y.G. (1993). Hepatocyte growth factor, keratinocyte growth factor, their receptors, fibroblast growth factor receptor-2, and the cells of the cornea. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 34, 2544–2561.
- Wilson, S.E., He, Y.-G., Weng, J., Zieske, J.D., Jester, J.V., and Schultz, G.S. (1994). Effect of Epidermal Growth Factor, Hepatocyte Growth Factor, and Keratinocyte Growth Factor, on Proliferation, Motility and Differentiation of Human Corneal Epithelial Cells. *Experimental Eye Research* 59, 665–678.

- Wilson, S.E., Chen, L., Mohan, R.R., Liang, Q., and Liu, J. (1999). Expression of HGF, KGF, EGF and Receptor Messenger RNAs Following Corneal Epithelial Wounding. *Experimental Eye Research* 68, 377–397.
- Wilson, S.E., Mohan, R.R., Mohan, R.R., Ambrósio, R., Hong, J., and Lee, J. (2001). The Corneal Wound Healing Response:: Cytokine-mediated Interaction of the Epithelium, Stroma, and Inflammatory Cells. *Progress in Retinal and Eye Research* 20, 625–637.
- Wolf, H.J., Schmidt, W., and Drenckhahn, D. (1991). Immunocytochemical analysis of the cytoskeleton of the human amniotic epithelium. *Cell Tissue Res.* 266, 385–389.
- Wrana, J.L. (2013). Signaling by the TGF- $\beta$  Superfamily. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5.
- Xie, J.-L., Qi, S.-H., Pan, S., Xu, Y.-B., Li, T.-Z., Liu, X.-S., and Liu, P. (2008). Expression of Smad Protein by Normal Skin Fibroblasts and Hypertrophic Scar Fibroblasts in Response to Transforming Growth Factor  $\beta$ 1. *Dermatologic Surgery* 34, 1216–1225.
- Yamada, J., Reza Dana, M., Sotozono, C., and Kinoshita, S. (2003). Local suppression of IL-1 by receptor antagonist in the rat model of corneal alkali injury. *Experimental Eye Research* 76, 161–167.
- Yamaguchi, Y., Mann, D.M., and Ruoslahti, E. (1990). Negative regulation of transforming growth factor-beta by the proteoglycan decorin. *Nature* 346, 281–284.
- Yamamoto, K., Ladage, P.M., Ren, D.H., Li, L., Petroll, W.M., Jester, J.V., and Cavanagh, H.D. (2001). Effects of low and hyper Dk rigid gas permeable contact lenses on Bcl-2 expression and apoptosis in the rabbit corneal epithelium. *CLAO J* 27, 137–143.
- Yamanaka, O., Yuan, Y., Zhang, Y., Liu, C.-Y., Saika, S., and Kao, W.W. (2011). Lumican Binds TGF- $\beta$  type I receptor and Stimulates the Phosphorylation of ERK and Smads in Cultured Corneal Epithelial Cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 52, 1946–1946.
- Yanai, R., Yamada, N., Inui, M., and Nishida, T. (2006). Correlation of proliferative and anti-apoptotic effects of HGF, insulin, IGF-1, IGF-2, and EGF in SV40-transformed human corneal epithelial cells. *Experimental Eye Research* 83, 76–83.
- Yang, A.Y., Chow, J., and Liu, J. (2018). Corneal Innervation and Sensation: The Eye and Beyond. *Yale J Biol Med* 91, 13–21.
- Yeh, L.-K., Chen, W.-L., Li, W., Espana, E.M., Ouyang, J., Kawakita, T., Kao, W.W.-Y., Tseng, S.C.G., and Liu, C.-Y. (2005). Soluble lumican glycoprotein purified from human amniotic membrane promotes corneal epithelial wound healing. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 46, 479–486.
- Yu, F.-S.X., Yin, J., Xu, K., and Huang, J. (2010). Growth factors and corneal epithelial wound healing. *Brain Res Bull* 81, 229–235.
- Yurchenco, P.D. (2011). Basement membranes: cell scaffoldings and signaling platforms. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3.

Zhang, X., Ibrahimi, O.A., Olsen, S.K., Umemori, H., Mohammadi, M., and Ornitz, D.M. (2006). Receptor Specificity of the Fibroblast Growth Factor Family. *J Biol Chem* 281, 15694–15700.

Zieske, J.D. Extracellular matrix and wound healing.(2001) p5.

Zieske, J.D., and Wasson, M. (1993). Regional variation in distribution of EGF receptor in developing and adult corneal epithelium. *J. Cell. Sci.* 106 ( Pt 1), 145–152.