

2m11.2891.5

Université de Montréal

**CO-CULTURE D'ENDOTHÉLIUM CORNÉEN ET
DE KÉRATOCYTES BOVINS : ÉLECTROPHORÈSE
DES PROTÉINES ET IMMUNOHISTOCHEMIE D'UN
MARQUEUR DES JONCTIONS SERRÉES**

Par

Caroline Poitras

École d'Optométrie

Mémoire présenté à la Faculté des Études Supérieures
En vue de l'obtention du grade de
Maître ès Sciences (M.Sc.)
En Sciences fondamentales

Juin 2001

©Caroline Poitras, 2001



WW
5
L58
2001
N.004

Université de Montréal
Faculté des Études Supérieures


Ce mémoire intitulé :

**CO-CULTURE D'ENDOTHÉLIUM CORNÉEN ET
DE KÉRATOCYTES BOVINS : ÉLECTROPHORÈSE
DES PROTÉINES ET IMMUNOHISTOCHIMIE D'UN
MARQUEUR DES JONCTIONS SERRÉES**

Présenté par

Caroline Poitras

MEMBRES DU COMITE EVALUATEUR


Dr John Lovasik O.D. Ph.D.

Président rapporteur


Dr Claude Giasson O.D. Ph.D.

Directeur de recherche


Dr Maurice Ptito Ph.D.

Membre du jury

Mémoire accepté le :

le 31 Juillet, 2001

SOMMAIRE

Le but principal de cette étude est de déterminer la présence de facteurs protéiques impliqués dans les interactions cellulaires entre les cellules endothéliales cornéennes et les kératocytes bovins. De plus, cette étude tentera de vérifier si ZO-1 est un candidat potentiel dans la recherche d'un marqueur des cellules endothéliales cornéennes.

Dans le but d'atteindre ces objectifs, un modèle de co-culture de cellules endothéliales cornéennes et de kératocytes bovins a été réalisé. Le protocole de solubilisation des protéines membranaires et cytoplasmiques a permis de récupérer les protéines insolubles, hydrophiles et hydrophobes des deux types cellulaires à confluence. L'électrophorèse de ces protéines a permis de comparer les tracés électrophorétiques des protéines des cellules témoins avec celui des protéines des cellules cultivées en co-culture. Plusieurs facteurs qui pourraient être impliqués dans les interactions cellulaires cornéennes ont été mis à jour. L'immunohistochimie avec ZO-1 sur des cellules en culture n'a pas permis d'observer la présence de ZO-1 chez les cellules endothéliales cornéennes en culture.

Les résultats de cette étude indiquent que deux protéines insolubles (143 et 160 kDa) et deux protéines hydrophiles (176 et 91 kDa) présentes chez les cellules endothéliales en co-culture sont absentes des kératocytes en co-culture. La sécrétion de ces facteurs par les cellules endothéliales entraînerait une baisse de production de ces mêmes facteurs par les kératocytes puisqu'ils les retrouvent dans leur environnement. La présence de collagène influencerait plus les protéines hydrophiles que les protéines insolubles. De plus, un facteur protéique de 97 kDa, présent seulement chez les cellules cultivées en présence de collagène laisse croire qu'il est impliqué au niveau des interactions cellules-matrice. La protéine ZO-1 impliquée dans la formation des jonctions serrées ne semble pas être une bonne candidate dans la recherche d'un marqueur des cellules endothéliales en culture du moins dans les conditions de croissance utilisées au laboratoire.

Mots clés : co-culture cellulaire, endothélium cornéen, kératocytes, électrophorèse, ZO-1

TABLE DES MATIERES

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Membres du comité évaluateur | ii |
| Sommaire | iii |
| Table des matières..... | iv |
| Liste des tableaux..... | viii |
| Liste des figures | xii |
| Liste des annexes..... | xv |
| Dédicaces | xvi |
| Remerciements..... | xvii |
| Introduction..... | 1 |
| PARTIE 1 : RELEVÉ DE LITTÉRATURE | 3 |
| Chapitre 1 La description et les rôles de la cornée et de la conjonctive | 4 |
| 1.1 La cornée dans l'œil..... | 4 |
| 1.2 Les cinq couches de la cornée | 6 |
| 1.3 La conjonctive | 9 |
| 1.3.1 L'épithélium de la conjonctive..... | 10 |
| 1.3.2 La transition entre l'épithélium conjonctival et l'épithélium cornéen | 10 |
| 1.3.3 Le rôle de la conjonctive lors d'atteintes à l'épithélium cornéen | 11 |
| 1.4 Les larmes..... | 12 |
| 1.5 Les rôles de la cornée | 13 |
| Chapitre 2 La nutrition et le métabolisme cornéen..... | 16 |
| 2.1 Introduction..... | 16 |
| 2.2 La nutrition de la cornée | 18 |
| 2.2.1 L'oxygène | 19 |
| 2.2.2 Le glucose | 20 |
| 2.2.3 Les acides aminés..... | 20 |
| 2.3 Le métabolisme cellulaire..... | 21 |
| 2.3.1 L'adénosine tri-phosphate..... | 21 |
| 2.3.2 Les réactions d'oxydo-réduction..... | 21 |
| 2.3.3 La glycolyse | 22 |
| 2.3.4 La voie des pentoses..... | 23 |
| 2.4 Le métabolisme de la cornée | 24 |
| 2.4.1 Le métabolisme de l'épithélium cornéen | 25 |
| 2.4.2 Le métabolisme du stroma cornéen..... | 26 |
| 2.4.3 Le métabolisme de l'endothélium cornéen | 27 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Chapitre 3 Les tissus épithéliaux | 28 |
| 3.1 Introduction..... | 28 |
| 3.2 La classification des tissus épithéliaux de revêtement | 29 |
| 3.3 Les propriétés des tissus épithéliaux..... | 32 |
| 3.3.1 La polarité | 33 |
| 3.3.2 La cohésion | 35 |
| 3.3.2.1 Les jonctions serrées | 38 |
| 3.3.2.2 Les jonctions de type gap | 40 |
| 3.3.2.3 Les desmosomes et les hémidesmosomes..... | 43 |
| 3.4 Les fonctions des tissus épithéliaux..... | 44 |
| Chapitre 4 L'épithélium cornéen..... | 46 |
| 4.1 Introduction..... | 46 |
| 4.2 La morphologie de l'épithélium cornéen..... | 46 |
| 4.2.1 Les cellules basales | 46 |
| 4.2.2 Les cellules à ailes de Ranvier | 48 |
| 4.2.3 Les cellules superficielles | 48 |
| 4.2.4 Les jonctions cellulaires de l'épithélium cornéen..... | 50 |
| 4.3 La physiologie du tissu..... | 52 |
| 4.3.1 Le renouvellement de l'épithélium | 52 |
| 4.3.2 L'importance des vitamines A et C pour l'épithélium cornéen | 55 |
| 4.3.3 Le transport ionique | 56 |
| 4.4 Les fonctions de l'épithélium cornéen..... | 58 |
| Chapitre 5 Le stroma cornéen..... | 60 |
| 5.1 Introduction..... | 60 |
| 5.2 La composition du stroma | 60 |
| 5.2.1 Les kératocytes..... | 60 |
| 5.2.2 Le collagène | 64 |
| 5.2.2.1 Le collagène du stroma cornéen..... | 66 |
| 5.2.2.2 Les lamelles de collagène du stroma cornéen | 68 |
| 5.2.3 Les glycosaminoglycanes et les protéoglycanes | 69 |
| 5.2.3.1 Les GAGs et les protéoglycanes du stroma | 72 |
| 5.3 La physiologie du stroma..... | 75 |
| 5.3.1 L'hydratation du stroma..... | 75 |
| 5.3.2 La transparence de la cornée | 77 |
| Chapitre 6 L'endothélium cornéen..... | 78 |
| 6.1 La morphologie et l'ultrastructure de l'endothélium cornéen | 78 |
| 6.2 La densité cellulaire de l'endothélium..... | 79 |
| 6.3 Les fonctions de l'endothélium cornéen..... | 81 |
| 6.4 L'hypothèse de pompe et de fuite..... | 82 |
| 6.4.1 La barrière endothéliale..... | 83 |
| 6.4.2 La pompe endothéliale | 84 |
| 6.5 Le transport ionique dans l'endothélium cornéen | 85 |

| | | |
|--------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|------------|
| Chapitre 7 | Le génie tissulaire et les interactions cellulaires dans la cornée | 87 |
| 7.1 | Introduction | 87 |
| 7.2 | Le génie tissulaire | 87 |
| 7.3 | Les équivalents tridimensionnels cornéens | 89 |
| 7.4 | Les interactions cellulaires dans la cornée | 93 |
| 7.4.1 | Les interactions stroma-épithélium | 94 |
| 7.4.2 | Les interactions épithélium-stroma | 95 |
| 7.4.3 | Les interactions épithélium-endothélium | 96 |
| | | |
| PARTIE 2 : | CO-CULTURE D'ENDOTHELIUM CORNEEN ET DE KERATOCYTES | |
| BOVINS : ELECTROPHORESE ET IMMUNOHISTOCHEMIE | | 97 |
| Introduction | | 98 |
| | | |
| MATÉRIELS ET MÉTHODES | | 100 |
| Le prélèvement des cellules cornéennes | | 100 |
| Les cellules endothéliales | | 100 |
| Les kératocytes | | 100 |
| La culture cellulaire | | 101 |
| La réalisation des montages stroma-endothélium | | 101 |
| Les montages avec collagène sur un anneau de papier | | 102 |
| Les montages avec collagène dans des <i>inserts</i> | | 103 |
| Les montages sans collagène dans les <i>inserts</i> | | 103 |
| La coloration au BCECF-AM | | 107 |
| La solubilisation des protéines membranaires | | 107 |
| Le dosage des protéines selon la méthode de Bradford | | 112 |
| L'électrophorèse | | 114 |
| La coloration des gels de polyacrylamide | | 115 |
| L'analyse des gels | | 116 |
| L'immunohistochimie indirecte avec ZO-1 | | 118 |
| Les coupes au cryostat | | 119 |
| Les cellules en culture | | 120 |
| | | |
| RÉSULTATS | | 121 |
| La culture cellulaire et la réalisation des différents types de montages | | 121 |
| La solubilisation et le dosage des protéines membranaires | | 125 |
| L'électrophorèse | | 126 |
| Les protéines insolubles | | 137 |
| Les cellules endothéliales cornéennes bovines en absence de collagène | | 137 |
| Les cellules cornéennes bovines en présence de collagène | | 139 |
| Les kératocytes bovins | | 141 |
| Les protéines hydrophiles | | 142 |
| Les cellules endothéliales cornéennes bovines en absence de collagène | | 142 |
| Les cellules cornéennes bovines en présence de collagène | | 144 |
| Les kératocytes bovins | | 146 |
| Les protéines hydrophobes | | 147 |
| Les cellules endothéliales cornéennes bovines en absence de collagène | | 147 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------|------------|
| Les kératocytes bovins | 148 |
| La densitométrie | 149 |
| L'immunohistochimie indirecte avec ZO-1 | 152 |
| DISCUSSION | 154 |
| La culture cellulaire et les montages de co-culture | 154 |
| La solubilisation et le dosage des protéines membranaires | 157 |
| L'électrophorèse..... | 159 |
| Les protéines insolubles..... | 163 |
| Les cellules endothéliales cornéennes en absence de collagène | 163 |
| Les cellules endothéliales cornéennes en présence de collagène..... | 164 |
| Les kératocytes..... | 165 |
| Les protéines hydrophiles..... | 166 |
| Les cellules endothéliales cornéennes en absence de collagène | 166 |
| Les cellules endothéliales cornéennes en présence de collagène..... | 167 |
| Les kératocytes..... | 168 |
| Les protéines hydrophobes | 169 |
| Les cellules endothéliales cornéennes en absence de collagène | 169 |
| Les kératocytes..... | 170 |
| La densitométrie | 170 |
| L'immunohistochimie avec ZO-1..... | 171 |
| PARTIE 3 : CONCLUSION..... | 173 |
| CONCLUSION..... | 174 |
| Bibliographie..... | 177 |
| Annexes..... | 189 |

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tableau I : Les valeurs des variables utilisées dans l'équation permettant de calculer la puissance totale approximative (D) de la cornée | 15 |
| Tableau II : Le pourcentage des sucres métabolisés selon les voies métaboliques des cellules de la cornée | 24 |
| Tableau III: La description des épithélia de revêtement présents chez l'humain | 31 |
| Tableau IV : Les observations associées à différentes connexines suite à la délétion des gènes codant pour cette protéine chez la souris | 42 |
| Tableau V : Les fonctions des différents types d'épithélia de revêtement ainsi que leurs localisations chez l'humain | 45 |
| Tableau VI : Les jonctions cellulaires de l'épithélium cornéen..... | 50 |
| Tableau VII : Des indices désignant le limbe comme emplacement des cellules souches de l'épithélium cornéen..... | 54 |
| Tableau VIII: Les fonctions et les localisations des différents collagènes présents dans le stroma cornéen humain | 67 |
| Tableau IX: La description des principaux groupes de glycosaminoglycanes | 70 |
| Tableau X: Des facteurs influençant le bon fonctionnement de la barrière endothéliale cornéenne | 84 |
| Tableau XI: Des facteurs influençant le bon fonctionnement de la pompe endothéliale cornéenne | 85 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Tableau XII: La comparaison de la structure de 5 équivalents tridimensionnels cornéens différents | 90 |
| Tableau XIII : Les différents types cellulaires provenant du troisième modèle de co-culture soumis au protocole de solubilisation | 107 |
| Tableau XIV: Liste des différents échantillons obtenus à la suite de la procédure de solubilisation | 111 |
| Tableau XV: Les différentes étapes nécessaires à la réalisation de la coloration au nitrate d'argent des gels de 0,75 et de 1,5 mm d'épaisseur..... | 116 |
| Tableau XVI: Liste des 76 échantillons distribués selon le type de protéines et la condition de culture (témoin ou montage) | 125 |
| Tableau XVII: La distribution des échantillons présents dans les 9 mini-gels..... | 133 |
| Tableau XVIII: La distribution des différents échantillons lyophilisés présents dans les gels A, B, C | 136 |
| Tableau XIX: Bandes des protéines insolubles (gels 1 à 9) des cellules endothéliales cornéennes bovines fraîches (cEF) ou cultivées en absence (cET) ou en présence (cEM) de kératocytes | 137 |
| Tableau XX: Bandes des protéines insolubles (échantillons lyophilisés : gels A et B) des cellules endothéliales cornéennes bovines fraîches (cEF) ou cultivées en absence (cET) ou en présence (cEM) de kératocytes | 138 |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Tableau XXI: Bandes des protéines insolubles (gels 1 à 9) des cellules endothéliales cornéennes bovines cultivées en absence (cET) ou en présence (cEM) de kératocytes ainsi qu'en absence ou en présence de collagène (cET+collagène et cEM+collagène)..... | 139 |
| Tableau XXII: Bandes de protéines insolubles (échantillons lyophilisés : gels A et B) des cellules endothéliales cornéennes bovines cultivées en absence (cET) ou en présence (cEM) de kératocytes ainsi qu'en absence ou en présence de collagène (cET+collagène et cEM+collagène)..... | 140 |
| Tableau XXIII: Bandes de protéines insolubles (gels 1 à 9) des kératocytes bovins cultivés en absence (cKT) ou en présence (cKM) de cellules endothéliales cornéennes..... | 141 |
| Tableau XXIV: Bandes de protéines insolubles (échantillons lyophilisés : gel B) des kératocytes bovins cultivés en absence (cKT) ou en présence (cKM) de cellules endothéliales cornéennes..... | 141 |
| Tableau XXV: Bandes de protéines hydrophiles (gels 1 à 9) des cellules endothéliales cornéennes bovines fraîches (sEF) ou cultivées en absence (sET) ou en présence (sEM) de kératocytes..... | 142 |
| Tableau XXVI: Bandes de protéines hydrophiles (échantillons lyophilisés : gels A et C) des cellules endothéliales cornéennes bovines fraîches (sEF) ou cultivées en absence (sET) ou en présence (sEM) de kératocytes..... | 143 |
| Tableau XXVII: Bandes de protéines hydrophiles (gels 1 à 9) des cellules endothéliales cornéennes bovines cultivées en absence (sET) ou en présence (sEM) de kératocytes ainsi qu'en présence ou en absence de collagène (sEt+collagène et sEM+collagène) | 144 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Tableau XXVIII: Bandes de protéines hydrophiles (échantillons lyophilisés : gels A et C) des cellules endothéliales cornéennes bovines cultivées en absence (sET) ou en présence (sEM) de kératocytes ainsi qu'en présence ou en absence de collagène (sET+collagène et sEM+collagène)..... | 145 |
| Tableau XXIX: Bandes de protéines hydrophiles (gels 1 à 9) des kératocytes bovins cultivés en absence (sKT) ou en présence (sKM) de cellules endothéliales cornéennes..... | 146 |
| Tableau XXX: Bandes de protéines hydrophiles (échantillons lyophilisés : gel C) des kératocytes bovins cultivés en absence (sKT) ou en présence (sKM) de cellules endothéliales cornéennes..... | 146 |
| Tableau XXXI: Bandes de protéines hydrophobes (gels 1 à 9) des cellules endothéliales cornéennes bovines fraîches (iEF) ou cultivées en absence (iET) ou en présence (iEM) de kératocytes..... | 147 |
| Tableau XXXII: Bandes des protéines hydrophobes (gels 1 à 9) des kératocytes bovins cultivés en absence (iKT) ou en présence (iKM) de cellules endothéliales cornéennes..... | 148 |
| Tableau XXXIII: Liste de poids moléculaires de plusieurs protéines présentent au niveau des cellules endothéliales cornéennes et de la membrane de Descemet. | 162 |

LISTE DES FIGURES

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figure 1: Coupe histologique d'une cornée de lapin colorée à l'hématoxyline-éosine photographiée sur un microscope inversé Olympus | 7 |
| Figure 2 : Schéma montrant les 4 principaux types de jonctions cellulaires : les jonctions serrées, les desmosomes, les jonctions de type gap et les hémidesmosomes | 37 |
| Figure 3 : Modèle simplifié d'une jonction serrée | 39 |
| Figure 4: Kératocytes bovins primaires en culture photographiés au microscope par contraste de phase | 61 |
| Figure 5: Formation d'une molécule de collagène..... | 65 |
| Figure 6: Structures des glycosaminoglycanes | 71 |
| Figure 7: Les dimensions de la plaque multipuits et de l' <i>insert</i> qui ont été utilisés pour le troisième modèle de co-culture | 105 |
| Figure 8: Schéma des différentes étapes nécessaires à la réalisation du troisième modèle de co-culture..... | 106 |
| Figure 9: Schéma montrant les différentes étapes pour réaliser la procédure de solubilisation des protéines membranaires des cellules endothéliales..... | 110 |
| Figure 10: Le graphique de la densité optique à 595 nm en fonction de la concentration du standard protéique | 113 |
| Figure 11: Courbe d'étalonnage distance de migration en fonction du poids moléculaire des différentes protéines du standard | 117 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figure 12: Cellules endothéliales cornéennes bovines en culture photographiées au microscope par contraste de phase..... | 122 |
| Figure 13: Cellules colorées au BCECF-AM photographiées sur un microscope inversé Olympus..... | 124 |
| Figure 14: Le gel d'électrophorèse #1 | 128 |
| Figure 15: Le gel d'électrophorèse #2 | 128 |
| Figure 16: Le gel d'électrophorèse #3 | 129 |
| Figure 17: Le gel d'électrophorèse #4 | 129 |
| Figure 18: Le gel d'électrophorèse #5 | 130 |
| Figure 19: Le gel d'électrophorèse #6 | 130 |
| Figure 20: Le gel d'électrophorèse #7 | 131 |
| Figure 21: Le gel d'électrophorèse #8 | 131 |
| Figure 22: Le gel d'électrophorèse #9 | 132 |
| Figure 23: Le gel d'électrophorèse A..... | 134 |
| Figure 24: Le gel d'électrophorèse B..... | 135 |
| Figure 25: Le gel d'électrophorèse C..... | 135 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figure 26: Graphique de densitométrie des protéines du standard | 150 |
| Figure 27: Graphique de densitométrie du puits #14 du gel B | 151 |
| Figure 28: Immonohistochimie d'une coupe au cryostat d'une cornée bovine | 153 |

LISTE DES ANNEXES

| | |
|---------------------------------------------------------------------|--------|
| Annexe I : Isolation des cellules bovines cornéennes. | xviii |
| Annexe II : Montage avec collagène et anneau de papier. | xix |
| Annexe III : Montage avec collagène dans des <i>inserts</i> | xx |
| Annexe IV : Montage sans collagène dans les <i>inserts</i> | xxii |
| Annexe V : Solubilisation des protéines membranaires. | xxiii |
| Annexe VI : Coloration au nitrate d'argent. | xxv |
| Annexe VII : Immunohistochimie des coupes de cornées fraîches. | xxvi |
| Annexe VIII : Immunohistochimie des cellules en culture. | xxviii |

DEDICACES

À mon Père, ma Mère, ma Sœur et mon Frère qui m'ont encouragée et soutenue dans la réalisation de ce projet. À vous quatre qui avez cru en moi, en mes capacités et en ce rêve si longtemps désiré. J'entreprends maintenant une nouvelle aventure vous sachant à nouveau à mes côtés.

Au Dr Giasson pour sa confiance et son aide dans la réalisation d'un rêve qui est maintenant devenu réalité.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier ma famille et mes amies, Geneviève, Claudine et Anne-Marie pour leurs encouragements tout au long de ce projet. Un gros merci à Grand-Grand et Mamie pour toutes vos pensées positives.

Je veux remercier Dr Giasson pour m'avoir appris la rigueur scientifique et une méthode de travail minutieuse. La relation de confiance que nous avons bâtie m'est très précieuse, je nous souhaite d'autres collaborations.

Ce projet n'aurait pas pu se réaliser sans l'aide de plusieurs personnes. Mme Nicole Fontaine du laboratoire du Dr Béliveau du Pavillon de Chimie et de Biologie de l'Université du Québec à Montréal. Mlle Geneviève Bérubé du laboratoire du Dr Pascale Duplay de l'INRS-Institut Armand Frappier. Roni Daoud et Darcy Moncada de l'Institut de Parasitologie de l'Université McGill. Finalement M. Denis Latendresse pour les images et les figures.

M. Vigneault du CHUM de l'Hôpital Notre-Dame et le Dr Gilles Bleau pour leurs précieux conseils.

Je veux également remercier le réseau FRSQ en santé de la vision, le Fond de Fiducie des Optométristes Canadiens pour l'Éducation (FFOCE) et le département des Études Supérieures de l'Université de Montréal pour leurs supports financiers.

Finalement je tiens à remercier les membres du comité d'évaluation de ce mémoire.

INTRODUCTION

Le génie tissulaire est une biotechnologie encore jeune faisant appel à la collaboration de nombreux spécialistes de plusieurs disciplines afin de réaliser à partir des cellules prélevées sur des tissus natifs une reconstruction d'organes *in vitro* remplissant les fonctions physiologique des organes originaux. L'objet ultime de cette approche vise à fournir un organe qu'il sera possible de greffer chez un individu souffrant de lésions graves. Par exemple, de grands progrès réalisés dans le domaine du génie tissulaire de la peau rendent possibles les greffes autologues d'équivalents dermiques chez les grands brûlés (Auger et coll., 1998). Alternativement, ces tissus reconstruits peuvent faire l'objet d'études pharmacologiques.

Cependant, les greffes d'équivalents cornéens ne sont pas encore au point. D'abord, leur résistance, incomparable avec celle du tissu natif, semble insuffisante. Ensuite, des difficultés inhérentes à la croissance des cellules dans des équivalents aux surfaces cambrées ne permettent pas d'obtenir une puissance optique similaire à la puissance native de la cornée *in vivo*. Enfin, l'implantation fructueuse d'un équivalent cornéen dans un œil humain nécessite une compréhension des réactions entre les cellules de la cornée de l'hôte et celles de l'équivalent.

Les tentatives d'implantation d'une kératoprothèse (implant inerte utilisé en dernière alternative) dans un œil humain peuvent renseigner sur les interactions avec le tissu hôte. Les causes les plus fréquentes d'échec sont l'éjection de la prothèse et la prolifération de tissus fibreux cicatriciels (Barron, 1998). L'éjection serait attribuable à une libération de protéases dissolvant le stroma cornéen, d'où ulcère stromal alors que la prolifération cicatricielle serait due à la production de collagène. En effet, paradoxalement, les kératocytes ont la capacité de produire, sous différentes conditions, du collagène, des inhibiteurs de collagène (molécules capables d'arrêter la production de collagène), et de la collagénase (enzyme capable de dégrader le collagène) (Wagoner et Kenyon, 1994). L'utilisation de molécules pharmaceutiques capables de stimuler la synthèse de collagène ou d'inhiber la production de collagénase pour une période donnée, suite à une greffe, pourrait s'avérer indispensable à la réussite d'une telle opération.

Ces complications liées aux kératoprothèses seront probablement similaires à celles rencontrées lors de greffes d'équivalents cornéens. Il est primordial de bien connaître les processus de différenciation, le développement et les besoins physiologiques des cellules du tissu cornéen, ainsi que les rôles et les constituants de la matrice dans laquelle elles vivent. De plus, les séquences des voies de signalisation menant (1) au développement du tissu, (2) à la migration des cellules, (3) au renouvellement des constituants et (4) aux processus de guérison doivent être connues. Ces informations concernant les cellules, la matrice, et la signalisation permettront d'éliminer graduellement les problèmes liés à la greffe d'un tissu, d'améliorer la compatibilité avec l'hôte, et d'augmenter le maintien, l'intégrité, et le bon fonctionnement de l'équivalent.

Une fois ces mécanismes connus, il sera possible d'envisager des formulations thérapeutiques qui minimiseront la dégradation des zones d'ancrage de l'équivalent à l'œil hôte. Ce travail de recherche se propose de vérifier l'hypothèse selon laquelle *des facteurs protéiques sécrétés par des kératocytes et/ou des cellules endothéliales en co-culture influenceraient positivement ou négativement l'autre type cellulaire présent dans le modèle de co-culture*. L'analyse des tracés électrophorétiques des protéines de ces deux types cellulaires permettra d'identifier les poids moléculaires de protéines retrouvées dans les cellules endothéliales et les kératocytes du montage expérimental (co-culture) mais absentes des mêmes cellules en condition témoin (mono-culture). Ceci constitue l'étude préliminaire qui permettra dans un deuxième temps d'identifier des protéines susceptibles de jouer un rôle dans les interactions cornéennes. En effet, un nombre incroyable de protéines sont nécessaires au maintien de la cornée. Sans les protéines, les cellules (1) ne peuvent répliquer l'ADN nécessaire à leur reproduction, (2) ne peuvent réaliser les réactions métaboliques, et (3) ne peuvent transformer les nutriments en métabolites utilisables. Tous ces rôles, réalisés par des protéines, permettent aux cellules de créer un tissu fonctionnel et d'assurer l'adhésion des couches épithéliales au stroma.

Une deuxième hypothèse vérifiera si *ZO-1, une protéine constituant les jonctions serrées, est un bon marqueur des cellules endothéliales*. La présence de trois types cellulaires différents au niveau de la cornée, cellules épithéliales ou endothéliales, et kératocytes augmente le risque d'obtenir des cultures cellulaires mixtes (contenant plus d'un type cellulaire). Si cette hypothèse est vérifiée et qu'un anticorps anti-ZO-1 marque exclusivement les cellules endothéliales, il sera possible de vérifier la présence d'un seul type de cellules dans les cultures de kératocytes (absence complète de marquage) et d'endothélium cornéen (absence de zones non-marquées).

Une synthèse de la littérature termine cette introduction. Elle a pour but de démontrer que les interactions cellulaires sont impliquées à plusieurs niveaux dans la cornée. De meilleures connaissances à propos de ces interactions cellulaires vont permettre d'améliorer les équivalents cornéens jusqu'au jour où il sera envisageable de les greffer à des patients malades.

Plusieurs interactions ont lieu dans le tissu cornéen. Ces interactions sont médiées par des cytokines et des facteurs de croissances (HGF, KGF et SFF) qui stimulent ou inhibent (1) la prolifération, (2) la mobilité, (3) la phase G1 du cycle cellulaire, et (4) les processus de guérison des cellules cornéennes (section 7.4). La stimulation ou l'inhibition de ces interactions dépendent de l'activation ou de la répression des gènes codant pour ces facteurs (section 2.1). Pour réaliser ces interactions, les cellules nécessitent un apport régulier en nutriments et en oxygène (section 2.2) afin d'accomplir des réactions métaboliques d'oxydation (section 2.3) ou de synthèse. Ces dernières permettront, par exemple, d'assurer la polarité et la cohésion, propriétés importantes des tissus épithéliaux (section 3.3) remplies en partie par les jonctions serrées. Plus spécifiquement, l'épithélium cornéen a ses propres caractéristiques (section 4.3) et par le fait même des interactions qui lui sont propres. Par exemple, l'interleukine-1, sécrétée par les cellules épithéliales est impliquée dans l'apoptose des kératocytes suite à une blessure de l'épithélium. Les kératocytes (section 5.2.1), qui peuplent le stroma cornéen, interagissent à la fois avec l'épithélium et l'endothélium. Le stroma est donc le siège de plusieurs interactions cellulaires (section 7.4.1 et 7.4.2). Le niveau

d'hydratation (section 5.3.1) du stroma influencera le coefficient de diffusion des nutriments dans le stroma cornéen. Par contre un mauvais fonctionnement de l'endothélium cornéen *in vivo*, responsable de la nutrition de la cornée (section 6.3), influencera l'accessibilité des nutriments aux différentes couches de la cornée et par le fait même la qualité des interactions cellulaires. *In vivo*, les tissus avoisinants peuvent contribuer à influencer les cellules de la cornée. En effet, le film lacrymal contient des immunoglobulines et plusieurs facteurs de croissance sécrétés après un traumatisme à la cornée (section 1.4).

Ces éléments sont revus en détail dans la première partie de ce travail. Cette revue de littérature devrait être considérée comme un complément dans l'étude de la physiologie de la cornée en général. La deuxième partie décrit le travail empirique effectué afin de vérifier les hypothèses décrites précédemment. L'élaboration d'un modèle de co-culture d'endothélium cornéen et de kératocytes bovins a permis d'étudier certaines interactions existant entre ces cellules. Ainsi, l'électrophorèse des protéines provenant de ces modèles permettra de distinguer les composantes protéiques qui caractérisent les cellules provenant de chacun de ces modèles. Enfin, l'étude d'un marqueur des jonctions serrées (ZO-1) terminera cette section.

Partie 1 : Relevé de littérature

Chapitre 1 La description et les rôles de la cornée et de la conjonctive

1.1 La cornée dans l'œil

Les yeux permettent à un organisme de percevoir les formes, les mouvements, les distances et les couleurs de l'environnement dans lequel il évolue. Ils constituent la porte d'entrée par laquelle le monde extérieur, formant des images, permet d'être intériorisé par le sens de la vision. L'œil, sphère creuse, possède un diamètre d'environ 2,5 cm chez l'humain. La paroi osseuse de l'orbite, les muscles responsables des mouvements oculaires et le gras orbitaire masquent les cinq sixièmes de la surface totale de l'œil (Marieb, 1993). Le sixième restant de la surface de l'œil forme les structures visibles à l'intérieur de la fente palpébrale. Ces structures sont les suivantes : la sclérotique, la conjonctive et la cornée.

Les fonctions optiques sont assurées par la cornée qui représente environ 70% de la surface totale de l'œil (Fatt et Weissman, 1992). La protection de ces fonctions optiques est primordiale pour la survie de l'espèce puisque c'est la vision qui permet le déplacement, l'orientation, le camouflage et la quête de nourriture des espèces vivantes. Les sourcils et les paupières sont des appendices qui protègent l'œil de la poussière, de la sueur et de la lumière vive. Lorsque nécessaire, ces structures prennent une position « de défense ». Ainsi, le réflexe de clignement des paupières consiste à répartir les larmes uniformément sur la surface de l'œil afin de prévenir la dessiccation et d'éliminer les débris avant qu'ils ne blessent la surface oculaire.

Le globe oculaire se divise en deux segments délimité par le cristallin: l'un antérieur et l'autre postérieur. Le segment antérieur comprend la cornée, l'iris, le corps ciliaire et une cavité remplie par l'humeur aqueuse. L'humeur aqueuse, sécrétée par l'épithélium du corps ciliaire, fournit les nutriments et l'oxygène nécessaires au maintien physiologique de la cornée et du cristallin tout en éliminant les déchets métaboliques de ces deux tissus (Marieb, 1993). Le segment postérieur inclut la choroïde, le cristallin et la rétine. Ce segment forme une cavité remplie par le corps vitré. Celui-ci se compose

d'une trame de fibrilles de collagène dans un liquide visqueux dont la composition en acide hyaluronique permet de lier, en formant un gel, une quantité énorme d'eau. Le vitré transparent transmet la lumière, soutient la face postérieure du cristallin et permet d'apposer la couche nerveuse de la rétine contre l'épithélium pigmentaire qui le nourrit (Marieb, 1993).

La paroi de l'œil se compose de trois tuniques distinctes. La tunique fibreuse, couche externe de l'œil, se compose de tissu conjonctif dense et comprend la sclérotique et la cornée dont les rôles seront élaborés plus bas. La couche moyenne ou tunique vasculaire inclut le corps ciliaire, l'iris et la choroïde. La choroïde est une mince couche hautement vascularisée qui recouvre presque entièrement la sclérotique. La présence de plusieurs petits vaisseaux sanguins en fait une couche importante dans l'approvisionnement de la face postérieure de la rétine (Tortora, Grabowski et Parent, 1994). La rétine ou tunique interne est un prolongement du cerveau. L'excitation de cette tunique sensitive de l'œil par la lumière conduit à la transduction de la lumière en influx nerveux décodable par le cerveau qui engendrera la sensation visuelle (Marieb, 1993).

La sclérotique, qui façonne le globe oculaire, est une couche opaque dont la grande résistance confère une rigidité à l'ensemble et maintient les constituants internes de l'œil. Sa fonction principale est de servir de point d'ancrage aux muscles extrinsèques du globe oculaire (Marieb, 1993). La cornée transparente permet à la lumière de pénétrer dans cette fenêtre afin de constituer une image sur la rétine. La transparence de la cornée dépend de la régularité de son arrangement et de l'absence de vascularisation, la cornée normale n'étant vascularisée qu'en son extrême périphérie. L'absence de vascularisation et l'arrangement régulier de la cornée sont deux facteurs essentiels pour obtenir une qualité optique optimale.

La cornée, principale lentille de l'œil, forme une ellipse à grand axe horizontal. Son rayon de courbure central s'élève chez l'humain à $7,8 \pm 0,26$ mm (Maurice, 1984). Son épaisseur moyenne est de $0,52 \pm 0,04$ mm au centre et de 0,65 mm (Maurice, 1984) en

périphérie, site où la tension développée dans le tissu est plus grande. Cette différence accroît la résistance dans la région de transition scléro-cornéenne.

1.2 Les cinq couches de la cornée

La cornée se compose de cinq couches qui sont à partir de la plus externe : l'épithélium, la membrane de Bowman, le stroma cornéen, la membrane de Descemet, et l'endothélium. La figure 1 montre une coupe histologique d'une cornée de lapin colorée à l'hématoxyline-éosine. L'épithélium cornéen, comme l'épithélium de la peau, est en contact avec l'environnement extérieur. Ces deux tissus ont pour fonction principale la protection des structures internes. Ils agissent également à titre de barrière contre les agents pathogènes. Ces tissus, formés d'un empilement de couches de cellules, protègent de l'érosion engendrée par les stress environnementaux et limitent les bris épithéliaux susceptibles de favoriser l'entrée d'agents infectieux opportunistes. Ces agents étrangers sont également bloqués grâce à la capacité de renouvellement des cellules épithéliales. En effet, l'épithélium cornéen se renouvelle en sept jours, permettant de conserver un tissu étanche et sain.

La membrane de Bowman se situe à la base de l'épithélium. Son prolongement deviendra le stroma cornéen. Cette couche d'environ 8 à 14 μm d'épaisseur (Kasner, Mietz et Green, 1993) a un rayon de courbure de $7,34 \pm 0,17$ mm (Patel et coll., 1998). La membrane de Bowman est acellulaire, de forme hyperbolique et est principalement composée de fibres de collagène disposées aléatoirement (Patel et coll., 1998). La partie antérieure de la membrane de Bowman, qui est en contact avec la lame basale de l'épithélium, a une morphologie très irrégulière.

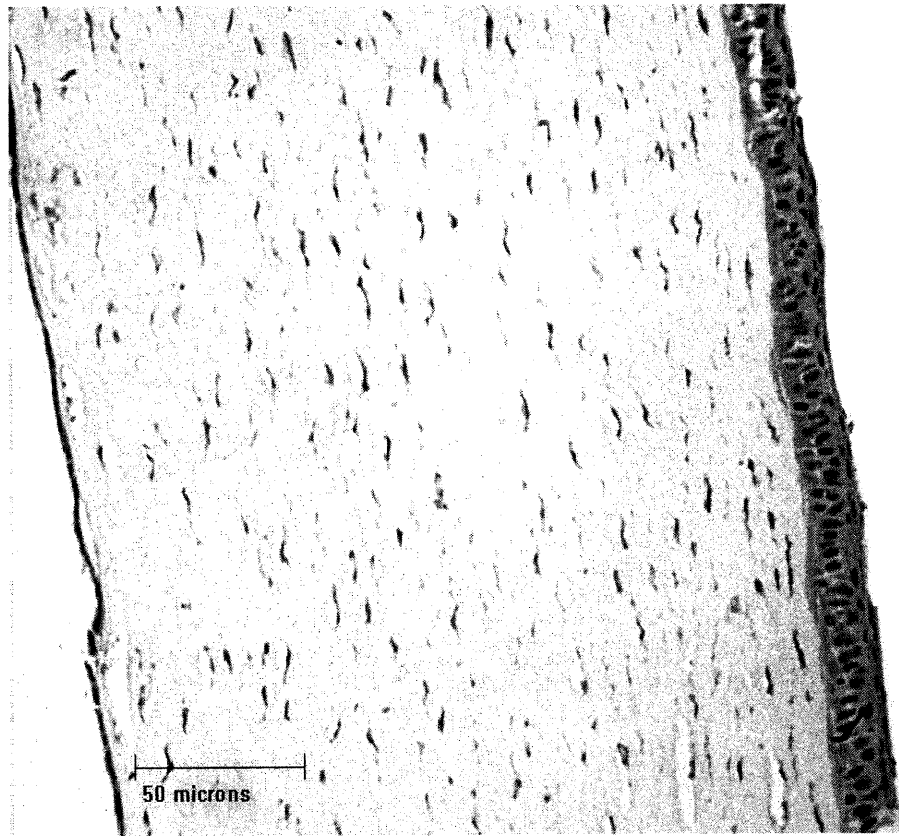


Figure 1: Coupe histologique d'une cornée de lapin colorée à l'hématoxyline-éosine photographiée sur un microscope inversé Olympus (grossissement 150X). L'épithélium stratifié non-kératinisé de la cornée et l'endothélium cornéen bordent le stroma qui représente 90% de l'épaisseur de la cornée. Les corps cellulaires des kératocytes sont bien visibles dans l'épaisseur du stroma cornéen.

La séparation entre ces deux couches est très visible en microscopie électronique à transmission (Komai et Ushiki, 1991), tandis que la séparation avec le stroma est beaucoup plus floue puisque les fibrilles de collagène de la membrane sont mélangées avec celles du stroma (Komai et Ushiki, 1991). La membrane de Bowman est transparente et ne se régénère pas lorsqu'elle est détruite. Elle semble impliquée au niveau de la lutte contre les infections puisqu'elle préviendrait l'entrée d'agents pathogènes, ayant pénétré l'épithélium, dans le stroma où leur action pourrait exercer des effets délétères sur la vision et sur l'organisation du tissu. La forme de la membrane de Bowman peut avoir un effet sur la performance optique totale de l'œil (Patel et coll., 1998). En effet, si la forme de la surface antérieure de la cornée peut influencer la performance optique de l'œil en contribuant directement à l'aberration sphérique, il est évident que des variations morphologiques, par exemple un rayon de courbure plus long, de la membrane de Bowman influencera la qualité de la vision (Patel et coll., 1998). Des changements dans la forme de la membrane de Bowman suite à une chirurgie ainsi que le processus de guérison sont deux facteurs qui peuvent faire varier la qualité de la vision de la personne concernée. Malgré la mise à jour de ces deux fonctions, barrière et performance optique, le rôle principal de la membrane de Bowman reste mystérieux.

Le stroma cornéen représente près de 90% de l'épaisseur totale de la cornée. Il se compose de kératocytes (fibroblastes), de protéoglycanes, et de fibrilles de collagène. Le collagène est une protéine fibreuse dont le rôle consiste à maintenir la structure du tissu. Les fibrilles de collagène qui forment le stroma sont disposées dans un arrangement bien précis conférant au stroma sa transparence.

La membrane de Descemet, mince couche d'épaisseur variant entre 10 et 15 μm (Pepose et Ubels, 1992) est la membrane basale de l'endothélium cornéen (Levy et coll., 1996). Elle se compose de minces fibres de collagène disposées uniformément selon un patron bien précis. Cette mince couche acellulaire est en contact avec le stroma et l'endothélium. Les cellules endothéliales seraient responsables de la synthèse de cette membrane très élastique et homogène (Pepose et Ubels, 1992). Très résistante aux

enzymes protéolytiques, il est difficile de la détruire. Par contre, la membrane de Descemet possède la capacité de se régénérer lorsqu'elle est détruite.

L'endothélium est la couche la plus postérieure de la cornée. Il s'agit d'une unique couche de cellules hexagonales dont la face apicale est en contact avec l'humeur aqueuse. Ces cellules sont essentielles à la santé de la cornée. L'endothélium est impliqué au niveau de la sécrétion ionique, responsable du maintien physiologique de la cornée. Il contrôle également l'hydratation de la cornée, responsable de sa transparence. L'endothélium malade d'un patient aura des conséquences directes sur l'ensemble de sa cornée et sur la qualité de sa vision.

1.3 La conjonctive

Le globe oculaire est recouvert par une fine membrane vascularisée: la conjonctive (Tortora et coll., 1994). Cette membrane muqueuse, protégeant l'œil des corps étrangers, est une source de cellules épithéliales pour le recouvrement de lésions cornéennes et une source de cellules immunitaires (leucocytes et anticorps) pour la lutte contre les infections. La conjonctive recouvre l'intérieur des paupières puis s'incurve vers la surface antérieure du globe oculaire jusqu'à la cornée. Elle est en continuité avec la peau au bord palpébral et avec l'épithélium cornéen au limbe (Duke-Elder et Wybar, 1961). Le limbe, jonction entre la sclérotique et la cornée transparente, suit le pourtour de la cornée et est alimenté par les capillaires du limbe. La conjonctive est formée de trois régions : la conjonctive palpébrale, la conjonctive du cul-de-sac et la conjonctive bulbaire.

La conjonctive palpébrale tapisse la surface interne des paupières et se divise en trois sections : marginale, tarsale et orbitaire. La conjonctive marginale est en fait un prolongement direct de la peau et se compose d'un épithélium stratifié. La conjonctive tarsale, fortement vascularisée, est fixée au tarse au niveau de la paupière supérieure. La conjonctive orbitaire est un tissu lâche et mince (Duke-Elder et Wybar, 1961). La conjonctive du cul-de-sac est plutôt lâche et mobile. Elle permet le mouvement du globe oculaire indépendamment des paupières. Il s'agit du pli qui relie la conjonctive

palpébrale à la conjonctive bulbaire. La conjonctive bulbaire est la membrane muqueuse qui recouvre le globe oculaire jusqu'au limbe. Cette couche très mince laisse voir les vaisseaux sanguins qui se trouvent en-dessous. Au voisinage du limbe cornéen, la muqueuse bulbaire devient la conjonctive limbique (Duke-Elder et Wybar, 1961).

1.3.1 L'épithélium de la conjonctive

La conjonctive est formée de deux couches : une couche épithéliale et une couche de substance propre ou stroma. Comme l'épithélium cornéen, l'épithélium conjonctival est de type squameux stratifié non-kératinisé. Il contient, comme lui, plusieurs couches de cellules : squameuses en superficie, ailées au centre et cylindriques en profondeur (Duke-Elder et Wybar, 1961). Il contient également les cellules globulaires responsables de sécréter un mucus contenant la mucine, substance nécessaire à la répartition du film lacrymal à la surface de l'œil (Spooner, 1972). Ces cellules se situent principalement au niveau de la conjonctive bulbaire et du cul-de-sac et sont emprisonnées dans un épithélium possédant deux à trois couches de cellules en forme de colonne. L'épithélium bulbaire possède cinq couches de cellules squameuses qui feront place à l'épithélium de la cornée au niveau du limbe (Spooner, 1972).

1.3.2 La transition entre l'épithélium conjonctival et l'épithélium cornéen

Au fur et à mesure que l'épithélium conjonctival bulbaire, qui recouvre la sclère, s'approche du limbe, il se transforme en un épithélium conjonctival limbique où il intensifie sa stratification. L'épithélium de la conjonctive limbique est en continuité avec l'épithélium de la conjonctive bulbaire d'un côté et avec l'épithélium cornéen de l'autre. Cet épithélium dépourvu de cellules globulaires possède la densité cellulaire la plus élevée des différentes régions de la conjonctive et plus élevée que l'épithélium cornéen (Oyster, 1999). La transition implique que les cellules de la couche profonde de la conjonctive limbique prennent une forme de colonnes tandis les cellules superficielles s'aplatissent pour se fusionner dans les cinq couches de l'épithélium cornéen (Duke-Elder et Wybar, 1961). Lors d'un traumatisme au niveau de l'épithélium cornéen, l'épithélium de la conjonctive limbique devient la source de cellules responsables du

recouvrement de la lésion. D'ailleurs, la section prochaine abordera les bienfaits à court terme et les limitations à long terme d'une recolonisation de la cornée par l'épithélium de la conjonctive.

1.3.3 Le rôle de la conjonctive lors d'atteintes à l'épithélium cornéen

Un limbe sain agit comme une barrière à l'invasion de l'épithélium de la cornée par celui de la conjonctive. Par contre, lorsqu'un traumatisme ou une maladie touche cette zone de transition, l'épithélium de la conjonctive traverse la barrière et une conjonctivalisation partielle ou totale de la cornée peut se produire dépendamment de la superficie atteinte. Une blessure touchant seulement le centre de la cornée sera refermée par les cellules épithéliales cornéennes entourant la blessure (Wagoner, 1997). Ce type de blessure aura peu d'incidence sur le résultat final puisque les nouvelles cellules proviennent de cellules épithéliales cornéennes. Par contre, si l'épithélium cornéen est atteint dans son ensemble, ce sont les cellules de la conjonctive limbique qui s'occuperont de la réépithélialisation (Wagoner, 1997). La conjonctive limbique joue un rôle de premier ordre dans le renouvellement de l'épithélium cornéen puisqu'elle contient les cellules souches responsables de générer les cellules basales de l'épithélium cornéen. La perte de la conjonctive limbique suite à un traumatisme éliminera partiellement ou totalement la génération de nouvelles cellules souches pour l'épithélium cornéen (Oyster, 1999). Lorsque l'épithélium cornéen et le limbe sont atteints, l'épithélium de la conjonctive devient la source de cellules (Wagoner, 1997). C'est avec ce type de recouvrement qu'une conjonctivalisation de la cornée se produit. Étant donné que la source habituelle de cellules, le limbe, est détruit, c'est l'épithélium de la conjonctive bulbaire qui est responsable de fournir les cellules afin de recouvrir la cornée.

La conjonctivalisation se caractérise par la présence d'un épithélium mince, contenant des cellules globulaires et présentant une vascularisation, à la place de l'épithélium cornéen régulier (Thoft, Friend et Murphy, 1979; cité par Dua, 1998). Des recherches montrent que l'épithélium de la conjonctive présent sur la cornée a la capacité de se

transformer et de présenter des caractéristiques semblables à l'épithélium cornéen. Ce phénomène se nomme transdifférenciation de la conjonctive (Shapiro, Friend et Thoft, 1981; cité par Dua, 1998).

Selon Dua (1998), une conjonctivalisation post-traumatique de la cornée présente des bénéfices à court terme même si idéalement, l'épithélium de la conjonctive et de la cornée doivent recouvrir de façon respective la sclère et la cornée. L'élimination mécanique de l'épithélium conjonctival présent sur la cornée permet de restaurer l'arrangement histologique original de l'œil. Par contre, il est possible pour les deux types d'épithélia de co-exister sur la surface de la cornée en autant que ce soit l'épithélium cornéen qui recouvre la région pupillaire, puisque l'épithélium de la conjonctive diminue la qualité de la vision.

1.4 Les larmes

Le film lacrymal se divise en trois couches. La couche antérieure, sécrétée par les glandes de Meibomius, est très mince (0,1 μm) et se compose de lipides polaires et non-polaires. La couche intermédiaire aqueuse est sécrétée par la glande lacrymale. Elle contient une variété de substances solubles dans l'eau comme des électrolytes, des protéines, des immunoglobulines et des enzymes (Berman, 1991). Finalement, les cellules de l'épithélium de la conjonctive sécrètent la couche profonde, couche globulaire muqueuse contenant de la mucine, une protéine participant à l'adhésion du film lacrymal à la surface de la cornée (voir section 4.2.3) (Berman, 1991).

Les protéines de la couche aqueuse agissent à différents niveaux. La majorité de ces protéines sont des facteurs de croissance, molécules polypeptidiques de signalisation extracellulaire qui stimulent la prolifération ou la stimulation d'une cellule (Alberts et coll., 1994). Le facteur de croissance épidermique (EGF) accélère la guérison de l'épithélium cornéen blessé en stimulant la prolifération cellulaire (Watanabe, Nakawaga et Nishida, 1987 ; Mishima et coll., 1992 ; cités par Nava et coll., 1997). Ce facteur serait sécrété par l'épithélium de la conjonctive chez le lapin (Wilson et Lloyd, 1992 ; cité par Nava et coll., 1997).

Le facteur de croissance transformant alpha (TGF- α) influence positivement le processus de croissance, de transformation et de développement des cellules de la surface oculaire (Rabiasz et coll., 1992 ; cité par van Setten et Schultz, 1994) ainsi que le processus de guérison (Schultz et coll., 1992 ; cité par van Setten et Schultz, 1994). Ce facteur, décrit comme faisant partie de la composition normale du film lacrymal de l'homme proviendrait de la glande lacrymale ou d'une production endogène par les cellules de la cornée (van Setten et Schultz, 1994).

Les facteurs de croissance beta-1 (TGF- β 1) et beta-2 (TGF- β 2) sont impliqués, chez l'humain, au niveau de la régulation cellulaire mais aussi dans le contrôle du système immunitaire (Roberts et Sporn, 1990 ; Lyon et Moses, 1990 ; Sporn et Roberts, 1992 ; Musteo et coll., 1987; cités par Kokawa et coll., 1996). La technique de l'ELISA (*enzyme linked immuno*) a permis de détecter un taux élevé de TGF- β 2 total (actif + inactif) dans le film lacrymal humain (Kokawa et coll., 1996). Cependant, l'isoforme TGF- β 1 serait celui présent en plus grande quantité (Gupta et coll., 1996).

Les différents facteurs de croissance utilisent le film lacrymal pour atteindre un endroit difficilement accessible par le système vasculaire. Le film lacrymal sert de voie de transport à ces protéines toutes aussi importantes les unes que les autres. Le film lacrymal lubrifie les paupières, forme une couche lisse sur la surface irrégulière de la cornée, prévient la croissance d'agents infectieux à l'aide d'agents anti-bactériens, contribue à nourrir la cornée et est une voie de transport pour les cellules du système immunitaire lors de blessure (Berman, 1991).

1.5 Les rôles de la cornée

La cornée agit comme une barrière pour les agents étrangers (Pepose et Ubels, 1992). Ces agents peuvent exercer une action mécanique (petits objets, grains de sable, copeaux de bois, éclats métalliques, etc.) ou encore de nature chimique. La cornée n'est pas résistante à 100% face à ces agents, mais sa grande résistance prévient fréquemment des lésions graves aux structures internes de l'œil.

Une cornée en santé et physiologiquement saine protège l'œil des agents pathogènes. Les virus, les champignons et les bactéries se heurtent à une très bonne barrière les empêchant de pénétrer le globe oculaire et de l'endommager. Cette protection des structures internes de l'œil à l'égard des agents pathogènes permet d'éviter une altération de la qualité de la vision. D'autre part, la nature avasculaire la prive du véhicule de la circulation sanguine pour distribuer l'action immunitaire des globules blancs. Le film lacrymal joue ce rôle puisqu'il contient, en plus des facteurs de croissance, des facteurs anti-microbiens de même que des immunoglobulines (Pepose et Ubels, 1992).

La cornée est une puissante surface de réfraction. Elle représente 70% de la puissance totale réfractive de l'œil ce qui équivaut à environ 42 dioptries. Cette propriété optique de la cornée est attribuable au contact de sa surface antérieure avec l'air, créant une différence maximale d'indice de réfraction. La puissance totale approximative (D) de la cornée peut être calculée, si son épaisseur est négligée, par simple addition algébrique de la puissance de chacun des deux dioptries. La valeur de la puissance totale se calcule avec la formule suivante :

$$D = (n' - n) / r$$

où n : indice de réfraction du milieu incident

n' : indice de réfraction du milieu émergent

r : valeur du rayon de courbure de la surface (mètre)

Cette formule est approximative car elle ne tient pas compte de l'épaisseur alors que la cornée ne peut être considérée comme une lentille mince (Le Grand, 1964). Les valeurs de chacun des paramètres sont présentés au tableau I. L'addition des résultats obtenus pour la face avant (48,2D) et arrière (-6,2D) donne comme puissance optique approximative de la cornée, 42.0 D (Le Grand, 1964).

Tableau I : Les valeurs des variables utilisées dans l'équation permettant de calculer la puissance totale approximative (D) de la cornée (Le Grand, 1964).

| Variables | Valeurs |
|--------------------|----------------|
| n air | 1,000 |
| n cornée | 1,376 |
| n humeur aqueuse | 1,336 |
| r face avant | 7,8 mm |
| r face arrière | 6,5 mm |

* n signifie indice de réfraction et r rayon de courbure.

Chapitre 2 La nutrition et le métabolisme cornéen

2.1 Introduction

Pour combattre l'état continu de déséquilibre auquel ils sont soumis, les eucaryotes incluant l'homme, possèdent quatre fonctions : l'auto-organisation, l'homéostasie, la reproduction et le métabolisme. Ces fonctions ont pour rôle de compenser ce déséquilibre. L'auto-organisation est la capacité de se structurer de façon autonome grâce à l'association spontanée d'éléments biologiques. La diversité génétique et plus précisément la séquence des protéines est responsable de l'orientation spatiale de ces éléments. L'homéostasie est le maintien de la stabilité interne de l'organisme malgré une variation du milieu environnant (Campbell, 1995). Il existe donc une relation entre le milieu extérieur et la capacité de répondre à ces variations. La reproduction implique des recombinaisons génétiques qui font en sorte qu'aucun individu n'est identique à ses parents. Elle favorise l'établissement de relations de dépendances entre les générations et l'évolution des espèces.

Le métabolisme est un ensemble de réactions biochimiques permettant de générer les ressources énergétiques et matérielles de la cellule (Campbell, 1995). Il se divise en deux types de fonctions opposées et complémentaires, l'anabolisme et le catabolisme. Les réactions cataboliques sont des réactions de dégradation qui libèrent de l'énergie tandis que les réactions anaboliques sont des réactions de biosynthèse qui utilisent de l'énergie (Horton et coll., 1994). Le métabolisme cellulaire implique un échange continue de matière et d'énergie entre la cellule et son environnement (Horton et coll., 1994). Les réactions spécifiques décrites dans ce chapitre se produisent dans les tissus des mammifères et, en particulier, dans la cornée.

L'énergie est la capacité de produire un travail, de changer la disposition d'une portion de matière (Campbell, 1995). L'ingestion d'aliments chez les êtres est à la fois une source d'énergie et de matière. L'énergie est libérée par des réactions d'oxydations sur les composés biologiques des aliments. Plus précisément, l'énergie provient de l'ATP (adénosine tri-phosphate) produit par l'oxydation, en présence ou non d'oxygène, de macromolécules telles les glucides, les lipides et les protéines (Campbell, 1995). La

digestion des aliments fournit des molécules simples, les nutriments, comme le glucose, les acides aminés et les acides gras permettant à leur tour à l'organisme de fabriquer des composés complexes comme les protéines, les nucléotides, les lipides et les glucides.

Ces composés complexes sont les briques formant les cellules et l'organisme en entier. Les protéines sont des polymères d'acides aminés liés entre eux par des liaisons peptidiques selon un ordre bien précis (Albert et coll., 1994). Les protéines fibreuses, insolubles dans l'eau forment la charpente de la cellule et celle des organismes dans leur ensemble. Les protéines globulaires, macromolécules, se situent dans le cytosol, dans la phase liquide des organites, et dans les fluides extracellulaires où elles agissent à titre de catalyseurs biochimiques (Horton et coll., 1994).

Les nucléotides sont les résidus formant les acides nucléiques. Un nucléotide se compose d'un sucre, d'une base azotée et d'au moins un groupement phosphate. Il existe deux types de bases azotées, les pyrimidines (uracile, thymine et cytosine) et les purines (adénine et guanine). Si le sucre des nucléotides est le ribose, le polymère formé se nommera acide ribonucléique (ARN) tandis que le désoxyribose formera l'acide désoxyribonucléique (ADN) (Horton et coll., 1994). C'est la molécule d'ADN transportant le matériel génétique, qui dicte la structure primaire des protéines (Alberts et coll., 1994). Cependant, du noyau cellulaire, l'ADN est transcrit en ARNm (ARN messenger) qui est exporté vers le cytoplasme cellulaire afin de diriger la synthèse des protéines par les ribosomes.

Les lipides sont des composés organiques peu ou pas solubles dans l'eau présents dans les systèmes biologiques. L'acide gras est la forme la plus simplifiée des lipides. Il entre dans la composition de plusieurs autres types de lipides comme les glycérophospholipides et les sphingolipides, éléments de base de toutes les membranes biologiques (Horton et coll., 1994). Les triacylglycérols peuvent servir de réserve intracellulaire d'énergie métabolique ou d'isolant thermique. Les vitamines et les stéroïdes appartiennent également à la grande classe des lipides. De plus, les lipides

peuvent s'associer avec d'autres biomolécules pour former des complexes tels les lipoprotéines.

Les hydrates de carbone ou glucides sont des polymères de monosaccharides. Les glucides, molécules partiellement réduites dont l'oxydation fournit l'énergie pour les processus métaboliques, ont tous la même formule brute $(CH_2O)_n$ où n est au moins égal à trois. Ils entrent dans la composition des parois cellulaires ou dans le revêtement de protection des organismes. Le glycogène est un polymère ramifié de résidus de glucose qui sert de réserve d'énergie. Lorsque l'organisme est soumis à un stress ou que la demande en glucose est trop forte, il y a hydrolyse du glycogène libérant du glucose.

La molécule à la base du métabolisme de la majorité des cellules est le glucose. Ce sucre est idéal pour la formation d'adénosine triphosphate (ATP). En effet, le glucose étant hautement réduit, son oxydation libérera une grande quantité d'énergie qui pourra être utilisée pour la synthèse de l'ATP (Horton et coll., 1994). Le catabolisme du glucose est primordial pour le maintien des fonctions cellulaires et implique plusieurs séries de réactions biochimiques : la glycolyse (section 2.3.3), la formation d'acétyl-coenzyme A, la voie des pentoses (section 2.3.4) et le cycle de Krebs.

2.2 La nutrition de la cornée

Comme les autres cellules du corps, les cellules de la cornée nécessitent l'apport de plusieurs nutriments afin de fonctionner adéquatement. Pour accomplir ces fonctions vitales, les cellules cornéennes ont besoin d'oxygène (section 2.2.1), de glucose (section 2.2.2), d'acides aminés (section 2.2.3), de vitamines et de minéraux. Cependant, contrairement aux autres cellules du corps baignées par un réseau vasculaire, les cellules cornéennes doivent être approvisionnées par des sources alternatives puisque la cornée est vascularisée seulement dans son extrême périphérie (Fatt et Weissman, 1992).

En effet, en plus des capillaires du limbe de la cornée, l'humeur aqueuse et les larmes représentent des sources alternatives d'approvisionnement qui assurent l'accessibilité des éléments nutritifs à la cornée. *In vivo* et en condition d'œil ouvert, les larmes sont

responsables d'apporter l'oxygène nécessaire à la réalisation des différentes voies métaboliques. En condition d'œil fermé, les capillaires de la conjonctive palpébrale deviennent la source principale d'approvisionnement en oxygène et la voie d'élimination des déchets métaboliques (Fatt et Weissman, 1992). L'humeur aqueuse véhicule le glucose et les acides aminés par diffusion dans les différentes couches cellulaires de la cornée (Fatt et Weissman, 1992). Les capillaires du limbe sont surtout impliqués au niveau de la nutrition de la périphérie cornéenne. La cornée centrale est ravitaillée par les liquides qui la baignent, soit les larmes et l'humeur aqueuse.

2.2.1 L'oxygène

La cornée de lapin exposée à l'air ambiant consomme environ $9,49 \mu\text{l}/\text{cm}^2/\text{heure}$ d'oxygène. L'oxygène consommé par l'épithélium cornéen du lapin, $3,83 \text{ ml}/\text{cm}^2/\text{heure}$, provient du film lacrymal. L'humeur aqueuse fournit l'oxygène au stroma et à l'endothélium qui consomment respectivement $3,63$ et $2,03 \mu\text{l}/\text{cm}^2/\text{heure}$ (Fatt, Freeman et Lin, 1974 ; Turss et coll., 1970 ; Freeman, 1972 ; cités par Stanifer, Snyder et Kretzer, 1983). Les différentes sources d'approvisionnement en oxygène permettent à la cornée de fonctionner en condition d'œil ouvert ou fermé.

Le film lacrymal est saturé en air lorsque l'œil est ouvert. L'équilibre entre l'air ambiant et le film lacrymal permet d'obtenir une pression en oxygène (P_{O_2}) de 159 mm Hg à la surface de l'œil (Stanifer et coll., 1983). L'importance de cette source, indispensable au maintien de la transparence, est reconnue depuis les travaux de Langman (1952). Celui-ci a démontré que l'absence d'oxygène conduit à la fois à une perte de transparence et à une augmentation de l'acide lactique, un produit de la glycolyse anaérobie (section 2.3.3).

Lorsque l'œil est fermé, les capillaires de la conjonctive palpébrale dont la P_{O_2} s'élève à 55 mm Hg sont responsables de l'approvisionnement en oxygène (Stanifer et coll., 1983). Les capillaires de la conjonctive palpébrale permettent à l'oxygène d'atteindre la cornée même lorsque les paupières sont fermées. L'oxygène de l'air ne peut alors

atteindre le film lacrymal, privant ainsi la cornée de sa source principale d'oxygène. En remplaçant cette source principale d'oxygène, les capillaires de la conjonctive palpébrale participent au maintien de la transparence et préviennent l'œdème cornéen observable cliniquement après une nuit de sommeil (Payrau et coll., 1967).

2.2.2 Le glucose

La cornée a un besoin en glucose estimé à $100 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{heure}$ (Riley, 1969 ; cité par Fatt et Weissman, 1992). Une expérience menée par Turss, Friend et Dohlman (1970) sur la nutrition de la cornée a permis de réaliser l'importance du glucose dans la santé de la cornée. Ils observèrent, suite à l'insertion d'un disque imperméable au glucose au niveau du stroma de lapins, une diminution importante de la concentration de glucose et de glycogène dans les tissus antérieurs au disque entraînant une dégénérescence de l'épithélium cornéen. Ces résultats confirment que l'épithélium cornéen est alimenté en glucose par l'humeur aqueuse et ce malgré la proximité du film lacrymal. La forte concentration de l'humeur aqueuse en glucose ($124\text{mg}/100\text{ml}$) comparativement à celle des larmes ($3\text{mg}/100\text{ml}$) (Dohlman, 1971) en fait la source principale d'approvisionnement des différentes couches de la cornée (Fatt et Weissman, 1992). L'épithélium étant peu perméable au glucose, un film lacrymal possédant une forte concentration en glucose ne pourrait être utilisée efficacement.

2.2.3 Les acides aminés

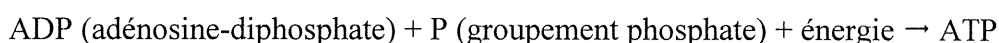
Les acides aminés jouent un rôle important dans la nutrition de la cornée. Dans la cellule, ils s'assemblent selon les instructions du code génétique pour former les protéines. Une proportion importante de ces protéines catalysent les réactions chimiques nécessaires à la vie et ainsi de cette façon, participent aux réactions métaboliques (voir sections 2.3). Les acides aminés utilisés par les cellules de l'épithélium cornéen doivent s'y trouver en grandes concentrations puisque ce tissu se renouvelle continuellement (Fatt et Weissman, 1992). La pénétration des capillaires limbiques dans la cornée étant très faible, cette source ne peut être responsable de l'approvisionnement de la cornée en acides aminés. En effet, la diffusion des ions des capillaires du limbe à la cornée est très

faible puisqu'elle ne dépasse pas 6 mm du limbe. Cette voie agit donc à titre de système d'appoint permettant un approvisionnement régulier mais faible (Fatt et Weissman, 1992). L'humeur aqueuse constitue le réservoir d'acides aminés. Ces derniers diffusent dans la cornée en fonction de leur poids moléculaire (Riley, 1977 ; cité par Maurice, 1984). La diffusion de ces éléments est rapide puisque la quantité d'acides aminés présente dans l'épithélium cornéen permet de synthétiser 10 µg de protéines par heure (Riley, 1977 ; cité par Fatt et Weissman, 1992).

2.3 Le métabolisme cellulaire

2.3.1 L'adénosine tri-phosphate

La molécule d'ATP intervient dans les échanges d'énergie au niveau des cellules vivantes. Elle a pour fonction de lier les réactions anaboliques et cataboliques. L'ATP transforme les composés simples en composés complexes (anabolisme) grâce à des réactions de synthèse. Lorsque ces composés sont dégradés (catabolisme), une partie de l'énergie est libérée sous forme d'ATP et une autre partie dégagée sous forme de chaleur. L'ATP peut être resynthétisé par la réaction suivante (Tortora et coll., 1994):



2.3.2 Les réactions d'oxydo-réduction

C'est par les réactions de dégradation qu'il est possible de libérer de l'énergie. Cette énergie est précieuse pour les cellules puisqu'elle permet la réalisation des fonctions cellulaires vitales. Les réactions d'oxydation permettent de libérer de l'énergie. Cette énergie sera récupérée pour la génération de l'ATP, molécule clé du métabolisme cellulaire. Une réaction d'oxydation implique en général, la perte de deux électrons et de deux atomes d'hydrogène. Il y a donc diminution de la valeur énergétique d'une molécule lorsqu'elle est oxydée et formation d'énergie (Tortora et coll, 1994). Tandis qu'une réaction de réduction implique le gain de deux électrons et de deux atomes d'hydrogène. Ce type de réaction augmente la valeur énergétique puisqu'il y a formation de liaisons qui, lorsqu'elles seront brisées, libéreront de l'énergie. L'oxydation d'une molécule de glucose par exemple, est suivie rapidement d'une

réaction de réduction grâce à des coenzymes, d'où le nom de réactions d'oxydoréductions (Tortora et coll., 1994). En effet, les atomes d'hydrogène libérés lors d'une oxydation ne demeurent pas libres dans la cellule. Ils sont récupérés par des coenzymes agissant à titre de transporteurs d'hydrogène. Ces dernières se chargent également de transférer les électrons et les atomes lors des réactions d'oxydoréductions. Il y a trois principaux coenzymes : NAD^+ , NADP^+ et FAD.

Le nicotinamide adénine dinucléotide (NAD^+) est un coenzyme transportant les molécules d'hydrogène et les électrons vers la chaîne respiratoire. Cette molécule qui existe sous la forme réduite ($\text{NADH} + \text{H}^+$) ou oxydée (NAD^+) est très similaire à une autre molécule, le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADP). Malgré une structure semblable, leur fonction est totalement différente. Le NAD^+ est un accepteur d'électrons des déshydrogénases de la respiration tandis que le NADP^+ est un accepteur d'électrons des déshydrogénases qui procure l'énergie aux biosynthèses (Horton et coll., 1993).

2.3.3 La glycolyse

La glycolyse est une porte d'entrée commune aux voies aérobiques et anaérobiques. Elle est la première étape du catabolisme du glucose. Il s'agit d'un ensemble de réactions chimiques transformant une molécule de glucose 6-phosphate en deux molécules d'acide pyruvique. Dix enzymes différentes catalysent autant de réactions nécessaires à la glycolyse. Cette voie permet d'obtenir un gain net de deux ATP par molécule de glucose partiellement transformée. La glycolyse ne requiert pas la présence d'oxygène pour s'activer. Par contre, le résultat final sera différent selon que la cellule est en condition aérobique ou anaérobique puisque la présence ou l'absence d'oxygène déterminera la voie métabolique subséquente (Horton et coll., 1993).

En condition anaérobique, les deux molécules d'acide pyruvique obtenues par molécule de glucose sont réduites en acide lactique au niveau de l'épithélium cornéen. Cette réaction se produit lorsque la cornée manque d'oxygène. Dans cette voie, les pyruvates

sont réduits en lactates par l'épithélium cornéen. Il est important pour la santé de la cornée que le lactate soit éliminé via l'endothélium vers l'humeur aqueuse puisqu'il peut y avoir formation d'œdème au niveau de l'épithélium (Klyce et Beuerman, 1998). Le bilan énergétique de la fermentation lactique est très faible, seulement 2 ATP sont produits par cette voie puisque le glucose n'est pas complètement oxydé. Même si ce type de glycolyse est très active en absence d'oxygène, l'énergie libérée n'est pas assez importante pour maintenir la cornée en santé. De l'énergie provenant de l'oxydation aérobie (cycle de Krebs) doit être libérée afin d'assurer les besoins énergétiques de la cornée (Payrau et coll., 1967).

En condition aérobie, l'acide pyruvique doit subir quelques transformations avant d'entrer dans le cycle de Krebs. Il y a décarboxylation (perte d'une molécule de CO_2) de l'acide pyruvique. Ce dérivé de l'acide pyruvique se lie avec une coenzyme A pour former l'acétyl coenzyme A. La coenzyme A guide l'acétyle vers le cycle de Krebs, ou cycle des acides tricarboxyliques. Lorsque le cycle de Krebs est couplé aux réactions biochimiques de la respiration se produisant dans la matrice mitochondriale, il y a transfert d'énergie chimique (électrons) à diverses coenzymes (Horton et coll., 1993). Cette respiration aérobie d'une molécule de glucose a un rendement très élevée de 36 ATP puisque la molécule de glucose est complètement oxydée.

2.3.4 La voie des pentoses

Le glucose emprunte également la voie des pentoses. Cette voie d'oxydation complète du glucose a lieu à l'extérieur des mitochondries. Elle permet de fabriquer les pentoses, sucres entrant dans la composition de l'ADN et de l'ARN, et de régénérer le NADPH^+ , réserve antioxydative pour la cellule. Par contre, cette voie ne produit pas vraiment d'énergie. Le glucose-6-phosphate est oxydé dans un premier temps en pentose phosphate puis après une série de réactions d'interconversions oxydatives générant du NADPH_2 , une coenzyme importante pour la réalisation des biosynthèses (Saraux et Biais, 1973), le glucose-6-phosphate peut prendre des voies différentes, dépendamment du type de cellule et des besoins cellulaires. Ainsi, des mécanismes de rétroaction

négative permettent à la cellule de choisir la voie métabolique la plus appropriée, de façon à produire le métabolite requis (dont la concentration est insuffisante). Par exemple, lorsque le rapport ATP/ADP + P est faible, c'est vers le cycle de Krebs que le glucose-6-phosphate se dirige. Par contre, lorsque le rapport NADPH₂/NADP diminue, c'est la voie des pentoses qui est activée. Il y a donc autorégulation de la part de la cellule afin qu'elle ne manque jamais d'un type de molécule (Saraux et Biais, 1973).

2.4 Le métabolisme de la cornée

Le métabolisme des différentes couches cellulaires de la cornée dépend du rôle particulier de celles-ci et des niveaux d'énergie requis (Whikehart, 1994). La cornée a une prédominance pour la glycolyse anaérobique. Par contre, étant donné le rendement énergétique beaucoup plus grand que produit l'oxydation complète des sucres dans la voie aérobie, la majorité de l'énergie produite est obtenue par la voie aérobie (Whikehart, 1994). Le tableau II montre les différents processus métaboliques que les cellules cornéennes empruntent ainsi que le pourcentage d'hydrate de carbone métabolisé par chacun de ces processus.

Tableau II : Le pourcentage des sucres métabolisés selon les voies métaboliques des cellules de la cornée (Whikehart, 1994).

| Type cellulaire | Glycolyse anaérobique (%) | Glycolyse aérobie (%) | Voie des pentoses (%) | Stockage glycogène |
|-----------------|---------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------|
| Épithéliales | 57 (114/402 %)* | 8 (288/402 %)* | 35 | Oui |
| Stromales | 57 | 8 | 35 | Non |
| Endothéliales | 70 | 23 | 7 | Non |

*Le nombre entre parenthèse indique le pourcentage d'énergie obtenue sous forme d'ATP par cette voie.

2.4.1 Le métabolisme de l'épithélium cornéen

L'épithélium cornéen est en contact direct avec l'environnement. L'oxygène, dissout dans les larmes, pénètre dans l'épithélium à un taux de $3,5 - 4,0 \mu\text{l}/\text{cm}^2/\text{h}$ (Stanifer et coll., 1983). Les cellules épithéliales métabolisent préférentiellement le glucose, pour produire leur énergie. Une fois transformé en glucose-6-phosphate ce dernier peut emprunter trois voies : la glycolyse, la glycogénogenèse (conversion du glucose en glycogène) et la voie des pentoses.

Environ 85% du glucose est métabolisé par les cellules épithéliales par la voie de la glycolyse anaérobie (Berman, 1991). Klyce (1981) estime cette valeur à 65%. Le tableau II indique que le taux de glycolyse anaérobie est plus élevé que celui de la glycolyse aérobie dans l'épithélium cornéen malgré la proximité des larmes, source principale d'oxygène. L'importance de ces voies métaboliques est reflétée au niveau cellulaire par la quantité relative de mitochondries, siège de la respiration cellulaire. La présence d'un grand nombre de mitochondries dans cette couche stratifiée détériorerait la qualité de la vision. En effet, ces organites seraient des sources multiples de diffusion de la lumière. La glycolyse anaérobie, pour ces raisons, joue un rôle important dans le métabolisme de l'épithélium cornéen.

Les cellules épithéliales cornéennes ont la capacité d'entreposer le glycogène pour l'utiliser lors d'un stress. En situation d'anoxie (diminution du niveau d'oxygène) la glycolyse anaérobie utilisera tout le glucose disponible pour maintenir la cornée en santé. Une fois le milieu épuisé, le glycogène pourra être rapidement transformé en glucose-6-phosphate permettant le maintien de l'activité métabolique cellulaire. La quantité de glycogène entreposé équivaut à 2 mg/gramme de poids sec (Stanifer et coll., 1983) et se situe principalement au niveau des cellules basales (Berman, 1991).

La voie des pentoses est grandement utilisée par les cellules épithéliales cornéennes. En effet, 35% du glucose acheminé vers l'épithélium passera par la voie des pentoses (Tableau II). La grande activité mitotique des cellules basales nécessite de grandes

quantités d'acides aminés et de lipides pour la synthèse de nouvelles cellules (Whikehart, 1994). Cette voie métabolique permet la synthèse de riboses, nécessaires à la formation de l'ADN et de l'ARN. De plus, les cellules épithéliales étant en contact direct avec l'environnement extérieur, il est important qu'elles puissent neutraliser les radicaux libres et le peroxyde (H_2O_2) générés inévitablement par le métabolisme cellulaire (Stryer, 1988 ; cité par Whikehart, 1994). Le NADPH, généré par la voie des pentoses, réduit le glutathion qui à son tour neutralise le peroxyde. Cette neutralisation protège le bagage génétique des cellules épithéliales cornéennes (Berman, 1991 ; Whikehart, 1994).

2.4.2 Le métabolisme du stroma cornéen

Le métabolisme des glucides au niveau du stroma est similaire à celui de l'épithélium cornéen. À poids équivalent, l'épithélium cornéen contiendra plus de cellules que le stroma cornéen. En effet, bien que le stroma représente 90% de l'épaisseur de la cornée, les kératocytes occupent environ 10% du volume du stroma. Étant donné que l'épithélium contient entre 10 et 15 fois plus de cellules que le stroma, il est possible de déterminer l'activité métabolique relative du stroma en multipliant les faibles résultats obtenus par ce facteur. Il en résulte des pourcentages équivalents pour l'épithélium et le stroma cornéen (Langham, 1952).

Tout comme pour l'épithélium cornéen, le faible pourcentage de glucose entrant dans la glycolyse aérobie est reflété par la faible présence de mitochondries. La voie des pentoses est très active (tableau II) puisque les kératocytes, malgré leur faible nombre, doivent constamment produire du collagène et des protéoglycanes pour maintenir le stroma physiologiquement sain. Il est important qu'il y ait une forte production d'ARN puisque ce dernier permet la synthèse du collagène et des protéoglycanes (Whikehart, 1994).

2.4.3 Le métabolisme de l'endothélium cornéen

L'endothélium cornéen possède un métabolisme oxydatif beaucoup plus élevé (23%), que celui de l'épithélium, (8%) (tableau II). La présence de nombreuses mitochondries dans ce type cellulaire implique une respiration aérobie plus élevée (Berman, 1991). La pompe endothéliale nécessite beaucoup d'ATP pour fonctionner adéquatement. En augmentant le pourcentage de glycolyse aérobie, qui génère plus d'ATP par molécule de glucose que la glycolyse anaérobie, il y aura assez d'énergie pour faire fonctionner la pompe (Whikehart, 1994). La voie des pentoses n'est pas très utilisée par les cellules endothéliales étant donné l'absence d'activité mitotique au niveau de cette couche cellulaire.

Chapitre 3 Les tissus épithéliaux

3.1 Introduction

Les multiples réactions biochimiques responsables du maintien des fonctions vitales ne sont qu'un exemple de la complexité du corps humain. La survie de l'organisme vivant repose sur la communication entre les organes ; le corps humain forme un tout. Malgré cette complexité, le corps humain se compose de seulement quatre types de tissus : (1) le tissu conjonctif caractérisé par l'abondance de matériel extracellulaire, (2) le tissu musculaire composé de cellules allongées qui ont la capacité de se contracter, (3) le tissu nerveux dont les cellules sont capables de recevoir, de générer et de transmettre des impulsions nerveuses et (4) le tissu épithélial, formé de cellules très proche les unes des autres, et où la cohésion est très forte (Junquera, Carneiro et Kelly, 1992 ; cité par Shaw, 1996).

Le premier usage documenté du mot épithélium remonte à 1715. Il signifiait « fine pellicule qui recouvre le mamelon » (Ruysch, 1715 ; cité par Maillet, 1976). La région décrite par cette première définition ne représente qu'une faible partie de l'épiderme. Par la suite, la définition a été modifiée pour inclure tous les tissus qui se composent de cellules juxtaposées recouvrant ou limitant le corps et les cavités de l'organisme (épithélium de revêtement). Finalement, un élargissement de la définition a permis d'inclure les épithélia de type glandulaire (Maillet, 1976). En effet, au cours du développement embryonnaire, les glandes, ensemble de cellules qui produisent et sécrètent une substance, sont formées par invagination d'un feuillet épithélial (Marieb, 1993). La définition du terme épithélium se base uniquement sur des caractéristiques structurales. Il n'est pas possible de créer une définition universelle qui inclurait l'ensemble des phénotypes observés dans les différents épithélia (Davies, 1997). À ce jour, aucun marqueur moléculaire qui soit exprimé dans tous les épithélia du corps humain n'a pu être identifié. Ce chapitre décrit la structure, la classification, les propriétés et les fonctions des épithélia de revêtement. Ces notions générales seront revues dans le contexte particulier des couches épithéliales de la cornée.

3.2 La classification des tissus épithéliaux de revêtement

La classification des différents tissus épithéliaux se base sur trois critères : la forme des cellules, le nombre de couches de cellules ou d'assises et la présence de structures superficielles spécialisées (Marieb, 1993). Il existe trois formes de cellules épithéliales : cubique, cylindrique et pavimenteuse. Les variations morphologiques des cellules s'expliquent par un changement au niveau du volume, influençant ainsi leur hauteur très aplaties, les cellules pavimenteuses prennent l'aspect d'un pavé. Les cellules cubiques sont aussi larges que hautes tandis que les cellules cylindriques sont plus hautes que larges (Marieb, 1993). Les cellules épithéliales ont une structure tridimensionnelle à six côtés assez similaire les unes par rapport aux autres et ce malgré les différents endroits où l'on rencontre ces cellules. Le noyau est unique mais sa forme et sa localisation diffèrent avec le type de cellule (Maillet, 1976). Il est sphérique et central dans les cellules cubiques, ovoïde et au niveau du tiers moyen dans les cellules cylindriques et discoïde au centre des cellules pavimenteuses. Les cellules épithéliales possèdent les mêmes organites que n'importe quelle autre cellule du corps humain. Les mitochondries sont assez abondantes et montrent une localisation périnucléaire dans les cellules pavimenteuses et sous le noyau dans les cellules cylindriques. L'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique varient en importance en fonction de l'activité cellulaire que la cellule doit maintenir (Maillet, 1976).

Le deuxième critère de classification est le nombre de couches de cellules que le tissu possède. L'épithélium simple possède une seule couche de cellules dont l'orientation est commune : tous les pôles apicaux forment la surface et tous les pôles basaux reposent sur la lame basale (Maillet, 1976). La minceur de cette couche cellulaire contribue à augmenter la vitesse de certains processus biologiques comme la filtration et l'absorption d'éléments nutritifs (Marieb, 1993). L'épithélium stratifié compte au moins deux couches de cellules et se situe surtout là où les forces de friction sont élevées comme par exemple la muqueuse buccale et la peau.

En plus de la morphologie des cellules et du nombre de couches dans lesquelles elles sont disposées, un troisième critère permet de préciser davantage le type d'épithélium

observé. Il s'agit de la présence, sur la surface libre ou apicale des cellules, de petites structures spécialisées comme des cils, des microvillosités ou encore de la présence d'une protéine comme la kératine (Maillet, 1976). Tous les épithélia ne présentent pas de spécialisation particulière mais certains tissus nécessitent la présence de ces structures pour optimiser leur rendement ou pour se protéger. Des cils, longs appendices cytoplasmiques mobiles doués de mouvements pendulaires ou ondulants, sont présents au niveau de l'épithélium du système respiratoire et des voies excrétrices. De telles structures aident à propulser les substances muqueuses dans le but de libérer les voies respiratoires ou de faire circuler les liquides dans les voies excrétrices des testicules (Marieb, 1993 ; Maillet, 1976).

Les microvillosités, projections cylindriques limitées par la membrane plasmique apicale, augmentent la surface de contact entre la région exposée et l'environnement (Maillet, 1976). Ces appendices peuvent multiplier par vingt-cinq fois l'absorption totale du tissu, améliorant considérablement les capacités de transport (Alberts et coll., 1994). L'épithélium tapissant l'intérieur des intestins présente un nombre considérable de ce type d'appendice ; 225 à 1 717 cils/entérocytes dans le jéjunum et 3 000 cils/entérocytes dans l'iléon (Maillet, 1976). Les fonctions de sécrétion et d'absorption de l'intestin justifient la présence de ces structures (Marieb, 1993).

Certains types d'épithélia comme l'épithélium pavimenteux stratifié de la peau, ont la capacité de synthétiser de la kératine. La kératinisation résulte de la synthèse intracytoplasmique d'une protéine fibrillaire sulfurée, la kératine (Maillet, 1976). La kératine, protéine insoluble, présente au niveau de la peau, des poils, des cheveux et des ongles est sécrétée par l'épithélium de la peau dans le but de protéger les tissus sous-jacents contre les forces d'érosion et de friction (Marieb, 1993 ; Wheater, Burkitt et Daniels, 1987). En combinant les trois critères de classification, il est possible de décrire une variété de types d'épithélia. Pour éviter toute confusion, les épithélia stratifiés sont nommés selon la forme des cellules superficielles et non selon celle des cellules de la couche profonde. Le tableau III décrit la structure des différents types d'épithélia de revêtement retrouvés chez l'humain.

Tableau III: La description des différents épithélia de revêtement présents chez l'humain (Marieb, 1993 ; Tortora, 1994).

| TYPE D'ÉPITHÉLIA DE REVÊTEMENT | DESCRIPTION DU TISSU |
|------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ◇Épithélium pavimenteux simple | Une seule couche de cellules pavimenteuses. |
| ◇Épithélium cubique simple | Une seule couche de cellules cubiques. |
| ◇Épithélium cylindrique simple non cilié | Une seule couche de cellules rectangulaires non ciliées. |
| ◇Épithélium cylindrique simple cilié | Une seule couche de cellules rectangulaires ciliées sur la face apicale. |
| ◇Épithélium pavimenteux stratifié | Plusieurs couches de cellules : les cellules des couches profondes sont cylindriques ou cubiques tandis que les cellules superficielles sont pavimenteuses. Il existe une variété kératinisée. |
| ◇Épithélium cubique stratifié | Deux couches de cellules dont les cellules superficielles sont cubiques. |
| ◇Épithélium cylindrique stratifié | Plusieurs couches de cellules, les cellules des couches profondes sont généralement cubiques tandis que les cellules superficielles sont cylindriques. |
| ◇Épithélium cylindrique pseudostratifié | Une couche unique de cellules cylindriques dont le noyau des cellules se trouvent à différents niveaux. Toutes les cellules sont attachées à la membrane basale mais toutes n'atteignent pas la surface. |
| ◇Épithélium de transition | Un tissu représentant une transition entre l'épithélium pavimenteux stratifié et l'épithélium cubique stratifié dépendamment du degré d'étirement de l'organe. |

Deux types spéciaux d'épithélium, l'endothélium et le mésothélium ne font pas partie de cette classification. Ces deux épithélia pavimenteux simple ne forment pas un revêtement. En effet, tout tissu qui limite une cavité n'est pas obligatoirement un épithélium de revêtement. L'endothélium tapisse le cœur, les vaisseaux sanguins et lymphatiques et forme la paroi des capillaires tandis que le mésothélium forme la couche épithéliale des séreuses (Marieb, 1993). Les propriétés décrites dans la section suivante s'appliquent à la fois à l'endothélium, au mésothélium et aux épithélia de revêtement. Chacun des différents types d'épithélia ont des caractéristiques semblables malgré leurs différences histologiques.

3.3 Les propriétés des tissus épithéliaux

L'épithélium de revêtement se trouve principalement au niveau de la peau et constitue l'enveloppe de certains organes internes. Il tapisse l'intérieur des voies respiratoires, du tube digestif, des systèmes urinaire et reproductif. De plus, il peut se combiner avec le tissu nerveux pour former les organes sensoriels (Tortora, 1994). Les différents épithélia de revêtement dérivent des trois types de tissus embryonnaires soit l'ectoderme, l'endoderme et le mésoderme (Maillet, 1976). L'épithélium de la peau, de la bouche du nez et de l'anus proviennent de l'ectoderme. L'épithélium du système respiratoire et du système digestif proviennent de l'endoderme tandis que l'épithélium des vaisseaux sanguins dérive du mésoderme (Junquera, Carneiro et Kelly, 1992 ; cité par Shaw, 1996).

Les tissus épithéliaux possèdent plusieurs caractéristiques ou propriétés communes malgré la multitude d'endroits occupés dans le corps humain. Ces propriétés permettent de distinguer l'épithélium des autres groupes de tissus rencontrés dans le corps humain.

Les épithélia sont complètement ou partiellement perméables à diverses substances. Les tissus épithéliaux n'étant pas vascularisés, des problèmes au niveau de la nutrition des cellules pourraient survenir sans la diffusion des métabolites des capillaires situés dans le tissu conjonctif sous-jacent vers l'épithélium. L'acheminement des nutriments dépendra de la perméabilité des espaces intercellulaires, du gradient osmotique du

compartiment extracellulaire (Maillet, 1976) et de la sélectivité de la lame basale (Tortora, 1994). La polarité épithéliale fait référence aux différences qui existent dans le type de lipides et de protéines composant la membrane plasmique. La morphologie et la structure des surfaces apicale et basolatérale de la membrane plasmique permettent également de caractériser le tissu.

La section suivante explique la polarité et les moyens utilisés pour arriver à caractériser la membrane plasmique des cellules. Des interdigitations (section 3.3.2) et des jonctions cellulaires comme les jonctions serrées (section 3.3.2.1), les desmosomes et les hémidesmosomes (section 3.3.2.3), empêchent le tissu de se disloquer, augmentant la cohésion du tissu. Il existe un couplage électrophysiologique des cellules formant l'épithélium. Les jonctions de type gap permettent l'échange d'informations et de substances entre les cellules (section 3.3.2.2). De plus, les épithélia possèdent une forte capacité de renouvellement. Cette capacité mitotique en fait un tissu où la réépithélialisation d'une lésion est très rapide. La cicatrisation se fait habituellement grâce à la migration des cellules venant du bord de la plaie et aux mitoses des cellules marginales et des cellules du nouvel épithélium (Maillet, 1976).

3.3.1 La polarité

Les cellules épithéliales possèdent deux domaines : un domaine apical, souvent recouvert de microvillosités, en contact avec le milieu extérieur et un domaine basolatéral en contact avec le milieu interne (Simons et Fuller, 1985). Les conditions physiques et chimiques diffèrent souvent entre les deux milieux entraînant des différences morphologiques et physiologiques entre les deux domaines de la cellule (Junquera, Carneiro et Kelly, 1992 ; cité par Shaw, 1996). Ce sont les jonctions serrées (section 3.3.2.1) qui permettent de délimiter les deux domaines. La surface basale des cellules repose sur une matrice extracellulaire souvent organisée en une lame basale constituée de glycoprotéines sécrétées par les cellules épithéliales. Les cellules du tissu conjonctif sous-jacent à l'épithélium sécrètent également de minces fibres de collagène qui formeront la lame réticulaire. La lame basale et la lame réticulaire forment la

membrane basale (Marieb, 1993). C'est sur cette membrane que repose la stabilité du feuillet épithélial. Des jonctions cellulaires nommées hémidesmosomes (section 3.3.2.3) permettent le rattachement des cellules épithéliales à la membrane basale.

Les premières études des surfaces apicale et basolatérale de cellules épithéliales ont été réalisées avec l'épithélium du rein du chien, le MDCK pour « *Madin-Darby canine kidney* » (Simons et Fuller, 1985). Les résultats ont été obtenus à l'aide de virus. En effet, certains virus s'enveloppe avec la membrane plasmique de la cellule infectée lors de son bourgeonnement. Le VSV (*vesicular stomatitis virus*) par exemple bourgeonne à partir de la surface basolatérale (Rodriguez-Boulan, 1983 ; Sabatini et coll., 1983 ; cités par Simons et Fuller, 1985) tandis que le virus *influenza* bourgeonne au niveau de la surface apicale (Rodriguez-Boulan et Pendergast, 1980; Roth et coll., 1983 ; cités par Simons et Fuller, 1985). En étudiant l'enveloppe des virus, il a été possible d'obtenir des indications sur les protéines et les lipides formant les deux différents domaines des cellules.

La composition en lipides de la membrane apicale et basolatérale des cellules épithéliales est très peu connue. Il y a par contre des indications laissant croire qu'elle est différente pour les deux domaines. Des études sur l'épithélium du petit intestin du rat et de la souris ont permis d'observer qu'il y a environ deux fois plus de glycolipides et de cholestérols et une demie fois plus de phosphatidylcholines au niveau de la membrane apicale qu'au niveau de la surface basolatérale (Forstner, Tanaka, et Isselbacher, 1968 ; Douglas, Kerley, et Isselbacher, 1972 ; Kawai, Fujita, et Nakao, 1974 ; Brasitus et Schachter, 1980 ; cités par Simons et Fuller, 1985). Des analyses plus approfondies permettraient de déterminer plus précisément la composition en lipides des deux domaines et de vérifier les différences et les similitudes entre les différents types d'épithélia.

La distribution des protéines sur la surface apicale et basolatérale des cellules épithéliales peut être étudiée avec les méthodes suivantes : la cytochimie des enzymes, l'immunocytochimie, le fractionnement des membranes cellulaires, la liaison de ligand

et le dosage d'anticorps radioactifs (Simons et Fuller, 1985). Ces méthodes ont permis de conclure qu'une protéine spécifique se situe habituellement sur un des deux domaines et ce pour toutes les cellules de l'épithélium. Deuxièmement, une protéine localisée sur un des deux domaines pour un type d'épithélium se retrouvera sur le même domaine dans la majorité des autres types d'épithélia (Simons et Fuller, 1985). Des exceptions comme la phosphatase alcaline retrouvée sur la surface apicale de plusieurs épithélia mais sur la surface basolatérale des cellules du duodénum du rat (Mircheff et coll., 1979 ; cité par Simons et Fuller, 1985).

La polarisation des cellules permet non seulement de maintenir l'épithélium en santé mais aide également à prévenir la colonisation du tissu par des agents opportunistes comme *Pseudomonas aeruginosa* (Fleiszig et coll., 1997). Plusieurs bactéries telles *S. flexneri* (Mounier et coll., 1992 ; cité par Fleiszig et coll., 1997), *Klebsiella pneumoniae* (Hornick et coll., 1992 ; cité par Fleiszig et coll., 1997), *L. monocytogenes* (Gaillard et Finlay 1996 ; cité par Fleiszig et coll., 1997), *Pseudomonas aeruginosa* (Fleiszig et coll., 1997), et certains virus ont une préférence pour la membrane basolatérale dans leur mécanismes d'infection. La polarité cellulaire joue donc un rôle primordial dans la défense de l'organisme contre ces agents infectieux. L'arrangement d'un tissu sain, avec des complexes de jonctions cellulaires efficaces permettent une polarité du tissu et empêchent les bactéries d'atteindre la surface basolatérale et de coloniser le tissu (Fleiszig et coll., 1997).

3.3.2 La cohésion

La cohésion entre les cellules permet d'éviter la dislocation du tissu. Les interdigitations et les jonctions cellulaires sont deux structures assurant l'adhésion des cellules entre elles (Maillet, 1976).

Les interdigitations permettent à deux cellules voisines de s'enchâsser l'une dans l'autre. La membrane plasmique d'une cellule forme un trajet sinueux dans lequel la membrane plasmique de l'autre cellule s'insère augmentant leur surface de contact (Maillet M,

1976). De plus, des jonctions cellulaires se retrouvent fréquemment au niveau de ces interdigitations (Maillet, 1976).

Plusieurs jonctions cellulaires sont présentes dans les épithélia. Il s'agit de régions spécialisées dans la connexion des cellules entre elles ou avec la matrice extracellulaire (Alberts et coll., 1994). Plusieurs types de jonctions assurent la solidité du tissu ou la communication intercellulaire. Les jonctions serrées (*zonula occludens*) délimitent le domaine apical du domaine basolatéral des cellules épithéliales en obstruant l'espace intercellulaire (Schneeberger et Lynch, 1992). En direction basale, il y a les desmosomes tandis que les hémidesmosomes se situent au niveau de la surface basale des cellules. Enfin, les jonctions de type gap permettent la transmission des informations d'une cellule à l'autre (Maillet, 1976). La figure 2 montre la position et la structure des 4 principaux types de jonctions cellulaires.

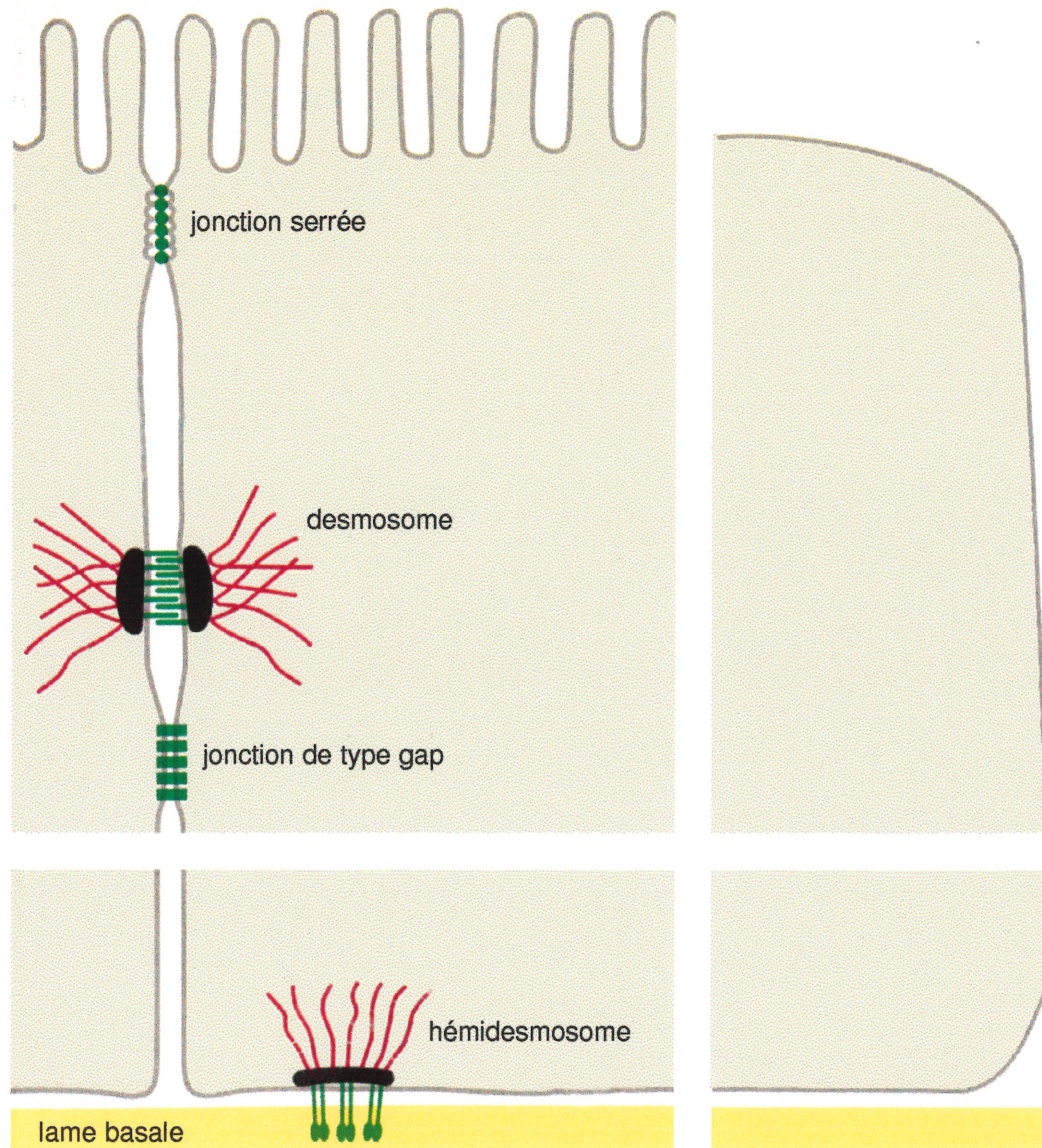


Figure 2 : Schéma montrant les 4 principaux types de jonctions cellulaires : les jonctions serrées, les desmosomes, les jonctions de type gap et les hémidesmosomes. Les cadhérines qui assurent l'adhérence intercellulaire et les intégrines qui sont impliquées dans l'adhérence des cellules à la matrice extracellulaire (lame basale) ne sont pas représentées.

3.3.2.1 Les jonctions serrées

Les jonctions serrées sont situées au niveau de la surface apicale des cellules épithéliales. Elles ont une structure moléculaire ressemblant à une ceinture continue mesurant entre 0,1 et 0,7 μm de largeur (Schneeberger et Lynch, 1992). Une jonction serrée est formée d'un nombre variable de chaînes de protéines membranaires, présentes dans les deux membranes plasmiques de cellules voisines (Alberts et coll., 1994). En microscopie électronique, elles apparaissent comme des points de fusion entre les feuillettes externes de la membrane plasmique de deux cellules adjacentes obstruant ainsi l'espace intercellulaire (Alberts et coll., 1994).

Plusieurs protéines forment la jonction serrée. L'occludine (Furuse et coll., 1993) et la claudine (Furuse et coll., 1998) sont des protéines transmembranaires associées à la jonction serrée. Trois protéines cytoplasmiques, ZO-1, ZO-2 et ZO-3, ont récemment été caractérisées et identifiées comme faisant partie de la famille des MAGuK (*membrane associated guanylate kinase family*). La protéine ZO-1 est une phosphoprotéine de 220 kDa située en périphérie de la membrane plasmique (Stevenson, 1986). Elle lie la partie C-terminale de l'occludine et aurait pour fonction de reconnaître l'occludine dans le processus de formation de la jonction serrée (Furuse et coll., 1994 ; cité par Petroll et coll., 1999). La protéine ZO-1 forme un hétérodimère avec ZO-2, une protéine de 160 kDa (Gumbiner, Lowenkopf et Apatira, 1991). ZO-3 est une protéine phosphorylée de 130 kDa qui interagit directement avec l'occludine et ZO-1 (Haskins, 1998). La figure 3 montre un modèle simplifié de la jonction serrée des cellules épithéliales et endothéliales. L'occludine interagit directement avec ZO-1, ZO-2 et ZO-3 tandis que ZO-2 est lié au complexe via ZO-1 (Haskins J, 1998). Plusieurs autres molécules cytoplasmiques comme la cinguline (Cordenonsi et coll., 1999), la JAM (molécule d'adhésion jonctionnelle) et la protéine Ras AF-6 (Itoh et coll., 1999 ; Bazzoni et coll., 2000) sont impliquées dans la formation de la jonction serrée. L'utilisation d'un anticorps dirigé contre ZO-1 facilite l'étude des jonctions serrées qui restent encore mystérieuses.

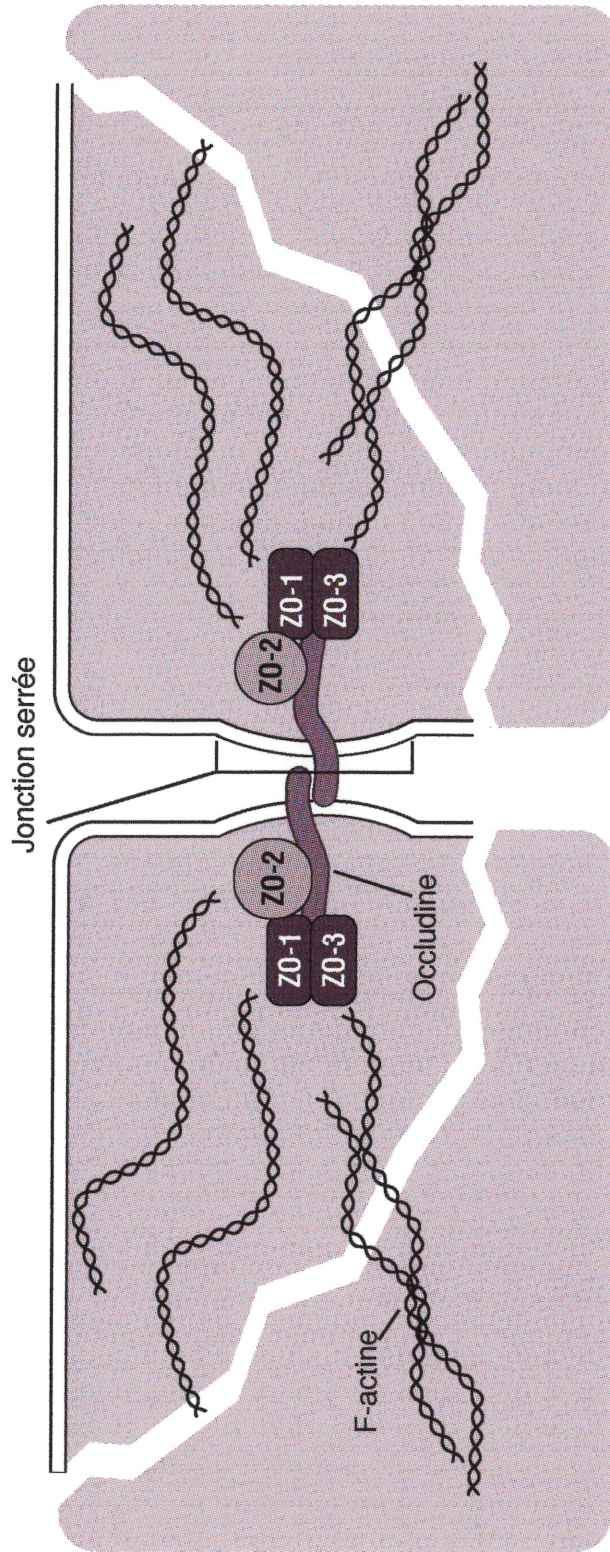


Figure 3 : Modèle simplifié d'une jonction serrée. La jonction serrée est scellée par deux occludines, une protéine transmembranaire. ZO-1 et ZO-3 se situent au niveau de la terminaison carboxyle de l'occludine tandis que ZO-2 forme un hétérodimère avec ZO-1. D'autres protéines cytoplasmiques (cinguline, molécule d'adhésion jonctionnelle (JAM) et Ras AF-6) ainsi qu'une autre protéine transmembranaire, la claudine, ne sont pas représentées sur la figure.

La surface apicale des cellules épithéliales présente une composition en protéines membranaires différente de la surface basale. Cette polarité une fois en place est maintenue en grande partie grâce aux jonctions serrées. Les membranes plasmiques étant fluides, il faut éviter que les protéines apicales basculent ou migrent vers la surface basolatérale (Alberts et coll., 1994). Les jonctions serrées agissent comme des barrières de diffusion des protéines membranaires entre les deux surfaces prévenant la redistribution des canaux ioniques, des pompes ioniques et enzymatiques (Diamond, 1977 ; cité par Schneeberger et Lynch, 1992). Les jonctions serrées soudent les cellules entre elles empêchant les molécules hydrosolubles de passer entre les cellules.

La protéine ZO-1 serait impliquée au niveau de la régulation de la différenciation des cellules épithéliales cornéennes chez l'homme et chez le lapin (Ryeom, Paul, et Goodenough, 2000). La création de cellules où le gène codant pour ZO-1 a été inactivé a permis d'observer une morphologie fibroblastique de ces cellules comparativement à des cellules non-mutées. Ces dernières affichaient une morphologie normale soit arrondie. Ces mutants sont une première étape dans l'étude de la voie de signalisation des protéines impliquées au niveau des jonctions serrées.

3.3.2.2 Les jonctions de type gap

La libération d'hormones et de cytokines dans l'environnement des cellules épithéliales permet de répondre à une stimulation des cellules parfois de types forts différents. La jonction de type gap, la plus répandue dans les tissus animaux, se présente en microscopie électronique comme une région où les membranes plasmiques de deux cellules voisines sont séparées par une fine ouverture d'une largeur de 2 à 4 nm (Bennett et coll., 1991 ; Beyer, 1993; cités par Alberts et coll., 1994).

Une jonction de type gap peut regrouper plusieurs centaines de connexons, structure formée de 6 sous-unités protéiques, les connexines. Lorsque les connexons, localisés dans la membrane plasmique, de deux cellules voisines sont alignés, ils forment un canal aqueux reliant les milieux intracellulaires des deux cellules (Kumar et Gilula, 1992 ; Stauffer et Unwin, 1992; cités par Alberts et coll., 1994). Environ 14 connexines

ont été identifiées jusqu'à maintenant permettant (1) de diversifier la composition des connexons dans les différents tissus, (2) de varier la perméabilité des canaux et (3) de transmettre des messages différents aux cellules adjacentes (Steinberg, 1998). Par contre, il n'a pas encore été démontré que différents types de connexines peuvent former un même connexon (Steinberg, 1998).

Les jonctions de type gap sont des jonctions dites communicantes. En effet, elles permettent l'échange de petites molécules comme des ions, des acides aminés, des oses, des nucléotides et des vitamines entre les cellules. La taille de ces molécules ne doit pas dépasser 1 000 daltons puisque la taille des pores est estimée à environ 1,5 nm (Bennett, 1991 ; Beyer, 1993 ; cités par Alberts et coll., 1994). Les pores des jonctions de type gap oscillent entre un état fermé et ouvert. Le calcium (Ca^{2+}) libre et le pH ont un effet direct et rapide sur la perméabilité des jonctions. Une augmentation de la concentration de Ca^{2+} ou une diminution du pH dans le cytosol entraîne une fermeture des canaux tandis qu'une diminution de Ca^{2+} ou une augmentation du pH dans le cytosol entraîne une ouverture des pores (Bennett et Verselis, 1992 ; Sgaz et coll., 1993 ; cités par Alberts et coll., 1994). Ces changements d'états montrent bien la structure dynamique des jonctions de type gap.

Un exemple bien précis montre à quel point il est important que les cellules puissent fermer les jonctions gap. Lorsqu'une cellule d'un feuillet épithélial est endommagée, son étanchéité diminue permettant au sodium (Na^+) et au Ca^{2+} , présents dans le milieu extracellulaire, d'entrer dans la cellule. L'influx de Ca^{2+} dans la cellule entraîne la fermeture des canaux des jonctions de type gap empêchant les cellules voisines de subir les mêmes changements physico-chimiques. La fermeture des canaux limiteront la propagation des dégâts (Bennett et Verselis, 1992 ; Sgaz et coll., 1993 ; cités par Alberts et coll., 1994).

Il est plus facile de comprendre les fonctions exercées par ces jonctions communicantes dans les tissus composés de cellules électriquement excitables (cellules nerveuses ou musculaires), où elles laissent les potentiels d'action se propager, plutôt que dans les

tissus dépourvus de cellules excitables (Warner, 1992 ; cité par Alberts et coll., 1994). Les jonctions de type gap seraient impliquées dans l'embryogenèse. En effet, les gradients de concentration, établit grâce à la perméabilité des canaux, renseigneraient les cellules sur leur position et contrôlraient leur différenciation en fonction de leur localisation dans l'embryon (Warner, 1992 ; cité par Alberts et coll., 1994). Des études récentes ont permis de découvrir de nouvelles fonctions pour les jonctions de type gap (tableau IV).

Tableau IV : Les observation associées à différentes connexines suite à la délétion des gènes codant pour cette protéine chez la souris.

| Connexines délétées | Observations associées |
|----------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Cx43 | Des implications dans le développement du tissu cardiaque et dans le développement de d'autres tissus (Reaume et coll., 1995). |
| Cx37 | Une infertilité des animaux causée par le manque de maturation des follicules ovariens (Simon, Goodenough et Paul, 1997). |
| Cx32 | Des anormalités hépatiques sont observées chez les souris et développement de tumeurs au niveau du foie (Nelles et coll., 1996 ; Temme et coll., 1997). |
| Cx46 | Le développement rapide de cataractes et un taux anormal de dégradation des protéines du cristallin (Gong et coll., 1997). |

3.3.2.3 Les desmosomes et les hémidesmosomes

Les desmosomes et les hémidesmosomes sont des jonctions d'ancrage. Ils attachent mécaniquement les cellules aux cellules adjacentes ou à la matrice extracellulaire. Plus précisément, ils agissent comme des rivets pour distribuer les forces de tension dans l'épithélium ou de dispersion dans le tissu conjonctif sous-jacent (Alberts et coll., 1994).

Le desmosome se compare à un bouton-pression. Il permet d'ancrer les cellules les unes aux autres augmentant la stabilité de l'épithélium (Pepose et Ubels, 1992). Il s'agit d'une plaque cytoplasmique dense formée de protéines intracellulaires. Cette plaque réunit le cytosquelette de la cellule à des protéines de liaisons transmembranaires appartenant à la famille des cadhérines, qui interagissent ensemble pour maintenir les deux membranes plasmiques adjacentes (Buxton et Magee, 1992 ; Buxton et coll., 1993 ; Legan, Collins et Garrod, 1992 ; Schwarz et coll., 1990; cités par Alberts et coll., 1994).

Le desmosome intervient, tout comme la jonction serrée, dans la connexion des cellules entre elles. Par contre, contrairement aux jonctions serrées, ce type de jonction est perméable et la membrane plasmique de deux cellules voisines ne se touchent pas. Elles sont plutôt maintenues entre elles par des glycoprotéines transmembranaires (Marieb, 1993). La desmocolline et la desmogléine sont deux protéines de liaisons transmembranaires Ca^{2+} -dépendantes, appartenant à la famille des cadhérines, présentes entre les deux membranes plasmiques de cellules voisines et qui assurent l'adhérence cellulaire dans les tissus animaux (Legan, Collins et Garrod, 1992).

Lorsqu'il y a élaboration d'un demi-desmosome sur la membrane plasmique d'une cellule, le demi-desmosome complémentaire sera formé sur la cellule voisine pour former un desmosome (Marieb, 1993). L'adhérence cellulaire des desmosomes est dite homophile puisque le demi-desmosome s'attachera à un demi-desmosome identique fourni par la cellule voisine tandis que l'adhérence cellulaire des hémidesmosomes est

dites hétérophile puisque l'hémidesmosome se liera à la matrice extracellulaire sous-jacente (Legan et coll., 1992).

3.4 Les fonctions des tissus épithéliaux

Les tissus épithéliaux sont présents à différents endroits dans l'organisme vivant. Ils interviennent au niveau de la réception sensorielle, de la lubrification, de la digestion, de l'absorption, de la reproduction, de la sécrétion, de la protection, de la filtration, de l'excrétion du tissu et dans le transport cellulaire. Ils ont par contre une fonction commune peu importe l'endroit où ils se situent : l'épithélium agit comme une barrière de perméabilité sélective entre les fluides intra et extracellulaires (Alberts et coll., 1994 ; Tortora, 1994).

La fonction de l'épithélium est hautement associée à sa localisation et plus précisément au rôle que l'organe ou la glande assure dans l'organisme. Le tableau V dresse une liste des différentes fonctions remplies par les divers types d'épithélia de revêtement ainsi que leurs localisations chez l'homme.

Tableau V : Les fonctions des différents types d'épithélia de revêtement ainsi que leurs localisations chez l'humain (Marieb, 1993 ; Tortora, 1994).

| Types d'épithélia | Localisations | Fonctions |
|-------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ◇ Épithélium pavimenteux simple | Les sacs alvéolaires ; glomérules des reins ; revêtement des cavités du cœur, des vaisseaux sanguins et lymphatiques | Le passage de substances par diffusion et filtration. Dans les séreuses, il sécrète des substances lubrifiantes |
| ◇ Épithélium cubique simple | Les tubules rénaux ; surface des ovaires ; épithélium pigmentaire de la rétine ; tapisse la face antérieure sous la capsule du cristallin | La sécrétion et l'absorption |
| ◇ Épithélium cylindrique simple non cilié | L'intérieur du tube digestif de l'estomac à l'anus, la vésicule biliaire et les canaux excréteurs de certaines glandes | L'absorption ; la sécrétion de mucus, d'enzymes et d'autres substances |
| ◇ Épithélium cylindrique simple cilié | L'intérieur des bronches, les trompes utérines et certaines régions de l'utérus | Les cils font avancer le mucus ou les cellules reproductrices |
| ◇ Épithélium pavimenteux stratifié | La variété non kératinisée forme les muqueuses de l'œsophage, de la bouche, du vagin et de l'épithélium cornéen ; la variété kératinisée forme l'épiderme de la peau | La protection des tissus sous-jacents dans les régions sujettes à l'abrasion |
| ◇ Épithélium cubique stratifié | Les canaux des glandes sudoripares, mammaires et salivaires et partie de l'urètre chez l'homme | La protection |
| ◇ Épithélium cylindrique stratifié | L'urètre de l'homme ; certaines glandes et une partie de la conjonctive | La protection ; la sécrétion |
| ◇ Épithélium cylindrique pseudostratifié | La variété non-ciliée tapisse les canaux de grosses glandes et certaines parties de l'urètre de l'homme ; la variété ciliée tapisse la trachée et les voies respiratoires supérieures | La sécrétion de mucus et le déplacement du mucus par l'action ciliaire |
| ◇ Épithélium de transition | L'intérieur des uretères et la vessie | La distension des organes |

Chapitre 4 L'épithélium cornéen

4.1 Introduction

La morphologie aplatie des cellules superficielles, l'empilement de plusieurs couches de cellules et l'absence de synthèse de kératine par les cellules épithéliales permettent de classer l'épithélium de la cornée comme un épithélium pavimenteux stratifié non-kératinisé. La morphologie des cellules épithéliales cornéennes intervient non seulement au niveau de la transparence de la cornée mais permet également à la lumière incidente d'être correctement réfractée sur la totalité de la surface de la cornée (Haddad A, 2000).

L'épithélium cornéen se compose d'environ six couches de cellules, représentant environ 10% de l'épaisseur totale de la cornée (Ehlers, 1970 ; cité par Klyce et Beuerman, 1998). La stratification du tissu présente trois types cellulaires. Une seule couche de cellules basales cylindriques repose sur une lame basale. Ces cellules représentent le tiers de l'épaisseur de l'épithélium cornéen central et sont responsables du renouvellement des cellules (Fatt et Weissman, 1992). Deux ou trois couches de cellules polygonales ou cellules à ailes suivent en direction antérieure. Ces cellules dérivent des cellules basales et les recouvrent. Finalement, deux ou trois couches de cellules superficielles s'aplatissant au fur et à mesure qu'elles approchent de la surface de la cornée complètent la stratification de l'épithélium cornéen (Fatt et Weissman, 1992).

4.2 La morphologie de l'épithélium cornéen

4.2.1 Les cellules basales

Les cellules basales sont différentes morphologiquement des autres types cellulaires formant l'épithélium cornéen. Cette unique couche de cellules fait le lien entre la lame basale et les cellules à ailes. Plusieurs jonctions cellulaires (section 4.2.4) sont responsables de l'attachement des cellules basales entre elles ainsi qu'à la membrane basale. Les cellules basales mesurent entre 18 et 20 μm de hauteur et leur diamètre varie de 8 à 10 μm (Klyce et Beuerman, 1998). La tête arrondie de ces cellules cylindriques

permet aux cellules à ailes de s'y ancrer tandis que leur base plate repose sur la membrane basale.

Les cellules basales possèdent plus d'organites que les couches antérieures de l'épithélium (Klyce et Beuerman, 1998). Le cytoplasme contient un appareil de Golgi, un réticulum endoplasmique lisse et rugueux, des ribosomes, et un nombre moyen de mitochondries (Klyce et Beuerman, 1998), indiquant un métabolisme aérobie oxydatif moyennement actif (section 2.4.1) (Fatt et Weissman, 1992). Plusieurs granules de glycogène sont présentes dans le cytoplasme des cellules basales (section 2.1). Cette réserve d'énergie est utilisée quand les cellules subissent un stress physiologique ou environnemental (Klyce et Beuerman, 1998). Les cellules basales sont responsables du renouvellement de l'épithélium dans sa totalité puisqu'elles sont les seules à posséder une activité mitotique (section 4.3.1).

Ces cellules étant en contact direct avec la membrane basale, elles assurent l'adhésion du feuillet épithélial au tissu sous-jacent. Elles possèdent des récepteurs, faisant partie de la famille des intégrines, pour une classe de protéines nommée les laminines. Les laminines, le collagène et l'héparane sulfate sont les composantes majeures de la membrane basale. Il existe onze isoformes de laminines (Ebihara et coll., 2000). La membrane basale de la conjonctive et des cellules du limbe cornéen comprend les laminines 2 et 4 tandis que la membrane basale de la cornée comprend les laminines 1 et 5 (Kurpakus et coll., 1999). Trois intégrines, présents sur les cellules épithéliales cornéennes humaines, interagissent avec les laminines $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 6\beta 4$, $\alpha 3\beta 1$ et $\alpha 2\beta 1$ de la membrane basale (Ebihara et coll., 2000 ; Kurpakus et coll., 1999). Le type de laminine ainsi que leur degré de maturation peuvent affecter l'adhésion que la cellule aura avec la membrane basale. L'interaction entre l'intégrine $\alpha 3\beta 1$ d'une cellule épithéliale cornéenne avec la laminine-5 endogène (non-mature), suite à une blessure, indique à la cellule qu'elle peut commencer sa migration. Par contre, l'interaction avec la laminine-5 exogène inhibe la migration et favorise l'adhésion cellulaire ainsi que la formation d'hémidesmosomes (Ebihara et coll., 2000).

4.2.2 Les cellules à ailes de Ranvier

Deux à trois couches de cellules à ailes forment la portion intermédiaire de l'épithélium cornéen. Ces cellules polygonales, à grand axe horizontal, plus ou moins irrégulières dérivent des cellules basales. La couche de cellules ailées la plus postérieure reposent sur les cellules basales (Fatt et Weissman, 1992). Ces cellules s'aplatissent de plus en plus au fur et à mesure qu'elles sont poussées vers la surface de la cornée. Elles se transforment en cellules superficielles deux couches avant d'être exfoliées (Fatt et Weissman, 1992). Les jonctions cellulaires présentes au niveau de ces cellules sont présentées à la section 4.2.4.

Contrairement aux cellules basales qui possèdent un pouvoir mitotique, les cellules à ailes ne sont pas dotées d'une telle activité. Ces cellules sont dans un stade intermédiaire de différenciation puisqu'elles poursuivent leur migration vers la surface de la cornée.

4.2.3 Les cellules superficielles

Les cellules superficielles forment une barrière entre les larmes et l'intérieur de la cornée (Pepose et Ubels, 1992). Ces cellules dont le diamètre varie entre 40 et 60 μm forment les deux ou trois premières couches de l'épithélium cornéen (Klyce et Beuerman, 1998). Ces cellules ayant traversé, dans leur migration vers la surface, la totalité de l'épaisseur de l'épithélium montrent une différenciation maximale. Leur morphologie très aplatie indique une phase de dégénérescence avancée, d'où la présence de très peu d'organites. Quelques ribosomes, de petites mitochondries et des fragments de réticulum endoplasmique sont visibles dans le cytoplasme (Klyce et Beuerman, 1998). L'appareil de Golgi, très peu développé, reflète la synthèse ou l'exportation inopportune de protéines de cellules prochainement éliminées (Klyce et Beuerman, 1998). En effet, l'action des paupières et des larmes exfolieront de la surface de la cornée les cellules mortes (Ren et Wilson, 1996 ; cité par Dua et Azura-Blanco, 2000).

L'exfoliation des cellules superficielles rend la surface de la cornée très irrégulière. Le film lacrymal doit toujours être en contact avec la surface oculaire afin de prévenir

l'exposition de la cornée à l'air ambiant et de rendre la surface de réfraction lisse. La continuité du film lacrymal est maintenue par l'émergence de la nouvelle cellule avant même l'élimination de la vieille cellule (Klyce et Beuerman, 1998). De plus, la membrane apicale des cellules superficielles possède deux structures qui facilitent la répartition et l'adhésion du film lacrymal : les microvillosités et la glycocalyx.

Les microvillosités, décrites depuis longtemps en microscopie électronique (Nichols, Chiappino, et Dawson, 1985) ont été également observées au microscope de force atomique (AFM). Grâce à cette nouvelle technique permettant l'observation des tissus dans des conditions semblables à leur environnement naturel (Tsilimbaris et coll., 2000), l'identification de variations de taille et de densité des microvillosités des cellules épithéliales cornéennes ont été identifiées. Au microscope électronique à balayage, l'épithélium cornéen présente des cellules foncées, moins foncées et pâles. Cette différence dans l'apparence est reliée à l'âge de celles-ci ; les cellules foncées étant les plus vieilles (Pepose et Ubels, 1992). Les différences au niveau de la densité des microvillosités observées en microscopie de force atomique correspondraient aux différentes couleurs observées dans l'ultrastructure, les cellules foncées ayant une densité plus élevée en microvillosités (Tsilimbaris et coll., 2000). Ces microvillosités jouent un rôle dans la répartition du film lacrymal pour créer une surface de réfraction lisse indispensable à une vision optimale (Pepose et Ubels, 1992).

Les cellules superficielles cornéennes sécrètent, au niveau des microvillosités, une glycoprotéine appelée glycocalyx. La couche de glycocalyx dont l'épaisseur à la surface cornéenne varie entre 0,4 et 1 μm d'épaisseur à la surface de la cornée (Nichols et coll., 1985), interagit avec une composante de la couche profonde du film lacrymal, la mucine (Pepose et Ubels, 1992). Les cellules épithéliales étant hydrophobes, l'adhésion du film lacrymal, directement sur les cellules superficielles serait très difficile sans la mucine. En effet, en s'attachant à la glycocalyx, la mucine engendre la formation d'une couche hydrophile, permettant l'adhésion du film lacrymal et sa distribution à la surface de la cornée (Berman, 1991). Le film lacrymal et l'épithélium cornéen lui-même protègent efficacement les tissus oculaires postérieurs à l'épithélium de la cornée.

4.2.4 Les jonctions cellulaires de l'épithélium cornéen

Les cellules de l'épithélium cornéen possèdent, comme les autres types de cellules épithéliales, des complexes de jonctions cellulaires. L'épithélium cornéen étant formé de trois types distincts de cellules, des différences dans la distribution des jonctions cellulaires existent. Le tableau VI résume les types de jonctions cellulaires présents au niveau des cellules épithéliales de la cornée.

Tableau VI : Les jonctions cellulaires des trois types cellulaires de l'épithélium cornéen (Pepose et Ubels, 1992 ; Klyce et Beuerman, 1998).

| Type de cellules | Type de jonctions cellulaires |
|---------------------------|----------------------------------------------------------|
| ◇ Cellules superficielles | -Jonctions serrées -Desmosomes |
| ◇ Cellules à ailes | -Desmosomes -Jonctions de type gap |
| ◇ Cellules basales | -Desmosomes -Jonctions de type gap -Hémidesmosomes |

Les cellules superficielles sont constamment soumises aux pressions abrasives des paupières (Gipson et Sugrue, 1994). Aussi, doivent-elles bien s'ancrer les unes dans les autres pour éviter une exfoliation trop rapide. Les jonctions serrées assurent le rattachement des cellules entre elles (Gipson et Sugrue, 1994). Ce type de jonction, présent au niveau des couches superficielles de l'épithélium cornéen, prévient aussi le mouvement des particules présentes dans les larmes, vers les espaces intercellulaires (Klyce et Beuerman, 1998). Lorsque l'endothélium cornéen est endommagé, l'humeur aqueuse traverse le stroma, provoquant un œdème épithélial puisque le fluide reste emprisonné dans l'épithélium cornéen à cause de la présence des jonctions étanches (Klyce et Beuerman, 1998). Ces jonctions serrées forment une barrière efficace contre les pathogènes puisque les cellules superficielles épithéliales cornéennes dépourvues de

jonctions serrées sont préférentiellement colonisées par *Pseudomonas aeruginosa* (Fleiszig et coll., 1997).

Les desmosomes sont présents dans toutes les couches de l'épithélium cornéen et de manière plus importante au niveau des cellules à ailes (Gipson et Sugrue, 1994). Ce type de jonction apporte une grande stabilité latérale au tissu (Klyce et Beuerman, 1998). Les filaments intermédiaires, associés aux desmosomes, permettent de stabiliser les structures internes des cellules et d'augmenter leur rigidité (Gipson et Sugrue, 1994). Contrairement aux autres tissus épithéliaux, les desmosomes de l'épithélium cornéen sont formés d'une seule paire de glycoprotéines, la desmocolline 2 (Dsc2) et la desmogléine 2 (Dsg2) (Messent et coll., 2000). Cette caractéristique indique que les desmosomes de l'épithélium cornéen maintiennent l'intégrité du feuillet épithélial pendant les processus de réépithélialisation et de guérison suite à une blessure (Messent et coll., 2000).

Les différentes couches de l'épithélium cornéen montrent la présence de jonctions de type gap (McLaughlin et coll., 1985). Ces jonctions permettent la transmission de signaux chimiques ou électriques créant un tissu dynamique (Gipson et Sugrue, 1994). Ces jonctions sont présentes chez les cellules à ailes et les cellules basales de l'épithélium cornéen du lapin (McLaughlin, 1985). Les cellules superficielles semblent posséder de telles jonctions en immuno-détection. Par contre, il est difficile de confirmer qu'elles soient fonctionnelles (Williams et Watsky, 1997). Dans l'épithélium cornéen, les jonctions de type gap joueraient un rôle dans la différenciation cellulaire et dans la coordination de la migration des cellules dans les processus de renouvellement de l'épithélium, de développement et de guérison (Williams et Watsky, 1997).

Les hémidesmosomes interviennent dans l'adhésion cellule-matrice. Ils attachent la surface basale des cellules basales à la lame basale solidifiant ainsi la base du tissu épithélial (Pepose et Ubels, 1992). Les intégrines formant les hémidesmosomes se lient aux laminines de la membrane basale. L'addition des autres contacts intégrines-

laminines avec celui des hémidesmosomes crée un tissu très bien ancré à la membrane basale, évitant la dislocation de l'épithélium cornéen.

4.3 La physiologie du tissu

La cornée doit être fonctionnelle pour procurer une vision claire et précise (Lemp et Mathers, 1991). L'étude de la physiologie de l'épithélium cornéen permettra de mieux comprendre la dynamique entourant ce tissu. Il sera question du renouvellement de l'épithélium, de l'importance des vitamines A et C et finalement du transport ionique.

4.3.1 Le renouvellement de l'épithélium

La cornée est maintenue dans un équilibre parfait : la division cellulaire, et la maturation des cellules permettent d'équilibrer les pertes cellulaires dues à l'exfoliation des cellules. Le renouvellement de l'épithélium cornéen par les cellules basales, assure une constance des effectifs cellulaires dans le tissu. Les cellules épithéliales qui prennent naissance en périphérie, au niveau du limbe, migrent vers le centre de la cornée selon un mouvement centripète (Thoft et Friend, 1983). Ce mouvement, basé sur le maintien de l'épithélium cornéen, est nécessaire pour expliquer le taux de renouvellement de l'épithélium cornéen. Cette constatation a donné naissance à l'hypothèse $X + Y = Z$, où X est la prolifération des cellules basales, Y, le mouvement centripète des cellules du limbe, et Z, la quantité de cellules exfoliées à la surface de la cornée (Thoft et Friend, 1983).

Le renouvellement de l'épithélium cornéen a été étudié depuis longtemps en utilisant des techniques différentes. La thymidine tritiée, nucléoside radioactif utilisé comme substrat par la cellule en division pour fabriquer l'ADN de la cellule-fille, a permis d'étudier le mouvement des cellules épithéliales de la cornée (Hanna et O'Brien, 1960). L'injection du nucléoside dans l'humeur aqueuse de rats, où il sert de substrat aux cellules, a permis de suivre la migration des cellules épithéliales marquées et de démontrer que l'épithélium cornéen se renouvelait en 7 jours (Hanna et O'Brien, 1960). Une autre technique utilise une aiguille rotative contenant de l'encre et du dioxyde de thorium pour marquer l'épithélium et le stroma des deux cornées d'une souris (Buck, 1985). Sept

jours après le marquage, la marque est encore visible au même endroit dans le stroma mais s'est déplacée en direction du centre chez les cellules épithéliales cornéennes. L'épithélium ayant progressé en direction centripète d'environ $94 \mu\text{m}$ (± 14) en 7 jours (Buck, 1985). La conception classique basée sur des extrapolations indique que l'épithélium cornéen de l'homme et du lapin prendraient environ sept jours pour se renouveler (Hanna, 1960). Cependant, Haddad (2000) a estimé, en utilisant d'autres techniques plus sensibles, que l'épithélium du lapin, qui ressemble beaucoup à celui de l'homme, prendrait plus de deux semaines pour se renouveler et non 7 jours.

Les cellules responsables de l'activité mitotique de l'épithélium, les cellules basales, ne sont pas immortelles. Il existe des cellules souches qui ont pour rôle de fournir des cellules basales dotées d'une activité mitotique. Les caractéristiques de ces cellules se ressemblent beaucoup quel que soit le tissu (Hall et Watt, 1989 ; cité par Gipson et Sugrue, 1994). Les cellules souches sont très peu différenciées et possèdent une capacité de renouvellement illimitée et autonome (Dua et Azura-Blanco, 2000). Elles ont un potentiel asymétrique de division : une des deux cellules-filles demeure une cellule souche tandis que l'autre cellule, que l'on nomme cellule en phase intermédiaire de différenciation (« *transit amplifying cell* », TA), amorce un processus de différenciation irréversible (Hall et Watt, 1989 ; Schermer, Galvin, et Sun, 1986 ; cités par Gipson et Sugrue, 1994). La cellule TA n'a plus la capacité de se diviser de manière illimitée et possède un cycle de vie qui est plus rapide que celui des cellules souches. Les cellules souches des cellules basales se situeraient au niveau de la couche de cellules basales de l'épithélium du limbe (Gipson et Sugrue, 1994). Plusieurs indices indiquent que le limbe est bien l'emplacement des cellules souches de l'épithélium cornéen (tableau VII).

Tableau VII : Des indices désignant le limbe comme emplacement des cellules souches de l'épithélium cornéen.

| Indices | Preuves |
|----------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>◇ Les cellules basales du limbe possèdent un cycle de vie lent</p> | <p>Elles retiennent plus longtemps la thymidine tritiée que les autres types de cellules (Lavker et Sun, 1983 ; cité par Gipson et Sugrue, 1994).</p> |
| <p>◇ Les cellules basales du limbe sont moins différenciées</p> | <p>Elles ne sont pas reconnues par un anticorps dirigé contre une kératine de 64kDa, spécifique aux cellules de l'épithélium cornéen (Schermer et coll., 1986 ; cité par Gipson et Sugrue, 1994). Au fur et à mesure qu'elles migrent, elles expriment la kératine recherchée.</p> |
| <p>◇ Les cellules basales du limbe expriment des protéines différentes</p> | <p>Elles sont marquées par un anticorps dirigé contre une α-enolase contrairement aux cellules de l'épithélium cornéen et de la conjonctive (Zieske, Bukusoglu, et Yankauckas, 1992 ; cité par Gipson et Sugrue, 1994).</p> |
| <p>◇ Les cellules basales ont une activité mitotique plus élevée</p> | <p>Elles ont, en culture, une capacité de croissance et une activité mitotique plus élevées que les cellules de l'épithélium central (Ebato, Thoft et Friend, 1987 ; Dua et Azura-Blanco, 2000).</p> |

4.3.2 L'importance des vitamines A et C pour l'épithélium cornéen

Les vitamines sont des composés organiques nécessaires à la croissance et au maintien de l'homéostasie des êtres vivants. L'homme doit absolument les ingérer dans le cadre d'une diète équilibré (Marieb, 1993). Les vitamines sont des coenzymes, agissant en relation avec une enzyme dans le but d'accomplir de nombreuses réactions biochimiques. Il existe deux groupes de vitamines, les vitamines liposolubles et les vitamines hydrosolubles (Campbell, 1995). Les carences autant que les excès peuvent être problématiques pour la santé des individus.

Les vitamines liposolubles, A, D, E et K, se lient aux lipides que l'organisme ingère et sont absorbées par l'intestin grêle et le gros intestin. Ces vitamines ne sont pas éliminées dans les urines lors d'un excès de consommation, mais se déposent dans les graisses corporelles, d'où accumulation toxique si l'ingestion excessive se poursuit (Marieb, 1993 ; Campbell, 1995). Les vitamines hydrosolubles, B et C, sont absorbées avec l'eau au niveau de l'intestin grêle. Le surplus vitaminique de ce groupe de vitamines est éliminé dans les urines diminuant considérablement les cas de vitaminoses observés par rapport aux vitamines liposolubles (Marieb, 1993).

L'épithélium cornéen est influencé par les carences en vitamines A et C. La vitamine A ou rétinol appartient au groupe des vitamines liposolubles. Les huiles de foies de poissons, les jaunes d'œufs, les légumes à feuilles jaunes et vertes et les aliments enrichis sont des aliments en forte teneur en vitamine A (Marieb, 1993). Une carence en vitamine A entraînera une cécité nocturne, une kératinisation de l'épithélium cornéen, une diminution du nombre de cellules globulaires de la conjonctive et une opacification de la cornée (Rao, Friend, et Thoft, 1987 ; Sommer et Green, 1982 ; Hatchell et Sommer, 1984 ; cités par Tei et coll., 2000).

Des études sur plusieurs modèles d'animaux indiquent qu'une diète pauvre en vitamine A peut entraîner les complications suivantes : surface cornéenne irrégulière, exfoliation rapide des cellules superficielles et érosion de l'épithélium cornéen (Berman, 1991). Le

rat souffrant de carence en vitamine A, présente des hémidesmosomes réduits en taille et en densité ainsi qu'une diminution de la transcription et de la translation des composantes formant la membrane basale (Shams et coll., 1993). Ces observations expliquent le décollement de l'épithélium cornéen chez ces animaux. Par contre les phénomènes observés disparaissent et la cornée redevient physiologiquement saine si la diète est corrigée (Shams et coll., 1993).

La vitamine C ou acide ascorbique est une vitamine hydrosoluble présente dans les fruits et légumes plus particulièrement dans les tomates, les légumes verts feuillus, les agrumes et les fraises (Marieb, 1993). Elle est impliquée dans les réactions d'hydroxylation pour la formation de presque tous les tissus conjonctifs. Une carence en vitamine C provoque un assemblage anormal du collagène en fibres de collagène (Marieb, 1993). Une carence en acide ascorbique aura donc des incidences sur l'arrangement du stroma cornéen.

Au niveau de l'épithélium cornéen humain et bovin, l'acide ascorbique agirait comme un filtre contre les rayonnements ultraviolets (Brubaker et coll., 2000; Ringvold, Anderssen, et Kjonniksen, 2000). La concentration en acide ascorbique de plusieurs tissus oculaires est très élevée (Heath, 1962 ; cité par Ringvold et coll., 2000). L'épithélium cornéen des animaux diurnes, soumis à de fortes radiations ultraviolettes, ont un taux élevé en acide ascorbique (Ringvold, Anderssen, et Kjonniksen, 1998 ; cité par Brubaker et coll., 2000). La région centrale de l'épithélium cornéen bovin, celle qui recouvre la pupille, contient entre 12 et 23% plus d'acide ascorbique que la périphérie (Ringvold et coll., 2000). Cette forte concentration protégerait les couches profondes de la cornée des dommages occasionnés par les rayons ultraviolets. (Brubaker et coll., 2000).

4.3.3 Le transport ionique

L'épithélium cornéen a une faible conductance ionique au niveau de la membrane apicale et une résistance élevée (12 à 16 kohm/cm²) au niveau de la voie paracellulaire.

Il existe un potentiel transépithélial variant entre 25 et 35 mV causé par la diffusion passive des ions (Klyce et Crosson, 1985 ; cité par Pepose et Ubels, 1992). La résistance paracellulaire et le potentiel transépithélial dépendent de la présence des jonctions serrées au niveau des cellules superficielles. En effet, la valeur de la résistance descend jusqu'à zéro si l'on inhibe la fonction des jonctions serrées à l'aide d'une solution dépourvue de calcium (Wolosin, 1988; cité par Pepose et Ubels, 1992).

En plaçant des microélectrodes au niveau des cellules superficielles, le potentiel de membrane enregistré est de -30 mV. En déplaçant les électrodes au niveau des cellules à ailes, le potentiel demeure le même. Ceci implique que les nombreuses jonctions de type gap entre les cellules superficielles et les cellules à ailes forment un syncytium permettant à ces deux types de cellules de communiquer. Lorsque les microélectrodes sont déplacées au niveau des cellules basales, le potentiel baisse d'environ 10 à 20 mV (Klyce, 1977 ; cité par Pepose et Ubels, 1992). Cette baisse démontre qu'il y a réduction du degré de couplage électrolytique entre les cellules ailées et basales.

Ces différents potentiels sont maintenus par le transport ionique du sodium, du potassium et du chlore. Chez le lapin, le sodium diffuse de façon passive des larmes, où il est le plus concentré, vers le stroma cornéen (Klyce et Crosson, 1985). Des canaux situés au niveau de la membrane apicale des cellules superficielles permettent le passage du sodium (Pepose et Ubels, 1992). La sortie de sodium des cellules épithéliales en direction du stroma, sens contraire à son gradient électrochimique, nécessite la présence d'un transport actif sur la membrane basolatérale des cellules épithéliales du lapin (Klyce et Crosson, 1985). C'est une enzyme, la Na^+/K^+ -ATPase qui fournit l'énergie nécessaire au transport du sodium.

Ces pompes permettent de conserver une concentration intracellulaire élevée en potassium et basse en sodium en faisant sortir 3 ions sodium chaque fois que deux ions potassium entrent dans la cellule (Klyce et Beuerman, 1998). La membrane basolatérale du lapin possède une perméabilité assez élevée au potassium. L'ion potassium est transporté selon un mécanisme de recyclage. Les pompes Na^+/K^+ -ATPases pompent

activement du potassium dans les cellules basales pour compenser sa diffusion vers le stroma (Klyce et Crosson, 1985).

L'épithélium transporte les ions chlorure du stroma vers les larmes de manière sécrétoire. L'entrée de Cl^- dans les cellules basales du lapin se fait activement via un co-transporteur Na^+/Cl^- (Candia, 1990 ; cité par Pepose et Ubels, 1992). La diffusion de l'ion chlorure à travers la membrane apicale vers les larmes est régulée par les récepteurs β -adrénergique/complexe adénylate cyclase (Zadunaisky, 1966 ; Wiederholt, 1980 ; cités par Klyce et Beuerman, 1998). Les catécholamines libérées par les nerfs sympathiques cornéens réagissent avec les récepteurs β -adrénergique/complexe adénylate cyclase stimulant la production d'AMP cyclique et favorisant le transport des ions chlorures (Klyce, Neufels, et Zadunaisky, 1973 ; cité par Pepose et Ubels, 1992). La sécrétion active de chlore par l'épithélium cornéen indiquerait la participation de l'épithélium dans la régulation de l'hydratation du stroma (Zadunaisky et Lande, 1971 ; Candia, 1976 ; Klyce, 1977 ; cités par Klyce et Beuerman, 1998).

4.4 Les fonctions de l'épithélium cornéen

L'épithélium cornéen est en contact direct avec le film lacrymal, et par le fait même avec l'atmosphère environnante. Cette barrière semi-perméable diminue la déshydratation causée par l'évaporation et l'invasion de l'œil par des agents pathogènes (Gipson et Sugrue, 1994). Cette fonction de barrière est indispensable au maintien physiologique de l'œil. L'environnement véhicule divers éléments susceptibles de venir en contact avec l'épithélium. Les pressions abrasives et le frottement exercés par ces éléments étrangers et le mouvement des paupières peuvent causer des lésions à la cornée. La stratification de l'épithélium cornéen confère une bonne résistance au tissu face à ces pressions abrasives en empêchant la lésion d'atteindre les couches postérieures de la cornée (Gipson et Sugrue, 1994). Cette fonction de protection prévient la détérioration de la cornée.

Les cellules épithéliales ont développé une capacité de régénération très élevée dans le but d'accélérer le temps de cicatrisation (Wheater, Burkitt, et Daniels, 1987). Le risque

qu'une infection oculaire puisse se propager aux couches profondes de la cornée et troubler la vision et le confort d'un individu sera diminué si la plaie se referme rapidement. Cette fonction de réparation est hautement structurée et implique l'intervention de plusieurs mécanismes et molécules.

Chapitre 5 Le stroma cornéen

5.1 L'introduction

Le stroma cornéen, arrangement régulier et uniforme de fibrilles de collagène dans une matrice de protéoglycanes et d'eau, représente 90% de l'épaisseur de la cornée (Maurice, 1984). Ainsi que le représente la coupe histologique d'une cornée de lapin (voir la figure 1), le stroma est recouvert du côté antérieur par un épithélium stratifié, et du côté postérieur par une monocouche de cellules épithéliales, l'endothélium cornéen. Les corps cellulaires des kératocytes, bien visibles sur la figure 1 dans le stroma, constituent le seul type cellulaire abondant dans un stroma sain, bien que des neutrophiles, des lymphocytes et des cellules plasmiques peuvent être présents en très faible quantité (Snyder, Bergmanson, et Doughty, 1998). Le stroma est formé d'un empilement de lamelles de fibrilles de collagène entre lesquelles se trouvent les corps cellulaires des kératocytes (Klyce et Beuerman, 1998). Les fibrilles d'une lamelle sont parallèles entre elles. D'une lamelle à l'autre, les fibrilles sont orientées à différents angles (Klyce et Beuerman, 1998).

5.2 La composition du stroma

5.2.1 Les kératocytes

Le stroma cornéen humain contient environ 2,4 millions de kératocytes correspondant approximativement à 10% du poids du stroma ou à 2,4 % de son volume total (Moller-Pedersen, Ledet, et Ehlers, 1994; Moller-Pedersen et Ehlers, 1995). Ainsi qu'il est possible de l'observer sur la figure 4, les kératocytes en culture possèdent de longs prolongements cytoplasmiques. Les plus petits de ces prolongements ont un diamètre variant entre 0,05 et 0,13 μm et les plus gros, entre 0,26 et 0,90 μm (Muller, Pels, et Vrensen, 1995). Le gros noyau baigne dans un cytoplasme contenant quelques ribosomes, des mitochondries et un réticulum endoplasmique rugueux peu développé comparativement à l'appareil de Golgi (Klyce et Beuerman, 1998).

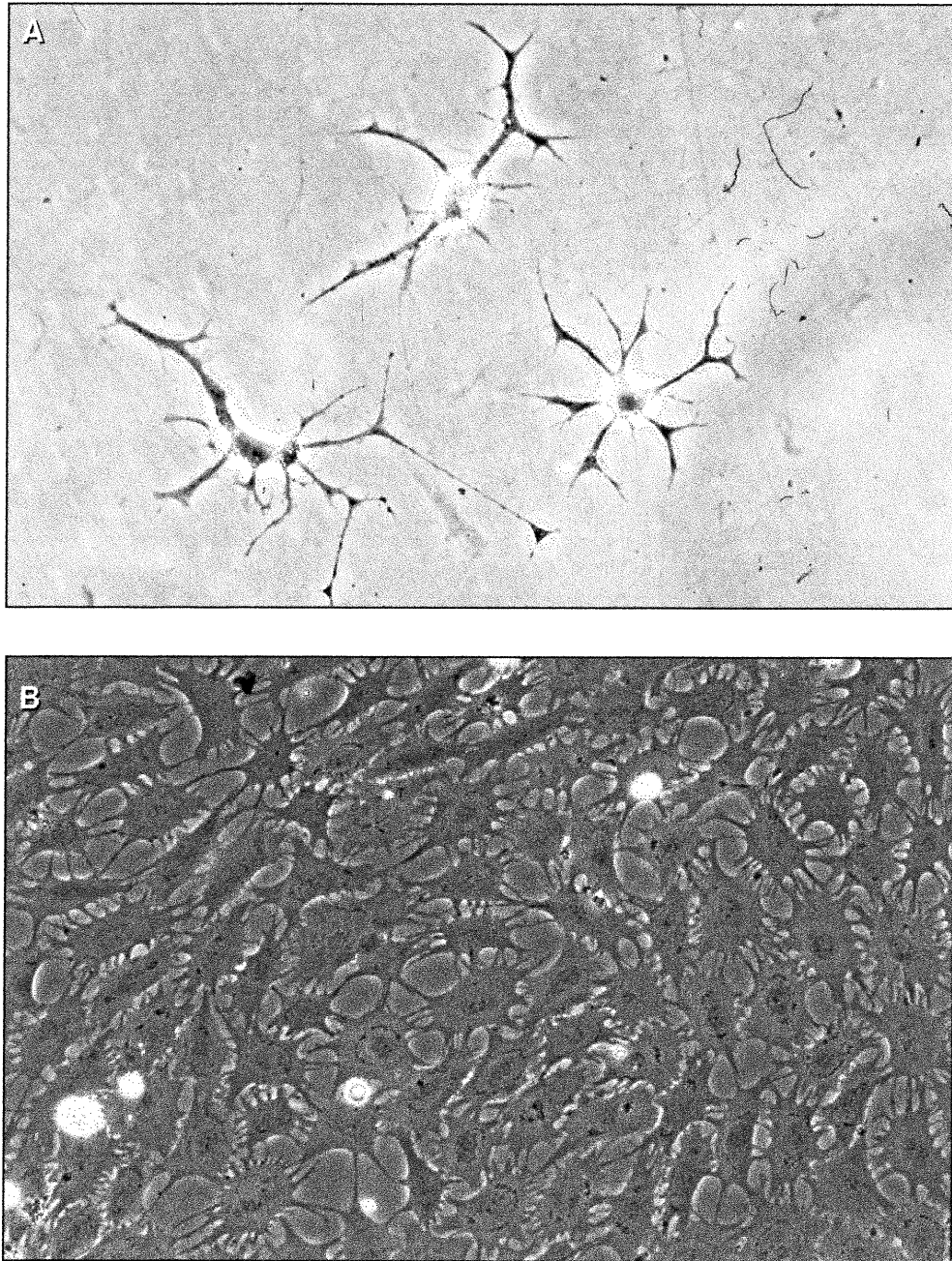


Figure 4: Kératocytes bovins primaires en culture photographiés au microscope par contraste de phase. A) Les longs prolongements cytoplasmiques reliant les kératocytes sont bien visibles dans les stades initiaux de la prolifération (grossissement : 300X.). B) Kératocytes photographiés lorsque la confluence des cellules est presque atteinte (grossissement : 200X). Plusieurs cellules sont en division.

La localisation des kératocytes dans le stroma cornéen influencerait leur morphologie et permettrait de les classer en deux catégories, les kératocytes antérieurs et postérieurs (Muller et coll., 1995). Les kératocytes antérieurs ont un corps cellulaire irrégulier, mince, et allongé tandis que les kératocytes postérieurs sont arrondis et plus larges que ceux de la partie antérieure (Poole, Brookes, et Clover, 1996). Les noyaux des kératocytes antérieurs contiennent plus d'hétérochromatine périnucléaire et possèdent deux fois plus de mitochondries que les kératocytes situés dans la partie postérieure du stroma. Ces différences morphologiques impliqueraient la synthèse de substances différentes par les kératocytes, dépendamment de leur localisation dans le stroma (Muller et coll., 1995).

Les kératocytes communiquent entre eux par des jonctions de type gap. La microscopie électronique et l'immuno-détection ont permis de localiser ce type de jonction dans les kératocytes de lapin et d'humain (Muller et coll., 1995 ; Ueda et coll., 1987). Le réseau fonctionnel de communication entre les kératocytes du stroma montre un couplage cellulaire inter-lamellaire plutôt qu'intra-lamellaire (Watsky, 1995). La communication inter-cellulaire des kératocytes interviendrait au niveau (1) des processus de guérison en participant à la signalisation inter-cellulaire et (2) de la nutrition du stroma en influençant les mouvements cytoplasmiques de l'oxygène et du glucose. En effet, face au gradient de concentration du glucose (plus concentré dans la cornée postérieure) et de l'oxygène (pO_2 plus élevée à l'avant du stroma de la cornée) à l'intérieur du stroma, un réseau de kératocytes pourrait, selon Watsky (1995), permettre un mouvement intercellulaire de glucose et d'oxygène ne dépendant d'aucune barrière de diffusion résidant dans le compartiment extracellulaire du stroma (Watsky, 1995).

Les kératocytes sont disposés en vrille dans le sens horaire, en direction antéro-postérieure dans le stroma (Muller et coll., 1995). La densité des kératocytes dans le stroma cornéen humain normal est maximale au niveau de la région antérieure et diminue graduellement vers la région postérieure avec une légère augmentation à 50 μm de l'endothélium, soit juste avant la membrane de Descemet (Prydal et coll., 1998). En plus de la diminution de densité antéro-postérieure d'environ 30%, la densité stromale

des kératocytes est plus élevée de 70% au centre comparativement au limbe (Moller-Pedersen et Ehlers, 1995). La densité centrale en kératocytes de la cornée humaine adulte est estimée à $4.6 \pm 1.1 \times 10^4$ cellules/mm³ (Moller-Pedersen et Ehlers, 1995).

À la naissance, la cornée d'un enfant possède 70% moins d'ADN par mm³ de stroma comparativement à la cornée d'un fœtus de trente semaines. Cette différence marquée peut s'expliquer par l'augmentation du volume de la cornée lors du développement tandis que le nombre de kératocytes demeure constant. Par la suite, une diminution annuelle de 0,3% de kératocytes se poursuivra jusqu'à la fin de la vie de l'individu (Moller-Pedersen, 1997). Les raisons de cette diminution constante du nombre de kératocytes sont inconnues mais pourraient être de nature environnementale et/ou génétique (Moller-Pedersen, 1997). La perte de kératocytes au cours de la vie d'un individu pourrait expliquer plusieurs phénomènes reliés à l'âge comme les variations dans la composition et la structure du stroma (Malik et coll., 1992), l'amincissement observé au centre de la cornée (Olsen et Ehlers, 1984), et son augmentation de courbure (Hayashi K, Hayashi H, et Hayashi F, 1995).

Les fonctions des kératocytes sont demeurées longtemps mystérieuses. On a d'abord pensé qu'elles se limitaient au maintien de leur propre intégrité et à la synthèse des glycosaminoglycanes de la matrice extracellulaire (Maurice, 1984). En fait, les kératocytes remplissent plusieurs autres fonctions qui influencent la physiologie oculaire. L'importance de ces cellules fibroblastiques commence dès l'embryogenèse de la cornée où elles produisent les fibrilles de collagène et les glycosaminoglycanes formant la matrice extracellulaire (Ozanics et Jacobiec, 1995). Dans la cornée saine, les kératocytes réarrangent la matrice extracellulaire en synthétisant de façon continue les fibrilles de collagène dans le but de maintenir l'intégrité du stroma (Friend et Hassell, 1998). La synthèse, dans des proportions précises, des diverses composantes de la matrice extracellulaire, par les kératocytes, influence positivement la transparence et les propriétés réfractives de la cornée en maintenant une matrice structurée (Friend et Hassell, 1998). Les prolongements dendritiques des kératocytes aident à conserver

l'orientation spatiale et l'arrangement régulier et uniforme des lamelles de collagène, participant ainsi au maintien de la transparence de la cornée (Friend et Hassell, 1998).

5.2.2 Le collagène

Les organismes des animaux pluricellulaires contiennent tous du collagène. Cette protéine fibreuse représente 25% du poids total des mammifères. Il s'agit de la composante majeure de la peau, des os, des tendons, des cartilages, des vaisseaux sanguins, des dents et de la cornée (Stryer, 1988). Une molécule de collagène possède trois chaînes polypeptidiques (chaînes α) enroulées les unes autour des autres en une super hélice régulière. Chaque chaîne α possède environ 1000 acides aminés en majorité de la proline et de la glycine. La structure cyclique de la proline stabilise l'hélice mais y occupe beaucoup d'espace en son centre. Le plus petit acide aminé, la glycine, est le seul pouvant se placer en position interne. L'importance de conserver la séquence en acides aminés avec une glycine à tous les trois résidus permet un enroulement serré de la molécule de collagène (Stryer, 1988). Vingt-cinq hélices α ont été identifiées jusqu'à maintenant permettant plus de 10 000 combinaisons. Par contre, seulement 19 molécules différentes de collagène ont été répertoriées (Sandberg et coll., 2000).

La figure 5 présente un schéma résumant les diverses étapes nécessaires à l'obtention d'une molécule mature de collagène. La synthèse des molécules de collagène commence à l'intérieur de la cellule fibroblastique où les ribosomes synthétisent les pro-chaînes α . Les pro-chaînes α sont ensuite introduites dans la lumière du réticulum endoplasmique sous forme de précurseurs des chaînes α . Ces précurseurs possèdent des acides aminés supplémentaires à leurs deux extrémités nommés propeptides. Ces propeptides préviennent la formation intra-cellulaire prématurée des fibres de collagène et guident l'assemblage des pro-chaînes α en procollagène (précurseur du collagène), molécule tricaténaire reliée par des liaisons hydrogènes (Stryer, 1988).

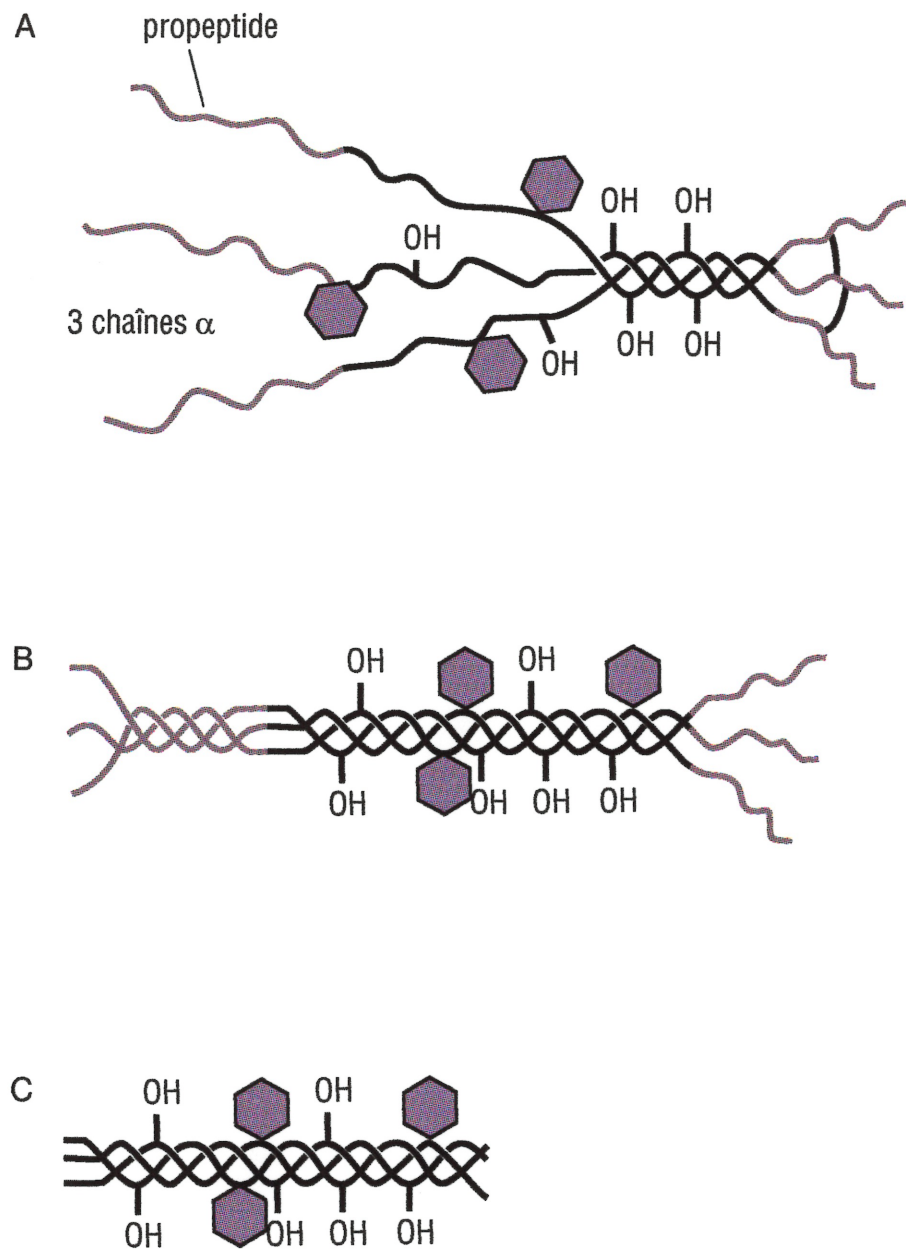


Figure 5: Formation d'une molécule de collagène. A) Trois pro-chaînes α de collagène se réunissent pour former une triple hélice stabilisée par des ponts hydrogène, le procollagène. Ce précurseur du collagène final contient une séquence d'acides aminés supplémentaires, les propeptides (représenté en gris pâle). B) Ce procollagène sera sécrété dans l'espace extracellulaire, où les propeptides seront clivés de la molécule finale de collagène (C).

Le procollagène est exporté hors de la cellule dans une vésicule de sécrétion vers une invagination de la membrane plasmique où il y a clivage des propeptides, étape permettant l'obtention d'une molécule de collagène mature (Alberts et coll, 1994). Toujours dans l'espace extracellulaire, il y a auto-assemblage des molécules de collagène en fibrilles de collagène ; l'agrégation de plusieurs fibrilles de collagène donnera naissance aux fibres de collagène.

Le rôle du collagène est structural. Le collagène est essentiel au maintien de la structure tissulaire, il intervient dans la réparation des blessures, il agit à titre d'échafaudage sur lequel est érigé la membrane de base, il forme le squelette extracellulaire et il est impliqué dans le dispositif d'ancrage des cellules aux régions acellulaires (Whikehart, 1994).

1.1.1.1 Le collagène du stroma cornéen

Le collagène représente environ 71% du poids sec du stroma (Klyce et Beuerman, 1998). Le collagène de type IV a été localisé dans la membrane basale de l'épithélium cornéen et au niveau de la membrane de Descemet mais pas au niveau du stroma humain (Nakayasu et coll., 1986). Par contre, il est présent dans le stroma cornéen (Pratt et Madri, 1985). Six autres types de collagène, I, III, V, VI, XII et XIII sont présents dans le stroma cornéen (Tableau VIII).

Tableau VIII: Les fonctions et les localisations des différents collagènes présents dans le stroma cornéen humain.

| Type | Localisations | Fonctions |
|------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| I | Fibrilles du stroma (Newsome, Gross, et Hassell, 1982; Marshall, Kontas et Lee, 1991a; Delaigue et coll., 1995) | Rôle structural (Whikehart, 1994) |
| III | Stroma et corps cellulaires des kératocytes qui le sécrètent (Newsome, et coll., 1982; Marshall, et coll., 1991a; Delaigue et coll., 1995) | Rôle dans l'adhésion de l'endothélium et de l'épithélium cornéen au stroma cornéen (Newsome et coll., 1982) |
| V | Surface des fibrilles de collagène du stroma et corps cellulaires des kératocytes (Nakayasu et coll., 1986 ; Newsome et coll., 1982 ; Marshall, Kontas, et Lee, 1991b) | Rôle dans le contrôle du diamètre des fibrilles et dans leur orientation parallèle (Nakayasu et coll., 1986 ; Marshall et coll., 1991b) |
| VI | Espace inter-fibrillaire du stroma et région péricellulaire des kératocytes (Delaigue et coll., 1995; Marshall et coll., 1991b; Murata et coll., 1989) | Rôle architectural (Zimmermann et coll., 1986) et dans l'invasion de la cornée par les kératocytes dans le stroma primaire (Carter, 1982) |
| XII | Stroma et région péricellulaire des kératocytes (Wessel et coll., 1997) | Rôle dans l'arrangement uniforme des fibrilles de collagène dans les lamelles et dans l'organisation des lamelles du stroma (Wessel et coll., 1997) |
| XIII | Stroma postérieur (Sandberg-Lall et coll., 2000) | Rôle structural mais fonction première inconnue (Sandberg-Lall et coll., 2000) |

Le collagène de type I est présent en quantité très élevée par rapport aux types III et V. Le pourcentage du poids sec représenté par les types I, III et IV s'élèvent respectivement à 85%, moins de 10% et 5% selon des techniques de chromatographie et d'électrophorèse (Newsome, et coll., 1982) L'immunohistochimie indirecte de la cornée humaine montre une même distribution pour ces trois types de collagène bien que le type V soit localisé à la surface des fibrilles (tableau VIII). Cependant, la microscopie électronique semble montrer une seule sorte de fibrille de collagène (Nakayasu et coll., 1986). Plusieurs hypothèses permettraient d'expliquer cette observation (1) le type III et/ou V est associé au collagène de type I, (2) le type III et/ou V est un collagène distinct dont l'ultrastructure donne une apparence semblable au collagène de type I et (3) le type III et/ou V est présent dans l'espace inter-fibrillaire, à proximité des fibrilles sans

pouvoir être distinctement observé en microscopie électronique (Nakayasu et coll., 1986).

Le collagène de type VI serait une composante majeure de la matrice extracellulaire du stroma cornéen (Zimmermann et coll., 1986). Deux indications suggèrent que ce collagène aurait une importance toute particulière tant au niveau structural que fonctionnel : sa distribution inter-fibrillaire, différente de celle des types I, III et V, et sa présence prématurée dans l'embryogenèse cornéenne (Marshall et coll., 1991b ; Murata et coll., 1989). Le collagène de type XII revêt deux formes dans la cornée humaine. Une forme allongée se retrouve dans la membrane basale de la cornée tandis qu'une forme courte est présente dans la matrice inter-fibrillaire du stroma, au niveau de la matrice périnucléaire des kératocytes et quelquefois, surtout lors de stress, dans la membrane basale de l'épithélium limbique (Wessel et coll., 1997). Ces variations dans la molécule de collagène de type XII apportent de la diversité à la cornée et au limbe cornéen. Le collagène de type XIII est présent dans plusieurs tissus oculaires comme, le nerf optique, les ganglions rétiniens, le stroma cornéen, le muscle ciliaire et les muscles striés extra-oculaires (Sandberg-Lall et coll., 2000). Localisé récemment dans le stroma cornéen, cette molécule serait impliquée dans les interactions cellules-matrice ou cellules-cellules, mais son rôle exact reste à préciser.

5.2.2.2 Les lamelles de collagène du stroma cornéen

Le stroma cornéen humain est formé d'un empilement de lamelles de fibrilles de collagène. Dépendant des lamelles, le diamètre des fibrilles de collagène varie entre 25 et 35 nm. Les fibrilles d'une lamelle sont parallèles entre elles et avec la surface de la cornée (Komai et Ushiki, 1991). Les lamelles sont fissurées en direction antéro-postérieure ou horizontale. Cette morphologie permet l'enchevêtrement des lamelles adjacentes (Radner et coll., 1998). Le stroma cornéen augmente en épaisseur en direction radiale, du centre vers la périphérie. Cette variation s'explique par le plus petit nombre de lamelles au centre de la cornée (environ 300) par rapport au limbe (environ 500) (Hamada et coll., 1972). Une variation de l'épaisseur des lamelles existe : les

lamelles du premier tiers du stroma sont plus minces (0,2-1,2 μm) que celles des deux tiers postérieurs (0,2-2,5 μm) (Komai et Ushiki, 1991).

L'orientation des fibrilles de lamelles adjacentes varie beaucoup dans le stroma. Le pourcentage de lamelles dont l'axe des fibrilles forme des angles inférieurs à 31° est plus faible (10-17%) : les lamelles dont les axes se croisent à angle variant entre $31-60^\circ$ sont les plus abondantes, (54-58%) suivies de celles qui se croisent à des angles compris entre $61-90^\circ$ (29-32%). Par contre, au niveau du limbe cornéen, les lamelles forment majoritairement (68%) des angles très faibles les unes par rapport aux autres. Cette orientation des lamelles du limbe, très différente de celle de la cornée, explique l'arrangement pseudo-circulaire des lamelles de la région limbique (Radner et coll., 1998).

Les lamelles sont maintenues les unes sur les autres par un mécanisme de cohésion qui doit stabiliser à la fois les fibrilles de collagène à l'intérieur d'une lamelle et les lamelles entre elles. De plus, un tel mécanisme doit permettre l'expansion du stroma lorsqu'il enfle. Le mécanisme doit donc à la fois autoriser les forces de cohésion à l'intérieur des lamelles et les forces d'étirement résultant du gonflement de la cornée (Maurice, 1999).

5.2.3 Les glycosaminoglycanes et les protéoglycanes

Les glycosaminoglycanes (GAGs) sont de longues chaînes non ramifiées de polysaccharides. Ces chaînes sont constituées de 70 à 200 unités disaccharidiques que leur composition permet de répartir en quatre groupes de GAGs (Alberts et coll., 1994). Chaque unité disaccharidique est formée de deux résidus glucidiques : un sucre et un sucre aminé, souvent sulfaté. Le sucre est habituellement un acide uronique (glucuronique ou iduronique) et le sucre aminé, un glucosamine ou un galactosamine. Le tableau IX nomme les GAGs en identifiant les disaccharides qui en forment l'unité répétitive selon le groupe auquel ils appartiennent tandis que la figure 6 en illustre la structure moléculaire.

Tableau IX: La description des quatre principaux groupes de glycosaminoglycanes (GAGs) (Olsen et McCarthy, 1994 ; Alberts et coll., 1994 ; Whitehart, 1994).

| Groupe | Nom | Sucre | Sucre aminé |
|---------------|-------------------------------------------|------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|
| 1 | Acide hyaluronique | Acide glucuronique | N-acétylglucosamine |
| 2 | Chondroïtine sulfate Dermatane sulfate | Acide glucuronique Acide iduronique | N-acétylgalactosamine sulfate N-acétylgalactosamine sulfate |
| 3 | Kératane sulfate | Galactose | N-acétylglucosamine sulfate |
| 4 | Héparane sulfate Héparine | Acide glucuronique Acide glucuronique | N-acétylgalactosamine sulfate N-acétylgalactosamine |

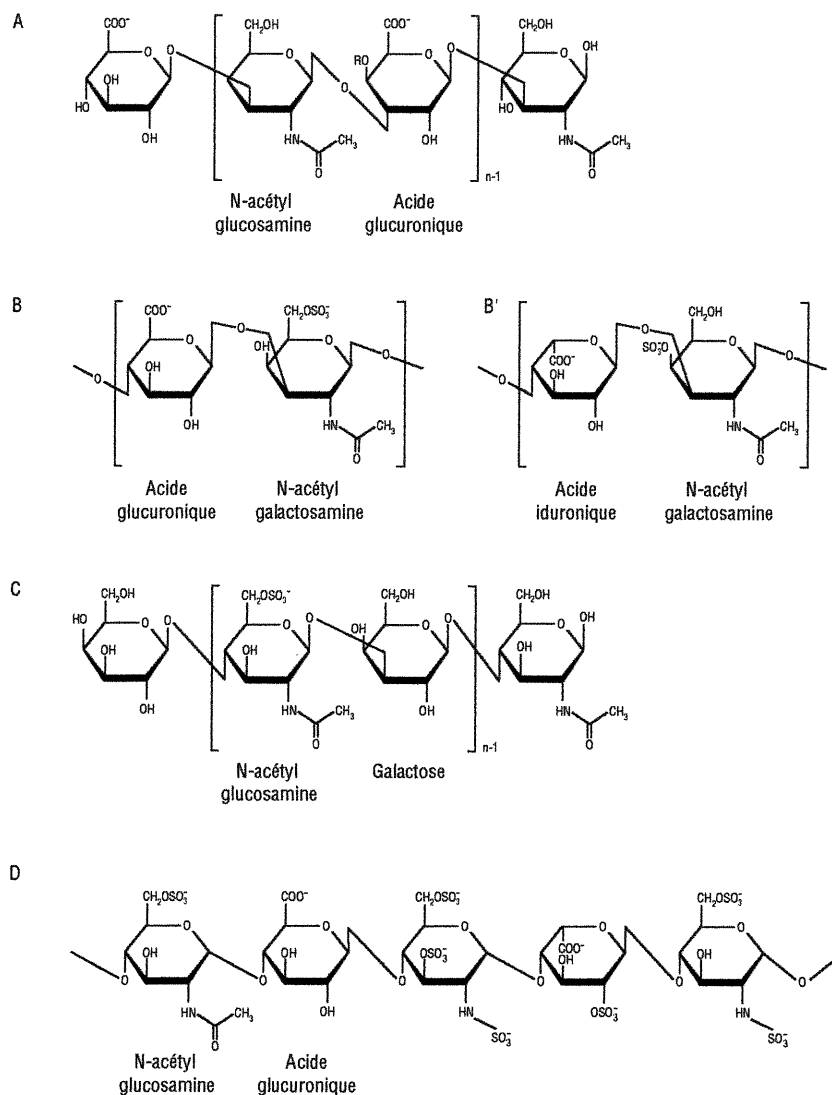


Figure 6: Les glycosaminoglycans (GAGs) forment les chaînes de polysaccharides qui constituent environ 95% des protéoglycans, le 5% restant étant des protéines. Ces GAGs sont constitués de séquences répétées de disaccharides (placés entre parenthèses en A, B, B' et C) que leur structure permet de classer en 4 groupes. À la différence des autres GAGs, l'hyaluronate (groupe 1, A) qui ne présente pas de chaînes sulfatées, peut exister comme polysaccharide à l'état libre. Il a un poids moléculaire beaucoup plus grand que celui des chaînes de GAGs sulfatés. L'unité répétitive de N-acétylgalactosamine et d'acide glucuronique prend le nom de chondroïtine sulfate (groupe 2, B) si seulement l'acide glucuronique est présent ; si l'acide iduronique est présent en quantité mesurable, le terme dermatane sulfate (groupe 2, B') est utilisé. Le kératane sulfate (groupe 3, C) est un polymère linéaire sulfaté de n résidus de N-acétyllactosamine (unité disaccharidiques de galactose et N-acétylglucosamine). L'héparine et l'héparane sulfate (groupe 4, D) sont formés de disaccharides d'acide glucuronique ou iduronique et de N-acétylglucosamine. Durant ou après la synthèse des chaînes, quelques groupes acétyl (CH_3CO) sont remplacés par des groupes sulfates. Moins de 50% des groupes N-acétyl ont été remplacés par des groupes sulfates dans l'héparane sulfate, alors que plus de 70% de ces groupes ont été substitués dans l'héparine. Dans un protéoglycane, des GAGs sont réunis à un noyau protéique.

Les chaînes de polysaccharides sont trop rigides pour se replier et former une structure globulaire semblable aux chaînes de polypeptides. Très hydrophiles, les GAGs ont tendance à s'étirer et à occuper un volume beaucoup plus grand que celui prédit par leur masse (Alberts et coll., 1994). La présence de groupements sulfatés ou carboxyles sur les résidus glucidiques donnent une forte charge négative aux GAGs attirant un nuage de cations, surtout des ions Na^+ , responsables de la grande capacité d'absorption d'eau par la matrice (Alberts et coll., 1994).

Les GAGs, sauf l'acide hyaluronique, sont liés de façon covalente à une protéine pour former des protéoglycanes. Les protéoglycanes sont donc des glycoprotéines ayant au moins un glycosaminoglycane sur une des chaînes glucidiques latérales (Alberts et coll., 1994). Le motif disaccharidique des GAGs est souvent modifié dans le protéoglycane, rendant difficile l'identification et la classification des protéoglycanes en fonction de leurs sucres.

La grande hétérogénéité structurale des protéoglycanes laisse croire qu'ils remplissent plusieurs fonctions autres que l'absorption d'eau : (1) ils ont la capacité de former des gels dont la porosité permettra une certaine sélectivité, (2) ils peuvent se lier à différentes molécules comme les facteurs de croissance et ainsi agir au niveau de la signalisation chimique, (3) ils agissent sur le contrôle et la régulation de l'activité de certaines protéines sécrétées et (4) ils s'associent aux protéines fibreuses de la matrice comme le collagène et la lame basale pour former des structures très complexes (Alberts et coll., 1994).

5.2.3.1 Les GAGs et les protéoglycanes du stroma

Les glycosaminoglycanes entrent dans la composition de plusieurs tissus oculaires. Ils sont présents dans l'humeur vitrée où ils aident à supporter la configuration concave de la rétine et empêchent le détachement des neurones rétinien des photorécepteurs (Whikehart, 1994). Dans le stroma cornéen, ils ont pour fonction principale de séparer les fibres de collagène des lamelles. En effet, les GAGs sont liés de manière non-

covalente aux fibrilles de collagène du stroma créant, grâce à leurs charges, un champ négatif autour de chaque fibrille permettant de maintenir l'espacement optimal entre les différentes fibrilles (Borcherding et coll., 1975). Ce rôle physique permet le maintien de la transparence de la cornée qui repose en partie sur la disposition régulière des fibres de collagène des lamelles du stroma (Maurice, 1984).

Le type et la distribution des GAGs varient en fonction de leur localisation dans la cornée (Stanifer, Snyder, et Kretzer, 1983). Dans la cornée non inflammée, les protéoglycanes du stroma cornéen contiennent tous les types de GAGs sauf l'acide hyaluronique. Il est donc possible de retrouver des protéoglycanes contenant ces types de GAGs sur leurs chaînes latérales à l'exclusion de l'acide hyaluronique (Borcherding et coll., 1975). La détection de l'un ou l'autre des différents GAGs, permet souvent de déterminer le type de protéoglycanes présent dans le stroma cornéen (Bairaktaris et coll., 1998). Le kératane sulfate qui entre dans la composition de trois protéoglycanes, le lumican, le kératocan et l'ostéoglycine, aurait un rôle dans l'organisation des fibrilles de collagène (Bairaktaris et coll., 1998). La décorine, protéoglycane contenant de la chondroïtine sulfate, serait impliquée dans l'organisation des fibrilles de collagène du stroma cornéen humain (Bairaktaris et coll., 1998).

Le stroma cornéen central comprend deux types de GAGs : le kératane sulfate, en grande quantité, et la chondroïtine, en faible quantité. Au niveau de la cornée périphérique, le kératane sulfate est toujours présent tandis que la chondroïtine a disparu pour laisser place à la chondroïtine sulfate. Le kératane sulfate possède plus de groupes sulfates par disaccharide que la chondroïtine sulfate et le ratio kératane sulfate:chondroïtine est de 3 :1 dans la cornée centrale (Borcherding et coll., 1975). Le réservoir métabolique de la cornée centrale ne serait pas assez riche en sulfate pour sulfater complètement le kératane et la chondroïtine expliquant la présence de chondroïtine non sulfatée au niveau de la cornée centrale. La diminution de kératane sulfate de la cornée centrale vers le limbe réduit la compétition pour le sulfate, laissant plus de place à la chondroïtine sulfate dans cette section de la cornée (Borcherding et coll., 1975).

Le stroma de la région du limbe possède également du kératane sulfate mais en quantité très limitée, de la chondroïtine sulfate et du dermatane sulfate. Finalement, la chondroïtine sulfate est présente en grande quantité dans la sclérotique tandis que le dermatane sulfate et l'acide hyaluronique y sont présents mais en plus faibles proportions. En résumé, la diminution du kératane sulfate du centre de la cornée vers le limbe entraîne une augmentation de la concentration du dermatane sulfate et de la chondroïtine sulfate tandis que l'acide hyaluronique est présent presque exclusivement au niveau de la sclérotique ; il est présent en quantité infime au limbe cornéen mais absent du reste de la cornée (Borcherding et coll., 1975). Ces différences dans la distribution des protéoglycanes influencent l'organisation des fibrilles de collagène du stroma et de la sclérotique.

La transparence de la cornée et l'opacité de la sclère impliquent une disposition et une taille différente des fibrilles de collagène. Il existe une relation entre la concentration et la composition des protéoglycanes et l'organisation des fibrilles de collagène (Borcherding et coll., 1975). Dans la cornée, les fibrilles sont présentes en très grand nombre et possèdent un petit diamètre tandis qu'au niveau de la sclérotique les fibrilles sont moins nombreuses et leurs diamètres, plus variables, sont souvent plus grands. La concentration en GAGs est très forte au niveau de la cornée centrale. La présence de kératane sulfate et de chondroïtine apporte une certaine uniformité dans la composition des GAGs de la cornée centrale permettant une constance dans le diamètre des fibres et dans la disposition des lamelles du stroma. Dans la région du limbe, la présence des autres GAGs, chondroïtine sulfate, dermatane sulfate et acide hyaluronique, engendre une perte d'uniformité. De plus, la concentration totale de GAGs est plus faible en périphérie et au niveau de la sclérotique étant donné la forte diminution en kératane sulfate, d'où variabilité du diamètre des fibrilles de collagène et perte de transparence.

5.3 La physiologie du stroma

5.3.1 L'hydratation du stroma

Les fonctions du stroma cornéen sont multiples : jouer un rôle mécanique au niveau de l'armature du globe oculaire, résister à la pression intra-oculaire, servir de réservoir aux facteurs de croissance favorisant la guérison après une blessure, protéger l'œil des agents extérieurs, et assurer un rôle dans la dioptrique oculaire. En effet, le stroma confère la rigidité à la cornée qui est la principale composante optique de l'œil. Cette fonction optique repose sur la transparence du stroma (Saraux et Biais, 1983). Le maintien de cette transparence nécessite la constance de l'hydratation stromale à une teneur en eau relative de 78% (3,5 mg d'eau/mg de poids sec). La régulation du contenu en eau du stroma dépend des cinq facteurs suivants : (1) pression d'imbibition, (2) fonctions métaboliques et de barrière de l'épithélium cornéen, (3) fonctions métaboliques et de barrière de l'endothélium cornéen, (4) évaporation à la surface de la cornée et (5) pression intra-oculaire (Delbosc, Piquot, et Erbezci, 1993).

Une meilleure compréhension du gonflement du stroma cornéen a consisté à établir un modèle *in vitro* de cornée dénudée de ses couches épithéliales. Dans ce modèle, la pression d'imbibition est de même grandeur, mais a un sens opposé à la pression de gonflement. L'application de cette relation à un tissu *in vivo* nécessite l'inclusion de la pression intra-oculaire qui tend à limiter l'expansion du stroma cornéen. Dans une cornée normale transparente *in vivo*, la pression d'imbibition a une valeur négative d'environ -40 mm de Hg, reflétant la tendance du stroma à attirer l'eau. Cette valeur négative qui résulte du transport actif d'eau par l'endothélium hors du stroma contribue à assurer la cohésion de la cornée en aspirant contre le stroma l'épithélium et l'endothélium cornéens. La pression d'imbibition est calculée à l'aide de l'équation suivante (Hedbys, Mishima, et Maurice, 1963):

Pression d'imbibition = pression intra-oculaire - pression de gonflement

La pression de gonflement ne peut être démontrée que dans la cornée excisée : c'est la pression qu'il faut exercer sur une pièce de stroma privée de ses couches épithéliales antérieure et postérieure afin d'en éviter le gonflement. Elle s'élève *in vivo* à 55 mm Hg dans la cornée humaine à hydratation normale (Hedbys, Mishima, et Maurice, 1963 ; Cogan et Kinsey, 1942).

La cornée a tendance à absorber beaucoup d'eau à cause de l'hydrophilie des GAGs et à la présence de charges négatives, responsables de l'abondance des ions sodium et potassium (et de rétention d'eau) dans le stroma (Klyce et Beuerman, 1998). La tendance du stroma à gonfler se manifeste par la pression de gonflement (Hedbys, et coll., 1963 ; Cogan et Kinsey, 1942). Les forces de répulsion électrostatique entre les charges négatives des GAGs, l'excès de cations nécessaires pour préserver l'électroneutralité ionique, les limites mécaniques de la cornée, les modifications du pH et la tension ionique totale sont tous des facteurs qui peuvent influencer la pression de gonflement (Delbosc et coll., 1993).

Les couches limitantes cellulaires sont importantes pour prévenir l'absorption importante d'eau par le stroma. L'épithélium cornéen possède un système de transport des ions sodium et chlore qui contribue à maintenir la faible activité du sodium observée dans le stroma par Stiemke et coll. (1992). Le déficit osmotique ainsi créé permet d'équilibrer la tendance au gonflement du stroma (Delbosc et coll., 1993). L'endothélium cornéen effectue un transport net d'ions (et donc un déplacement d'eau) du stroma vers l'humeur aqueuse (Maurice, 1984). Il s'agit d'un phénomène de déshydratation métabolique qui au moyen d'une dépense d'énergie permet de maintenir la pression d'imbibition à un niveau négatif. Une diminution de la fonction de la pompe endothéliale provoquera un gonflement du stroma et une réduction consécutive de la pression d'imbibition. L'évaporation d'eau à la surface de la cornée produit à l'éveil une hypertonicité du film lacrymal jouant un rôle accessoire dans la déturgescence cornéenne permettant ainsi le passage de l'eau du stroma vers l'extérieur.

5.3.2 La transparence de la cornée

L'explication la plus répandue de la transparence de la cornée est l'hypothèse du réseau de Maurice (1957). La disposition régulière et ordonnée des fibrilles de collagène ne leur permet pas de diffuser l'énergie lumineuse indépendamment les unes des autres. Le diamètre des fibrilles, inférieur aux longueurs d'onde de la lumière, produira de l'interférence destructive dans toutes les directions sauf dans celle du faisceau incident. Deux conditions sont nécessaires à cette interférence : (1) l'écartement entre les fibrilles doit être constant dans tous les plans du stroma et parallèle à la direction des fibrilles et (2) le diamètre de toutes les fibrilles doit être similaire. Hart et Farrell (1969) ont montré que la transparence était assurée même si ces conditions n'étaient pas rigoureusement respectées. Quant à la sclère, elle est formée de fibrilles de collagène disposées parallèlement, mais dont la grande variation en diamètre des fibrilles (entre 28 et 280 μm) exclue toute transparence.

Lors d'œdème, le stroma cornéen s'hydrate, entraînant une diminution de la pression de gonflement. La réduction de cette pression dans le stroma reflète alors une diminution des forces de répulsion (dues aux GAGs) responsables de l'alignement des fibrilles de chaque lamelle. Les forces se trouvent réduites, car l'absorption d'eau a causé une expansion du tissu, et par conséquent une séparation des charges.

Chapitre 6 L'endothélium cornéen

6.1 La morphologie et l'ultrastructure de l'endothélium cornéen

La couche postérieure de la cornée est l'endothélium cornéen. Le pôle apical ou face postérieure de l'endothélium est en contact avec l'humeur aqueuse tandis que le pôle basal ou face antérieure s'appuie sur la membrane de Descemet. Les cellules de cette unique couche mesurent entre 18 et 20 μm de large et 4 à 5 μm d'épaisseur (Hogan, Alvarado, et Weddell, 1971). L'endothélium cornéen a l'aspect d'une mosaïque autant par sa face postérieure que par sa face antérieure (Sherrard et Ng, 1990). Cette morphologie caractéristique est attribuable à la forme hexagonale qu'ont 60 à 80% des cellules endothéliales du jeune adulte (Pepose et Ubels, 1992). Des interdigitations de la membrane plasmique latérale réunissent les cellules adjacentes. Enfin, des microvillosités, environ 20 à 30 par cellule, sont présentes au niveau de la face postérieure (Hogan et coll., 1971).

Plusieurs vésicules de pinocytose sont visibles au niveau des faces postérieure, antérieure et latérale des cellules. Ces vésicules, formées par l'invagination de la membrane plasmique, contiennent des substances utiles aux cellules endothéliales elles-mêmes ainsi qu'au stroma qui est situé à proximité (Hogan et coll., 1971). Les vésicules, une fois dans la cellule, traversent le cytoplasme et libèrent leur contenu dans l'espace entre les cellules ou au niveau de la membrane de Descemet. Des molécules de 58 Å peuvent ainsi traverser l'endothélium. Cependant, l'eau traverserait de la chambre antérieure vers le stroma via des aquaporines, des canaux formés de protéines membranaires ayant pour fonction de laisser passer les molécules d'eau (Li et coll., 1999).

Le noyau ovale mesure 7 μm de diamètre et se positionne au centre de la cellule (Hogan et coll., 1971). Le cytoplasme est riche en organites : réticulum endoplasmique lisse et rugueux, ribosomes et appareil de Golgi prédominant. L'abondance en mitochondries suggère que ces cellules sont très actives du point de vue métabolique. Les cellules endothéliales cornéennes sont jointes entre elles par deux types de jonctions soit les jonctions serrées et de type gap chez plusieurs espèces telles le lapin, le chat et l'humain

(Hirsch et coll., 1977). Les jonctions serrées de l'endothélium cornéen, contrairement aux autres types d'épithélias de barrière, sont formées de *maculae occludentes* au lieu de *zonulae occludentes*. Ce type de jonctions se retrouve à l'apex des cellules et ne serait aussi imperméable que celles des cellules épithéliales cornéennes (Maurice, 1984). Le complexe de jonctions serrées de l'endothélium cornéen forme une ceinture apicale péricellulaire discontinue (Petroll et coll., 1999). La discontinuité des jonctions serrées se situe principalement au niveau de la jonction en Y formée par trois cellules hexagonales adjacentes (Barry et coll., 1995). Cette structure unique pour les jonctions serrées de l'endothélium cornéen expliquerait le caractère fuyant de la barrière endothéliale (Petroll et coll., 1999).

Plusieurs jonctions de type gap sont présentes au niveau de la membrane basolatérale des cellules endothéliales cornéennes (Hirsch et coll., 1977 ; Watsky et coll., 1990). Ces jonctions forment des canaux d'environ 1,6 nm de diamètre qui joignent directement le cytoplasme de deux cellules adjacentes (Rae et coll., 1989). La communication intercellulaire au niveau de l'endothélium cornéen interviendrait dans le transport des ions, de l'eau et dans les processus de guérison (Rae et coll., 1989).

6.2 La densité cellulaire de l'endothélium

À la naissance, l'humain possède environ 400 000 cellules endothéliales cornéennes (Svedbergh et Bill, 1972 ; cité par Joyce, 1994). Selon la conception classique, tout comme les cellules du système nerveux central, les cellules endothéliales cornéennes sont en général amitotiques. Ces cellules vont diminuer en nombre tout au long de la vie de l'individu sans possibilité de régénération. Contrairement aux cellules du système nerveux, les cellules endothéliales ont une grande capacité d'expansion. Cette expansion permet aux cellules endothéliales de toujours bien couvrir la face postérieure de la cornée conservant les propriétés physiologiques de la cornée (Klyce et Beuerman, 1998). Par contre, une étude récente laisserait croire à la présence de cellules souches, au niveau du limbe, qui aurait la capacité de produire des cellules endothéliales cornéennes (Bednarz et Engelmann, 2001). La présence de telles cellules dont

l'existence devra être confirmée, pourrait aider dans le processus de guérison de plusieurs maladies de l'endothélium cornéen.

La densité cellulaire de l'endothélium cornéen d'un jeune enfant se situe entre 3 500 et 4 000 cellules/mm² tandis que l'endothélium de la cornée adulte possède une densité plus faible variant entre 1 400 et 2 500 cellules/mm² (Klyce et Beuerman, 1998). Sous une densité minimale de 400 à 700 cellules/mm² la cornée ne peut conserver sa transparence et maintenir une hydratation constante (Bourne et Kaufman, 1976 ; cité par Pepose et Ubels, 1992). La perte de cellules endothéliales est plus prononcée chez les enfants de moins de 14 ans que chez l'adulte. Le taux annuel de perte est de 1,5-4,0% chez l'enfant et de 0,3-0,7% chez l'adulte (Moller-Pedersen, 1997). Il y a une diminution linéaire de la densité cellulaire de l'endothélium cornéen en fonction de l'âge si bien que la densité d'un onctogénaire est la moitié de la densité cellulaire moyenne à la naissance. La diminution de la densité cellulaire débute dans la période fœtale et se poursuit jusqu'à l'âge de deux ans. Cette diminution rapide est alors corrélée avec une augmentation des dimensions de la cornée (Murphy et coll., 1984). La diminution qui se poursuit chez l'adolescent et l'adulte serait causée par une limitation dans le pouvoir mitotique des cellules et par une perte nette de cellules puisque la cornée conserve des dimensions stables après l'âge de deux ans.

Cette diminution de densité résulte de l'action de plusieurs mécanismes biologiques. Les hormones et/ou les conditions environnementales comme les rayons ultra-violets pourraient être impliqués dans la perte progressive et constante des cellules endothéliales cornéennes (Moller-Pedersen, 1997).

Les télomères sont des séquences non-codantes de nucléotides ajoutées à la fin des chromosomes pour empêcher la perte d'informations génétiques importantes. *In vitro*, les télomères, des cellules endothéliales cornéennes en culture se raccourcissent au fur et à mesure que les cellules vieillissent (Whikehart et coll., 2000). Les cellules endothéliales en culture qui sont sénescence possèdent des télomères plus court que les cellules en culture qui sont actives. D'autre part, une autre étude tend à démontrer que

la longueur des télomères était stable tout au long de la vie des cellules endothéliales cornéennes humaines provenant de l'endothélium de cornées de 13 donateurs (Egan, et coll, 1998). De plus, aucune activité de la télomérase, enzyme responsable d'ajouter des nucléotides à la fin des télomères, n'a été détectée au niveau de ces mêmes cellules laissant croire que la prolifération cellulaire n'est pas affectée par la longueur des télomères (Egan et coll., 1998).

Le polymégathisme et le pléiomorphisme sont deux phénomènes associés à la perte des cellules endothéliales cornéennes. L'âge et certaines maladies endommagent la mosaïque de l'endothélium cornéen et peuvent entraîner la perte de cellules (Fatt et Weissman, 1992). Lorsqu'une cellule se détache de l'endothélium, les cellules voisines s'organisent pour combler le vide en s'élargissant ou en se contractant. Ces changements morphologiques augmentent le coefficient de variation cellulaire (l'écart-type de l'aire cellulaire / l'aire cellulaire moyenne), phénomène nommé polymégathisme. Ces changements au niveau de la taille des cellules influencent directement la forme et le nombre de côtés des cellules. Le pléiomorphisme implique une réduction du pourcentage de cellules hexagonales observées (Fatt et Weissman, 1992). La cornée la plus stable en terme de coefficient de variation possédera le plus grand nombre de cellules hexagonales, l'hexagone étant la forme géométrique qu'il est possible de placer le plus de fois dans un volume donné. Rao, Lohman et Aquavella (1982) émettent l'hypothèse que si le nombre de cellules possédant plus de six côtés augmentent, les cellules auront tendance à s'arrondir de plus en plus. Ces changements morphologiques diminueraient possiblement la qualité et le nombre d'interdigitations entre les cellules adjacentes, augmentant l'entrée de fluides dans le stroma puisque la barrière endothéliale deviendrait encore plus fuyante (Shaw et coll., 1978 ; cité par Rao et coll., 1982).

6.3 Les fonctions de l'endothélium cornéen

L'endothélium cornéen remplit plusieurs fonctions : (1) nutrition, (2) maintien de la transparence, (3) barrière et (4) pompe. La cornée étant avasculaire, elle reçoit l'oxygène et les nutriments nécessaires à son bon fonctionnement par d'autres sources

que le sang. L'air ambiant constitue la source principale d'oxygène qui se dissout dans le film lacrymal avant d'être utilisée par les cellules de la cornée. Pour les nutriments, c'est l'humeur aqueuse sécrétée par l'épithélium du corps ciliaire qui en est le principal réservoir. Le glucose, les acides aminés et les vitamines empruntent la voie paracellulaire pour se rendre aux cellules de la cornée. Ce type de transport des molécules est possible grâce à l'endothélium cornéen qui a la caractéristique d'être fuyant (Joyce, 1994). L'endothélium participe donc à l'approvisionnement des différentes couches de la cornée en nutriments

La cornée étant la principale composante optique de l'œil, il est important que sa transparence ne soit jamais perturbée. L'organisation spatiale des fibrilles de collagène du stroma et l'uniformité du tissu assurent en partie cette transparence (Joyce, 1994). Par contre, cette transparence repose également sur le faible niveau d'hydratation du stroma. Les protéoglycanes présents dans le stroma cornéen ont la capacité d'emprisonner l'eau entraînant le gonflement de la cornée et la perte graduelle de la transparence. La barrière endothéliale étant fuyante pour les petites molécules, l'eau suivra le gradient osmotique et pénétrera la cornée. Cette barrière retarde le mouvement des fluides mais c'est l'action de la pompe qui permettra de deshydrater la cornée en pompant les ions hors des cellules. Les notions de barrière et de pompe endothéliale sont détaillées dans la section suivante.

6.4 L'hypothèse de pompe et de fuite

La constance de l'épaisseur cornéenne en conditions normales requiert qu'il n'y ait pas de déplacement net d'eau (pompe = fuite). Cette hypothèse décrite par Maurice implique que l'endothélium cornéen agit à la fois comme une fuite et une pompe (Maurice, 1984). L'endothélium cornéen contrôlerait l'épaisseur de la cornée en maintenant une barrière face aux mouvements des fluides et en pompant les ions activement hors du stroma.

Les acides aminés, les vitamines et le glucose de l'humeur aqueuse peuvent passer par la voie paracellulaire de l'endothélium puisque les jonctions serrées ne forment pas une

barrière imperméable. Ainsi, l'humeur aqueuse peut pénétrer passivement dans le stroma. La pompe endothéliale s'opposerait à cette action et interviendrait en pompant les ions hors de la cornée pour générer un gradient osmotique responsable de l'évacuation active de l'eau hors de la cornée tel que proposé par Diamond et Bossert (1967) pour les épithélia sécrétoires. L'équilibre entre l'entrée et la sortie d'eau permettra à la cornée de maintenir une épaisseur constante nécessaire à la transparence de la cornée tout en permettant un apport de certains nutriments par la voie paracellulaire (Maurice, 1984).

6.4.1 La barrière endothéliale

La barrière endothéliale retarde l'entrée d'eau dans le stroma. Deux structures sont responsables du bon fonctionnement de la barrière endothéliale et permettent de ralentir le transport par convection : (1) les complexes de jonctions serrées (Iwamoto et Smelser, 1965 ; Leuenberger, 1973; Kreutziger, 1976 ; cités par Joyce, 1994) et (2) les jonctions de type gap (Watsky et coll., 1990). Les jonctions serrées, *maculae occludentes*, au niveau de l'endothélium cornéen forment des zones discontinues. Cette morphologie permet le passage de petites molécules entre les cellules endothéliales mais retarde l'entrée d'eau dans le stroma. Les jonctions de type gap agissent comme une deuxième barrière puisqu'elles rapprochent considérablement les cellules voisines les unes des autres (Leuenberger, 1973; Hirsch et coll., 1976 ; Kreutziger, 1976 ; cités par Joyce, 1994). Cette diminution du volume de l'espace inter-cellulaire contribue avec les complexes de jonctions étanches à augmenter la résistance de l'endothélium aux mouvements passifs des fluides.

Les complexes de jonctions étanches auraient un rôle plus important que les jonctions de type gap en ce qui concerne le maintien de la résistance face à l'entrée de fluides dans le stroma (Watsky et coll., 1990). Le dysfonctionnement des jonctions de type gap n'a pas d'impact majeur sur le gonflement de la cornée mais augmente légèrement la perméabilité endothéliale (Watsky et coll., 1990). Les complexes de jonctions étanches peuvent donc contenir le mouvement des fluides malgré une fuite plus élevée d'ions vers

le stroma. Le tableau X dresse la liste des facteurs qui influencent le bon fonctionnement de la barrière endothéliale.

Tableau X: Des facteurs influençant le bon fonctionnement de la barrière endothéliale cornéenne (Joyce, 1994).

| Facteurs diminuant l'efficacité de la barrière endothéliale |
|--------------------------------------------------------------------|
| ◆ Les lésions mécaniques ou chimiques |
| ◆ Les maladies (glaucome, diabète) |
| ◆ Une solution sans calcium |
| ◆ L'oxydation du glutathion |
| ◆ Un pH inférieur à 6.8 et supérieur à 8.2 |

6.4.2 La pompe endothéliale

L'hydratation de la cornée ne peut être seulement contrôlée par la barrière endothéliale. La pompe endothéliale permet le raffinement du mécanisme de contrôle de l'épaisseur de la cornée. L'endothélium possède deux types de pompes, Na^+/K^+ ATPase et bicarbonate-dépendante : Mg^{2+} ATPase, responsables de créer un flux net d'ions, du milieu intracellulaire vers le milieu extracellulaire ce qui a pour effet de déplacer l'eau du stroma vers l'humeur aqueuse (Hodson et Miller, 1977; Mayes, 1979 ; Maurice, 1972 ; cités par Joyce, 1994).

La pompe Na^+/K^+ ATPase, localisée sur les faces latérales des cellules endothéliales cornéennes, engendre un gradient ionique qui aide à contrôler l'épaisseur de la cornée. Elle est impliquée dans la déturgescence de la cornée puisque la perfusion d'une cornée avec une solution d'ouabaïne (un inhibiteur de Na^+/K^+ ATPase) entraîne son gonflement (Geroski et Edelhauser, 1984 ; Trenberth et Mishima, 1968 ; cités par Joyce, 1994). Il y aurait 3.0×10^6 pompe Na^+/K^+ ATPase par cellules endothéliales cornéennes (Geroski, Kies, et Edelhauser, 1984 ; cité par Watsky et coll., 1990). Ce nombre démontre l'importance de ces pompes dans le transport actif des ions.

La pompe bicarbonate-dépendante : Mg^{2+} ATPase est également impliquée au niveau du pompage des ions hors du stroma. Par contre, sa localisation exacte sur les cellules endothéliales n'a pas encore été clairement identifiée. Malgré cette incertitude, la participation du bicarbonate dans la déturgescence de la cornée est acquise (Hodson et Miller, 1976; Hull et coll., 1977 ; Barfort et Maurice, 1974; cités par Joyce, 1994). Le tableau XI énumère les facteurs qui ont pour effets de diminuer les capacités de la pompe endothéliale.

Tableau XI: Des facteurs influençant le bon fonctionnement de la pompe endothéliale cornéenne (Joyce, 1994).

Facteurs diminuant l'efficacité de la pompe endothéliale

In vitro :

- ◆ Une réduction de la température
- ◆ La présence d'ouabaine
- ◆ La diminution de la concentration des ions bicarbonate
- ◆ La présence d'inhibiteurs de l'anhydrase carbonique

In vivo :

- ◆ La diminution de la capacité de pompage (diminution du nombre de cellules responsables du pompage)
-

6.5 Le transport ionique dans l'endothélium cornéen

Plusieurs types de transporteurs d'ions sont présents au niveau de l'endothélium cornéen : (1) la pompe Na^+/K^+ ATPase, (2) l'échangeur Na^+/H^+ , (3) le co-transporteur $Na^+ : HCO_3^-$, et (4) l'échangeur Cl^-/HCO_3^- . Ces différents systèmes travaillent pour un même et unique but, le contrôle de l'hydratation de la cornée. Le premier mécanisme, le plus caractérisé des transporteurs d'ions, implique la pompe Na^+/K^+ ATPase (Fischbarg, 1973; Geroski, Matsuda, et Edelhauser, 1985; cités par Pepose et Ubels, 1992). Le bon fonctionnement de cette enzyme, probablement située sur la membrane basolatérale des cellules, est vital pour l'hydratation de la cornée. La pompe Na^+/K^+ ATPase entraîne la

formation d'un gradient de Na^+ . Ce gradient créerait une alcalinisation cellulaire via l'échangeur Na^+/H^+ dont la contribution au mécanisme actif de déplacement d'eau serait moins grande que celle des mécanismes qui dépendent des bicarbonates (Bonanno et Giasson, 1992). La pompe favorise également une entrée d'ions HCO_3^- dans les cellules endothéliales cornéennes. Étant donné l'absorption de HCO_3^- , les cellules ont développé un gradient pour sortir ces ions dans le milieu extracellulaire, probablement dans l'humeur aqueuse (Bonanno et Giasson, 1992). Ce gradient est couplé cette fois à un échangeur $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$.

L'entrée de chlore dans les cellules serait nécessaire au transport des fluides dans l'endothélium cornéen de lapin (Winkler et coll., 1992). Plusieurs autres modèles décrivant le transport ionique dans les cellules endothéliales cornéennes ont été proposés et l'emplacement, sur la membrane plasmique des cellules, des différents mécanismes varient d'un modèle à l'autre (Bonanno et Giasson, 1992 ; Jentsch, Keller, et Wiederholt, 1985 ; Fischbarg et Lim, 1974).

Chapitre 7 Le génie tissulaire et les interactions cellulaires dans la cornée

7.1 Introduction

La majorité des organismes vivants sont pluricellulaires. Au début de l'embryogenèse, une seule cellule souche est responsable de la formation complète de l'être vivant. Au cours de ses divisions, cette cellule se spécialise permettant aux cellules-filles d'accomplir des fonctions complémentaires de plus en plus spécialisées. Ces cellules établissent entre les différents types cellulaires des interactions complexes.

L'activité des systèmes et des gènes de tout être vivant doivent être coordonnées afin de maintenir l'organisme vivant. Les interactions ne sont pas seulement physiques, mais également chimiques : les cellules communiquant entre elles à l'aide de cytokines. Le nombre d'interactions existant dans un organisme est incalculable, puisqu'il y a sans cesse de nouvelles découvertes dans ce domaine. Les chercheurs ne cessent de mettre au point des modèles d'étude de co-culture qui permettent l'étude d'un, deux ou trois types cellulaires en interaction. Il s'agit de modèles simplifiés comparativement à l'organe puisqu'il fait partie d'un tout et que des interactions à plusieurs niveaux en même temps peuvent influencer ce même organe.

Ces modèles ont déjà permis d'étudier des interactions au niveau de plusieurs tissus et organes. La peau (Auger et coll., 1998) et les vaisseaux sanguins (Germain, Remy-Zolghadri, et Auger, 2000a) ne sont que deux exemples où l'importance de l'interaction entre les divers types cellulaires ont permis la reconstruction des tissus *in vitro*. Les données recueillies aident à comprendre les processus de guérison, à déterminer les facteurs étiologiques des maladies ou tout simplement à comprendre le fonctionnement de l'organe ou du tissu.

7.2 Le génie tissulaire

L'origine du génie tissulaire remonte autour de la deuxième Guerre Mondiale. Les chirurgiens de cette époque ont commencé à utiliser divers matériaux comme le nylon et

le polypropylène pour réparer les blessures de guerre (Bell, 2000). Cette *chirurgie de reconstruction* permettait d'aider aussi des personnes atteintes de certaines déficiences génétiques. C'est avec le désir de sauver la vie de ses semblables que l'homme a commencé à chercher des moyens pour guérir ou augmenter l'autonomie des personnes atteintes (Vacanti et Vacanti, 2000).

La greffe d'organes a donné beaucoup d'espoirs aux personnes en attente d'un traitement. Les longues listes d'attente, les rejets, la prise d'immunosuppresseurs et les problèmes d'immuno-histocompatibilité associés à cette nouvelle technologie ont poussé les chercheurs à développer des implants artificiels avec les techniques du génie tissulaire (Vacanti et Vacanti, 2000). Cette nouvelle discipline a nécessité une étude approfondie de l'embryogenèse des différents tissus, et un approfondissement des connaissances sur l'origine et le développement des tissus humains. Le génie tissulaire nécessite des connaissances dans plusieurs autres domaines de la biologie notamment en biologie cellulaire et moléculaire, en micro-anatomie et en immunologie (Bell, 2000). Les spécialistes de ces domaines doivent travailler de concert pour essayer de répondre aux multiples questions que soulèvent cette nouvelle discipline.

Un tissu vivant se compose principalement de trois éléments : les cellules, la matrice extracellulaire et le système de signalisation. Le système de signalisation permet d'activer les gènes impliqués dans le développement et la différenciation du tissu. Il influencera la synthèse de la matrice par les cellules (Bell, 2000). Différentes approches peuvent être utilisées pour la reconstruction de tissu *in vitro* (1) la création d'une matrice acellulaire nécessitant le recrutement des cellules de l'hôte, (2) la formation d'un gel de collagène contenant des cellules cultivées *in vitro*, (3) la formation d'un échafaud de polymère contenant des cellules cultivées *in vitro* et (4) l'auto-assemblage cellulaire dans lequel les cellules synthétisent leur propre matrice (Nerem, 2000).

7.3 Les équivalents tridimensionnels cornéens

Le génie tissulaire au niveau de la cornée en est à ses débuts. Plusieurs modèles ont été élaborés et ont donné des résultats intéressants. Ces modèles permettent d'étudier sous différents angles la morphologie, les rôles ou les fonctions de la cornée.

La première étape dans la reconstruction d'une cornée est l'isolement des trois types cellulaires impliqués, les kératocytes, les cellules endothéliales et les cellules épithéliales, à partir d'une cornée provenant d'organismes vivants. Cette étape permet de cultiver les cellules en monocouche et d'approfondir les connaissances sur la morphologie de chacun des types cellulaires. Cette étape permet de mettre au point les conditions de culture qui favorisent la croissance et le développement des cellules. Par la suite, il faut choisir la substance qui jouera le rôle de matrice dans laquelle il est possible d'inclure les kératocytes et sur laquelle il est possible de déposer les cellules épithéliales et endothéliales. Finalement, plusieurs tests sont effectués sur le montage final pour vérifier si la cornée reconstituée *in vitro* est physiologiquement et fonctionnellement similaire à la cornée *in vivo*.

Les utilisations à long terme d'un équivalent tridimensionnel cornéen sont multiples. Ce modèle permettrait l'étude de la pathophysiologie et des maladies associées à la cornée (Minami, Sugihara, et Oono, 1993), d'effectuer des tests de toxicité et de pharmacologie (Schneider, Maier-Reif, et Graeve, 1999), d'analyser des cosmétiques et des produits ophtalmiques utilisés par les porteurs de lentilles cornéennes (Germain, Auger, et Grandbois, 1999), d'évaluer de nouveaux médicaments et produits chimiques sans oublier les études biomédicales et le développement d'implants qui pourront un jour remplacer en partie ou en totalité la cornée malade d'un patient (Griffith et coll., 1999 ; Orwin et Huber, 2000). Les modèles mis au point par les différentes équipes de recherche ont des formes semblables mais diffèrent dans la composition. Le tableau XII présente les caractéristiques les plus importantes de ces modèles.

Tableau XII: La comparaison de la structure de 5 équivalents tridimensionnels cornéens différents.

| | Minami et coll., 1993 | Schneider et coll., 1999 | Zieske et coll., 1994 | Germain et coll., 1999 | Griffith et coll., 1999 |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|--------------------------|------------------------------------------------|------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| Organisme d'où proviennent les cornées | Bœuf | Embryon de cochon | Lapin | Humain | Humain |
| Formation d'une lignée continue | Non | Non | Oui, seulement pour les cellules endothéliales | Non | Oui pour les trois types cellulaires |
| Type de matrice | Collagène type I | Collagène type I | Collagène type I | Collagène type I | Collagène-chondroïtine sulfate couplé avec de la glutaraldéhyde |
| Présence de kératocytes dans la matrice | Oui | Oui | Oui | Oui | Oui |
| Présence de cellules épithéliales sur une des faces de la matrice | Oui | Oui | Oui | Oui | Oui |
| Présence de cellules endothéliales sur l'autre face de la matrice | Oui | Oui | Oui | Non | Oui |
| Technique de l'interface air-liquide permettant la stratification de l'épithélium cornéen | Oui | Non | Oui | Non | Oui |

L'équivalent cornéen tridimensionnel mis au point par Minami et coll. (1993) a révélé peu de choses concernant la physiologie de l'équivalent. Par contre, ils ont démontré qu'il était possible de créer un modèle de co-culture où les trois types cellulaires d'une cornée normale étaient disposés comme dans une cornée *in situ*. Ils ont mis en culture des cellules de cornées bovines. Les cellules épithéliales et endothéliales limitaient un gel de collagène contenant des kératocytes. Cette reconstruction *in vitro* était assez transparente pour permettre l'observation des trois types cellulaires en microscopie par contraste de phase. L'anticorps AE5, spécifique pour une kératine entre 55 et 64 kDa présent dans les différentes couches de l'épithélium cornéen *in vivo*, réagit avec cette même protéine au niveau de l'épithélium cornéen de l'équivalent. Cette similitude entre l'équivalent cornéen et le tissu natif leur permettent de conclure que les cellules épithéliales cornéennes de l'équivalent cornéen possèderaient les mêmes caractéristiques biochimiques que la cornée native. Cette étude permet de soulever une hypothèse : les kératocytes et/ou les cellules endothéliales produiraient des facteurs de croissance qui affecteraient la croissance et la différenciation des cellules épithéliales en co-culture avec ces deux types cellulaires (Minami et coll., 1993).

L'équivalent cornéen tridimensionnel de Schneider et coll. (1999) constitue un pas de plus vers la réalisation d'un montage où les composantes sont mieux évaluées. Une fois que les conditions optimales de culture pour les trois types cellulaires ont été déterminées, l'étude de la biologie cellulaire et moléculaire des cellules peut être amorcée. L'étape ultime de leur projet a consisté à réaliser l'équivalent. Des études histologiques et histochimiques sur la cornée *in vitro* ont montré une structure similaire à la cornée *in vivo* plus particulièrement au niveau du gel de collagène qui affiche une organisation et une composition en glycosaminoglycane similaire au stroma cornéen *in vivo*. L'observation d'une membrane entre l'épithélium et le gel de collagène de même qu'entre le gel de collagène et l'endothélium suggèrent que les cellules de l'équivalent cornéen se comportent comme les cellules du tissu natif puisque ce sont elles qui synthétisent les membranes basales.

Zieske et coll. (1994) ont produits différents types de modèles d'équivalents tridimensionnels cornéens. Un modèle possédant des cellules épithéliales déposées sur une des deux faces d'un gel de collagène contenant des fibroblastes a d'abord été conçu. Trois différentes conditions d'incubation ont été testées avec ce montage (1) immersion complète de l'épithélium avec du milieu de culture, (2) épithélium soulevé pour former un interface air-liquide sans humidité ou (3) avec humidité. C'est la troisième condition qui a donné la plus grande similitude avec l'épithélium cornéen *in vivo*, l'humidité jouant le rôle du film lacrymal. Par contre, l'ajout des cellules endothéliales sur l'autre face du montage a permis d'obtenir un résultat très proche d'une cornée de lapin *in vivo*. L'endothélium a permis une meilleure différenciation de l'épithélium et une meilleure distribution des kératocytes dans le gel. L'équivalent tridimensionnel cornéen mis au point par cette équipe accorde beaucoup d'importance à l'endothélium cornéen et vient confirmer le rôle qu'il joue dans la physiologie de la cornée.

L'équipe du Dr Lucie Germain (Germain et coll., 1999) a utilisé des cellules cornéennes humaines dans un équivalent cornéen tridimensionnel, étape nécessaire à la construction d'un implant oculaire humain. Cette équipe s'est attardée aux liens qui assurent l'intégrité de la cornée et s'est demandée si la cornée *in vitro* présente les mêmes caractéristiques que la cornée *in vivo*. La membrane basale de la matrice sous l'épithélium cornéen et les intégrines des cellules basales cornéennes sont responsables du maintien de l'intégrité de la cornée. Les récepteurs sur les cellules animales qui attachent les protéines de la matrice sont des intégrines. L'attachement de l'épithélium cornéen au stroma est possible grâce à l'interaction des composantes de la matrice avec les intégrines. Ils ont donc ajouté la couche de cellules épithéliales sur le stroma afin d'étudier l'adhésion de l'épithélium au stroma. L'utilisation de plusieurs anticorps, spécifiques aux différentes intégrines et composantes de la matrice, permet de conclure que dans l'ensemble, les propriétés histologiques de la matrice ressemblent au tissu normal. Par contre, la distribution des intégrines est plutôt similaire à celle d'une cornée en cours de guérison.

L'analyse de la physiologie de l'équivalent cornéen tridimensionnel a été réalisée par l'équipe de May Griffith et coll. (1999). Comparativement aux autres types de modèles, celui-ci a été bâti à l'aide de cellules provenant de lignées continues de cellules. Ce facteur n'étant pas rencontré *in vivo* chez un patient en santé, les cellules ont été étudiées afin de confirmer qu'elles avaient le même phénotype que les cellules *in vivo*. La transparence, la morphologie et l'histologie des cornées *in vitro* sont apparemment similaires à la cornée *in vivo*. De plus, ils ont évalué que l'œdème stromal des équivalents, observé à la suite de l'ajout d'ouabaïne dans le milieu de culture, est semblable à celui de la cornée humaine et qu'il y avait instauration d'une pompe endothéliale fonctionnelle dans les équivalents cornéens. La transparence de l'équivalent est très semblable à la cornée *in vivo*. De plus, elle est affectée lors de son exposition à des agents chimiques de la même façon qu'une cornée normale.

La réalisation d'un équivalent cornéen tridimensionnel à partir de cellules humaines est possible mais il reste encore beaucoup de travail pour vérifier les différentes composantes histologiques et physiologiques. Le défi consiste à améliorer les modèles tout en préservant la transparence de l'équivalent (Germain et coll., 2000b). Une partie de ce travail repose sur la compréhension de la signalisation entre les différents types de cellules formant la cornée.

7.4 Les interactions cellulaires dans la cornée

Les interactions entre les différents tissus d'un organe se manifestent dès les premiers instants de son développement et l'œil des vertébrés ne fait pas exception à cette règle (Hay, 1980 ; cité par Chan et Haschke, 1983). La plupart des tissus humains sont formés d'une couche épithéliale reposant sur une matrice extracellulaire. La cornée est l'organe idéal pour l'étude des interactions entre la matrice extracellulaire (stroma) et l'épithélium. Plusieurs raisons justifient son utilisation : (1) les deux types cellulaires, cellules épithéliales et kératocytes, sont bien localisés, (2) l'ARNm est localisé sans ambiguïté dans le tissu natif, (3) les interactions nerfs-cellules épithéliales sont moins complexes que dans d'autres organes et moins susceptibles d'influencer les interactions stroma-épithélium et (4) les changements de structure sont facilement visibles à la lampe

à fente et au microscope confocal (Wilson, Liu, et Mohan, 1999). L'étude des interactions cellulaires dans la cornée apporte beaucoup d'informations en ce qui concerne le fonctionnement et les comportements de ces trois types cellulaires.

7.4.1 Les interactions stroma-épithélium

Les kératocytes produisent des substances comme des cytokines qui régulent les fonctions des cellules épithéliales cornéennes. En effet, des cellules épithéliales basales en co-culture avec des kératocytes humains dans une éponge de collagène affichaient une morphologie cuboïde, similaire à la cornée *in vivo*, lorsque des kératocytes étaient présents dans l'éponge (Orwin et Hubel, 2000).

Le facteur de croissance des hépatocytes, HGF, et le facteur de croissance des kératinocytes, KGF, sont deux médiateurs de signalisation paracrine qui sont impliqués dans les interactions stroma-épithélium (Wilson et coll., 1993 ; Li et coll., 1996 ; cités par Wilson et coll., 1999). Les kératocytes et les cellules endothéliales cornéennes expriment l'ARNm de ces deux facteurs de croissance tandis que les trois types cellulaires de la cornée expriment les récepteurs appropriés (Wilson et coll., 1993 ; cité par Wilson et coll., 1999). Par contre, le niveau d'expression des récepteurs pour l'HGF est supérieur dans les cellules épithéliales cornéennes (Li et coll., 1996 ; cité par Wilson et coll., 1999). Plusieurs fonctions sont régulées par ces deux facteurs de croissance : ils stimulent la prolifération des cellules épithéliales cornéennes (aucun effet sur les kératocytes) (Wilson et coll., 1994b ; cité par Wilson et coll., 1999), et modulent le processus de guérison lorsque l'épithélium cornéen est blessé. De plus, l'HGF stimule la mobilité des cellules épithéliales cornéennes. L'interleukine-1 (IL-1) alpha et bêta seraient des cytokines libérées par les cellules épithéliales qui réguleraient l'expression de l'HGF et de l'KGF (Weng et coll., 1996 ; Li et Tseng, 1996 ; Li et Tseng, 1997 ; cités par Wilson et coll., 1999).

Un autre facteur influencerait la prolifération des cellules épithéliales cornéennes. Ce facteur non-identifié par les auteurs mais nommé facteur des fibroblastes du stroma

(SFF) est présent dans le milieu de culture de kératocytes humains, de lapins et de bœufs (Chan et Haschke, 1983 ; Jacob, Cruwys, et Mackie, 1989). Ce facteur nécessite un contact minimum de 16 heures avant de stimuler la synthèse d'ADN dans les cellules épithéliales et ainsi de les inciter à proliférer. Son effet stimulant est indépendant de la présence de sérum dans le milieu de culture et cesse deux jours après le retrait du facteur dans le milieu. Plus spécifiquement, il stimule les cellules épithéliales bovines cornéennes en phase G1 du cycle cellulaire et son effet diminue au fur et à mesure que les cellules en culture atteignent la confluence (Jacob et coll., 1989). Plusieurs facteurs de croissance ont été testés sur les cellules épithéliales afin d'identifier le SFF. Aucune des substances n'a engendré une prolifération cellulaire telle qu'observée avec le SFF (Chan et Haschke, 1983). Des études plus poussées permettront de déterminer l'identification et le mécanisme d'action de ce facteur.

7.4.2 Les interactions épithélium-stroma

L'interleukine-1 est fortement exprimée dans les cellules épithéliales et endothéliales cornéennes et très faiblement dans les kératocytes de la cornée normale (Wilson et coll., 1994c ; cité par Wilson et coll., 1999). Les kératocytes possèdent le récepteur pour l'IL-1 (Fabre et coll., 1991 ; Bereau et coll., 1993 ; Wilson, Lloyd, et He, 1994d ; cités par Wilson et coll., 1999) et ils entrent en apoptose lorsqu'ils sont incubés avec de l'interleukine-1 (Wilson et coll., 1996a ; cité par Wilson et coll., 1999). L'épithélium cornéen libère l'IL-1 lorsque les cellules sont endommagées entraînant l'apoptose des kératocytes.

L'apoptose des kératocytes, surtout dans la région antérieure du stroma serait médiée par Fas/Fas ligand. Fas et Fas ligand sont exprimés dans les trois types cellulaires de la cornée (Wilson et coll., 1996b ; cité par Wilson et coll., 1999). Deux mécanismes pourraient moduler en parallèle l'apoptose des kératocytes en réponse à une lésion de l'épithélium cornéen. Des cytokines influenceraient la libération de KGF et de HGF par les kératocytes de la région postérieure de la cornée qui stimuleraient la prolifération des cellules épithéliales afin de refermer la lésion tandis que d'autres cytokines auraient pour

fonction de stimuler la prolifération des kératocytes dans la région antérieure du stroma (Wilson et coll., 1999).

7.4.3 Les interactions épithélium-endothélium

Malgré le fait que l'épithélium ne se situe pas à proximité de l'endothélium, ce dernier sécréterait un ou des facteurs qui ont la capacité de promouvoir la stratification de l'épithélium cornéen. En effet, des cellules épithéliales humaines, situées sur une face d'une éponge de collagène avec des cellules endothéliales sur l'autre face, montrent une plus grande stratification (3-4 couches) comparativement à des cellules épithéliales ensemencées sur une éponge sans endothélium (1-2 couches) (Orwin et Hubel, 2000). L'épithélium et l'endothélium n'interagiraient pas seulement via des facteurs solubles mais également de manière physique.

Des études anciennes ont documenté des interactions entre des couches épithéliales. Lorsqu'une guérison anormale se manifeste, elle se traduit souvent par la migration incontrôlée des cellules épithéliales cornéennes dans la chambre antérieure entraînant une perte de vision partielle ou totale (Yanoff et Fine, 1975 ; cité par Yanoff et Cameron, 1977). Le contact des cellules épithéliales et endothéliales dans une cornée blessée inhibe leur migration respective (Cameron, Flaxman, et Yanoff, 1974 ; Glickstein, Cameron, et Yanoff, 1975 ; cités par Yanoff et Cameron, 1977). Ce phénomène nommé inhibition de mouvement par contact n'est pas observé lorsque l'endothélium est très endommagé, ou présente une *cornea guttata*. Bien que l'endothélium ne soit pas altéré physiquement, des facteurs de l'environnement comme des infections oculaires, un flux sanguin irrégulier ou une variation dans le pH peuvent empêcher l'arrêt de la migration de l'épithélium cornéen (Yanoff et Cameron, 1977).

**Partie 2 : Co-culture d'endothélium cornéen et de kératocytes
bovins : électrophorèse et immunohistochimie**

INTRODUCTION

Depuis quelques années, le génie tissulaire cornéen est devenu un sujet d'actualité. Un des buts de la reconstruction d'un équivalent cornéen tridimensionnel est le remplacement du test de *Draize*. Ce test consiste à exposer la cornée de lapins à différentes concentrations de produits chimiques ou commerciaux afin d'en déterminer les niveaux de toxicité. L'utilisation d'un tissu créé *in vivo* à la place de yeux de lapins permettrait de réduire le nombre de tests effectués sur les animaux. Avant de réussir à recréer *in vitro* une cornée physiologiquement fonctionnelle, il est important de bien connaître les interactions qui ont lieu entre les différents types cellulaires constituant la cornée saine. De plus, l'interaction entre ces cellules ou entre un type cellulaire et le tissu extracellulaire détermine la guérison et le pronostic visuel après un traumatisme ou une chirurgie.

La réalisation de modèles de co-culture avec des cellules cornéennes a permis d'identifier plusieurs molécules, sécrétées par l'un des types cellulaires, influençant la croissance et la différenciation de l'autre type cellulaire. Des cytokines et des facteurs de croissances libérés par les kératocytes semblent contrôler les fonctions des cellules épithéliales de la cornée (Orwin et Hubel, 2000 ; Wilson, Liu, et Mohan, 1999). La présence de cellules endothéliales de la cornée dans une co-culture favoriserait la stratification des cellules épithéliales adjacentes (Orwin et Hubel, 2000).

Malgré plusieurs études sur les interactions cellulaires cornéennes, très peu d'informations sont disponibles sur l'influence que produit la co-culture de cellules endothéliales et de kératocytes sur les protéines insolubles, hydrophiles et hydrophobes de ces cellules. Un modèle de co-culture de cellules endothéliales cornéennes bovines et de kératocytes a permis d'étudier les effets sur les protéines membranaires et cytoplasmiques de ces cellules. Une fois que les cellules, poussant en co-culture, ont atteint la confluence, elles sont soumises à un protocole de solubilisation. L'électrophorèse de ces protéines solubilisées a permis de comparer les tracés électrophorétiques des cellules témoins avec celui des cellules cultivées en co-culture.

La découverte d'un marqueur des cellules endothéliales en culture serait un outil permettant de déterminer la présence de cellules endothéliales dans les cultures de kératocytes et d'évaluer la pureté des cultures de cellules endothéliales. ZO-1, une protéine des jonctions serrées, a été choisi comme candidat potentiel dans l'identification d'un marqueur des cellules endothéliales en culture.

Cette seconde partie discute d'abord des méthodes et du matériel utilisés afin de (1) réaliser le modèle de co-culture, (2) solubiliser les protéines des cellules endothéliales et des kératocytes, (3) effectuer l'électrophorèse des protéines membranaires et cytoplasmiques et (4) faire l'immunohistochimie avec ZO-1 sur des tissus cornéens frais et sur des cellules endothéliales en culture. La deuxième section décrit les différentes conditions qui ont permis de retrouver certaines bandes. La présence de collagène semble avoir eu un impact un peu plus important sur la fraction hydrophile des protéines que sur la fraction insolubles. Cette section précède la discussion dans laquelle les résultats sont analysés et les sources d'erreurs identifiées.

Finalement, une troisième partie présente les conclusions tirées à la suite de l'analyse des résultats. Brièvement, des protéines insolubles de 143 et de 160 kDa et des protéines hydrophiles de 176 et 91 kDa seraient impliquées dans les interactions cellulaires puisqu'elles sont présentes dans les cellules endothéliales en co-culture mais sont absente des kératocytes en co-culture. Les kératocytes restreindraient la production de certains facteurs qu'ils retrouvent maintenant dans leur environnement. Un facteur de 97 kDa est présent dans les tracés électrophorétiques des protéines hydrophiles des cellules cultivées en présence de collagène. Ce facteur serait impliqué dans les interactions cellule-matrice extracellulaire. Des ouvertures vers lesquelles il pourrait être intéressant d'orienter des travaux termine cette partie. Des calculs des concentrations relatives des protéines obtenus grâce à des courbes de densitométrie et des techniques comme le Western Blot et l'immunobuvardage permettraient d'identifier les facteurs protéiques impliqués dans les interactions cellulaires cornéennes.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Le prélèvement des cellules cornéennes

Des yeux de bœufs fraîchement abattus dans un abattoir local sont transportés dans une solution saline sur la glace jusqu'au laboratoire de physiologie cornéenne. Les yeux sont dégrossis puis déposés dans une solution saline contenant de la pénicilline et de la streptomycine (Gibco BRL, Burlington, Canada, Cat. No. 15140-122). Les cornées sont excisées en milieu stérile, sous une hotte à flux laminaire (Biological Safety Cabinets, Nuaire, Plymouth, MN) afin de prélever les cellules appropriées.

Les cellules endothéliales

Les cornées sont déposées sur un support concave, la face postérieure vers le haut (Annexe I). Dans la cuvette formée par l'endothélium cornéen, de la trypsine-EDTA (0,25% Trypsine et 1 mM EDTA-4Na) (Gibco BRL, Cat. No. 25200-072) y est déposée. Les cellules endothéliales sont frottées mécaniquement (McCallum et coll., 1982) puis déposées dans un tube à centrifugation auquel est ajouté du milieu de culture contenant 20% de sérum fœtal bovin afin de neutraliser l'action protéolytique de l'enzyme. Une centrifugation à la température de la pièce (Centrifugeuse Beckman, modèle Allegra 21R, rotor S4180G, Palo Alto, CA) à 800g est effectuée durant 5 minutes. Le culot cellulaire est resuspendu dans 1 ml de nouveau milieu de culture (20% de sérum fœtal bovin). Deux culots, correspondant aux cellules de deux cornées, sont transférés dans un flacon de culture de 25 cm² (T-25) (Falcon #3014, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) qui est déposé dans l'incubateur.

Les kératocytes

Le protocole de prélèvement des kératocytes d'après Wee et coll. (1995) fait appel à la technique de l'explant (Annexe I étape D). Une cornée, dépourvue de cellules endothéliales est soumise à l'action de la dispase (Collaborative Biomedical Products, #40235, Two Oak Park, Bedford, MA) sur sa face antérieure afin d'enlever les cellules épithéliales. Le stroma, dénudé sur ses deux faces, est coupé en 4 morceaux. Chaque morceau est déposé dans un flacon T-25 contenant du milieu de culture (20% de sérum

foetal bovin). Les explants sont retirés des flacons après cinq jours, lorsque des kératocytes ayant migré hors de l'explant sont visibles. Ces cellules se diviseront pour former une monocouche de cellules à la surface du flacon.

La culture cellulaire

Le milieu de culture *Eagle* modifié d'après *Dulbecco* (Gibco BRL, Cat. No. 12100-046) est utilisé afin de subvenir aux besoins nutritionnels des cellules cornéennes. Ce milieu de culture formulé pour un environnement de 10% en CO₂ dans l'incubateur requiert habituellement l'ajout de 22 mmole/litre de bicarbonate de sodium. Pour simuler les conditions régnant dans la cornée, les cellules sont incubées dans un environnement de 5% en CO₂. Afin de permettre un pH physiologique à une pCO₂ de 38 mm de Hg (5%), la moitié de la quantité de bicarbonate de sodium a été remplacée par une quantité molaire équivalente de gluconate de sodium. À ce milieu de culture est ajouté un mélange d'antibiotiques/anti-mycotique (Sigma Chemical, St-Louis, MO) (pénicilline 100 U/ml, streptomycine 100 µg/ml et fungizone 0,25 µg/ml) et du sérum foetal bovin (Medicorp inc., Montréal, Canada) de façon à former une solution 1% (v/v) d'antibiotiques et de 20% ou 10% (v/v) de sérum foetal bovin. Le milieu de culture contenant 20% de sérum est utilisé pour démarrer les cultures cellulaires jusqu'à ce que la confluence soit atteinte, tandis que le milieu de culture contenant 10% de sérum maintient les cellules en culture. Le milieu est changé trois fois par semaine sous la hotte à flux laminaire. Les flacons sont remis dans l'incubateur (Sanyo O₂/CO₂ incubator, Scientifique Instrumentation inc., Montréal, Canada), le bouchon légèrement dévissé, où l'atmosphère ambiante est composée de 5% de CO₂ et 95% d'air.

La réalisation des montages stroma-endothélium

Les modèles de co-culture de cellules endothéliales cornéennes avec des kératocytes ont été réalisés avec des culture cellulaires secondaires. Les cellules étaient préalablement cultivées dans des flacons de culture avant d'être trypsinisées puis déposées dans de nouveaux supports. Pour les trois modèles testés, le nombre de kératocytes et de cellules endothéliales initialement déposé dans les montages était déterminé à l'aide d'un hématimètre. Un volume contenant 5×10^4 kératocytes/ml et 3×10^5 cellules

endothéliales/ml a été utilisé. Du milieu de culture (20% de sérum foetal bovin) a été ajouté pour subvenir aux besoins nutritionnels des cellules des différents modèles.

Trois types de montages de co-culture ont été testés, utilisant différentes approches et matériaux. Le premier (montages avec collagène sur un anneau de papier) a permis d'évaluer les faiblesses du système et a permis le développement d'un deuxième modèle (montages avec collagène dans des inserts) plus simple et de meilleure qualité. Aucun résultat n'a été obtenu avec le premier modèle par contre, quelques résultats intéressants ont été obtenus avec le deuxième modèle. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec le troisième modèle de co-culture (montages sans collagène dans les inserts). Les étapes nécessaires à la réalisation de ces trois montages sont décrites brièvement dans les 3 sections suivantes.

Les montages avec collagène sur un anneau de papier

Le premier modèle se base sur les travaux de Germain et coll. (1999). Des kératocytes sont déposés dans un gel de collagène formé de 8 volumes de collagène bovin de type I (4°C) (Collaborative Biomedical Products, Two Oak Park, Bedford, MA), de 1 volume de NaOH 0,01M et d'un volume de milieu de culture 10X. Le gel est coulé dans un anneau de papier filtre par dessus lequel un *insert* contenant des cellules endothéliales est ajouté (Annexe II). L'ajustement du pH de la solution de collagène influencera l'intégrité du gel.

Un papier filtre (Whatman #4) découpé en forme de beigne (diamètre extérieur de 33 mm et diamètre intérieur de 12 mm) est déposé dans un petit pétri 35 x 10 mm (Falcon #1008). Un millilitre de la solution de collagène contenant les kératocytes est coulé dans le centre de l'anneau qui sert de support physique au gel. Un *insert* de 35 mm de diamètre avec une membrane (porosité de 1 μ m) (Falcon #3102) est déposé au centre des différents gels une fois qu'ils sont gélifiés. Les cellules endothéliales sont finalement déposées dans les *inserts*. Des montages identiques sans kératocytes ont également été préparés comme témoins. Le pH étant un facteur critique, les gels sont

demeurés gélifiés seulement au début de l'expérimentation, les changements d'environnement (hotte et incubateur) rendaient les gels liquides. Ces montages n'ont pas été utilisés dans les expériences d'électrophorèse.

Les montages avec collagène dans des *inserts*

Le deuxième modèle de co-culture se base sur les travaux de Minami et coll. (1993). Un gel de collagène bovin de type I contenant des kératocytes est coulé dans un *insert* qui est suspendu dans un puits d'une plaque où pousse une monocouche de cellules endothéliales (Annexe III).

La solution de collagène bovin est préparée et son pH équilibré. Les cellules endothéliales sont déposées dans les puits d'une plaque multipuits pour culture cellulaire (Falcon #3502). Un millilitre de la solution de collagène contenant les kératocytes est déposé dans chacun des *inserts* (Falcon #3102). Ils sont par la suite suspendus dans les puits de la plaque. Des montages sans kératocytes dans le gel de collagène ont été réalisés à titre de témoins. En tout, les protéines provenant de 3 montages de co-culture et 3 montage témoins ont été solubilisées et soumises à l'électrophorèse. Cependant, la gélification du collagène contenant ou non des kératocytes, s'est produite seulement initialement, tout comme pour le premier modèle. Au bout de quelques heures, le collagène était revenu à son état liquide. Les cellules ont donc été en contact avec le collagène durant environ deux jours, soit jusqu'au renouvellement du milieu de culture.

Les montages sans collagène dans les *inserts*

Le troisième modèle ne tient plus compte de la disposition tridimensionnelle des kératocytes. Il s'agit d'un montage très similaire à celui de la section précédente à l'exception des kératocytes qui ne sont plus ensemencés dans un gel de collagène (Annexe IV). C'est ce type de montage qui a été utilisé pour la majorité des expérimentations. La figure 7 montre les dimensions de la plaque et de l'*insert* tandis que la figure 8 est un schéma montrant les différentes étapes pour parvenir à réaliser le troisième modèle de co-culture de cellules endothéliales cornéennes et de kératocytes

bovins. Les cellules endothéliales sont cultivées dans le fond des puits de la plaque multipuits tandis que les kératocytes sont déposés dans les inserts. Des montages sans cellule endothéliale dans les puits de la plaque mais avec des kératocytes dans les *inserts*, et des montages avec des cellules endothéliales dans les puits de la plaque mais sans kératocyte dans les *inserts* ont été réalisés comme témoins. La croissance des cellules dans les puits et les *inserts* a pu être examinée en colorant les cellules avec un colorant photosensible. Ce colorant, le BCECF-AM, a également permis de vérifier la viabilité des cellules et de s'assurer de la confluence avant de procéder à la solubilisation des protéines membranaires.

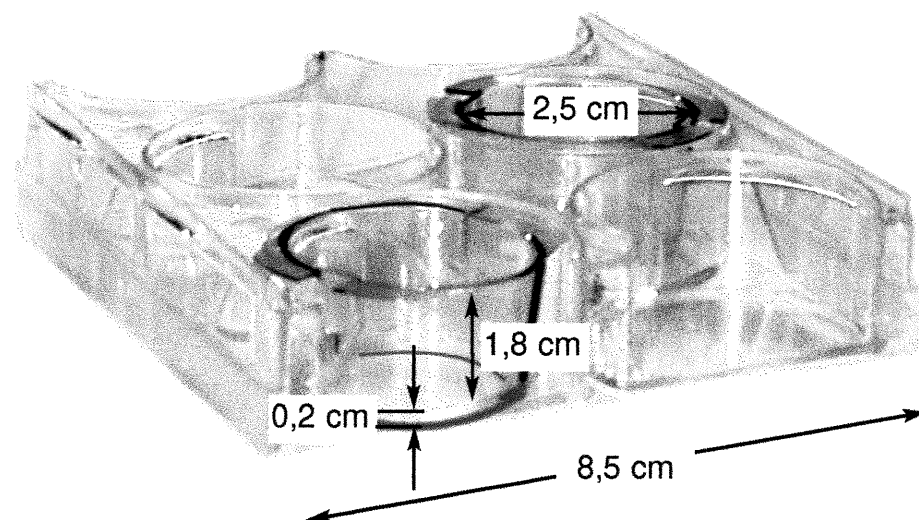
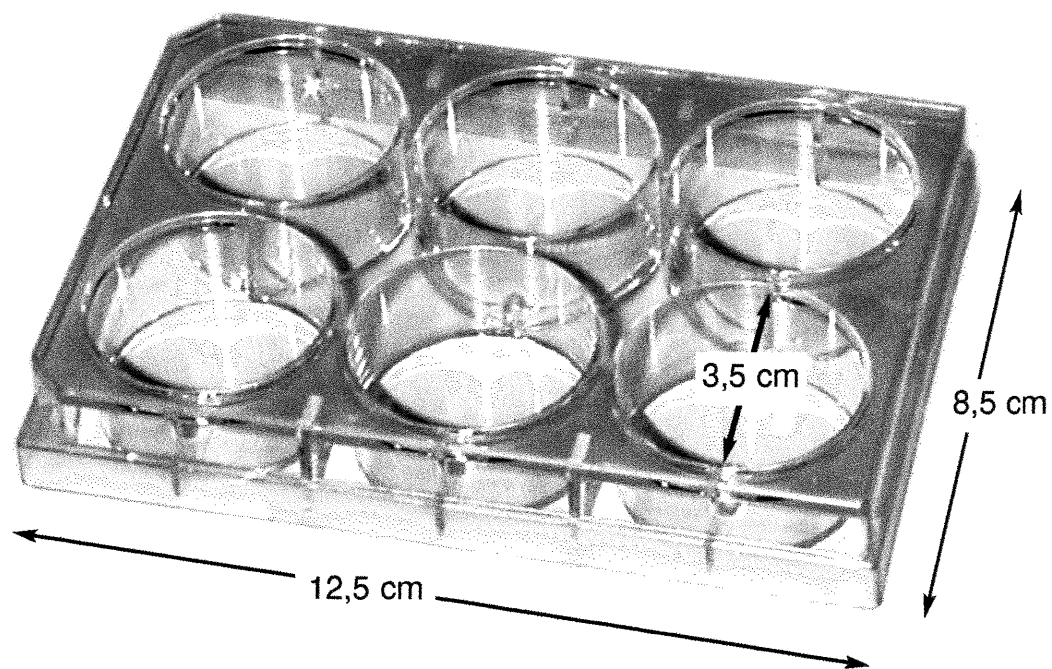


Figure 7.: Les dimensions de la plaque multipuits et de l'insert qui ont été utilisés pour le troisième modèle de co-culture (montages sans collagène dans les inserts). Les inserts, légèrement plus petits que les puits de la plaque permettent de séparer physiquement les deux types cellulaires. La distance entre la membrane poreuse et le fond du puits (entre les kératocytes et les cellules endothéliales cornéennes) a été évaluée à 2 mm.

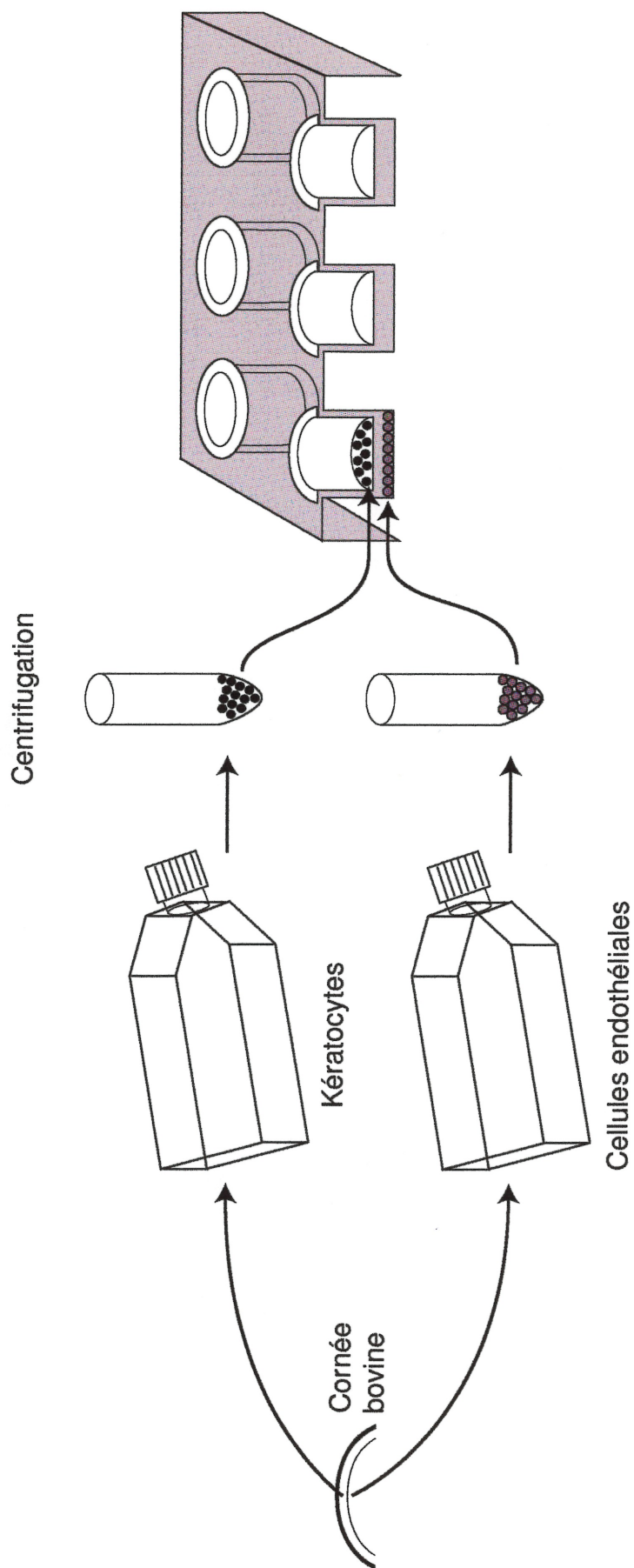


Figure 8: Schéma des différentes étapes nécessaires à la réalisation du troisième modèle de co-culture. Les cellules sont isolées à partir d'une cornée bovine et mises en culture dans des flacons de culture (T-25). Une fois à confluence, les cellules sont trypsinisées, centrifugées à température de la pièce et le culot resuspendu dans du milieu de culture frais. Le compte cellulaire est fait à l'aide d'un hématimètre afin de déposer un volume contenant 5×10^4 kératocytes/ml dans chaque *insert* et 3×10^5 cellules endothéliales/ml dans les puits. La co-culture est maintenue pendant 7 jours.

La coloration au BCECF-AM

La molécule de BCECF-AM (*2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5-(and-6)-carboxyfluorescein, acetoxymethyl ester*) (Molecular Probe, Eugene, OR) est un précurseur non polaire d'un colorant photosensible qui diffuse à l'intérieur de la cellule. Une fois à l'intérieur, les estérases intracellulaires activent le colorant par clivage. L'émission de fluorescence (520 et 560 nm) après excitation produite par une lampe au xénon à 490 ou 440 nm permet de visualiser les cellules. Environ 500µL de colorant d'une solution de BCECF-AM 0,15 mM est déposée dans un *insert* ou un puits. Après une incubation d'environ 45 minutes et rinçage, les cellules sont observées en épi-fluorescence avec un microscope inversé (IX70 Olympus, Carsen Optical, Markham, Canada).

La solubilisation des protéines membranaires

Plusieurs montages de co-culture et de témoins sont préparés selon le protocole du troisième modèle. Après 7 jours de co-culture, les protéines membranaires et cytoplasmiques des cellules sont récupérées afin d'en effectuer l'électrophorèse selon la technique décrite plus bas. La solubilisation des protéines membranaires est l'étape permettant d'obtenir les différentes suspensions protéiques (Annexe V). Le tableau XIII énumère les types cellulaires solubilisés d'après les différentes conditions de co-culture.

Tableau XIII : Les différents types cellulaires provenant du troisième modèle de co-culture soumis au protocole de solubilisation.

| Type de montage | Description du montage | Type cellulaire solubilisé |
|---------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|
| ◇ Co-culture de cellules endothéliales cornéennes et de kératocytes | -Des cellules endothéliales cornéennes dans les puits et des kératocytes dans les inserts | -Les cellules endothéliales cornéennes (EM) -Les kératocytes (KM) |
| ◇ Témoin cellules endothéliales cornéennes | -Seulement des cellules endothéliales cornéennes en culture dans des puits | -Les cellules endothéliales cornéennes (ET) |
| ◇ Témoin kératocytes | -Seulement des kératocytes en culture dans des inserts | -Les kératocytes (KT) |

Des cellules endothéliales cornéennes fraîches (EF) sont également solubilisées. Ces cellules proviennent directement d'une cornée bovine dont la face endothéliale a été exposée à la trypsine. D'autres échantillons (6) ont également été obtenus à partir du deuxième modèle de co-culture (montages avec collagène dans des *inserts*). Les cellules endothéliales et les kératocytes ont donc été en présence de collagène durant environ 2 jours. Trois échantillons de cellules endothéliales témoins (ET+collagène) et 3 échantillons de cellules endothéliales dans un montage (EM+collagène) ont été soumis au protocole de solubilisation.

Au bout des 7 jours de co-culture, les protéines membranaires sont récupérées afin d'effectuer l'électrophorèse. Les cellules endothéliales bovines cornéennes témoins et en co-culture cultivées ou non en présence de collagène sont mises en présence d'EDTA (éthylène-diaminetétraacétique acide) 0,1% dans du tampon phosphate. Cet agent chélateur aidera les cellules à se détacher les unes des autres. À l'aide d'une spatule en caoutchouc les cellules sont décollées du fond des puits. La membrane supportant les kératocytes témoins ou en co-culture est détachée de l'*insert* et déposée dans un pétri contenant 1 ml d'EDTA 0,1% dans du tampon phosphate. Les kératocytes sont décollés de la membrane à l'aide d'un scalpel. Les cellules endothéliales fraîches, après exposition à la trypsine, sont centrifugées à 4°C (800g /5 minutes) et le culot resuspendu dans 1 ml d'EDTA 0,1% dans du tampon phosphate.

Étant donné la petite surface des puits, les cellules endothéliales de deux puits, dont les conditions de culture sont identiques, sont jumelées afin d'obtenir des extraits protéiques plus concentrés. Les kératocytes, poussant en conditions de culture identiques sur 3 membranes sont jumelées.

Les cellules en suspension dans 1 ml d'EDTA 0,1% sont centrifugées à 4°C (1 200g/10 minutes) (Allegra 21R Centrifuge, rotor # S4180). Les différents culots sont resuspendus dans du tampon physiologique contenant des inhibiteurs de protéases (15%) (Sigma, #P-8340). Les protéases de la sérine, de la cystéine et de l'acide aspartique sont inhibées par ce cocktail qui contient également des inhibiteurs des aminopeptidases.

L'étape suivante consiste à homogénéiser mécaniquement les cellules (cellules endothéliales et kératocytes) à l'aide d'un homogénéisateur (VirTis, Gardiner N.Y., tête #265173 vitesse nominale 1 (4500-8000 tours/minutes)). Une deuxième centrifugation à 800g (Allegra 21R Centrifuge, rotor # F2402H) a fait sédimenter les noyaux. Les surnageants, contenant les protéines cytoplasmiques et membranaires, sont transférés dans de nouveaux tubes eppendorf. Un volume de 200 μ L permettant d'obtenir une concentration de 2% p/v en Triton X-114 (Sigma) est ajouté dans chacun des tubes eppendorf. Ce détergent solubilise les protéines membranaires des divers types cellulaires selon la procédure décrite par Pouliot et Béliveau (1994). Les tubes eppendorf sont transportés sur glace au Pavillon de Chimie de l'Université du Québec à Montréal. Une ultracentrifugation (100 000g /30 minutes) à 4°C des divers échantillons est effectuée à l'aide d'une ultra-centrifugeuse (Beckman, Optima TLX Ultracentrifuge 120,000 rpm).

Les surnageants obtenus à la suite de l'ultracentrifugation sont transférés dans de nouveaux tubes eppendorf tandis que les culots de l'ultracentrifugation sont resuspendus dans un millilitre de tampon physiologique. Les fractions « culot » contenant les protéines insolubles sont réfrigérées en attendant le dosage. Les surnageants de l'ultracentrifugation sont déposés sur un lit de sucrose 1 :9 afin de séparer le détergent de la suspension protéique. Le surnageant se sépare en deux phases, une phase inférieure riche et une phase supérieure pauvre en détergent. La phase supérieure est séparée de la phase inférieure et déposée dans un nouveau tube. Les fractions « phase supérieure » contenant les protéines hydrophiles sont réfrigérées. Le Triton X-114 est retiré des phases inférieures à l'aide de billes hydrophobiques (Bio-Beads, Biorad SM-2, Hercules, CA). Après 60 à 90 minutes d'agitation, les billes sont retirées des suspensions protéiques et les fractions « phase inférieure » contenant les protéines hydrophobes sont réfrigérées. Les échantillons des trois fractions sont maintenant prêts pour le dosage protéique. La figure 9 illustre la procédure de solubilisation tandis que le tableau XIV dresse la liste des différents échantillons obtenus à la suite de la procédure de solubilisation.

Cellules endothéliales
cornéennes dans du
tampon physiologique + EDTA

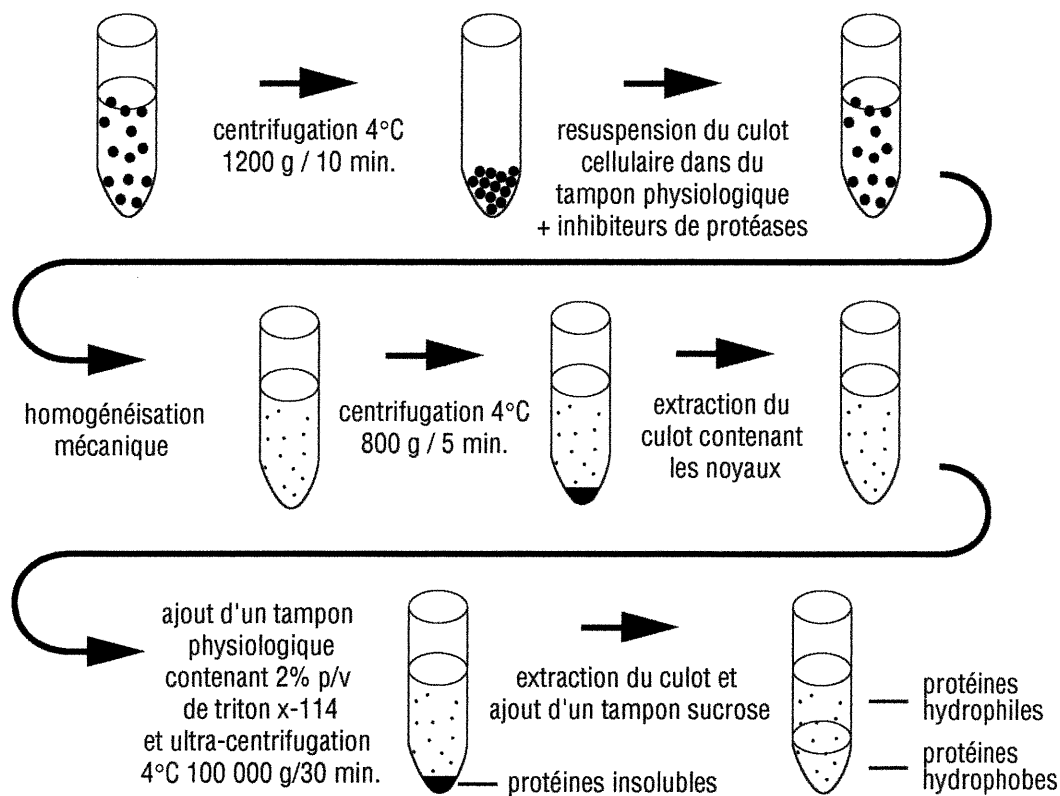


Figure 9: Schéma montrant les différentes étapes pour réaliser la procédure de solubilisation des protéines membranaires des cellules endothéliales cornéennes. La même procédure a été effectuée pour les kératocytes et les cellules endothéliales fraîches.

Tableau XIV: Liste des différents échantillons obtenus à la suite de la procédure de solubilisation.

| Type de fraction | Type cellulaire* | Condition de culture† | Abréviation |
|----------------------|------------------------------------|-----------------------|---------------|
| « Culot » | Cellules endothéliales + collagène | Témoin | cET+collagène |
| | Cellules endothéliales | Témoin | cET |
| | Cellules endothéliales fraîches | - | cEF |
| | Cellules endothéliales + collagène | Montage | cEM+collagène |
| | Cellules endothéliales | Montage | cEM |
| | Kératocytes | Témoin | cKT |
| | Kératocytes | Montage | cKM |
| « Phase supérieure » | Cellules endothéliales + collagène | Témoin | sET+collagène |
| | Cellules endothéliales | Témoin | sET |
| | Cellules endothéliales fraîches | - | sEF |
| | Cellules endothéliales + collagène | Montage | sEM+collagène |
| | Cellules endothéliales | Montage | sEM |
| | Kératocytes | Témoin | sKT |
| | Kératocytes | Montage | sKM |
| « Phase inférieure » | Cellules endothéliales | Témoin | iET |
| | Cellules endothéliales | Montage | iEM |
| | Cellules endothéliales fraîches | - | iEF |
| | Kératocytes | Témoin | iKT |
| | Kératocytes | Montage | iKM |

*La mention +collagène désigne les échantillons provenant du deuxième modèle de co-culture (montages avec collagène dans des *inserts*). Les types cellulaires ne portant pas la mention proviennent du troisième modèle de co-culture (montages sans collagène dans les *inserts*).

†Le terme témoin signifie que le type cellulaire a été cultivé en absence du deuxième type cellulaire tandis que le terme montage indique que les cellules ont été cultivées en co-culture.

Le dosage des protéines selon la méthode de Bradford

Les différents échantillons des différentes fractions sont dosés afin d'éviter de charger, dans les puits d'un même gel d'acrylamide, des suspensions protéiques avec des concentrations protéiques très différentes. La méthode de Bradford (micro-procédure) consiste à préparer un standard protéique d'albumine sérique de bœuf dont la concentration initiale est connue (1,4 mg/ml) (BioRad Kit II #500-0002). Quatre dilutions du standard protéique sont effectuées (1 :1, 1 :2, 1 :4 et 1 :8) et sont mesurées au spectrophotomètre à 595 nm (Philips, PU8620 series, Cambridge, Angleterre). La concentration des dilutions du standard étant connue ainsi que la densité optique associée, il est possible d'obtenir la droite d'étalonnage. Celle-ci est la droite de régression linéaire de la densité optique en fonction de la concentration des standards protéiques. Toutes les droites de régression ont été obtenues avec le logiciel Excel. Les échantillons contenant les fractions cellulaires sont dilués et une mesure au spectrophotomètre est effectuée. La densité optique des échantillons est reportée dans l'équation de la droite de régression afin d'obtenir les concentrations des échantillons inconnus.

Brièvement, 800 μ L de chaque dilution du standard ou des suspensions protéiques est déposé dans une cuvette spectrophotométrique. Un volume de 200 μ L de réactif est ajouté au volume du standard ou des suspensions protéiques. Après incubation de 5 minutes à la température de la pièce, la densité optique du standard est mesurée à 595 nm. Les échantillons étant préparés en duplicata, une moyenne des deux densités obtenues par dilution du standard et par échantillon de concentration inconnue est calculée. Le graphique de la densité optique à 595 nm en fonction de la concentration est tracé (figure 10). Les densités optiques des échantillons sont reportées dans l'équation de la droite de référence afin d'en déterminer la concentration en μ g/ml. Le reste des suspensions protéiques dosées est congelé à -80°C en attendant d'effectuer l'électrophorèse.

Standard protéique Méthode de Bradford

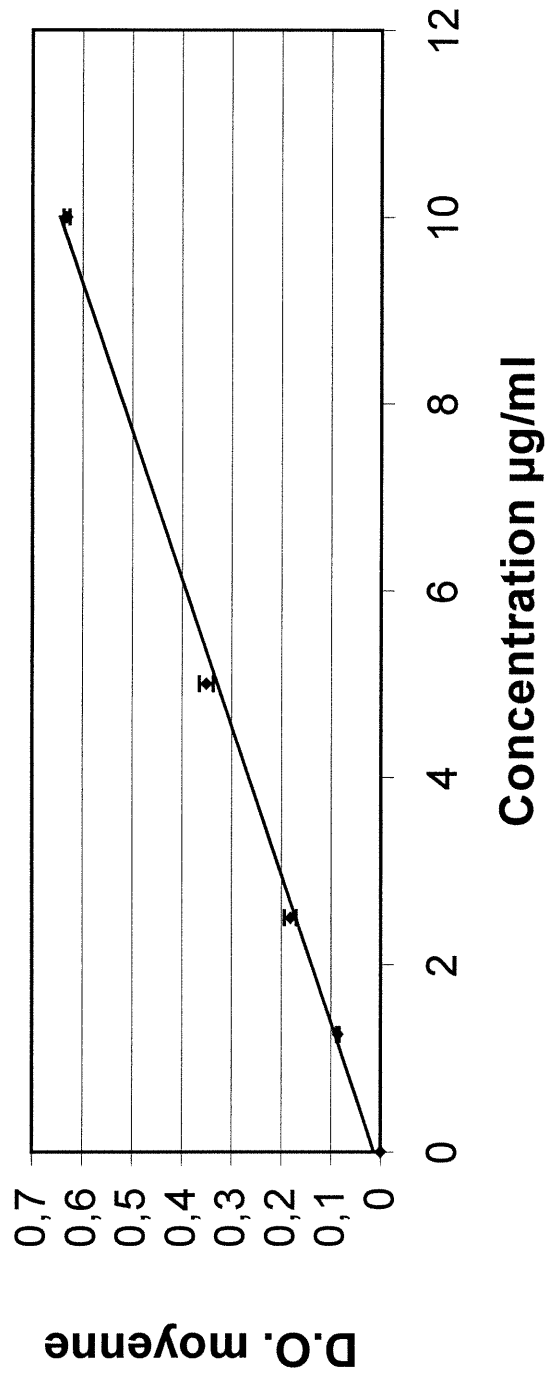


Figure 10: Le graphique de la densité optique à 595 nm en fonction de la concentration du standard protéique. L'équation de la droite est $y = 0,0632x + 0,0133$ et le coefficient de corrélation au carré de 0,99. La méthode de Bradford permet de déterminer la concentrations d'échantillons inconnus en reportant sur la courbe de référence la densité optique lu au spectrophotomètre. La concentration associée à la densité optique est celle de l'échantillon.

L'électrophorèse

L'électrophorèse consiste à faire migrer des protéines chargées des différentes fractions : « culot », « phase supérieure » et « phase inférieure », sous l'influence d'un champ électrique (Charlionet, et Rivat 1990). L'électrophorèse dans un gel de polyacrylamide contenant du SDS (dodécyle sulfate de sodium), un détergent ionique, est une méthode permettant d'estimer le poids moléculaire des protéines. Cette méthode électrophorétique porte le nom de SDS-PAGE (*SDS- polyacrylamide gel electrophoresis*). Le SDS se fixe sur les protéines (environ 1,4 de SDS par gramme de protéine), les entourant d'une enveloppe de groupes sulfates chargés négativement. Cette enveloppe masque complètement les charges naturelles des protéines, brise les ponts disulfures, et linéarise les protéines (Reynolds et Tanford, 1970). Les protéines identiques acquièrent donc une densité de charge identique. La technique d'électrophorèse utilisée dans le cadre de ce travail se base sur les protocoles de Laemmli (1970). Les protéines ont été séparées par SDS-PAGE dans deux types de gels. Les gels 1 à 9 étaient des mini-gels (Bio-Rad, Mini-Protean2, minivertical electrophoresis system) de 0,75 mm d'épaisseur (5,5 x 10 cm) à 10 puits. Les gels A, B, et C avaient 1,5 mm d'épaisseur (9,5 x 14,5 cm) et comportaient 15 puits (Owl, P9DS, Portsmouth, NH). Dans les deux cas, le gel de compactage était de 4% et le gel de séparation d'environ 8%. Après l'électrophorèse des mini-gels 1 à 9, la coloration des gels était faible par endroit. Une partie des échantillons utilisés pour les mini-gels 1 à 9 ont donc été concentrés par lyophilisation sous-vide à -80°C . Les échantillons lyophilisés des protéines insolubles ont été resuspendus dans 200 μL de tampon phosphate sans calcium ni magnésium tandis que les échantillons lyophilisés des protéines hydrophiles l'ont été dans 600 μL . Ce sont ces échantillons concentrés qui ont été déposés dans les gels A, B, et C.

Une fois, les suspensions protéiques décongelées, un volume contenant environ 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (pour les mini-gels 1 à 9) ou 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (pour les gels A, B, et C) de chaque échantillon est déposé dans un tube eppendorf. Un volume identique de tampon de chargement contenant du DTT (dithiothréitol), agent réducteur responsable de linéariser les protéines en éliminant les ponts disulfures, est ajouté dans les tubes. Les échantillons

sont bouillis entre 3 et 5 minutes. Les échantillons des 9 mini-gels ont été congelés à -20°C puisque l'électrophorèse a eu lieu à l'Institut Armand Frappier. Les échantillons des gels A, B et C ont été utilisés immédiatement puisque l'électrophorèse a été réalisée au laboratoire de physiologie cornéenne.

Plusieurs étapes sont nécessaires avant de charger les échantillons dans le gel de compactage. À la suite de la polymérisation du gel de séparation, le gel de compactage est coulé par dessus et un peigne de 10 ou 15 puits y est inséré. Après polymérisation du gel de compactage, le peigne est retiré et les puits de chargement nettoyés. Deux gels sont fixés par support et du tampon de migration est déposé entre les deux gels. Les différents échantillons sont chargés dans les puits. Un standard protéique (Novex, #LC5677, Scarborough, Ontario, Canada) composé de protéines dont les poids moléculaires sont connus est chargé dans le dernier puits de chaque gel. Les supports à migration sont déposés dans les cuvettes servant à la migration qui sont finalement remplies de tampon de migration. La migration des protéines dans le gel de compactage a lieu à voltage constant de 96 volts pour les mini-gels et à courant constant de 40 mA pour les gels A, B, et C. Le voltage est augmenté et stabilisé à voltage constant de 137 volts dans le gel de séparation pour les 9 mini-gels et à courant constant de 80mA pour les gels A, B, et C. Le courant est arrêté lorsque le front de migration approche du bas du gel.

La coloration des gels de polyacrylamide

Une fois la migration terminée, les gels sont soumis à une coloration au nitrate d'argent. Une trousse de Owl (VWR, #DP140002, Ville Mont-Royal, Québec, Canada) a été utilisée pour cette procédure. Chacun des 6 réactifs permet de fabriquer les solutions nécessaires à la coloration qui comporte huit étapes (annexe VI). Le tableau XV décrit les étapes nécessaires à la réalisation de la coloration ainsi que les différents temps d'incubation. Une fois la coloration terminée, les gels sont prêts pour le séchage. Les 9 mini-gels ont été déposés sur un séchoir (Gel Slab Dryer modèle #224, BioRad) pendant

une heure tandis que les gels A, B, et C ont été séchés entre deux pellicules de plastique (Gel drying frames, Sigma #Z37, 759-9) pendant 24 heures.

Tableau XV: Les différentes étapes nécessaires à la réalisation de la coloration au nitrate d'argent des gels de 0,75 et de 1,5 mm d'épaisseur.

| Étape | Description | Incubation gel 0,75 mm (min) | Incubation gel 1,5 mm (min) |
|-------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|
| 1 | Une fixation du gel | 10 | 20 |
| 2 | Une fixation du gel | 15 | 30 |
| 3 | Un pré-traitement qui rend le gel perméable au colorant | 10 | 20 |
| 4 | Un rinçage à l'eau déionisée | 5 | 10 |
| 5 | La coloration au nitrate d'argent | 15 | 25 |
| 6 | Trois rinçages à l'eau déionisée qui permettent d'éliminer les traces du colorant | 3 x 2 | 3 x 5 |
| 7 | Le développement de la coloration est une étape critique stoppée par l'expérimentateur lorsque l'intensité de la coloration est jugée optimale | 5 - 10 | 5 - 10 |
| 8 | L'arrêt de la réaction. | - | - |

L'analyse des gels

Une fois les gels secs, l'analyse peut commencer. Les distances de migration des différentes bandes du standard sont mesurées et la courbe d'étalonnage distance de migration en fonction du poids moléculaire est tracée (figure 11). Toutes les bandes d'un même gel ont été analysées en fonction du standard présent sur le même gel. Les différentes distance de migration des différentes bandes des échantillons ont été reportées dans l'équation de la courbe de régression afin d'obtenir le poids moléculaire associé. Les poids moléculaires ont été arrondis à l'unité la plus proche, et seulement les bandes bien visibles et distinctes ont été analysées.

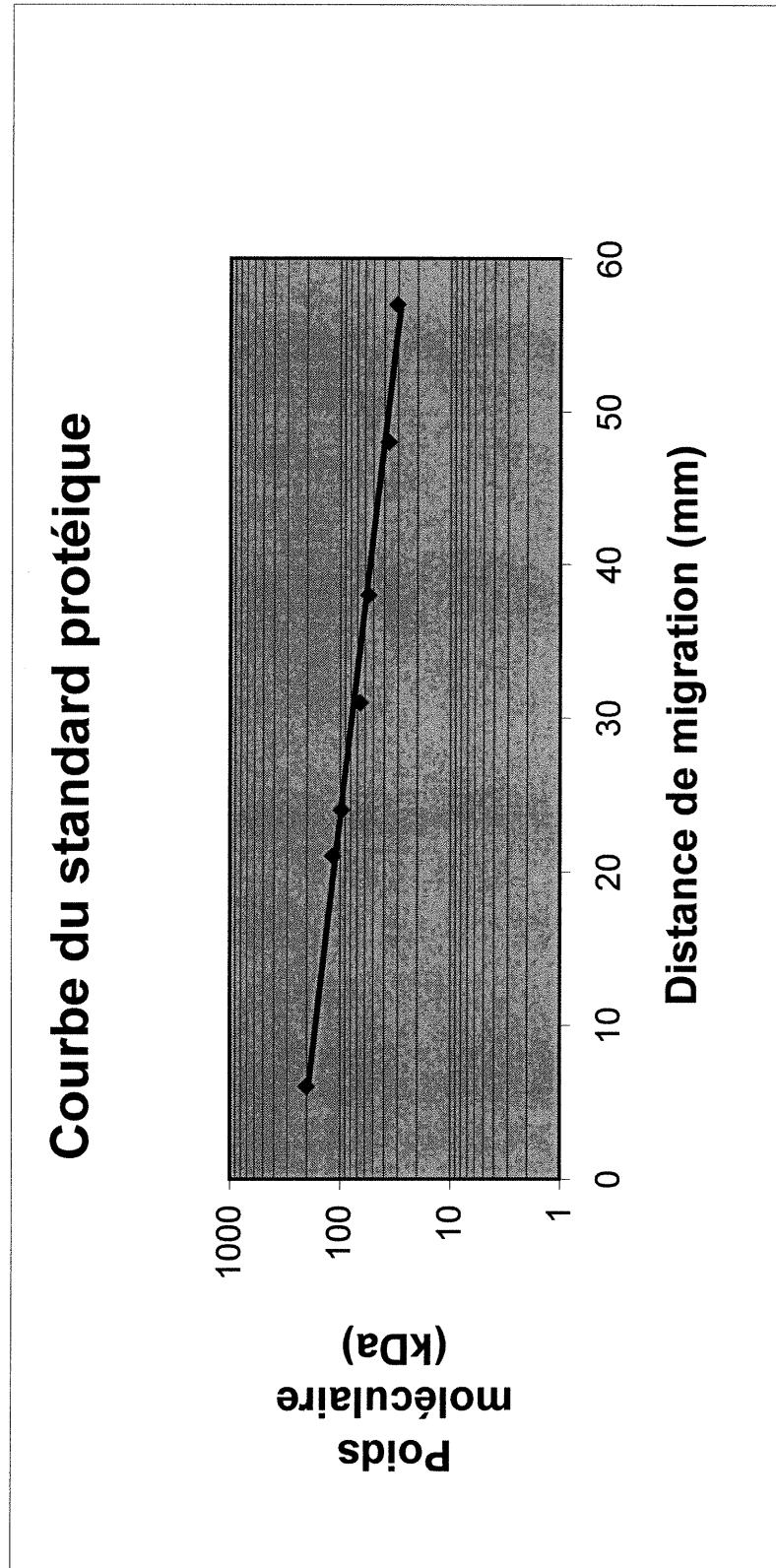


Figure 11: Courbe d'étalonnage distance de migration en fonction du poids moléculaire des différentes protéines du standard. Le standard est formé des protéines suivantes : (1) myosine (200 kDa), (2) β -galactosidase (116,3 kDa), (3) phosphorylase b (97,4 kDa), (4) albumine sérique de bœuf (66,3 kDa), (5) glutamique déshydrogénase (55,4 kDa), (6) lactate déshydrogénase (36,5 kDa) et (7) anhydrase carbonique (31 kDa).

Puisque plusieurs échantillons d'un même type cellulaire cultivé en conditions similaires de culture ont été déposés dans les puits des gels, plusieurs puits d'un même gel contenaient les mêmes protéines. Les différentes bandes de ces puits ont été jumelées afin de faciliter la comparaison entre les différents type de montages. Un calcul d'imprécision sur le poids moléculaire a été effectué de la façon suivante. La moitié de la plus petite valeur de l'instrument utilisé, la règle, a pour valeur 5 mm. Cette valeur a été introduite dans l'équation de plusieurs droites de régression du standard protéique. La moyenne de ces valeurs a permis d'évaluer à 3 kDa l'erreur d'imprécision ayant été faite sur les valeurs des poids moléculaires obtenues.

Le gel B a également été numérisé avec un *scanner* commercial (Hewlett-Packard, Scanjet 4C, logiciel HP Deskscan II) et analysé avec un système de densitométrie afin de vérifier la concentration des bandes de protéines. Deux puits ont été analysés par intensité de niveaux de gris avec le système d'analyse d'image informatique Northern Eclipse (Empix Imaging, Mississauga, Ontario) qui détermine la densité pour chaque pixel.

L'immunohistochimie indirecte avec ZO-1

La technique d'immunohistochimie indirecte consiste à faire réagir, dans un premier temps, un anticorps primaire dirigé contre la protéine étudiée, ZO-1, une protéine de la jonction serrée (voir section 3.3.2.1). Par la suite, un second anticorps marqué (fluorescent), est dirigé contre le premier anticorps. Si l'anticorps primaire s'est fixé sur la protéine ciblée, l'anticorps secondaire pourra s'attacher sur l'anticorps primaire. L'observation en épi-fluorescence confirmera la présence de la protéine cible ainsi que sa localisation dans le tissu. La présence de cette protéine dans l'endothélium cornéen *in situ* et chez les cellules endothéliales en culture permettrait d'utiliser ZO-1 comme marqueur cellulaire. L'immunoréactivité envers ZO-1 de coupes histologiques de cornées bovines (Annexe VII), effectuées à l'aide d'un cryostat, et de cellules en culture (cellules endothéliales et kératocytes) (Annexe VIII) ont été testées.

Les coupes au cryostat

Le cryostat permet de faire de minces coupes du tissu à l'étude qui a préalablement été congelé. Il est par la suite possible de déposer l'anticorps primaire et secondaire directement sur la coupe et vérifier la présence et la localisation de la protéine à l'étude. Selon la technique de Petroll et coll. (1999), une cornée bovine fraîche, fixée dans de la paraformaldéhyde 1% durant 30 minutes, est découpée en plusieurs morceaux. Les morceaux sont déposés dans une solution contenant 20% de sucrose afin de cryoprotéger le tissu. Une matrice d'enrobage (OCT Embedding matrix, Lipshaw, Pittsburgh, PA) est mise dans une petite cuvette en plastique puis un morceau de cornée est déposé au centre de la cuvette, puis le tout est congelé. Des coupes de 20 et de 10 μm d'épaisseur sont effectuées à l'aide d'un cryostat (Microm HM 500 OM). Les coupes histologiques sont déposées sur des lames enduite de poly-L-lysine (Sigma, P-1399).

La première étape de la révélation immunologique consiste à incuber les sections dans du lait écrémé 5%. La caséine du lait bloque les sites libres avec lesquels l'anticorps primaire pourrait se lier de façon non spécifique. Le tissu est par la suite mis en contact avec l'anticorps primaire, anti-ZO-1 (1 :200) (Chemicon, MAB1520 Rat x ZO-1, Temecula, CA). Une heure plus tard, les coupes sont rincées avec du tampon phosphate et mises en contact avec l'anticorps secondaire fluorescent (1 :100) (Chemicon, AP136F, Chèvre x Rat IgG). Une heure plus tard, les coupes histologiques sont observées en épifluorescence au microscope inversé. Des coupes histologiques ont été mises en contact seulement avec l'anticorps secondaire à titre de témoin afin de vérifier l'absence de réaction croisée. Quelques coupes histologiques ont également été soumises au protocole d'immunohistochimie indirecte utilisant la saponine. La procédure, la même que pour les cellule en culture, est décrite brièvement à la fin de la section suivante ainsi que dans la section B) de l'annexe VII.

Les cellules en culture

La technique de Petroll et coll. (1999) a également été suivie pour les cellules en culture. Des cellules endothéliales cornéennes bovines et des kératocytes bovins cultivés dans des T-25 différents sont trypsinisés et déposés respectivement dans trois puits d'une plaque multipuits. Après avoir atteint la confluence, les cellules sont perméabilisées dans de l'acétone à -20°C pendant 5 minutes. Après blocage des sites libres par une incubation avec du lait écrémé 5%, les cellules sont rincées et l'anticorps primaire, anti-ZO-1 (1 :200) est déposé dans deux puits contenant des cellules endothéliales et deux puits contenant des kératocytes. Du tampon phosphate est déposé dans les deux autres puits qui servent de contrôle. Une heure plus tard, l'anticorps primaire est enlevé et les cellules rincées avec un tampon phosphate. Les 6 puits reçoivent l'anticorps secondaire (1 :100) pendant une heure. Les cellules sont par la suite observées en épi-fluorescence au microscope inversé.

Un deuxième protocole, selon Sun et coll. (2000) a été testé afin de confirmer les résultats obtenus (Annexe VIII, étape B). Cette seconde méthode consiste à fixer les cellules dans une solution composée de 2% de paraformaldéhyde, de 75 mM de lysine, de 10 mM de périodate de sodium et de 45 mM de phosphate de sodium pendant 30 minutes. Les cellules sont rincées puis une solution de PBS contenant 1% de SDS est ajoutée. Au bout de 5 minutes, les sites libres des cellules sont bloqués avec une solution de lait écrémé 5% dans du PBS contenant 0,01% de saponine et 50 mM de NH_4Cl durant une heure. Par la suite, l'anticorps primaire (rat anti-ZO-1, 1 :100), est ajouté durant une autre heure à la température de la pièce. Les cellules sont rincées avec du PBS contenant 0,01% de saponine. L'anticorps secondaire (chèvre anti-IgG de rat, 1 :500 et 1 :1 000) fluorescent est mis en contact avec les cellules pendant une autre heure. Par la suite, les cellules sont observées en épi-fluorescence au microscope inversé.

RÉSULTATS

La culture cellulaire et la réalisation des différents types de montages

Les cellules endothéliales et les kératocytes ont été isolés avec succès à plusieurs reprises et maintenus en culture durant plusieurs mois. Les cellules endothéliales en culture ont une morphologie assez allongée avant d'atteindre la confluence. Une fois à confluence, leur forme hexagonale est parfaitement visible au microscope à contraste de phase (figure 12). Les cellules endothéliales cornéennes prennent environ 3 semaines avant d'atteindre la confluence. La morphologie des kératocytes en culture est très différente de celle des cellules endothéliales. Leur corps cellulaire rond, plus gros que celui des cellules endothéliales cornéennes, présente des prolongements dendritiques semblable à un soleil (voir la figure 4A). Une fois à confluence, les prolongements dendritiques des cellules voisines sont en contact les uns avec les autres (voir la figure 4B). Deux semaines après la mise en culture, les kératocytes ont atteint la confluence.

Le montage avec le collagène sur un anneau de papier a été d'abord testé. Plusieurs problèmes ont été rencontrés : (1) la liquéfaction du gel lors des changements de températures (incubateur-hotte), (2) l'adhésion du gel à la boîte de Pétri et (3) la difficulté d'utiliser des contenants permettant une bonne protection contre les contaminations. Aucun résultat n'a été obtenu avec ce type de montage. Ces contraintes ont nécessité l'élaboration d'un second modèle où le gel de collagène, contenant des kératocytes, est déposé dans un *insert* qui est suspendu au dessus de cellules endothéliales cultivées dans le fond d'une plaque à six puits. L'ensemble *insert*/plaque apportait plus de protection face aux contaminations, plus de support au gel de collagène et facilitait les manipulations de l'équivalent.

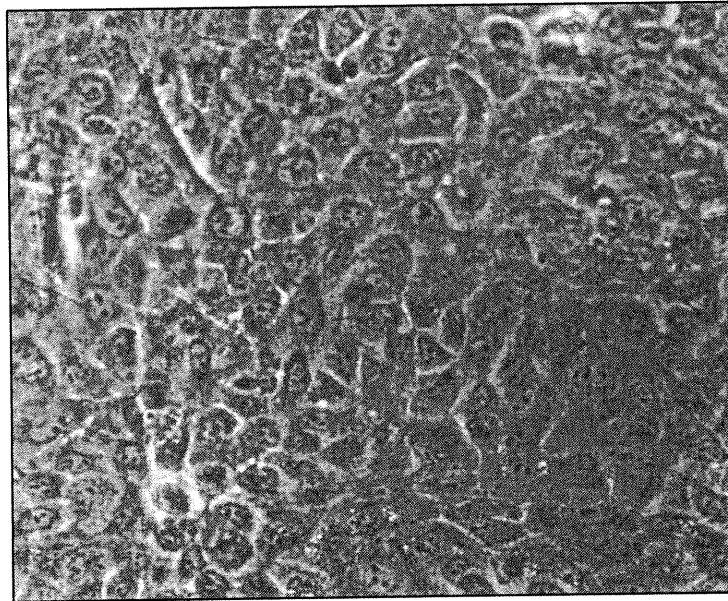


Figure 12: Cellules endothéliales cornéennes bovines en culture photographiées au microscope par contraste de phase. La forme polygonale des cellules est bien visible.

Malgré les améliorations apportées aux deuxième montage de co-culture, le problème concernant la liquéfaction du gel de collagène n'a pas été résolu ni en changeant le papier Whatman pour un contenant en plastique avec membrane poreuse ni en variant le pH ou la concentration du collagène. Quelques uns de ces montages ont été traités afin d'en recueillir les protéines. Cependant, la disposition tridimensionnelle des kératocytes de ce deuxième modèle d'équivalent cornéen n'a pas été maintenue puisque le gel de collagène n'est pas demeuré gélifié.

Le troisième montage (montage sans collagène dans les *inserts*), utilisé pour la plus grande partie de l'expérimentation, est identique au modèle précédent sauf que l'*insert* ne contient qu'une monocouche de kératocytes sans collagène. Un volume de milieu de culture contenant 3×10^5 cellules endothéliales par ml est déposé dans le fond d'un puits d'une plaque à 6 puits et un volume contenant 5×10^4 kératocytes par ml est déposé dans un *insert* possédant une membrane poreuse. Après 7 jours, les cellules dans le puits et dans l'*insert* sont à confluence.

La coloration au BCECF-AM a permis de visualiser la position des cellules et de confirmer la confluence des deux types cellulaires au bout de 7 jours. L'observation au microscope des cellules a montré que des kératocytes nouvellement déposés dans un *insert* s'attachaient au niveau de la périphérie de l'*insert*. Au fur et à mesure que le temps progresse, les kératocytes se divisent pour finalement se rejoindre au centre de l'*insert*. La figure 13 montre des cellules endothéliales cornéennes en culture dans un puits d'une plaque et des kératocytes en culture dans un *insert* colorés au BCECF-AM.

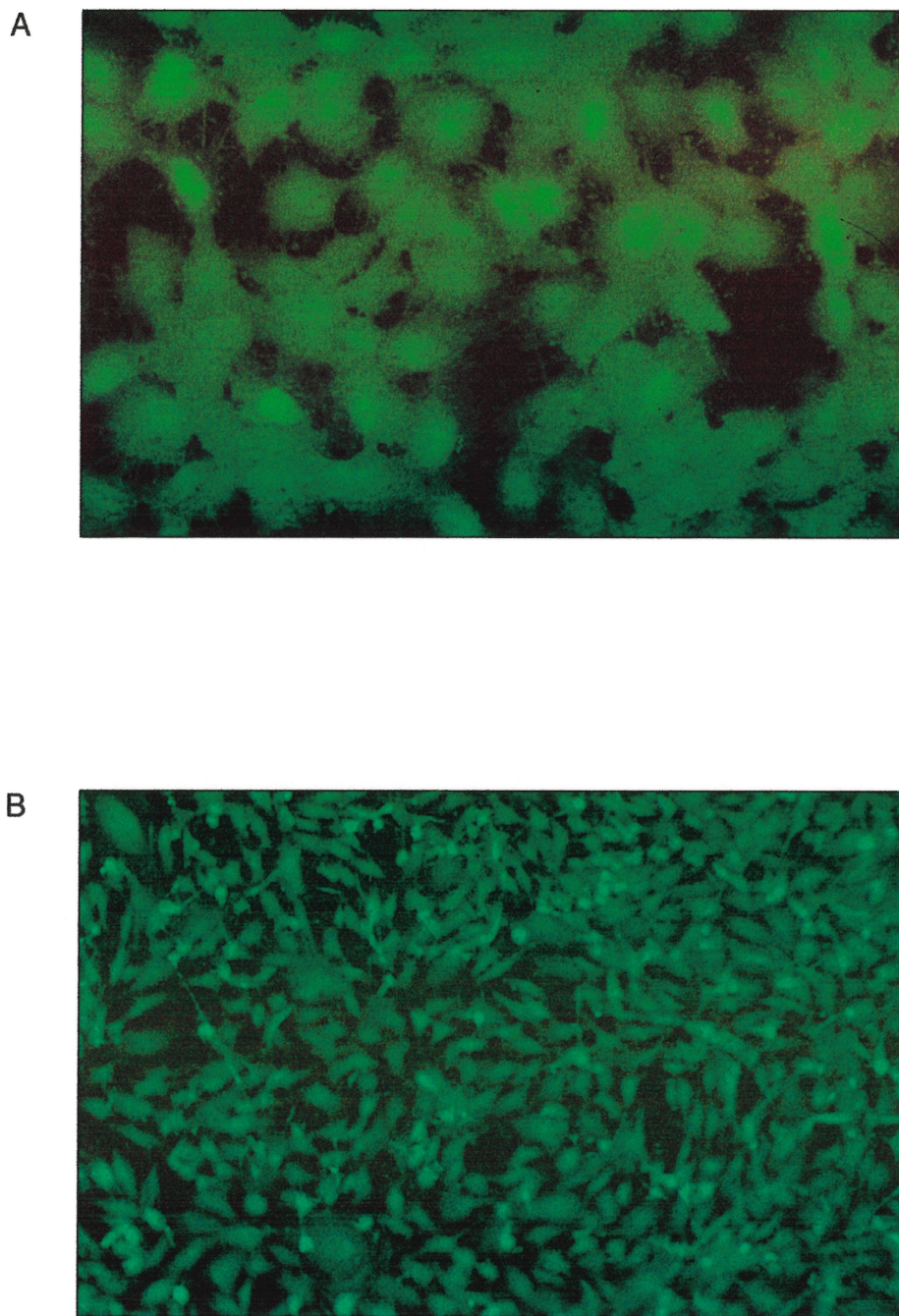


Figure 13: Cellules colorées au BCECF-AM photographiées sur un microscope inversé Olympus. A) Cellules endothéliales cornéennes bovines en culture dans un puits d'une plaque multipuits (grossissement 300X) et B) Kératocytes bovins en culture dans un insert (grossissement 150X).

La solubilisation et le dosage des protéines membranaires

La technique de solubilisation des protéines membranaires des cellules endothéliales cornéennes en culture, des cellules endothéliales cornéennes fraîches et des kératocytes a été réalisée à trois reprises. L'annexe V décrit en détail cette technique. La solubilisation des protéines membranaires a permis de récupérer les protéines membranaires et cytoplasmiques des cellules endothéliales et des kératocytes. Les protéines insolubles proviennent de la fraction « culot » de l'ultracentrifugation. Le surnageant de l'ultracentrifugation est déposé sur un lit de sucrose qui permet de le séparer en 2 fractions (1) fraction « phase supérieure » contenant les protéines hydrophiles et (2) fraction « phase inférieure » contenant les protéines hydrophobes. Au total, 76 échantillons ont été obtenus et le tableau XVI en dresse la liste complète. Les échantillons du deuxième modèle de co-culture (montages avec collagène dans des inserts) ont été en contact avec le collagène bovin de type I. La majorité des échantillons proviennent du troisième modèle de co-culture (montages sans collagène dans les inserts). Pour un même type cellulaire et un même type de condition de culture, plusieurs échantillons ont été obtenus.

Tableau XVI: Liste des 76 échantillons distribués selon le type de protéines et la condition de culture (témoin ou montage).

| Types de protéines* | Condition de culture | | | | |
|---------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------|---------------------------|
| | Cellules endothéliales témoins (ET) | Cellules endothéliales montages (EM) | Cellules endothéliales fraîches (EF) | Kératocytes témoins (KT) | Kératocytes montages (KM) |
| Insolubles | 11† | 13† | 2 | 4 | 4 |
| Hydrophobes | 2 | 2 | 1 | 1 | 2 |
| Hydrophiles | 11† | 13† | 2 | 4 | 4 |

* Les protéines insolubles proviennent du culot de l'ultracentrifugation, les protéines hydrophiles et hydrophobes sont contenues respectivement dans les phases supérieure et inférieure (section 2.5).

† En tout, 6 échantillons (3 échantillons de protéines insolubles et 3 échantillons de protéines hydrophiles) ont été en contact avec du collagène bovin de type I conformément au deuxième modèle de co-culture. Les cellules endothéliales témoins étaient en contact avec un *insert* contenant seulement du collagène tandis que l'*insert* déposé sur les cellules endothéliales des montages contenait des kératocytes dans un gel de collagène. Au total, 3 échantillons de chacune des conditions ont été en contact avec du collagène.

Au total, 68 échantillons ont été dosés selon la méthode de Bradford. Les 8 échantillons de la fraction « phase inférieure » (protéines hydrophobes) n'ont pu être dosés étant donné le très petit volume obtenu à la suite de l'extraction du détergent X-114 à l'aide de *Bio-Beads*. Le fait de déterminer la concentration des échantillons est utile pour l'électrophorèse. Il est important de charger dans les différents puits des volumes contenant à peu près les mêmes concentrations en protéines afin d'obtenir des tracés électrophorétiques réguliers. Environ 44% des échantillons contenant des protéines des kératocytes et 17% des échantillons contenant des protéines des cellules endothéliales avaient une densité optique se situant hors de la linéarité. Pour ces échantillons, il n'est pas possible d'être certain que les concentrations calculées, à partir de l'équation de la droite de régression, étaient valides.

La droite de référence obtenues lors des trois sessions de dosage des protéines avaient des coefficients de corrélation au carré d'au moins 0,99 (figure 10). Les différentes concentrations des échantillons inconnus ont été obtenues en utilisant l'équation de la droite de régression. Une grande variabilité dans les concentrations des différents échantillons est observée ainsi qu'entre les fractions représentant les mêmes conditions de co-culture. C'est ainsi qu'à l'intérieur des fractions « culots » et « phases supérieures » ; des écarts importants en $\mu\text{g/ml}$ en protéines ont été obtenues.

L'électrophorèse

Les différents échantillons ont été chargés dans les nombreux gels selon la journée de l'expérimentation et non selon le type d'échantillons. Ainsi, les échantillons d'une même condition de culture ne se trouvaient pas sur le même gel rendant l'analyse très difficile. Les échantillons d'un même type cellulaire et d'une même condition de culture ont donc été jumelés lors de l'analyse des résultats. Le tableau XVII, qui suit les images des 9 mini-gels (figures 14 à 22), indique les numéros des gels et des puits dans lesquels se trouvent les mêmes échantillons. Le tableau XVIII, situé à la suite des images des gels A, B, et C (figure 23 à 25), indique également les numéros des gels et des puits dans lesquels les mêmes échantillons lyophilisés ont été déposés.

L'analyse des tracés électrophorétiques ont été regroupés en trois grands groupes : protéines insolubles, protéines hydrophiles, et protéines hydrophobes. À l'intérieur de ces groupes, d'autres subdivisions ont été créées afin de faciliter l'analyse. Afin d'éviter toute redondance, les observations relatives à chacun de ces groupes se trouvent uniquement dans le bas des tableaux XIX à XXXII. Les analyses des tracés électrophorétiques des protéines insolubles (fraction « culot ») des cellules endothéliales fraîches ou cultivées en absence ou en présence de kératocytes ont été regroupés et comparés à ceux des cellules endothéliales ayant poussé en présence de collagène (Tableaux XIX à XXII). Les analyses des tracés électrophorétiques des protéines insolubles des kératocytes témoins ont été comparés à ceux des kératocytes cultivés en co-culture avec des cellules endothéliales (Tableaux XXIII et XXIV). Tous ces tracés électrophorétiques ont finalement été comparés avec les échantillons équivalents lyophilisés.

Les mêmes subdivisions ont été faites concernant les analyses des tracés électrophorétiques des protéines hydrophiles (fraction « phase supérieure ») (Tableaux XXV à XXX). Finalement, les tracés électrophorétiques des protéines hydrophobes des cellules endothéliales fraîches ou cultivées en présence ou en absence de k tatocytes ont été comparés entre eux (Tableaux XXXI et XXXII). La section solubilisation et dosage des protéines de la partie matériel et méthodes explique comment les différents échantillons ont été obtenus. Les prochaines pages montrent les différents tableaux d'analyse des tracés électrophorétiques des différents échantillons.

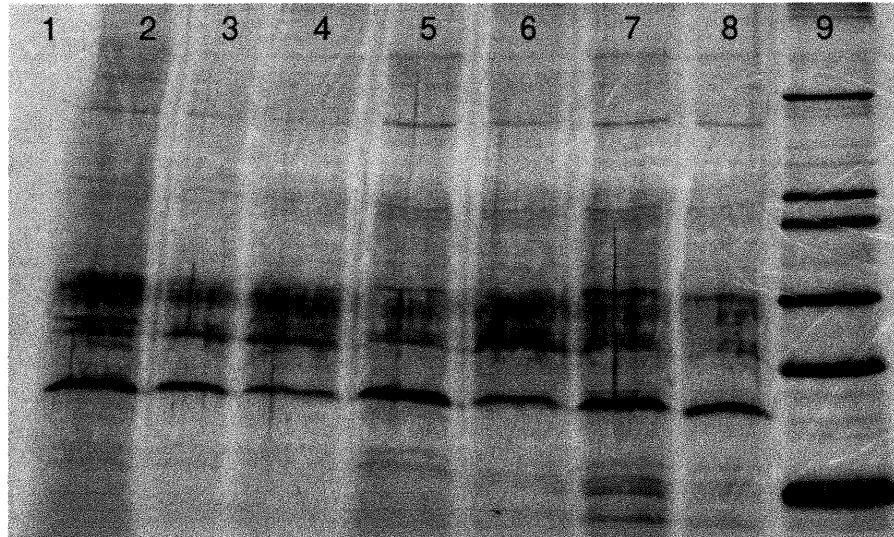


Figure 14: Le gel #1 présente plusieurs échantillons différents des protéines insolubles qui ont été en contact avec du collagène (deuxième modèle de co-culture). Le puits 1 est vide. Les puits 2 à 4 sont les protéines de cellules endothéliales témoins (cET+collagène) tandis que les puits 5 à 7 montrent les protéines des cellules endothéliales cultivées dans des montages en co-culture avec des kératocytes dans un gel de collagène (cEM+collagène). Le puits 8 n'a pas été comptabilisé puisqu'il y a eu une erreur dans la préparation de l'échantillon. Le standard protéique est dans le puits 9.

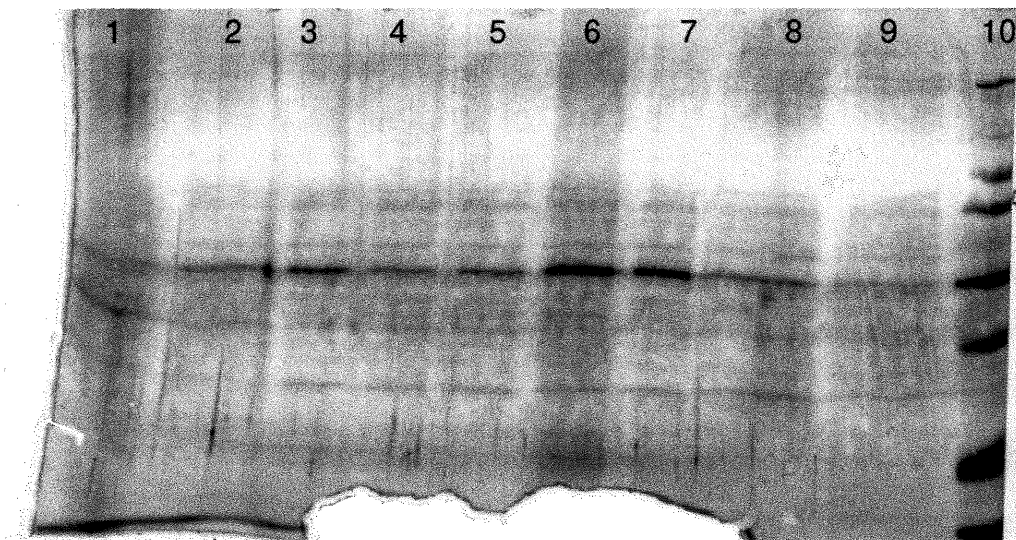


Figure 15: Le gel #2 présente plusieurs échantillons différents. Les puits 1 à 3 montrent les protéines hydrophiles des cellules endothéliales témoins en contact avec un gel de collagène sans kératocytes (sET+collagène) tandis que les puits 4 à 6 montrent les cellules endothéliales ayant poussé dans des montages en co-culture avec des kératocytes dans un gel de collagène (sEM+collagène). Le puits 7 n'a pas été comptabilisé puisqu'il y a eu une erreur dans la préparation de l'échantillon. Les puits 8 et 9 montrent les protéines insolubles de cellules endothéliales témoins (cET). Le standard protéique est dans le puits 10.

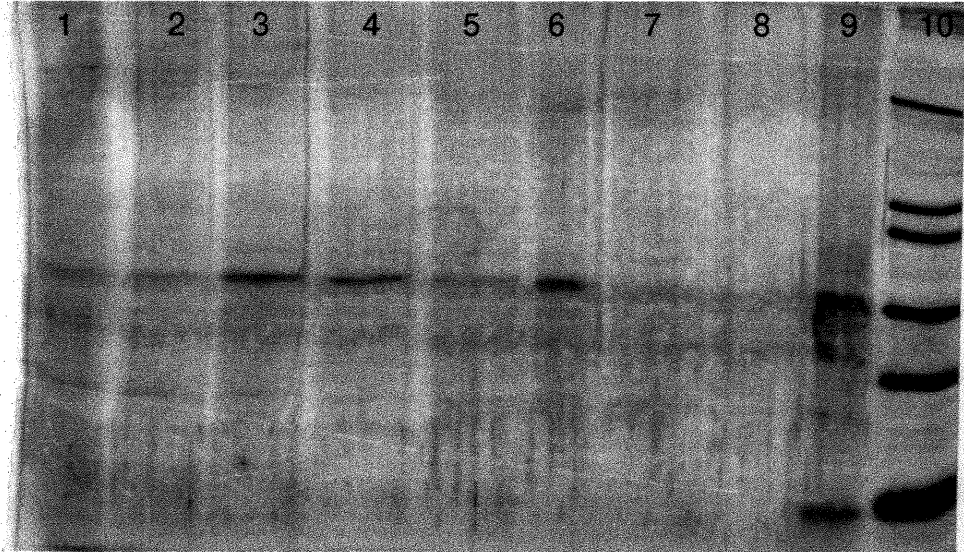


Figure 16: Le gel #3 présente plusieurs échantillons différents. Les puits 1 et 2 montrent les protéines insolubles des cellules endothéliales témoins (cET) tandis que les puits 3 à 6 montrent les protéines des cellules endothéliales cultivées dans des montages en co-culture avec des kératocytes (cEM). Les puits 7 et 8 montrent les protéines insolubles de kératocytes ayant poussé en co-culture avec des cellules endothéliales (cKM). Le puits 9 montre les protéines hydrophobes des cellules endothéliales témoins (iET). Le standard protéique est dans le puits 10.

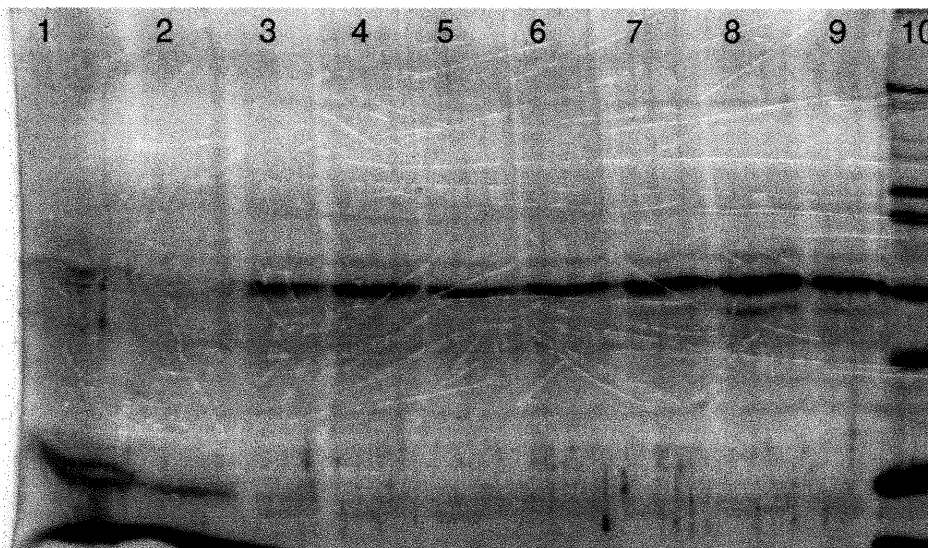


Figure 17: Le gel #4 présente plusieurs échantillons différents. Le puits 1 montre les protéines hydrophobes des cellules endothéliales en co-culture dans des montages (iEM) tandis que le puits 2 montre les protéines des kératocytes ayant poussé en co-culture dans des montages (iKM). Les puits 3 à 6 montrent des protéines hydrophiles de cellules endothéliales témoins (sET) tandis que les puits 7 à 9 montrent des protéines hydrophiles de cellules endothéliales cultivées en co-culture dans des montages (sEM). Le standard protéique est dans le puits 10.

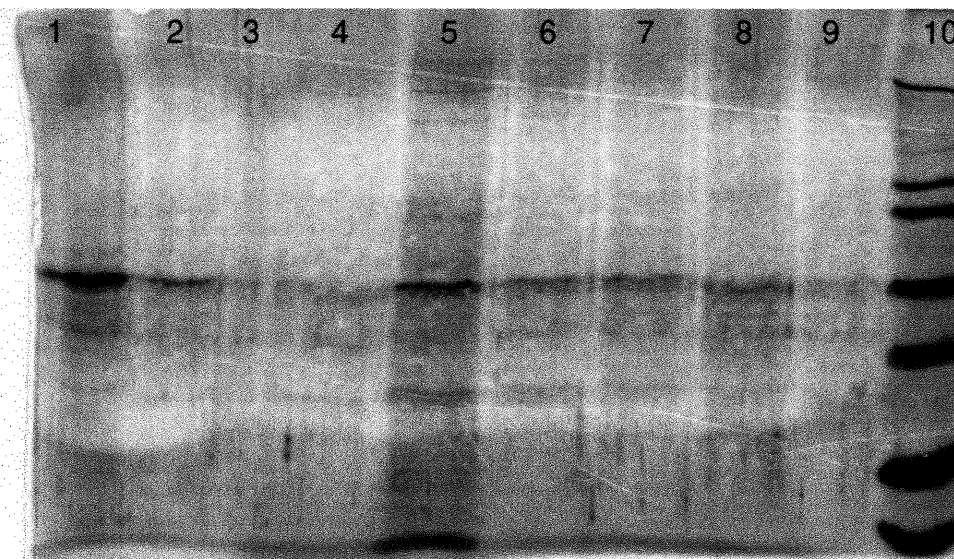


Figure 18: Le gel #5 présente plusieurs échantillons différents. Les puits 1 et 2 montrent les protéines hydrophiles des cellules endothéliales cultivées en co-culture avec des kératocytes (sEM) tandis que les puits 3 et 4 montrent les protéines hydrophiles de kératocytes ayant poussé en co-culture dans des montages (sKM). Les puits 4 à 7 montrent des protéines insolubles de cellules endothéliales témoins (cET). Les puits 8 et 9 montrent des protéines insolubles de kératocytes témoins (cKT). Le standard protéique a été déposé dans le puits 10.

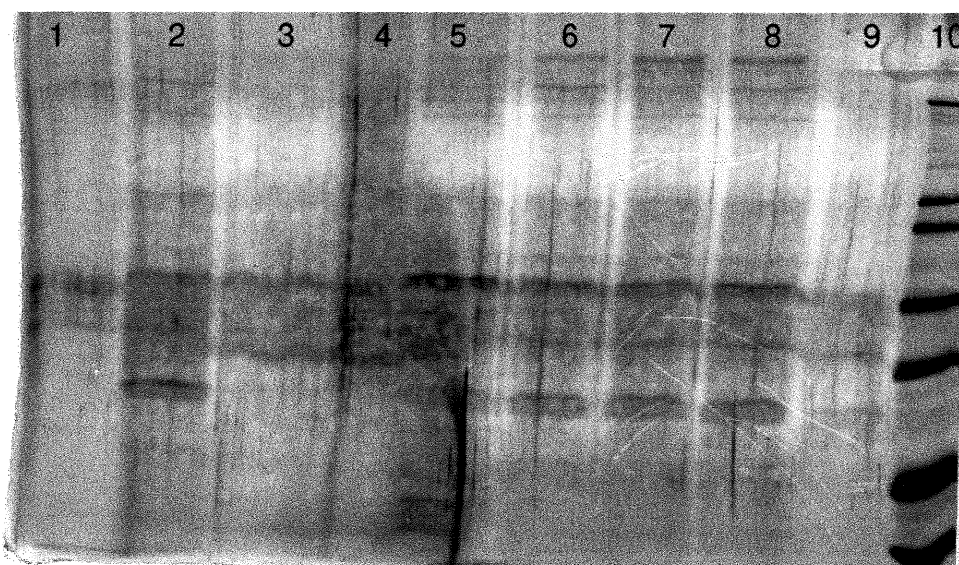


Figure 19: Le gel #6 présente plusieurs échantillons différents. Les puits 1 et 2 montrent les protéines insolubles des kératocytes témoins (cET) tandis que les puits 3 à 8 montrent les protéines insolubles de cellules endothéliales ayant poussé en co-culture avec des kératocytes (cEM). Le puits 9 montre des protéines insolubles de kératocytes cultivés en co-culture dans des montages (cKM). Le standard protéique a été déposé dans le puits 10.

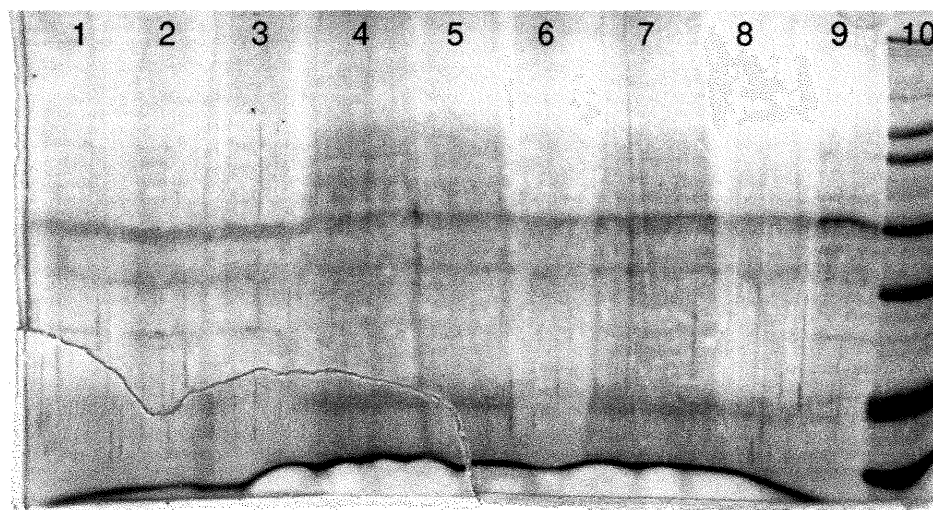


Figure 20: Le gel #7 présente plusieurs échantillons différents. Le puits 1 montre les protéines insolubles des kératocytes ayant poussé en co-culture avec des cellules endothéliales (cKM) tandis que les puits 2 et 3 montrent les protéines insolubles de cellules endothéliales fraîches (cEF). Les puits 4 à 8 montrent tous des protéines hydrophobes ; puits 4 : iET, puits 5 : iKT, puits 6 : iEM, puits 7 : iKM, et puits 8 : iEF. Le puits 9 montre les protéines hydrophiles de cellules endothéliales témoins (sET). Le standard protéique a été déposé dans le puits 10.

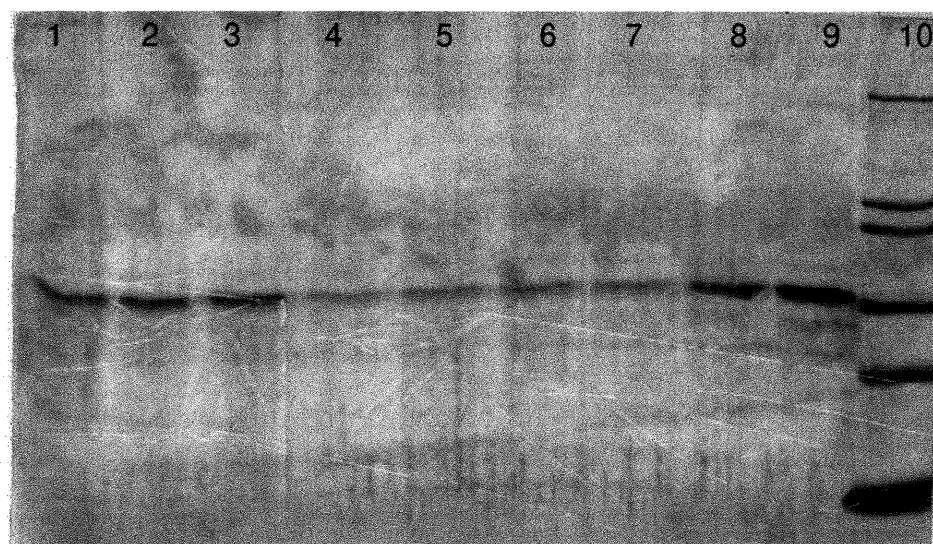


Figure 21: Le gel #8 présente plusieurs échantillons différents. Les puits 1 à 3 montrent les protéines hydrophiles des cellules endothéliales témoins (sET) tandis que les puits 4 à 7 montrent les protéines hydrophiles de kératocytes témoins (sKT). Les puits 8 et 9 sont des protéines hydrophiles de cellules endothéliales cultivées en co-culture (sEM). Le standard protéique a été déposé dans le puits 10.

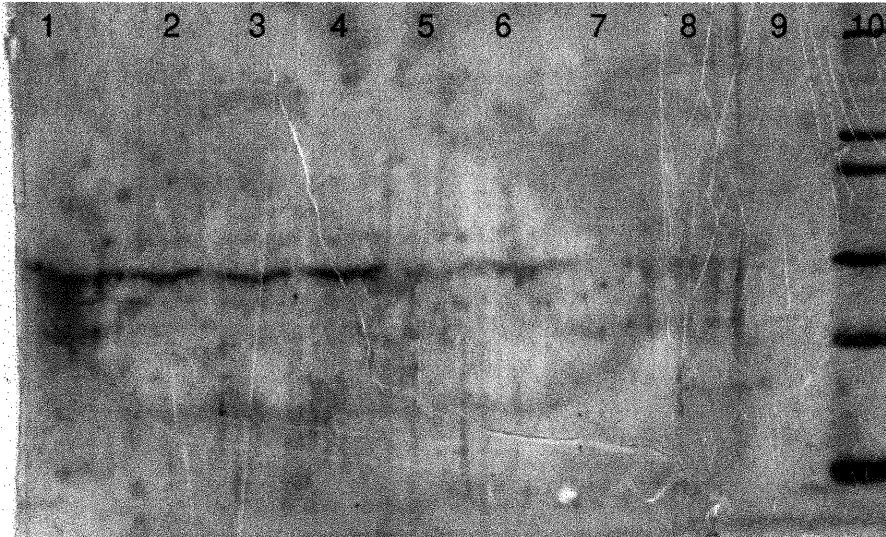


Figure 22: Le gel #9 présente plusieurs échantillons différents. Les puits 1 à 4 montrent les protéines hydrophiles des cellules endothéliales ayant poussé en co-culture avec des kératocytes (sEM) tandis que les puits 5 et 6 montrent les protéines hydrophiles de kératocytes cultivés en co-culture dans des montage (sKM). Les puits 7 et 8 montrent des protéines hydrophiles de cellules endothéliales fraîches (sEF). Le puits 9 est vide et le standard protéique a été déposé dans le puits 10.

Tableau XVII: La distribution des différents échantillons présents dans les 9 mini-gels.

| Type de fraction | Type d'échantillon | | | | | | |
|------------------|------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|----------------------|--------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|----------------------|
| | ET | EM | ET+collagène | EM+collagène | KT | KM | EF |
| Culot | *Gel 2; puits 8-9 *Gel 3; puits 1-2 *Gel 5; puits 4-7 | *Gel 3; puits 3-6 *Gels 6; puits 3-8 | *Gel 1; puits 2-4 | *Gel 1; puits 5-7 | *Gel 5; puits 8-9 *Gel 6; puits 1-2 | *Gel 3; puits 7-8 *Gel 6; puits 9 *Gel 7; puits 1 | *Gel 7; puits 2-3 |
| Phase Supérieure | *Gel 4; Puits 3-6 *Gel 7; Puits 9 *Gel 8; Puits 1-3 | *Gel 4; Puits 7-9 *Gel 5 ; Puits 1 *Gel 8 ; Puits 8-9 *Gel 9 ; Puits 1-4 | *Gel 2; Puits 1-3 | *Gel 2; Puits 4-6 | *Gel 8 ; Puits 4-7 | *Gel 5 ; Puits 2-3 *Gel 9 ; Puits 5-6 | *Gel 9; Puits 7-8 |
| Phase Inférieure | *Gel 3 ; Puits 9 *Gel 7 ; Puits 4 | *Gel 4 ; Puits 1 *Gel 7 ; Puits 6 | | | *Gel 7 ; Puits 5 | *Gel 4; Puits 2 *Gel 7 ; Puits 7 | *Gel 7 ; Puits 8 |

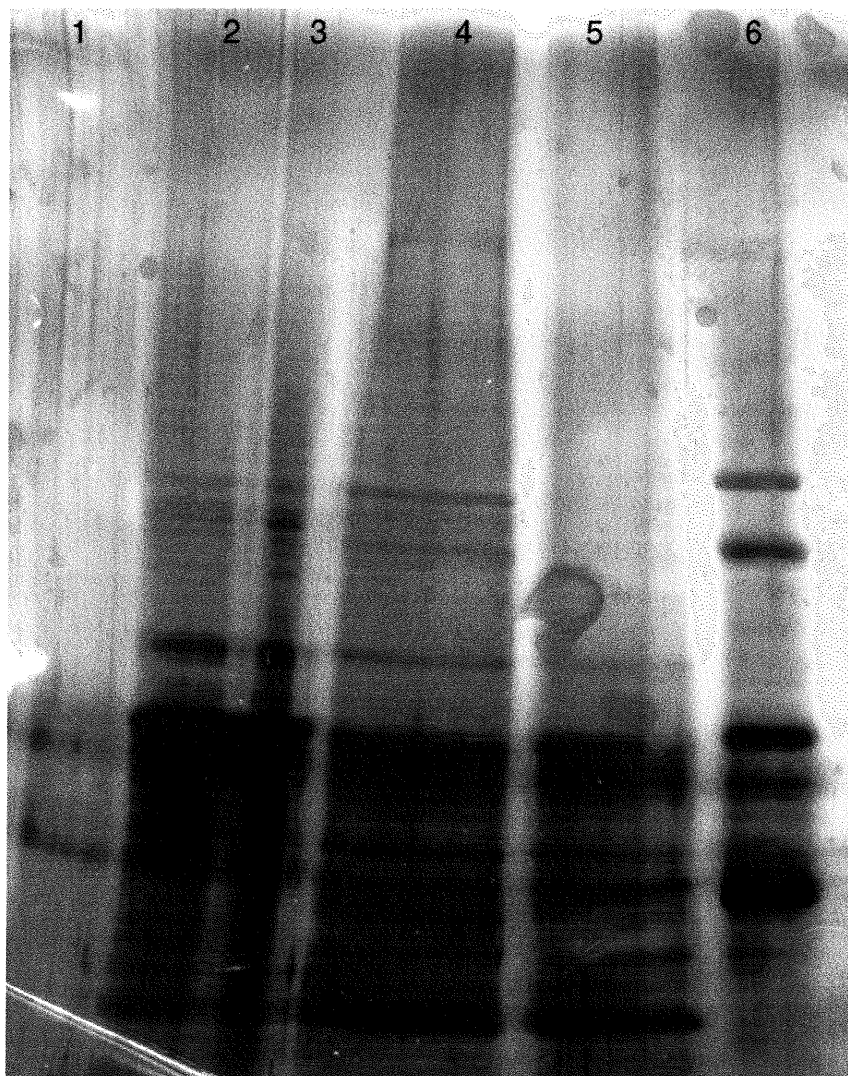


Figure 23: Les échantillons du gel A ont été lyophilisés avant d'être resuspendus dans environ 600 μ l de tampon phosphate sans magnésium ni calcium. Les puits 2 et 3 montrent les protéines hydrophiles de cellules endothéliales témoins (sET) tandis que les puits 4 et 5 montrent les protéines insolubles de cellules endothéliales témoins (cET). Le standard est dans le puits 6.

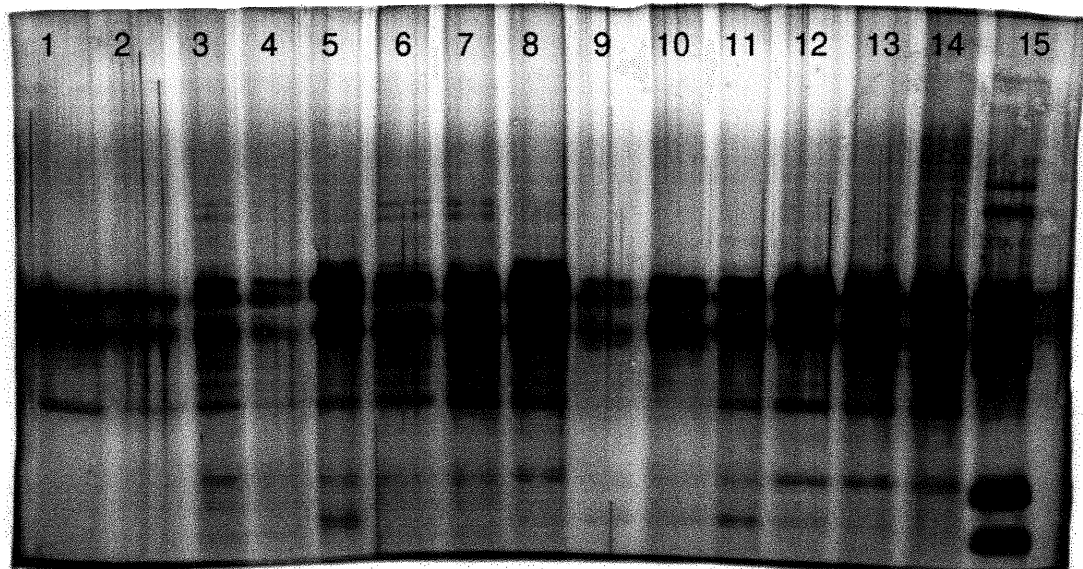


Figure 24: Les échantillons du gel B ont été lyophilisés avant d'être resuspendus dans environ 200 μ l de tampon phosphate sans magnésium ni calcium. Le gel présente plusieurs échantillons différents. Tous les puits contiennent des protéines insolubles ; puits 1 et 2 : cET+collagène, puits 3 et 4 : cEM+collagène, puits 5 et 6 : cEM, puits 7 et 8 : cEF, puits 9 et 10 : cKM, puits 11 et 12 : cKT, puits 13 et 14 : cET. Le standard est dans le puits 15.

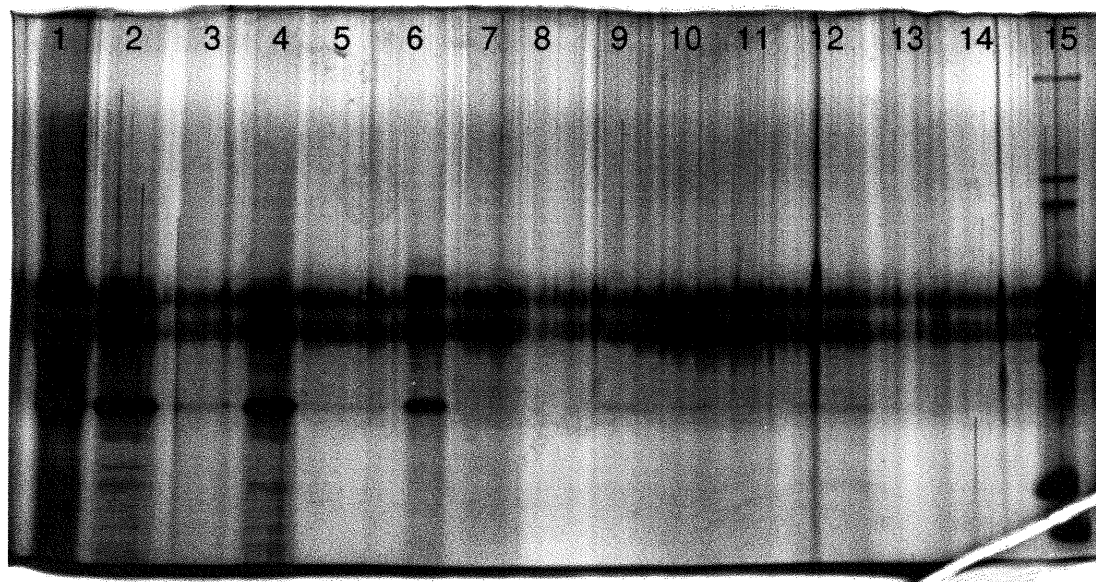


Figure 25: Les échantillons du gel C ont été lyophilisés avant d'être resuspendus dans environ 600 μ l de tampon phosphate sans magnésium ni calcium. Le gel présente plusieurs échantillons différents. Tous les puits contiennent des protéines hydrophiles sauf les 2 premiers puits qui montrent des protéines insolubles; puits 1 et 2 : cEM, puits 3 et 4 : sET+collagène, puits 5 et 6 : sEM+collagène, puits 7 et 8 : sEM, puits 9 et 10 : sEF, puits 11 et 12 : sKM, puits 13 et 14 : sKT. Le standard est dans le puits 15.

Tableau XVIII: La distribution des différents échantillons lyophilisés présents dans les gels A, B, C.

| Type de fraction | Type d'échantillon | | | | | | |
|------------------|------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|
| | ET | EM | ET+collagène | EM+collagène | KT | KM | EF |
| Culot | *Gel A ; Puits 4-5 | *Gel B; Puits 5-6 | *Gel B; Puits 1-2 | *Gel B; Puits 3-4 | *Gel B; Puits 11-12 | *Gel B; Puits 9-10 | *Gel B; Puits 7-8 |
| | *Gel B; Puits 13-14 | *Gel C; Puits 1-2 | | | | | |
| Phase supérieure | *Gel A; Puits 2-3 | *Gel C ; Puits 7-8 | *Gel C ; Puits 3-4 | *Gel C ; Puits 5-6 | *Gel C; Puits 13-14 | *Gel C ; Puits 11-12 | *Gel C ; Puits 9-10 |

Le volume des phases inférieures obtenu sur un gradient de sucrose était limité. Il a été utilisé en entier dans les électrophorèses des 9 mini-gels. Ceci explique l'absence d'échantillons de protéines hydrophobes au niveau des gels A, B, et C.

Les protéines insolubles

Les cellules endothéliales cornéennes bovines en absence de collagène

Tableau XIX: Bandes des protéines insolubles (gels 1 à 9) des cellules endothéliales cornéennes bovines fraîches (cEF) ou cultivées en absence (cET) ou en présence (cEM) de kératocytes.

| Numéro de bande | cET Endothéliales témoins | cEM Endothéliales montages | cEF Endothéliales fraîches |
|------------------------|---------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| 1 | 221 (2) | | |
| 2 | 202 (6) | | |
| 3 | 187 (4) | | |
| 4 | 178 (4) | 179 (4) | |
| 5 | 170 (2) | | |
| 6 | 163 (2) | 160 (4) | |
| 7 | 157 (2) | | |
| 8 | | 143 (4) | |
| 9 | 124 (2) | | |
| 10 | | | |
| 11 | 109 (4) | | |
| 12 | 105 (1) | 106 (4) | |
| 13 | 100 (2) | | |
| 14 | 93 (4) | 94 (4) | |
| 15 | 84 (4) | 86 (8) | |
| 16 | 77 (6) | 78 (6) | 75 (2) |
| 17 | 67 (2) | 68 (4) | |
| 18 | 63 (4) | 63 (6) | |
| 19 | 60 (2) | 58 (2) | 61 (2) |
| 20 | 53 (4) | 51 (8) | |
| 21 | 49 (6) | | 49 (2) |
| 22 | | 37 (1) | |
| 23 | | 34 (1) | |
| Nombre de puits totaux | 8 | 10 | 2 |

-Le chiffre entre parenthèses indique le nombre de puits dans lequel la bande a été observée

-La trame de fond désigne des bandes communes entre les différentes conditions de culture.

✱ Il y a 4 zones de bandes communes entre les cET et les cEM : trois petites (autour de 178 kDa, 160 kDa et 106 kDa) et une large (entre 93 et 49 kDa).

✱ Six bandes sont présentes chez les cET mais absentes des cEM. Le poids moléculaire de ces bandes sont les suivants : 221, 202, 187, 170, 124 et 100 kDa. À l'inverse, une bande de 143 kDa est présente chez les cEM mais est absente des cET.

✱ Les trois bandes obtenues avec les cEF peuvent être jumelées à la large zone de bandes communes qu'il y a entre les cET et les cEM.

Tableau XX: Bandes des protéines insolubles (échantillons lyophilisés : gels A et B) des cellules endothéliales cornéennes bovines fraîches (cEF) ou cultivées en absence (cET) ou en présence (cEM) de kératocytes

| Numéro de bandes | cET Endothéliales témoins | cEM Endothéliales montages | cEF Endothéliales fraîches |
|-------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 1 | 119 (1) | | |
| 2 | 112 (1) | | |
| 3 | 107 (1) | 106 (2) | 106 (2) |
| 4 | | 100 (2) | 100 (2) |
| 5 | 89 (1) | | |
| 6 | 84 (1) | | |
| 7 | | 82 (1) | 82 (1) |
| 8 | 77 (2) | 77 (2) | 77 (2) |
| 9 | 74 (4) | 72 (4) | 73 (2) |
| 10 | 68 (1) | | |
| 11 | 63 (3) | 63 (4) | 63 (2) |
| 12 | 59 (2) | | |
| 13 | 56 (2) | 55 (1) | 55 (1) |
| 14 | 50 (2) | | |
| 15 | 48 (2) | 48 (4) | 48 (2) |
| 16 | 45 (2) | | |
| 17 | | 38 (1) | |
| 18 | 36 (3) | 36 (4) | 36 (2) |
| 19 | 30 (1) | 31 (2) | |
| Nombre de puits totaux | 4 | 4 | 2 |

-Le chiffre entre parenthèses indique le nombre de puits dans lequel la bande a été observée

-La trame de fond désigne des bandes communes entre les différentes conditions de culture.

✱ Il y a 4 zones de bandes communes entre les trois types cellulaires. Une petite (autour de 106 kDa) et trois moyennes (entre 84 et 72 kDa, entre 63 et 48 kDa et entre 38 et 30 kDa).

✱ Cinq bandes (119, 112, 89, 68, 35, et 45 kDa) sont présentes chez les (cET) mais absentes des (cEM) et des cellules endothéliales fraîches (cEF).

✱ À l'inverse, une bande de 100 kDa est présente chez les cEM et les cEF mais est absente des cellules endothéliales témoins (cET).

Les cellules cornéennes bovines en présence de collagène

Tableau XXI: Bandes des protéines insolubles (gels 1 à 9) des cellules endothéliales cornéennes bovines cultivées en absence (cET) ou en présence (cEM) de kératocytes ainsi qu'en absence ou en présence de collagène (cET+collagène et cEM+collagène).

| Numéro de bandes | cET+collagène | cEM+collagène | cET | cEM |
|------------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|
| | Endothéliales témoins | Endothéliales montages | Endothéliales témoins | Endothéliales montages |
| 1 | * | | 221 (2) | |
| 2 | 206 (3) | 206 (3) | 202 (6) | * |
| 3 | * | | 187 (4) | |
| 4 | 181 (3) | 183 (3) | 178 (4) | 179 (4) |
| 5 | * | | 170 (2) | |
| 6 | | | 163 (2) | 160 (4) |
| 7 | 159 (3) | 159 (3) | 157 (2) | |
| 8 | | * | | 143 (4) |
| 9 | * | | 124 (2) | |
| 10 | 115 (3) | | * | |
| 11 | 109 (3) | 111 (3) | 109 (4) | |
| 12 | | 106 (3) | 105 (1) | 106 (4) |
| 13 | * | | 100 (2) | |
| 14 | 90 (3) | | 93 (4) | 94 (4) |
| 15 | | 87 (3) | 84 (4) | 86 (8) |
| 16 | 74 (3) | 80 (3) | 77 (6) | 78 (6) |
| 17 | 67 (1) | | 67 (2) | 68 (4) |
| 18 | 65 (3) | 63 (3) | 63 (4) | 63 (6) |
| 19 | | | 60 (2) | 58 (2) |
| 20 | 51 (3) | 51 (3) | 53 (4) | 51 (8) |
| 21 | | | 49 (6) | |
| 22 | 39 (1) | 40 (1) | | |
| 23 | 37 (1) | 38 (2) | | 37 (1) |
| 24 | | 35 (1) | | 34 (1) |
| 25 | | 31 (1) | | |
| Nombre de puits totaux | 3 | 3 | 8 | 10 |

-Le chiffre entre parenthèses indique le nombre de puits dans lequel la bande a été observée

-La trame de fond désigne des bandes communes entre les différentes conditions de culture.

-L'astérisque indique qu'une bande est absente de la même condition de culture avec ou sans collagène.

✱ Il y a 4 zones de bandes communes entre les cET+collagène et les cEM+collagène : trois petites (autour de 181 kDa, 160 kDa et 109 kDa) et une large (entre 90 et 51 kDa). Une bande de 115 kDa est présente avec les cET+collagène et absente des cEM+collagène. À l'inverse, une bande de 106 kDa se trouve uniquement dans le tracé électrophorétique des cEM+collagène.

✱ Il y a 5 bandes (221, 187, 170, 124 et 100 kDa) présentes avec les cET mais absentes chez les cET+collagène. À l'inverse, une bande de 115 kDa est présente chez les cET+collagène mais est absente des cET. Une bande de 143 kDa se retrouve avec les cEM mais est absente des cEM+collagène. À l'inverse, une bande de 206 kDa, présente chez les cEM+collagène, est absente des cEM.

Tableau XXII: Bandes de protéines insolubles (échantillons lyophilisés : gels A et B) des cellules endothéliales cornéennes bovines cultivées en absence (cET) ou en présence (cEM) de kératocytes ainsi qu'en absence ou en présence de collagène (cET+collagène et cEM+collagène).

| Numéro de bandes | cET+collagène Endothéliales témoins | cEM+collagène Endothéliales montages | cET Endothéliales témoins | cEM Endothéliales montages |
|-------------------------|----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|------------------------------------------|-------------------------------------------|
| 1 | * | | 119 (1) | |
| 2 | * | | 112 (1) | |
| 3 | * | 106 (2) | 107 (1) | 106 (2) |
| 4 | | 100 (2) | | 100 (2) |
| 5 | * | | 89 (1) | |
| 6 | * | | 84 (1) | |
| 7 | | 81 (2) | | 82 (1) |
| 8 | * | * | 77 (2) | 77 (2) |
| 9 | 73 (2) | 73 (2) | 74 (4) | 72 (4) |
| 10 | * | | 68 (1) | |
| 11 | 63 (2) | 63 (2) | 63 (3) | 63 (4) |
| 12 | * | | 59 (2) | |
| 13 | * | 55 (1) | 56 (2) | 55 (1) |
| 14 | * | 52 (2) | 50 (2) | * |
| 15 | 48 (2) | 48 (2) | 48 (2) | 48 (4) |
| 16 | * | | 45 (2) | |
| 17 | | * | | 38 (1) |
| 18 | * | 36 (2) | 36 (3) | 36 (4) |
| 19 | * | * | 30 (1) | 31 (2) |
| Nombre de puits totaux | 2 | 2 | 4 | 4 |

-Le chiffre entre parenthèses indique le nombre de puits dans lequel la bande a été observée

-La trame de fond désigne des bandes communes entre les différentes conditions de culture.

-L'astérisque indique qu'une bande est absente de la même condition de culture avec ou sans collagène.

✱ Il y a 3 petites zones de bandes communes entre les cET+collagène et les cEM+collagène. Une à 73, 63 et 48 kDa.

✱ Six bandes (106, 100, 81, 55, 52 et 36 kDa) sont présentes chez les cellules endothéliales des montages avec collagène (cEM+collagène) mais sont absentes des cellules endothéliales témoins avec collagène (cET+collagène).

✱ Presque la totalité des bandes présentes chez les cET sont absentes des cET+collagène.

✱ Les cEM+collagène ont une bande de 52 kDa qui est absente des cEM. À l'inverse, les cEM ont des bandes de 77, 38 et 31 kDa qui sont absentes chez les cEM+collagène.

Les kératocytes bovins

Tableau XXIII: Bandes de protéines insolubles (gels 1 à 9) des kératocytes bovins cultivés en absence (cKT) ou en présence (cKM) de cellules endothéliales cornéennes.

| Numéro de Bandes | cKT | cKM |
|------------------------|---------------------|----------------------|
| | Kératocytes témoins | Kératocytes montages |
| 1 | 160 (2) | |
| 2 | 143 (1) | |
| 3 | 106 (1) | 106 (1) |
| 4 | | 94 (1) |
| 5 | | 87 (2) |
| 6 | 78 (4) | 77 (2) |
| 7 | | 67 (2) |
| 8 | 64 (4) | |
| 9 | 58 (1) | 61 (2) |
| 10 | | 53 (2) |
| 11 | 49 (3) | 49 (2) |
| Nombre de puits totaux | 4 | 4 |

-Le chiffre entre parenthèses indique le nombre de puits dans lequel la bande a été observée

-La trame de fond désigne des bandes communes entre les différentes conditions de culture.

✱ Il y a 2 zones de bandes communes entre les kératocytes témoins (cKT) et les kératocytes cultivés en co-culture dans des montages (cEM). Une petite zone à 106 kDa et une plus large entre 78 et 49 kDa. Deux bandes, une de 160 kDa et une autre de 143 kDa sont présentes avec les cKT mais sont absentes des cKM. À l'inverse, deux bandes, une de 94 kDa et une autre de 87 kDa, sont présentes uniquement dans le tracé électrophorétique des cKM.

Tableau XXIV: Bandes de protéines insolubles (échantillons lyophilisés : gel B) des kératocytes bovins cultivés en absence (cKT) ou en présence (cKM) de cellules endothéliales cornéennes.

| Numéro de bandes | cKT | cKM |
|------------------------|---------------------|----------------------|
| | Kératocytes témoins | Kératocytes montages |
| 1 | 77 (2) | 77 (2) |
| 2 | 73 (2) | 73 (2) |
| 3 | 63 (2) | 63 (2) |
| 4 | 48 (2) | |
| 5 | 36 (2) | |
| 6 | 30 (2) | |
| Nombre de puits totaux | 2 | 2 |

-Le chiffre entre parenthèses indique le nombre de puits dans lequel la bande a été observée

-La trame de fond désigne des bandes communes entre les différentes conditions de culture.

✱ Il y a une zone de bandes communes (entre 63 et 77 kDa) entre les kératocytes témoins (cKT) et les kératocytes cultivés en co-culture avec des cellules endothéliales (cKM). Trois bandes sont présentes chez les cKT mais sont absentes des cKM. Ces bandes ont les poids moléculaires suivants : 48, 36 et 30 kDa.

Les protéines hydrophiles

Les cellules endothéliales cornéennes bovines en absence de collagène

Tableau XXV: Bandes de protéines hydrophiles (gels 1 à 9) des cellules endothéliales cornéennes bovines fraîches (sEF) ou cultivées en absence (sET) ou en présence (sEM) de kératocytes.

| Numéro De bandes | sET | sEM | sEF |
|------------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|
| | Endothéliales témoins | Endothéliales montages | Endothéliales fraîches |
| 1 | | 173 (2) | |
| 2 | 167 (4) | 165 (3) | |
| 3 | 113 (4) | | |
| 4 | 109 (4) | 109 (3) | |
| 5 | 101 (1) | | |
| 6 | 88 (5) | 90 (9) | |
| 7 | 80 (8) | 81 (6) | |
| 8 | | 76 (4) | 76 (1) |
| 9 | 69 (1) | 71 (7) | |
| 10 | 63 (8) | 64 (7) | |
| 11 | | 56 (1) | |
| 12 | 49 (8) | 50 (5) | |
| 13 | 36 (1) | 36 (1) | |
| 14 | 32 (4) | 32 (3) | |
| Nombre de puits totaux | 8 | 10 | 2 |

-Le chiffre entre parenthèses indique le nombre de puits dans lequel la bande a été observée

-La trame de fond désigne des bandes communes entre les différentes conditions de culture.

✱ Il y a 4 zones de bandes communes entre les cellules endothéliales témoins (sET) et les cellules endothéliales cultivées en co-culture avec des kératocytes (sEM). Deux petites zones se situant autour de 166 kDa et 109 kDa. Une zone moyenne englobe les poids moléculaires entre 90 et 80 kDa tandis que la zone la plus large s'étend de 69 à 32 kDa.

✱ Deux bandes, une de 113 kDa et une autre de 101 kDa sont présentes avec les sET mais sont absentes des sEM. À l'inverse, 2 bandes (173 et 76 kDa) sont présentes uniquement chez les sEM.

✱ Une seule bande de 76 kDa a été observée avec les cellules endothéliales fraîches (sEF). Cette bande ne peut être jumelée à aucune zone de bandes communes. Par contre, elle est présente avec les sEM.

Tableau XXVI: Bandes de protéines hydrophiles (échantillons lyophilisés : gels A et C) des cellules endothéliales cornéennes bovines fraîches (sEF) ou cultivées en absence (sET) ou en présence (sEM) de kératocytes.

| Numéro de bandes | sET | sEM | sEF |
|------------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|
| | Endothéliales témoins | Endothéliales montages | Endothéliales fraîches |
| 1 | 135 (1) | | |
| 2 | 125 (1) | | |
| 3 | 119 (1) | | |
| 4 | 112 (1) | | |
| 5 | 101 (2) | | |
| 6 | 89 (2) | | |
| 7 | 82 (2) | | |
| 8 | 78 (2) | | |
| 9 | | 72 (2) | 72 (2) |
| 10 | 63 (2) | 63 (2) | 63 (2) |
| 11 | 46 (2) | | 47 (2) |
| 12 | 40 (2) | | |
| 13 | 36 (2) | | |
| Nombre de puits totaux | 2 | 2 | 2 |

-Le chiffre entre parenthèses indique le nombre de puits dans lequel la bande a été observée

-La trame de fond désigne des bandes communes entre les différentes conditions de culture.

✱ La répartition des bandes des protéines hydrophiles des cellules endothéliales ayant poussé en co-culture dans des montages (sEM) et des cellules endothéliales fraîches (sEF) est très peu révélatrice comparativement au tracé électrophorétique des cellules endothéliales témoins (sET). Il y a une seule zone de similitude entre les 3 types cellulaires soit une bande de 63 kDa.

✱ Une bande de 72 kDa est présente à la fois chez les sEM et les sEF mais elle est absente des sET. Une bande de 47 kDa est présente chez les cellules endothéliales fraîches (sEF) et les sET.

Les cellules cornéennes bovines en présence de collagène

Tableau XXVII: Bandes de protéines hydrophiles (gels 1 à 9) des cellules endothéliales cornéennes bovines cultivées en absence (sET) ou en présence (sEM) de kératocytes ainsi qu'en présence ou en absence de collagène (sET+collagène et sEM+collagène).

| Numéro de bandes | sET-collagène Endothéliales Témoins | sEM-collagène Endothéliales montages | sET Endothéliales témoins | sEM Endothéliales montages |
|------------------------|-------------------------------------------|--------------------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| 1 | | * | | 173 (2) |
| 2 | * | * | 167 (4) | 165 (3) |
| 3 | * | | 113 (4) | |
| 4 | * | 110 (3) | 109 (4) | 109 (3) |
| 5 | * | 103 (3) | 101 (1) | * |
| 6 | 97 (2) | 97 (3) | * | * |
| 7 | 87 (2) | 87 (3) | 88 (5) | 90 (9) |
| 8 | 80 (3) | 80 (3) | 80 (8) | 81 (6) |
| 9 | | * | | 76 (4) |
| 10 | * | * | 69 (1) | 71 (7) |
| 11 | 65 (3) | 62 (3) | 63 (8) | 64 (7) |
| 12 | | | | 56 (1) |
| 13 | 51 (3) | 50 (3) | 49 (8) | 50 (5) |
| 14 | 39 (2) | 38 (3) | 36 (1) | 36 (1) |
| 15 | * | * | 32 (4) | 32 (3) |
| Nombre de puits totaux | 3 | 3 | 8 | 10 |

-Le chiffre entre parenthèses indique le nombre de puits dans lequel la bande a été observée

-La trame de fond désigne des bandes communes entre les différentes conditions de culture.

-L'astérisque indique qu'une bande est absente de la même condition de culture avec ou sans collagène.

✱ Il y a deux zones de bandes communes entre les sET+collagène et les sEM+collagène. La première zone se situe entre 87 et 80 kDa tandis que la deuxième englobe les poids moléculaires entre 62 et 38 kDa.

✱ Deux bandes (110 et 103 kDa) sont présentes avec les sEM+collagène mais absentes des sET+collagène.

✱ Il y a 6 bandes présentes chez les sET mais absentes chez les sET+collagène. Les poids moléculaires de ces bandes sont : 167, 113, 109, 101, 69 et 32 kDa. À l'inverse, une seule bande de 97 kDa se trouve uniquement avec les sET+collagène.

✱ Il y a 5 bandes présentes chez les sEM mais absentes avec les sEM+collagène. Les poids moléculaires de ces bandes sont : 173, 165, 76, 71 et 32 kDa. De plus, deux bandes, une de 103 kDa et une autre de 97 kDa, sont présentes uniquement avec les cellules sEM+collagène.

Tableau XXVIII: Bandes de protéines hydrophiles (échantillons lyophilisés : gels A et C) des cellules endothéliales cornéennes bovines cultivées en absence (sET) ou en présence (sEM) de kératocytes ainsi qu'en présence ou en absence de collagène (sET+collagène et sEM+collagène).

| Numéro de bandes | sET+collagène Endothéliales Témoins | sEM+collagène Endothéliales montages | sET Endothéliales témoins | sEM Endothéliales montages |
|------------------------|-------------------------------------------|--------------------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| 1 | * | | 135 (1) | |
| 2 | * | | 125 (1) | |
| 3 | * | | 119 (1) | |
| 4 | * | | 112 (1) | |
| 5 | * | | 101 (2) | |
| 6 | * | | 89 (2) | |
| 7 | * | | 82 (2) | |
| 8 | * | | 78 (2) | |
| 9 | 72 (2) | 72 (2) | | 72 (2) |
| 10 | 63 (2) | 63 (2) | 63 (2) | 63 (2) |
| 11 | 47 (2) | 47 (1) | 46 (2) | |
| 12 | * | | 40 (2) | |
| 13 | * | | 36 (2) | |
| Nombre de puits totaux | 2 | 2 | 2 | 2 |

-Le chiffre entre parenthèses indique le nombre de puits dans lequel la bande a été observée

-La trame de fond désigne des bandes communes entre les différentes conditions de culture.

-L'astérisque indique qu'une bande est absente de la même condition de culture avec ou sans collagène.

✖ Il y a une zone de bandes communes entre les sET+collagène et les sEM+collagène. Cette zone inclus les poids moléculaires entre 72 et 47 kDa.

✖ Deux bandes, une de 76 et une autre de 47 kDa, sont présentes chez les sEM+collagène et absentes des sEM.

Les kératocytes bovins

Tableau XXIX: Bandes de protéines hydrophiles (gels 1 à 9) des kératocytes bovins cultivés en absence (sKT) ou en présence (sKM) de cellules endothéliales cornéennes.

| Numéro de Bandes | sKT | sKM |
|------------------------|---------------------|----------------------|
| | Kératocytes témoins | Kératocytes montages |
| 1 | 200 (4) | |
| 2 | 179 (4) | |
| 3 | 91 (2) | |
| 4 | 80 (4) | 83 (2) |
| 5 | | 76 (2) |
| 6 | 64 (4) | 65 (2) |
| 7 | 50 (4) | 51 (2) |
| 8 | 38 (4) | |
| Nombre de puits totaux | 4 | 4 |

-Le chiffre entre parenthèses indique le nombre de puits dans lequel la bande a été observée

-La trame de fond désigne des bandes communes entre les différentes conditions de culture.

✱ Il y a deux zones de bandes communes entre les kératocytes témoins (sKT) et les kératocytes cultivés en co-culture (sEM). Une petite zone autour de 80-83 kDa et une zone plus large entre 65 et 50 kDa.

✱ Quatre bandes sont présentes avec les sKT mais sont absentes des sKM. Les poids moléculaires de ces bandes sont : 200, 179, 91 et 38 kDa. À l'inverse, une bande de 76 kDa est présente uniquement dans le tracé électrophorétique des sKM.

Tableau XXX: Bandes de protéines hydrophiles (échantillons lyophilisés : gel C) des kératocytes bovins cultivés en absence (sKT) ou en présence (sKM) de cellules endothéliales cornéennes.

| Numéro de Bandes | sKT | sKM |
|------------------------|---------------------|----------------------|
| | Kératocytes témoins | Kératocytes montages |
| 1 | 72 (2) | 72 (2) |
| 2 | 63 (2) | 63 (2) |
| 3 | | 47 (1) |
| Nombre de puits totaux | 2 | 2 |

-Le chiffre entre parenthèses indique le nombre de puits dans lequel la bande a été observée

-La trame de fond désigne des bandes communes entre les différentes conditions de culture.

✱ Il y a une zone de bandes communes (entre 73 et 63 kDa) entre les kératocytes témoins et ceux qui ont été cultivés en co-culture avec des cellules endothéliales.

✱ Une bande de 47 kDa est présente chez les sKM mais est absente des (sKT).

Les protéines hydrophobes

Les cellules endothéliales cornéennes bovines en absence de collagène

Tableau XXXI: Bandes de protéines hydrophobes (gels 1 à 9) des cellules endothéliales cornéennes bovines fraîches (iEF) ou cultivées en absence (iET) ou en présence (iEM) de kératocytes.

| Numéro de bandes | iET | iEM | iEF |
|------------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|
| | Endothéliales témoins | Endothéliales montages | Endothéliales fraîches |
| 1 | 101 (1) | | |
| 2 | 90 (1) | | |
| 3 | | 85 (1) | |
| 4 | 79 (2) | 78 (1) | 78 (1) |
| 5 | 64 (2) | 66 (2) | 63 (1) |
| 6 | 52 (2) | 51 (2) | |
| 7 | | 39 (1) | |
| 8 | 35 (2) | 36 (2) | 35 (1) |
| Nombre de puits totaux | 2 | 2 | 1 |

-Le chiffre entre parenthèses indique le nombre de puits dans lequel la bande a été observée

-La trame de fond désigne des bandes communes entre les différentes conditions de culture.

✱ Il y a deux zones (une large et une petite) de bandes communes entre les iET et les iEM. Une première zone inclut les poids moléculaires se situant entre 78 et 51 kDa tandis que la deuxième montre une bande commune de 35 kDa.

✱ Il y a deux bandes, une de 101 kDa et une autre de 90 kDa, qui sont présentes uniquement avec les iET. Ces bandes sont absentes des cellules endothéliales en co-culture avec des kératocytes (iEM).

✱ Il y a très peu de bandes pour les cellules endothéliales fraîches (iEF). Les trois bandes appartiennent aux 2 zones de bandes communes.

Les kératocytes bovins

Tableau XXXII: Bandes des protéines hydrophobes (gels 1 à 9) des kératocytes bovins cultivés en absence (iKT) ou en présence (iKM) de cellules endothéliales cornéennes.

| Numéro de Bandes | iKT Kératocytes témoins | iKM Kératocytes montages |
|------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| 1 | | 92 (1) |
| 2 | | 85 (1) |
| 3 | 78 (1) | 80 (2) |
| 4 | 63 (1) | 63 (2) |
| 5 | | 49 (1) |
| 6 | 45 (1) | |
| 7 | | 35 (2) |
| Nombre de puits totaux | | |

-Le chiffre entre parenthèses indique le nombre de puits dans lequel la bande a été observée

-La trame de fond désigne des bandes communes entre les différentes conditions de culture.

✱ Il y a deux zones de bandes communes entre les kératocytes témoins (iKT) et les kératocytes cultivés en co-culture (iEM). Une petite zone autour de 80-83 kDa et une zone plus large entre 65 et 50 kDa.

✱ Quatre bandes sont présentes avec les iKT mais sont absentes des iKM. Les poids moléculaires de ces bandes sont : 200, 179, 91 et 38 kDa. À l'inverse, une bande de 76 kDa est présente uniquement dans le tracé électrophorétique des iKM.

La densitométrie

Deux bandes du gel B (échantillons lyophilisés) ont été numérisées et analysées, selon l'intensité des bandes produites, par dans un système d'analyse d'image. Une fois l'image du gel à l'écran, le curseur a été positionné sur un des 15 puits afin de délimiter la section à analyser. La boîte permettant de délimiter la zone avait une largeur de 42 par 1 pixels. Le système Eclipse analyse la densité, pixels par pixels et compile les données dans le programme Excel de Microsoft. Plus l'intensité d'un pixel est élevée, plus la valeur associée se rapproche de 255 (0 = blanc). Il est possible d'obtenir le graphique niveau de gris en fonction de la position du pixel. Deux graphiques ont été obtenus à la suite de l'utilisation de ce logiciel. Le graphique du puits #15 où le standard protéique a été déposé (figure 26) et celui du puits #14 où les protéines insolubles des cellules endothéliales témoins ont été déposées (figure 27). Ces graphiques seraient utiles afin de calculer les concentrations relatives des différentes bandes.

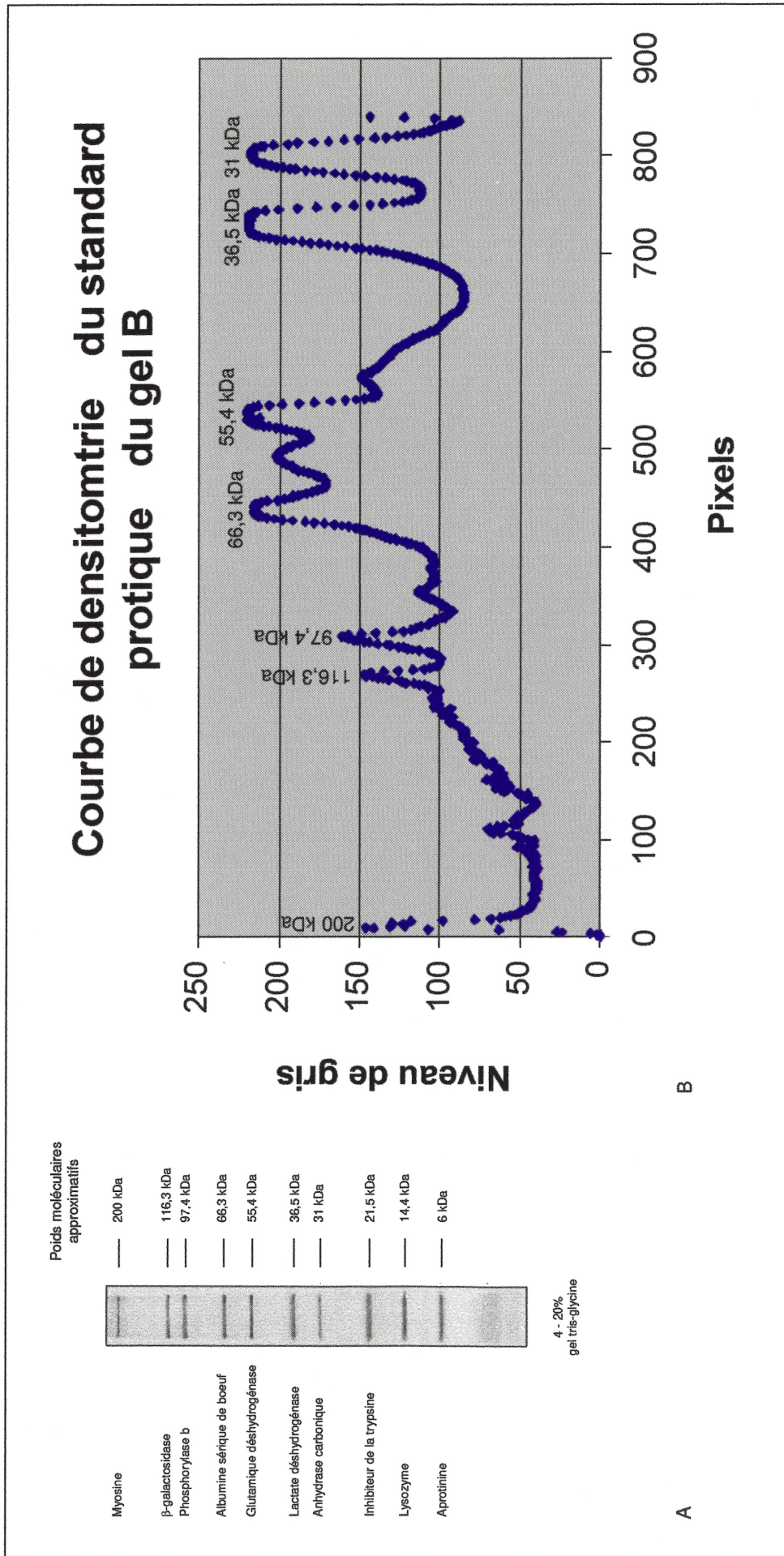


Figure 26 : A) Standard protéiques du fabricant (Novex) utilisé lors de l'électrophorèse des différentes fractions de protéines afin de réaliser la courbe d'étalonnage distance de migration en fonction du poids moléculaire des différentes protéines du standard. B) Graphique représentant les niveaux de gris (blanc = 0, noir = 255) sur un rectangle de 42 x 1 pixels aligné verticalement au centre du puits de migration #15 du gel B. Ce puits correspond aux protéines du standard. Les valeurs maximales correspondent aux bandes du standard.

Courbe de densitométrie des protéines insolubles (Gel B, puits 14)

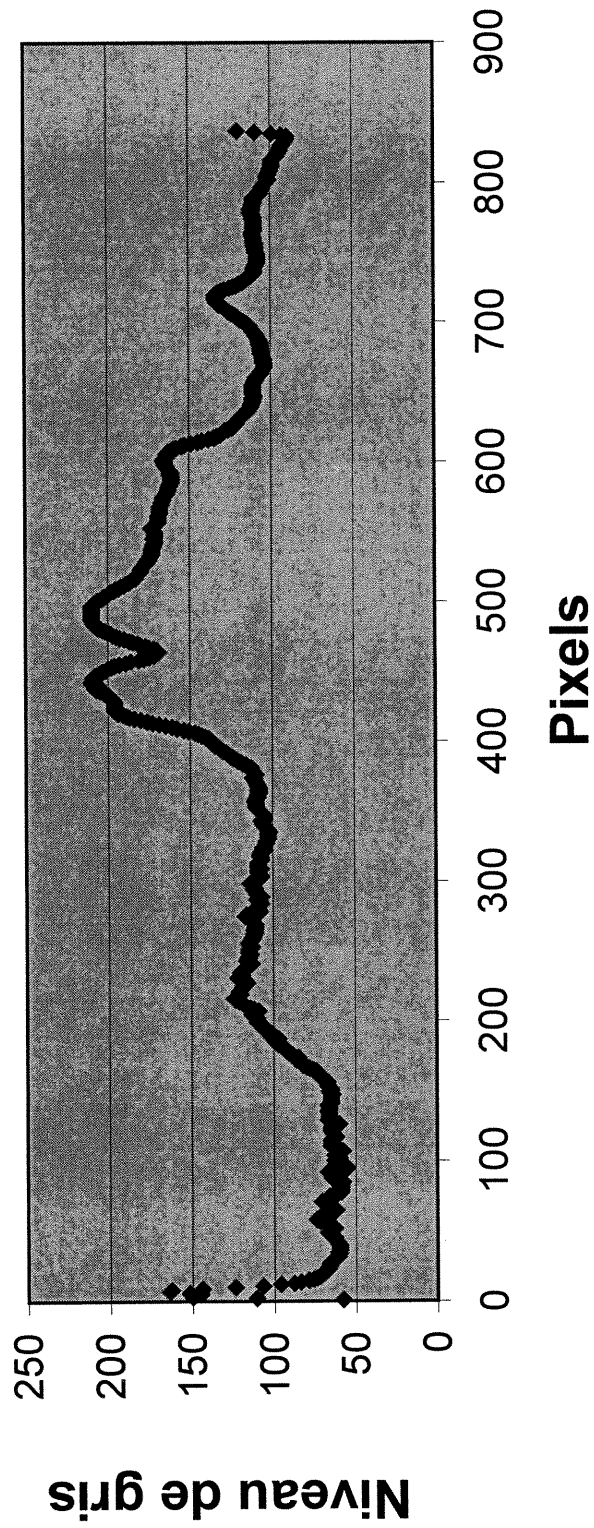


Figure 27: Graphique représentant les niveaux de gris (blanc = 0, noir = 255) sur un rectangle de 42 x 1 pixels aligné verticalement au centre du puits de migration #14 du gel B. Ce puits correspond aux protéines insolubles des cellules endothéliales cornéennes témoins. Les valeurs maximales correspondent aux différentes bandes obtenues sur le gel.

L'immunohistochimie indirecte avec ZO-1

L'immunohistochimie indirecte avec ZO-1 a été réalisée sur des sections de cornées fraîches ainsi que sur des cellules endothéliales et des kératocytes en culture. L'analyse des coupes de cornées montre une fluorescence au niveau de l'endothélium cornéen et de l'épithélium cornéen (figure 28). Un certain niveau de fluorescence non-spécifique a été observée avec les coupes témoins que les cellules aient été perméabilisées ou non avec la saponine. Les mêmes résultats ont été obtenus avec les deux protocoles testés (annexe VII).

Des cellules endothéliales primaires et des kératocytes secondaires ont respectivement été cultivés dans 3 puits d'une plaque multipuits. Une fois la confluence atteinte, l'analyse par immunohistochimie indirecte avec ZO-1 sur ces cellules a montré que les cellules endothéliales ainsi que les kératocytes en culture ne présentaient aucune fluorescence tout comme les cellules témoins. Les résultats ont été les mêmes dans le cas des deux protocoles testés (annexe VIII).

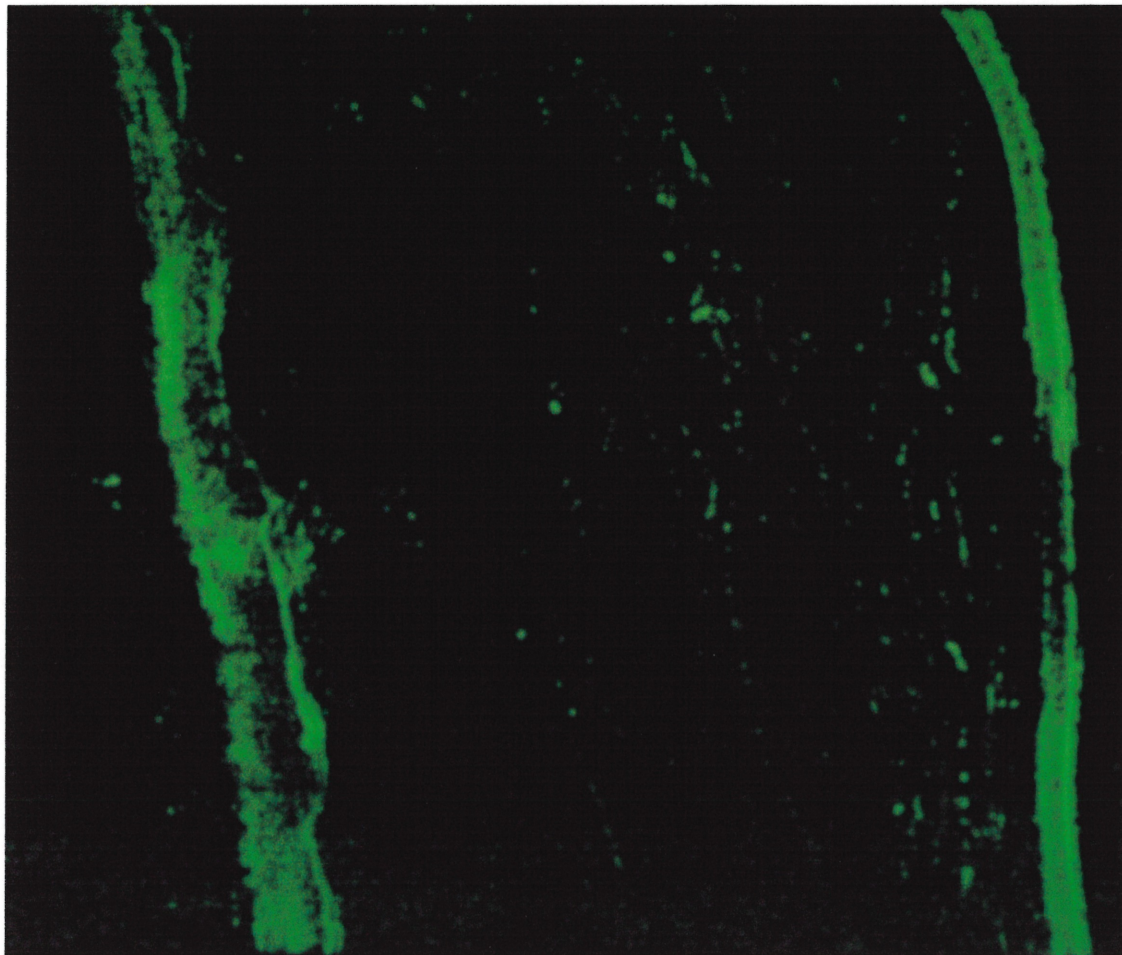


Figure 28: Coupe au cryostat de 20 µm d'une cornée bovine. Le tissu a été en contact avec un anticorps primaire dirigé contre la protéine de la jonction serrée ZO-1 puis avec un anticorps secondaire fluorescent dirigé contre l'anticorps primaire. L'épithélium et l'endothélium cornéens montrent une fluorescence indiquant la présence de la protéine dans ces deux couches. Une fluorescence non-spécifique est également présente au niveau du stroma.

DISCUSSION

La culture cellulaire et les montages de co-culture

La réussite de la mise en culture de cellules provient essentiellement de la capacité (1) à isoler le type cellulaire à partir du tissu frais et (2) à les maintenir en milieu stérile. Un bon protocole d'isolement des cellules doit permettre de récupérer la majorité des cellules tout en évitant de les endommager et ne pas favoriser le détachement des autres types cellulaires situés à proximité.

Le protocole d'isolement des cellules endothéliales cornéennes (MacCallum et coll., 1982) répond assez bien aux exigences de base. Les cellules ne sont pas abîmées et la grande majorité des cellules se situant sur la face postérieure de la cornée sont récupérées. La plus grande difficulté est venue de la présence de quelques kératocytes dans certaines cultures de cellules endothéliales. Des kératocytes se sont probablement retrouvés dans la suspension de cellules endothéliales lors du détachement mécanique de ces dernières. Dans le cas présent, c'est l'observation des cultures au microscope qui a permis de détecter la présence de kératocytes puisque les deux types cellulaires à l'étude, cellules endothéliales et kératocytes, présentent des morphologies distinctes.

Le protocole d'isolement des kératocytes (Wee et coll., 1995) satisfait également aux exigences. Les kératocytes, migrant par eux-mêmes hors de l'explant, ne subissent aucun dommage tandis que leur capacité mitotique a permis d'obtenir des cultures confluentes assez rapidement. Encore une fois, des problèmes lors de la récupération des cellules sont survenus. Malgré un grattage minutieux sur les deux faces de la cornée, lors de la préparation de l'explant, des cellules endothéliales ont été détectées dans les cultures de kératocytes. Une fois l'isolement des cellules terminé, leur maintien dans un état physiologique optimal dépend en partie de la capacité à assurer la stérilité et à organiser un milieu environnant compatible avec leur croissance et leur développement.

Les cellules endothéliales en culture ont une morphologie semblable à celle des cellules *in vivo*. À confluence, elles forment une mosaïque de cellules polygonales (figure 12).

Les kératocytes en culture, tout comme ceux du tissu natif, ont des prolongements dendritiques en contact les uns avec les autres (figure 4). Les phénotypes observés en culture sont en accord avec la littérature (Muller et coll., 1995; Sherrard et Ng, 1990). Malgré l'observation de phénotypes semblables, la disposition des cellules en monocouche ne respecte pas l'arrangement natif. Dans la cornée, les kératocytes sont répartis dans la totalité du stroma tandis que la face basale des cellules endothéliales est à proximité des kératocytes les plus postérieurs. En culture, les kératocytes perdent cette disposition tridimensionnelle tandis que les cellules endothéliales se retrouvent en contact avec le flacon de culture. La co-culture est un outil permettant dans une certaine limite de reconstituer la disposition native des cellules.

La co-culture mime mieux les conditions de l'environnement *in situ* des cellules que la culture en monocouche. Le premier modèle de co-culture (montages avec collagène sur un anneau de papier) respectait la disposition en trois dimensions des kératocytes bovins, ces derniers étant distribués à l'intérieur d'un gel de collagène. La présence de cellules endothéliales dans des *inserts* déposés sur le gel de collagène permettait un rapprochement des deux types cellulaires comme dans la cornée *in situ*. Les *inserts* dans lesquels étaient déposées les cellules endothéliales facilitaient la récupération des cellules sans risquer de récupérer des kératocytes. Ce modèle n'a cependant pas répondu aux attentes.

La liquéfaction, quelques heures après la réalisation du montage, du gel de collagène n'a pas permis de conserver l'orientation spatiale des kératocytes. Les petits vases de pétri Falcon (35 mm de diamètre) favorisaient la contamination des cellules par des moisissures puisque la hauteur de l'*insert* empêchait la fermeture du couvercle du vase de pétri le contenant. Ces différentes contraintes ont nécessité l'élaboration d'un deuxième modèle de co-culture.

Le montage avec collagène dans des *inserts* est le deuxième modèle de co-culture testé. Un gel de collagène contenant des kératocytes était déposé dans un *insert* permettant la bonne disposition des cellules. L'*insert* était par la suite suspendu dans un puits d'une

plaque multipuits au dessus de cellules endothéliales en culture. L'utilisation d'une plaque multipuits et d'*inserts* a mis un terme aux contaminations et a apporté un meilleur support physique aux montages. Le problème majeur lié à ce deuxième modèle de co-culture a eu pour origine la liquéfaction du gel de collagène lors de changements de température ou d'ajout du milieu de culture.

Plusieurs modifications au protocole ont été apportées afin de contrer cet effet : (1) augmentation de la concentration en collagène, (2) variation du pH du gel, et (3) augmentation du temps entre la gélification et l'ajout de milieu de culture. Finalement, 6 montages (3 montages témoins et 3 montages de co-culture) ont été réalisés. Le collagène est demeuré sous forme de gel durant quelques heures, À la suite de la liquéfaction, les kératocytes ont probablement formé une monocouche à la surface de la membrane poreuse de l'*insert*. Les deux types cellulaires ont donc été en contact avec du collagène bovin de type 1 durant environ deux jours, soit jusqu'au renouvellement du milieu de culture. La non-gélification du collagène pourrait peut-être s'expliquer par une trop grande pureté du collagène utilisé, favorisant la formation de liaisons fragiles. Cette hypothèse mériterait d'être testée par extraction du collagène à partir des tendons de queues de rats. L'utilisation d'une substance, comme la glutaraldéhyde, capable de former des chaînes collatérales sur les molécules de collagène aurait peut-être permis de renforcer les liaisons dans le gel. En effet, la glutaraldéhyde a été utilisé avec succès lors de la reconstruction du stroma d'un équivalent cornéen tridimensionnel (Griffith et coll., 1999). Cependant, à cause de sa toxicité, ce fixateur n'a pas été utilisé.

Le troisième modèle de co-culture (montages sans collagène dans les *inserts*) de kératocytes et de cellules endothéliales ne permettait pas la disposition tridimensionnelle des kératocytes. Même si les deux types cellulaires étaient situés à proximité l'un de l'autre, le modèle ne respectait pas la proximité réelle des deux types cellulaires *in vivo*. Comme le montre la figure 8, une distance évaluée à environ 2 mm (distance membrane poreuse de l'*insert* et fond du puits) séparait les 2 types cellulaires. Cette distance représente environ 2 fois l'épaisseur totale de la cornée bovine. Malgré un souci de mimer la disposition native des cellules, il ne fait aucun doute que ce facteur « distance »

ait pu influencer la croissance, le développement et/ou la différenciation des cellules. Cette distance physique empêcherait peut-être les kératocytes de bénéficier de certains facteurs libérés par les cellules endothéliales. Les facteurs sécrétés par les kératocytes traverseraient la membrane poreuse, d'après la loi de la gravité, et interagiraient avec certains récepteurs à la surface des cellules endothéliales. Par contre, il est difficile de déterminer si les facteurs sécrétés par les cellules endothéliales réussissent via le milieu de culture à atteindre de manière précise les récepteurs des kératocytes de l'autre côté de la membrane poreuse. Un moyen suggéré pour tenter de vérifier cette interrogation serait de récupérer le milieu de culture ayant été en contact avec des cellules endothéliales et de le déposer sur des kératocytes en culture.

Afin de s'assurer que les cellules proliféraient normalement dans le montage de co-culture, elles ont été colorées au BCECF-AM (section 2.4) (figure 13). La coloration a montré que les deux types cellulaires étaient déjà à confluence après 7 jours de co-culture, démontrant que la présence d'un type cellulaire n'inhibait pas la croissance de l'autre. Ainsi, les conditions de culture et le modèle de co-culture ne semblaient pas exercer d'effet négatif sur la croissance des cellules.

La solubilisation et le dosage des protéines membranaires

La procédure de solubilisation a permis de récupérer, en plus des protéines membranaires, les protéines cytoplasmiques, libérées lors de l'éclatement des cellules, et les protéines formant l'assise des cellules, analogue à la membrane de Descemet *in vivo*. Cette dernière est sécrétée par les cellules endothéliales bovines en culture (Karpool et coll., 1986; cité par Berman, 1991). En récupérant les cellules endothéliales des puits de la plaque multipuits, la membrane basale de l'endothélium a probablement été récupérée. Une analyse immunologique dirigée contre le collagène de type VIII, principal collagène de la membrane de Descemet sécrété par les cellules endothéliales cornéennes en culture, devrait être effectuée afin de confirmer cette hypothèse (Perlman et Benya, 1980; Labermeier et Kenney, 1983; Benya et Padilla, 1986; Kapoor et coll., 1988; cités par Harding, 1997).

Quelques étapes du protocole de solubilisation devraient être vérifiées ou améliorées. Le protocole de solubilisation comporte une étape d'incubation à 30°C lorsque le surnageant est déposé sur un lit de sucrose. Toute les étapes de la solubilisation devraient se faire sur la glace afin d'éviter l'activation de protéases non-neutralisées par le cocktail de protéases et ainsi, prévenir la dégradation des protéines. Il faudrait s'assurer que cette incubation n'a pas d'effets sur les suspensions protéiques. L'étape d'extraction du détergent avec les *Bio-Beads* ne serait probablement pas nécessaire. En effet, la petite quantité de triton X-114 ne devrait pas interagir négativement avec le gel d'acrylamide utilisé pour l'électrophorèse. L'élimination de cette étape permettrait de récupérer une plus grande quantité de protéines hydrophobes. L'ultracentrifugation a permis de récupérer les protéines insolubles. La difficulté de bien séparer le surnageant de l'ultracentrifugation du culot a probablement fait en sorte qu'une partie du surnageant est demeurée dans la fraction « culot ».

Le dosage des échantillons a permis d'en déterminer la concentration en protéines. Les coefficients de corrélation au carré des courbes du standard de BSA (albumine sérique bovine) étaient tous plus grand que 0,99, indiquant une très bonne corrélation. Les concentrations obtenues peuvent être considérées relativement fiables quoiqu'un certain nombre d'échantillons avait une concentration en protéines inférieure à celle du standard le plus dilué. Les concentrations moyennes des échantillons non-lyophilisés (gels 1 à 9) étaient assez faibles, soit en dessous de 20 µg/ml (protéines hydrophiles) et autour de 50 µg/ml (protéines insolubles). Une lyophilisation de quelques uns de ces échantillons a été effectuée dans le but de les concentrer. La concentration des échantillons lyophilisés des protéines hydrophiles se situait autour de 100 µg/ml (gels A et C) tandis que la concentration des échantillons lyophilisés, des protéines insolubles, était supérieure à 200 µg/ml (gel B). La procédure de lyophilisation a donc permis de concentrer des échantillons parfois très dilués.

L'électrophorèse

L'électrophorèse des protéines membranaires et cytoplasmiques des cellules endothéliales cornéennes et des kératocytes bovins a été réalisée avec des échantillons peu concentrés en protéines (gels 1 à 9). Une coloration au nitrate d'argent a été effectuée sur les 9 mini-gels. Cette technique, 100 à 1000 fois plus sensible que celle utilisant le bleu de Coomassie est capable de détecter jusqu'à 0,1-1 ng de protéines (Maniatis, Fritsch, et Sambrook, 1989). Malgré l'utilisation d'une technique sensible, les tracés électrophorétiques comportaient plusieurs zones moins colorées, ne présentant aucune bande. Les tracés électrophorétiques des échantillons lyophilisés des gels A et B (surtout des protéines insolubles) montrent une nette amélioration concernant le nombre de bandes et la qualité des tracés. Par contre, les tracés électrophorétiques du gel C (protéines hydrophiles) présentent peu de détail. Les échantillons des protéines hydrophiles étant en suspension dans un volume de 9 ml de tampon de sucre, la lyophilisation a permis d'éliminer l'eau, mais a eu pour conséquence de cristalliser le sucre et les minéraux. Il se pourrait que la forte concentration en glucose ait pu affecter la migration des bandes.

Une concentration en lipide trop élevée pourrait peut-être expliquer les artéfacts présents sur les 9 mini-gels. Les lipides pourraient affecter la pénétration du colorant dans les gels ou la migration des protéines. Les cellules étant composées de lipoprotéines, il est possible que les lipides aient retardé le déplacement des lipoprotéines dans le gel. Une procédure d'extraction des lipides à l'acétone aurait permis de retirer les lipides contenus dans les suspensions protéiques. Étant donné que la quantité de cellules utilisée au départ est assez petite, la quantité de lipides présente dans les échantillons devait être très faible. La lyophilisation se présentait donc comme une procédure plus avantageuse.

D'autres facteurs pouvant s'appliquer aux trois types de fractions protéiques pourraient avoir influencé les tracés électrophorétiques. Ces facteurs sont énumérés dans cette section afin d'éviter de les répéter à la fin de chacune des trois prochaines sections.

Le milieu de culture utilisé pour nourrir les cellules contient du sérum foetal. Le sérum se compose majoritairement d'eau et de plus de 100 solutés (nutriments, gaz, hormones, ions, et protéines) (Marieb, 1993). Le sérum foetal est un milieu encore plus riche contenant beaucoup de facteurs nécessaires au développement de l'organisme. Les protéines les plus abondantes dans le sérum sont les suivantes : de l'albumine, des enzymes, et des globulines. L'albumine représente environ 60% des protéines plasmatiques (Marieb, 1993), et se retrouve assurément dans le milieu de culture. Il est possible que les protéines du sérum, comme l'albumine, se soient fixées à la membrane des cellules à partir du milieu de culture. En chargeant du milieu de culture dans le puits d'un gel, il aurait été possible d'identifier le poids moléculaire des protéines présentes dans le milieu de culture. L'analyse des différents gels (1 à 9 et A, B, et C) montre une bande commune à tous les puits. Cette bande dont le poids moléculaire varie entre 63 et 67 kDa pourrait être de l'albumine (66,6 kDa d'après le standard protéique).

La présence dans le milieu de culture, de molécules pouvant adhérer aux cellules pourrait s'être produit également avec le collagène. Le collagène bovin de type I utilisé pour le deuxième modèle de co-culture aurait pu se fixer sur les cellules malgré le fait qu'il ne soit resté en contact avec elles pendant 2 jours. L'unité de base des collagènes I, III et V est une molécule asymétrique ayant un poids moléculaire se situant entre 285 et 300 kDa (Berman, 1991). L'absence de poids moléculaire élevé dans les différents gels pourrait laisser croire à la non fixation de molécules de collagène sur les cellules. Cependant, il est fort possible que les molécules aient subi des dégradation lors des nombreuses étapes de solubilisation ou lors de la lyophilisation. *In vivo*, les cellules sont en contact avec la matrice extracellulaire, il est possible que la présence du collagène bovin de type I influence plusieurs facteurs protéiques dans les cellules endothéliales et les kératocytes (Nishida et coll., 1988).

La dégradation des différentes protéines a pu être causée par les nombreuses manipulations des échantillons au cours de l'expérimentation. Les échantillons doivent être maintenus à basse température ce qui n'a pas toujours été respecté dans le protocole de solubilisation. La faible identification de protéines aux poids moléculaires élevés

laisserait croire que la dégradation des protéines a peut-être été plus forte qu'initialement évaluée, et ce, en particulier dans le cas des échantillons lyophilisés. Cette absence de protéines aux poids moléculaires élevés ne dépend pas de la résolution des gels puisque les protéines aux poids moléculaires élevés (200, 116,3 et 97,4 kDa) du standard ont bien été révélées lors de la coloration des gels. La résolution du gel n'a cependant pas permis d'obtenir les trois ou quatre protéines aux petits poids moléculaire du standard. L'ajout d'inhibiteurs de protéases après chacune des étapes aurait probablement diminué la dégradation des protéines des échantillons et permis d'obtenir plus de protéines aux poids moléculaires supérieurs à 100 kDa.

Les cellules sont constituées d'un nombre incalculable de protéines. L'analyse d'extraits protéiques totaux, réalisée dans le présent travail, ne permet pas d'identifier avec certitude les bandes. Cependant, cette méthode, combinée avec les poids moléculaires de protéines d'endothélium cornéen rapportés dans la littérature (tableau XXIII) pourrait permettre d'identifier des protéines candidates. Des techniques d'immunobuvardage sur *Western Blot*, utilisant des anticorps dirigés contre une protéine cible, permettraient de confirmer ou d'infirmer les candidates potentielles.

La présence fréquente d'un plus grand nombre de bandes dans les extraits des cellules endothéliales témoins comparativement aux extraits obtenus en co-culture ou avec les cellules fraîches pourrait peut-être s'expliquer par une forte spécialisation des cellules fraîches ou cultivées avec des kératocytes. Si, effectivement, les cellules endothéliales en co-culture se rapprochent davantage des cellules *in vivo*, il est possible qu'elles soient formées de molécules plus complexes (lipoprotéines ou glycoprotéines). Ces molécules étant plus difficile à solubiliser, moins de protéines ne se sont alors retrouvées en solution dans les différents échantillons. Environ 44% des échantillons de kératocytes avaient une concentration en deça de la linéarité de la droite de régression. Les faibles concentrations pourraient s'expliquer par une mauvaise récupération des cellules sur la membrane poreuse. De plus, les kératocytes étant un type cellulaire différent des cellules endothéliales, il est possible qu'ils soient formés d'un plus grand nombre de protéines formant des complexes difficilement dissociables.

Tableau XXXIII: Liste de différents poids moléculaires de plusieurs protéines présentent au niveau des cellules endothéliales cornéennes et de la membrane de Descemet.

| Nom | Poids moléculaire (kDa) | Type de protéine | Fonction ou localisation |
|---------------------------------------------------------------------|-------------------------|------------------|--------------------------------------------------|
| Claudine (Cordenonsi et coll., 1999) | 22 | Hydrophobe | Jonction serrée |
| Aquaporine (Li et coll., 1999) | 28 | Hydrophobe | Canaux pour l'eau |
| Sialoglycoprotéine-8 (Panjwani et Baum. 1985) | 44 | Hydrophobe | Surface de la membrane plasmique |
| α 1-antichymotrypsine (Twining et coll., 1994) | 50 | Soluble | Inhibiteur de protéases de la classe des serpins |
| Occludine (Petroll et coll., 1999) | 65 | Hydrophobe | Jonction serrée |
| Sialoglycoprotéine-7 (Panjwani et Baum. 1985) | 80 | Hydrophobe | Surface de la membrane plasmique |
| Sialoglycoprotéine-6 (Panjwani et Baum. 1985) | 95 | Hydrophobe | Surface de la membrane plasmique |
| Sialoglycoprotéine-5 (Panjwani et Baum. 1985) | 110 | Hydrophobe | Surface de la membrane plasmique |
| Co-transporteur $\text{Na}^+ : \text{HCO}_3^-$ (Sun et coll., 2000) | 130 | Hydrophobe | Transporteur d'ions |
| ZO-3 (Cordenonsi et coll., 1999) | 130 | Soluble | Jonction serrée |
| Sialoglycoprotéine-4 (Panjwani et Baum. 1985) | 135 | Hydrophobe | Surface de la membrane plasmique |
| Collagène VI (α 1/ α 2) (Chapman et coll., 1998) | 140 | Insoluble | Membrane de Descemet |
| ZO-2 (Petroll et coll., 1999) | 160 | Soluble | Jonction serrée |
| Sialoglycoprotéine-3 (Panjwani et Baum. 1985) | 170 | Hydrophobe | Surface de la membrane plasmique |
| Sialoglycoprotéine-2 (Panjwani et Baum. 1985) | 200 | Hydrophobe | Surface de la membrane Plasmique |
| Collagène VI (α 3) (Chapman et coll., 1998) | 200 | Insoluble | Membrane de Descemet |
| ZO-1 (Petroll et col., 1999) | 220 | Soluble | Jonction serrée |
| Sialoglycoprotéine-1 (Panjwani et Baum. 1985) | 220 | Hydrophobe | Surface de la membrane plasmique |
| Fibronectine (Chapman et coll., 1998) | 250 | Soluble | Membrane de Descemet |

La fraction « culot » contenant les protéines insolubles a été obtenue à la suite de l'ultracentrifugation du surnageant. Les protéines du collagène, les protéoglycanes et les glycoprotéines de structures sont des exemples de protéines pouvant se retrouver dans cette fraction (Cooper et coll., 1991). De plus, il est également possible de retrouver des morceaux non-solubilisés de membrane plasmique ou des membranes des organites ainsi que des organites (réticulum endoplasmique, appareil de Golgi). La fraction « phase supérieure » contient les protéines hydrophiles. Les protéines du cytoplasme sont présentes dans cette fraction. Finalement, la fraction « phase inférieure » contient les protéines impliqués au niveau de la membrane plasmique des cellules (protéines hydrophobes).

Les protéines insolubles

Les cellules endothéliales cornéennes en absence de collagène

Les tracés électrophorétiques des protéines insolubles des cellules endothéliales ayant poussé en présence (cEM) ou en absence de kératocytes (cET) (tableau XIX) montrent plusieurs zones de regroupement de bandes communes. Il est normal que des protéines identiques soient présentes avec les cET et les cEM puisqu'il s'agit du même type cellulaire. La présence de kératocytes influencerait négativement l'expression de certains facteurs protéiques (221, 202, 187, 170, 124, et 100 kDa) des cellules endothéliales. Ces dernières pourraient restreindre la production de certains facteurs qu'elles retrouvent maintenant dans leur environnement. Ces facteurs, sécrétés par les kératocytes, voyageraient dans le milieu de culture pour finalement atteindre les cellules endothéliales. Inversement, une protéine de 143 kDa est présente dans les échantillons de cellules endothéliales provenant de 4 montages de co-culture sur une possibilité de 10.

L'analyse des protéines insolubles de cellules endothéliales fraîches (cEF) donne très peu d'informations sur d'éventuels facteurs influencés par la mise en culture des cellules. Les trois bandes obtenues peuvent être jumelées avec des bandes de poids moléculaires semblables chez les cET et les cEM. Cette large zone de similitude entre les trois conditions de culture est formée de plusieurs bandes aux poids moléculaires

similaires. L'estimation d'une erreur de 3 kDa sur le poids moléculaire des différentes bandes implique la présence de plusieurs chevauchements pouvant masquer la présence de protéines aux poids moléculaires très rapprochés. L'utilisation de gels préparés spécifiquement pour séparer les poids moléculaires variant entre 40 et 100 kDa pourrait peut-être mettre à jour des bandes que l'on croyait absentes.

La lyophilisation d'échantillons de cellules endothéliales fraîches ou cultivées en présence (cEM) ou en absence (cET) de kératocytes a permis d'obtenir des tracés électrophorétiques plus détaillés (tableau XX). De nombreuses bandes communes entre les cET, les cEM et les cEF démontrent une certaine uniformité entre les différentes conditions de culture. Tout comme pour les échantillons non-lyophilisés, plusieurs bandes (119, 112, 89, 68, et 45 kDa) se trouvent chez les cET et non chez les cEM. Les kératocytes auraient un impact sur la régulation de certains facteurs au niveau des cellules endothéliales. La lyophilisation a apporté plus d'informations concernant le tracé électrophorétique des cellules endothéliales fraîches. Ce dernier ressemble davantage à celui des cellules endothéliales cultivées en présence de kératocytes. En effet, toutes les bandes peuvent être jumelées à celles des cEM laissant croire que la co-culture permet de se rapprocher des conditions *in vivo*.

Les cellules endothéliales cornéennes en présence de collagène

Le tracé électrophorétique des protéines insolubles des cellules endothéliales témoins cultivées en contact avec du collagène (cET+collagène) est semblable à celui des cellules endothéliales cultivées en contact avec un gel de collagène contenant des kératocytes (cEM+collagène) (Tableau XXI). La seule présence du collagène permettrait de recréer un environnement similaire à celui retrouvé *in vivo*, poussant les cellules endothéliales à mieux se différencier, peu importe la présence ou non de kératocytes. Une bande de 115 kDa, présente chez les cET+collagène, serait influencée négativement par la présence de kératocytes. À l'inverse, des protéines de 106 et de 87 kDa sembleraient être influencées positivement par la présence des kératocytes.

Ces deux tracés électrophorétiques ressemblent à celui des cEM à l'exception d'un facteur de 106 kDa absent des cEM et d'un autre de 143 kDa présent uniquement chez les cEM. La co-culture des deux types cellulaires, même en absence de collagène, indiquerait que les cellules ne seraient pas trop influencées par les conditions de culture.

Les tracés électrophorétiques des échantillons précédents soumis à la lyophilisation montrent très peu de détails concernant les cET+collagène (Tableau XXII). Plusieurs protéines aux poids moléculaires élevées du tableau XXI ne se retrouvent pas dans le tableau XXII. La lyophilisation semble donc avoir eu un impact négatif sur les protéines aux poids moléculaires élevées. L'ajout d'inhibiteurs de protéases avant la lyophilisation aurait pu restreindre la dégradation des protéines. Cependant, le tracé électrophorétique des cEM+collagène ressemble à celui des cEM (tableau XXII) et par le fait même à celui des cEF (tableau XX). Le montage de co-culture, sans kératocytes, serait donc un aussi bon environnement pour les cellules que celui utilisant du collagène puisque les cellules sembleraient très proches des cellules *in vivo* (cellules fraîches).

Les kératocytes

Le tracé électrophorétique des protéines insolubles des kératocytes cultivés en absence (cKT) ou en présence (cKM) de cellules endothéliales cornéennes (tableau XXIII) indique 2 protéines, 160 et 143 kDa, présentes uniquement chez les kératocytes témoins. Les cellules endothéliales influenceraient négativement l'expression de ces facteurs protéiques chez les kératocytes. Il est possible que les kératocytes limitent la production de facteurs qui pourraient être présents dans le milieu de culture. Effectivement, ces deux facteurs sont présent dans les cellules endothéliales en co-culture avec des kératocytes (tableau XIX). La présence d'une bande de 160 kDa et d'une autre de 143 kDa chez les cellules endothéliales en co-culture (cEM) et l'absence de ces deux mêmes bandes chez les kératocytes en co-culture (cKM) sont des indices permettant de croire à l'importance de ces facteurs dans la physiologie cellulaire. Une attention particulière pourrait être portée à deux facteurs protéiques de 143 et 160 kDa dans la recherche de nouveaux facteurs impliqués dans les interactions cellules endothéliales-kératocytes.

Un facteur de 94 kDa et un autre de 87 kDa présents chez les cKM pourraient indiquer que la co-culture les influencerait positivement. L'analyse des protéines de kératocytes fraîchement prélevés aurait peut-être pu permettre de vérifier si la présence des cellules endothéliales conditionne les cellules comme dans le tissu *in vivo*.

L'électrophorèse des échantillons précédents lyophilisés n'a pas permis l'apparition de nouvelles bandes (tableau XXIV). De plus, plusieurs bandes avec des poids moléculaires supérieurs à 80 kDa ne sont plus présents dans les tracés électrophorétiques. Une dégradation des protéines pourrait à nouveau expliquer l'absence de protéines aux poids moléculaires élevés. La présence de bandes de 48, 36 et 30 kDa seulement chez les cKT signifierait que les cellules endothéliales influenceraient négativement ces facteurs au niveau des kératocytes.

Les protéines hydrophiles

Les cellules endothéliales cornéennes en absence de collagène

Les tracés électrophorétiques des protéines hydrophiles des cellules endothéliales cultivées en absence (sET) et en présence (sEM) de kératocytes sont assez semblables (tableau XXV). Il est normal de retrouver plusieurs bandes communes aux deux conditions de culture puisqu'il s'agit du même type cellulaire. De nombreux chevauchements sont probablement présents au niveau de la zone commune la plus large. Un gel avec une meilleure séparation des petits poids moléculaires permettrait de vérifier de nouvelles bandes masquées par d'autres protéines. Une dégradation des protéines de poids moléculaires élevés aurait également pu augmenter le nombre de facteurs protéiques de petits poids moléculaires.

Deux bandes, une de 113 kDa et une autre de 101 kDa, sont présentes uniquement chez les sET. Le facteur de 113 kDa a été détecté dans la moitié des puits où les échantillons ont été déposés contrairement à un seul puits sur une possibilité de 8 pour la bande de 101 kDa. La présence de kératocytes influencerait négativement le facteur de 113 kDa

en l'inhibant ou peut-être en diminuant le niveau d'expression. Étant donné la faible représentation de la bande de 101 kDa, il est possible que cette bande soit en fait le produit d'une dégradation. Inversement, deux facteurs de 173 et 76 kDa, sont présents seulement chez les sEM suggérant une influence positive de la présence des kératocytes. Le facteur de 173 kDa, présent dans seulement 2 puits sur 10 pourrait être le produit d'une dégradation. La protéine de 76 kDa semble être plus stable étant donné qu'elle est présente dans 4 puits sur 10. Il est impossible de conclure sur l'effet que pourrait avoir la mise en culture des cellules sur les protéines hydrophiles puisque le tracé électrophorétique des cEF est dépourvu de bandes.

L'électrophorèse des échantillons lyophilisés n'a pas révélé de nouvelles bandes (tableau XXVI). Une bande commune de 63 kDa est présente dans les trois conditions (sET, sEM, et sEF). Cette bande pourrait être de l'albumine dont le poids moléculaire est 66,6 kDa. Un facteur de 72 kDa est présent avec les sEM et les sEF lyophilisés. En appliquant l'imprécision, estimée à 3 kDa, il est possible qu'il s'agisse du facteur de 76 kDa observé avec les échantillons non-lyophilisés (sEM et sEF). Il serait intéressant d'obtenir des informations supplémentaires sur le facteur dont le poids moléculaire se situerait autour de 75 kDa et de vérifier si la stimulation exercée par les kératocytes est reproductible.

Les cellules endothéliales cornéennes en présence de collagène

Le tracé électrophorétique des protéines hydrophiles des cellules endothéliales témoins cultivées en contact avec du collagène (sET+collagène) est semblable à celui des cellules endothéliales cultivées en contact avec un gel de collagène contenant des kératocytes (sEM+collagène) (Tableau XXVII). Seulement deux bandes diffèrent entre les deux tracés. Une bande de 110 et une autre de 103 kDa, présentes dans tous les puits où des (sEM) ont migré, seraient influencées positivement par la présence de kératocytes. La bande de 110 kDa est, par contre, commune aux sET et aux sEM. Ce facteur semble être présent en absence de collagène mais nécessite la présence de kératocytes pour s'exprimer lorsqu'il y a eu du collagène dans le milieu.

L'analyse des protéines insolubles des cellules endothéliales a montré que les tracés électrophorétiques ne semblaient pas influencés par la présence de collagène. Cette constatation n'est pas aussi claire dans le cas des protéines hydrophiles. En effet, plusieurs bandes des sEM et sET ne sont pas présentes avec les cellules ayant été en contact avec du collagène. Ces résultats pourraient s'expliquer par une influence négative possiblement exercée par le collagène sur certaines protéines hydrophiles

Un facteur de 97 kDa semblerait être relié à la présence de collagène puisqu'il se retrouve uniquement dans le tracé électrophorétique des cellules ayant été en contact avec du collagène. Ce facteur, provenant probablement du milieu de culture, pourrait s'être fixé à la surface de la membrane plasmique des cellules endothéliales. Une bande de 71 kDa, présente chez les sEM, est absente des sEM+collagène. La forte représentation (7 puits sur 10) de cette bande uniquement chez les cellules n'ayant pas été en contact avec le collagène laisserait croire que ce facteur n'est pas essentiel à l'établissement d'interactions entre la matrice et les protéines hydrophiles des cellules endothéliales cornéennes en culture.

La lyophilisation des échantillons précédents n'a pas permis d'obtenir des patrons électrophorétiques très détaillés (tableau XXVIII). Un facteur de 72 kDa, probablement le même que celui de 76 kDa des échantillons non-lyophilisés sans collagène (tableau XXVI) est présent dans la totalité des puits des échantillons ayant été en contact avec le collagène. Ce résultat est contradictoire avec le tableau des mêmes échantillons non-lyophilisés (tableau XXVII) puisque la bande de 76 kDa est absente des tracés électrophorétiques des cellules ayant été en contact avec le collagène. Par contre, il est possible qu'une dégradation d'une autre protéine ait pu produire un fragment protéique de 72 kDa. Un marquage des bandes de 72 et de 76 kDa serait nécessaire afin de confirmer qu'il s'agit bien de la même protéine.

Les kératocytes

Les tracés électrophorétiques des protéines hydrophiles des kératocytes cultivés en absence (sKT) ou en présence (sKT) de cellules endothéliales (tableau XXIX) montrent quelques bandes communes découlant probablement du fait qu'il s'agit du même type cellulaire. Les bandes de 200, 179, 91 et 38 kDa, seraient influencées négativement par la présence de cellules endothéliales. La bande de 179 (en soustrayant l'imprécision de 3 kDa) et celle 91 kDa peuvent être jumelées avec une bande de 173 (en additionnant l'imprécision de 3 kDa et une autre de 90 kDa présentes dans les cellules endothéliales cultivées en co-culture avec des kératocytes (sEM) (tableau XXV). Un facteur de 176 kDa et un autre de 91 kDa pourraient être sécrétés uniquement par les cellules endothéliales, mais agiraient sur les deux types cellulaires. Les kératocytes restreindraient leur production concernant ces deux facteurs évitant ainsi de synthétiser des facteurs présents dans le milieu de culture. L'analyse détaillée de ces bandes permettrait peut-être d'identifier des facteurs impliqués dans les interactions cellules endothéliales-kératocytes.

L'observations des tracés électrophorétiques des échantillons précédents lyophilisés (tableau XXX) ne permet pas d'ajouter de nouvelles informations puisque très peu de bandes sont apparues lors de la coloration.

Les protéines hydrophobes

Les cellules endothéliales cornéennes en absence de collagène

Les gels contenant les échantillons des protéines hydrophobes ne présentent pas beaucoup de bandes. Une extraction non-complète du triton X-114 a peut-être contribué à diminuer la qualité de la coloration ou à influencer la migration des protéines. De plus, ces échantillons n'ayant pas été dosés, il est possible qu'ils n'aient pas été assez concentrés pour produire une coloration au nitrate d'argent. Les tracés électrophorétiques des protéines hydrophobes des cellules endothéliales fraîches (iEF) ou cultivées en absence (iET) ou présence de kératocytes (iEM) (tableau XXXI) montrent une zone de bandes communes aux trois types de conditions. Ces similarités s'expliqueraient par le fait qu'il s'agit du même type cellulaire. Deux facteurs, l'un de

101 kDa et un autre de 90 kDa sont présents dans les cellules endothéliales témoins (iET) et absents des cellules cultivées en présence de kératocytes (iEM). Ces derniers influenceraient négativement ces facteurs hydrophobes. Inversement, un facteur de 85 et un autre de 39 kDa seraient stimulés par les kératocytes.

Les kératocytes

Les tracés électrophorétiques des protéines hydrophobes des kératocytes cultivés en absence (iKT) ou en présence (iKM) de cellules endothéliales (iKM) (tableau XXXII) sont encore moins détaillés que ceux des protéines hydrophobes des cellules endothéliales. Une petite zone où des poids moléculaires communs aux deux types de conditions est présente. Des facteurs de 92, 85 et 49 kDa se retrouvent uniquement chez les iKM. La présence de cellules endothéliales influencerait positivement ces facteurs. Une protéine de 45kDa serait influencée négativement par la présence de cellules endothéliales.

La densitométrie

Les deux graphiques de densitométrie (figures 26 et 27) montrent une technique qui pourrait être utile dans l'étude des différentes bandes de protéines mise en lumière dans les pages précédentes. En soumettant un par un les puits d'un gel au système informatique Eclipse, il serait possible de calculer la concentration relative des différentes bandes. L'intensité des bandes lors de la coloration au nitrate d'argent est proportionnelle à la concentration des différentes protéines présentes dans l'échantillon. L'analyse des niveaux de gris de l'image numérique des différents puits sera en théorie proportionnelle à la quantité de protéines formant les bandes. En additionnant l'intensité de toutes les bandes d'un même puits, il est possible d'obtenir l'intensité totale, quantité proportionnelle à la concentration totale en protéines de l'échantillon. En divisant l'intensité d'une bande à l'étude par l'intensité totale il serait ainsi possible d'obtenir le pourcentage de protéines représentées par cette bande. Une fois les différentes concentrations relatives obtenues, il sera plus facile d'orienter les recherches sur les

facteurs protéiques les plus stimulés en co-culture. Ce type de procédure pourrait donc être utile dans la recherche d'informations supplémentaires sur des protéines ciblées.

L'immunohistochimie avec ZO-1

Les résultats obtenus lors de l'immunohistochimie avec ZO-1 sur les coupes histologiques de cornées bovines ont été les mêmes, peu importe la technique utilisée (avec ou sans saponine). Dans les deux cas, la présence de fluorescence au niveau de l'épithélium et de l'endothélium cornéens est en accord avec la littérature puisque des jonctions serrées sont présentes au niveau des deux types cellulaires (McLaughlin et coll., 1985). Une faible fluorescence, non spécifique, obtenue au niveau du stroma pourrait s'expliquer par des lavages insuffisants des coupes. En effet, après les incubations avec le lait et l'anticorps primaire, les coupes commençaient à se détacher de la lame. Il devenait donc très difficile de bien nettoyer l'anticorps secondaire de la surface du tissu avant l'observation au microscope. Une fluorescence assez forte, non-spécifique, a été observée avec les coupes témoins ce qui pourrait impliquer la présence d'une réaction croisée entre le tissu et l'anticorps secondaire.

Quelques facteurs pourraient expliquer la présence de fluorescence non-spécifique au niveau du stroma et des témoins. Des dilutions non-appropriées des anticorps primaire et secondaire pourraient avoir influencé les résultats. Une plus faible dilution de l'anticorps primaire et une dilution plus forte de l'anticorps secondaire permettraient peut-être d'éviter un marquage non-spécifique. La présence d'un plus grand nombre d'anticorps primaires au niveau de ZO-1 favoriserait la fixation des anticorps secondaires au niveau de ZO-1. De plus, le deuxième protocole testé, celui de Sun et coll. (2000) n'était pas pour les coupes au cryostat. En adaptant le protocole à du tissu frais, il se peut que certaines étapes ne soient plus valides.

Le marquage des cellules endothéliales cornéennes et des kératocytes en culture a donné des résultats contraires à ceux obtenus avec le tissu frais. En effet, aucune fluorescence n'a été obtenue avec les cellules endothéliales en culture. L'expérience a été reprise

plusieurs fois. Au début, la non perméabilisation des cellules endothéliales pouvait expliquer l'absence de marquage puisque ZO-1 est une protéine cytoplasmique. L'utilisation d'acétone afin de perméabiliser la membrane cytoplasmique laissait espérer l'obtention d'un marquage spécifique au pourtour des cellules. Encore une fois, aucune fluorescence n'a été observée. Un deuxième protocole utilisant la saponine, détergent moins dommageable pour les cellules, n'a pas démontré de fluorescence, suggérant que ZO-1 n'est pas exprimé en culture. L'utilisation de plusieurs protocoles vient du fait que plusieurs équipes de recherche ont obtenu un marquage de leurs cellules endothéliales cornéennes en culture avec un anticorps dirigé contre ZO-1 (Petroll et coll., 1999; Bazzoni et coll., 2000; Itoh et coll., 1999). Concernant les kératocytes, la littérature ne fait pas mention de la présence de jonctions serrées au niveau de ce type cellulaire lorsqu'ils sont inactifs (dans le tissu non blessé) (Muller et coll., 1995). Cependant, il est possible que ZO-1 soit présent dans les kératocytes activés (dans le tissu blessé). À la suite d'une blessure, ZO-1 participerait à la réorganisation du cytosquelette des kératocytes (Taliana et coll., 2001).

Quelques facteurs pourraient expliquer l'absence de fluorescence au niveau des cellules endothéliales cornéennes en culture. L'utilisation d'une lampe au xénon d'une puissance de plus de 75 watts et d'un microscope confocal aurait peut-être permis l'observation de fluorescence au pourtour des cellules endothéliales en culture.

Partie 3 : CONCLUSION

CONCLUSION

Dans cette étude, un modèle de co-culture a permis d'étudier des protéines dont la présence semble régulée par différentes interactions avec d'autres types cellulaires de la cornée ou avec le collagène. Le modèle de co-culture sans collagène dans les *inserts* a permis la croissance et le développement des cellules endothéliales et des kératocytes bovins. Le protocole de solubilisation a permis d'obtenir les protéines insolubles, hydrophiles et hydrophobes en trois fractions distinctes. De nombreux artéfacts sur les 9 mini-gels (absence de bandes et mauvaise coloration) ont probablement été causés par la faible concentration des échantillons. En effet, l'électrophorèse des échantillons lyophilisés a montré une nette amélioration concernant la qualité de la coloration. Par contre, de façon générale, l'électrophorèse des échantillons lyophilisés n'a pas permis d'obtenir plus de détails. En somme, la technique de lyophilisation a permis la concentration des échantillons, mais aurait entraîné une forte dégradation des protéines probablement causée par l'activation de protéases.

La première hypothèse de travail a été confirmée. *Des facteurs protéiques sécrétés par des kératocytes et des cellules endothéliales en co-culture influencent positivement et négativement l'autre type cellulaire présent dans le modèle de co-culture.* Des pistes intéressantes ont permis de suggérer les poids moléculaires de certaines protéines régulées par les interactions cellule-cellule ou cellule-collagène dans la cornée. Il semblerait que le modèle de co-culture n'influencerait pas la différenciation des protéines insolubles étant donné les ressemblances dans les tracés électrophorétiques des protéines insolubles des cellules endothéliales fraîches et en culture. Deux protéines insolubles de 143 kDa et de 160 kDa mériteraient d'être identifiées avec des méthodes appropriées. Ces deux protéines, présentes dans les cellules endothéliales cultivées en co-culture avec des kératocytes sont absentes des tracés électrophorétiques des kératocytes cultivés en présence de cellules endothéliales. Les mêmes observations ont été faites avec deux protéines hydrophiles (91 kDa et 176 kDa). Les kératocytes semblent diminuer la production de ces facteurs qu'ils retrouvent maintenant dans leur environnement. Les facteurs, probablement libérés par les cellules endothéliales atteindraient les kératocytes via le milieu de culture.

Des techniques d'identification devraient également être effectuées sur une protéine hydrophile de 113 kDa. Ce facteur préférentiellement présent dans les cellules endothéliales témoins ne serait pas nécessaire aux cellules en présence de kératocytes. Ces derniers compenseraient peut-être pour l'arrêt de la production de ce facteur par les cellules endothéliales. Un facteur de 76 kDa (échantillon non-lyophilisé) probablement le même que celui de 72 kDa (échantillon lyophilisé) pourrait être influencé positivement par les kératocytes. Des études immunologiques utilisant des anticorps dirigés spécifiquement contre ces facteurs permettraient de vérifier s'il s'agit bien du même facteur.

Les résultats obtenus avec les tracés électrophorétiques des protéines hydrophobes doivent être interprétés avec prudence puisqu'ils n'ont pas fait l'objet de répétition et qu'ils n'ont pas été dosés. Il semblerait que la co-culture exerce quelque influence sur ce type de protéine, mais il faudrait pousser davantage et peut-être développer un protocole plus facile permettant d'obtenir des fractions de plus grand volume.

Le collagène semble avoir plus d'impact sur les protéines hydrophiles que sur les protéines insolubles. Il favoriserait la bonne différenciation des protéines insolubles étant donné que les tracés électrophorétiques sont semblables à ceux des cellules endothéliales fraîches ou cultivées en absence ou en présence de kératocytes. Cependant, il y a diminution du nombre de bandes des protéines hydrophiles lorsque les cellules sont en contact avec le collagène. Une bande de protéines hydrophiles de 97 kDa est présente seulement dans les cellules cultivées en contact avec du collagène. Ce facteur serait impliqué dans les interactions cellules-matrice.

Plusieurs sources d'erreurs ont contribué à rendre difficile l'analyse des différents gels : (1) la présence de protéines dans le milieu de culture via le sérum, (2) la forte dégradation des protéines causée par des températures élevées, (3) la difficulté à récupérer un nombre maximal de cellules lors du protocole de solubilisation, et (4) l'utilisation d'un gel ne permettant pas une bonne séparation des protéines aux petits poids moléculaires.

Finalement, la deuxième hypothèse n'a pu être confirmée. *La protéine des jonctions serrées, ZO-1, n'est pas un bon marqueur des cellules endothéliales cultivées dans les conditions décrites dans ce travail.* L'immunohistochimie d'une protéine des jonctions serrées (ZO-1) n'a pas permis de confirmer que ZO-1 est présent dans les cellules endothéliales en culture dans les conditions de croissance utilisées au laboratoire. L'utilisation d'appareils (lampe au xénon plus puissante et microscope confocal) permettrait peut-être de confirmer l'expression de ZO-1 dans les cellules endothéliales cornéennes en culture.

Ce travail met en évidence l'influence positive ou négative mutuellement exercée par des cellules endothéliales et des kératocytes en co-culture. Il indique des outils afin d'identifier positivement les différentes protéines dont le poids moléculaire est indiqué sur les différents tracés électrophorétiques. Des techniques de *Western Blot* et d'immunobuvardage aideraient à identifier les protéines ciblées. De plus, l'analyse des courbes de densitométrie des tracés électrophorétiques permettrait de quantifier l'abondance relative des protéines de ces poids moléculaires.

BIBLIOGRAPHIE

- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., et Watson, J.D. *Biologie moléculaire de la cellule*. Flammarion, Paris, 1994, 1294 pages.
- Auger, F.A., Rouabhia, M., Goulet, F., Berthod, F., Moulin, V., et Germain, L. Tissue-engineering human skin substitutes developed from collagen-populated hydrated gels: clinical and fundamental applications. *Med Biol Eng Comput* 36:801-812, 1998.
- Bairaktaris, G., Lewis, D., Fullwood., N.J., Nieduszynski, I.A., Marcyniuk, B., Quantock, A.J., et Ridgway, A.E.A. An ultrastructural investigation into proteoglycan distribution in human corneas. *Cornea* 17(4):396-402, 1998.
- Barron, B.A. In: *The Cornea*, (Eds. Smolin, G. et Thoft, R.A.). Little, Brown and Company, Boston, pages 879-896.
- Barry, P.A., Petroll, W.M., Andrews, P.M., Cavanagh, H.D., et Jester, J.V. The spatial organization of corneal endothelial cytoskeletal proteins and their relationship to the apical junctional complex. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 36:1115-1124, 1995.
- Bazzoni, G., Martinez-Estrada, O.M., Orsenigo, F., Cordenonsi, M., Citi, S., et Dejana, E. Interaction of junctional adhesion molecule with the tight junction components ZO-1, cingulin, and occludin. *J Biol Chem* 275: 20520-20526, 2000.
- Bednarz, J., et Engelmann, K. Indication for precursor cells in the adult human corneal endothelium [ARVO Abstract]. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42(4), 2001. Abstract nr 1484.
- Bell, E. Tissue engineering in perspective in : *Principles of Tissue Engineering*, Lanza RP, Langer R, Vacanti J, Academic Press, Californie, 2000, pages xxxv à xli.
- Berman, ER. *Biochemistry of the Eye*, Plenum Press, New-York, 1991, pages 89-150.
- Bonanno, J.A., et Giasson, C. Intracellular pH regulation in fresh and cultured bovine corneal endothelium. I. Na^+/H^+ exchange in the absence and presence of HCO_3^- . II. $\text{Na}^+:\text{HCO}_3^-$ cotransport and $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchange. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33(11): 3058-3079, 1992.
- Borcherding, M.S., Blacik, L.J., Sittig, R.A., Bizzell, J.W., Breen, M., et Weinstein, H.G. Proteoglycans and collagen fibre organization in human corneoscleral tissue. *Exp Eye Res* 21:59-70, 1975.
- Brubaker, R.F., Bourne, W.M., Bachman, L.A., et McLaren, J.W. Ascorbic acid content of the corneal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41:1681-1683, 2000.
- Buck, R.C. Measurement of centripetal migration of normal corneal epithelial cells in the mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 26: 1296-1299, 1985.

Campbell, N.A. *Biologie*, Éditions du Renouveau Pédagogique inc., Saint-Laurent, 1995, pages 789-791.

Chan, K.Y., et Haschke, R.H. Epithelial-stromal interactions: specific stimulation of corneal epithelial cell growth in vitro by factor(s) from cultured stromal fibroblasts. *Exp Eye Res* 36:231-246, 1983.

Charlionet, R., et Rivat, C. *Techniques en électrophorèse : Principes et concepts méthodologiques*. Éditions Inserm, Paris, 1990, 155 pages.

Cogan, D.G., et Kinsey, V.E. The cornea. V. Physiologic aspects. *Arch Ophthalmol* 28:661, 1942.

Cooper, D.L., Baptist, E.W., Enghild, J.J., Isola, N.R., et Klintworth G.K. Bovine corneal protein 54K (BCP54) is a homologue of the tumor-associated (class 3) rat aldehyde dehydrogenase (RATALD). *Gene* 98: 201-207, 1991.

Cordenonsi, M., D'Atri, F., Hammar, E., Parry, D.A.D., Kendrick-Jones, J., Shore, D., et Citi, S. Cingulin contains globular and coiled-coil domains and interacts with ZO-1, ZO-2, ZO-3, and myosin. *J Cell Biol* 147: 1569-1581, 1999.

Davies, J.A., et Garrod, D.R. Molecular aspects of the epithelial phenotype. *BioEssay* (19)8: 699-704, 1997.

Delaigue, O., Arbeille, B., Rossazza, C., Lemesle, M., et Roingeard, P. Quantitative analysis of immunogold labellings of collagen types I, III, IV and VI in healthy and pathological human corneas. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 233: 331-338, 1995.

Delbosc, B., Piquot, X., et Erbezci, M. Physiologie de la cornée : l'hydratation stromale et sa régulation. *J Fr Ophtalmol* 16(2): 129-136, 1993.

Diamond, J.M., et Bossert, W.H. Standing-gradient osmotic flow. A mechanism for coupling of water and solute transport in epithelia. *J Gen Physiol* 50(8):2061-83, 1967.

Dohlman, C.H. The function of the epithelium in health and disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 10: 383-407, 1971.

Dua, H.S., et Azura-Blanco, A. Limbal stem cells of the corneal epithelium. *Surv Ophthalmol* 44: 415-425, 2000.

Dua, H.S. The conjunctiva in corneal epithelial wound healing. *Br J Ophthalmol* 82: 1407-1411, 1998.

Duke-Elder, S., et Wybar, K.C. *The anatomy of the visual system*, The C.V. Mosby Company, St-Louis, 1961, pages 541-558.

- Ebato, B., Friend, J., et Thoft, R.A. Comparaison of central and peripheral human corneal epithelium in tissue culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 28: 1450-1456, 1987.
- Ebihara, N., Mizushima, H., Miyazaki, K., Watanabe, Y., Ikawa, S., Nakayasu, K., et Kanai, A. The functions of exogenous and endogenous laminin-5 on corneal epithelial cells. *Exp Eye Res* 71: 69-79, 2000.
- Egan, C.A., Savre-Train, I., Shay, J.W., Wilson, S.E., et Bourne, W.M. Analysis of telomere lengths in human corneal endothelial cells from donors of different ages. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39 (3): 648-653, 1998.
- Fatt, I., et Weissman, B.A. *Physiology of the Eye: an introduction to the vegetative functions*, Butterworth-Heinemann, Etats-Unis, 1992, 275 pages.
- Fischbarg, J., et Lim, J. Role of cations, anions and carbonic anhydrase in fluid transport across the rabbit corneal endothelium. *J Physiol* 241: 647-675, 1974.
- Fleiszig, S.M.J., Evans, D.J., Do, N., Vallas, V., Shin, S., et Mostov, K.E. Epithelial cell polarity affects susceptibility to *Pseudomonas aeruginosa* invasion and cytotoxicity. *Infect Immun* 65(7): 2861-2867, 1997.
- Friend, J., et Hassell, J.R. Biochemistry of the Cornea. In: *The Cornea*, (Eds. Smolin, G. et Thoft, R.A.). Little, Brown and Company, Boston, pages 47-67.
- Furuse, M., Hirase, T., Itoh, M., Nagafuchi, A., Yonemura, S., Tsukita, Sa., et Tsukita, Sh. Occludin: A novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol* 123: 1777-1788, 1993.
- Furuse, M., Fujita, T., Hiiragi, T., Fujimoto, K., et Tsukita, Sh. Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occluding. *J Cell Biol* 141: 1539-1550, 1998.
- Germain, L., Auger, F.A., et Grandbois, E. Reconstructed human cornea produced in vitro by tissue engineering. *Pathobiology* 67:140-147, 1999.
- Germain, L., Remy-Zolghadri, M., et Auger, F. Tissue engineering of the vascular system: from capillaries to larger blood vessels. *Med Biol Eng Comput* 38(2): 232-240, 2000a.
- Germain, L., Carrier, P., Auger, F.A., Salesse, C., et Guérin, S.L. Can we produce a human corneal equivalent by tissue engineering? *Prog Ret Eye Res* 19(5): 497-527, 2000b.
- Gipson, I.K., et Sugrue, S.P. Cell Biology of the corneal epithelium. In: *Principles and practice of ophthalmology Basic Sciences*, (Eds Albert, D.M. et Jakobiec, F.A.), W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1994, pages 3-16.

Gong, X., Li, E., Klier, G., Huang, Q., Wu, Y., Lei, H., Kumar, N.M., Horwitz, J., et Gilula, N.B. Disruption of $\alpha 3$ connexin gene leads to proteolysis and cataractogenesis in mice. *Cell* 91: 833-843, 1997.

Griffith, M., Osborne, R., Munger, R., Xiong, X., Doillon, C.J., Laycock, N.L.C., Hakim, M., Song, Y., et Watsky, M.A. Functional human corneal equivalents constructed from cell lines. *Science* 286:2169-2172, 1999.

Gumbiner, B., Lowenkopfr, T., et Apatira, D. Identification of a 160-kDa polypeptide that binds to the tight junction protein ZO-1. *Proc Nat Acad Sci* 88: 3460-3464, 1991.

Gupta, A., Monroy, D., Yoshino, K., Huang, K., et Pflugfelder, S.C. Transforming growth factor beta-1 and beta-2 in human tear fluid. *Curr Eye Res* 15: 605-614, 1996.

Haddad, A. Renewal of the rabbit epithelium as investigated by autoradiography after intravitreal injection of ^3H -thymidine. *Cornea* 19(3): 378-383, 2000.

Hamada, R., Giraud, J., Graf, B., et Pouliquen, Y. Étude analytique et statistique des lamelles, des kératocytes, des fibrilles de collagène de la région centrale de la cornée humaine. *Arch Ophtalmol* 32:563-570, 1972.

Hanna, C., et O'Brien, J.E. Cell production and migration in the epithelial layer of the cornea. *Arch. Ophthalmol* 64: 536-539, 1960.

Harding, J.J. *Biochemistry of the Eye*, Chapman & Hall Medical, London, 1997, pages 40-41.

Hart, R.W., et Farrell, R.A. Light scattering in the cornea. *J Opto Soc Amer* 59:766-774, 1969.

Haskins, J., GU, L., Wittchen, E.S., Hibbard, J., et Stevenson, B.R. ZO-3, a novel member of the MAGUK protein family found at the tight junction, interacts with ZO-1 and occluding. *J Cell Biol* 141:199-208, 1998.

Hayashi, K., Hayashi, H., et Hayashi, F. Topographic analysis of the changes in corneal shape due to aging. *Cornea* 14:527-532, 1995.

Hedbys, B.O., Mishima, S., et Maurice, D.M. The inhibition pressure of the corneal stroma. *Exp Eye Res* 2:99-111, 1963.

Hirsch, M., Renard, G., Faure, J.-P., et Pouliquen, Y. Study of the ultrastructure of the rabbit corneal endothelium by the freeze-fracture technique: apical and lateral junctions. *Exp Eye Res* 25:277-288, 1977.

Hogan, M.J., Alvarado, J.A., et Weddell J.S. *Histology of the human eye: an atlas and textbook*. W.B. Saunders, Philadelphie, 1971, pages 102-103.

- Horton, H. R., Moran, L.A., Ochs, R.S., Rawn, J.D., et Scrimgeour, K.G. *Principes de Biochimie, De Boeck-Wesmael, Bruxelles, 1994, pages 317-598.*
- Itoh, M., Furuse, M., Morita, K., Kubato, K., Saitou, M., et Tsukita, S. Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3 with the COOH termini of claudins. *J Cell Biol* 147: 1351-1363, 1999.
- Jacob, T.J.C., Cruwys, S., et Mackie, I.A. Control of cellular proliferation in the bovine cornea: An in vitro study. *Eye* 3:618-625, 1989.
- Jelamskii, S., Cai Sun, X., Herse, P., et Bonanno, J.A. Basolateral Na⁺ -K⁺ -2Cl⁻ cotransporteur in cultured and fresh bovine corneal endothelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41: 488-495, 2000.
- Jentsch, T.J., Keller, S.K., et Wiederholt, M. Ion transport in cultured bovine corneal endothelial cells. *Cur Eye Res* 4 : 361-369, 1985.
- Joyce, N.C. Cell Biology of the corneal endothelium. In: *Principles and practice of ophthalmology Basic Sciences*, (Eds Albert, D.M. et Jakobiec, F.A.), W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1994, pages 17 à 37.
- Kasner, L., Mietz, H., et Green, W.R. Agenesis of Bowman's Layer. *Cornea* 12(2): 163-170, 1993.
- Klyce, S.D., et Beuerman, R.W. Structure and function of the cornea. In: *The Cornea*, (Eds Kaufman, H.E., Barron, B.A., McDonald, M.B.), Butterworth-Heinemann, 1998, pages 3-50.
- Klyce, S.D., et Crosson, C.E. Transport processes across the rabbit corneal epithelium. *Curr Eye Res* 4:323-331, 1985.
- Klyce, S.D. Stromal lactate accumulation can account for corneal oedema osmotically following epithelial hypoxia in the rabbit. *J Physiol* 321: 49-64, 1981.
- Kokawa, N., Sotozono, C., Nishida, K., et Kinoshita, S. High total TGF- β 2 levels in normal human tears. *Curr Eye Res* 15: 341-343, 1996.
- Komai, Y., et Ushiki, T. The three-dimensional organization of collagen fibrils in the human cornea and sclera. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32: 2244-2258, 1991.
- Kurpakus, M.A., Daneshvar, C., Davenport, J., et Kim, A. Human corneal epithelial cell adhesion to laminins. *Curr Eye Res* 19 (2): 106-114, 1999.
- Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685, 1970.

Langham, M.E. Utilization of oxygen by the component layers of the living cornea. *J Physiol Lond* 117: 461-470, 1952.

Le Grand, Y. *Optique physiologique: la dioptrique de l'œil et sa correction*, Éditions de la « Revue d'Optique », Paris, 1964, pages 66 à 68.

Legan, P.K., Collins, J.E., et Garrod, D.R. The molecular biology of desmosome and hemidesmosomes: 'What's in a name?'. *Bioessays* 14(6): 385-393, 1992.

Lemp, M.A., et Mathers, W.D. Renewal of the corneal epithelium. *CLAO Journal* 17: 258-266, 1991.

Lévy, S.G., Moss, J., Sawada, H., Doppinf-Hepenstal, P.J.C., et McCartney, A. The composition of wide-spaced collagen in normal and diseased Descemet's membrane. *Curr Eye Res* 15: 45-52, 1996.

Li, J., Kuang, K., Nielson, S, et Fischbarg, J. Molecular identification and immunolocalization of the water channel protein aquaporin 1 in CECECs. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40: 1288-1292, 1999.

MacCallum, D.K., Lillie, J.H., Scaletta, L.J., Occhino, J.C., Frederick, W.G., et Dejana, E. Bovine corneal endothelium in vitro elaboration and organization of basement membrane. *Exp Cell Res* 139: 1-13, 1982.

Maillet, M. *Les épithéliums de revêtement*, Collection histologique et histophysiologie humaines, Vigot Frères Éditeurs, Paris, 1976, 77 pages.

Malik, N.S., Moss, S.J., Ahmed, N., Furth, A.J., Wall, R.S., et Meek, K.M. Ageing of the human corneal stroma: structure and biochemical changes. *Biochem Biophys Acta* 1138:222-228, 1992.

Maniatis, T., Fritsch, E.F., et Sambrook, J. *Molecular cloning : a laboratory manual*, 2 ième Édition, Cold Spring Harbor, N.J., Cold Spring Harbor Laboratory, 1989, pages 18.55-18.57.

Marieb, E.N. *Anatomie et Physiologie Humaines*, Éditions du Renouveau Pédagogique Inc., St-Laurent, 1993, pages 501- 521.

Marshall, G.E., Konstas, A.G., et Lee, W.R. Immunogold fine structural localization of extracellular matrix components in aged human cornea. *Graefes Arch Clin Exp ophthalmol* 229: 157-163, 1991a.

Marshall, G.E., Konstas, A.G., et Lee, W.R. Immunogold fine structural localization of extracellular matrix components in aged human cornea. *Graefes Arch Clin Exp ophthalmol* 229: 164-171, 1991b.

Maurice, D.M. The structure and transparency of the cornea. *J Physiol* 136:263-286, 1957.

Maurice, D.M. In: *The Eye*, (Eds Davson, H.) volume 1B, 3^{ième} Edition, Academic Press Inc., Orlando, 1984, pages 1 à 158.

Maurice, D.M., Some puzzles in the microscopic structure of the stroma. *J Refract Surg* 15:692-694, 1999.

McLaughlin, B.J., Caldwell, R.B., Sasaki, Y., et Wood, T.O. Freeze-fracture quantitative comparison of rabbit corneal epithelial and endothelial membranes. *Curr Eye Res* 9: 951-961, 1985.

Messent, A.J., Blissett, M.J., Smith, G.L., North, A.J., Magee, A., Foreman, D., Garrod, D.R., et Boulton, M. Expression of a single pair of desmosomal glycoproteins renders the corneal epithelium unique amongst stratified epithelia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41:8-15, 2000.

Minami, Y., Sugihara, H., et Oono, S. Reconstruction of cornea in three-dimensional collagen gel matrix culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34 :2316-2324, 1993.

Moller-Pedersen, T. A comparative study of human corneal keratocytes and endothelial cell density during aging. *Cornea* 16(3): 333-338, 1997.

Moller-Pedersen, T., et Ehlers, N. A three-dimensional study of the human corneal keratocytes density. *Curr Eye Res* 14: 459-464, 1995.

Moller-Pedersen, T., Ledet, T., et Ehlers, N. The keratocyte density of human donor corneas. *Curr Eye Res* 13:163-169, 1994.

Muller, L.J., Pels, L., et Vrensen, G.F.J.M. Novel aspects of the ultrastructural organization of the human corneal keratocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36: 2557-2567, 1995.

Murata, Y., Yoshioka, H., Iyama, K., et Usuka, G. Distribution of type VI collagen in the bovine cornea. *Ophthalmic Res* 21:67-72, 1989.

Nakayasu, K., Tanaka, M., Konomi, H., et Hayashi, T. Distribution of types I, II, III, IV and V collagen in normal and keratoconus corneas. *Ophthalmic Res* 18: 1-10, 1986.

Nava, A., Barton, K., Monroy, D., et Pflugfelder, S.C. The effects of age, gender, and fluid dynamics on the concentration of the tear film epidermal growth factor. *Cornea* 16(4): 430-438, 1997.

Nelles, E., Butzler, C., Jung, D., Temme, A., Gabriel, H-D., Dahl, U., Traub, O., Stumpel, F., et Jungermann, K. *Ophthalmology*, San Francisco, 1983, pages 23-47.

Nerem, R.M. The challenge of imitating nature in: Principles of Tissue Engineering, Lanza RP, Langer R, Vacanti J, Academic Press, Californie, 2000, pages 9 à 15.

Newsome, D.A., Gross, J., et Hassell, J.R. Human corneal contains three distinct collagens. Invest Ophthalmol Vis Sci 22: 376-381, 1982.

Nichols, B.A., Chiappino, M.L., et Dawson, C.R. Demonstration of the mucus layer of the tear film by electron microscopy. Invest Ophthalmol Vis Sci 26: 464-473, 1985.

Nishida, T., Ueda, A., Fukuda, M., Mishima, H., Yasumoto, K., et Otori, T. Interactions of extracellular collagen and corneal fibroblasts : morphologic and biochemical changes of rabbit corneal cells cultured in a collagen matrix. In vitro Cell Dev Biol 24 (10): 1009-1014, 1988.

Olsen, T., et Ehlers, N. The thickness of the human cornea as determined by a specular method. Acta Ophthalmol (Copenh) 62:859-871, 1984.

Orwin, E.J., et Huber, A. In vitro culture characteristics of corneal epithelial, endothelial, and keratocyte cells in a native collagen matrix. Tissue Eng 6(4):307-319, 2000.

Oyster Clyde, W. The Human Eye, Sinauer Associates Inc., Massachusetts, 1999, pages 401 à 405.

Ozanics, V., et Jacobiec, F.A. Prenatal development of the eye and its adnexa. In: Tasman W, ed. Biomedical foundations of the eye, Vol 1. Philadelphie, Pa.: Lippincott-Raven, 1995, 8-15.

Patel, S., Reinstein, D.Z., Silverman, R.H., et Coleman D.J. The Shape of Bowman's Layer in the Human Cornea. J Refract Surg 14: 636-640, 1998.

Panjwani, N., et Baum, J. Rabbit corneal endothelial cell surface glycoproteins. Invest Ophthalmol Vis Sci 26 : 450-456, 1985.

Payrau, P., Pouliquen, Y., Faure, J-P., et Offret, G. La transparence de la cornée. Les mécanismes de ses altérations, Masson et Cie Éditeurs, Paris, 1967, pages 1 à 305.

Pepose, J.S. et Ubels, J.L. In: Physiologie of the eye, (Eds Adler, J), Mosby Year Book Inc., Missouri, 1992, pages 29-44.

Petroll, W.M., Hsu, J.K.W., Bean, J., Cavanagh, D., et Jester, J.V. The spatial organization of apical junctional complex-associated proteins in feline and human corneal endothelium. Curr Eye Res 18(1): 10-19, 1999.

Poole, C.A., Brookes, N.H., et Clover, G.M. Confocal imaging of the keratocytes network in porcine cornea using the fixable vital dye 5-chloromethyl-fluorescein diacetate. *Curr Eye Res* 15:165-174, 1996.

Pouliot, J-F., et Béliveau, R. Extraction of brain capillary membrane proteins using triton X-114. *Biochem. Mol. Biol Int* 34: 1075-1084, 1994.

Pratt, B.M., et Madri, J.A. Immunolocalization of type IV collagen and laminin in nonbasement membrane structures of murine corneal stroma: a light and electron microscopic study. *Lab Invest.* 52:650-656, 1985.

Prydal, J.I., Franc, F., Dilly, P.N., Kerr Muir, M.G., Corbett, M.C., et Marshall, J. Keratocyte density and size in conscious humans by digital image analysis of confocal images. *Eye* 12:337-342, 1998.

Radner, W., Zehetmayer, M., Aufreiter, R., et Mallinger, R., Interlacing and cross-angle distribution of collagen lamellae in the human cornea. *Cornea* 17(5):537-543.

Rae, J.L., Lewno, A.W., Cooper, K., et Gates, P. Dye and electrical coupling between cells of the rabbit corneal endothelium. *Curr Eye Res* 8: 859-869, 1989.

Rao, G., Lohman, L.E., et Aquavella, J.V. Cell size-shape relationship in corneal endothelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 22:271-274, 1982.

Reaume, A.G., De Sousa, P.A., Kulkarni, S., Langille, B.L., Zhu, D., Davies, T.C., Juneja, S.C., Kidder, et G.M., Rossant, J. Cardiac malformation in neonatal mice lacking connexin-43. *Science* 267: 1831-1834, 1995.

Reynolds, J., et Tanford, C. Binding of SDS to proteins at high binding ratios. Possible implications for the state of proteins in biological membranes. *Proc Natl Acad Sci* 66: 1002-1007, 1970.

Ringvold, A., Anderssen, E., et Kjonniksen, I. Distribution of ascorbate in the anterior bovine eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41: 20-23, 2000.

Ryeom, S.W., Paul, D., et Goodenough, D.A. Truncation mutants of the tight junction protein ZO-1 disrupt corneal epithelial cell morphology. *Mol Biol Cell* 11:1687-1696, 2000.

Sandberg-Lall, M., Hagg, P.O., Wahlstrom, I., et Pihlajaniemi, T. Type XIII collagen is widely expressed in the adult and developing human eye and accentuated in the ciliary muscle, the optic nerve and the neural retina. *Exp Eye Res* 70: 401-410, 2000.

Saraux, H., et Biais, B. *Physiologie oculaire*, Masson, Paris, 1983, 419 pages.

Schneeberger, E.E., et Lynch, R.D. Structure, function and regulation of cellular tight junctions. *Am J Physiol* 262: L647-661, 1992.

Schneider, A.I., Maier-Reif, K., et Graeve, T. Constructing an in vitro cornea from cultures of the three specific corneal cell types. *In Vitro Cell Dev-Animal* 35:515-526, 1999.

Shams, N.B.K., Hanninen, L.A., Chaves, H.V., Frangieh, G., Reddy, C.V., Azar, D.T., et Kenyon, K.R. Effect of vitamin A deficiency on the adhesion of rat corneal epithelium and the basement membrane complex. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34: 2646-2654, 1993.

Shaw, A.J. Epithelial cell culture a practical approach. The practical approach series
Sherrard, E.S., et Ng, Y.L. The other side of the corneal endothelium. *Cornea* 9(1):48-54, 1990.

Simon, A.M., Goodenough, D.A., Li, E., et Paul, D.L. Female infertility in mice lacking connexin 37. *Nature* 385: 525-529, 1997.

Simons, K., et Fuller, S.D. Cell surface polarity in epithelia. *Ann Rev Cell Biol* 1:243-288, 1985.

Snyder, M.C., Bergmanson, J.P.G., et Doughty, M.J. Keratocytes : no more the quiet cells. *J Am Optom Assoc* 69:180-187, 1998.

Spooner, J.D. *Ocular anatomy*, Butterworths, Londres, 1972, pages 86-101.

Stanifer, R.M., Snyder, R.K., et Kretzer, F.L. Cornea. In: *Biochemistry of the eye* (Eds Anderson, R.E.), American Academy of Ophthalmology, Californie, 1983, pages 23-48.

Steinberg, T.H. Gap junction function. *Am J Pathol* 152: 851-854, 1998.

Stevenson, B., Siliciano, J.D., Mooseker, M.S., et Goodenough, D.A. Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. *J Cell Biol* 103: 755-766, 1986.

Stiemke, M.M., Roman, R.J., Palmer, M.L., et Edelhauser, H.F. Sodium activity in the aqueous humor and corneal stroma of the rabbit. *Exp Eye Res* 55(3):425-33, 1992.

Stryer, L. *Biochemistry*, W.H. Freeman and Company, third Edition, New York, 1988, pages 261-274.

Taliana, L., Bernstein, A.M., Zekaria, D., et Masur, S.K. ZO-1- A participant in reorganization of adhesion complexes of corneal fibroblasts. [ARVO Abstract]. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42(4), 2001. Abstract nr 1509.

Tei, M., Spurr-Michaud, S.J., Tisdale, A.S. et Gipson, I.K. Vitamin A deficiency alters the expression of mucin genes by the rat ocular surface epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41: 82-88, 2000.

Temme, A., Buchmann, A., Gabriel, H-D., Nelles, E., Schwarz, M., et Willecke, K. High incidence of spontaneous and chemically induced liver tumors in mice deficient for connexin32. *Curr Biol* 7: 713-716, 1997.

Thoft, R.A., et Friend, J. The X, Y, Z hypothesis of corneal epithelial maintenance. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 24: 1442-1443, 1983.

Tortora, G.J., Grabowski, S.R., et Parent, J.C. *Principes d'Anatomie et de Physiologie*, Centre Éducatif et Culturel Inc., Anjou, 1994, pages 874-887.

Tsilimbaris M.K., Lesniewska, E., Lydataki, S., Le Grimellec, C., Goudonnet, J.P., et Pallikaris, I.G. The use of atomic force microscopy for the observation of corneal epithelium surface. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41:680-686, 2000.

Turss, R., Friend, J., et Dohlman, C.H. Effect of a corneal fluid barrier on the nutrition of the epithelium. *Exp Eye Res* 9: 254-259, 1970.

Twining, S.S., Fukuchi, T., Yue, B.Y.J.T., Wilson, P.M., et Zhou, X. α 1-antichymotrypsin is present in and synthesized by the cornea. *Curr Eye Res* 13: 433-439, 1994.

Ueda, A., Nishida, T., Otori, T., et Fujita, H. Electron-microscopic studies on the presence of gap junctions between corneal fibroblasts in rabbits. *Cell Tiss Res* 249:473-475, 1987.

Vacanti, J.P., Vacanti, C.A. The history and scope of tissue engineering. In: *Principles of Tissue Engineering*, (Eds Lanza, R.P., Langer, R., Vacanti, J.), Academic Press, Californie, 2000, pages 3 à 7.

Van Setten, G., et Schultz, G. Transforming growth factor-alpha is a constant component of human tear fluid. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 32: 523-526, 1994.

Wagoner, M.D. Chemical injuries of the eye: Current concepts in pathophysiology and therapy. *Surv Ophthalmol* 41: 275-313, 1997.

Wagoner, M.D., et Kenyon, K.R. In: *Principles and practice of ophthalmology Clinical Practice*, Volume 1 (Eds Albert, D.M. et Jakobiec, F.A.), W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1994, pages 234,235.

Watsky, M.A. Keratocytes gap junctional communication in normal and wounded rabbit corneas and human corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36:2568-2576, 1995.

Watsky, M.A., McCartney, M.D., McLaughlin, B.J., et Edelhauser, H.F. Corneal endothelial junctions and the effect of ouabain. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31: 933-941, 1990.

Wee, W.R., Wang, X.W., et McDonnell, P.J. Effect of artificial tears on cultured keratocytes in vitro. *Cornea* 14 (3): 273-279, 1995.

Wessel, H., Anderson, S., Fite, D., Halvas, E., Hempel, J., et SundarRaj, N. Type XII collagen contributes to diversities in the human corneal and limbal extracellular matrices. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38: 2408-2422, 1997.

Wheater, P.R., Burkitt, H.G., et Daniels, V.G. *Functional Histology*, Churchill Livingstone Inc., New-York, 1987.

Whikehart, D.R. *Biochemistry of the Eye*, Butterworth-Heinemann, 1994, pages 53-86.

Whikehart, D.R., Register, S.J., Chang, Q., et Montgomery, B. Relationship of telomeres and p53 in aging bovine corneal endothelial cell cultures. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41(5): 1070-1075, 2000.

Williams, K.K., et Watsky, M.A. Dye spread through gap junctions in the corneal epithelium of rabbit. *Curr Eye Res* 16, 445-452, 1997.

Wilson, S.E., Liu, J.J., et Mohan, R.R. Stromal-epithelial interactions in the cornea. *Prog Ret Eye Res* 18(3): 293-309, 1999.

Winkler, B., Riley, M., Peters, M., et Williams, F. Chloride is required for fluid transport by the rabbit corneal endothelium. *Am J Physiol* 262:C1176-1174, 1992.

Yanoff, M., et Cameron J.D. Human cornea organ cultures: epithelial-endothelial interactions. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 16 (4): 269-273, 1977.

Yeaman, C., Grindstaff, K.K., et Nelson, W.J. New perspectives on mechanisms involved in generating epithelial cell polarity. *Physiol Rev* 79: 73-98, 1999.

Zielasek, J., Toyka, K.V., Dermietzel, R., et Willecke, K. Defective propagation of signals generated by sympathetic nerve stimulation in the liver of connexin32-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci* 93: 9565-9570, 1996.

Zieske, J.D., Mason V.S., Wasson, M.E., Meunier, S.F., Nolte, C.J.M., Fukai, N., Olsen, B.R., et Parenteau, N.L. Basement membrane assembly and differentiation of cultured corneal cells: Importance of culture environment and endothelial cell interaction. *Exp Cell Res* 214: 621-633, 1994.

ANNEXES

ANNEXE I

Isolation des cellules bovines cornéennes

A-Préparation des yeux de bœufs pour l'excision des cornées

- 1-Trimer les yeux, enlever le gras
- 2-Rincer les yeux dans un bécher de saline propre
- 3-Mettre les yeux dans un bécher contenant de la saline et des antibiotiques
- 4-Souffler de l'air dans le bécher avec la pompe à aquarium
- 5-Attendre environ 10-20 minutes
- 6-Sous la hotte, faire une incision avec une lame de rasoir sur le côté de l'œil dans la sclère
- 7-Découper l'œil de manière à laisser environ 5 mm de sclérotique autour de la cornée
- 8-Avec des pinces, décoller le corps ciliaire afin d'obtenir une cornée propre

B-Isolation des cellules endothéliales

- 1-Déposer les cornées, l'endothélium à la surface du support
- 2-Recouvrir l'endothélium avec de la trypsine
- 3-Incuber 5 minutes à 37°C
- 4-Gratter les cellules avec une spatule
- 5-Aspirer les cellules avec une pipette Pasteur et déposer la suspension cellulaire de deux cornées dans un tube à centrifugation contenant 2 ml de milieu de culture 25%.
- 6-Centrifuger à basse vitesse (température de la pièce) 5 minutes pour que les cellules endothéliales sédimentent
- 7-À l'aide d'une pipette Pasteur, resuspendre les cellules dans 2 ml de milieu de culture 25% et transférer la suspension cellulaire dans un T-25 stérile

C-Isolation des cellules épithéliales

- 1-Déposer les cornées, l'épithélium à la surface du support
- 2-Recouvrir l'épithélium de dispase
- 3-Incuber 5 minutes à 37°C
- 4-Gratter les cellules avec un scalpel
- 5-Aspirer les cellules avec une pipette Pasteur et déposer la suspension cellulaire de deux cornées dans un tube à centrifugation contenant 2 ml de milieu de culture 25%.
- 6-Centrifuger à basse vitesse (température de la pièce) 5 minutes pour que les cellules endothéliales sédimentent
- 7-À l'aide d'une pipette Pasteur, resuspendre les cellules dans 2 ml de milieu de culture 25% et transférer la suspension cellulaire dans un T-25 stérile

D-Isolation des kératocytes : technique de l'explant

- 1-Enlever les cellules endothéliales à l'aide de la trypsine (étape B)
- 2-Enlever les cellules épithéliales à l'aide de la dispase (étape C)
- 3-Bien gratter les deux faces du stroma et nettoyer avec de la saline stérile
- 4-Couper le morceau de stroma en plusieurs petits morceaux
- 5-Déposer un morceau de stroma dans un T-25 contenant du milieu de culture 25%
- 6-Enlever l'explant environ 5 jours plus tard

ANNEXE II

La réalisation d'un montage stroma-endothélium avec collagène et anneau de papier

A-Trypsinisation des kératocytes

- 1-Choisir un T-25 où les kératocytes sont à confluence
- 2-Enlever le milieu de culture du T-25
- 3-Mettre environ 1,5 ml de trypsine dans le T-25
- 4-Incuber 5 minutes
- 5-Gratter avec une spatule en plastique le fond du T-25
- 6-Recueillir la suspension cellulaire avec une pipette Pasteur et la déposer dans un tube à centrifugation contenant 2 ml du milieu de culture 25%
- 7-Centrifuger à basse vitesse pendant 5 minutes à la température de la pièce
- 8-Enlever le surnageant et resuspendre le culot dans 2 ml de milieu de culture 25%
- 9-Déterminer la quantité de cellules par ml à l'aide de l'hématimètre
- 10-Déterminer le volume de la suspension cellulaire qui contient 5×10^4 cellules/ml

B-Préparation du gel de collagène

La recette de base est la suivante :

- 8 volumes de collagène froid
 - 1 volume de NaOH 0.01M
 - 1 volume de milieu de culture 10X sans sérum
- 1-Prélever le volume de collagène proportionnel au nombre de montage
 - 2-Ajouter le NaOH et le milieu de culture 10X
 - 3-Mettre sur la plaque agitatrice
 - 4-Ajuster le pH, en ajoutant du KCl ou du NaOH filtré, à $7,4 \pm 0,02$

C-Incorporation des kératocytes dans le gel et coulage dans l'anneau

- 1-Déposer un papier Whatman #4 découpé en forme de beigne dans un pétris Falcon (35mm de diamètre) et ajouter 1 ml de la solution de collagène sans kératocytes. Ce montage sert de témoin
- 2-Déposer le volume de cellules contenant 5×10^4 cellules/ml dans 1ml de la solution de collagène et le déposer au centre de l'anneau et s'assurer que le collagène couvre bien l'intérieur de l'anneau
- 3-Laisser les montages attendre 15 minutes sous la hotte
- 4-Mettre dans l'incubateur pour environ 30 à 45 minutes
- 5-Déposer du milieu de culture 25% sur les gels

D-Trypsinisation des cellules endothéliales

- 1-Procéder comme pour les kératocytes (étape A)
- 2-Déterminer le volume de la suspension cellulaire qui contient 3×10^5 cellules/ml

E-Ajout des cellules endothéliales aux montages

- 1-Déposer un *insert* sur chaque gel
- 2-Mettre le volume équivalent à 3×10^5 cellules/ml dans chacun des *inserts*
- 3-Ajouter du milieu de culture 25% dans l'*insert* et incuber à 37°C

ANNEXE III
La réalisation d'un montage stroma-endothélium
avec collagène dans des *inserts*

A-Trypsinisation des kératocytes

- 1-Choisir un T-25 où les kératocytes sont à confluence
- 2-Enlever le milieu de culture du T-25
- 3-Mettre environ 1,5 ml de trypsine dans le T-25
- 4-Incuber 5 minutes
- 5-Gratter avec une spatule en plastique le fond du T-25
- 6-Recueillir la suspension cellulaire avec une pipette Pasteur et la déposer dans un tube à centrifugation contenant 2 ml du milieu de culture 25%
- 7-Centrifuger à basse vitesse pendant 5 minutes à la température de la pièce
- 8-Enlever le surnageant et resuspendre le culot dans 2 ml de milieu de culture 25%
- 9-Déterminer la quantité de cellules par ml à l'aide de l'hématimètre
- 10-Déterminer le volume de la suspension cellulaire qui contient 5×10^4 cellules/ml

B-Préparation du gel de collagène

La recette de base est la suivante :

- 8 volumes de collagène froid
- 1 volume de NaOH 0.01M
- 1 volume de milieu de culture 10X sans sérum

- 1-Prélever le volume de collagène proportionnel au nombre de montage
- 2-Ajouter le NaOH et le milieu de culture 10X
- 3-Mettre sur la plaque agitatrice
- 4-Ajuster le pH, en ajoutant du KCl ou du NaOH filtré, à $7,4 \pm 0,02$

C-Incorporation du gel dans les inserts

- 1-Déposer stérilement 12 *inserts* dans 2 plaques de 6 puits
- 2-Déposer 6 ml de la solution de collagène dans un tube Falcon 15 ml
- 3-Ajouter le même volume de milieu de culture 10% que le volume de kératocytes qui sera ajouter au collagène pour faire les montages de co-culture (étape C-6)
- 4-Vortexer
- 5-Déposer 1 ml de collagène sans kératocytes dans 6 *inserts* à titre de témoin
- 6-Déposer le volume de kératocytes qui permettra d'obtenir la bonne quantité de kératocytes par millilitre dans 6 ml de la solution de collagène (étape A-10)
- 7-Vortexer
- 8-Déposer 1 ml de collagène contenant les kératocytes dans 6 *inserts* à titre de montage stroma-endothélium
- 9-Incuber à 37°C

D-Trypsinisation des cellules endothéliales

1-Procéder comme pour les kératocytes (étape A)

2-Déterminer le volume de la suspension cellulaire qui contient 3×10^5 cellules/ml

E-Ajout des cellules endothéliales aux montages

***FAIRE CETTE ÉTAPE EN FIN DE JOURNÉE QUAND LES GELS SONT GÉLIFIÉS

1-Pipetter le volume qui contient 3×10^5 cellules endothéliales/ml

2-Déposer le même volume dans le fond de chacun des 12 puits

3-Ajouter 1 ml de milieu de culture 10 % dans le fond de chacun des puits et s'assurer qu'il n'y a pas de bulles d'air sous les inserts

4-Incuber les montages à 37°C

ANNEXE IV
La réalisation de montage stroma-endothélium
sans collagène dans les *inserts*

A-Trypsinisation des kératocytes

- 1-Choisir un T-25 où les kératocytes sont à confluence
- 2-Enlever le milieu de culture du T-25
- 3-Mettre environ 1,5 ml de trypsine dans le T-25
- 4-Incuber 5 minutes
- 5-Gratter avec une spatule en plastique le fond du T-25
- 6-Recueillir la suspension cellulaire avec une pipette Pasteur et la déposer dans un tube à centrifugation contenant 2 ml du milieu de culture 25%
- 7-Centrifuger à basse vitesse pendant 5 minutes à la température de la pièce
- 8-Enlever le surnageant et resuspendre le culot dans 2 ml de milieu de culture 25%
- 9-Déterminer la quantité de cellules par ml à l'aide de l'hématimètre
- 10-Déterminer le volume de la suspension cellulaire qui contient 5×10^4 cellules/ml

B-Trypsinisation des cellules endothéliales

- 1-Procéder comme pour les kératocytes (étape A)
- 2-Déterminer le volume de la suspension cellulaire qui contient 3×10^5 cellules/ml

C-Co-culture des deux types cellulaires

- 1-Déposer le volume de cellules endothéliales contenant 3×10^5 cellules/ml dans le fond de chacun des puits
- 2-Ajouter 2 ml de milieu de culture 25% dans les puits
- 3-Déposer le volume de kératocytes contenant 5×10^4 cellules/ml dans chacun des *inserts*
- 4-Ajouter 1 ml de milieu de culture 25% dans l'*insert*
- 5-Préparer les témoins endothélium en déposant seulement des cellules endothéliales dans le fond de quelques puits sans ajouter de kératocytes dans l'*insert*
- 6-Préparer les témoins kératocytes en déposant seulement des kératocytes dans quelques *inserts* sans ajouter de cellules endothéliales dans le fond des puits correspondant
- 7-Incuber à 37°C

ANNEXE V
La solubilisation des protéines membranaires

- 1-Aspirer le milieu de culture contenu dans les plaques
- 2-Découper les membranes des *inserts* contenant les kératocytes et les déposer, les cellules sur le dessus, dans une nouvelle plaque
- 3-Déposer 1 ml de PBS incomplete contenant de l'EDTA 0.1% dans la moitié des puits où il y a des cellules endothéliales et attendre 10 minutes
- 4-Gratter le fond des puits avec une spatule blanches
- 5-Utiliser le même ml pour gratter les cellules d'un deuxième puit possédant le même type de montage ou de témoin
- 6-Gratter 3 membranes et mettre dans l'eppendorf
- 7-Centrifuger à 1200g pour 10 minutes et jeter le surnageant à 4°C
- 8-Conserv**er le culot
- 9-Resuspendre le culot dans 1 ml de tampon physiologique contenant 15% d'inhibiteurs de protéases
- 10-Homogénéiser les cellules à 4°C pendant 15 secondes (5000RPM = vitesse 1) avec homogénéisateur électrique
- 11-Centrifuger à 800g pendant 5 minutes à 4°C
- 12-Conserv**er le surnageant dans des nouveaux Eppendorfs
- 13-Ajouter 200 µl de tampon physiologique contenant 2% w/v de Triton X-114
- 14-Équilibrer les tubes avec du tampon physiologique sur la balance analytique et attendre 30 minutes sur la glace
- 15-Ultra-centrifuger à 100 000g pendant 30 minutes à 4°C
- 16-Transférer les surnageants dans de nouveaux Eppendorfs
- 17-Resuspendre le culot dans 1ml de tampon physiologique
- 18-LE CULOT EST PRET POUR LE DOSAGE PROTÉIQUE (mettre au frigo les Eppendorfs)**

- 19-Déterminer le volume de surnageant qu'il reste après l'ultracentrifugation
- 20-Étendre le surnageant sur un lit de sucrose (1 volume de surnageant pour 9 volumes de sucrose) dans des tubes à centrifugation
- 21-Incuber à 30°C pendant 10 minutes dans le bain-marie
- 22-Centrifuger le mélange surnageant + sucrose à 2 000g pendant 5 minutes à 30°C
- 23-La phase supérieure est séparée de la phase inférieure à l'aide d'une pipette Pasteur et déposée dans des tubes à centrifugation.
- 24-LA PHASE SUPÉRIEURE, EST PRETE POUR LE DOSAGE PROTÉIQUE (mettre au frigo les tubes à centrifugation)**
- 25-Déterminer le volume de la phase inférieure et transférer dans des tubes à fond rond
- 26-Calculer 5g de Bio-Beads par 25ml de suspension cellulaire
- 27-Ajouter les billes à la phase inférieure riche en détergent
- 28-Agiter pour 90-120 minutes à température de la pièce sur le vortex
- 29-Aspirer la suspension protéique en prenant le moins de billes possible et déposer dans des tubes à centrifugation
- 30-Centrifuger à base vitesse pendant 5 minutes à la température de la pièce pour faire descendre les billes
- 31-Retirer le surnageant en laissant les billes dans le fond et déposer dans de nouveaux Eppendorfs
- 32-LA PHASE INFÉRIEURE EST PRETE POUR LE DOSAGE PROTÉIQUE (mettre au frigo les Eppendorfs)**

ANNEXE VI

La coloration au nitrate d'argent des gels d'acrylamide

La technique de coloration au nitrate d'argent utilisée provient de VWR. Il s'agit d'un ensemble incluant tous les réactifs nécessaires à la réalisation de la coloration. L'ensemble inclus 6 bouteilles numérotées 1 à 6. Les volumes mentionnés ci-dessous sont pour 1 seul gel. Les différentes étapes se font sous agitation.

*La solution de fixation #1

- 80 ml d'eau déionisée
- 100 ml de méthanol
- 20 ml d'acide acétique glaciale

*La solution de fixation #2

- 110 ml d'eau déionisée
- 60 ml de méthanol
- 20 ml d'acide acétique glacial
- 10 ml de la bouteille 1

*La solution de pré-traitement

- 90 ml d'eau déionisée
- 100 ml de méthanol
- 10 ml de la bouteille 2

*Colorant à l'argent

- Mélanger 10 ml de la bouteille 3 avec 10 ml de la bouteille 4
- Ajouter 180 ml d'eau déionisée

*Solution d'arrêt

- 190 ml d'eau déionisée
- 10 ml de la bouteille 5

*Stopper

- 10 ml de la bouteille 6 directement dans le développeur

Procédure de coloration pour 1 gel de 0,75 ou de 1,5 mm d'épaisseur

| Étapes | Temps d'incubation | |
|-------------------------------|--------------------|-------------------|
| | Gels 0,75 mm (min) | Gels 1,5 mm (min) |
| 1- Solution de fixation #1 | 10 | 20 |
| 2- Solution de fixation #2 | 15 | 30 |
| 3- Solution de pré-traitement | 10 | 20 |
| 4- Rinçage à l'eau | 5 | 10 |
| 5- Colorant à l'argent | 15 | 25 |
| 6- Rinçages à l'eau | 3 x 2 | 3 x 5 |
| 7- Développeur | 5-10 | 5-10 |
| 8- Arrêt | | |

ANNEXE VII
L'immunohistochimie indirecte avec ZO-1
coupes au cryostat

La fixation du tissu

- 1-Déposer la cornée dans de la paraformaldéhyde 1% pendant 30 minutes à 4°C
 - *Recette pour la paraformaldéhyde 1%
 - 10g de paraformaldéhyde dans 300-400ml d'eau à 70°C
 - Ajouter quelques gouttes de NaOH 10N pour éclaircir
 - Compléter à 500ml avec de l'eau et ajouter 500ml de PBS 2x
- 2-Retirer la cornée et la couper en 6 morceaux
- 3-Rincer les morceaux avec du tampon phosphate ou du tampon physiologique
- 4-Déposer quelques morceaux dans une solution de sucrose 20% pour 45 minutes
 - *Recette pour la solution de sucrose 20% (20g de sucrose et 100ml de PBS).
- 5-Déposer les morceaux cryo-protégés et ceux qui ne le sont pas sur un papier absorbant
- 6-Mettre du Embedding Matrix pour le cryostat dans une petite cuvette et déposer les morceaux debout dans le fond de la cuvette
- 7-Congeler les cuvettes
- 8-Faire les coupes à l'aide du cryostat et déposer les coupes sur des lames gélatinées

L'immunohistochimie indirecte avec ZO-1

A) Première technique

- 1-Bloquer les sites libres en incubant les sections dans lait écrémé 5% dans PBS pendant 30 minutes
- 2-Enlever le lait et rincer les lames avec du tampon physiologique
- 3-Incuber les coupes avec l'anticorps primaire 1 :200 pendant 1 heure, les témoins reçoivent du PBS
- 4-Retirer l'anticorps primaire et effectuer plusieurs rinçages des coupes avec du tampon physiologique
- 5-Incuber les coupes avec l'anticorps secondaire 1 :100 pendant 1 heure
- 6-Retirer l'anticorps secondaire et effectuer plusieurs rinçages des coupes avec du tampon physiologique
- 7-Observer les sections au microscope

B) Deuxième technique

1-Bloquer les sites libre avec du lait écrémé 5% dans du PBS contenant 0,01% de saponine et 50 mM de NH_4Cl pendant 1 heure

2-Laver les coupes 3 fois avec du PBS à 37°C

3-Déposer l'anticorps primaire 1 :200 sur les coupes et du PBS sur les coupes témoins. Attendre 1 heure avec agitation

4-Laver les cellules 3 fois pendant 15 minutes avec du PBS contenant 0,01% de saponine

5-Ajouter l'anticorps secondaire 1 :500 ou 1 :1000 pour une heure avec agitation

6-Rincer les cellules avec du PBS à 37°C

7-Observer au microscope

ANNEXE VIII
L'immunohistochimie indirecte avec ZO-1
marquage de cellules en culture

A) Première technique

- 1-Trypsiniser un T-25 de cellules endothéliales et un T-25 de kératocytes en suivant la procédure de l'annexe I
- 2-Déposer les cellules endothéliales dans trois puits et les kératocytes dans les trois autres d'une plaque à 6 puits
- 3-Changer le milieu de culture au deux jours jusqu'à ce que les cellules aient atteint la confluence
- 4-Enlever le milieu de culture des 6 puits et incuber dans de l'acétone à -20°C pendant 5 minutes
- 5-Bloquer les sites libres en incubant avec du lait écrémé 5% pendant 30 minutes
- 6-Enlever le lait et rincer avec du tampon phosphate
- 7-Déposer l'anticorps primaire 1 :200 dans deux puits de cellules endothéliales et deux puits de kératocytes. Déposer du tampon phosphate dans les deux puits restant à titre de témoin
- 8-Attendre 1 heure avec agitation
- 9-Enlever l'anticorps primaire
- 10-Rincer plusieurs fois avec du tampon phosphate
- 11-Ajouter l'anticorps secondaire 1 :100 dans tous les puits de la plaque
- 12-Attendre 1 heure avec agitation
- 13-Enlever l'anticorps secondaire
- 14-Rincer plusieurs fois avec du tampon phosphate
- 15-Observer au microscope

B)Deuxième technique

- 1-Trypsiniser un T-25 de cellules endothéliales et un T-25 de kératocytes en suivant la procédure de l'annexe I
- 2-Déposer les cellules endothéliales dans trois puits et les kératocytes dans les trois autres d'une plaque à 6 puits
- 3-Changer les milieu de culture au deux jours jusqu'à ce que les cellules aient attend la confluence
- 4-Laver 3 fois les cellules avec du PBS à 37°C
- 5-Fixer les cellules 30 minutes avec agitation dans du tampon PLP à 37°C (2% paraformaldéhyde, 75 mM de lysine, 10 mM de périodate de sodium, 45 mM de phosphate de sodium, pH 7,4)
- 6-Laver les cellules 3 fois avec du PBS à 37°C
- 7-Déposer du PBS contenant 1% de SDS sur les cellules pendant 5 minutes
- 8-Laver les cellules 3 fois avec du PBS à 37°C
- 9-Bloquer les sites libre avec du lait écrémé 5% dans du PBS contenant 0,01% de saponine et 50 mM de NH₄Cl pendant 1 heure
- 10-Laver les cellules 3 fois avec du PBS à 37°C
- 11-Déposer l'anticorps primaire 1 :200 dans les puits à l'étude et du PBS dans les puits témoins. Attendre 1 heure avec agitation
- 12-Laver les cellules 3 fois pendant 15 minutes avec du PBS contenant 0,01% de saponine
- 13-Ajouter l'anticorps secondaire 1 :500 ou 1 :1000 pour une heure avec agitation
- 14-Rincer les cellules avec du PBS
- 15-Observer au microscope