



Université de Montréal

**Fonctionnalité *in vivo* d'un endothélium cornéen  
reconstitué par injection de cellules endothéliales  
cornéennes dans la chambre antérieure d'un modèle félin**

par  
Cristina Bostan

Département de sciences biomédicales  
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté de médecine  
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise  
en Sciences biomédicales  
option générale

Décembre, 2015

© Cristina Bostan, 2015



## Résumé

**Introduction** : Malgré leur état non-prolifératif *in vivo*, les cellules endothéliales cornéennes (CEC) peuvent être amplifiées *in vitro*. Leur transplantation subséquente par injection intracamérale pourrait surmonter la pénurie de tissus associée à l'allo-greffe traditionnelle – l'unique traitement définitif disponible pour les endothéliopathies cornéennes.

**Objectif** : Évaluer la fonctionnalité d'un endothélium cornéen reconstitué par injection de CEC dans la chambre antérieure du félin.

**Méthodes** : Les yeux droits de 16 animaux ont été opérés. Huit ont été désendothélialisés centralement avec injection de  $2 \times 10^5$  (n=4) ou  $1 \times 10^6$  (n=4) CEC félines supplémentées avec Y-27632 et marquées avec SP-DiOC<sub>18</sub>(3). Deux ont été désendothélialisés complètement et injectés avec  $1 \times 10^6$  CEC et Y-27632. Six contrôles ont été désendothélialisés centralement (n=3) ou complètement (n=3) et injectés avec Y-27632 sans CEC. La performance clinique, l'intégrité anatomique, le phénotype fonctionnel et l'expression de SP-DiOC<sub>18</sub>(3) du nouvel endothélium ont été étudiés.

**Résultats** : Les cornées greffées avec  $2 \times 10^5$  CEC et les contrôles désendothélialisés centralement ont réussi le mieux cliniquement. Les contrôles désendothélialisés complètement sont restés opaques. L'histopathologie a révélé une monocouche endothéliale fonctionnelle dans les cornées greffées avec  $2 \times 10^5$  CEC et les contrôles désendothélialisés centralement, une multicouche endothéliale non-fonctionnelle dans les cornées désendothélialisées centralement et greffées avec  $1 \times 10^6$  CEC, et un endothélium fibrotique non-fonctionnel dans les cornées désendothélialisées complètement. L'expression de SP-DiOC<sub>18</sub>(3) était rare dans les greffes.

**Conclusion** : La thérapie par injection cellulaire a reconstitué un endothélium partiellement fonctionnel, auquel les CEC injectées n'ont contribué que peu. L'injection de Y-27632 sans CEC a reconstitué l'endothélium le plus sain. Des études additionnelles investiguant l'effet thérapeutique de Y-27632 seul sont justifiées.

**Mots-clés** : cellules endothéliales cornéennes, thérapie par injection cellulaire, kératoplastie endothéliale, transplantation cornéenne, Y-27632.

## **Abstract**

**Introduction :** Despite their growth arrest *in vivo*, corneal endothelial cells (CEC) can be amplified *in vitro*. Their subsequent transplantation by cell-injection therapy could overcome the tissue scarcity associated with traditional allo-transplantation, which is the only currently available treatment for irreversible corneal endothelial failure.

**Objective :** To evaluate the functionality of a corneal endothelium reconstituted by cell-injection therapy in the feline.

**Methods :** The right eyes of 16 animals underwent surgery. Eight underwent central endothelial scraping and injection with  $2 \times 10^5$  (n=4) or  $1 \times 10^6$  (n=4) feline CEC supplemented with Y-27632 and labeled with SP-DiOC<sub>18</sub>(3). After total scraping, two eyes were injected with  $1 \times 10^6$  labeled CEC and Y-27632. The central (n=3) or entire (n=3) endothelium was scraped in six controls followed by Y-27632 injection without CEC. Outcomes included clinical performance, anatomical integrity, functional phenotype and SP-DiOC<sub>18</sub>(3) expression of the new endothelium.

**Results:** Corneas grafted with  $2 \times 10^5$  CEC and centrally scraped controls performed the best clinically. Entirely scraped controls remained hazy and thick. Histopathology revealed a confluent, functional endothelial monolayer in corneas grafted with  $2 \times 10^5$  CEC and centrally scraped controls, a non-uniform, non-functional endothelial multilayer in centrally scraped corneas grafted with  $1 \times 10^6$  CEC, and a non-functional fibrotic endothelium in entirely scraped grafts and controls. SP-DiOC<sub>18</sub>(3) was scarce in grafts and absent in controls.

**Conclusion :** Cell-injection therapy reconstituted an incompletely functional endothelium, to which injected CEC contributed little. Y-27632 injection without CEC reconstituted the healthiest endothelium. Further studies investigating the therapeutic effect of Y-27632 alone are warranted.

**Keywords:** corneal endothelial cells, cell-injection therapy, endothelial keratoplasty, corneal transplantation, Y-27632.

# Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Table des matières.....	iii
Liste des tableaux.....	vi
Liste des figures.....	vii
Liste des initiales.....	ix
Liste des abbréviations.....	x
Avant-propos et remerciements.....	xi
PARTIE I – INTRODUCTION.....	1
1. La cornée humaine normale.....	2
1.1. Forme et structure cornéenne.....	2
1.1.1. Epithélium.....	4
1.1.2. Membrane de Bowman.....	6
1.1.3. Stroma.....	7
1.1.4. Membrane de Descemet.....	10
1.1.5. Endothélium.....	11
1.2. La physiologie derrière la transparence cornéenne.....	15
1.2.1. Les facteurs déterminant la transparence cornéenne.....	16
1.2.2. Le rôle de l'endothélium cornéen.....	18
2. Défaillance endothéliale et perte de la transparence cornéenne.....	20
2.1. Physiopathologie de la décompensation endothéliale.....	20
2.2. Entités cliniques.....	21
2.3. Approches thérapeutiques actuelles et leurs limitations.....	24
2.4. Tendances et indications pour la kératoplastie endothéliale.....	29
2.5. Le dilemme de la pénurie de tissu cornéen donneur.....	30
3. La kératoplastie endothéliale avec CEC cultivées.....	33

3.1. Prolifération <i>in vitro</i> des CEC humaines .....	33
3.1.1. Protocoles d'isolement des CEC.....	34
3.1.2. Protocoles de culture de CEC .....	35
3.2. Monocouches endothéliales construites par génie tissulaire .....	38
3.3. Injection intracamérale de CEC cultivées.....	40
3.3.1. Avantages potentiels .....	40
3.3.2. Études antérieures de thérapie par injection intracamérale de CEC .....	40
4. Objectifs de l'étude .....	46
PARTIE II – PRÉREQUIS .....	47
1. Choix des paramètres à étudier .....	48
2. Choix du modèle animal .....	51
2.1. Rongeurs et lapins.....	51
2.2. Le modèle porcin .....	52
2.3. Le primate non-humain.....	52
2.4. Le modèle félin .....	53
3. Préparation des CEC félines pour la transplantation .....	56
3.1. Isolement et culture.....	56
3.2. Mise en suspension des CEC cultivées.....	56
4. Établissement du protocole chirurgical.....	58
4.1. Établissement du modèle de déficience endothéliale.....	58
4.1.1. Choix de la technique de désendothélialisation .....	58
4.1.2. Surface désendothélialisée .....	60
4.1.3. Optimisation de la technique de désendothélialisation.....	61
4.2. Choix du nombre de CEC à injecter .....	64
4.3. Choix des stratégies d'augmentation de l'adhérence des CEC.....	64
4.3.1. Concentration d'inhibiteur de ROCK .....	64
4.3.2. Durée de positionnement cornée-vers-le-bas.....	66
4.4. Contrôle de l'inflammation intraoculaire chez le félin .....	68
4.5. Technique d'injection de CEC dans la chambre antérieure.....	69

5. CEC félines ensemencées <i>in vitro</i> .....	70
PARTIE III – ARTICLE ORIGINAL .....	78
Abstract .....	81
Introduction.....	82
Materials and methods .....	84
Results.....	89
Discussion .....	94
Acknowledgements.....	99
PARTIE IV –DISCUSSION GÉNÉRALE, PERSPECTIVES ET CONCLUSION.....	118
1. Discussion générale .....	119
2. Perspectives.....	127
3. Conclusion .....	129
Références.....	i
Annexe 1: Protocole de mise en suspension de CEC cultivées .....	xxiii
Annexe 2: Protocole chirurgical .....	xxvi
Annexe 3: Feuillet de suivi clinique .....	xxviii
Annexe 4: Lexique des classifications pour le suivi clinique .....	xxx
Annexe 5: Protocole de photographie à la lampe à fente.....	xxxii
Annexe 6: Distribution du tissu cornéen pour les tests histopathologiques.....	xxxiii
Annexe 7: Prise de photos au stéréomicroscope.....	xxxiv
Annexe 8: Protocole de préparation de photos pour études morphométriques .....	xxxvi



## Liste des tableaux

<b>Tableau 1.</b> Milieux de culture pour les CEC humaines.....	37
<b>Tableau 2.</b> Thérapie par injection intracamérale de CEC : revue de la littérature.....	43
<b>Tableau 3.</b> Caractéristiques des différents modèles animaux à l'âge adulte.....	55
<b>Table A1.</b> Endothelial cell counts and morphology.....	100
<b>Table S1.</b> Experimental design.....	101

## Liste des figures

<b>Figure 1.</b> Coupe sagittale d'un œil humain. <sup>2</sup> .....	2
<b>Figure 2.</b> Cornée humaine normale.....	3
<b>Figure 3.</b> Cornée humaine vue en section optique à la lampe à fente.....	4
<b>Figure 4.</b> Les couches cellulaires de l'épithélium cornéen.....	6
<b>Figure 5.</b> Microscopie électronique à transmission du stroma cornéen.....	9
<b>Figure 6.</b> Organisation préférentielle des lamelles de collagène dans la cornée humaine.....	10
<b>Figure 7.</b> Microscopie électronique à transmission de la membrane de Descemet.....	11
<b>Figure 8.</b> Endothélium cornéen normal.....	14
<b>Figure 9.</b> Réduction de la densité endothéliale cornéenne liée à l'âge.....	15
<b>Figure 10.</b> Représentation schématique des techniques de transplantation pour le traitement des maladies endothéliales.....	26
<b>Figure 11.</b> Attrition des cellules endothéliales du donneur selon la technique de greffe.....	28
<b>Figure 12.</b> L'offre et la demande pour les transplantations cornéennes dans 148 pays.....	32
<b>Figure 13.</b> Comparaison de l'anatomie cornéenne humaine et féline.....	54
<b>Figure 14.</b> Montage pour le positionnement cornée-vers-le-bas.....	62
<b>Figure 15.</b> Régions centrales de cornées de lapin désendothélialisées ( <b>A, B</b> ) et contrôle ( <b>C</b> ) en coloration au rouge d'alizarine et bleu de trypan.....	63
<b>Figure 16.</b> Adhésion de CEC injectées dans la chambre antérieure à la surface postérieure des cornées selon la durée de positionnement cornée-vers-le-bas.....	67
<b>Figure 17.</b> CEC félinesensemencées sur cornées dévitalisées <i>in vitro</i> .....	73
<b>Figure 18.</b> Résultats d'immunofluorescence de spécimens de cornées dévitaliséesensemencées avec CEC félines <i>in vitro</i> .....	74
<b>Figure 19.</b> Résultats d'immunofluorescence de spécimens de cornées félines normales.....	74
<b>Figure A1.</b> Corneal endothelial cells prior to grafting.....	102
<b>Figure A2.</b> Operated eyes one month after surgery.....	103
<b>Figure A3.</b> Clinical evolution of the operated eyes.....	104
<b>Figure A4.</b> Alizarin red and trypan blue vital staining.....	105
<b>Figure A5.</b> Scanning electron microscopy results.....	107

<b>Figure A6.</b> Histology results. ....	109
<b>Figure A7.</b> Transmission electron microscopy results.....	111
<b>Figure A8.</b> Immunofluorescence staining (red) of endothelial cell marker keratin 8/18 (column 1) and functional proteins zonula occludens-1 (column 2) and Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase α1 (column 3).....	113
<b>Figure A9.</b> Immunofluorescence staining (red) of α-smooth muscle actin (column 1), type I collagen (column 2) and fibronectin (column 3). ....	115
<b>Figure S1.</b> Scanning (A, B) and transmission electron microscopy (C, D) of scraped non-grafted controls immediately after the 3-hour-eyes-down positioning period.....	116
<b>Figure S2.</b> Ectopic deposition of injected corneal endothelial cells. ....	117

## Liste des initiales

CB : Cristina Bostan

IB : Isabelle Brunette

MT : Mathieu Thériault

SP : Stéphanie Proulx

## Liste des abbréviations

$\alpha$ -SMA :	$\alpha$ -Smooth muscle actin
CCT :	Épaisseur cornéenne centrale / <i>central corneal thickness</i>
CEC:	Cellules endothéliales cornéennes / <i>corneal endothelial cells</i>
COL-1 :	Collagène de type I
CV :	Coefficient of variation
DAPI :	4',6-diamidino-2-phenylindole
DiI :	1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine
DiOC :	3,3'-dioctadecyl-5,5'-Di(4-sulfofenyl)-oxacarbocyanine ou SP-DiOC <sub>18</sub> (3)
DM :	Membrane de Descemet / <i>Descemet's membrane</i>
DMEK :	<i>Descemet's membrane endothelial keratoplasty</i>
DMEM :	Milieu Eagle modifié par Dulbecco
DS(A)EK :	<i>Descemet's stripping (automated) endothelial keratoplasty</i>
EBAA :	Eye Bank Association of America
EDTA :	Acide ethylènediaminetetraacétique
FN :	Fibronectine
GAG :	Glycosaminoglycan
K8/18 :	cytokératines 8 et 18
KP/PK :	Kératoplastie pénétrante / <i>penetrating keratoplasty</i>
KPs :	Précipités kératiques / <i>keratic precipitates</i>
MEB/SEM :	Microscopie électronique à balayage / <i>scanning electron microscopy</i>
MET/TEM :	Microscopie électronique à transmission / <i>transmission electron microscopy</i>
N/A :	Not applicable
ROCK :	Protéine kinase associée à Rho
ROCKi:	Inhibiteur de protéine kinase associée à Rho (Y-27632)
rtPA :	activateur du plasminogène tissulaire recombinant / <i>recombinant tissue plasminogen activator</i>
TIO/IOP :	Tension intraoculaire / <i>intraocular pressure</i>

## **Avant-propos et remerciements**

Ce mémoire est divisé en quatre parties et inclue un article scientifique publié dans un journal avec comité de pairs. La Partie I consiste en une introduction aux concepts sous-jacents à ce travail, une revue de la littérature pertinente et une exposition de la problématique ayant justifié cette recherche. La Partie II aborde les décisions méthodologiques et présente les expériences préliminaires entreprises. L'article scientifique est présenté dans la Partie III. La discussion générale, les perspectives de recherche pour l'avenir et les conclusions du projet sont présentées dans la Partie IV. Les protocoles de recherche sont joints en annexe.

Les expériences préliminaires et l'article ont été réalisés sous la supervision de ma directrice de recherche, Dr Isabelle Brunette, et ma co-directrice, Dr Stéphanie Proulx. J'ai été en charge de l'élaboration des protocoles de recherche, de l'organisation des chirurgies, du suivi postopératoire des sujets de recherche, du prélèvement et de la distribution des tissus pour les tests histopathologiques, de l'exécution des colorations vitales, des études morphométriques et des observations en microscopie électronique à transmission sur les tissus post-mortem, de la compilation et l'interprétation des données, ainsi que de la rédaction de l'article scientifique. Les chirurgies ont été exécutées par Dr Isabelle Brunette. Mathieu Thériault a été en charge de la préparation et de la caractérisation préopératoire des cellules endothéliales cornéennes, des observations en microscopie électronique à balayage, des observations histologiques et des tests en immunofluorescence. Il a également participé à l'interprétation des résultats et à la rédaction de l'article scientifique. Karolyn Forget a été en charge de la mise en suspension des cellules endothéliales cornéennes avant la chirurgie et a aidé au suivi postopératoire, au prélèvement et à la distribution des tissus pour les tests histopathologiques, à l'observation de certains spécimens en microscopie électronique à transmission, ainsi qu'à la rédaction de l'article. Dr Christelle Doyon a participé au suivi postopératoire des sujets de recherche. Dr John D. Cameron a contribué à l'interprétation des résultats en microscopie électronique.

J'aimerais remercier toutes les personnes ayant participé de proche et de loin à la réalisation de ce projet de recherche. Ma directrice de recherche, Dr Isabelle Brunette m'a fourni un

support inestimable. Je lui suis reconnaissante de m'avoir guidée et soutenue à travers toutes les étapes de ce projet et d'avoir poussé mes limites au-delà de ce que je pensais être capable de réaliser. Je remercie également Dr Stéphanie Proulx de son expertise et de sa rigueur scientifique qui m'ont appris à travailler mon esprit critique et à retourner à mes objectifs de recherche afin de réorienter mon travail avec succès lorsque les solutions semblent limitées.

Je remercie Myriam Bareille, Xinling Liu et Anitha Kalai qui ont assisté lors du suivi postopératoire des sujets de recherche; Angèle Halley, qui a participé aux chirurgies en tant qu'infirmière, et l'équipe de l'animalerie du Centre de recherche de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont, qui a été impliquée dans l'hébergement, l'entretien, les chirurgies et le suivi postopératoire des animaux utilisés dans cette étude. Les cellules endothéliales cornéennes utilisées ont été isolées et cryopréservées jusqu'à leur utilisation par les anciens étudiants diplômés du Laboratoire d'organogénèse expérimentale (Caroline Audet et Jeanne d'Arc Uwamaliya). Les spécimens cornéens pour la microscopie électronique à balayage ont été préparés par les techniciens du service de microscopie électronique de l'IBIS de l'Université Laval. Les spécimens pour l'histologie ont été préparés par les techniciens du service d'histologie du Laboratoire d'organogénèse expérimentale. Les spécimens de microscopie électronique à transmission ont été préparés par Steve Breault, technicien au Département d'anatomo-pathologie de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont. J'aimerais également remercier Odette Hinse, André Déveault, Dr Ellen Freeman, Élodie Samson, Dr Nour Haydari, Delphine Mathieu et Eugen Lungu, qui m'ont conseillée et/ou offert leur assistance à différents moments à travers la maîtrise. Le *Fonds de recherche en santé – Québec (FRQS)*, le *Réseau de recherche en santé de la vision (RRSV)* et la *Faculté des études supérieures de l'Université de Montréal* m'ont offert un support financier très apprécié qui m'a permis de me concentrer sur mon projet de recherche pendant ma formation.

J'ai complété cette maîtrise en parallèle avec mes études médicales – tâche tout sauf facile – et je remercie l'administration du programme de Doctorat en médecine de l'Université de Montréal de m'avoir accordé une année de suspension pour la réalisation d'une partie du projet. La recherche est non seulement complémentaire à la pratique médicale, mais aussi essentielle à son perfectionnement. Le souci des écoles de médecine d'offrir un temps dédié à la formation en recherche à leurs étudiants permet de promouvoir l'importance de la recherche

auprès de futurs cliniciens et de les sensibiliser à la contribution unique qu'ils peuvent y apporter de par leur familiarité avec la pratique clinique et les besoins des patients. J'espère que cette option demeurera disponible aux étudiants en médecine de l'Université de Montréal et qu'elle bénéficiera, au fil du temps, d'une collaboration plus étroite entre l'administration du programme de Doctorat en médecine et celle des programmes d'études de deuxième et troisième cycle, afin d'offrir un meilleur encadrement aux étudiants qui s'y aventurent.

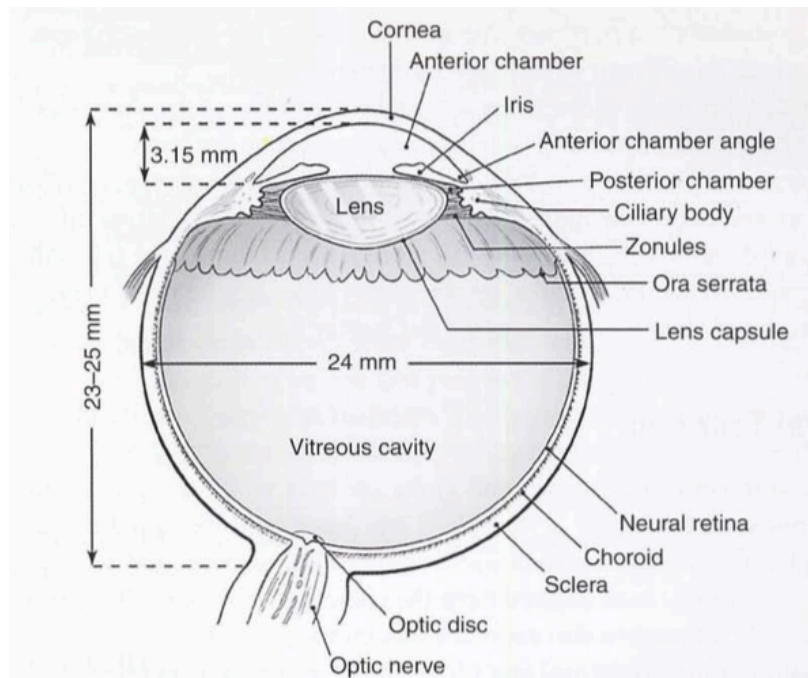


## **PARTIE I – INTRODUCTION**

# 1. La cornée humaine normale

## 1.1. Forme et structure cornéenne

La cornée est la portion antérieure transparente de l'œil (**Figure 1**). Sa fonction principale est de réfracter les rayons lumineux en minimisant la dispersion optique, de façon à optimiser la qualité de l'image projetée sur la rétine et donc la qualité de la vision.<sup>1</sup> La forme et la structure de la cornée permettent l'accomplissement de cette fonction.

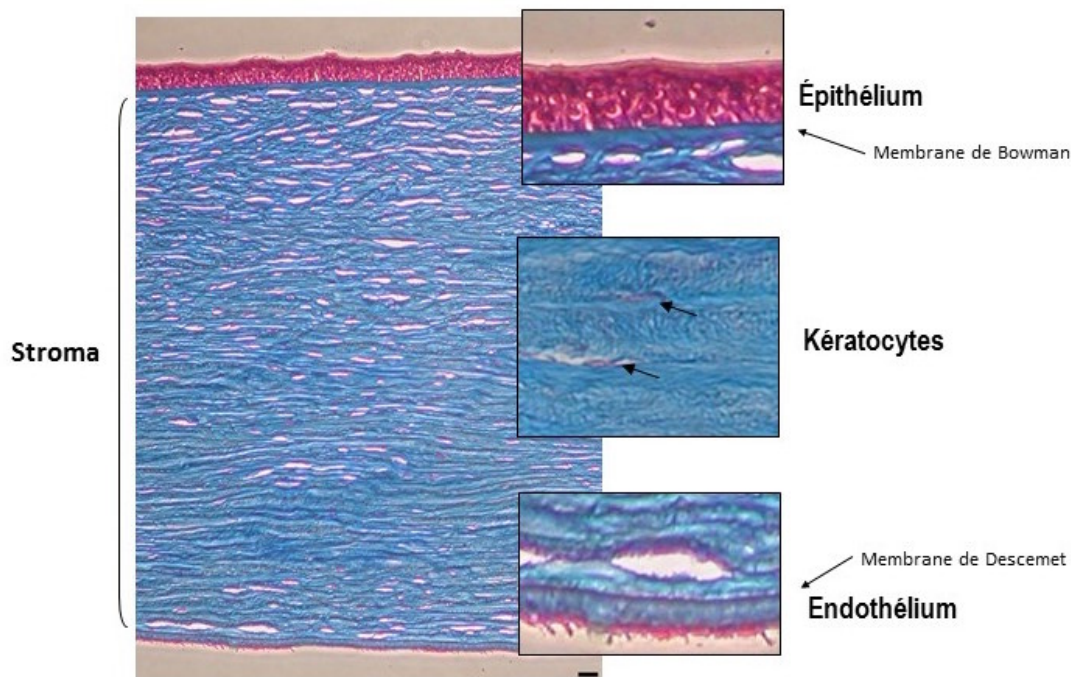


**Figure 1.** Coupe sagittale d'un œil humain.<sup>2</sup>

Chez l'adulte, le diamètre cornéen moyen atteint 11-12 mm horizontalement et 10-11 mm sur l'axe vertical.<sup>2</sup> L'épaisseur cornéenne varie de  $536 \pm 31 \mu\text{m}$  dans sa portion centrale à  $650 \mu\text{m}$  en périphérie.<sup>3, 4</sup> Son rayon de courbure central est en moyenne de 7,8 mm, mais la cornée s'aplatit vers la périphérie, acquérant une configuration asphérique.<sup>2</sup> Sa surface interne concave est plus courbe que sa surface externe convexe.<sup>2, 5</sup>

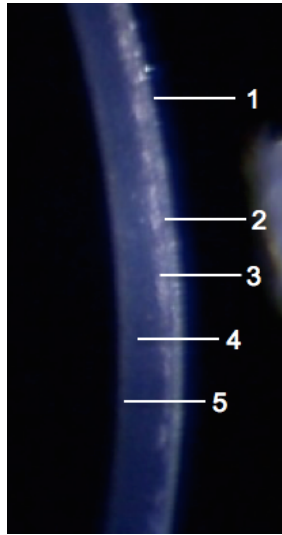
Ces attributs lui permettent d'assurer 74% (43,25 dioptries) de la puissance de réfraction totale de l'œil.<sup>3</sup>

La structure cornéenne joue un rôle essentiel au maintien de sa forme, de sa courbure et de ses propriétés biomécaniques.<sup>3</sup> La cornée est composée de trois couches cellulaires et deux couches acellulaires (**Figures 2 et 3**). Une sixième couche de 15 µm en épaisseur, localisée entre le stroma et la membrane de Descemet (**DM**) et dénommée « couche de Dua » a récemment été décrite.<sup>6</sup> Son existence en tant que structure distincte du stroma et sa signification clinique demeurent incertaines pour le moment, par contre.<sup>7</sup>



**Figure 2.** Cornée humaine normale.

Les cinq couches de la cornée : l'épithélium, la membrane de Bowman, le stroma, la membrane de Descemet et l'endothélium. Les kératocytes allongés sont dispersés à travers la matrice extracellulaire stromale abondante. Coloration au Trichrome de Masson. Tirée de Proulx et al.<sup>8</sup> Barre de mesure : 50 µm.



**Figure 3.** Cornée humaine vue en section optique à la lampe à fente.

1 – Film lacrymal. 2 – Épithélium. 3 – Stroma antérieur. 4 – Stroma postérieur. 5 – Membrane de Descemet et endothélium.

### 1.1.1. Épithélium

L'épithélium est la couche cornéenne la plus antérieure. Dérivé de l'ectoderme superficiel rostral, il se forme autour de la 5<sup>ème</sup> semaine d'embryogénèse.<sup>3</sup> Composé de cellules épithéliales squameuses stratifiées non-kératinisées, l'épithélium est composé de cinq à sept rangées (**Figure 4**) et constitue approximativement 10% (50  $\mu$ m) de l'épaisseur cornéenne totale.<sup>2,3</sup>

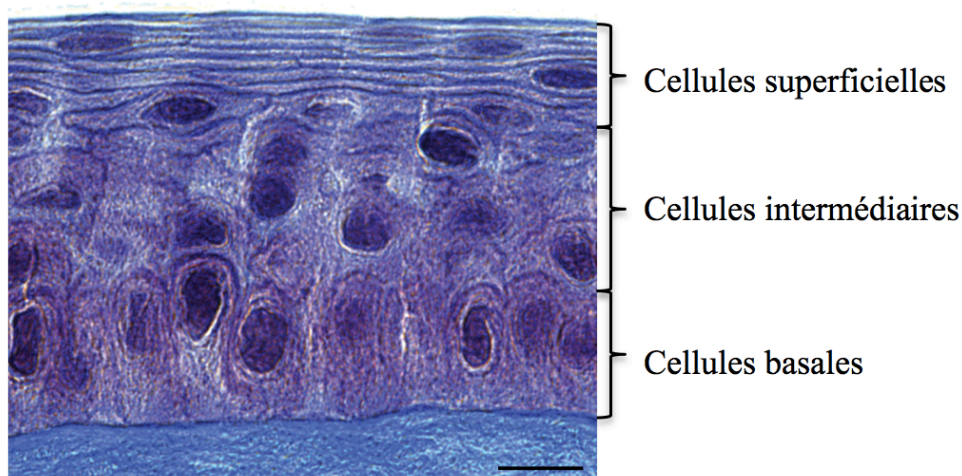
Les deux ou trois rangées les plus superficielles contiennent des cellules polygonales aplaties. Des jonctions serrées au niveau des membranes latérales (*zonula occludens*) relient ces cellules et préviennent l'entrée des larmes, toxines ou pathogènes dans l'espace intracellulaire, conférant une fonction de barrière mécanique et physiologique à l'épithélium.<sup>1, 3</sup> L'imperméabilité de l'épithélium joue un rôle important dans la pharmacocinétique des médicaments topiques.<sup>1</sup> La portion apicale de ces cellules superficielles est couverte par une couche dense de glycocalyx chargé négativement qui interagit intimement avec la couche muscinée de larmes sus-jacente. Les microvillosités et microplicae extensives de la membrane épithéliale apicale augmentent la superficie de l'interface glycocalyx-film lacrymal.<sup>3</sup> Cette interaction permet une dispersion uniforme des larmes sur toute la surface de la cornée et aide au maintien d'une surface antérieure lisse essentielle à la fonction optique de la cornée.<sup>2, 3</sup> Sous les rangées cellulaires

superficielles, on retrouve les cellules intermédiaires disposées en deux à trois rangées. Celles-ci ont une forme cuboïde et sont aussi connectées par des jonctions serrées.

Les cellules épithéliales basales forment la couche la plus profonde de l'épithélium. Mesurant approximativement 20 µm en hauteur, elles sont connectées par des jonctions intercellulaires lacunaires et adhérentes. Elles secrètent leur propre membrane basale d'une épaisseur approximative de 0,05 µm et composée de collagène type IV, de laminine et autres protéines.<sup>2</sup> Les cellules basales adhèrent étroitement à cette membrane à l'aide d'hémi-desmosomes, empêchant la séparation de l'épithélium des couches cornéennes sous-jacentes.<sup>3</sup> La membrane basale maintient l'organisation de l'épithélium et agit comme plateforme pour la migration des cellules épithéliales.<sup>1</sup>

Les cellules épithéliales superficielles et intermédiaires n'ont pas de capacité mitotique. Chaque 7 à 10 jours, elles subissent involution, apoptose et desquamation dans les larmes.<sup>2</sup> Un cycle régénératif impliquant les cellules épithéliales souches et basales assurent un remplacement rapide des couches superficielles et le maintien de la fonction de barrière de l'épithélium.<sup>9</sup> Localisées à la jonction entre le limbe et la conjonctive, les palissades de Vogt sont des replis radiaux qui s'étendent sur 1 à 2 mm dans la cornée et abritent dans les papilles interpalissadiales des cellules souches épithéliales.<sup>2, 10</sup> Ces palissades sont importantes cliniquement car elles marquent la présence de cellules souches; leur absence a été associée à une déficience en ces cellules secondaire à des anomalies congénitales, des dommages épithéliaux aigus ou des maladies épithéliales chroniques.<sup>10</sup> Les cellules souches limbiques subissent une division asymétrique, par laquelle une cellule fille demeure non-différenciée afin de maintenir la réserve de cellules souches et l'autre se différencie en cellules amplificatrices transitoires.<sup>3</sup> Celles-ci migrent centralement pour devenir des cellules basales qui, à leur tour, migrent antérieurement pour remplacer les cellules intermédiaires et superficielles. En cours de différenciation, les cellules basales s'aplatissent et acquièrent des microvillosités apicales et des jonctions serrées.<sup>2</sup>

L'arrangement étanche des cellules épithéliales à travers toutes les couches est nécessaire au maintien d'un indice de réfraction homogène et aide à limiter la dispersion de la lumière à travers la cornée.<sup>2</sup>



**Figure 4.** Les couches cellulaires de l'épithélium cornéen.

Spécimen d'une cornée félin. Coloration au Trichrome de Masson. Photo gracieuseté de Mathieu Thériault. *Barre de mesure* : 10  $\mu\text{m}$ .

### 1.1.2. Membrane de Bowman

La membrane de Bowman est la dernière membrane cornéenne à prendre forme, apparaissant au 4<sup>ème</sup> mois de l'embryogénèse.<sup>2</sup> Chez l'adulte normal, elle a une épaisseur de 8-12  $\mu\text{m}$ . C'est une couche acellulaire morphologiquement différente du stroma. Elle est composée de fibrilles de collagène condensées, orientées aléatoirement et dispersées à travers une matrice amorphe.<sup>5</sup> Les fibrilles de collagène du stroma antérieur se prolongent dans la membrane de Bowman, ce qui rend la visualisation de l'interface entre les deux difficile.<sup>1</sup> Un certain nombre de faisceaux de collagène s'étendent du stroma moyen vers la membrane de Bowman assurant une cohésion entre les deux couches cornéennes. La Bowman ne peut d'ailleurs pas être pelée du stroma en un feuillet continu.<sup>1</sup>

Le rôle physiologique de la membrane de Bowman demeure méconnu. Il a été proposé qu'elle renforce la rigidité antérieure du stroma et contribue au maintien de la courbure cornéenne.<sup>1, 3</sup> Les dystrophies de la membrane de Bowman sont des entités cliniques reconnues (les dystrophies de Reis-Bücklers et de Thiel-Behnke).<sup>2</sup> Après blessure, cette couche ne se régénère pas et elle se cicatrise, entraînant des opacités cornéennes.<sup>3</sup>

### 1.1.3. Stroma

À 450  $\mu\text{m}$  d'épaisseur, le stroma constitue la majeure partie de la cornée (90%).<sup>11</sup> Les composantes stromales sont dérivées d'un mélange de cellules mésenchymateuses provenant de la crête neurale et du mésoderme.<sup>12</sup> Après la formation de l'endothélium, une deuxième vague de cellules de la crête neurale migrent entre l'épithélium et l'endothélium et deviennent des kératoblastes qui prolifèrent et sécrètent la matrice extracellulaire embryonnaire pauvre en collagène.<sup>13</sup> Après leur différenciation en kératocytes, elles commencent à sécréter les composantes de la matrice mature.<sup>13</sup> Le stroma adulte est principalement un compartiment extracellulaire composé de collagène et de protéoglycans, les kératocytes ne représentant que 5% de son volume (**Figs. 2 et 5A**).<sup>1</sup>

Les collagènes prédominants du stroma sont de type I et V et sont localisés dans les fibrilles stromales.<sup>1</sup> Le collagène de type VI est uniquement présent dans l'espace interfibrillaire.<sup>1</sup> Trois à cinq molécules de procollagène se combinent pour créer des microfibrilles qui se combinent, à leur tour, en fibrilles striées hétérotopiques de 25-35 nm en diamètre espacées à des intervalles de 67 nm.<sup>1, 13</sup> Les fibrilles striées sont disposées en 200 à 250 faisceaux d'une épaisseur de 1-2  $\mu\text{m}$ , nommés lamelles (**Figure 5B**).<sup>1, 3</sup> Elles s'étendent à travers les lamelles de limbe à limbe de manière continue.<sup>1</sup> Les lamelles sont orthogonales les unes par rapport aux autres et parallèles à la surface cornéenne (**Figure 6A**).<sup>5, 13</sup> Orientées dans les axes horizontal et vertical au centre de la cornée, elles sont quasi-circumférentielles près du limbe.<sup>1</sup> Les lamelles antérieures sont courtes, étroites et très imbriquées (**Figure 6B**). Au niveau des deux-tiers postérieurs de la cornée, elles sont plus longues, plus épaisses et peu inter-reliées, créant un réseau moins rigide que celui du stroma antérieur.<sup>2, 9</sup>

L'arrangement précis des fibrilles de collagène est étroitement associé à la substance fondamentale dans laquelle elles sont intégrées. Les protéoglycans occupent les espaces entre les fibrilles et servent d'échafaudage pour la fixation covalente des chaînes latérales de glycosaminoglycans (GAG).<sup>13</sup> À leur tour, les GAGs s'attachent aux fibrilles de collagène à des sites régulièrement espacés<sup>1</sup> et maintiennent les séparations interfibrillaires à l'aide de leurs charges négatives qui se repoussent mutuellement.<sup>5</sup>

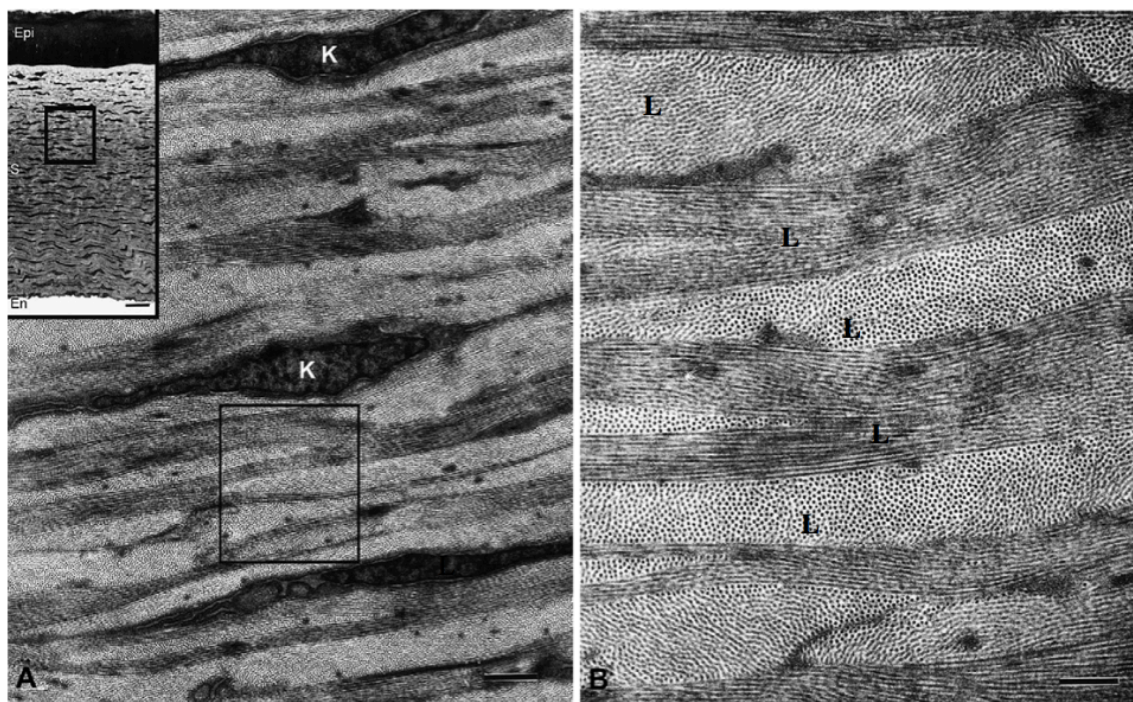
Les protéoglycans sont des noyaux protéiques qui, dépendamment des GAGs qui s'y attachent, prennent des configurations différentes.<sup>1</sup> Il y a quatre types majeurs de protéoglycans dans la cornée adulte : la décorine, le lumicane, le kératocane et le minecan.<sup>13</sup> Les GAGs sont des molécules de polysaccharides composées d'unités de disaccharides qui se répètent.<sup>1</sup> Les entités retrouvées principalement dans le stroma sont le sulfate de kératane, le sulfate de dermatane, le sulfate de chondroïtine et l'acide hyaluronique.<sup>1, 13</sup> Ces molécules chargées négativement sont hydrophiles, pouvant absorber des volumes d'eau atteignant jusqu'à 1000 fois leur volume.<sup>1,13</sup>

La distribution des GAGs à travers la cornée est hétérogène.<sup>1</sup> Cette hétérogénéité explique quelques propriétés biomécaniques cornéennes. Le sulfate de chondroïtine se retrouve uniquement dans la périphérie et au niveau du limbe.<sup>1</sup> Étant plus large que le sulfate de kératane, il crée une séparation plus grande entre les fibrilles de collagène périphériques que celle entre les fibrilles centrales, expliquant ainsi la plus grande épaisseur de la périphérie cornéenne.<sup>3,5</sup> Le stroma antérieur contient un ratio plus élevé de sulfate de dermatane sur sulfate de kératane comparativement au stroma postérieur. Comparé au sulfate de kératane, le sulfate de dermatane a une moindre capacité d'absorption d'eau et une plus grande capacité de rétention d'eau.<sup>1,9</sup> Cette différence dans la distribution antéro-postérieure des GAGs, combinée avec la rigidité lamellaire, la force cohésive, le plus grand degré d'évaporation atmosphérique et la moindre concentration de glucose antérieurement, expliquent la résistance du tiers antérieur du stroma aux changements des niveaux d'hydratation et la susceptibilité relative des deux-tiers postérieurs à l'œdème.<sup>2, 3, 9, 14</sup> La surface stromale postérieure s'aplatit rapidement lors d'une accumulation de liquide, forçant la formation de plis dans la DM, alors que la surface cornéenne antérieure n'en est affectée que plus tardivement.<sup>3, 14, 15</sup>

Les kératocytes ont des corps cellulaires compacts et allongés, avec des noyaux disproportionnellement grands (**Figure 5**). Leur apparence dendritique est due à leurs nombreuses lamellipodes qui assurent la communication intercellulaire.<sup>13</sup> Les jonctions serrées connectent les bouts de ces projections cytoplasmiques.<sup>1</sup> La majorité des kératocytes sont localisés dans l'espace interlamellaire, parallèlement aux lamelles stromales.<sup>1</sup> Leur densité varie à travers la cornée et diminue graduellement avec l'âge.<sup>2</sup>

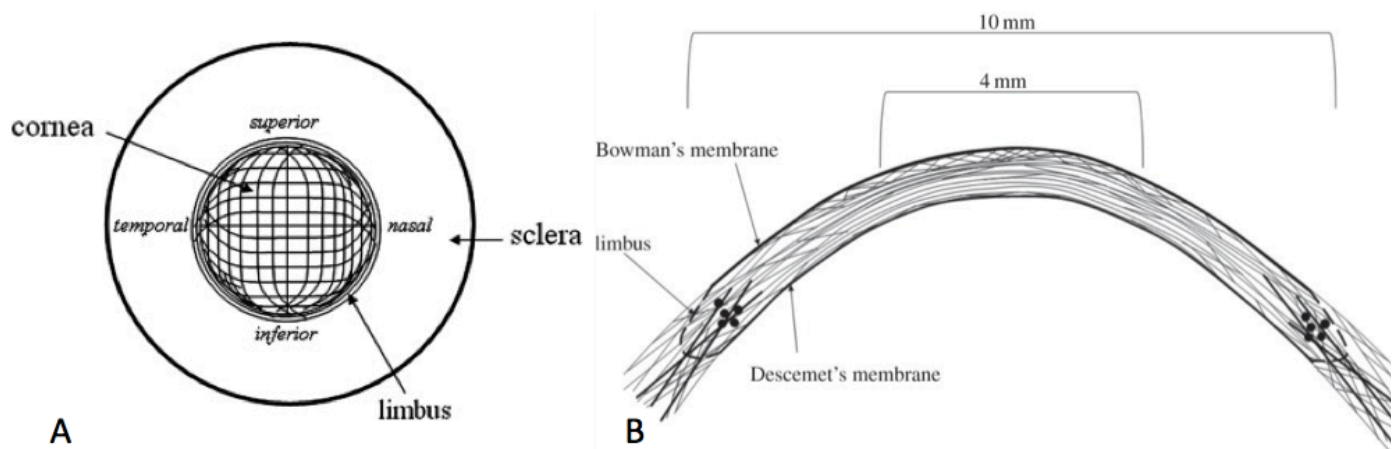


Malgré qu'ils soient quiescents chez l'adulte, les kératocytes maintiennent continuellement l'homéostasie de la matrice extracellulaire en sécrétant des métalloprotéinases matricielles, du collagène et des GAGs, afin de dégrader et remplacer les anciennes composantes.<sup>1</sup> Ils produisent et contiennent également des protéines hydrosolubles, similaires aux molécules cristallines retrouvées dans le cristallin, qui contribuent à la réduction de la dispersion de la lumière.<sup>13, 16</sup> Lors d'un dommage stromal, ces cellules sont rapidement activées et leur phénotype est altéré. Les kératocytes activés, appelés fibroblastes, migrent vers les marges des plaies où ils produisent des quantités importantes de procollagène afin de réparer le déficit créé.<sup>2</sup>



**Figure 5.** Microscopie électronique à transmission du stroma cornéen.

- (A) Le stroma représente plus de 90% de l'épaisseur cornéenne et contient des kératocytes (K) orientés parallèlement à la surface cornéenne et localisés entre les lamelles stromales.
- (B) Agrandissement de l'aire dans le rectangle de la figure A. Les lamelles (L) sont composées des fibrilles de collagène de petit diamètre avec arrangement régulier. Les couches adjacentes sont à des angles approximativement perpendiculaires les unes aux autres formant un réseau orthogonal. Adaptée de Hassel et al.<sup>13</sup>



**Figure 6.** Organisation préférentielle des lamelles de collagène dans la cornée humaine.

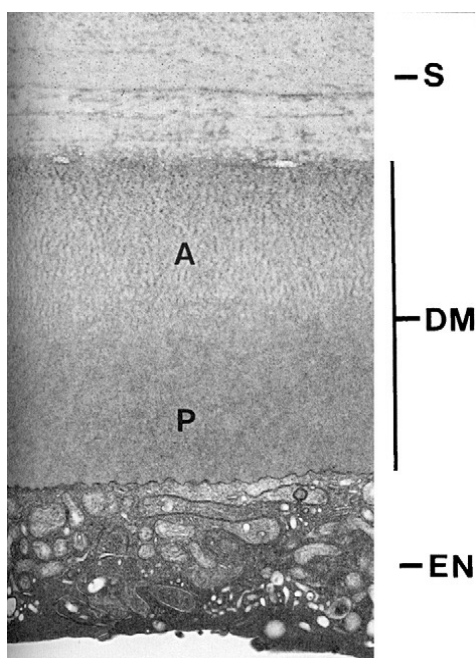
(A) Dans la cornée centrale, les lamelles sont orientées dans les directions supéro-inférieure et naso-temporale. Ces lamelles changent de direction en périphérie, près du limbe, où elles deviennent quasi-circconférentielles. Adaptée de Boote et al.<sup>17</sup> (B) Coupe sagittale de la cornée.

Centralement, les lamelles antérieures forment de grands angles avec la membrane de Bowman et sont très imbriquées. Ces angles diminuent dans le stroma plus profond, où les lamelles sont moins inter-reliées. Dans la cornée périphérique, entre 8 et 10 mm, l'entrelacement lamellaire est présent à travers toute l'épaisseur stromale. Au limbe, des lamelles d'origine stromale renforcent le tissu sans pour autant pénétrer le stroma central (lignes plus foncées). Les cercles noirs représentent la disposition circconférentielle des lamelles stromales près du limbe. Adaptée de Abbas et al.<sup>18</sup>

#### 1.1.4. Membrane de Descemet

La DM recouvre la surface postérieure du stroma et fusionne en périphérie avec les faisceaux trabéculaires au niveau de la ligne de Schwalbe. Elle est sécrétée par l'endothélium cornéen à partir de la 8<sup>ème</sup> semaine de gestation.<sup>3</sup> La portion sécrétée avant la naissance forme la couche antérieure striée (« *anterior banded layer* », **Figure 7**), dont l'épaisseur (3  $\mu\text{m}$ ) demeure constante tout au long de la vie.<sup>19</sup> Cette couche est composée de fibres de collagène type VI et VIII précisément alignées et régulièrement espacées à des intervalles de 110 nm.<sup>1, 19</sup> La couche postérieure finement granuleuse (« *posterior non-banded layer* ») est sécrétée en post-natal sur la couche antérieure et son épaisseur

augmente avec l'âge, atteignant autour de 10  $\mu\text{m}$  chez les personnes âgées.<sup>19</sup> Composée principalement de collagène de type IV désorganisé, son ultrastructure a une apparence fibrogranulaire et homogène.<sup>1</sup> À part le collagène, les autres composantes de la DM incluent la laminine, le perlecan, le nidogène-1 et 2, la nétrine-4, la vitronectine et la fibronectine<sup>20</sup>



**Figure 7.** Microscopie électronique à transmission de la membrane de Descemet.

Stroma postérieur (S), les couches antérieure striée (A) et postérieure granuleuse (P) de la DM normale et l'endothélium (EN). Adaptée de DelMonte et al.<sup>3</sup>

### 1.1.5. Endothélium

L'endothélium cornéen provient des cellules de la crête neurale qui prolifèrent et migrent centralement à partir du rebord de la cupule optique jusqu'à l'espace entre l'épithélium cornéen et la placode cristalliniene,<sup>13</sup> formant une monocouche de cellules cuboïdes d'une épaisseur de 10  $\mu\text{m}$  à la naissance.<sup>3</sup> Éventuellement, ces cellules s'aplatissent, se stabilisant à une hauteur de 4-5  $\mu\text{m}$  et une surface cellulaire de 250  $\mu\text{m}^2$ .<sup>3</sup> Approximativement 400 000 à 500 000 cellules endothéliales cornéennes hexagonales disposées de façon homogène dans une mosaïque en « nid d'abeilles » (**Figure 8A-B**) couvrent la surface postérieure de la cornée adulte, fusionnant avec les cellules du trabéculum en périphérie.<sup>1</sup>

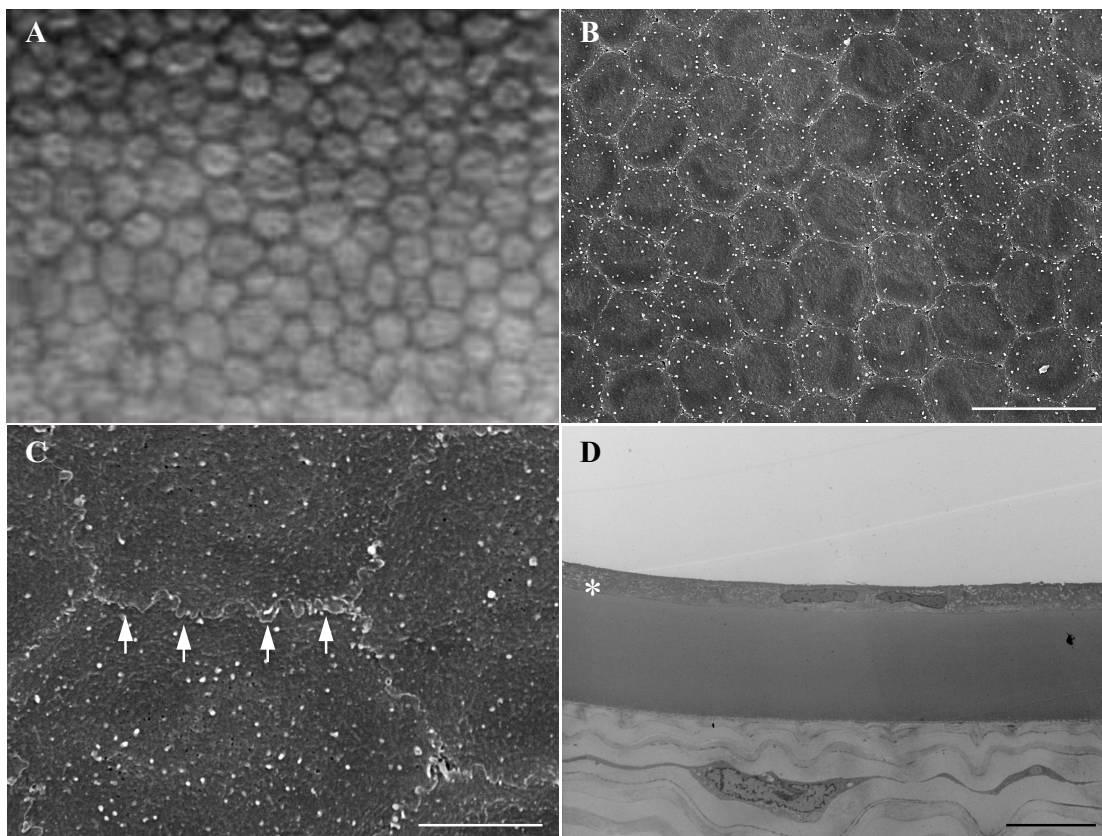
À leur aspect apical (faisant face à la chambre antérieure), les cellules endothéliales cornéennes possèdent des microvillosités et un seul cilium.<sup>1</sup> À leur aspect basal, elles adhèrent à la DM; les structures membranaires assurant cette adhésion demeurent inconnues, mais la présence de « plaques d'adhésion » focales a été suggérée.<sup>21</sup> Les membranes latérales forment de nombreux replis et interdigitations (**Figure 8C**) et abritent des jonctions lacunaires et adhérentes.<sup>3</sup> La longueur du chemin paracellulaire est estimé à 10 fois la hauteur de la cellule en raison des interdigitations latérales extensives.<sup>1</sup> Les jonctions intercellulaires lacunaires permettent la communication entre les cellules. Les jonctions adhérentes, localisées principalement à la portion apicale des membranes latérales, assurent une étanchéité incomplète entre les cellules avoisinantes, ne permettant que le transport passif de petites molécules de la chambre antérieure vers le stroma à travers le passage paracellulaire.<sup>1</sup> Les cellules endothéliales cornéennes contiennent des mitochondries abondantes, ainsi qu'un réticulum endoplasmique rugueux et un appareil de Golgi proéminents, témoignant de leur activité métabolique importante. Celle-ci est principalement reliée à une fonction de transport ionique actif (voir section 1.2.2), plutôt qu'à une activité mitotique significative.<sup>1</sup> D'ailleurs, chez l'adulte, les cellules endothéliales cornéennes semblent ne subir que très peu ou pas de mitoses.<sup>22-26</sup>

Il est peu clair si le maintien de l'état non-réplicatif de l'endothélium cornéen *in vivo* est bénéfique à la fonction de l'œil.<sup>27</sup> L'hypothèse d'une entrave à l'acuité visuelle par la prolifération cellulaire a été mise de l'avant en se basant sur l'observation que la plupart des cellules localisées directement dans l'axe visuel, à l'exception des cellules épithéliales basales, ne se multiplient pas.<sup>27</sup> Les raisons expliquant l'incapacité des cellules endothéliales cornéennes humaines à proliférer *in vivo* ont été extensivement investiguées. La sénescence cellulaire ne semble pas en être une, la longueur des télomères étant normale dans ces cellules.<sup>28, 29</sup> Les cellules endothéliales cornéennes sont plutôt arrêtées dans la phase G1 du cycle cellulaire et ne peuvent pas passer librement à la phase S *in vivo*, même lors d'une stimulation par un dommage endothélial.<sup>27</sup> L'inhibition de contact intercellulaire (« *cell-to-cell contact dependent inhibition* »)<sup>30</sup> et le facteur de croissance transformant (TGF)-β2 retrouvé dans l'humeur aqueuse ont été impliqués comme éléments majeurs dans le maintien de l'état non-réplicatif de l'endothélium.<sup>27</sup>

Les conséquences majeures de l'arrêt en phase G1 des cellules endothéliales cornéennes *in vivo* incluent une réparation par élargissement et migration cellulaire plutôt que par multiplication suite à un trauma, une diminution graduelle de la densité endothéliale avec l'âge et une décompensation endothéliale irréversible lors d'une perte excessive de cellules.<sup>22, 31</sup> Le vieillissement normal de même que tout dommage direct ou indirect à la monocouche endothéliale entraînent une réduction irréversible de la densité endothéliale. La guérison d'un dommage endothélial se fait en trois étapes.<sup>9</sup> Étant donné leur incapacité à se multiplier, les cellules avoisinant un déficit s'étalent d'abord pour recouvrir le déficit en agrandissant leur surface cellulaire et/ou en migrant dans sa direction. L'endothélium perd alors sa disposition uniforme en « nid d'abeille ». Graduellement ensuite, la fonction endothéliale de perméabilité et de pompe ionique (voir section 1.2.2.) se rétablit. Finalement, les cellules ayant participé à la guérison se stabilisent et récupèrent, du moins en partie, leur morphologie hexagonale.<sup>9</sup> Avec le vieillissement et l'accumulation de dommages endothéliaux, ce processus de remodelage est de moins en moins possible, expliquant le polymégathisme (variation dans la taille cellulaire) et le pléomorphisme (variation dans la forme cellulaire) plus prononcés chez les personnes âgées.<sup>3, 9</sup> Ainsi, entre la 2<sup>e</sup> et la 9<sup>e</sup> décennie, le coefficient de variation de la surface cellulaire moyenne passe de 0,22 à 0,29 et le pourcentage de cellules hexagonales diminue de 75% à 60%.<sup>3</sup>

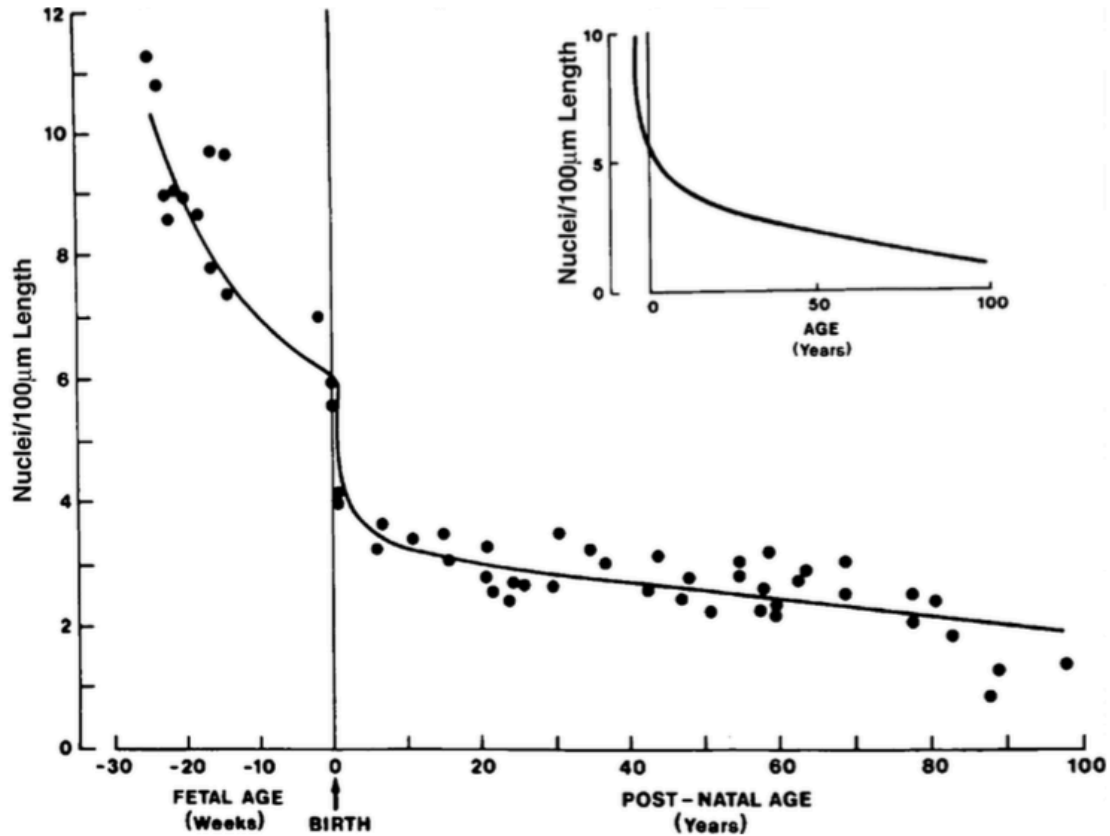
La densité endothéliale centrale est autour de 4500 cellules/mm<sup>2</sup> à la naissance.<sup>32</sup> Dans la première décennie de vie, elle diminue jusqu'à 3200-3500 cellules/mm<sup>2</sup> en raison d'un étalement des cellules sur la surface grandissante de la cornée en croissance (**Figure 9**).<sup>33</sup> Au cours des années subséquentes, le taux d'attrition annuel se stabilise autour de 0,5 à 0,6%,<sup>31</sup> i.e. approximativement 100 à 500 cellules par année, ce qui est suffisamment lent pour que l'endothélium continue à fonctionner normalement.<sup>9</sup> De la deuxième à la huitième décennie de vie, la densité diminue donc de 3500 à 2600 cellules/mm<sup>2</sup> (Figure 9).<sup>19</sup> La densité endothéliale en périphérie est d'environ 10% supérieure à la densité centrale et diminue beaucoup plus lentement que la densité centrale au cours de la vie,<sup>27</sup> d'où l'hypothèse de l'existence d'un réservoir de cellules souches périphériques, à la frontière entre la cornée et le trabéculum.<sup>27, 34-36</sup> Ces cellules souches auraient une

capacité proliférative limitée et fourniraient un renouvellement cellulaire continu mais lent.<sup>27</sup> Si elles existent véritablement, leur contribution à la densité endothéliale ne semble pas être suffisante pour compenser la diminution graduelle encourue au fil des années ou suite à un trauma.<sup>27</sup>



**Figure 8.** Endothélium cornéen normal.

(A) Photomicrographie spéculaire illustrant la disposition en « nid d'abeille » et la morphologie régulière des cellules endothéliales cornéennes humaines. (B, C) Microscopie électronique à balayage (MEB) d'une cornée féline. Interdigitations extensives visibles entre les cellules avoisinantes (flèches). (D) Microscopie électronique à transmission (MET) d'une cornée féline montrant la disposition en monocouche de l'endothélium normal (astérisque). Les figures (B) et (C) sont une gracieuseté de Mathieu Thériault. *Barres de mesure* : 5  $\mu\text{m}$  (C), 25  $\mu\text{m}$  (B), 10  $\mu\text{m}$  (D).



**Figure 9.** Réduction de la densité endothéliale cornéenne liée à l'âge.

Données provenant de 56 spécimens cornéens pré- et post-natales, variant en âge de 16 semaines de gestation à 98 ans. La densité est exprimée comme nombre de noyaux par 100  $\mu\text{m}$  de longueur endothéliale. L'échelle temporelle varie pour les périodes pré- et post-natales. L'encart présente les données sur une échelle temporelle uniforme. Adaptée de Murphy et al.<sup>24</sup>

## 1.2. La physiologie derrière la transparence cornéenne

La cornée est la porte d'entrée des rayons lumineux vers la rétine. La transmission adéquate de ces rayons dépend de la régularité de ses surfaces antérieure et postérieure et, surtout, du maintien de sa transparence. Plusieurs facteurs interreliés y contribuent. L'endothélium cornéen joue un rôle de première importance.

### 1.2.1. Les facteurs déterminant la transparence cornéenne

#### a) Avascularité cornéenne

La cornée maintient un état avasculaire à tous les stades de son développement, un processus appelé « privilège angiogénique ». <sup>12</sup> Les vaisseaux scléraux qui bordent la cornée près du limbe ne l'envahissent pas, possiblement en raison de certains facteurs anti-angiogéniques présents dans le stroma. <sup>12</sup> Une néovascularisation pathologique peut se produire suite à une hypoxie chronique, une inflammation insidieuse et tout trauma, entraînant ainsi une perte de la transparence cornéenne.

Pour assurer la survie de ses composantes cellulaires malgré son état avasculaire, la cornée obtient les métabolites nécessaires par diffusion à partir des fluides environnants. Ainsi, l'humeur aqueuse nourrit l'endothélium et le stroma postérieur, alors que le film lacrymal alimente l'épithélium et le stroma antérieur. Le liquide interstitiel provenant des vaisseaux péri-cornéens nourrit la périphérie de la cornée. L'oxygène est essentiel à la fonction de l'endothélium et atteint celui-ci par diffusion à partir de l'air à travers l'épithélium et le stroma, l'humeur aqueuse étant pauvre en oxygène. <sup>12</sup>

#### b) L'épithélium cornéen

L'**arrangement étanche** des cellules épithéliales et la **rareté relative d'organelles intracellulaires**, surtout de mitochondries, assurent un index réfractif homogène à travers l'épithélium contribuant de cette façon à la transparence cornéenne. <sup>37</sup>

#### c) Structure du stroma

Après la migration des cellules de la crête neurale pour former les kératoblastes stromaux sécrétant la matrice extracellulaire pauvre en collagène et sulfate de kératane, la cornée embryonnaire n'atteint que 40% de sa transparence. <sup>13</sup> Celle-ci n'est à son maximum qu'après la différenciation des kératoblastes en kératocytes qui complètent la synthèse de collagène et de protéoglycans extracellulaires. <sup>13</sup> L'**arrangement hautement régulier, avec espacement uniforme et précis des fibrilles de collagène** qui résulte de l'interaction avec les protéoglycans, confère au



stroma sa solidité et sa transparence, maintenant la courbure cornéenne et minimisant la dispersion des rayons lumineux.<sup>5</sup> Cet arrangement contraste avec la sclère opaque, dont les fibres de collagène sont distribuées de façon désorganisée.<sup>37</sup>

La **rareté des kératocytes stromaux**, leur **corps cellulaire compact et allongé** et leur **disposition parallèle aux lamelles stromales** diminuent la surface cellulaire exposée à la lumière et maintient l'arrangement uniforme des lamelles de collagène.<sup>13</sup> Les **protéines hydrosolubles cristallines**, telles l'aldéhyde déshydrogénase et la transkétolase, présentes en grand nombre dans le cytoplasme des kératocytes contribuent également à la transparence cornéenne en laissant passer la lumière librement.<sup>13, 16</sup>

#### **d) Disposition de l'endothélium en monocouche mince**

Malgré la haute densité de mitochondries essentielles à sa fonction, l'endothélium n'altère pas la transparence cornéenne et disperse très peu la lumière de par sa disposition en monocouche aplatie de 4-5  $\mu\text{m}$ , ce qui raccourcit considérablement la longueur de son trajet optique.<sup>37</sup>

#### **e) Déturgescence stromale**

Les protéoglycans stromaux, avec les GAGs négativement chargés qui leurs sont associés, créent une pression osmotique et une force de répulsion électrostatique qui attirent l'humeur aqueuse dans le stroma à travers l'endothélium.<sup>9, 13</sup> Ainsi, le stroma a une grande tendance au gonflement et peut atteindre un contenu en eau de 98% si placé en milieu aqueux.<sup>9</sup> Dans des conditions physiologiques normales, par contre, il maintient cette proportion à 78%.<sup>9</sup> Tout liquide excédant accumulé dans la matrice extracellulaire augmente la séparation entre les lamelles de collagène, perturbant leur organisation uniforme et la transparence cornéenne.<sup>9, 13, 14</sup> L'état de déshydratation relative du stroma est finement ajusté grâce à un équilibre étroit entre la fuite de liquide vers le stroma à travers l'endothélium et la fonction de pompe endothéliale qui assure le retour du liquide excédant vers la chambre antérieure.

## 1.2.2. Le rôle de l'endothélium cornéen

### a) Fonction de barrière sélective

À la naissance, la perméabilité de la monocouche endothéliale diminue graduellement avec la formation de complexes de jonctions intercellulaires.<sup>9</sup> Les jonctions serrées, composées de molécules spécifiques telles la ZO-1, la F-actine, les  $\alpha$ - and  $\beta$ -cadhérines, la JAM-1 et la AF6, sont localisées en une ligne discontinue au niveau de la portion apicale de la membrane cellulaire latérale.<sup>9</sup> Elles rapprochent les cellules voisines de façon à ne laisser que 3 nm d'espace intercellulaire à l'aspect apical, alors que cet espace est de 25 à 40 nm du côté basal, où il n'y pas de jonctions serrées.<sup>1</sup> L'endothélium acquiert ainsi une fonction de membrane semi-perméable : de l'humeur aqueuse qui essaye de pénétrer le stroma sous l'effet combiné de la pression d'imbibition stromale et de la tension intraoculaire (TIO), il ne laisse diffuser que des molécules d'eau et des petits ions nécessaires au métabolisme du stroma.

Des états pathologiques affectant l'intégrité de la monocouche endothéliale ou des jonctions serrées, incluant tout dommage endothélial mécanique, altération du pH intraoculaire (normal : 6,8 à 8,2), préservatif et solution sans calcium ou induisant une oxydation du glutathion intracellulaire, peuvent altérer la fonction de barrière et augmenter les fuites de liquide vers le stroma.<sup>9, 14</sup> Étant donnée la capacité de l'endothélium à rétablir l'intégrité de la monocouche par une migration et un étalement cellulaire, la perméabilité endothéliale est préservée lors du vieillissement normal malgré la diminution graduelle de la densité endothéliale.<sup>9</sup>

### b) Fonction de pompe

Pour contrebalancer la fuite de liquide vers le stroma à travers la membrane endothéliale semi-perméable, des  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPases et des co-transporteurs  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$  localisés aux membranes latérales des cellules endothéliales transportent activement des ions du stroma vers la chambre antérieure.<sup>14</sup> Un gradient osmotique se crée et attire le liquide à l'extérieur de la cornée par la voie para-cellulaire, empêchant l'œdème et la perte de transparence cornéenne.

La densité de transporteurs d'ions augmente après la naissance. Elle ne diminue cependant pas avec l'âge, malgré la perte graduelle de cellules endothéliales au cours de la vie.<sup>38</sup> Ceci pourrait s'expliquer par une augmentation de l'expression des transporteurs par les cellules restantes afin de maintenir la capacité de pompe totale de l'endothélium.<sup>9</sup> Les facteurs pouvant affecter la fonction de pompe incluent les endothéliopathies, une baisse de température, des solutions sans bicarbonate (nécessaire à l'effet des co-transporteurs  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ ) et le bromacetazolamide (les inhibiteurs de l'anhydrase carbonique sont couramment utilisés dans le traitement du glaucome).<sup>9</sup>

Les transporteurs actifs d'ions requièrent de l'ATP, dont la production mitochondriale nécessite de l'oxygène.<sup>14</sup> La fonction de pompe est donc physiologiquement réduite la nuit, lorsque les paupières sont fermées, en raison d'une quantité insuffisante d'oxygène atteignant l'endothélium à partir de l'air.<sup>14</sup> Ainsi, le matin, la cornée est relativement œdématisée et cet état est exacerbé dans les endothéliopathies comme la dystrophie de Fuchs.<sup>14</sup> De même, le port chronique de lentilles cornéennes peut entraîner une hypoxie des couches cornéennes internes.<sup>12</sup>

### **c) Aquaporines**

Les aquaporines sont une famille d'une dizaine de protéines transporteuses d'eau exprimées dans la membrane des cellules épithéliales et endothéliales des mammifères.<sup>39</sup> Deux de ces protéines sont exprimées dans la cornée humaine : l'AQP5 dans l'épithélium cornéen et l'AQP1 dans l'endothélium. Les AQP1 permettent l'extrusion trans-membranaire de l'eau du stroma vers la chambre antérieure indépendamment du transport para-cellulaire.<sup>39</sup> Leur rôle exact dans le maintien de la déturgescence stromale n'est pas encore élucidé, mais il a été démontré que l'absence des AQP1 retarde la récupération de la transparence et de l'épaisseur cornéenne normale suite à un œdème.<sup>40</sup>

## **2. Défaillance endothéliale et perte de la transparence cornéenne**

### **2.1. Physiopathologie de la décompensation endothéliale**

L'endothélium cornéen a une réserve fonctionnelle importante.<sup>9, 41</sup> Lors d'un dommage, les cellules restantes agrandissent leur surface cellulaire et migrent afin de rétablir l'intégrité de la monocouche et, ainsi, la fonction endothéliale. Le degré de cette compensation dépend de la santé des cellules restantes.<sup>19</sup>

La perte irréversible de cellules entraîne une réduction de la densité endothéliale. Sa diminution en dessous d'un seuil critique d'environ 400-700 cellules/mm<sup>2</sup><sup>9, 11, 19</sup> cause une défaillance de l'endothélium, une perte de l'équilibre entre son rôle de barrière semi-perméable et sa fonction de pompe, et une accumulation d'eau dans la cornée.<sup>42</sup> Il en résulte un œdème stromal et/ou épithélial. L'œdème cornéen aigu se produit majoritairement par l'altération de la fonction de barrière à l'humeur aqueuse, alors que l'œdème d'évolution chronique est surtout associé avec une perte de la fonction de pompe, quoique les deux mécanismes peuvent se chevaucher.<sup>42</sup>

L'augmentation du volume de liquide lié aux GAGs stromaux entraîne une séparation antéro-postérieure plus grande et non-uniforme entre les fibrilles de collagène, une perte des protéoglycans et une lyse des kératocytes stromaux. Ce phénomène perturbe l'arrangement régulier des composantes stromales responsable de la transparence cornéenne et accroît la dispersion de la lumière.<sup>9, 14</sup> L'accumulation de liquide dans les compartiments intra- et extra-cellulaires de la couche épithéliale basale entraîne une irrégularité de la surface épithéliale, une perte de l'homogénéité de l'indice réfractif épithélial et une dispersion importante des rayons lumineux incidents sur la cornée.<sup>9, 14</sup> Avec la progression de l'œdème, l'épithélium se détache de sa membrane basale formant des bulles sous-épithéliales.<sup>9, 19</sup>

Cliniquement, les patients se présentent avec une vision floue et une sensibilité à la lumière surtout marquée au réveil, une photophobie et des halos autour des sources

lumineuses surtout évidente la nuit.<sup>14</sup> L'examen démontre un œdème stromal qui se manifeste par un haze granulaire diffus et un épaissement.<sup>14, 42</sup> Dans l'œdème stromal plus avancé, des plis de la DM apparaissent secondairement à l'aplatissement de la courbure postérieure cornéenne et, donc, le raccourcissement de l'arc recouvert par la DM de limbe en limbe.<sup>14, 19</sup> Lorsqu'elle gonfle, la cornée s'épaissit seulement dans la direction antéro-postérieure sans augmentation de son diamètre, en raison de la disposition serrée des lamelles de collagène parallèlement plutôt que perpendiculairement au limbe.<sup>14</sup> L'épaisseur cornéenne mesurée par pachymétrie permet ainsi d'estimer l'ampleur de l'œdème stromal.<sup>42</sup>

Des degrés variables d'œdème épithélial peuvent être notés lors de l'examen à la lampe à fente, incluant des microkystes sous-épithéliaux, une kératopathie bulleuse, des érosions cornéennes récurrentes ou des ulcères. Les microkystes sont de petites « gouttelettes » réfractiles, visibles en illumination indirecte, provenant de la couche épithéliale basale et migrant vers la surface.<sup>1</sup> En fusionnant, ces microkystes forment des bulles sous-épithéliales qui entraînent une séparation de l'épithélium de sa membrane basale et qui éclatent éventuellement causant de la douleur et des érosions.<sup>1</sup> Dans les cas les plus avancés et sévères, une néovascularisation cornéenne apparaît, avec formation d'un pannus sous-épithélial. Le pannus soulage l'œdème, mais exacerbe l'opacification cornéenne.<sup>14, 19</sup>

## 2.2. Entités cliniques

Le diagnostic différentiel d'une défaillance endothéliale inclue des causes primaires (dystrophies endothéliales) et secondaires, dont les dommages mécaniques et iatrogéniques, les brûlures chimiques, l'inflammation et l'hypertension intraoculaire.

Les **endothéliopathies primaires** sont relativement peu nombreuses et incluent la dystrophie endothéliale de Fuchs, la dystrophie postérieure polymorphe, la dystrophie endothéliale congénitale héréditaire (CHED), le syndrome endothélial irido-cornéen (ICE) et des formes intermédiaires de ces entités.<sup>19</sup>

La **dystrophie endothéliale de Fuchs** est une maladie héréditaire autosomique dominante, bilatérale (quoique souvent asymétrique), à prédominance féminine, apparaissant typiquement dans la soixantaine<sup>19</sup> et touchant de 4 à 9% de la population de plus de 50 ans.<sup>43, 44</sup> Les cellules endothéliales subissent une dégénérescence fibroblastique, perdent leur fonction de pompe cellulaire et sécrètent des quantités excessives de matrice collagèneuse qui se dépose à l'aspect postérieur de la DM et forme des excroissances focales appelées *guttae*.<sup>45</sup> La séquence physiopathologique de cette dystrophie n'est pas encore élucidée.<sup>45</sup> Cliniquement, la maladie évolue à travers quatre stades. Asymptomatiques initialement, avec seulement des *guttae* visibles à la lampe à fente dans la cornée centrale, les patients développent graduellement un œdème cornéen, puis une kératopathie bulleuse, au fur et à mesure que les *guttae* fusionnent se propageant vers la périphérie et que la densité endothéliale diminue causant une perte de la fonction de barrière de l'endothélium.<sup>45</sup>

La **dystrophie postérieure polymorphe** est aussi une pathologie héréditaire autosomique dominante, classiquement bilatérale, mais beaucoup plus rare que la dystrophie de Fuchs en Amérique du Nord.<sup>46, 47</sup> Les cellules endothéliales anormales acquièrent des caractéristiques épithéliales avec, notamment, une tendance à proliférer et former des multicouches, des microvilli apicaux et des desmosomes intercellulaires.<sup>48</sup> Des anomalies de la DM, telles un épaissement et une apparence multilaminée, sont aussi présentes.<sup>48</sup> Le tableau clinique est variable, allant de lésions vésiculaires rondes ou en bandelette discrètes, à des lésions géographiques plus larges et un œdème cornéen.<sup>19, 47, 48</sup> Les cellules anormales peuvent proliférer jusqu'à former des adhésions irido-cornéennes et entraîner une TIO élevée ou même un glaucome secondaire.<sup>14, 48</sup>

La **dystrophie endothéliale congénitale héréditaire (CHED)** est à transmission autosomique dominante (type I) ou récessive (type II). La maladie se présente dans la 1<sup>ère</sup> ou 2<sup>e</sup> année de vie avec un œdème cornéen diffus bilatéral et vision floue, et demeure relativement stationnaire ou progresse très lentement par la suite.<sup>14, 48</sup> Les résultats histopathologiques incluent un épaissement de la DM et la formation d'une couche postérieure collagèneuse à l'aspect intracaméral.<sup>14, 48</sup> Les cellules endothéliales sont

absentes ou rares, atrophiques et en dégénérescence. Un épithélium squameux stratifié remplace les régions dépourvues d'endothélium.<sup>14, 48</sup>

Le **syndrome endothélial irido-cornéen (ICE)** est une entité acquise, le plus souvent unilatérale, à prédominance féminine, se manifestant habituellement entre 30 et 50 ans.<sup>48</sup> Le syndrome ICE englobe un spectre de maladies avec des degrés variés d'œdème cornéen, anomalies iriennes et glaucome.<sup>19, 48</sup> Les cellules endothéliales, comme dans la dystrophie postérieure polymorphe, assument des caractéristiques épithéliales. Lorsque l'endothélium échoue dans sa fonction de pompe cellulaire entraînant un œdème cornéen et que l'atteinte est limitée à la cornée, le tableau est désigné comme un syndrome de Chandler. L'atrophie essentielle de l'iris se produit lorsque l'endothélium malade migre sur la surface de l'iris formant une membrane contractile et résultant en polycorie, corectopie ou atrophie irienne. Lorsque cette migration envahit l'angle irido-cornéen, un glaucome secondaire peut survenir.

Les **dommages mécaniques** de l'endothélium se produisent suite à tout contact direct avec la surface endothéliale. Ainsi, un **corps étranger intraoculaire** peut entraîner un trauma par ballotement contre l'endothélium et causer plus de dommage que son passage initial à travers la cornée.<sup>14</sup> Toute **chirurgie intraoculaire** pose un risque de répercussions sur l'endothélium.

Dans le contexte d'une chirurgie de cataracte, la chirurgie intraoculaire la plus fréquente partout dans le monde,<sup>49</sup> les sources de traumatisme mécanique incluent le contact direct avec les instruments chirurgicaux, avec la lentille intraoculaire implantée, des particules du cristallin retenues dans l'œil, ou encore du vitré faisant saillie dans la chambre antérieure à travers l'ouverture pupillaire.<sup>14</sup> La manipulation même des instruments chirurgicaux à travers la plaie limbique ou cornéenne peut affecter la réserve fonctionnelle de l'endothélium et induire une décompensation, surtout dans le cas d'une cornée fragilisée par une maladie préexistante.<sup>2, 19</sup> Au-delà des atteintes mécaniques, l'endothélium peut souffrir des dommages de par l'exposition à des solutions d'irrigation ou des médicaments injectables toxiques, ou encore de par une brûlure thermique secondaire à un transfert de chaleur des sondes utilisées pour la phacoémulsification, si

celles-ci sont tenues trop près de l'endothélium.<sup>9, 19</sup> L'**œdème cornéen du pseudophaque ou de l'aphaque** désigne l'œdème irréversible causé par une diminution accélérée de la densité endothéliale suite à une chirurgie de cataracte.<sup>9, 19</sup> Cette entité est devenue une indication majeure pour la transplantation cornéenne dans les années 1980.<sup>9</sup> Son incidence a beaucoup diminué depuis, avec l'introduction d'agents viscoélastiques et de lentilles intraoculaires implantables dans la chambre postérieure et avec l'amélioration des techniques chirurgicales.<sup>14, 19</sup>

Les endothéliopathies secondaires à des **dommages non-mécaniques** incluent les brûlures chimiques, l'inflammation intraoculaire et l'hypertension oculaire. Les **brûlures chimiques** acides ou alcalines agissent en altérant le pH normalement toléré par l'endothélium, résultant en un bris des jonctions intercellulaires et une perte de la fonction endothéliale de barrière.<sup>14</sup> Le dommage causé par une **uvéite** antérieure dépend de l'état de base de l'endothélium et de la durée de l'inflammation. Une décompensation endothéliale se produit surtout lors de la présence de pathologies endothéliales préexistantes et lorsque l'uvéite est chronique et insidieuse.<sup>14</sup> Une **augmentation aigüe de la TIO**, comme c'est le cas dans un glaucome aigu à angle fermé, cause un œdème cornéen transitoire de par sa nature compressive sur la surface postérieure de la cornée. L'accumulation de liquide dans le stroma secondaire à cette pression excède alors la capacité de pompe de l'endothélium. Dans les cas d'**hypertension oculaire persistante**, la pression peut directement endommager les cellules cornéennes et induire une décompensation irréversible.<sup>14</sup>

### 2.3. **Approches thérapeutiques actuelles et leurs limitations**

Le traitement symptomatique de la défaillance endothéliale vise à résorber l'œdème et soulager l'inconfort cornéen. Des agents hypertoniques, tels le chlorure de sodium topique, et des médicaments hypotensifs oculaires réduisent l'œdème.<sup>14, 48</sup> Un sèche-cheveux tenu à distance d'un bras et dirigé contre les yeux peut aussi aider à « sécher » les cornées et améliorer la vision matinale.<sup>1</sup> Les verres de contact thérapeutiques,<sup>50</sup> la ponction stromale antérieure<sup>51-53</sup> et les greffes de membrane amniotique<sup>54-56</sup> ou de conjonctive<sup>57</sup> sont utilisées pour recouvrir les érosions épithéliales et soulager la douleur



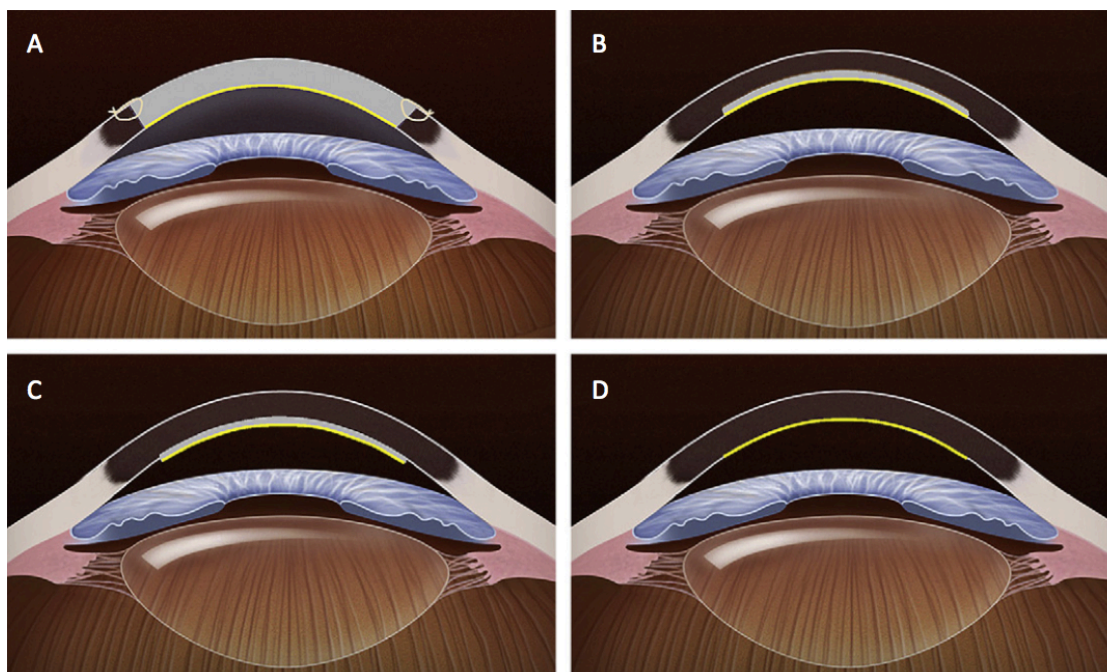
secondaire à la kératopathie bulleuse. Le traitement définitif de la décompensation endothéliale irréversible requiert une transplantation cornéenne, par contre.

Dr Eduard Zirm a réussi la première transplantation cornéenne chez l'humain en 1905.<sup>58</sup> Le remplacement de la cornée œdématisée malade au complet par kératoplastie pénétrante (**KP, Figure 10A**) a longtemps été l'approche thérapeutique standard.<sup>59</sup> Cette technique implique la trépanation du bouton cornéen receveur et sa substitution par un bouton donneur pleine-épaisseur du même diamètre fixé sur 360 degrés avec des points de suture.<sup>60</sup> Les désavantages de cette approche, telles la réhabilitation visuelle prolongée, les complications reliées aux points de suture (astigmatisme irrégulier, infiltrats, érosions, abcès), ainsi que le risque de déhiscence de la plaie et de rejet immunologique,<sup>60</sup> ont contribué à une transition vers des techniques moins invasives.

Le concept de remplacement sélectif des couches cornéennes malades a émergé tant pour les atteintes cornéennes antérieures que postérieures. Après l'introduction des premières techniques de transplantation endothéliale pour le traitement des endothéliopathies dans les années 1990, des approches de plus en plus sélectives ont été proposées.<sup>60</sup> Ainsi, en passant par la kératoplastie lamellaire postérieure profonde (*deep lamellar endothelial keratoplasty*, **DLEK, Figure 10B**) et par la *Descemet's stripping endothelial keratoplasty* (**DSEK, Figure 10C**), la transplantation endothéliale a évolué pour permettre aujourd'hui la greffe d'un feuillet composé de DM et d'endothélium uniquement (*Descemet's membrane endothelial keratoplasty*, **DMEK, Figure 10D**). Introduite en 2006 par Melles et collègues,<sup>61</sup> la DMEK est une technique relativement nouvelle et demeure, pour l'instant, moins populaire que la DSEK.<sup>62</sup>

La DSEK implique une dissection sur un diamètre de 7 à 8 mm de la DM et de l'endothélium cornéen du receveur sans dissection stromale postérieure, ce qui la distingue de la DLEK et facilite de beaucoup son exécution.<sup>60</sup> Le greffon, lui, contient une portion mince du stroma du donneur en plus de la DM et de l'endothélium. Il est plié et introduit dans la chambre antérieure par une plaie limbique de 3 à 5 mm, puis déplié et accolé à l'aspect postérieur de la cornée avec une bulle d'air.<sup>60, 63</sup> Une variante de la DSEK est la *Descemet's stripping automated endothelial keratoplasty* (**DSAEK**), où un microkératome est utilisé pour faciliter et améliorer la dissection du bouton donneur.<sup>60, 63</sup>

La DMEK se distingue de la DSEK par l'absence de stroma dans le greffon.<sup>61, 64</sup> La dissection du donneur est exécutée manuellement ou avec un microkératome.<sup>60, 64</sup> Le tissu donneur est soigneusement enroulé sur lui-même et introduit dans la chambre antérieure par une plaie limbique, puis il est déroulé et accolé à la cornée DM-vers-le-haut à l'aide d'une solution d'irrigation et de l'air, avec ou sans gaz SF6.<sup>64</sup>



**Figure 10.** Représentation schématique des techniques de transplantation pour le traitement des maladies endothéliales.

**(A)** Kératoplastie pénétrante. **(B)** Kératoplastie lamellaire profonde postérieure (DLEK). **(C)** *Descemet's stripping endothelial keratoplasty* (DSEK). **(D)** *Descemet's membrane endothelial keratoplasty* (DMEK). Adaptée de Patel.<sup>65</sup>

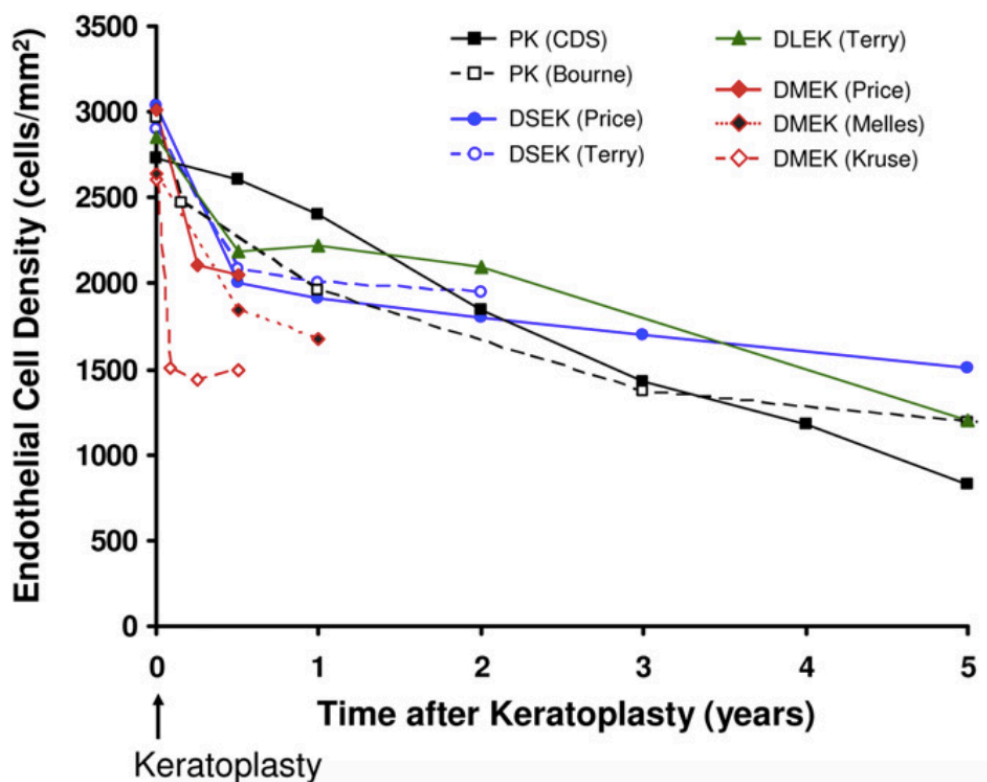
La kératoplastie endothéliale est associée à de meilleurs résultats chirurgicaux lorsque comparée à la greffe transfixiante, avec une récupération visuelle plus rapide et une acuité visuelle supérieure.<sup>60</sup> L'acuité visuelle rapportée après DMEK à 3 mois surpasse d'ailleurs celle décrite à six mois et plus post-DSA EK (médiane de 20/25 vs. 20/40, respectivement).<sup>60</sup> Ces résultats supérieurs sont probablement dus à la minceur du tissu greffé avec la DMEK qui épouse mieux la courbure cornéenne que le greffon DSAEK.<sup>60</sup>

Contrairement à la KP qui se déroule « à ciel ouvert », les kératoplasties endothéliales sont exécutées à travers une petite plaie limbique; elles sont donc moins invasives et préservent l'innervation cornéenne. Ainsi, présentent-elles un moindre risque intra-opératoire d'hémorragie suprachoroïdienne, moins de complications de surface oculaire et une meilleure stabilité et intégrité cornéenne structurelle.<sup>60</sup> Ne nécessitant de points de suture que pour fermer la petite plaie, elles sont aussi associées à un moindre taux de complications liées aux sutures (relâchement, infection, vascularisation et rejet).<sup>60</sup> Le décollement du greffon est la complication la plus commune des DSAEK et DMEK, mais peut être corrigée dans la plupart des cas avec une révision chirurgicale.<sup>60, 66</sup>

Malgré les résultats chirurgicaux et le profil d'innocuité des kératoplasties endothéliales, leur succès demeure éclipsé par le risque de rejet immunologique et par l'attrition des cellules endothéliales cornéennes du donneur. Post-DSAEK, le risque de rejet rapporté dans la plus grande série de cas est de 7,6% à un an et de 12% à deux ans.<sup>60, 67</sup> Selon une revue de la littérature, les risques rapportés varient entre 0 et 45,5% entre 3 mois et 2 ans en postopératoire.<sup>60</sup> Les données concernant le rejet immunologique post-DMEK sont peu nombreuses et, quoique son incidence semble être plus rare qu'après une DSAEK, des taux jusqu'à 5% ont été rapportés.<sup>68, 69</sup>

L'attrition des cellules du donneur après une transplantation cornéenne est causée en partie par une manipulation excessive peropératoire du greffon, principalement lors de l'insertion dans la chambre antérieure,<sup>19</sup> et est exacerbée par les épisodes postopératoires d'inflammation intraoculaire ou de rejet. Elle implique une diminution graduelle de la densité endothéliale, une détérioration de la capacité de l'endothélium à maintenir la cornée déshydratée et un éventuel échec de la greffe.<sup>60</sup> L'attrition se produit indépendamment de la technique utilisée, mais le degré et la vitesse de la perte varient (**Figure 11**).<sup>19, 60</sup> L'attrition précoce après une kératoplastie endothéliale est plus élevée comparé à une greffe transfixiante, probablement en raison d'une manipulation plus importante du tissu donneur.<sup>70</sup> Ainsi, à un an post-DSAEK, le taux de perte de cellules endothéliales est autour de 30-40%, alors qu'il est d'environ 20% après une KP.<sup>70</sup> Au-delà de cette période précoce, par contre, ce taux s'estompe et atteint 1-4% par année, ce qui est relativement plus bas que suite à une KP, où l'attrition continue à un taux de 10-12%

par année. Sur une période de 3 ans, la perte de cellules du donneur est donc comparable entre les deux techniques.<sup>70</sup> Les données post-DMEK sont encore peu nombreuses et à court-terme, avec des taux rapportés autour de 35% à 6 mois et 1 an.<sup>41</sup>



**Figure 11.** Attrition des cellules endothéliales du donneur selon la technique de greffe.

Dans la première année en postopératoire, la perte est plus grande après une DSAEK qu'après une kératoplastie pénétrante. À 2 ans, l'attrition est comparable avec les deux techniques. À 5 ans, la perte cellulaire est plus basse avec la DSAEK. Seulement les données des études plus grandes ont été incluses à des fins de clarté. Le chirurgien principal pour chaque série est indiqué entre parenthèses. CDS : *Cornea Donor Study*; DLEK : *deep lamellar endothelial keratoplasty*; DMEK : *Descemet's membrane endothelial keratoplasty*; DSEK : *Descemet's stripping endothelial keratoplasty*; PK : *penetrating keratoplasty*. Adaptée de Patel.<sup>65</sup>

## 2.4. Tendances et indications pour la kératoplastie endothéliale

La cornée est le tissu humain le plus fréquemment transplanté mondialement.<sup>71, 72</sup> Une revue systématique récente de données provenant de 134 pays a rapporté approximativement 185 000 greffes cornéennes effectuées en 2012.<sup>72</sup> Leur nombre augmente continuellement, en partie en raison de l'amélioration de l'accès aux soins et des techniques chirurgicales,<sup>73</sup> mais surtout en raison du vieillissement de la population et de l'incidence secondairement plus élevée des maladies cornéennes liées à l'âge.<sup>74</sup> Selon la Eye Bank Association of America (EBAA), 69 833 transplantations cornéennes ont été effectuées avec des cornées provenant des États-Unis en 2014, une augmentation de 5,1% par rapport à 2013 et de 10% par rapport à 2012.<sup>62</sup> Quoique moins de greffes soient documentées annuellement au Canada, la tendance est similaire.<sup>73, 75, 76</sup> Leur nombre total rapporté pour la province de Québec a doublé entre l'an 2000 et 2011.<sup>76</sup>

Mondialement, la KP demeure la technique la plus populaire : 70.3% de toutes les greffes cornéennes réalisées en 2012 étaient des KP.<sup>72</sup> Ces données reflètent l'utilisation encore embryonnaire des greffes lamellaires postérieures dans les pays en voie de développement, contrairement aux pays comme les États-Unis et le Canada. Les chiffres du rapport de la EBAA vont dans ce sens : des cornées exportées à l'extérieur des États-Unis, 80% ont servi à des KP en 2014.<sup>62</sup> À l'opposé, aux États-Unis, avec 25 965 kératoplasties endothéliales contre 19 294 greffes transfixiantes, les greffes lamellaires postérieures sont devenues l'approche préférée pour les maladies endothéliales.<sup>62</sup> Relativement nouvelles, les DMEK/DMAEK demeurent moins fréquentes que la DSAEK. Le nombre de DMEK effectuées annuellement ne cesse de croître, par contre, avec une augmentation de 88,2% entre 2013 et 2014.<sup>62</sup> Une transition semblable des greffes pleine-épaisseur vers celles lamellaires pour le traitement de la décompensation endothéliale a été documentée au Québec,<sup>76</sup> en Ontario<sup>77</sup> et en Colombie Britannique.<sup>73</sup>

Les indications pour une greffe de cornée varient selon des facteurs géographiques, démographiques et socioéconomiques. Représentant 40% de toutes les transplantations rapportées par la EBAA en 2014,<sup>62</sup> les maladies endothéliales en sont la principale indication en Amérique du Nord, avec l'œdème cornéen du pseudophaque/aphaque et la

dystrophie endothéliale de Fuchs en tête de file.<sup>62, 73, 76, 77</sup> Au Québec, la dystrophie endothéliale de Fuchs devance l'œdème cornéen du pseudophaque depuis 2009, possiblement en raison du perfectionnement continu des techniques pour la chirurgie de cataracte.<sup>76</sup>

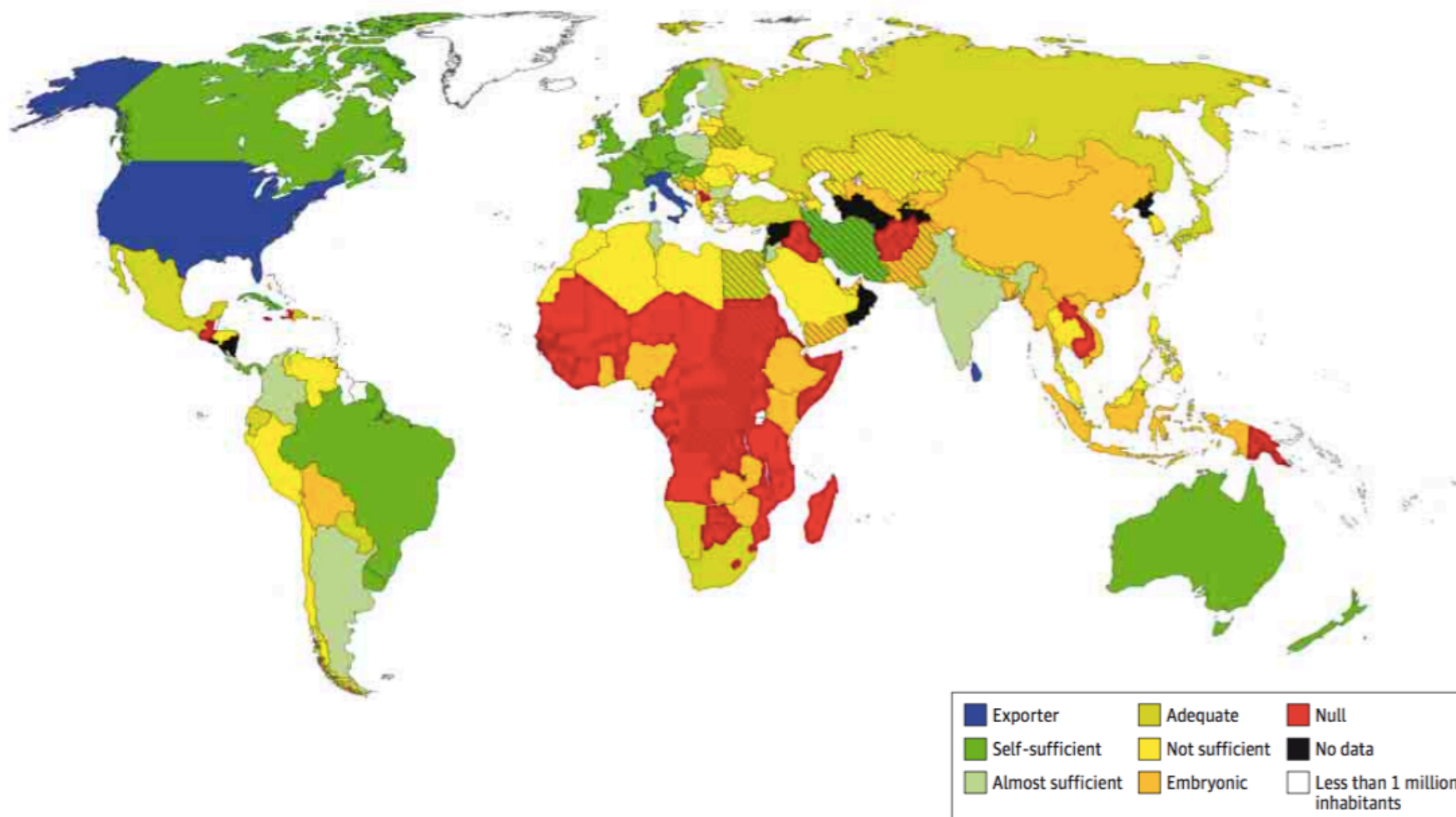
## 2.5. Le dilemme de la pénurie de tissu cornéen donneur

Environ 12,7 millions de personnes sont en attente d'une transplantation cornéenne dans le monde.<sup>72</sup> Bien que certains pays arrivent à répondre à la demande locale (Canada, Brésil, Australie, pays de l'Europe de l'Ouest) et parviennent même à exporter des cornées (États-Unis, Italie, Sri Lanka), la plupart rencontrent des difficultés à s'autosuffire et à se procurer des tissus à l'international.<sup>72</sup> La situation est particulièrement précaire dans les pays africains et de l'Asie du Sud-Est (**Figure 12**).<sup>72</sup> Alors que le temps d'attente moyen dans les pays avec un approvisionnement adéquat en tissu cornéen est d'approximativement 6,5 mois (environ 1 an au Canada),<sup>72, 76, 78, 79</sup> la plupart des patients des pays en pénurie ne reçoivent jamais de greffe.<sup>72</sup> Ainsi, au moins 53,3% de la population mondiale n'a pratiquement pas d'accès aux transplantations cornéennes.<sup>72</sup>

L'offre en cornées de donneurs est présentement limitée, dépendamment des pays, en raison des critères d'exclusion sévères des banques d'yeux, des difficultés logistiques et/ou des facteurs religieux. Ainsi, un nombre important des cornées cadavériques obtenues par les banques d'yeux est rejeté sur la base d'une densité endothéliale insuffisante (habituellement, si inférieure à 2000 cellules/mm<sup>2</sup>), d'antécédents médicaux du donneur manquants ou de résultats positifs aux tests sérologiques de dépistage de maladies infectieuses.<sup>11, 80</sup> Les obstacles logistiques incluent l'absence d'infrastructure administrative adéquate, de personnel dédié à la collecte des tissus à toutes les heures de la journée ou d'allocations gouvernementales suffisantes aux banques d'yeux.<sup>11, 76</sup> Dans certains pays, le don d'organes est moins accepté pour des raisons religieuses, ce qui affecte d'autant plus la disponibilité des tissus.<sup>72</sup>

Dans le contexte d'une offre précaire, l'augmentation de la demande mondiale en greffes cornéennes risque d'exacerber la pénurie en tissu donneur dans les années à venir. En effet, une croissance démographique importante est attendue d'ici 2050<sup>81</sup> et sera plus

marquante dans des pays en voie de développement tels l'Inde et la Chine qui, à elles seules, regroupent déjà près de 9 millions de personnes en attente de greffe de cornée.<sup>72</sup> Dans les pays développés, le vieillissement de la population influence à la hausse l'incidence des maladies cornéennes liées à l'âge et se traduira par un plus grand besoin en transplantations de cornée dans le futur rapproché.<sup>82</sup>



**Figure 12.** L'offre et la demande pour les transplantations cornéennes dans 148 pays.

Le terme « embryonnaire » désigne une activité existante, suggérant un désir d'exécuter des greffes cornéennes et au moins une quelconque infrastructure pour la préservation des cornées, mais un nombre de greffes effectuées limité à quelques cas seulement. Les données pour les pays hachurés étaient jugées de robustesse questionnable. Adaptée de Gain et al.<sup>72</sup>



### **3. La kératoplastie endothéliale avec CEC cultivées**

La décompensation endothéliale irréversible mène à une cécité qui ne peut être définitivement traitée que par une transplantation cornéenne. La demande en tissu cornéen donneur ne cesse de croître, alors que l'offre demeure modeste, restreignant l'accessibilité d'une grande proportion de la population mondiale à cette option thérapeutique. Même dans les parties du monde où la greffe de cornée est relativement accessible, l'attrition postopératoire des cellules endothéliales du donneur et le risque de rejet immunologique limitent les bénéfices thérapeutiques malgré l'avancement des techniques chirurgicales. Ces complications mènent à une éventuelle greffe, contribuant ainsi à l'exacerbation de la pénurie en tissu donneur.

Les limitations des traitements actuels justifient l'intérêt clinique envers la recherche d'alternatives thérapeutiques qui permettraient de reconstituer un endothélium cornéen tout en contournant ces obstacles. Le nouvel endothélium serait idéalement hypercellulaire, hautement fonctionnel, libre de maladies transmissibles et compatible avec les propriétés optiques et biomécaniques cornéennes (i.e. transparence maximale et astigmatisme minime), ainsi qu'avec le profil immunologique du patient.<sup>80</sup> Cet endothélium serait reconstitué utilisant les techniques chirurgicales présentement disponibles ou une nouvelle technique plus facile d'exécution et moins invasive. Enfin, les bénéfices et les résultats chirurgicaux des nouveaux traitements devraient être équivalents ou supérieurs à ceux obtenus avec l'allo-transplantation traditionnelle.

#### **3.1. Prolifération *in vitro* des CEC humaines**

Malgré l'arrêt des CEC humaines dans la phase G1 du cycle cellulaire *in vivo*, celles-ci conservent une capacité proliférative qui peut être stimulée *in vitro* dans des conditions optimales avec des facteurs de croissance.<sup>27, 83, 84</sup> L'utilisation pour la reconstitution d'un nouvel endothélium de CEC prélevées de cornées cadavériques et amplifiées en culture permettrait de répondre à la demande grandissante en tissu cornéen de haute qualité.

La préparation *in vitro* de telles CEC offrirait l'avantage d'un contrôle direct et précis tant sur la qualité et la stérilité, que sur la densité cellulaire du nouvel endothélium. Les

cellules prélevées d'une seule cornée pourraient être stimulées à proliférer *in vitro* de façon à produire un nombre suffisant pour générer un endothélium hypercellulaire à moindre risque d'échec de greffe par attrition postopératoire, ainsi que pour greffer plus d'un patient.<sup>80</sup> L'option d'une cryopréservation de cornées cadavériques sur de longues périodes de temps<sup>85</sup> permettrait d'en cultiver et transplanter les cellules endothéliales ultérieurement sans les « gaspiller » si elles ne sont pas utilisées dans l'immédiat. Ceci permettrait aussi de regreffer un patient des années plus tard avec des cellules immunologiquement identiques sans sensibilisation par de nouveaux anticorps donneurs.<sup>80</sup> Finalement, l'éventuelle possibilité d'une transplantation de CEC autologues prélevées dans la périphérie cornéenne du patient et amplifiées en culture éliminerait, en théorie, le risque de rejet et le besoin même de tissu donneur. Les protocoles d'isolement et de culture de CEC varient grandement entre les laboratoires et seront résumés dans cette section.

### **3.1.1. Protocoles d'isolement des CEC**

L'isolement des CEC d'une cornée doit, idéalement :

- a) Être efficace et permettre le prélèvement d'un nombre maximal de CEC.
- b) Cibler les cellules avec le plus haut potentiel prolifératif.

Les cellules provenant de donneurs plus jeunes (<20 ans) sont plus faciles à cultiver et à maintenir en culture que les cellules de donneurs plus âgés.<sup>27</sup> Celles dérivées de la périphérie cornéenne ont une plus grande capacité répliquative que celles centrales.<sup>27</sup> Ainsi, des cornées de donneurs plus jeunes devraient, idéalement être utilisées et la technique d'isolement devrait permettre d'isoler les CEC tant centrales que périphériques.

- c) Éviter la contamination de la population isolée par d'autres cellules cornéennes, notamment les kératocytes.

Ayant une capacité proliférative plus importante que les CEC, des kératocytes isolés simultanément par inadvertance deviennent rapidement fibroblastiques et

submergent la culture, empêchant l'établissement d'une monocouche endothéliale.<sup>80</sup>

Une approche couramment utilisée pour l'isolement des CEC est la méthode en deux étapes « *peel-and-digest* ». <sup>11</sup> Cette technique consiste en un pelage soigneux de la DM et de l'endothélium qui la recouvre du reste de la cornée, suivi d'une digestion enzymatique pour relâcher les interactions intercellulaires et celles entre les cellules et la DM. Plusieurs agents ont été décrits pour cette deuxième étape, dont l'acide ethylènediaminetetraacétique (**EDTA**),<sup>83, 86-90</sup> la trypsine,<sup>91</sup> la collagénase<sup>92, 93</sup> et la dispase.<sup>94, 95</sup> Alternativement, les CEC peuvent être cultivées sans détachement préalable de la DM par culture d'explants : la DM avec la monocouche endothéliale isolée est placée endothélium-vers-le-bas sur une surface de culture pour permettre la migration et l'excroissance cellulaire.<sup>96, 97</sup>

Les deux techniques peuvent entraîner l'isolement indésirable de kératocytes en plus des CEC, surtout avec l'utilisation de cornées de donneurs jeunes ou de certains animaux dont la DM est plus fine et/ou plus adhérente au stroma.<sup>11, 80</sup> Pour contourner cet inconvénient, l'utilisation d'un milieu sans L-valine pour inhiber la croissance fibroblastique a été proposé.<sup>98</sup> Afin de faciliter le pelage de la DM lorsque celui-ci s'avère difficile, des stratégies telles l'aspiration sous vide pour maintenir le tissu cornéen en place<sup>99</sup> ou le prétraitement avec dispase avant le pelage<sup>100</sup> peuvent être tentées. L'expérience du technicien joue aussi un rôle important dans la qualité et l'efficacité de la technique d'isolement.<sup>11</sup>

### **3.1.2. Protocoles de culture de CEC**

Une fois isolées, les CEC sont placées en culture pour amplification. La plupart des laboratoires utilisent des surfaces de culture enrobées de matrice extracellulaire pour favoriser l'adhérence des CEC.<sup>11</sup> Les agents d'enrobage décrits dans la littérature incluent le collagène,<sup>92</sup> un mélange de laminine et de chondroïtine,<sup>98</sup> un mélange de fibronectine, collagène et albumine (« *FNC coating mix* »)<sup>88-90, 95</sup> et une matrice extracellulaire dérivée de CEC bovines.<sup>102-104</sup> L'utilisation de surfaces de culture sans enrobage matriciel a aussi été proposée.<sup>86</sup>

Une variété de milieux de culture composés de sérum bovin et de facteurs de croissance ont été optimisés au fil du temps pour stimuler la prolifération de CEC humaines et/ou animales. Les milieux de culture diffèrent d'une espèce à l'autre, tout comme le potentiel prolifératif intrinsèque de leurs CEC.<sup>80</sup> Le **Tableau 1** résume les formulations des milieux optimisés pour les CEC humaines. La formulation la plus fréquemment citée est celle de Zhu et Joyce.<sup>90</sup> Dans une perspective d'un transfert sécuritaire en clinique sans risque de transmission de pathogènes animaux aux humains, un milieu de culture sans sérum bovin a été proposé.<sup>105, 106</sup>

Les CEC en culture primaire prolifèrent jusqu'à confluence, moment auquel la prolifération arrête par un mécanisme d'inhibition de contact (« *cell-to-cell contact dependent inhibition* »).<sup>107</sup> Plusieurs passages cellulaires peuvent donc être nécessaires pour obtenir des nombres élevés de CEC. Lors d'un passage, les CEC cultivées sont dissociées les unes des autres par digestion enzymatique afin de les rendre à nouveau réceptives aux effets mitogéniques des facteurs de croissance et stimuler leur prolifération.<sup>107</sup> Elles sont alors placées en sous-culture. Avec le nombre croissant de passages, la culture devient de plus en plus hétérogène en raison d'une transition des CEC vers un phénotype fibroblastique ou de l'instauration d'une sénescence répllicative.<sup>11, 107, 108</sup> Ainsi, le nombre de passages possibles à partir d'une culture primaire est limité.

**Tableau 1.** Milieux de culture pour les CEC humaines.

	Milieu de base	Sérum	Suppléments/facteurs de croissance
<b>Blake et al.</b> <sup>102</sup>	MEM	10%	5 µg/mL insuline; 5 µg/mL transferrine; 5 ng/mL sélénite de sodium; 150 µg/mL ECGS; 50 µg/mL gentamicine; 100 U/mL pénicilline; 100 µg/mL streptomycine; 0.25 µg/mL amphotericine B
<b>Yue et al.</b> <sup>109</sup>	MEM	15%	200 mM glutamine; 2% acides aminés essentiels; 1% acides aminés non-essentiels; 10 µg/mL gentamicine; 1.2 µg/mL amphotericine B
<b>Miyata et al.</b> <sup>103</sup> <b>Amano et al.</b> <sup>104</sup>	DMEM	15%	30 mg/L L-glutamine; 2.5 mg/L fungizone; 2.5 mg/L doxycycline; 2 ng/mL bFGF
<b>Pistsov et al.</b> <sup>110</sup>	M199	20%	4 mM glutamine; 200 µg/mL ECGS; 100 µg/mL pénicilline; 100 µg/mL streptomycine
<b>Zhu and Joyce</b> <sup>90</sup>	Opti-MEM-I	8%	20 ng/mL NGF; 5 ng/mL EGF; 20 µg/mL acid ascorbique; 200 mg/L chlorure de calcium; 100 µg/mL extract de glande pinéale; 50 µg/mL gentamicine; 1X antibiotique/antimycotique; 0.08% sulfate de chondroïtine
<b>Engelmann and Friedl</b> <sup>111, 112</sup>	F99 Ham's F12 et M199 (ratio 1:1)	2-5%	20 µg/mL acid ascorbique; 20 µg/mL insuline bovine; 2.5 µg/mL transferrine; 0.6 µg/mL sélénite de sodium; 10 ng/mL bFGF
<b>Li et al.</b> <sup>92</sup>	SHEM Ham's F12 et DMEM (ratio 1:1)	5%	0.5% DMSO; 2 ng/mL EGF; 5 µg/mL insuline; 5 µg/mL transferrine; 5 ng/mL sélénium; 0.5 µg/mL hydrocortisone; 1 nM toxine cholérique; 50 µg/mL gentamicine; 1.25 µg/mL amphotericine B
<b>Ishino et al.</b> <sup>94</sup>	DMEM	10%	2 ng/mL bFGF; 50 U/mL pénicilline; 50 µg/mL streptomycine
<b>Choi et al.</b> <sup>113</sup>	EGM-2 milieu de croissance endothéliale	10%	SingleQuots (Lonza, Switzerland); VEGF; EGF; bFGF; IGF; acide ascorbique; hydrocortisone; gentamicin; amphotericine B
<b>Mimura et al.</b> <sup>114, 115</sup>	DMEM/F12	-	Supplément B27; 20 ng/mL EGF; 40 ng/mL FGF

\*Modifiée de Peh et al.<sup>11</sup> ECGS, endothelial cell growth supplement; bFGF, basic fibroblast growth factor; NGF, nerve growth factor; EGF, epidermal growth factor; DMSO, dimethyl sulfoxide; VEGF, vascular endothelial growth factor; IGF, insulin-like growth factor; SHEM, supplemented hormonal epithelial medium; MEM, minimum essential medium; DMEM, Dulbecco's Modified Eagle Medium.

### **3.2. Monocouches endothéliales construites par génie tissulaire**

Une monocouche endothéliale reconstituée en culture est trop fragile et friable pour être transplantée seule. Ainsi, ces monocouches sont soit placées dans un deuxième temps, soit reconstruites directement sur des supports qui permettent un mode de transplantation compatible avec les techniques chirurgicales actuellement disponibles.

À l'arrivée des CEC à confluence en culture, l'endothélium peut être récolté en une monocouche. Certains chercheurs ont utilisé des supports thermosensibles pour cultiver les CEC, permettant de les détacher au moment opportun grâce à une baisse de température.<sup>116-119</sup> D'autres ont dégagé la monocouche de son support avec l'EDTA.<sup>120</sup> Placé ensuite sur un support, l'endothélium a été transplanté avec succès par KP<sup>116, 120</sup> ou par approche lamellaire postérieure<sup>117</sup> chez l'animal.

Alternativement, les CEC isolées et cultivées peuvent êtreensemencées directement sur le support après plusieurs passages; elles adhèrent alors à celui-ci et forment un endothélium hypercellulaire exprimant des protéines fonctionnelles.<sup>87, 89, 116, 117, 120-122</sup> Plusieurs types de support ont été décrits, chacun avec ses avantages et inconvénients.

#### **Supports minces et souples**

Ceux-ci incluent les membranes minces telles la DM,<sup>123</sup> la membrane amniotique,<sup>94, 124</sup> les membranes de gélatine<sup>117, 125, 126</sup> ou de fibroïne de soie<sup>127</sup> et la capsule antérieure du cristallin.<sup>128</sup> Les greffons reconstruits sur de tels supports sont transplantés par une technique lamellaire postérieure. Leur difficulté d'utilisation vient de leur nature fragile qui complique significativement leur insertion et stabilisation sur le stroma du receveur.<sup>80</sup>

#### **Supports minces et rigides**

Les lentilles en hydrogel,<sup>129</sup> les supports en collagène réticulé<sup>130-132</sup> et ceux en vitrigel<sup>121, 133</sup> en sont des exemples. De par leur minceur, ces greffons peuvent être transplantés par approche postérieure. Par contre, ils sont difficilement intégrables dans la cornée du receveur et facilement déplacés ou décollés.<sup>80, 121</sup>

## Supports pleine-épaisseur

Le stroma cornéen dénudé de son l'endothélium natif a été proposé comme support pour l'endothélium reconstruit par génie tissulaire. Le stroma est, en théorie, le support idéal, offrant, de par sa courbure physiologique et transparence, l'avantage d'une excellente compatibilité avec les propriétés biomécaniques et optiques de la cornée.<sup>80</sup> Certains groupes ont utilisé des stromas frais pour reconstruire et transplanter une monocouche endothéliale chez l'animal.<sup>96, 122, 134-138</sup> Les inconvénients de ces stromas vivants en tant que supports incluent le risque d'envahissement des CEC cultivées par les cellules épithéliales ou les kératocytes stromaux et le besoin en cornées cadavériques des banques d'yeux pour les produire.<sup>80</sup>

Le stroma dévitalisé acellulaire a été proposé comme alternative<sup>86, 89, 113, 139-141</sup> afin de réduire le risque de contamination par d'autres cellules cornéennes. L'immunogénicité réduite du greffon<sup>142, 143</sup> et la possibilité d'employer des tissus cornéens non-utilisés par les banques d'yeux, car inadéquats pour une transplantation traditionnelle, sont des avantages additionnels des stromas dévitalisés.<sup>80</sup> Plusieurs techniques ont été utilisées pour la dévitalisation, dont le gel et l'incubation subséquente avec un gaz d'azote liquide,<sup>144</sup> le débridement chimique avec hydroxyde d'ammonium,<sup>86, 113, 139, 140</sup> et un cycle gel (à -80°C)-dégel.<sup>140</sup> Notre laboratoire a réussi la transplantation d'un endothélium reconstruit sur une cornée humaine dévitalisée par 3 cycles gel-dégel chez un modèle félin vivant.<sup>89</sup> La dévitalisation permet de préserver l'intégrité architecturale et biomécanique stromale, les composantes matricielles stromales nécessaires à l'adhésion cellulaire et la transparence du greffon.<sup>80, 89, 113, 141</sup>

Des monocouches endothéliales reconstruites sur différents supports ont été transplantées avec succès chez l'animal.<sup>87, 89, 116, 117, 120-122</sup> Le choix du meilleur support pour un transfert chez l'humain demeure un défi, par contre, en raison de leur biocompatibilité limitée ou du besoin persistant en tissu donneur humain, dans le cas des stromas et/ou DM.<sup>80</sup> L'injection de CEC cultivées dans la chambre antérieure est une alternative thérapeutique prometteuse et éliminerait le besoin en un support.

### **3.3. Injection intracamérale de CEC cultivées**

#### **3.3.1. Avantages potentiels**

L'injection intracamérale de CEC cultivées offrirait les mêmes avantages que les monocouches endothéliales reconstruites par génie tissulaire. Ainsi, elles seraient préparées *in vitro* dans des conditions hautement contrôlées, permettant d'assurer leur stérilité et qualité. Un nombre précis de CEC à injecter pourrait être préparé de façon à générer un nouvel endothélium hypercellulaire à moindre risque d'échec de greffe par attrition postopératoire. Les options de cryopréservation et de transplantation autologue, avec réduction du « gaspillage » tissulaire et du risque de rejet, seraient également possibles. Finalement, plusieurs patients pourraient être greffés avec les CEC provenant d'une seule cornée de donneur, afin d'atténuer la pénurie mondiale en tissu cornéen.

De plus, l'injection de CEC dans la chambre antérieure éliminerait les complications liées à l'usage d'un support et le temps et les ressources nécessaires à la préparation de celui-ci, permettant de produire des CEC transplantables plus rapidement sans recourir à des tissus donneurs supplémentaires. Enfin, la technique d'injection intracamérale est théoriquement moins invasive et plus facile d'exécution que les kératoplasties pleine-épaisseur et lamellaires postérieures utilisées tant pour l'allo-transplantation traditionnelle, que pour la greffe des monocouches endothéliales reconstruites par génie tissulaire.

#### **3.3.2. Études antérieures de thérapie par injection intracamérale de CEC**

Quelques groupes de recherche se sont penchés sur la thérapie par injection de CEC cultivées dans la chambre antérieure. Leurs approches et résultats sont résumés dans le **Tableau 2**. Il a été démontré que des CEC injectées seules dans la chambre antérieure d'un modèle animal de déficience endothéliale ne réussissent pas à reconstruire un endothélium fonctionnel,<sup>145, 146</sup> possiblement par faute d'adhérence à la surface cornéenne postérieure. Différentes stratégies pour faciliter l'adhérence des CEC injectées ont été essayées avec des résultats variables.



Des CEC chargées de particules de fer,<sup>145, 146</sup> de microsphères superparamagnétiques<sup>147</sup> et de nanoparticules magnétiques,<sup>148 149</sup> injectées dans la chambre antérieure et attirées vers la cornée avec un champ magnétique extraoculaire ont reconstitué une monocouche endothéliale non-uniforme, mais fonctionnelle. Malgré l'absence de signes toxiques intraoculaires à court terme,<sup>145, 146, 149-151</sup> l'innocuité locale et systémique à plus long terme de ces particules magnétiques demeure inconnue.

Okumura et collègues ont investigué l'effet d'une supplémentation des CEC injectées avec inhibiteur de protéine kinase associée à Rho (**ROCKi**).<sup>95</sup> La supplémentation a permis de reconstituer une monocouche endothéliale fonctionnelle cliniquement et exprimant des protéines de fonction. Dans le groupe contrôle sans ajout de ROCKi, un endothélium fibroblastique a été généré.

D'autres chercheurs ont tenté d'utiliser l'effet de la gravité afin d'aider l'adhérence des CEC. Des périodes cornée-vers-le-bas de 1, 3, 6 et 24 heures après l'injection intracamérale ont été investiguées dans différentes études.<sup>95, 114, 115, 152</sup> L'effet seul de la gravité n'a pas aidé les CEC cultivées à se déposer sur la surface postérieure de la cornée dans deux études où les animaux avaient été placés cornées-vers-le-bas pour 24 heures,<sup>115, 152</sup> et a mené à la formation d'un endothélium stratifié fibroblastique avec positionnement pour 3 heures dans une autre étude.<sup>95</sup> Par contre, une durée aussi courte que 1 heure a eu un effet bénéfique lorsque des colonies sphériques dérivées de CEC ont été injectées plutôt que les CEC cultivées elles-mêmes.<sup>114, 115, 152</sup> Un positionnement de 3 heures a été utilisé par Okumura et collègues pour aider l'adhérence de CEC supplémentées avec ROCKi.<sup>95</sup> Par contre, l'étude n'incluait pas de groupe contrôle sans période cornée-vers-le-bas et la contribution exacte de la gravité à leurs résultats positifs demeure incertaine. Il semble ainsi que l'effet de la gravité seul n'est pas suffisant pour promouvoir l'adhérence des CEC injectées, mais qu'il pourrait être bénéfique en combinaison avec d'autres stratégies.

La plupart des études antérieures sur la thérapie par injection de CEC cultivées dans la chambre antérieure ont été effectuées dans un modèle lapin,<sup>95, 114, 115, 145, 146, 148, 152, 153</sup> dont les cellules endothéliales, contrairement à celles de l'humain, se divisent spontanément,<sup>154, 155</sup> Leurs conclusions doivent donc être interprétées avec précaution.

Une seule étude publiée a inclus un modèle primate, mais avec une très petite taille échantillon (n=2).<sup>95</sup>

**Tableau 2.** Thérapie par injection intracamerale de CEC : revue de la littérature.

Étude	CEC injectées	Modèle animal	Technique chirurgicale	Groupes contrôles	Suivi	Résultats
Patel et al. <sup>147</sup>	3 x 10 <sup>5</sup> or 1 x 10 <sup>6</sup> CEC humaines chargées de sphères super-paramagnétiques	Segment antérieur humain ( <i>ex vivo</i> )	Descemetorexis + ensemencement de CEC + champ magnétique extraoculaire (n=5)	Descemetorexis + ensemencement de CEC humaines normales (n=5)	3-7 jours	<u>Expérimental</u> : CEC en monocouche non-uniforme sur stroma postérieur; densité cellulaire de 812 à 1585 cellules/mm <sup>2</sup> . <u>Contrôles</u> : aucune ou très peu de CEC sur stroma postérieur.
Mimura et al. <sup>145</sup>	1 x 10 <sup>5</sup> CEC de lapin marquées au DiI et chargées avec fer	Lapin	Gel transcornéen + injection de CEC + champs magnétique extraoculaire de 24h (n=4)	Gel transcornéen seul (n=4) Gel transcornéen + injection de 1 x 10 <sup>5</sup> CEC de lapin normales marquées au DiI (n=4)	2 mois	<u>Expérimental</u> : réduction graduelle de l'œdème; CEC marquées au DiI en monocouche sur la DM. <u>Contrôles</u> : œdème cornéen pendant le suivi; aucune CEC sur DM.
Mimura et al. <sup>146</sup>	5 x 10 <sup>5</sup> CEC de lapin marquées au DiI et chargées avec fer	Lapin	Gel transcornéen + injection de CEC + champs magnétique extraoculaire de 24h (n=4)	Gel transcornéen seul (n=4) Gel transcornéen + injection de 5 x 10 <sup>5</sup> CEC de lapin normales marquées au DiI (n=4)	12 mois	<u>Expérimental</u> : cornées rapidement éclaircies; CEC marquées au DiI en monocouche sur la DM; densité moyenne 2581 ± 230 cellules/mm <sup>2</sup> . <u>Contrôles</u> : œdème et cornées opaques pendant tout le suivi; aucune CEC sur la DM.
Mimura et al. <sup>152</sup>	150 colonies sphériques dérivées de CEC de lapin et marquées au DiI	Lapin	Gel transcornéen + injection de sphères + cornée-vers-le-bas 24h (n=4)	Gel transcornéen seul (n=4) Gel transcornéen + injection de 1 x 10 <sup>7</sup> CEC de lapin marquées au DiI + cornée-vers-le-bas 24h (n=4) Gel transcornéen + injection de 150 colonies sphériques marquées au DiI (n=4)	1 mois	<u>Expérimental</u> : cornées rapidement éclaircies; CEC marquées au DiI en monocouche sur la DM; densité moyenne 2963 ± 302 cellules/mm <sup>2</sup> . <u>Contrôles</u> : œdème et cornées opaques pendant tout le suivi; aucune CEC sur la DM.

Étude	CEC injectées	Modèle animal	Technique chirurgicale	Groupes contrôles	Suivi	Résultats
Mimura et al. <sup>115</sup>	150 colonies sphériques dérivées de CEC humaines et marquées au DiI	Lapin	Gel transcornéen + injection de sphères + cornée-vers-le-bas 24h (n=4)	Gel transcornéen seul (n=4) Gel transcornéen + injection de $1 \times 10^7$ CEC humaines marquées au DiI + cornée-vers-le-bas 24h (n=4) Gel transcornéen + injection de 150 colonies sphériques marquées au DiI (n=4)	1 mois	<u>Expérimental</u> : cornées rapidement éclaircies; CEC marquées au DiI en monocouche sur la DM; densité moyenne $2781 \pm 92$ cellules/mm <sup>2</sup> . <u>Contrôles</u> : œdème et cornées opaques pendant tout le suivi; aucune CEC sur la DM.
Mimura et al. <sup>114</sup>	150 colonies sphériques dérivées de CEC humaines et marquées au DiI	Lapin	Gel transcornéen + injection de sphères + cornée-vers-le-bas pour 1, 6 ou 24h (n=4 dans chaque groupe)	Gel transcornéen seul (n=4) Gel transcornéen + injection de 150 colonies sphériques marquées au DiI (n=4)	1 mois	<u>Groupes de 1, 6 et 24h</u> : cornées rapidement éclaircies; CEC marquées au DiI en monocouche sur la DM; densité moyenne $2658 \pm 122$ , $2767 \pm 94$ et $2858 \pm 138$ cellules/mm <sup>2</sup> , respectivement. <u>Contrôles</u> : œdème et cornées opaques pendant tout le suivi; aucune CEC sur la DM.
Okumura et al. <sup>95</sup>	$2 \times 10^5$ CEC de lapin ou de primate (allogreffe) marquées au DiI et supplémentées avec 100 $\mu$ M ROCKi.	Lapin Primate	Désendothélialisation mécanique de toute la cornée + injection de CEC + cornée-vers-le-bas pour 3h (n=5 lapins; n=2 primates)	Désendothélialisation mécanique de toute la cornée + injection de $2 \times 10^5$ CEC sans ROCKi + cornée-vers-le-bas pour 3h (n=5 lapins; n=2 primates)	2 sem/ 3 mois	<u>Expérimental</u> : cornées rapidement éclaircies et amincies; CEC en monocouche sur la DM. DiI exprimé chez lapin, mais pas rapporté chez primate. Densité chez primate 2208 cellules/mm <sup>2</sup> à 3 mois; pas rapportée chez lapin. <u>Contrôles</u> : œdème et cornées opaques pendant tout le suivi chez le lapin; récupération partielle chez primates. CEC sur la DM présentes, mais fibroblastiques stratifiées.

Étude	CEC injectées	Modèle animal	Technique chirurgicale	Groupes contrôles	Suivi	Résultats
<b>Koizumi et al.</b> <sup>156</sup> (Résumé de conférence)	5 x 10 <sup>5</sup> CEC humaines marquées au DiI	Primate	Désendothélialisation mécanique de toute la cornée + injection de CEC (n=8)	Pas décrits dans résumé	14 jours	Six sur 8 cornées ont récupéré la transparence à 7 jours. Densité moyenne 3922 cellules/mm <sup>2</sup> (rapportée pendant la présentation).
<b>Kunzevitzky et al.</b> <sup>148, 149</sup> (Résumé de conférence)	CEC humaines chargées de nanoparticules magnétiques	Lapin	Descemetorexis + injection de CEC (n non rapporté)	Descemetorexis + injection de solution saline équilibrée (n non rapporté)	7 jours/ 1 mois	Expérimental : cornées éclaircies au jour 5 et amincies; agrégats de CEC sur une DM reconstituée.  Contrôles : œdème et cornées opaques pendant tout le suivi avec récupération lente; aucune CEC sur la DM.

\*DiI : 1,1'-dioctadecyl-3,3,3'-tetramethylindocarbocyanine; traceur cellulaire fluorescent. ROCKi : ROCK inhibitor (Y-27632). Les densités endothéliales obtenues sont présentées dans la colonne « Résultats » lorsque rapportées par les auteurs.

## 4. Objectifs de l'étude

L'objectif primaire de cette étude était d'évaluer la fonctionnalité d'un endothélium cornéen reconstitué par injection de cellules endothéliales cornéennes amplifiées *in vitro* dans la chambre antérieure d'un modèle animal de déficience endothéliale, dont les cellules endothéliales cornéennes ne se divisent pas spontanément *in vivo*, comme chez l'humain. Dans le cadre de cet objectif, nous voulions notamment évaluer la performance clinique, l'intégrité structurelle et morphologique, ainsi que le phénotype fonctionnel du nouvel endothélium.

Un des objectifs secondaires de l'étude était d'estimer la contribution des cellules endothéliales cornéennes injectées à l'endothélium reconstitué.

L'autre objectif secondaire était d'évaluer l'innocuité au niveau intraoculaire de cette nouvelle technique de transplantation endothéliale.

## **PARTIE II – PRÉREQUIS**

# 1. Choix des paramètres à étudier

Plusieurs paramètres ont été choisis pour étudier la fonctionnalité de l'endothélium cornéen reconstitué par injection de CEC dans la chambre antérieure d'un modèle félin et, ainsi, répondre à notre objectif primaire :

- 1) La transparence et l'épaisseur cornéenne ont été utilisées pour évaluer la performance clinique du nouvel endothélium. Ces deux paramètres reflètent la capacité d'un endothélium à maintenir la cornée déshydratée, mince et transparente, condition essentielle à ses fonctions optiques.<sup>9, 14, 42</sup> La transparence a été évaluée par examen à la lampe-à-fente et quantifiée sur une échelle subjective de 0 à 4 (**Annexe 4**).<sup>89</sup> L'Oculus Pentacam (Oculus, Inc., Wetzlar, Allemagne) est un appareil relativement nouveau qui combine une caméra rotative à la lampe-à-fente pour permettre la prise de mesures précises du segment antérieur de l'œil, dont la densité cornéenne. La mesure de cette densité permet indirectement de quantifier la transparence cornéenne et corrèle bien avec l'observation subjective à la lampe-à-fente.<sup>157-159</sup> Par contre, la non-disponibilité du Pentacam pour la recherche sur des sujets animaux dans notre centre et les couts qui y sont associés ont justifié l'utilisation, dans cette étude, de la mesure subjective semi-quantitative de la transparence cornéenne, qui demeure encore la méthode la plus fréquemment utilisée en recherche. L'épaisseur cornéenne a été mesurée par pachymétrie à ultrason.
- 2) L'identité endothéliale des cellules dans la région greffée a été confirmée par l'expression de cytokératines 8 et 18 (**K8/18**) en immunofluorescence. Les K8/18 sont normalement exprimées par les cellules endothéliales cornéennes, mais ne le sont pas par les kératocytes stromaux.<sup>160, 161</sup> L'intégrité structurelle, la morphologie et la densité cellulaire du nouvel endothélium ont été analysées par observation en histologie, en microscopie électronique à balayage (**MEB**), en microscopie électronique à transmission (**MET**), et en microscopie spéculaire. L'endothélium a ainsi été évalué tant de profil que de face afin de documenter non seulement la morphologie et l'ultrastructure des cellules individuelles, mais aussi leur



confluence, leur disposition en monocouche ou multicouche, leur apposition à la DM et la présence de matrice extracellulaire, le cas échéant. La densité cellulaire est un facteur important dans la fonctionnalité d'un endothélium, étant donné qu'en dessous d'un seuil critique de densité, il ne peut plus remplir ses fonctions de pompe et de barrière.<sup>9, 11, 19</sup>

- 3) Le phénotype fonctionnel des cellules de l'endothélium reconstitué a été déterminé en immunofluorescence par l'expression des protéines  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, zonula occludens-1 (**ZO-1**),  $\alpha$ -smooth muscle actin ( **$\alpha$ -SMA**), fibronectine (**FN**) et collagène de type I (**COL1**). L'expression de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase reflète la fonction de pompe responsable du maintien de la cornée en état déshydraté.<sup>9, 14, 162</sup> La ZO-1 est une protéine spécifique aux jonctions serrées qui attachent les cellules endothéliales avoisinantes et qui confèrent à l'endothélium cornéen sa fonction de barrière sélective.<sup>163</sup> L'expression des protéines  $\alpha$ -SMA, FN et COL-1 est associée à une transition des cellules endothéliales vers un phénotype myofibroblastique.<sup>164-171</sup> Ce phénomène est observé tant dans des états pathologiques de l'endothélium,<sup>166, 168, 169</sup> que suite à plusieurs passages des cellules endothéliales *in vitro*.<sup>11, 108</sup> Une immunocoloration avec des anticorps contre ces protéines a donc été effectuée afin de documenter une transition des cellules du nouvel endothélium d'un phénotype endothélial à un phénotype fibroblastique, le cas échéant.

Quoique l'ultrastructure, la morphologie, la disposition spatiale et le phénotype fonctionnel d'un endothélium transplanté corrént bien avec son intégrité et sa performance, sa capacité à maintenir la cornée transparente et deshydratée, telle qu'estimée cliniquement à la lampe-à-fente et par pachymétrie, représente le meilleur indicateur de fonctionnalité endothéliale.

Pour atteindre nos objectifs secondaires, les paramètres suivants ont été choisis :

- 1) Le marquage des CEC cultivées avec le traceur cellulaire fluorescent 3,3'-diocadecyl-5,5'-di(4-sulfophenyl)oxacarbocyanine (SP-DiOC<sub>18</sub>(3) ou **DiOC**, tel qu'utilisé dans ce mémoire) avant la transplantation a permis de visualiser et de localiser les CEC injectées post-mortem sur la surface postérieure de la cornée par

observation de l'expression de DiOC en immunofluorescence. Alternativement, l'utilisation de CEC provenant d'un donneur de sexe opposé à celui du receveur et leur identification subséquente par karyotypage ou par hybridation *in situ* en fluorescence a été proposée dans la littérature.<sup>172, 173</sup> Ces techniques sont plus complexes et plus coûteuses que le marquage des CEC cultivées avec un traceur et leur observation en immunofluorescence. De plus, les difficultés logistiques et les coûts associés à l'obtention de CEC félines provenant d'animaux d'un sexe prédéterminé ont justifié l'utilisation d'un traceur cellulaire dans cette étude.

- 2) L'inflammation intraoculaire, les signes cliniques de rejet immunologique (précipités kératiques et ligne de Khodadoust limités à la zone du greffon)<sup>14</sup> et la présence de dépôts ectopiques de CEC ont été utilisés pour l'évaluation de l'innocuité locale de cette nouvelle technique de transplantation endothéliale. En ce qui concerne le dépôt ectopique des CEC injectées, des agrégats ont été recherchés sur l'endothélium receveur à l'extérieur de la zone dénudée, sur le cristallin et sur l'iris lors des examens à la lampe-à-fente, ainsi qu'en histologie. Les dépôts au niveau du trabéculum ont été recherchés indirectement, par l'entremise de la tension intraoculaire (**TIO**, mesurée par tonométrie), et directement, en observant l'angle irido-cornéen en histologie.

## 2. Choix du modèle animal

Afin de faciliter le transfert des résultats de recherche aux patients, le modèle animal idéal pour le développement et l'optimisation des techniques de transplantation endothéliale utilisant des CEC amplifiées en culture devrait avoir des caractéristiques cornéennes anatomiques et physiopathologiques similaires à celles des humains et être facilement manipulable et disponible à un prix abordable. Cette section aborde les différents modèles animaux utilisés dans la recherche sur la transplantation cornéenne. Leurs principales caractéristiques sont résumées dans le **Tableau 3**.

### 2.1. Rongeurs et lapins

Tant les rongeurs que les lapins ont été utilisés pour l'étude d'un endothélium cornéen reconstitué à partir de CEC amplifiées en culture.<sup>95, 96, 114, 115, 122, 132, 134, 136, 145, 146, 152</sup> Les avantages majeurs de ces modèles incluent leur grande disponibilité à faible coût et facilité de manipulation.<sup>80</sup>

Les rongeurs, tels les rats et les souris, ont de très petits yeux; l'exécution et le suivi postopératoire des chirurgies de transplantation cornéenne sont donc difficiles dans ce modèle. Au contraire, les dimensions oculaires des lapins sont comparables à celles des humains. Le diamètre cornéen est d'environ 15 mm sur l'axe horizontal et 14 mm sur l'axe vertical,<sup>155</sup> permettant ainsi l'utilisation des mêmes instruments chirurgicaux que pour les interventions chez les humains. La cornée normale du lapin est composée des mêmes cinq couches, mais est légèrement plus mince, avec une épaisseur autour de 400  $\mu\text{m}$ ,<sup>155, 174</sup> celle-ci étant en moyenne de 550  $\mu\text{m}$  chez un humain.<sup>3</sup>

La densité endothéliale des deux modèles est comparable à celle d'un humain adulte, allant de l'ordre de 2000 à 2200 cellules/ $\text{mm}^2$  chez le rongeur<sup>175-178</sup> et de 2300 à 3200 cellules/ $\text{mm}^2$  chez le lapin.<sup>155, 176, 178-181</sup> Par contre, les CEC des deux espèces ont une grande capacité de réplication *in vivo* : suite à un dommage endothélial, les cellules avoisinantes entrent en mitose, prolifèrent et recouvrent la région endommagée rapidement.<sup>154, 155, 182</sup> Cette caractéristique les distingue des CEC humaines et rend les

conclusions des études de transplantation endothéliale utilisant ces modèles moins applicables au contexte clinique.

## 2.2. Le modèle porcin

Le modèle porcin a largement été employé dans le cadre d'études de culture de CEC,<sup>100, 140, 183-186</sup> de guérison de plaie endothéliale<sup>187, 188</sup> et d'optimisation de techniques de kératoplastie et de chirurgies réfractives cornéennes.<sup>189-192</sup> L'utilisation répandue de ce modèle est due à sa grande disponibilité à faible prix et aux similarités anatomiques et physiologiques entre les yeux porcins et humains. Ainsi, la cornée porcine est grande et mesure 14,5 mm de diamètre verticalement et 16,5 mm horizontalement.<sup>193-195</sup> Elle est plus épaisse que chez l'humain, allant de 665 à 880  $\mu\text{m}$ .<sup>195, 196</sup> La densité endothéliale autour de 3700-4000 cellules/ $\text{mm}^2$  chez le jeune animal<sup>197-199</sup> diminue avec l'âge, atteignant environ 2500 cellules/ $\text{mm}^2$  chez l'adulte.<sup>199</sup> Cette réduction graduelle reflète la capacité proliférative minime de l'endothélium porcin *in vivo*,<sup>200</sup> qui rend ce modèle intéressant pour le développement des techniques de kératoplastie endothéliale. Plusieurs aspects limitent par contre l'utilisation du modèle porcin, notamment la manipulation difficile de l'animal, tant pour l'intervention chirurgicale que pour le suivi à la lampe-à-fente, son plus grand risque anesthésique et sa tendance à engendrer une inflammation intraoculaire importante en postopératoire.<sup>192</sup>

## 2.3. Le primate non-humain

Les primates non-humains partagent de nombreuses similarités évolutives avec les humains et sont, de par ce fait, considérés comme le modèle animal idéal pour l'étude des pathologies cliniques.<sup>201</sup> Ceci dit, il existe plusieurs espèces de primates et toutes ne ressemblent pas autant au modèle humain. Les deux espèces les plus utilisées dans la recherche en sciences de la vision sont les macaques rhésus (*Macaca mulatta*) et les singes cynomologus (*Macaca fascicularis*).<sup>201</sup>

Leurs dimensions cornéennes sont très proches de celles des humains, avec un diamètre de 9,8-10,6 mm et une épaisseur centrale de 470-550  $\mu\text{m}$ .<sup>202-204</sup> La densité

endothéliale cornéenne est plus grande, par contre, étant de l'ordre de 4000 cellules/mm<sup>2</sup>.<sup>181, 205</sup> Malgré cette différence, les CEC des primates compensent les dommages endothéliaux par un mécanisme d'agrandissement et de migration cellulaire similaire aux humains, ayant elles aussi une capacité proliférative presque inexistante *in vivo*.<sup>137, 206, 207</sup>

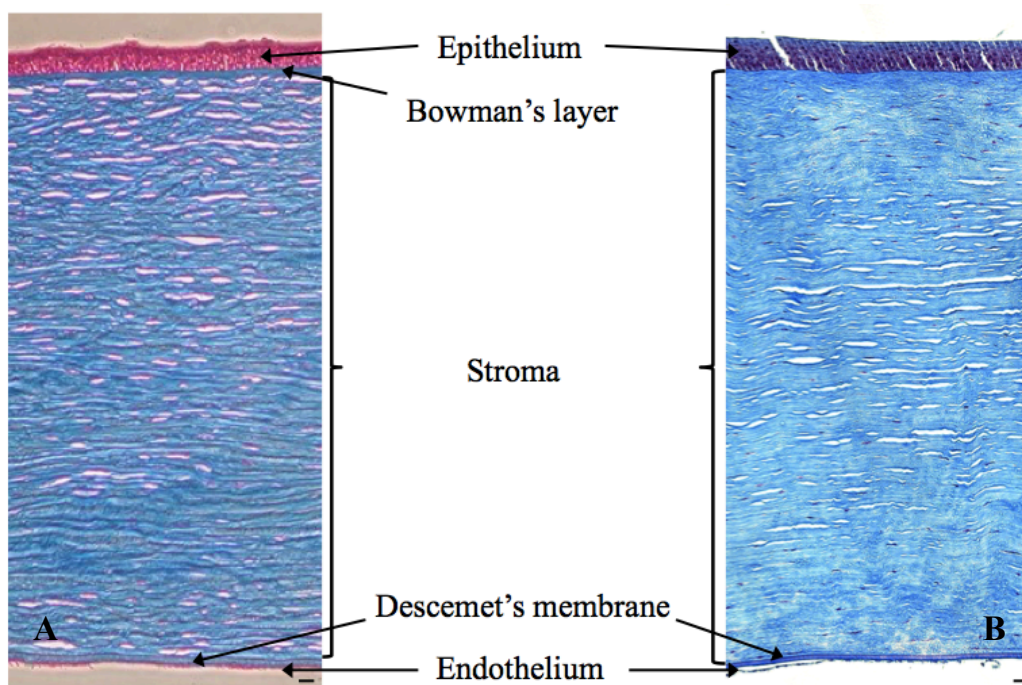
Le modèle primate a été utilisé tant pour la culture cellulaire endothéliale,<sup>121, 208</sup> que pour la transplantation de feuillets endothéliaux construits par génie tissulaire<sup>121, 137, 138, 208, 209</sup> et pour l'injection intracamerale de CEC cultivées.<sup>95</sup> Le grand obstacle à l'utilisation de ce modèle en Amérique du Nord réside en sa disponibilité très limitée et à des coûts très élevés, associés tant à leur achat et livraison, qu'à leur hébergement et entretien à long terme.<sup>80, 201</sup>

## 2.4. Le modèle félin

Les félins sont des mammifères fréquemment utilisés dans la recherche en sciences de la vision,<sup>192</sup> incluant l'étude de la guérison endothéliale,<sup>169, 210-213</sup> des techniques de kératoplastie<sup>135, 214-219</sup> et de la transplantation de greffons cornéens construits par génie tissulaire.<sup>89, 101, 129, 136, 220</sup> La popularité de ce modèle est due à sa grande disponibilité (quoique à des coûts plus élevés que les rongeurs, les lapins et les cochons) et leur anatomo-physiologie oculaire proche des humains (**Figure 13**).

L'œil félin est grand, avec une cornée de 15,5-18 mm de diamètre<sup>193, 221</sup> et une chambre antérieure relativement profonde de 4,2-5,1 mm,<sup>222-225</sup> facilitant ainsi les interventions intraoculaires. L'épaisseur de sa cornée, située autour de 545-650 µm,<sup>226-228</sup> et sa densité endothéliale, d'environ 2300-2900 cellules/mm<sup>2</sup>,<sup>178, 181, 193, 229-233</sup> sont semblables à celles des humains.<sup>178, 226, 229, 232</sup> Plus important encore, comme les humains, les primates et les cochons, les félins ont des CEC qui ne se divisent que très peu *in vivo*,<sup>154, 213, 233</sup> ce qui rend ce modèle intéressant pour l'étude des approches thérapeutiques aux endothéliopathies cornéennes.

Le modèle félin offre une anatomie cornéenne similaire à celle des humains, une capacité proliférative endothéliale minime dans des conditions physiologiques, une plus grande disponibilité à des coûts plus raisonnables que ceux associés aux primates, ainsi qu'une facilité de manipulation. Son utilisation pour l'optimisation des techniques de transplantation cornéenne est bien documentée.<sup>135, 192, 216, 217</sup> Le félin est donc un modèle intéressant pour l'évaluation préclinique d'un endothélium reconstitué par injection intracamérale de CEC cultivées. Afin de minimiser le risque de rejet immunologique et de reproduire des conditions qui seraient désirables lors d'un transfert en clinique, nous avons opté pour une transplantation allogénique, plutôt que xénogénique.



**Figure 13.** Comparaison de l'anatomie cornéenne humaine et féline.

Cornées humaine (**A**) et féline (**B**) normales. Les deux ont des structures et épaisseurs comparables. Comme chez certains autres mammifères, la membrane de Bowman n'est souvent pas détectée dans les cornées félines (voir Tableau 3). Coloration au Trichrome de Masson. Photo (A) tirée de Proulx et al.<sup>8</sup> Photo (B) gracieuseté de Mathieu Thériault. *Barres de mesure : 50 µm.*

**Tableau 3.** Caractéristiques des différents modèles animaux à l'âge adulte.

	<b>Humain</b>	<b>Rongeur</b>	<b>Lapin</b>	<b>Porcin</b>	<b>Primate</b>	<b>Félin</b>
Diamètre cornéen horizontal (mm)	10-12 <sup>234</sup>	1,5 (souris) <sup>235</sup> 3,0 (rat) <sup>235</sup>	14-15 <sup>155</sup>	14,5-16,5 <sup>193-195</sup>	9,8-10,6 <sup>103, 104</sup>	15,5-18 <sup>193, 221</sup>
Profondeur de la chambre antérieure (mm)	2,9-3,4 <sup>236-240</sup>	0,1 (souris) <sup>241</sup> 0,6-0,7 (rat) <sup>242, 243</sup>	2,0-2,7 <sup>174, 244</sup>	2,2-3,5 <sup>194, 195</sup>	2,8-3,3 <sup>203, 204</sup>	4,2-5,1 <sup>222-225</sup>
Membrane de Bowman	Bien développée 8-10 $\mu\text{m}$ <sup>14</sup>	Absente ou très mince <sup>176, 178, 245</sup>	Mince 3 $\mu\text{m}$ <sup>176, 178, 246</sup>	Absente <sup>247</sup> / très mince 1-2.2 $\mu\text{m}$ <sup>246, 248</sup>	Mince 2.9 $\mu\text{m}$ <sup>249</sup>	Absente /très peu développée <sup>178, 232, 246, 247, 249</sup>
Épaisseur cornéenne centrale ( $\mu\text{m}$ )	540 <sup>2</sup>	93 (souris) <sup>235</sup> 156 (rat) <sup>235</sup>	400 <sup>155, 174</sup>	665-880 <sup>195, 196</sup>	470-550 <sup>202-204</sup>	545-650 <sup>226-228</sup>
Densité endothéliale centrale chez adulte (cell./mm <sup>2</sup> )	2600-3200 <sup>3, 181</sup>	2000-2800 <sup>9, 175-178</sup>	2300-3200 <sup>180</sup>	2500 <sup>199</sup>	2700-4100 <sup>9, 181</sup>	2300-2900 <sup>181, 231, 233, 250, 251</sup>
Capacité proliférative des CEC <i>in vivo</i>	Minime <sup>27</sup>	Importante <sup>182</sup>	Importante <sup>154, 155</sup>	Minime <sup>200</sup>	Minime <sup>137, 206, 207</sup>	Minime <sup>154, 213, 233</sup>
Disponibilité et coût	-	Disponible; peu coûteux	Disponible; peu coûteux	Disponible; peu coûteux	Difficilement disponible; très coûteux	Disponible; coûteux
Facilité de manipulation	-	Facile	Facile	Difficile	Facile	Facile

### **3. Préparation des CEC félines pour la transplantation**

#### **3.1. Isolement et culture**

La technique d'isolement de CEC utilisée dans notre laboratoire est celle rapportée par Zhu et Joyce.<sup>90</sup> Le protocole de culture de CEC félines a été décrit préalablement par notre équipe.<sup>88</sup> En bref, des yeux félines sont obtenus d'autres laboratoires de recherche en moins de 24 heures après le décès de l'animal. Les recherches effectuées préalablement sur les animaux n'impliquent aucune manipulation oculaire et, donc, ceux-ci sont intacts au moment du prélèvement. Les boutons cornéo-scléraux sont disséqués. Des bandes de DM sont pelées et incubées dans un milieu de culture pour la nuit à 37°C et 8% CO<sub>2</sub>.<sup>90</sup> Ces bandes sont ensuite incubées dans l'EDTA 0,02% (Sigma-Aldrich Corp., St-Louis, MO) pour 1 heure et passées plusieurs fois à travers une pipette polie à la flamme afin de relâcher les jonctions entre les cellules et détacher celles-ci de la DM.<sup>90</sup> Les CEC relâchées sont cultivées pour le premier passage sur des pétris recouverts de FNC (Athena Enzyme Systems, Baltimore, MD, USA) dans un milieu Eagle modifié de Dulbecco (DMEM; Invitrogen, Burlington, ON, Canada) contenant 20% de sérum bovin fœtal, 5 ng/mL de facteur de croissance épidermique humain, 25 µg/mL d'extrait de glande pinéale bovine, 25 µg/mL de sulfate de gentamicine et 100 IU/mL de pénicilline G.<sup>88</sup> À l'approche de la confluence, les cellules sont photographiées, décollées, comptées, et ré-ensemencées à une densité de 15 000 à 20 000 cellules par cm<sup>2</sup>. Après un ou deux passages, les cellules sont cryopreservées dans un sérum bovin fœtal 10%/diméthylsulfoxyde 10% (Sigma-Aldrich Corp.). Suite à la décongélation et avant d'être utilisées pour les expériences, les CEC sont cultivées pour au moins un autre passage et marquées avec le traceur membranaire fluorescent DiOC (SP-DiOC<sub>18</sub>(3); 2 µg/mL; Molecular Probes, Eugene, OR) selon le protocole du fabricant.<sup>88</sup> Seules les cellules ayant un phénotype endothélial (morphologie cuboïdale) sont utilisées pour la transplantation.

#### **3.2. Mise en suspension des CEC cultivées**

Afin de greffer des CEC cultivées par injection dans la chambre antérieure, les CEC doivent être remises en suspension. Pour ce faire, dans cette étude, au moment de la chirurgie de



transplantation, les CEC ont été détachées de leur boîte de culture utilisant une solution de trypsine 0,05% et EDTA 0,53 mM (Corning Cellgro, Manassas, VA, USA). Les CEC ont été comptées et un nombre prédéterminé de CEC a été mis en suspension dans 0,2 mL de solution saline équilibrée (**BSS**) et de ROCKi (Y-27632; Sigma-Aldrich Corp.). Le protocole détaillé est disponible à l'**Annexe 1**. Le choix du nombre de CEC greffées et la concentration de ROCKi utilisée est discuté plus loin (Partie II, Chapitre 4).

## 4. Établissement du protocole chirurgical

Dans ce chapitre seront discutés les différents aspects ayant été pris en considération lors de l'établissement du protocole chirurgical pour la thérapie par injection cellulaire dans le modèle félin, notamment l'induction de la déficience endothéliale, le nombre de CEC félines à injecter, les stratégies utilisées pour faciliter l'adhérence des CEC injectées, ainsi que le contrôle de l'inflammation intraoculaire chez le félin. Le protocole chirurgical est détaillé dans la Partie III – Article Original et dans l'Annexe 2.

### 4.1. Établissement du modèle de déficience endothéliale

#### 4.1.1. Choix de la technique de désendothélialisation

Deux méthodes de désendothélialisation ont été rapportées dans la littérature : la **désendothélialisation mécanique**<sup>95, 165, 182, 210-213, 252, 253</sup> et le **gel transcornéen** (« *transcorneal freezing* »).<sup>114, 115, 145, 146, 152, 165, 169, 182, 253-258</sup>

Une aiguille de 30 gauge,<sup>182</sup> une canule olive émoussée<sup>165, 210-213, 253</sup> et une aiguille en silicone de 20 gauge<sup>95, 121, 252</sup> ont été utilisées pour la désendothélialisation mécanique en grattant soigneusement l'endothélium cornéen. Une formation chirurgicale est nécessaire pour exécuter correctement cette technique. Elle a l'avantage de limiter le dommage induit à l'endothélium et de produire peu d'inflammation intraoculaire secondaire,<sup>165, 182</sup> tout en permettant d'avoir un contrôle précis sur la taille de la surface désendothélialisée et l'efficacité de la désendothélialisation.<sup>95, 252</sup> Si la visualisation de l'endothélium pendant la chirurgie n'est pas optimale, il y a un risque de laisser des cellules résiduelles en place. Des études de guérison chez le modèle lapin et félin ont montré que l'endothélium compense un dommage mécanique par agrandissement des cellules voisines et « glissement » vers la zone endommagée, tout en préservant leur connectivité intercellulaire et leur polarité apicale-basale.<sup>210</sup>

Le gel transcornéen est effectué avec une sonde en acier inoxydable<sup>165, 169, 253, 254, 256-258</sup> ou un goujon<sup>114, 115, 145, 146, 152</sup> immergés dans de l'azote liquide, ou bien une sonde cryogénique.<sup>182</sup> Ces dispositifs sont appliqués à la surface cornéenne plusieurs fois pour une

durée de quelques secondes afin d'induire le déficit endothélial. La taille du déficit créé dépend du diamètre du dispositif et de la surface sur laquelle celui-ci a été appliqué. Le gel transcornéen a l'avantage d'être plus facile d'exécution, ne nécessitant pas d'entrée dans la chambre antérieure. Il permet de détacher toutes les cellules endothéliales dans la zone gelée, mais plusieurs applications peuvent être requises avant d'atteindre ce résultat.<sup>182</sup> Cette approche est généralement excessivement dommageable pour la cornée, produisant une atteinte tant endothéliale, que stromale et épithéliale, ainsi qu'une inflammation intracamérale et extraoculaire importante avec formation de fibrine.<sup>165, 182</sup> Suite à un gel transcornéen, le processus de guérison endothéliale est altéré et s'oppose à celui suivant une désendothélialisation mécanique. Ainsi, les cellules endothéliales restantes subissent une transition mésenchymateuse, perdent leur confluence et leur polarité basale-apicale et migrent individuellement vers la DM dénudée, secrétant en cours de route une matrice extracellulaire fibreuse pour la recouvrir.<sup>169, 255</sup> L'inflammation importante engendrée par le gel transcornéen, de par l'implication de nombreuses cytokines inflammatoires et facteurs de croissance, pourrait expliquer l'induction de cette réponse de guérison pathologique.<sup>169</sup>

La plupart des études antérieures de thérapie par injection cellulaire ont employé le gel transcornéen pour induire le modèle de déficience endothéliale.<sup>114, 115, 145, 146, 152</sup> Afin de limiter sélectivement le dommage cornéen à l'endothélium et minimiser la réaction inflammatoire postopératoire, nous avons opté pour l'approche mécanique dans la présente étude. Sans l'effet confondant d'une atteinte épithéliale et/ou stromale, la transparence cornéenne – un de nos paramètres primaires évalués en postopératoire – reflète plus fidèlement la fonctionnalité endothéliale. Une entrée dans la chambre antérieure serait nécessaire de toute façon pour l'injection des CEC cultivées et l'approche mécanique permettrait un meilleur contrôle sur l'étendue et l'efficacité de la désendothélialisation. Pour effectuer cette désendothélialisation mécanique, nous avons choisi une spatule de kératoplastie endothéliale (Moria 19083/B, Irrigating Endothelial Keratoplasty Spatula for Descemet's Stripping; Antony, France). Celle-ci présente une pointe mousse angulée à 90° qui permettrait de peler l'endothélium plus efficacement et avec moins de risque de causer des micro-bris dans la DM qu'une aiguille.

La DM est sécrétée par l'endothélium. Elle constitue donc le substrat naturel des cellules endothéliales cornéennes.<sup>14</sup> *In vitro*, les CEC humaines ou animales cultivées peuvent adhérer et reconstituer un endothélium hypercellulaire fonctionnel lorsqu'ensemencées tant sur une DM<sup>86, 96, 122, 123, 134, 138-141, 259</sup> que sur une matrice stromale.<sup>113, 260</sup> Suite à un descemetorexis partiel chez l'humain, les cellules endothéliales restantes repeuplent le stroma dénudé dans la même mesure qu'une DM dénudée suite à une désendothélialisation mécanique sans descemetorexis.<sup>252</sup> Dans la plupart des études antérieures de transplantation endothéliale par injection cellulaire intracamérale chez l'animal, la DM n'avait pas été enlevée avant l'injection des CEC.<sup>95, 114, 115, 145, 146, 152</sup> Dans deux études, par contre, les CEC injectées ont pu adhérer au stroma dénudé par descemetorexis.<sup>147, 149</sup> La littérature suggère donc que, lors d'une injection de CEC dans la chambre antérieure, les CEC pourraient adhérer à l'aspect postérieur de la cornée indépendamment de la présence ou l'absence de la DM.

Des membranes rétrocornéennes fibrotiques sous-endothéliales, originant de kératocytes stromaux envahissant l'endothélium à travers des bris dans la DM ont déjà été décrites.<sup>101, 261-263</sup> Ces membranes fibrotiques peuvent compromettre la fonctionnalité du nouvel endothélium, induire une dispersion des rayons lumineux et une réduction de la transparence cornéenne, et agir de cette façon comme facteur confondant dans l'évaluation de l'endothélium reconstitué. Le fait d'enlever la DM en même temps que l'endothélium receveur avant d'injecter les CEC dans la chambre antérieure poserait, du moins en théorie, le même risque d'envahissement de l'endothélium par les kératocytes stromaux. Pour ces raisons, dans le cadre de cette étude, nous avons opté pour une désendothélialisation sans descemetorexis, avec une attention spéciale envers la préservation de l'intégrité de la DM.

#### **4.1.2. Surface désendothélialisée**

Lors d'une DSAEK ou d'une KP, la cornée du donneur est habituellement trépanée sur un diamètre de 7-8 mm et transplantée dans un lit receveur de diamètre équivalent ou légèrement inférieur.<sup>2, 60</sup> Dans cette étude, afin de se rapprocher des conditions cliniques, nous avons opté pour une désendothélialisation et une greffe sur un diamètre central de 7 mm. Étant donnée la possibilité d'une migration de l'endothélium du receveur périphérique

resté intact après la désendothélialisation centrale, nous avons aussi procédé à une large désendothélialisation jusqu'à l'angle de la chambre antérieure avec greffe sur toute la surface, afin d'estimer le potentiel de participation de l'endothélium receveur périphérique au processus de réendothélialisation.

#### 4.1.3. Optimisation de la technique de désendothélialisation

Avant d'entreprendre les expériences *in vivo*, nous avons testé et optimisé la technique de désendothélialisation mécanique sur des yeux de lapin *ex vivo* dans le but de :

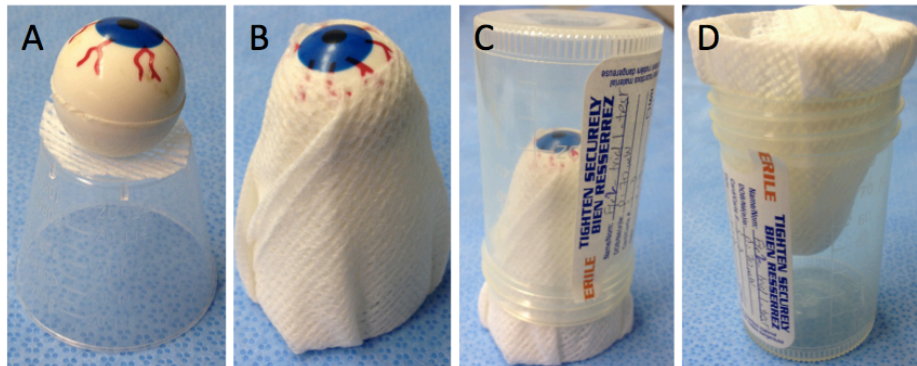
- 1) confirmer la faisabilité d'enlever toutes les cellules endothéliales de la zone désendothélialisée;
- 2) confirmer l'intégrité de la DM à la fin du processus;
- 3) déterminer si des cellules endothéliales détachées de la DM par cette technique et restantes dans la chambre antérieure ré-adhèrent à la DM pendant le temps de positionnement cornée-vers-le-bas.

#### Méthodes

Des yeux de lapin ont été utilisés pour ces expériences, car plus facilement disponibles que les yeux félins. Deux yeux de lapin ont été obtenus d'un autre laboratoire de recherche en moins de 4 heures après leur décès et utilisés la journée même.

Les yeux ont été placés sur une coupe à médicaments, tel qu'illustré dans la **Figure 14 (A, B)**. Une spatule de kératoplastie endothéliale (Moria 19083/B) a été utilisée pour détacher l'endothélium cornéen central sur un diamètre de 7 mm. Une attention spéciale a été portée à la préservation de l'intégrité de la DM. La chambre antérieure a été ensuite rincée continuellement avec du BSS pour éliminer les cellules endothéliales détachées et la plaie limbique a été refermée (nylon CU-1 10-0; Alcon Surgical, Fort Worth, TX). Avec une canule de 30 gauge, 0,2 mL BSS et 100  $\mu$ M ROCKi (Y-27632; Sigma-Aldrich Corp.) ont été injectés dans la chambre antérieure. Les yeux ont ensuite été immédiatement placés cornée-vers-le-bas (**Fig. 14C-D**) pour 60 min (n=1) et 180 min (n=1).

À la fin de la période cornée-vers-le-bas, les boutons cornéo-scléreaux ont été disséqués et colorés au rouge d'alizarine et bleu de trypan (Sigma-Aldrich Corp.). La cornée centrale a ensuite été analysée et photographiée (SteREO Discovery V12; AxioVision Rel. 4.8.2.; Carl Zeiss Canada, Toronto, ON, Canada) selon le protocole présenté en **Annexe 6**.



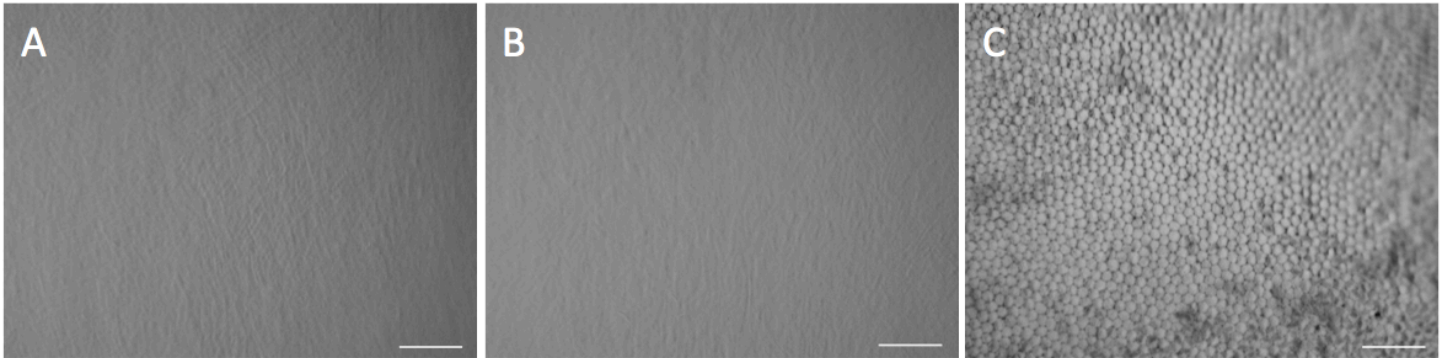
**Figure 14.** Montage pour le positionnement cornée-vers-le-bas.

(A) L'œil est placé sur une coupe à médicaments inversée et (B) enveloppé d'une compresse 4 x 4 découpée de façon à permettre la visualisation de la cornée et l'accès au limbe. (C) Après la chirurgie, un pot de pathologie est placé sur la coupe à médicaments et (D) le montage est retourné à l'envers.

## Résultats

La spatule de kératoplastie endothéliale utilisée a permis de soigneusement et systématiquement peler l'endothélium cornéen en petits lambeaux. Les amas de cellules résiduelles ont été enlevés doucement avec la spatule, puis avec une irrigation continue contre la surface cornéenne postérieure. La spatule utilisée a aussi permis de ne pas endommager la DM. Un bris de la DM aurait été facilement identifiable sous la haute magnification du microscope opératoire, le rebord du flap de DM créé s'allumant en rétro-illumination co-axiale.

Aucune cellule endothéliale, ni bris dans la DM n'ont été observés dans les régions désendothélialisées au stéréomicroscope après 60 (**Fig. 15A-B**) ou 180 minutes (**Fig. 15C-D**) de positionnement cornée-vers-le-bas.



**Figure 15.** Régions centrales de cornées de lapin désendothérialisées (**A, B**) et contrôle (**C**) en coloration au rouge d'alizarine et bleu de trypan.

Les yeux ont été désendothérialisés centralement, injectés avec 0.2 mL BSS et 100  $\mu$ M ROCKi et maintenus cornée-vers-le-bas pour (**A**) 60 et (**B**) 180 minutes. Aucune cellule n'est visible sur la surface postérieure de la DM dénudée. La DM ne présente pas de bris. (**C**) Endothélium normal d'une cornée non-désendothérialisée. *Barres de mesure*: 100  $\mu$ m.

#### **Discussion et conclusions en vue des expériences *in vivo***

L'absence de cellules dans la région désendothérialisée après 60 minutes et 180 minutes cornée-vers-le-bas suggère que :

- 1) la technique de désendothérialisation mécanique utilisant une spatule de kératoplastie endothéliale permet d'enlever efficacement toutes les cellules endothéliales;
- 2) il est faisable d'éviter l'endommagement de la DM pendant le processus;
- 3) les cellules endothéliales détachées ne ré-adhèrent pas à la DM pendant le positionnement cornée-vers-le-bas.

Ces résultats ont été validés par des expériences *in vivo* chez le félin, dont le déficit endothélial a aussi été caractérisé en microscopie électronique pour détecter plus sensiblement des bris dans la DM (voir Partie III – Article original).

## 4.2. Choix du nombre de CEC à injecter

La densité endothéliale d'une cornée féline normale est d'environ 2900 cellules/mm<sup>2</sup>. Un minimum de 112 000 et 738 000 CEC injectées serait donc nécessaire pour recouvrir une surface de 7 mm (désendothélialisation centrale) et 18 mm (désendothélialisation totale) de diamètre, respectivement. Ainsi, nous avons greffé  $2 \times 10^5$  CEC félines aux cornées dénudées centralement et  $1 \times 10^6$  CEC à celles désendothélialisées sur toute la surface.

Dans des conditions idéales (i.e. conditions de culture cellulaire contrôlées),  $2 \times 10^5$  CEC seraient suffisantes pour repeupler une région centrale de 7 mm. Des facteurs associés avec l'environnement *in vivo*, par contre, tels les mouvements oculaires et de la tête, la circulation intracamérale d'humeur aqueuse et l'inflammation intraoculaire, ne peuvent pas être contrôlées aussi efficacement et pourraient limiter l'adhérence des CEC injectées. Ainsi, pour déterminer si l'injection d'un plus grand nombre de CEC améliorerait les résultats cliniques ou histopathologiques, nous avons aussi tenté l'injection de  $1 \times 10^6$  CEC après la désendothélialisation centrale.

## 4.3. Choix des stratégies d'augmentation de l'adhérence des CEC

Des études précédentes ont démontré que l'injection intracamérale de CEC seule après désendothélialisation ne permet pas de reformer un endothélium fonctionnel dans la région dénudée,<sup>145, 146</sup> tout comme l'injection de CEC suivie de positionnement cornée-vers-le-bas.<sup>95, 115, 152</sup> La supplémentation des CEC injectées avec un inhibiteur de ROCK spécifique, le Y-27632, combinée au positionnement du sujet cornée-vers-le-bas pour 3 heures après la chirurgie a été prouvée efficace pour aider la thérapie par injection cellulaire.<sup>95</sup> Nous avons estimé que ces deux stratégies constitueraient les conditions optimales pour faciliter la transplantation *in vivo* des CEC injectées.

### 4.3.1. Concentration d'inhibiteur de ROCK

Les GTPases Rho et leurs effecteurs secondaires, les protéines kinases associées à Rho (**ROCK**), modulent le cytosquelette intracellulaire et jouent un rôle essentiel dans la motilité, l'adhésion et la progression à travers le cycle cellulaire.<sup>264, 265</sup> Les ROCK ont



suscité beaucoup d'intérêt dans la communauté scientifique en tant que cible thérapeutique dans une variété de pathologies systémiques, telles l'hypertension, l'athérosclérose et l'ischémie cérébrale.<sup>265-267</sup> Au niveau oculaire, la régulation négative de cette voie a été étudiée extensivement pour le traitement hypotensif<sup>268-272</sup> et neuroprotecteur<sup>273</sup> du glaucome primitif à angle ouvert.<sup>274, 275</sup> Rapasudil, un inhibiteur de ROCK sélectif, a dernièrement été approuvé pour cette indication au Japon.<sup>276</sup> De plus, le rôle des inhibiteurs de ROCK comme agents anti-fibrotiques pour améliorer les résultats des chirurgies filtrantes pour le glaucome a été proposé.<sup>277, 278</sup>

L'effet sur l'endothélium cornéen d'un inhibiteur sélectif du ROCK, Y-27632, a été étudié *in vitro* et *in vivo* sur des CEC de lapins, primates, bovins et humains.<sup>95, 256-258, 279-283</sup> Les effets décrits sont le renforcement de l'adhésion cellulaire au substrat, de la migration, de la prolifération et de la guérison endothéliale, ainsi que la suppression de l'apoptose. Le traitement avec des gouttes ophtalmiques de ROCKi a été investigué dans la réhabilitation d'un endothélium hypocellulaire avec des résultats positifs chez le lapin, le primate et l'humain.<sup>252, 256-258, 284</sup> Son application topique chez les patients avec dommage endothélial iatrogénique aigu ou après gel transcornéen central chez les patients atteints par la dystrophie endothéliale de Fuchs semble stimuler les cellules endothéliales restantes à recouvrir et guérir le déficit créé et améliorer l'œdème cornéen et l'acuité visuelle.<sup>252, 256</sup>

Okumura et collègues ont utilisé 100 µM de ROCKi pour faciliter l'adhérence à la DM des CEC injectées dans la chambre antérieure d'un modèle lapin et primate. Les groupes traités avec des CEC supplémentées par le ROCKi ont démontré un nouvel endothélium plus fonctionnel que les groupes contrôles.<sup>95</sup> Dans la présente étude, nous avons utilisé des concentrations de ROCKi 100 µM ou de 350 µM pour supplémenter les CEC félines avant transplantation. La concentration de 350 µM a été essayée pour rendre compte du plus grand volume de la chambre antérieure féline comparée à celle du lapin et du primate (voir Partie II, Chapitre 2). Étant donné qu'aucune différence dans les résultats n'a été observée entre les deux concentrations, cette variable n'a pas été utilisée pour distinguer les groupes expérimentaux (voir Partie III – Article Original).

### 4.3.2. Durée de positionnement cornée-vers-le-bas

L'idée derrière le positionnement du sujet cornée-vers-le-bas, avec le plan de l'iris parallèle au sol, consiste en une facilitation du dépôt des CEC injectées sur la DM par la gravité. Okumura et al. ont rapporté des résultats positifs avec une durée de positionnement de 3 heures et ajout de ROCKi aux CEC cultivées injectées.<sup>95</sup> Dans une perspective d'applicabilité clinique, même une période d'une durée de 3 heures de positionnement cornée-vers-le-bas pourrait être gênante pour le patient. Nous avons donc entrepris des expériences préliminaires pour déterminer si des durées de positionnement post-injection intracamérale de CEC plus courtes ne permettraient l'adhérence d'un nombre suffisant de cellules. Notre objectif était de comparer les durées de 10, 60 et 180 minutes cornée-vers-le-bas en termes de densités endothéliales obtenues suite à l'injection de CEC supplémentées avec ROCKi dans la chambre antérieure.

#### Méthodes

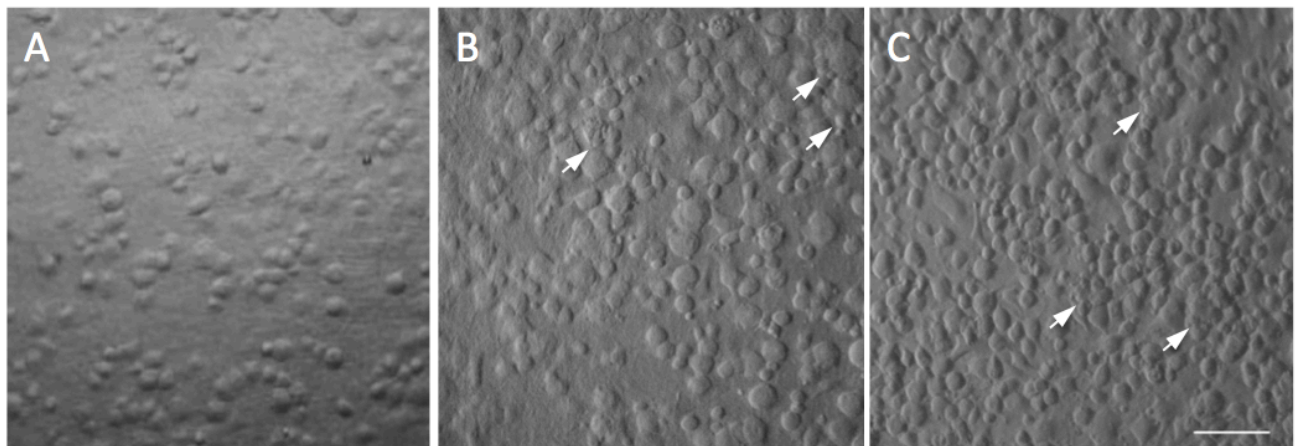
Des yeux de lapin et des CEC humaines ont été utilisés pour ces expériences, car plus facilement disponibles que les yeux et les CEC de félins. Les CEC humaines ont été préalablement isolées à partir de cornées de recherche obtenues de la Banque d'yeux du Centre Universitaire d'Ophthalmologie (Québec, QC, Canada) et cultivées.<sup>90</sup> Elles ont ensuite été mises en suspension en 0,2 mL BSS tel que décrit dans le Chapitre 3 (Partie II) pour les CEC félines. Les yeux de lapin (n=12) ont été obtenus d'un autre laboratoire de recherche en moins de 4 heures après leur décès et utilisés pour cette expérience la journée même. Tous les yeux ont été désendothélialisés sur une surface centrale de 7 mm de diamètre (utilisant la technique décrite en 4.1.3.) et injectés avec  $2 \times 10^5$  CEC et 100  $\mu$ M ROCKi. Les yeux ont ensuite été immédiatement placés cornée-vers-le-bas (**Figure 14**) pour 10 (n=2), 60 (n=5) et 180 minutes (n=5).

À la fin de la période de positionnement cornée-vers-le-bas, la plupart des yeux (n=8) ont été injectés avec formaline 10% dans la chambre antérieure pour fixer les tissus intracaméraux, puis complètement immergés avec de la formaline 10% pour 1 heure. Les deux autres yeux ont été analysés à l'état frais après coloration au rouge d'alizarine et bleu de trypan (Sigma-Aldrich Corp.). Les boutons cornéo-scléaux disséqués de tous les yeux

ont été observés et photographiés dans trois champs représentatifs de la cornée centrale (SteREO Discovery V12; AxioVision Rel. 4.8.2.; Carl Zeiss Canada) selon le protocole à l'Annexe 6. La mise à l'échelle des photos ainsi prises pour décompte cellulaire a été effectuée avec le logiciel ImageJ (U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD) selon le protocole à l'Annexe 7. Les photos ont ensuite été téléversées sur le logiciel associé au microscope spéculaire (KSS-409SP software, version 2.10; Cellchek XL; KonanMedical USA, Torrance, CA). Pour déterminer la densité endothéliale avec ce logiciel, un minimum de 100 cellules par photo ont été comptées par la méthode de décompte des centres cellulaires.

### Résultats

La Figure 16 illustre la zone centrale des cornées de lapin dénudées de leur endothélium, greffées avec  $2 \times 10^5$  CEC et positionnées cornée-vers-le-bas pour différentes périodes de temps. Les densités cellulaires moyennes (min, max) obtenues étaient de 538 (290, 786) cellules/mm<sup>2</sup> pour la période de 10 minutes, de 735 (476, 1029) cellules/mm<sup>2</sup> pour 60 minutes, et 1790 (1211, 2095) cellules/mm<sup>2</sup> pour 180 minutes.



**Figure 16.** Adhésion de CEC injectées dans la chambre antérieure à la surface postérieure des cornées selon la durée de positionnement cornée-vers-le-bas.

Régions centrales de cornées de lapin dénudées de leur endothélium centralement, greffées avec  $2 \times 10^5$  CEC et 100  $\mu$ M ROCKi et fixées avec de la formaline. Positionnement cornée-vers-le-bas pour (A) 10, (B) 60 et (C) 180 min. Des cellules superposées sont visibles dans les conditions de 60 et 180 minutes (*pointes de flèche*). Barres de mesure : 100  $\mu$ m.

### **Discussion et conclusions en vue des expériences *in vivo***

Dans cette expérience, le positionnement cornée-vers-le-bas pour 180 min a permis d'obtenir la meilleure densité cellulaire dans la zone centrale désendothélialisée et greffée avec  $2 \times 10^5$  CEC humaines lorsque comparé avec le positionnement pour 10 et 60 minutes. Ces résultats suggèrent qu'un positionnement prolongé donne le temps à un plus grand nombre de CEC injectées de se déposer sur la DM par gravité et d'y adhérer. Dix et 60 minutes cornée-vers-le-bas ne semblent pas être suffisantes pour obtenir des densités cellulaires acceptables. Ainsi, pour nos expériences *in vivo*, nous avons décidé de maintenir le positionnement cornée-vers-le-bas à 3 heures, tel quel rapporté par Okumura et al.<sup>95</sup>

Des cellules empilées les unes sur les autres ont été observées suite au positionnement cornée-vers-le-bas pour 60 et 180 min. Il est possible qu'avec le temps ces cellules plus superficielles migrent vers une portion de la DM encore non-recouverte pour s'y attacher ou qu'elles se détachent et soient éliminées de la chambre antérieure. Il sera important d'analyser l'endothélium en vues de profil lors des expériences *in vivo* pour s'assurer qu'une monocouche plutôt qu'une multicouche endothéliale est reconstituée par l'injection de CEC dans la chambre antérieure.

## **4.4. Contrôle de l'inflammation intraoculaire chez le félin**

Les réactions inflammatoires intracamérales secondaires aux interventions intraoculaires sont plus importantes chez l'animal que chez l'humain.<sup>285</sup> L'inflammation se produit par un bris de la barrière hémato-oculaire et/ou une dysfonction de la cascade de coagulation ou de fibrinolyse, et peut entraîner l'accumulation de fibrine dans la chambre antérieure. La fibrine insoluble déposée sur le cristallin ou le trabéculum forme des synéchies causant une perte de la fonction pupillaire et/ou un glaucome secondaire.<sup>286</sup> Dans le contexte d'une injection intracamérale de CEC pour reconstituer un nouvel endothélium, la fibrine peut séquestrer les CEC injectées, les empêcher de se déposer sur la DM, ou compromettre la fonctionnalité du nouvel endothélium en y adhérant.

L'activateur du plasminogène tissulaire recombinant (**rtPA**; Alterplase; Genentech, CA) est un agent fibrinolytique puissant utilisé dans le traitement d'inflammations peropératoires

sévères avec formation de fibrine.<sup>286-288</sup> Une concentration de 15-25 µg/0.3 mL a été démontrée comme efficace pour lyser et prévenir l'accumulation de fibrine dans la chambre antérieure.<sup>289</sup> Notre équipe a préalablement utilisé avec succès le rtPA à des concentrations de 150 µM/0,3 mL<sup>87, 192</sup> ou 100 µM/0,2 mL<sup>89</sup> pour contrôler l'inflammation intraoculaire peropératoire dans un modèle félin de KP. Yoeruek et collègues ont montré que le rtPA peut causer une toxicité aux CEC humaines en culture à partir de 125 µg/mL. En se basant sur ces données d'efficacité et de toxicité, nous avons calculé une concentration de 75 µM/0.3 mL à injecter dans la chambre antérieure du félin pour prévenir l'accumulation de fibrine sans causer de toxicité aux CEC injectées. Le rtPA a été injecté avant les CEC.

#### **4.5. Technique d'injection de CEC dans la chambre antérieure**

Les études antérieures sur la thérapie par injection intracamérale de CEC cultivées ne détaillent pas la technique d'injection des CEC.<sup>95, 114, 115, 145, 146, 148, 152, 153</sup> Dans cette étude, nous avons procédé comme suit. Les CEC ont été injectées seulement quelques minutes après leur mise en suspension, afin d'éviter la formation d'agrégats de CEC et leur adhésion à la paroi de la seringue. La chambre antérieure a été préalablement rincée de tout produit toxique et la plaie limbique fermée. La chambre antérieure est restée formée, mais très légèrement hypotone pour éviter la perte d'une portion du liquide contenant les CEC mises en suspension. L'animal a préalablement été retourné sur l'abdomen, mais avec la tête sur le côté et l'iris perpendiculaire au sol. La canule 30 gauge de la seringue utilisée pour l'injection a été orientée vers la zone désendothélialisée, afin de minimiser le dépôt de CEC sur les autres structures de la chambre antérieure. Après l'injection, la tête de l'animal a été rapidement, mais doucement positionnée cornée-vers-le-bas et toute manipulation additionnelle post-injection de la tête a été évitée.

## 5. CEC félines ensemencées *in vitro*

Un prérequis au succès de la transplantation d'un endothélium par injection de CEC dans la chambre antérieure est le succès d'une reconstruction endothéliale par ensemencement de CEC sur une cornée *in vitro*. De nombreuses études ont réussi à reconstruire un tel endothélium sur différents supports (voir Partie I, Chapitre 3), dont la DM séparée ou non de la cornée.<sup>86, 96, 122, 123, 134, 138-141, 259</sup> Notre équipe a montré que  $2,85 \times 10^5$  CEC félines en 0,1 mL (densité de 3000 cellules/mm<sup>2</sup>) ensemencées sur des cornées humaines dévitalisées reconstituent une monocouche endothéliale dense avec des cellules de morphologie normale et exprimant des protéines de fonction endothéliale deux semaines post-ensemencement.<sup>88</sup> Nous avons entrepris cette expérience préliminaire dans le cadre de cette étude afin de tester les résultats obtenus par ensemencement *in vitro* des mêmes nombres de CEC supplémentées avec ROCKi que dans nos expériences *in vivo*.

### Méthodes

Des cornées humaines ont été utilisées pour dévitalisation dans le cadre de cette expérience, car plus disponibles que les cornées félines. Quatre cornées humaines obtenues de la Banque d'yeux du Centre Universitaire d'Ophtalmologie (Québec, QC, Canada) ont été décellularisées tel que décrit précédemment par notre équipe.<sup>88</sup> Les cornées ont ensuite été placées DM vers le haut et ensemencées avec  $2 \times 10^5$  (n=1) ou  $1 \times 10^6$  (n=3) CEC félines en 0,2 mL supplémentées avec 100  $\mu$ M ou 350  $\mu$ M ROCKi et marquées avec le traceur cellulaire fluorescent DiOC (2  $\mu$ g/mL; Molecular Probes) selon le protocole du manufacturier. Les CEC félines ont été préalablement isolées, cultivées et mises en suspension (voir Partie II, Chapitre 3). Après une période de 3 heures permettant aux cellules d'adhérer, les cornées ont été immergées et maintenues en milieu de culture pour un mois. Le milieu a été changé deux à trois fois par semaine.

À un mois, des portions représentatives de chaque cornée ont été distribuées pour colorations vitales, histologie, MEB, MET et immunofluorescence (voir **Annexe 5**). En bref, les colorations vitales ont été effectuées avec du rouge d'alizarine et du bleu de trypan (Sigma-Aldrich Corp.).<sup>290</sup> Deux champs représentatifs de la cornée centrale, sans

chevauchement, ont été photographiés (SteREO Discovery V12; AxioVision Rel. 4.8.2.; Carl Zeiss Canada). Un minimum de 100 cellules par champ ont été comptées pour déterminer la densité endothéliale (KSS-409SP software, version 2.10; Cellchek XL; KonanMedical USA). Pour la MEB et l'analyse histologique, deux spécimens par cornée ont été fixés en formaline neutre à 10%. Pour la MEB, le spécimen fixé a ensuite été déshydraté à l'éthanol et à l'hexamethyldisilazane, coloré (Sputter Coater EMS 950; EMS, Cedarlane, ON, Canada) et observé au microscope JEOL 6360LV (Tokyo, Japon).<sup>88</sup> Pour l'histologie, le tissu fixé a été enrobé en paraffine et des coupes de 5 µm ont été colorées au trichrome de Masson puis analysées (Axio Imager.Z2 microscope; AxioVision Rel. 4.8.2.; Carl Zeiss Canada).<sup>88</sup> Un autre spécimen par cornée a été fixé en glutaraldéhyde 2,5%, rincé au cacodylate, postfixé dans 1% de tétraoxyde d'osmium, coloré à l'acétate d'uranyl, déshydraté à l'éthanol puis enrobé en Poly/Bed 812.<sup>88</sup> Des coupes fines ont été analysées en MET (Hitachi H-7500; Tokyo, Japon).

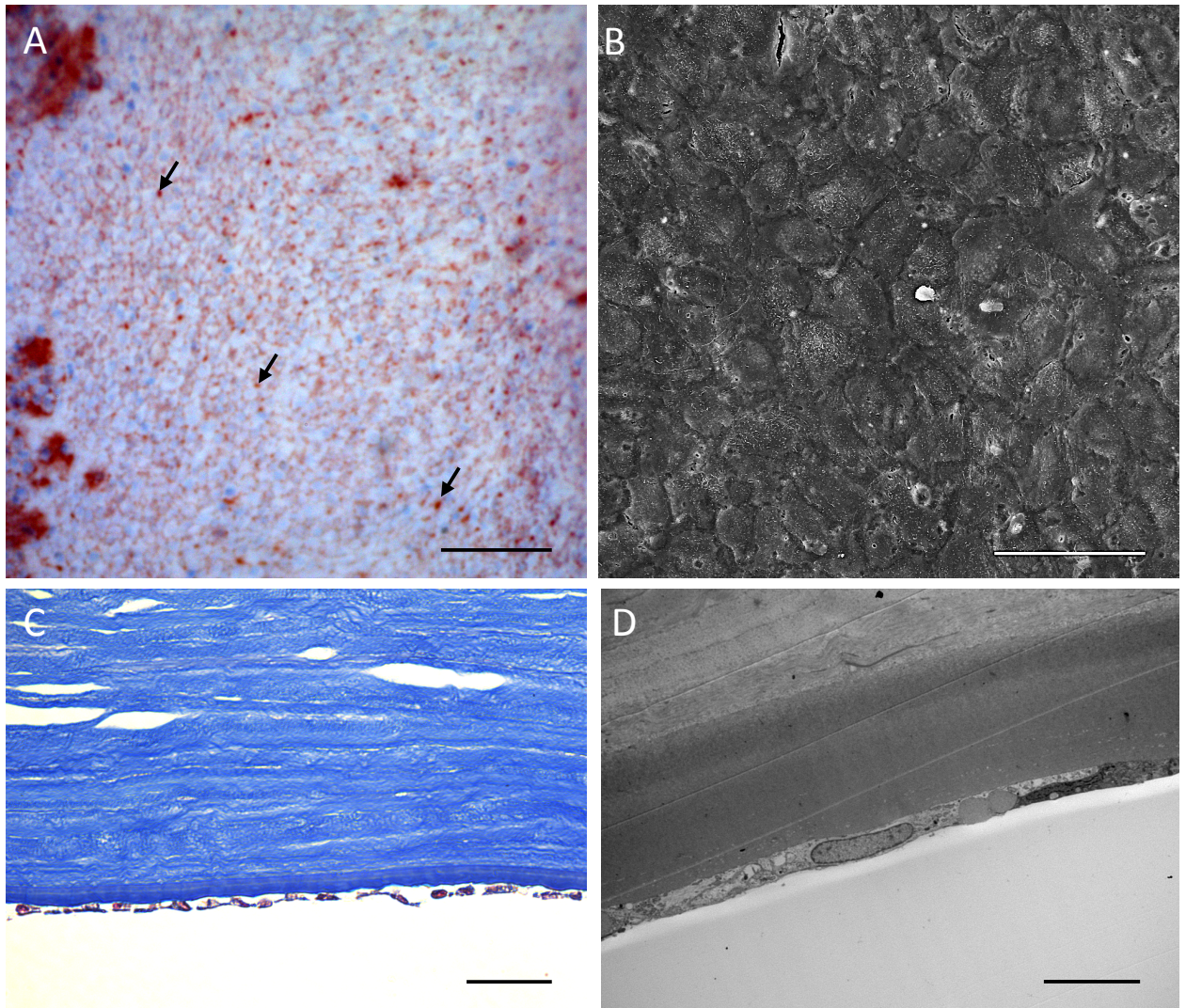
Pour l'immunofluorescence (Axio Imager.Z2, Carl Zeiss Canada), les spécimens de cornées dévitalisées ensemencées avec CEC ont été fixés dans un composé optimal de la température de découpage (OCT; Somagen, Edmonton, AB, Canada).<sup>89</sup> Des cryosections transversales d'une épaisseur de 10 µm ont été fixées avec de l'acétone 100% (EMD, Mississauga, Ontario, Canada) pour 10 minutes à -20°C et immunocolorés pour 1 heure à température de la pièce avec : un anti-Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase α1 monoclonal de souris (1:400), un anti-ZO-1 polyclonal de lapin (1:50), un anti-α-SMA monoclonal de souris (1:400), un anti-fibronectine polyclonal de chèvre (1:100), et un anti-keratines 8/18 polyclonal de cochon d'Inde (1:100; # 03-GP11; ARP, Waltham, MA, USA) en tant qu'anticorps primaires. Les anticorps secondaires respectifs ont été utilisés ensuite pour 45 minutes à température de la pièce : Alexa Fluor 594 chèvre anti-souris (1:400), chèvre anti-cobaye (1:400; #A11076; Invitrogen), poulet anti-chèvre (1:600) et poulet anti-lapin (1:800). Les noyaux ont été marqués avec Hoechst 33258 ou 4',6-diamidino-2-phénylindole (**DAPI**). Des spécimens de cornées félines normales avec endothélium natif ont été traités pour analyse en immunofluorescence de la même manière immédiatement après le prélèvement chez l'animal et ont été utilisés comme contrôles normaux.

## Résultats

À un mois post-ensemencement, de petites cellules disposées de manière compacte et recouvrant la DM presque en totalité ont été notées en coloration vitale et en MEB sur l'aspect postérieur des cornées humaines dévitalisées et ensemencées avec  $2 \times 10^5$  ou  $1 \times 10^6$  CEC félines (**Fig. 17A-B**). Les cellules paraissaient aplaties, uniformément hexagonales et étroitement attachées les unes aux autres avec de petits espaces intercellulaires. La densité endothéliale moyenne (min, max) était de 2860 (1281, 4540) cellules/mm<sup>2</sup>. Les vues de profil en histologie et en MET ont confirmé la disposition en une monocouche fine de cet endothélium, son attachement à la DM, ainsi que l'absence de membrane rétro-cornéenne (**Fig. 17C-D**). L'absence de kératocytes stromaux en histologie était compatible avec la dévitalisation préalable des cornées ensemencées. La MET a dévoilé des cellules d'apparence saine, avec des noyaux cellulaires normaux et de nombreuses organelles intracytoplasmiques (**Fig. 17D**).

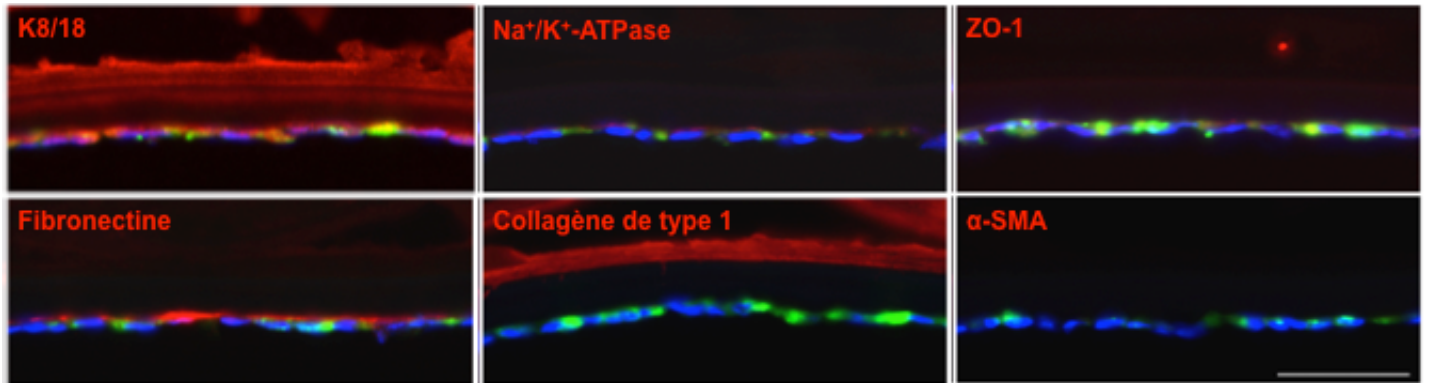
En immunofluorescence, l'endothélium reconstitué sur des cornées dévitalisées (**Fig. 18**) était positif pour le marqueur endothélial K8/18, tout comme l'endothélium natif des cornées félines normales (**Fig. 19**). Ce marqueur était également présent au niveau de la DM et du stroma cornéen des cornées dévitalisées. Les protéines de fonction endothéliale, la pompe Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase et la protéine associée aux jonctions serrées ZO-1, étaient toutes les deux présentes dans l'endothélium reconstruit, quoique plus faiblement exprimées que dans une cornée féline normale (**Fig. 19**). Parmi les marqueurs de guérison endothéliale, seule la fibronectine était exprimée par le nouvel endothélium. L'endothélium félin normal n'exprimait aucun de ces marqueurs. Le stroma était normalement positif pour le collagène de type I. Dans les cornées dévitalisées, la plupart des CEC marquées avec le traceur cellulaire DiOC étaient encore très fluorescentes à un mois post-ensemencement. Tel qu'attendu, le DiOC n'était pas exprimé dans les contrôles normaux.





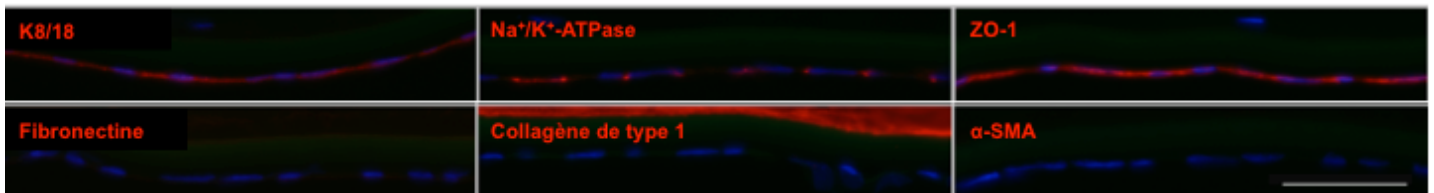
**Figure 17.** CEC félines ensemencées sur cornées dévitalisées *in vitro*.

Cornées humaines dévitalisées ensemencées avec  $1 \times 10^6$  CEC félines et maintenues en culture pour un mois. **(A)** Coloration au rouge d'alizarine et bleu de trypan. Des espaces intercellulaires étroits colorés par le rouge d'alizarine sont visibles (*flèches*). **(B)** MEB. **(C)** Histologie (coloration au Trichrome de Masson). On note l'absence de kératocytes dans le stroma dévitalisé. **(D)** MET. *Barres de mesure* : 10  $\mu\text{m}$  (C, D); 50  $\mu\text{m}$  (B); 100  $\mu\text{m}$  (A).



**Figure 18.** Résultats d'immunofluorescence de spécimens de cornées dévitalisées ensemencées avec CEC félines *in vitro*.

Expression de K8/18, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, ZO-1, fibronectine, collagène de type I et α-SMA (rouge) dans les cornées dévitalisées ensemencées avec 1 x 10<sup>6</sup> CEC félines un mois après l'ensemencement. Noyaux cellulaires marqués au Hoescht (bleu). Traceur cellulaire DiOC (vert fluorescent). Le stroma est partiellement décollé de la DM dans les photos K8/18, Fibronectine et Collagène de type I, et complètement dans les autres photos (donc non-visible). *Barre de mesure* : 10 μm.



**Figure 19.** Résultats d'immunofluorescence de spécimens de cornées félines normales. Expression de K8/18, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, ZO-1, fibronectine, collagène de type I et α-SMA (rouge) par l'endothélium natif d'une cornée féline normale. Noyaux cellulaires marqués au Hoescht (bleu). Le stroma est visible dans la photo Collagène de type I. *Barre de mesure* : 10 μm.

### Discussion et conclusions en vue des expériences *in vivo*

Les résultats de cette expérience préliminaire d'ensemencement de cornées humaines dévitalisées avec 2 x 10<sup>5</sup> et 1 x 10<sup>6</sup> CEC félines sont compatibles avec les observations rapportées précédemment par notre laboratoire suite à l'ensemencement de 2,85 x 10<sup>5</sup> CEC.<sup>88</sup>

Les CEC ensemencées ont bien adhéré à la DM dénudée et ont reconstitué une monocouche sans matrice extracellulaire, recouvrant la totalité de la DM et démontrant une morphologie et ultrastructure normales. La formation d'une monocouche plutôt qu'une multicouche suggère que l'ensemencement d'un nombre beaucoup plus élevé de CEC ( $1 \times 10^6$ ) n'entraîne pas d'empilement de celles-ci ou que, si cet empilement a lieu, il n'est que transitoire, avec migration des CEC plus superficielles vers une portion de la DM encore non-recouverte pour s'y attacher. La densité cellulaire obtenue dans nos cornées ensemencées était comparable à celle d'une cornée féline normale (2300-2900 cellules/mm<sup>2</sup>)<sup>181, 231, 233, 250, 251</sup> et grandement supérieure à la densité nécessaire au maintien de la déturgescence et de la transparence cornéennes (autour de 1050-1150 cellules/mm<sup>2</sup> chez le félin).<sup>291</sup> La plupart des cellules ensemencées ont démontré une forte expression du DiOC. La diminution de l'intensité du traceur dans certaines cellules pourrait être attribuée à son photoblanchiment avec le temps ou à sa libération des CEC ensemencées.

Le K8/18, un hétéropolymère composé des cytokératines 8 et 18, est classiquement exprimé par des cellules de la lignée épithéliale,<sup>292</sup> telles les cellules de l'épithélium cornéen, de l'endothélium vasculaire, et du mésothélium pleural et péritonéal.<sup>293-295</sup> Son expression a aussi été démontrée dans l'endothélium cornéen,<sup>160, 161</sup> mais pas dans les kératocytes stromaux.<sup>161</sup> Étant intracytoplasmique,<sup>292</sup> il n'est pas présent dans des structures acellulaires, telle la DM, ou dans la matrice extracellulaire stromale. Dans cette expérience préliminaire, le K8/18 était présent dans l'endothélium reconstruit par ensemencement, la DM et le stroma des cornées dévitalisées. Il est possible que l'anticorps primaire polyclonal anti-K8/18 utilisé ait été peu spécifique, entraînant la fluorescence des trois couches cornéennes. Il se peut aussi que sa présence au niveau de la DM et du stroma soit attribuable à un bruit de fond en lien avec un plus grand temps d'exposition du tissu. Un spécimen du même tissu observé en immunofluorescence sans marquage préalable avec l'anticorps primaire anti-K8/18 aurait pu être utilisé comme contrôle négatif pour distinguer le bruit de fond du vrai marquage par l'anticorps. Alternativement, le tissu marqué aurait pu être observé sous d'autres longueurs d'ondes pour établir si le bruit de fond est toujours présent. Étant donné le doute concernant la spécificité de l'anticorps primaire utilisé, il est difficile de savoir si le nouvel endothélium exprimait réellement le K8/18. Par contre, étant donné que les cornées humaines étaient

dévitalisées avec une technique préalablement validée,<sup>88</sup> qu'il n'y avait pas de kératocytes dans leur stroma tel que confirmé en histologie, que les seules cellules ensemencées étaient des CEC amplifiées en culture et que le DiOC était présent à l'aspect postérieur de la DM post-ensemencement, il est très probable que les cellules observées après un mois étaient des cellules endothéliales.

D'un point de vue fonctionnel, tel que mentionné plus haut, notre équipe a démontré préalablement qu'un endothélium reconstruit par des CEC félines ensemencées sur des cornées humaines dévitalisées expriment les protéines ZO-1 et Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase de façon semblable à un endothélium natif de cornées félines normales.<sup>88</sup> Dans le cadre des expériences préliminaires présentées ici, les deux protéines fonctionnelles étaient exprimées par l'endothélium reconstruit, mais plus faiblement que par l'endothélium natif normal. L'expression plus faible de ZO-1 est compatible avec la présence d'espaces intercellulaires colorés au rouge d'alizarine en coloration vitale, et suggère la formation encore incomplète de jonctions intercellulaires dans nos cornées à un mois post-ensemencement.

Le  $\alpha$ -SMA est un marqueur de transition mésenchymateuse.<sup>164, 171</sup> L'absence de l'expression de cette protéine dans nos cornées dévitalisées suggère que les cellules endothéliales ensemencées ont préservé leur phénotype endothélial et n'ont pas subi de transition myofibroblastique *in vitro*. Cette observation est compatible avec l'absence de membrane rétrocornéenne en histologie et en MET.

Des membranes rétrocornéennes exprimant la fibronectine et le collagène de type I ont été décrites suite à la transition myofibroblastique de cellules endothéliales.<sup>165, 167, 169, 170</sup> Dans nos cornées dévitalisées ensemencées avec CEC, la fibronectine était présente à l'interface entre la DM et l'endothélium, alors que le collagène de type I n'était exprimé qu'au niveau du stroma. Combiné avec la négativité pour le  $\alpha$ -SMA et la disposition de l'endothélium en monocouche sans matrice extracellulaire, ce phénotype suggère que la fibronectine présente au niveau de l'endothélium dans nos spécimens n'a pas été secrétée par les CEC ensemencées dans un contexte de transition mésenchymateuse et de formation de membrane rétrocornéenne. À l'état physiologique *in vivo*, la fibronectine n'est pas détectée du tout ou seulement très faiblement dans les cellules endothéliales ou à leur interface avec la DM,<sup>296, 297</sup> tel que corroboré par nos résultats d'immunofluorescence dans

l'endothélium natif de cornées félines normales (**Fig. 19**). Plusieurs chercheurs rapportent par contre l'expression de cette protéine par les cellules endothéliales avec une distribution intracytoplasmique ou péricellulaire dans des cornées provenant de donneurs plus âgés<sup>297</sup> ou dans un contexte de guérison et migration endothéliale sans production de membrane rétrocornéenne.<sup>298</sup> La présence de la fibronectine a aussi été rapportée à l'interface de la DM avec l'endothélium dans des cornées provenant de donneurs plus âgés<sup>297</sup> ou encore dans des cornées maintenues en culture ad 24 heures, où l'œdème stromal secondaire permet la diffusion de l'anticorps anti-fibronectine vers le tissu plus facilement que dans une cornée normale *in vivo*.<sup>299</sup> Ainsi, il est possible que la fibronectine exprimée dans nos spécimens ait été sécrétée par les CECensemencées ayant migré sur la DM dénudée pour établir le nouvel endothélium ou qu'elle ait déjà été présente à l'aspect postérieur de DM avant même l'ensemencement. Un spécimen contrôle d'une cornée dévitalisée avant ensemencement marqué contre la fibronectine aurait pu nous aider à distinguer la fibronectine normalement présente sur la DM de celle sécrétée par les CECensemencées.

En conclusion, dans des conditions contrôlées *in vitro*, l'ensemencement de  $2 \times 10^5$  ou  $1 \times 10^6$  CEC félines supplémentées avec ROCKi sur une DM dénudée permet de reconstituer une monocouche endothéliale hypercellulaire d'apparence saine, adhérant à la DM et probablement fonctionnelle. L'expression de DiOC un mois après ensemencement confirme que le nouvel endothélium a été formé par les CEC félinesensemencées. L'utilisation de ce traceur pour les expériences *in vivo* pourra permettre de localiser les CEC injectées dans la chambre antérieure et d'estimer leur contribution à la reconstitution du nouvel endothélium. Quoique les conditions *in vivo* soient plus difficiles à contrôler que celles *in vitro*, cette expérience préliminaire suggère que  $2 \times 10^5$  ou  $1 \times 10^6$  CEC félines seraient suffisantes pour reconstituer un endothélium fonctionnel par injection dans la chambre antérieure d'un modèle félin vivant de déficience endothéliale.

**PARTIE III – ARTICLE ORIGINAL**

***In Vivo* Functionality of a Corneal Endothelium  
Transplanted by Cell-Injection Therapy in a Feline Model**

*Investigative Ophthalmology and Visual Science* 2016;57(4):1620-34

**Authors:** Cristina Bostan,<sup>1, 2</sup> Mathieu Thériault,<sup>3</sup> Karolyn J. Forget,<sup>1</sup> Christelle Doyon,<sup>1,2</sup> J. Douglas Cameron,<sup>4</sup> Stéphanie Proulx,<sup>3,5</sup> Isabelle Brunette<sup>1,2\*</sup>

**\*Corresponding author and reprint request:** Dr Isabelle Brunette, Department of Ophthalmology, Maisonneuve-Rosemont Hospital, 5415 boulevard de l'Assomption, Montreal, QC H1T 2M4 Canada.

**Financial support:** This work was supported by The Canadian Institutes for Health Research, ON, Canada; the FRQ-S Vision Health Research Network, and the FRQ-S ThéCell Network, Montreal, QC, Canada. CB holds a Master's Training for Medical Students FRQ-S Award. MT holds a Doctoral Training Excellence Award for Research in Vision from Centre LOEX of Université Laval, Canada. JDC is supported in part by an unrestricted grant from Research to Prevent Blindness to the Department of Ophthalmology and Visual Neuroscience of University of Minnesota. SP is an FRQ-S Research Scholar Junior 1. IB is the recipient of the Charles-Albert Poissant Research Chair in Corneal Transplantation, University of Montreal, Canada. Funding organizations had no role in the design or conduct of this study.

---

<sup>1</sup> Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Center, Montreal, QC, Canada

<sup>2</sup> Department of Ophthalmology, University of Montreal, Montreal, QC, Canada

<sup>3</sup> Centre d'organogénèse expérimentale de l'Université Laval/LOEX, Québec city, QC, Canada and Centre de recherche du CHU de Québec - UL, axe Médecine régénératrice, Québec city, QC, Canada.

<sup>4</sup> Ophthalmology and Visual Neurosciences and Laboratory Medicine and Pathology, University of Minnesota School of Medicine, Minneapolis, Minnesota

<sup>5</sup> Department of Ophthalmology and ENT-Head and Neck Surgery, University Laval, Québec city, QC, Canada

**Disclosure:** C. Bostan, None; M. Thériault, None; K. Forget, None; C. Doyon, None; J.D. Cameron, None; S. Proulx, None; I. Brunette, None

**Presented in part at:** the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) Annual Meeting, Orlando, Florida, May 4<sup>th</sup>-8<sup>th</sup> 2014.

**Word count:** 4672



## Abstract

**Purpose:** To evaluate the functionality of a corneal endothelium reconstituted by injection of corneal endothelial cells (CEC) in the anterior chamber of a feline model.

**Methods:** We operated the right eyes of 16 animals. Eight underwent central endothelial scraping and injection with  $2 \times 10^5$  (n=4) or  $1 \times 10^6$  (n=4) feline CEC supplemented with Y-27632 and labeled with 3,3'-dioctadecyl-5,5'-Di(4-sulfophenyl)-oxacarbocyanine sodium salt (SP-DiOC<sub>18</sub>(3) or **DiOC**, as referred to in this text). After total endothelial scraping, two eyes were injected with  $1 \times 10^6$  labeled CEC and Y-27632. The central (n=3) or entire (n=3) endothelium was scraped in six eyes followed by Y-27632 injection without CEC. Subjects were positioned eyes-down for three hours. Outcomes included graft transparency, pachymetry, CEC morphometry, histology, electron microscopy, and function and wound healing-related protein immunostaining.

**Results:** Postoperatively, corneas grafted with  $2 \times 10^5$  CEC and centrally scraped controls displayed the best transparency and pachymetry. Corneas grafted with  $1 \times 10^6$  CEC yielded intermediate results. Entirely scraped controls remained hazy and thick. Histopathology revealed a confluent endothelial monolayer expressing sodium-potassium adenosine phosphatase (**Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase**) and zonula occludens-1 (**ZO-1**) in corneas grafted with  $2 \times 10^5$  CEC and centrally scraped controls, a non-uniform endothelial multilayer without expression of functional proteins in centrally scraped corneas grafted with  $1 \times 10^6$  CEC, and a non-functional fibrotic endothelium in entirely scraped grafts and controls. DiOC expression in grafts was scarce.

**Conclusion:** Injected CEC contributed little to the incompletely functional endothelium of grafted corneas. Y-27632 injection without CEC following scraping reconstituted the healthiest endothelium. Further studies investigating the therapeutic effect of Y-27632 alone are needed to validate these conclusions.

## Introduction

Corneal endothelial diseases cause blindness due to loss of corneal transparency. They were responsible for 40% of the 66,305 corneal transplantations performed in the United States in 2013.<sup>300</sup> In several parts of the world, however, donor tissue shortage limits accessibility to this therapeutic option.<sup>78, 79, 116, 301-303</sup> The relentlessly increasing demand for transplantable corneas<sup>71, 304</sup> and the limitations inherent to current transplantation techniques, including postoperative endothelial cell attrition<sup>305-311</sup> and immune rejection,<sup>67, 312</sup> have driven the search for alternative treatments.

Tissue engineering opens a promising avenue for generating sufficient amounts of highly cellular corneal endothelial grafts to alleviate the increasing demand.<sup>74, 80</sup> It is based on the ability of human endothelial cells, normally arrested in the G<sub>1</sub> phase of the cell cycle *in vivo*, to proliferate *in vitro* with the addition of growth factors.<sup>83</sup> Tissue-engineered endothelial monolayers have been successfully grafted in animal eyes.<sup>89, 116, 117, 120-122</sup> The choice of a carrier for these monolayers, however, remains a challenge, because of poor biocompatibility issues, interface scarring, or the persisting need for human donor tissue for carriers consisting of stroma and/or Descemet's membrane (**DM**).<sup>80</sup> Endothelial cell sheets not supported by a carrier are too fragile to constitute a clinically viable option.

The injection of cultured corneal endothelial cells (**CEC**) into the anterior chamber offers a promising therapeutic alternative. Intracameral CEC injection is significantly less invasive than any currently used keratoplasty technique. It also shares the advantages of engineered tissues, namely standardization of *in vitro* production, quality control, graft sterility, as well as the options of autologous transplantation and production of multiple grafts from a single donor cornea. Moreover, intracameral CEC injection can be repeated if needed using the same cryopreserved cell population, thus avoiding sensitization by new donor antibodies.

Intracameral CEC injection alone after corneal endothelial cell depletion was proven unsuccessful for endothelial transplantation in several studies.<sup>145, 146</sup> Different strategies have thus been proposed to enhance adherence of injected CEC to the DM.<sup>95, 114, 115, 145, 146, 148, 152, 153, 313</sup> Some groups used CEC loaded with iron particles,<sup>145, 146</sup> superparamagnetic microspheres<sup>147</sup> or magnetic nanoparticles<sup>148</sup> and an extra-ocular magnetic field to attract CEC to the DM, however with an uncertain long term safety profile. Others showed that maintenance of a prone

position after injection promotes cell deposition by gravity.<sup>95, 114, 115, 152</sup> A promising approach was the addition of Rho-associated kinase inhibitor (**ROCKi**) to stimulate migration and adherence of injected CEC.<sup>95, 279, 280</sup>

Most of the *in vivo* CEC-injection studies were performed in rabbits,<sup>95, 114, 115, 145, 146, 148, 152, 153</sup> whose endothelial cells are known to replicate spontaneously,<sup>154</sup> while only one small sample size study included a primate model.<sup>95</sup> The feline model has non-replicating endothelial cells similar to humans<sup>136, 154, 231</sup> and its use for the optimization of corneal transplantation techniques is well documented.<sup>135, 192, 216, 217</sup> It is thus an interesting model for the preclinical assessment of corneal endothelial reconstitution by intracameral CEC injection.

The goal of this study was to assess the anatomy, biocompatibility and functionality of a corneal endothelium reconstituted by injection of allogeneic CEC in the anterior chamber of a feline endothelial deficiency model. All injected eyes received ROCK inhibitor supplementation and were positioned eyes down for 3 hours after injection.

## Materials and methods

All experiments were conducted in accordance with the ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research and with the Maisonneuve-Rosemont Hospital Committee for Animal Protection guidelines.

### Endothelial Cell Isolation, Culture and Labeling

Descemet's membranes were peeled from feline corneas and incubated in growth medium overnight at 37°C and 8% CO<sub>2</sub>.<sup>83, 88</sup> They were then incubated with EDTA 0.02% for 1 hour and passed several times through a pipette. Detached cells were seeded on FNC (Athena Enzyme Systems, Baltimore, MD, USA) coated culture dishes in Dulbecco's modified Eagle's medium (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) containing 10% fetal bovine serum (Hyclone, Logan, UT, USA), 5 ng/mL human epidermal growth factor (Austral Biologicals, San Ramon, CA, USA), 25 µg/mL bovine pituitary extract (Biomedical Technologies, Ward Hill, MA, USA), 25 µg/mL gentamicin sulfate (Schering Canada, Pointe Claire, QC, Canada) and 100 IU/mL penicillin G (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA). Four cell populations were cultured up to second passage (**Table S1**) and labeled with the fluorescent membrane tracer 3,3'-dioctadecyl-5,5'-Di(4-sulfophenyl)-oxacarbocyanine, sodium salt (**SP-DiOC<sub>18</sub>(3)**) or DiOC, as referred to in this text; 2 µg/mL; Molecular Probes, Eugene, OR, USA) following manufacturer instructions.

### Endothelial Cell Preoperative Characterization

Prior to grafting, cell morphology was evaluated *in vitro* by phase contrast microscopy (TS100 Eclipse; Nikon, Melville, NY, USA). CEC seeded on glass coverslips were fixed (paraformaldehyde 4% for 30 minutes) for immunolabeling. Cells were first labelled with Alexa Fluor 488 phalloidin (Invitrogen) for 30 minutes, then immunostained for one hour with either a mouse anti-sodium-potassium adenosine phosphatase alpha 1 (**Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase α1**; Millipore, Etobicoke, ON, Canada), a polyclonal anti-zonula occludens-1 (**ZO-1**; Invitrogen), a mouse anti-alpha-smooth muscle actin (**α-SMA**; Dako, Burlington, ON, Canada), a goat anti-fibronectin (Santa Cruz, Dallas, TX, USA), or a mouse anti-collagen type I (Sigma-Aldrich Corp.). The secondary antibodies Alexa Fluor 594 goat anti-mouse (Invitrogen), chicken anti-goat (Invitrogen) and chicken anti-rabbit (Invitrogen) were used as secondary antibodies for 45

minutes at room temperature. Antibodies were diluted in phosphate buffered solution containing 1% bovine albumin serum (Sigma-Aldrich Corp.). Hoechst reagent 33258 or 4',6-diamidino-2-phenylindole (**DAPI**) was added for cell nuclei counterstaining. Fluorescence was then observed (Axio Imager.Z2 microscope; AxioVision Rel. 4.8.2.; Carl Zeiss Canada, Toronto, ON, Canada) and the percentage of  $\alpha$ -SMA positive cells was determined (ImageJ; U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

### **Population**

Sixteen healthy adult animals were obtained from a certified supplier. Right eyes were assigned to surgery and left eyes were used as normal non-operated controls. Eight animals underwent central (7 mm diameter) endothelial scraping and injection with  $2 \times 10^5$  (200K; n=4) or  $1 \times 10^6$  (1M; n=4) feline CEC supplemented with 100  $\mu$ M or 350  $\mu$ M ROCKi (Y-27632; Sigma-Aldrich Corp.) in 0.2 mL. Two animals underwent total (18 mm diameter) endothelial scraping followed by intracameral injection of ROCKi and 1M CEC in 0.2 mL. After scraping off their central (n=3) or entire (n=3) endothelium, six negative control corneas were injected with ROCKi in 0.2 mL without CEC.

### **Preoperative Assessment**

The preoperative ophthalmic examination included slit-lamp biomicroscopy (BQ 900; Haag-Streit, Bern, Switzerland; Sony 3CCD video camera; Sony; Park Ridge, NJ, USA), central corneal pachymetry (Ultrasound Pachymeter SP 3000; Tomey, Nagoya, Japan), intraocular pressure (**IOP**) measurement (Tonovet, TV01; Tiolat Oy, Helsinki, Finland) and noncontact specular microscopy (Konan Medical INC., Nishinomiya, Hyogo, Japan) for endothelial cell count and morphometry.

### **Medication**

All animals were given oral prophylactic famcyclovir (125 mg daily; Famvir; PMS, Montreal, QC, Canada) for the entire study period. Topical diclofenac sodium 0.1% (twice daily; Voltaren Ophtha; Alcon, Mississauga, ON, Canada) and dexamethasone 0.1% (once daily; Maxidex

ointment; Alcon), as well as oral prednisone (5 mg daily) were administered for 3 days prior to surgery.

At the beginning of the surgery, subconjunctival dexamethasone (1.2 mg/0.3 mL), tobramycin (10 mg/0.25 mL), and cefazolin (55 mg/0.25 mL) were administered. Pupillary constriction, using pilocarpine 2% (minims; Chauvin, Kingston-Upon-Thames, UK) with or without intracameral acetylcholine 1% (Miochol-E; Bausch+Lomb; Rochester, NY, USA), was sought to minimize deposition of injected CEC on the lens.

Sodium chloride 5% (twice daily; Muro 128 ointment; Bausch+Lomb), diclofenac sodium 0.1% (three times daily), and tobramycin 0.3% with dexamethasone 0.1% (once daily; Tobradex ointment; Alcon) were administered to the operated eye for the first postoperative week and tapered over one month. Systemic prednisone (5 mg daily) was given for 3 days after surgery.

### **Endothelial Cell Transplantation**

At the time of surgery, cultured CEC were detached from the culture dish using 0.05% trypsin/0.53 mM EDTA (Corning Cellgro, Manassas, VA, USA) and suspended in 0.2 mL balanced salt solution (**BSS**) supplemented with 100  $\mu$ M or 350  $\mu$ M ROCKi. The same corneal surgeon (IB) performed all interventions under general anaesthesia.<sup>192</sup> The central (7-mm diameter) or entire (18-mm diameter, up to 0.5 mm from the angle) recipient endothelium was gently detached in flaps (Endothelial keratoplasty spatula; Moria; Antony, France), leaving the DM denuded and intact. Continuous irrigation with BSS ensured completeness of endothelial cell removal from the DM's surface and anterior chamber. The 2 mm limbal wound was closed (CU-1 10-0 nylon; Alcon Surgical, Fort Worth, TX, USA) and recombinant tissue plasminogen activator (75  $\mu$ g/0.3 mL; Alteplase; Genentech, San Francisco, CA, USA) was injected in the anterior chamber to accelerate fibrin resorption.<sup>286, 314</sup> A 30-gauge cannula, directed towards the denuded DM and away from the angle, iris and lens, was used to inject 0.2 mL BSS:ROCKi containing 200K, 1M or no CEC. The animal was then immediately turned eyes-down, to allow CEC deposition on the denuded DM by gravity. This position was maintained for 3 hours under general anaesthesia.

### **Postoperative Follow-up**

Eyes were examined on postoperative days 1 to 4, then twice a week until euthanasia. Examination included assessment of corneal transparency, intraocular inflammation, signs of rejection, and ectopic deposition of injected CEC. A subjective 0 to 4+ scale<sup>315</sup> was used to evaluate graft transparency (0: opaque cornea; 1+: moderate opacity, no iris/lens details; 2+: mild opacity, iris/lens details still visible; 3+: slight opacity, iris/lens details easily visible; 4+: clear graft, iris details fully visible). For intraocular inflammation, anterior chamber cells and flare were quantified with a 0 to 4+ scale.<sup>316</sup> IOP and central corneal thickness (CCT) were also measured. Sutures were removed on day 10.

Two non-grafted controls (central scraping, n=1; entire scraping, n=1) were analyzed immediately after the 3 hour-eyes-down positioning period to assess the endothelial damage induced by scraping. One of the centrally scraped corneas grafted with 1M CEC was followed for 16 days and one of the centrally scraped non-grafted controls for 7 days. All other operated eyes were followed for one month. Animals were then euthanized (pentobarbital sodium 3 mL/2.5-5 kg intravenously). Experimental and control eyes were enucleated and the corneal-scleral buttons, irido-corneal angle and lenses carefully dissected. Representative portions of each cornea were distributed for vital staining, histology, scanning and transmission electron microscopy (SEM; TEM), and immunofluorescence.

### **Postoperative Endothelial Cell Density and Morphometry**

Vital staining was performed with trypan blue and alizarin red S (Sigma-Aldrich Corp.).<sup>290</sup> Two non-overlapping fields of the central cornea were photographed (SteREO Discovery V12; AxioVision Rel. 4.8.2.; Carl Zeiss Canada) and a minimum of 100 cells per field were counted for endothelial cell density and morphometry analysis (KSS-409SP software, version 2.10; Cellchek XL; KonanMedical USA, Torrance, CA, USA). The percentage of hexagonal cells was used to describe pleomorphism (differences in cell shape) and the cell area coefficient of variation to describe polymegathism (differences in cell size).<sup>317, 318</sup>

### **Histopathology**

Two samples per cornea, the irido-corneal angle and the lens specimens were fixed in 10% neutral buffered formalin and processed for SEM (6360LV; JEOL, Tokyo, Japan) and light

microscopy (Axio Imager.Z2). Another sample was fixed in 2.5% glutaraldehyde and processed for TEM (H-7500; Hitachi, Tokyo, Japan).<sup>88</sup> For immunofluorescence analysis, specimens were frozen in optimal cutting temperature solution (OCT; Somagen, Edmonton, AB, Canada).<sup>89</sup> Transversal cryosections (10 µm thick) were fixed in 100% acetone (EMD, Mississauga, Ontario, Canada) for 10 minutes at -20°C and immunostained for 1 hour at room temperature with the antibodies previously described, as well as a guinea pig anti-keratins 8/18 antibody (ARP, Waltham, MA, USA). Cell nuclei were counterstained with Hoechst reagent or DAPI and fluorescence was assessed as described previously.



## Results

### CEC Characterization Prior to Transplantation

All CEC populations displayed polygonal morphology in culture (**Fig. A1, A**). The tight junction protein ZO-1 and the cell membrane endothelial function-related protein Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha$ 1 were present in all (**Fig. A1, B-C**). As little as  $0.07 \pm 0.04\%$  of cells expressed the endothelial-to-mesenchymal transition marker alpha-SMA (**Fig. A1, D**). A weak background expression of type I collagen and fibronectin was noted, which was compatible with use of FNC coating (**Fig. A1, E-F**). Actin was limited to the cellular perimembrane region in all populations (**Fig. A1, B-F**).

### Assessment of the Endothelial Damage Induced by Scraping

Analysis of the two non-grafted controls (7 mm and 18 mm scraping and ROCK inhibitor injection) immediately after their 3-hour eyes-down postoperative positioning period confirmed the complete removal of the endothelium and the integrity of the denuded DM (**Fig. S1**).

### Postoperative Clinical Outcome

**Figures A2 and A3** describe the postoperative clinical evolution. Before surgery, no epithelial defects, inflammation or neovascularization were noticed in any of the eyes. After surgery, intraocular inflammation was minimal, with few inflammatory cells and mild flare, resolving within one week (**Fig. A3, D-E**). Significant anterior chamber inflammation was noted in only one subject (entirely scraped cornea transplanted with 1M CEC), with condensation of web-like fibrin filaments contracting towards the posterior corneal surface. Intracameral recombinant tissue plasminogen activator (600  $\mu$ g/0.6 mL) injected in this eye on day 7 led to complete fibrin resorption by day 8. No signs of rejection (Khodadoust line, keratic precipitates) were noted during follow-up in any of the grafts.

**Corneal Transparency.** Grafted corneas progressively cleared in the first week after surgery, however remaining overall hazier than contralateral non-operated controls (**Fig. A2, A-B, E, J, and Fig. A3, A**). Corneas transplanted with 200K CEC (**Fig. A2, A**) and centrally scraped non-

grafted controls (**Fig. A2, I**) achieved the best transparency at one month, with a mean score of 3.69 and 3.75, respectively. The centrally and entirely scraped corneas grafted with 1MCEC progressed similarly, but with lower scores (**Fig. A2, B, E**). The non-grafted entirely scraped corneas never cleared postoperatively (**Fig. A2, F**).

**Central Corneal Thickness.** **Figure A3, B** shows the evolution of the mean CCT in operated eyes. Grafted corneas remained thicker than contralateral non-operated controls, but considerably thinner than the entirely scraped non-grafted controls, which stayed oedematous and maintained CCT values above 2,000  $\mu\text{m}$ . Corneas grafted with 200K CEC and the centrally scraped non-grafted controls thinned progressively, reaching mean CCT of 789  $\mu\text{m}$  and 671  $\mu\text{m}$ , respectively. Those transplanted with 1M CEC remained relatively stable, with a mean CCT of 1,248  $\mu\text{m}$  at one month.

**Intraocular pressure.** No significant IOP elevation was noted in any of the operated eyes (**Fig. A3, C**).

**Posterior Corneal Haze.** On postoperative day 1, a highly reflective layer was noted at the posterior aspect of corneas injected with CEC (**Fig. A2, C-D, G**). This haze was limited to and did not extend beyond the areas that had been scraped and grafted. With time, it lost uniformity and adopted a patchy aspect. No haze was seen in scraped but non-injected eyes, although the significant oedema noted in entirely scraped non-grafted corneas might have prevented its visualization (**Fig. A2, H-K**).

#### **Endothelial Cell Density and Morphometry**

Endothelial cell counts and morphology findings are summarized in **Table A1** and illustrated in **Fig. A4**. Specular microscopy showed a normal corneal endothelium in all eyes prior to surgery. One month after surgery, all operated eyes had lower cell counts than contralateral non-operated controls. Centrally scraped non-grafted controls (**Fig. A4, E**) and corneas grafted with 200K CEC (**Fig. A4, A**) displayed the greatest cell densities, followed by centrally (**Fig. A4, B**) and entirely scraped (**Fig. A4, C**) corneas grafted with 1M CEC. No cells were seen in the center of the entirely scraped non-grafted controls (**Fig. A4, D**). All repopulated regions displayed

polymegethism (greater mean coefficients of variation in cell area) and pleomorphism (loss of hexagonality).

### **Scanning Electron Microscopy**

Overall, SEM corroborated vital staining findings. Confluent polygonal cells covered the surface of centrally scraped corneas grafted with 200K, 1M or no CEC (**Fig. A5, A-C, G**). Cells were smaller and more uniformly arranged in centrally scraped non-grafted controls (**Fig. A5, G**). Interestingly, arciform patterns were noted in centrally scraped corneas grafted with 1M CEC, corresponding to areas of redundant plasma membrane at the cell periphery and suggesting the presence of cells underneath the superficial layer (**Fig. A5, B-C**). The large, irregular, stretched cells noted in the entirely scraped corneas grafted with 1M CEC (**Fig. A5, D-E**) displayed hypertrophic intercellular junctions, with abundant interdigitating cytoplasmic projections extending towards neighboring cells. Patches of disorganized fibrillar material and rare fibroblastic-like cells were seen in entirely scraped non-grafted controls (**Fig. A5, F**).

### **Light Microscopy Cross Sections**

A monolayer of cells covered the DM in centrally scraped corneas grafted with 200K CEC and in centrally scraped non-grafted corneas (**Fig. A6, A, E**). A multilayer was noted on the posterior aspect of the DM in all eyes grafted with 1M CEC and in entirely scraped non-grafted controls (**Fig. A6, B-D**). One of the corneas grafted with 200K CEC displayed a similar multilayer.

### **Transmission Electron Microscopy**

The centrally scraped corneas grafted with 200K CEC (**Fig. A7, A-D**) were repopulated by a monolayer of either attenuated endothelial cells with few intracytoplasmic organelles and no prominent endoplasmic reticulum (**Fig. A7, A-B**) or healthy appearing cells with well-defined intercellular junctions (**Fig. A7, C-D**). Some subendothelial extracellular matrix was present (asterisk). Beyond the centrally scraped area, recipient cells looked healthy and active (**Fig. A7, F**), and were well attached to the DM, without abnormal extracellular matrix. Their healthy appearance ruled out a more general toxic injury to anterior chamber structures that could have occurred at the time of surgery.

Centrally scraped corneas grafted with 1M CEC (**Fig. A7, G-I**) yielded variable results, ranging from a monolayer (**Fig. A7, G**), similar to that obtained in corneas grafted with 200K CEC, to a multilayer (**Fig. A7, H**) consisting of two to four layers of tightly packed rounded cells, connected by junctional complexes (**Fig. A7, I**) and stacked without polarity. This multilayered structure was consistent with the arciform patterns seen in SEM. The cells looked active and healthy, with a large nucleus, chromatin margination, mitochondria, lysosomes and endoplasmic reticulum in all layers. Subendothelial deposition of fibrillar material was noted.

The entirely scraped corneas injected with 1M CEC (**Fig. A7, J-L**) were covered by an abundant extracellular matrix deposited in multiple successive wavy layers and composed of disorganized fibrils (**Fig. A7, K**). Thin spindle-shaped fibroblastic-like cells, with lost polarity, were interspersed within these layers, without apparent intercellular contact (**Fig. A7, L**). Most of these cells appeared attenuated or showed signs of degeneration, such as large intracytoplasmic vacuoles and mitochondria with amplified cristae. A thin superficial layer of confluent stretched cells was noted on top of this fibrous membrane (**Fig. A7, J**), consistent with the cell sheet observed in SEM. One of the corneas grafted with 200K CEC displayed a similar fibrotic multilayer (**Fig. A7, E**).

The entirely scraped non-grafted corneas (**Fig. A7, M**) also yielded a thick multilayered membrane with scarce elongated fibroblastic-like cells. This membrane, however, was thinner and with fewer cells than after injection of 1M CEC. Endothelial cells were seen in the extreme periphery, near the limbus, which was compatible with the surgical technique used to remove the endothelium (**Fig. A7, N**).

Centrally scraped non-grafted controls displayed a regular monolayer of healthy looking cells,

with normal ultrastructure and no extracellular fibrillar accumulation (**Fig. A7, O-P**). The DM was undamaged and unremarkable in all specimens.

### **Immunofluorescence**

All specimens were positive for keratin 8/18 (**Fig. A8, column 1**), a protein normally expressed by corneal endothelial cells.<sup>160</sup> The tight-junction associated protein ZO-1 and the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha$ 1 protein were adequately expressed only in centrally scraped corneas grafted with 200K CEC and in centrally scraped non-grafted controls (**Fig. A8, columns 2-3**). Confocal microscopy confirmed that ZO-1 in these specimens, like in normal controls, was localized at the apical aspect of the lateral cell membrane. Specimens displaying a multilayered endothelium in light microscopy were positive for  $\alpha$ -SMA, type I collagen and fibronectin (**Fig. A9, rows 2-4**).  $\alpha$ -SMA and fibronectin were also expressed in one of the centrally scraped non-grafted corneas at 7 days (**Fig. A9, row 5**). DiOC expression was non-existent in grafted corneas displaying an endothelial monolayer, but present, although scant, in multilayered grafts (**Figs. A8 and A9, rows 1-3**). No DiOC was noted in scraped but non-injected corneas and normal controls (**Figs. A8 and A9, rows 4-6**).

### **Ectopic Deposition of Injected CEC**

Immediately after injection, discrete CEC deposits were observed at the slit-lamp on the recipient endothelium, just outside the scraped area (**Fig. S2, A**), but were no longer visible after the first week. Small aggregates were also noted on the anterior lens capsule in all injected eyes, progressively flattening and fading with time (**Fig. S2, B**). At one month after surgery, no such deposits were visible on the anterior lens capsule or in the trabeculum of grafted eyes in histology sections (**Fig. S2, C-D**). No deposits or membrane were noticed on the iris at the slit-lamp.

## **Discussion**

In this paper, we report on the structural and functional characteristics of a corneal endothelium reconstituted by injection of allogeneic CEC in the anterior chamber of a feline model, whose endothelial cells, like in humans, do not replicate *in vivo*.<sup>154, 192</sup>

### **Minimal Invasiveness of Cell-Injection Therapy**

Intracameral CEC-injection proved to be minimally invasive, generating only little postoperative inflammation. There were no signs of rejection. Trabecular obstruction by injected CEC, if any, was transient and negligible, with no postoperative IOP elevation, similar to what has been reported in the literature.<sup>95, 145, 146</sup> CEC deposits on other anterior chamber structures have not been described in previous studies. The deposits on the peripheral recipient endothelium faded away after one week and were not noted in TEM and immunofluorescence at one month, suggesting that they detached with time and were washed out through the trabeculum. The absence of CEC deposits on the anterior capsule in histology at one month indicates that they gradually detached as well. However, given the possibility of visual axis obstruction, these deposits require further evaluation.

### **Incomplete Functionality of the New Corneal Endothelium**

In all grafts, the performance of the new corneal endothelium was superior to that of entirely scraped non-grafted corneas, but inferior to an intact endothelium, indicating incomplete functionality.

The hypothesis that the injection of a larger number of CEC would result in better clinical outcomes was not confirmed. While 200K CEC are sufficient to repopulate a 7-mm denuded surface in controlled cell culture conditions, their adherence to the DM might be limited by factors associated with the *in vivo* environment that are more difficult to control, such as head and eye movement, intracameral aqueous flow, and low degrees of intraocular inflammation. Since injection of 200K CEC yielded an incompletely functional endothelium, we hypothesized that injecting more CEC (1M) would lead to the adherence of greater CEC numbers to the DM and, thus, better clinical and histopathological outcomes. However, results showed that centrally scraped corneas grafted with 200K CEC were clearer and thinner than those grafted with 1M

CEC. Despite signs of ultrastructural instability, their new endothelial monolayer displayed greater cell densities and expressed the function-related proteins ZO-1 and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, which were not observed in the multilayered endothelium of centrally scraped corneas grafted with 1M CEC.

Okumura and colleagues injected 200K CEC with or without ROCK inhibitor supplementation in entirely scraped rabbit and monkey eyes followed by 3-hour eyes-down positioning.<sup>95</sup> Primate corneas, which have non-replicating corneal endothelial cells similar to felines, recovered transparency, thickness and expression of functional endothelial proteins following injection of 200K ROCK inhibitor-supplemented CEC, similar to our centrally scraped corneas grafted with 200K CEC.

Given the functional endothelial monolayer reconstituted in centrally scraped non-grafted controls in our study, it appears that endothelial scraping alone without CEC injection provided its therapeutic effect through migration of peripheral recipient endothelial cells over the denuded DM. The persistent corneal oedema and the fibrotic healing response observed in entirely scraped non-grafted controls suggests however that a critical number of remaining host endothelial cells are needed to enable effective repopulation of the scraped region.

### **Contribution of Injected CEC to the New Endothelium**

Unlike previous studies where the injected CEC were similarly labeled with a fluorescent cell tracker,<sup>95, 114, 115, 145, 146, 152</sup> DiOC expression in our grafts was scarce to non-existent. Corneas grafted with 200K CEC and displaying an endothelial monolayer did not express DiOC, while multilayers of corneas grafted with 1M CEC expressed it only sparsely.

Photobleaching of the fluorescent tracker with time or its release from injected CEC could explain DiOC scarcity in our specimens. However, repopulation of the central denuded DM by recipient corneal endothelial cells from peripheral unscraped regions, with limited contribution of injected CEC is more probable.

Rho guanosine phosphatases (GTPases) and their downstream effectors, Rho-associated kinases (ROCK), play a critical role in cell motility, adhesion, and progression through the cell cycle via modulation of the intracellular cytoskeleton.<sup>264</sup> Down-regulation of this pathway with a selective ROCK inhibitor, Y-27632, has been explored *in vitro* and *in vivo* on rabbit, monkey, bovine, and human CEC.<sup>95, 256-258, 279-283</sup> Its effects included enhancement of cell adhesion to

substrate, migration, proliferation, and wound healing, as well as suppression of apoptosis. Okumura and colleagues showed that ROCK inhibitor supplementation for CEC-injection therapy in the primate aids the recovery of a more functional new endothelium.<sup>95</sup> However, since the contribution of injected CEC to the new endothelium in the primate is unknown, it is unclear whether the ROCK inhibitor treatment effect was mediated through increased adherence of injected CEC, stimulated migration of peripheral recipient endothelial cells, or both.

### **Fibrotic Healing Response**

Multilayering of the endothelium was noted in corneas grafted with 1M CEC, in one of the centrally scraped corneas grafted with 200K CEC, and in entirely scraped controls. It coincided with the expression of type I collagen, fibronectin and  $\alpha$ -SMA, suggesting transition to a myofibroblastic phenotype. Mesenchymally transited CEC have been shown to secrete type I collagen, instead of normally produced basement membrane type IV collagen,<sup>165, 167</sup> and fibronectin.<sup>167, 169, 170</sup> Alpha-SMA is also a marker of mesenchymal transition<sup>164, 171</sup> and its presence has been attributed to pathologic healing states, such as pseudophakic bullous keratopathy in human,<sup>168</sup> after alkali injury in rabbit corneas,<sup>166</sup> or after transcorneal freezing in the feline.<sup>169</sup> Importantly, our preoperative assessment showed that injected CEC did not express  $\alpha$ -SMA and displayed normal morphology, reducing the possibility of transplanting already mesenchymally transited cells. It should be emphasized that cross-sectional histopathology assessment of the new endothelium is essential to document multilayering or formation of a retrocorneal fibrous membrane.

Corneal endothelial multilayering in association with myofibroblastic transformation, loss of cell-to-cell connectivity and increased proliferation has been reported during wound healing after transcorneal freezing in the rabbit and feline models.<sup>154, 165, 167, 169, 319</sup> This healing mechanism was opposed to that following endothelial scraping injuries of less than 4 mm, which involved preservation of endothelial differentiation and cell-to-cell junctions.<sup>165, 210, 213, 317, 320</sup> In our study, after scraping over a 7 mm-diameter with no CEC injection, the recipient endothelial cells spread and enlarged to cover the deficit, resulting in a confluent monolayer with preservation of endothelial differentiation and cell-to-cell junctions, similar to that reported in the literature following smaller scrape injuries.<sup>165, 210, 213, 317, 320</sup> On the other hand, healing of 18 mm-diameter



injuries, with or without CEC injection, induced a fibrotic response resembling that triggered by transcorneal freezing. These results are consistent with the literature in suggesting that endothelial wound healing is influenced by the size and nature of the damage, a variable that should be kept in mind when investigating wound healing after CEC injection.

The fibroblastic-like cells interspersed within the retrocorneal fibrous membrane observed in our entirely scraped corneas could have originated from different sources. Stromal keratocyte downgrowth through breaks in the DM<sup>261-263</sup> is unlikely, since special care was taken to leave the DM intact at the time of surgery, with confirmation of its integrity by TEM. Significant contribution of circulating inflammatory cells<sup>262, 319</sup> is also unlikely, since anterior chamber inflammation was minimal. The improbable implication of stromal and inflammatory cells is further supported by the expression of the corneal endothelial marker K8/18 in all specimens with fibrous multilayering, pointing towards corneal endothelial cells as the most plausible source. Retrocorneal fibrous membranes composed of mesenchymally transited fibroblastic-like endothelial cells and similar to the membranes noted herein have been previously described.<sup>165, 167, 169, 212, 319, 321, 322</sup> In this study, since they formed in scraped corneas both injected or not with CEC, host corneal endothelial cells having migrated from the far periphery were likely the main source, although donor CEC contribution to the fibrotic reaction cannot be excluded.

In conclusion, allogeneic CEC-injection therapy with ROCK inhibitor supplementation and eyes-down positioning in the feline reconstituted an incompletely functional corneal endothelium. The new endothelium in corneas grafted with 200K CEC displayed superior functionality and anatomical integrity to that of corneas grafted with 1M CEC, but remained inferior to normal controls. DiOC scarcity in all grafted corneas suggested a limited contribution of injected CEC to the new endothelium, reconstituted mainly by migration of remaining recipient cells. Endothelial scraping without CEC-injection allowed the reconstitution of the healthiest endothelium, provided that sufficient peripheral host endothelial cells were left intact. These findings question the utility of CEC-injection therapy for the treatment of endothelial deficiency. Given the recently reported promising outcomes with ROCK inhibitor eye drops in the rabbit model,<sup>252</sup> it is possible that scraping and ROCK inhibitor treatment alone is sufficient to reconstitute a functional endothelium through a wound healing-stimulating mechanism.

Further studies investigating the therapeutic effect of ROCK inhibitor without CEC-injection on the healing of an endothelial deficit are warranted in order to validate these conclusions.

## **Acknowledgements**

**The authors wish to thank:** Myriam Bareille, Xinling Liu, Steve Breault, André Deveault, Benjamin Goyer, Angèle Halley, Delphine Mathieu, Catherine Mauger-Labelle, Natalie Tessier, Nour Haydari, Marie-Claude Perron, Eugen Lungu, Caroline Audet, Jeanne d'Arc Uwamaliya, Élodie Samson, as well as the LOEX histology and the IBIS electron microscopy research assistants for their technical and/or intellectual support.

**Table A1.** Endothelial cell counts and morphology.

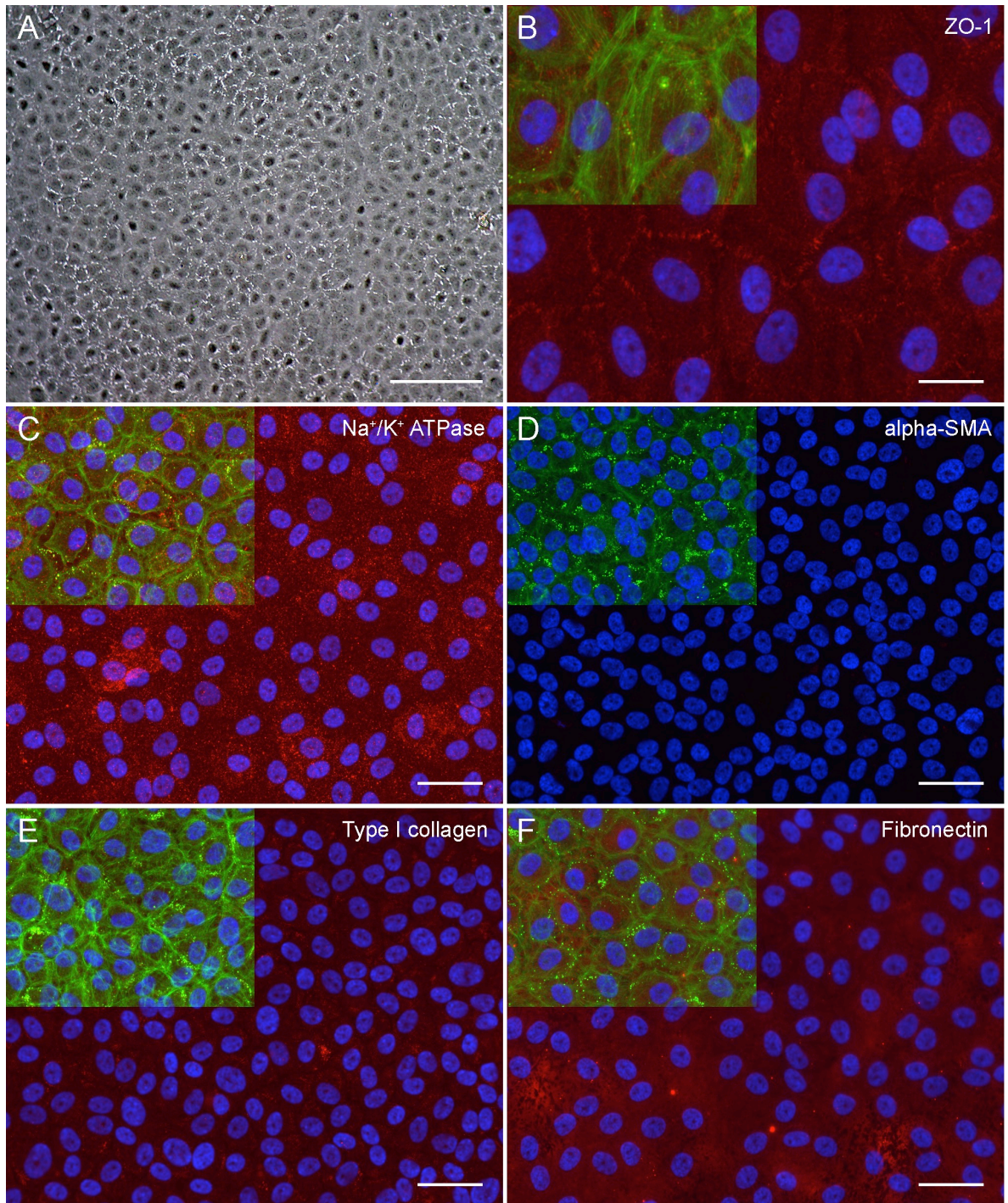
	<b>7 mm - 200K CEC</b>	<b>7 mm - 1M CEC</b>	<b>18 mm - 1M CEC</b>	<b>18 mm - No CEC</b>	<b>7 mm - No CEC</b>	<b>Non-operated Controls</b>
	<b>(n=4)</b>	<b>(n=4)</b>	<b>(n=2)</b>	<b>(n=2)</b>	<b>(n=2)</b>	<b>(n=12)</b>
Cell count, cells/mm <sup>2</sup>	1015 (673, 1295)	715 (511, 870)	681 (462, 900)	0 (0, 0)	1113 (785, 1442)	3271 (2321, 3986)
Cell area, μm <sup>2</sup>	1059 (774, 1487)	1479 (1389, 1164)	1718 (1271, 2165)	N/A	985 (695, 1275)	312 (251, 431)
CV of cell area	48 (42, 53)	48 (36, 60)	45 (43, 47)	N/A	46 (36, 55)	23 (18, 29)
6-sided cells, %	47 (46, 50)	44 (37, 47)	45 (35, 55)	N/A	47 (42, 52)	70 (60, 76)

\*Average (min, max) are reported. CV, coefficient of variation. N/A, not applicable.

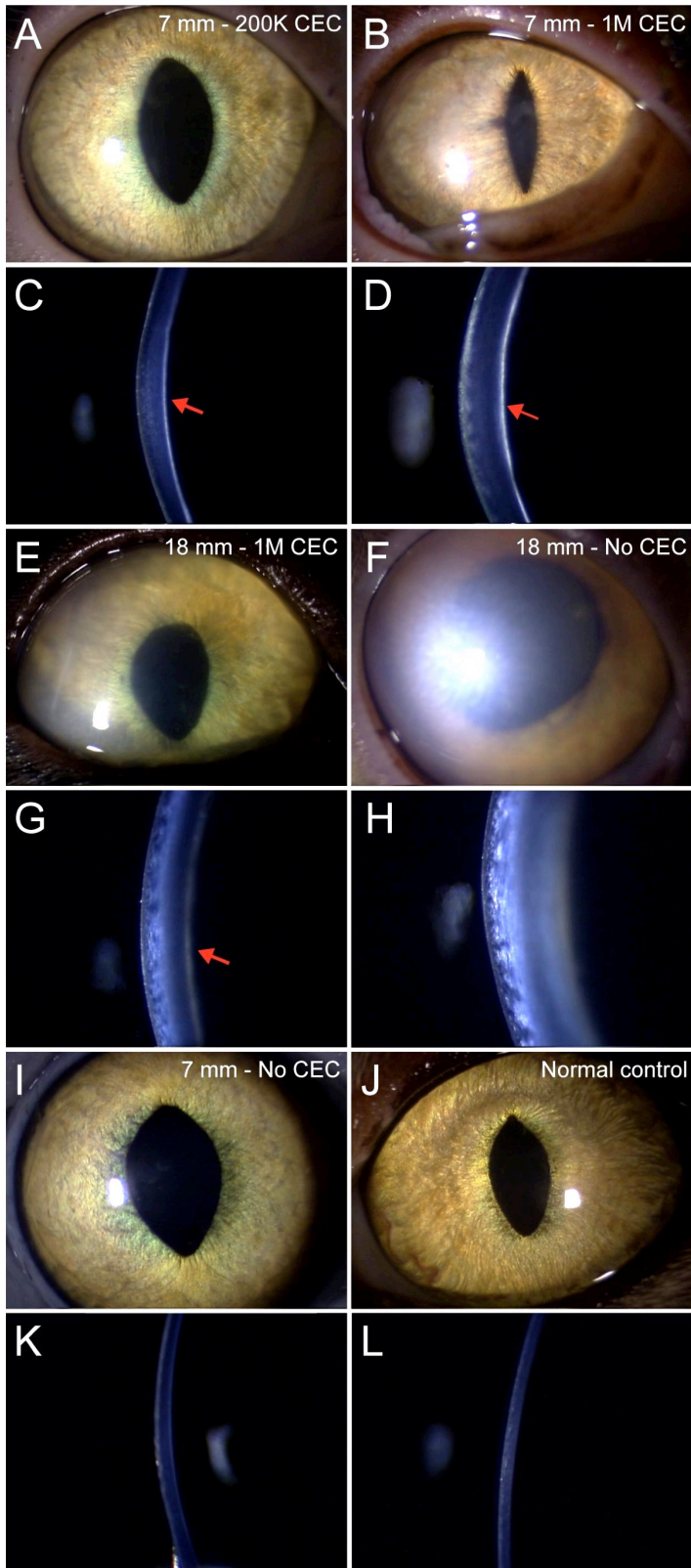
**Table S1.** Experimental design.

<b>Cornea</b>	<b>Scraped diameter (mm)</b>	<b>Injected CEC (in 0.2 mL)</b>	<b>ROCK i concentration (<math>\mu</math>M)</b>	<b>CEC population</b>	<b>Passage at grafting</b>	<b>DiOC labeling</b>	<b>Follow-up (days)</b>
1	7	0	100	N/A	N/A	N/A	0
2	7	0	100	N/A	N/A	N/A	7
3	7	0	100	N/A	N/A	N/A	30
4	7	200K	100	C	P2	Adhered	30
5	7	200K	100	C	P2	Adhered	30
6	7	200K	350	D	P3	Suspension	30
7	7	200K	350	D	P3	Suspension	30
8	7	1M	100	A	P2	No labeling	16
9	7	1M	100	B	P3	Suspension	30
10	7	1M	100	B	P2	Adhered	30
11	7	1M	100	B	P3	Adhered	30
12	18	0	100	N/A	N/A	N/A	0
13	18	0	100	N/A	N/A	N/A	30
14	18	0	100	N/A	N/A	N/A	30
15	18	1M	100	D	P3	Suspension	30
16	18	1M	100	D	P3	Suspension	30

\* N/A, not applicable.

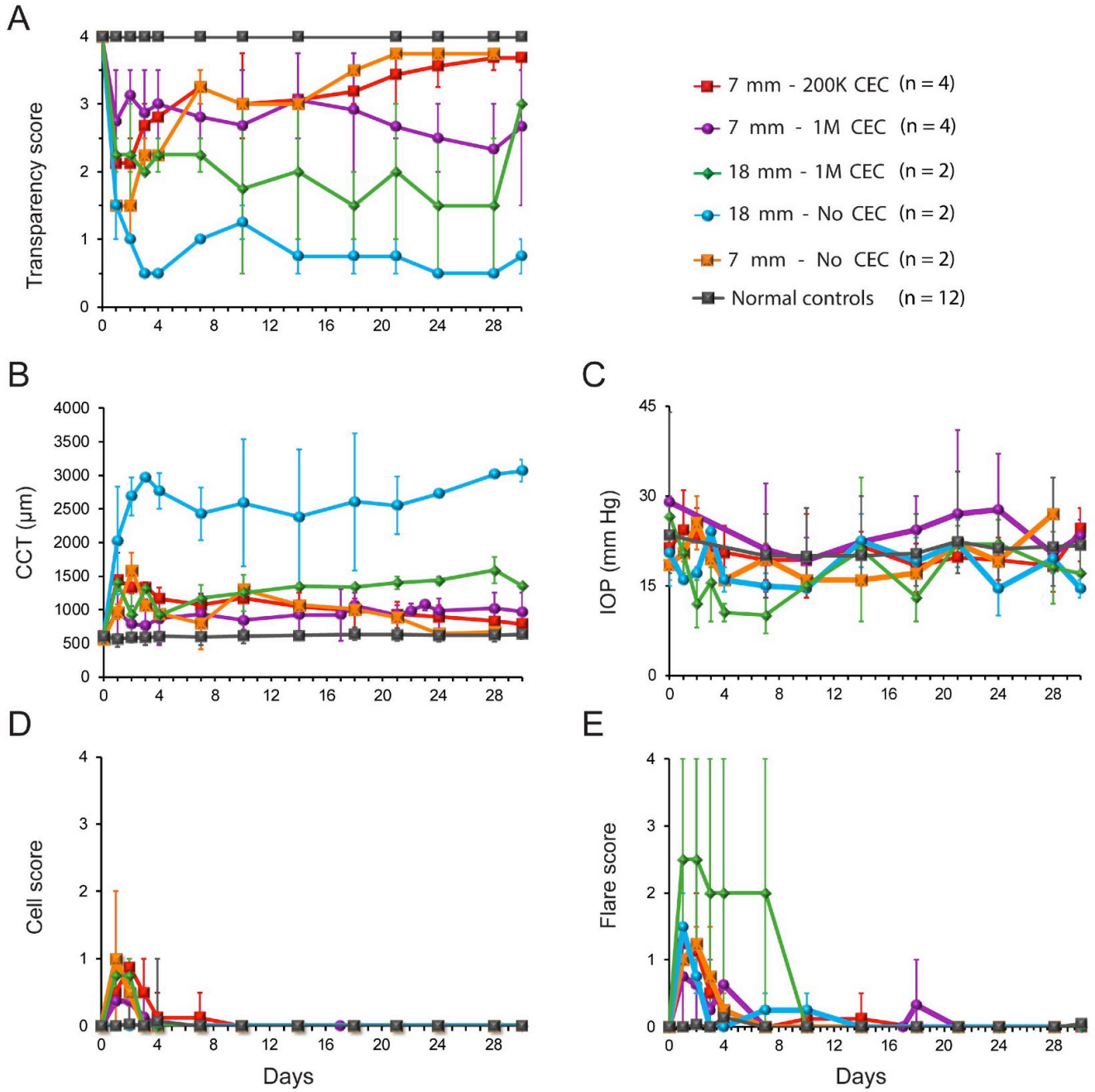


**Figure A1.** Corneal endothelial cells prior to grafting. (A) Cultured CEC at P2. **B-F)** Immunofluorescence directed against ZO-1, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, α-SMA, type I collagen or fibronectin (red) with Hoechst (blue) and phalloidin staining (green). Scale bars: 200 μm (A); 10 μm (B); 20 μm (C-F).



**Figure A2.** Operated eyes one month after surgery.

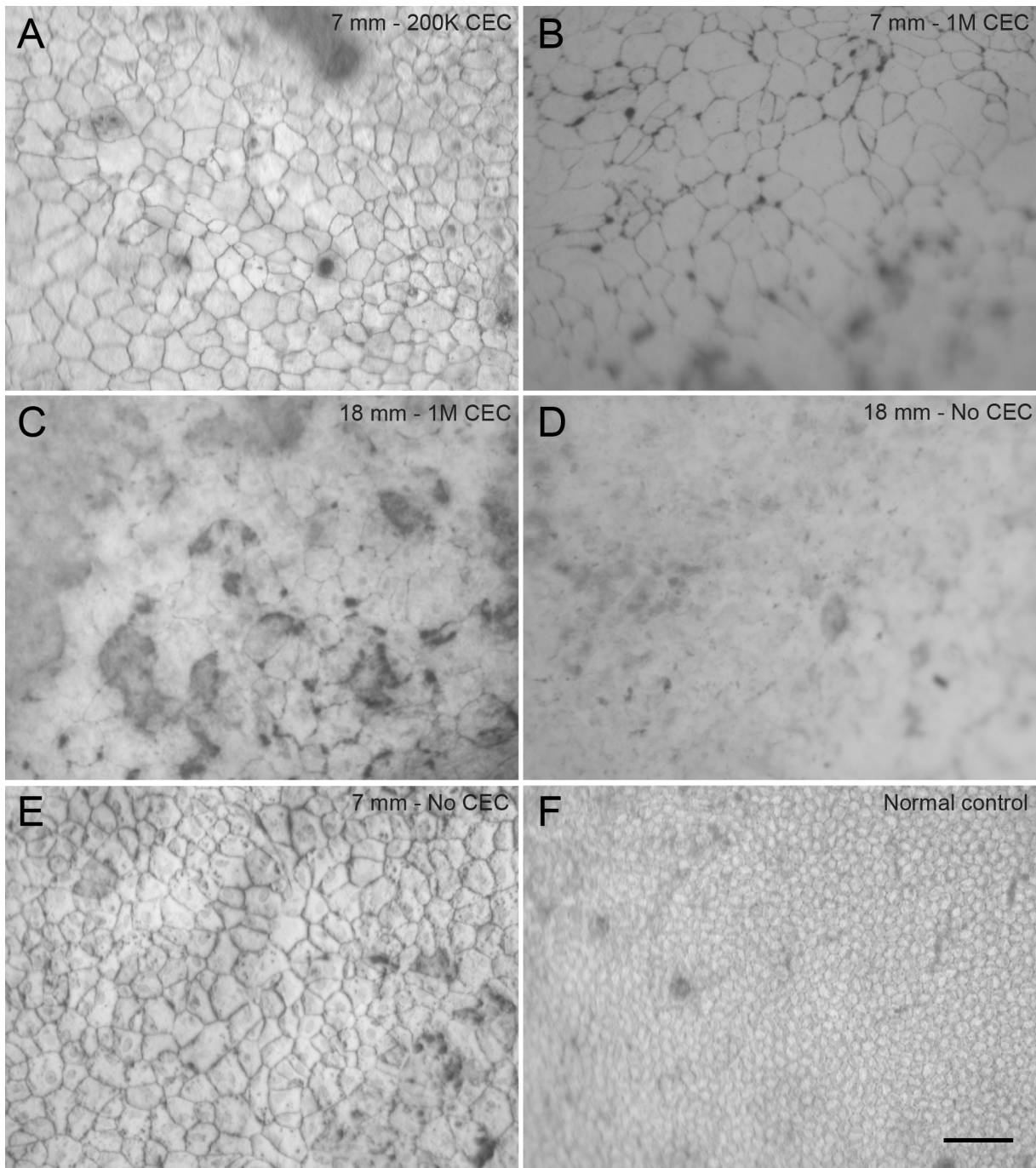
(A, C) Centrally scraped cornea grafted with 200K CEC. (B, D) Centrally scraped cornea grafted with 1M CEC. (E, G) Entirely scraped cornea grafted with 1M CEC. A condensed, highly reflective layer is visible at the posterior aspect of all grafts (*arrows*). (F, H) Non-grafted entirely scraped cornea. Considerable stromal and sub-epithelial oedema can be noted. (I, K) Non-grafted centrally scraped cornea. (J, L) Normal non-operated control.



**Figure A3.** Clinical evolution of the operated eyes.

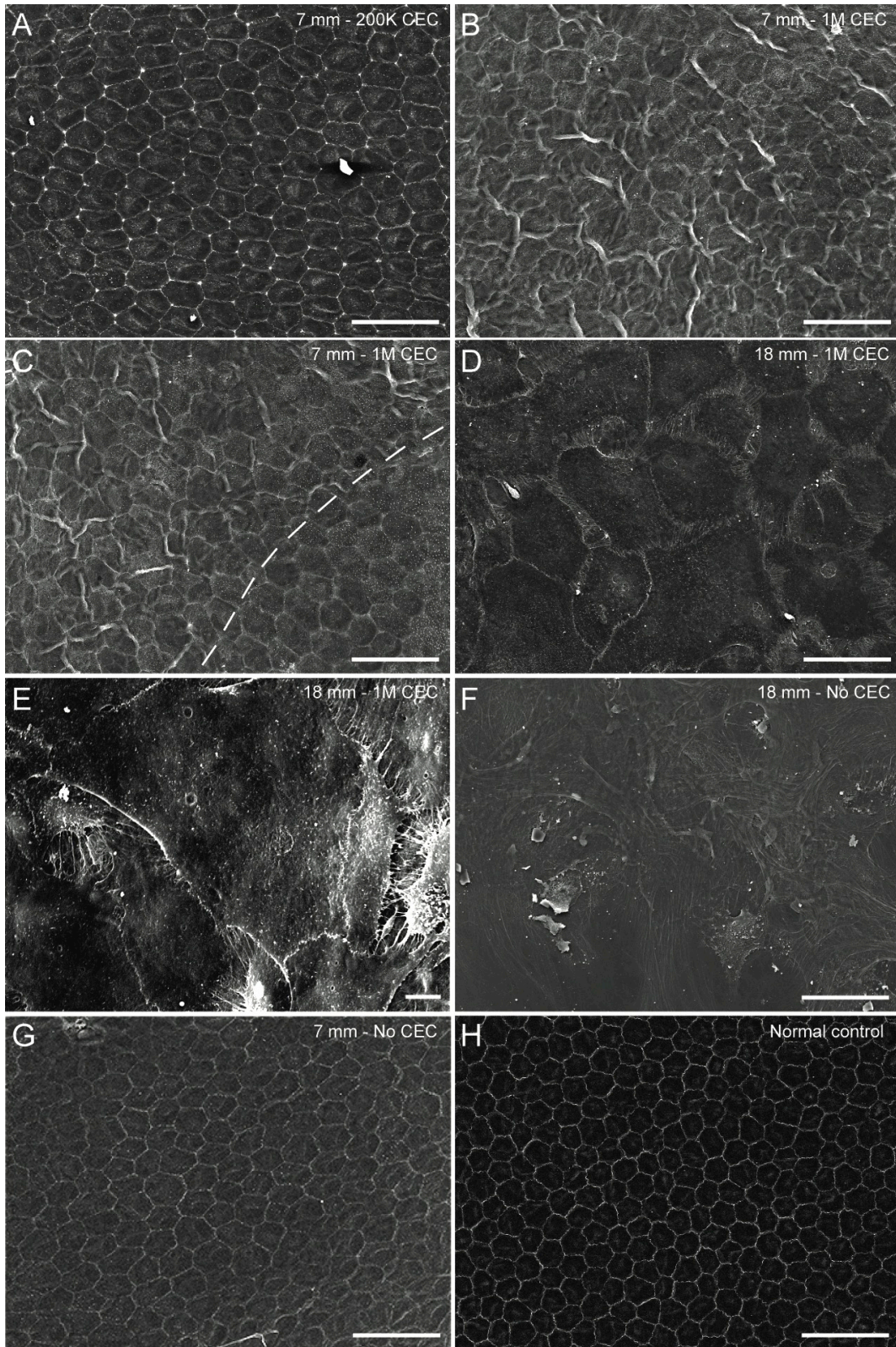
(A) Transparency score. (B) Central corneal thickness. (C) Intraocular pressure. (D) Anterior chamber inflammatory cell score. (E) Anterior chamber flare score. Minimum and maximum values around means are presented.





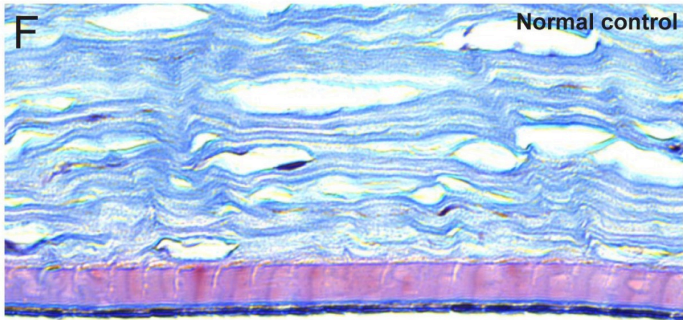
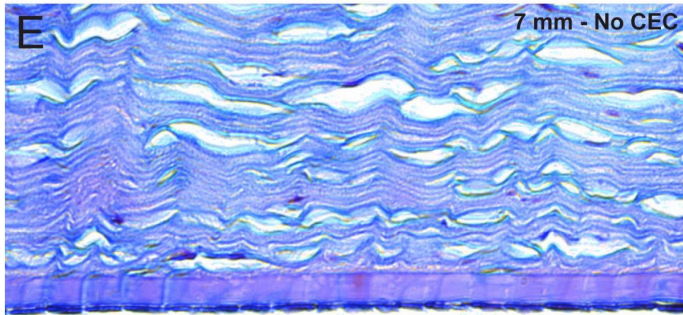
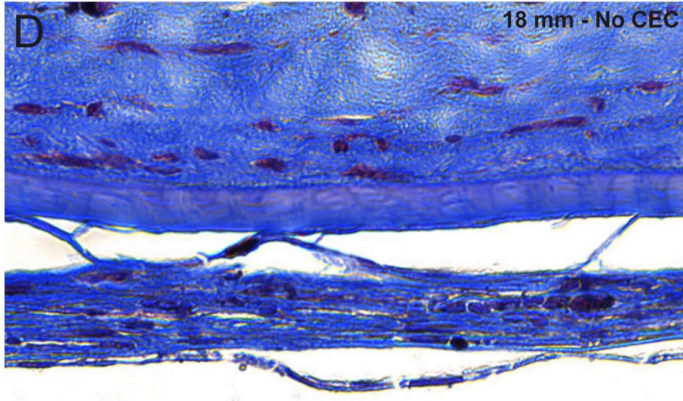
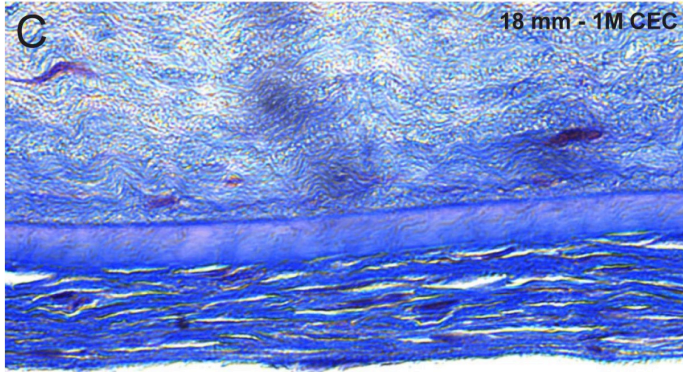
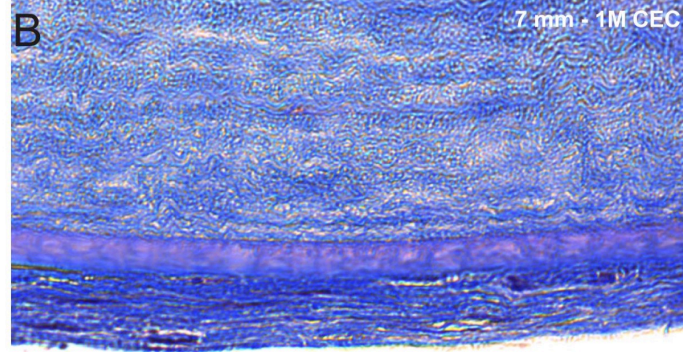
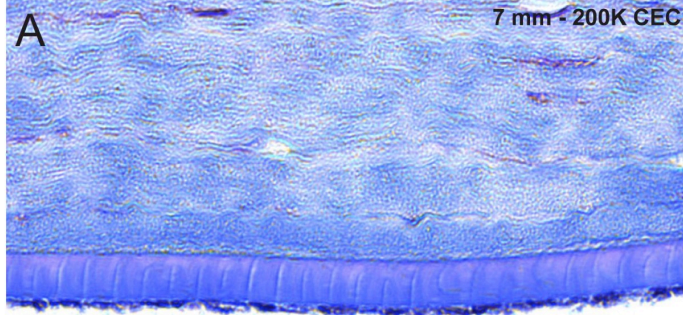
**Figure A4.** Alizarin red and trypan blue vital staining.

**(A)** Centrally scraped cornea grafted with 200K CEC. **(B)** Centrally scraped cornea grafted with 1M CEC. **(C)** Entirely scraped cornea grafted with 1M CEC. **(D)** Non-grafted entirely scraped cornea. **(E)** Non-grafted centrally scraped cornea. **(F)** Normal non-operated control. *Scale bar:* 100  $\mu$ m.



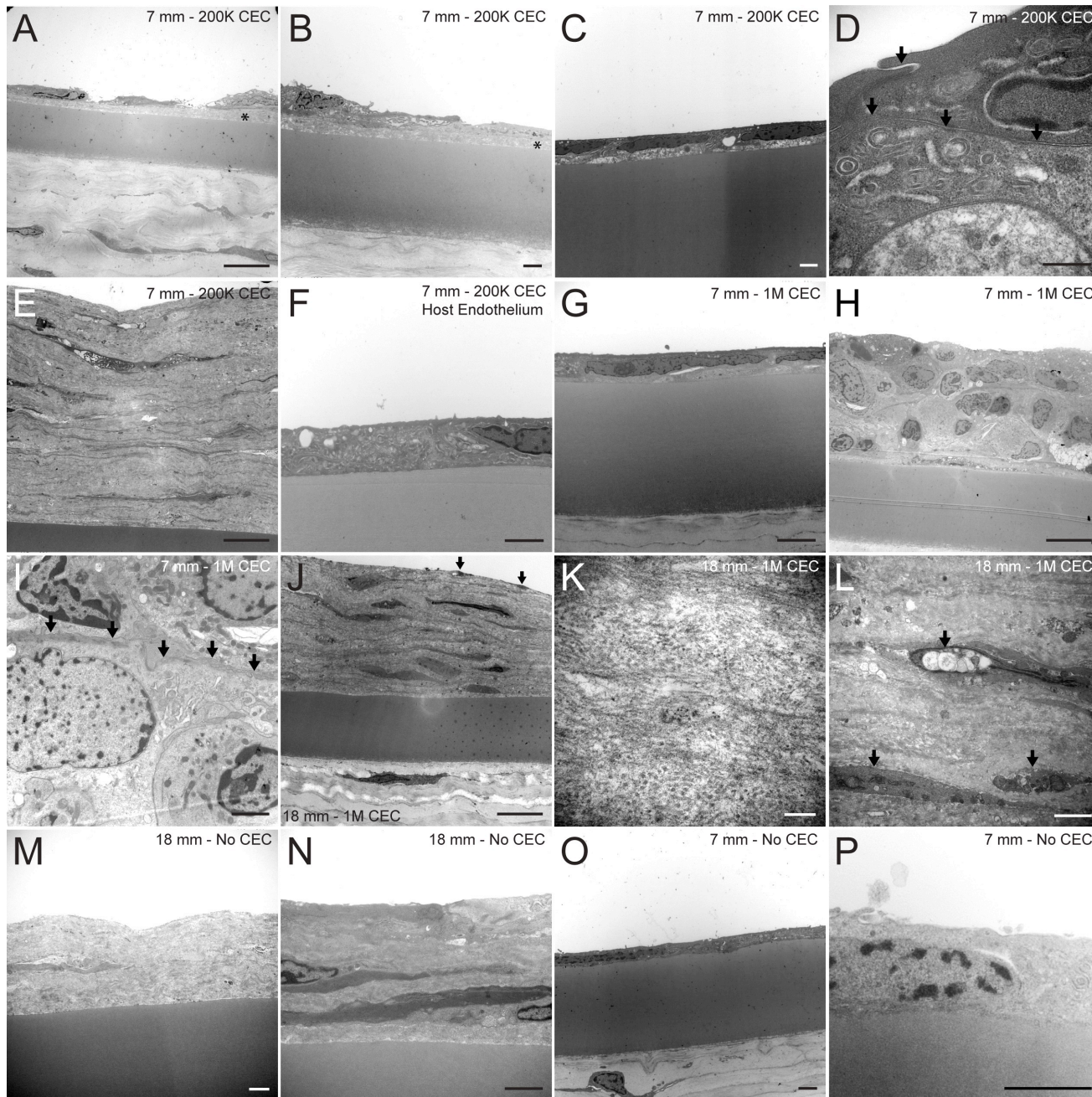
**Figure A5.** Scanning electron microscopy results.

**(A)** Centrally scraped cornea grafted with 200K CEC. **(B-C)** Centrally scraped cornea grafted with 1M CEC. Arciform patterns suggesting overlapping cells are visible in the central region **(B)**, but disappear beyond the junction with the recipient endothelium (*dashed line*) **(C)**. **(D-E)** Entirely scraped cornea grafted with 1M CEC. Hypertrophic junctions **(D)** with abundant cytoplasmic projections **(E)** between large, irregularly shaped cells are visible. **(F)** Non-grafted entirely scraped cornea. **(G)** Non-grafted centrally scraped cornea. **(H)** Normal non-operated control. *Scale bars:* 10  $\mu\text{m}$ .



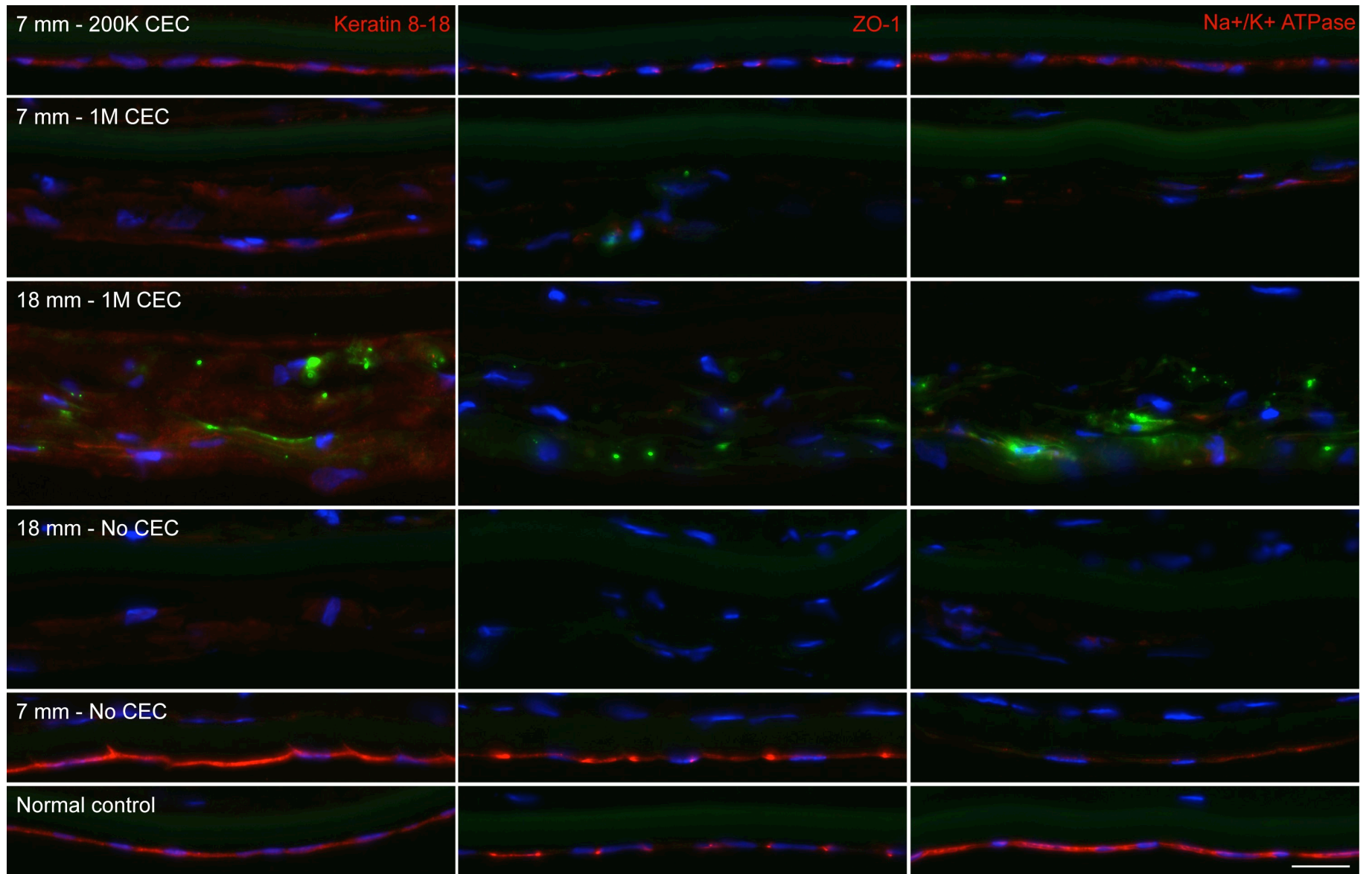
**Figure A6.** Histology results.

**(A)** Centrally scraped cornea grafted with 200K CEC. **(B)** Centrally scraped cornea grafted with 1M CEC. **(C)** Entirely scraped cornea grafted with 1M CEC. **(D)** Non-grafted entirely scraped cornea. **(E)** Non-grafted centrally scraped cornea. **(F)** Normal non-operated control. (A, E, F) The DM is covered by a cellular monolayer. (B-D) A multilayered membrane is present on the posterior aspect of the DM. *Scale bar:* 10  $\mu\text{m}$ .



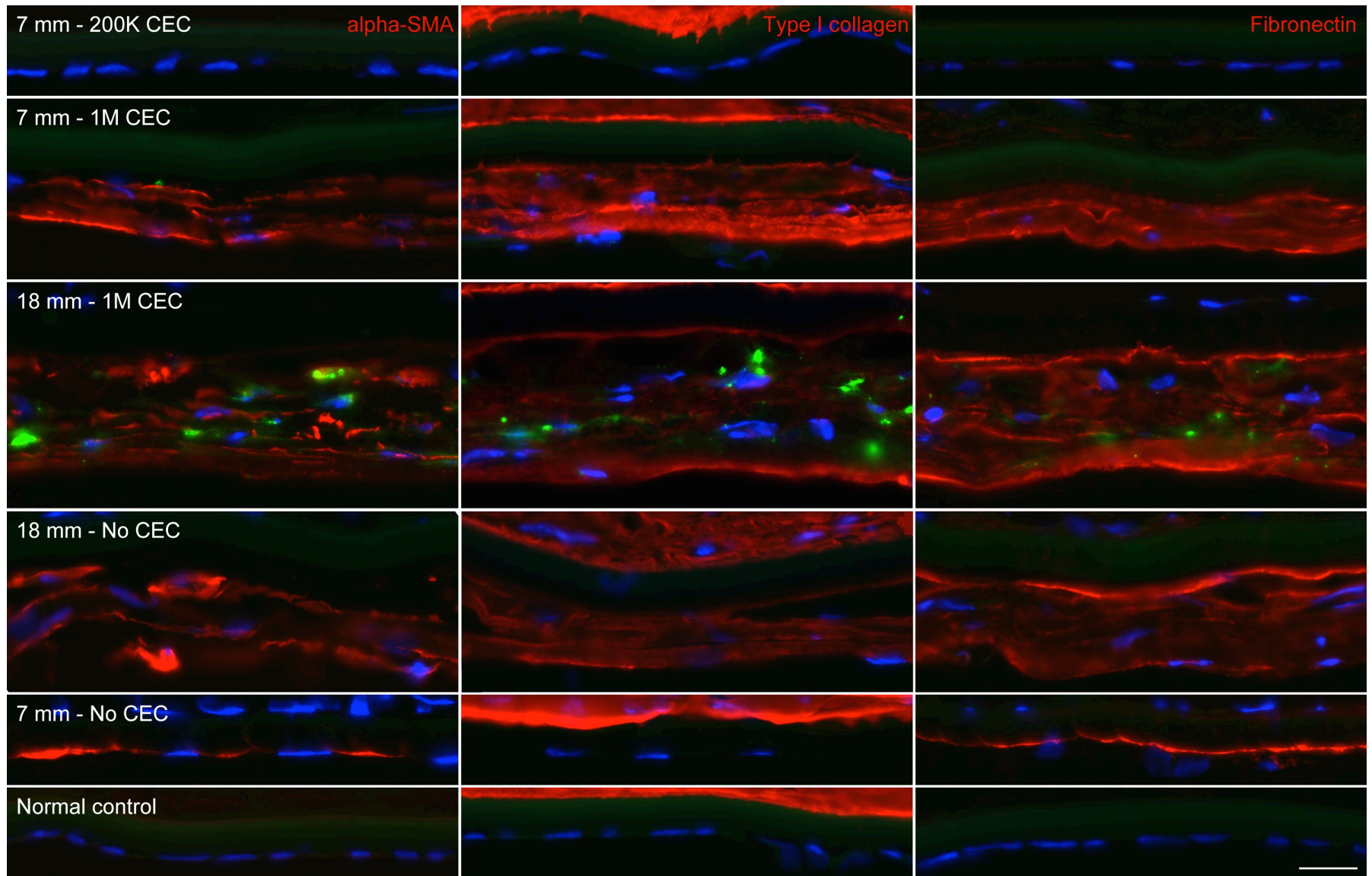
**Figure A7.** Transmission electron microscopy results.

**(A-F)** Centrally scraped cornea transplanted with 200K CEC. **(A-B)** Attenuated endothelial monolayer, with no intercellular junctions, separated from the DM by subendothelial fibrillar material (*asterisk*). **(C)** Healthy-appearing endothelial monolayer with. **(D)** well defined intercellular junctions (*arrows*). **(E)** Multilayered fibrotic endothelium in one of the centrally scraped corneas grafted with 200K CEC. **(F)** Normal peripheral host endothelium. **(G-I)** Centrally scraped cornea grafted with 1M CEC. Variable endothelial thickness was noted, ranging from a monolayer **(G)** to a multilayer **(H)**. **(I)** Interdigitations between cells stacked in multilayers (*arrows*). **(J, K, L)** Entirely scraped cornea transplanted with 1M CEC. **(J)** Fibroblastic-like cells interspersed within an abundant extracellular matrix and superficial layer of attenuated cells on top (*arrows*). **(K)** Fibrils are perpendicular and parallel to DM. **(L)** Cells show signs of degeneration (*arrows*). **(M, N)** Entirely scraped non-grafted cornea. **(M)** Abundant fibrotic extracellular matrix in the scraped region. **(N)** Remaining recipient cells in the far periphery near the angle. **(O, P)** Centrally scraped non-grafted cornea with a normal endothelial monolayer. *Scale bars:* 10  $\mu\text{m}$  (A, E H, J); 2  $\mu\text{m}$  (B, C, F, G, I, L-P); 0.5  $\mu\text{m}$  (D); 0.1  $\mu\text{m}$  (K).



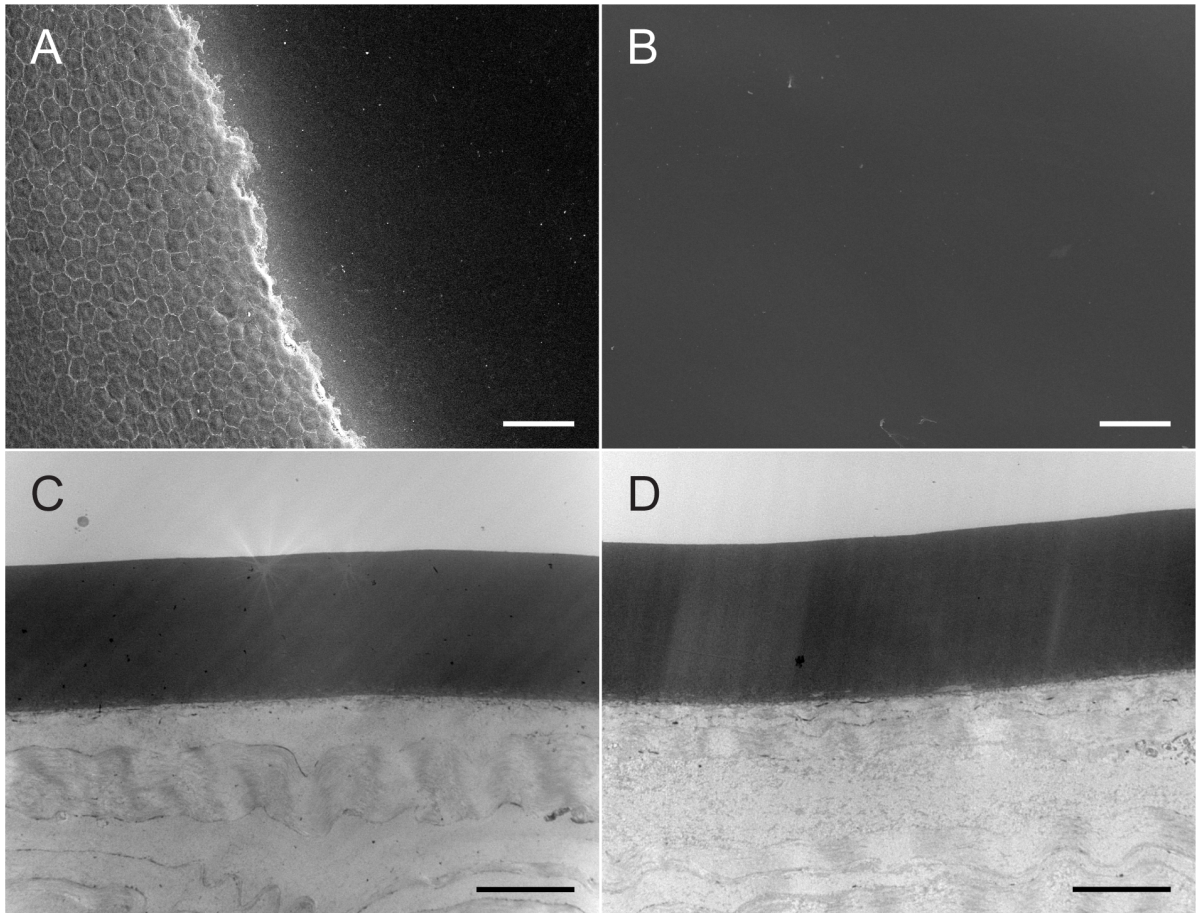


**Figure A8.** Immunofluorescence staining (red) of endothelial cell marker keratin 8/18 (column 1) and functional proteins zonula occludens-1 (column 2) and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha$ 1 (column 3). **(Row 1)** Centrally scraped cornea grafted with 200K CEC. **(Row 2)** Centrally scraped cornea grafted with 1M CEC. **(Row 3)** Entirely scraped cornea grafted with 1M CEC. **(Row 4)** Non-grafted entirely scraped cornea. **(Row 5)** Non-grafted centrally scraped cornea. **(Row 6)** Normal non-operated control. Cell nuclei counterstaining with Hoescht (blue). DiOC labelling (green). *Scale bar:* 10  $\mu$ m.



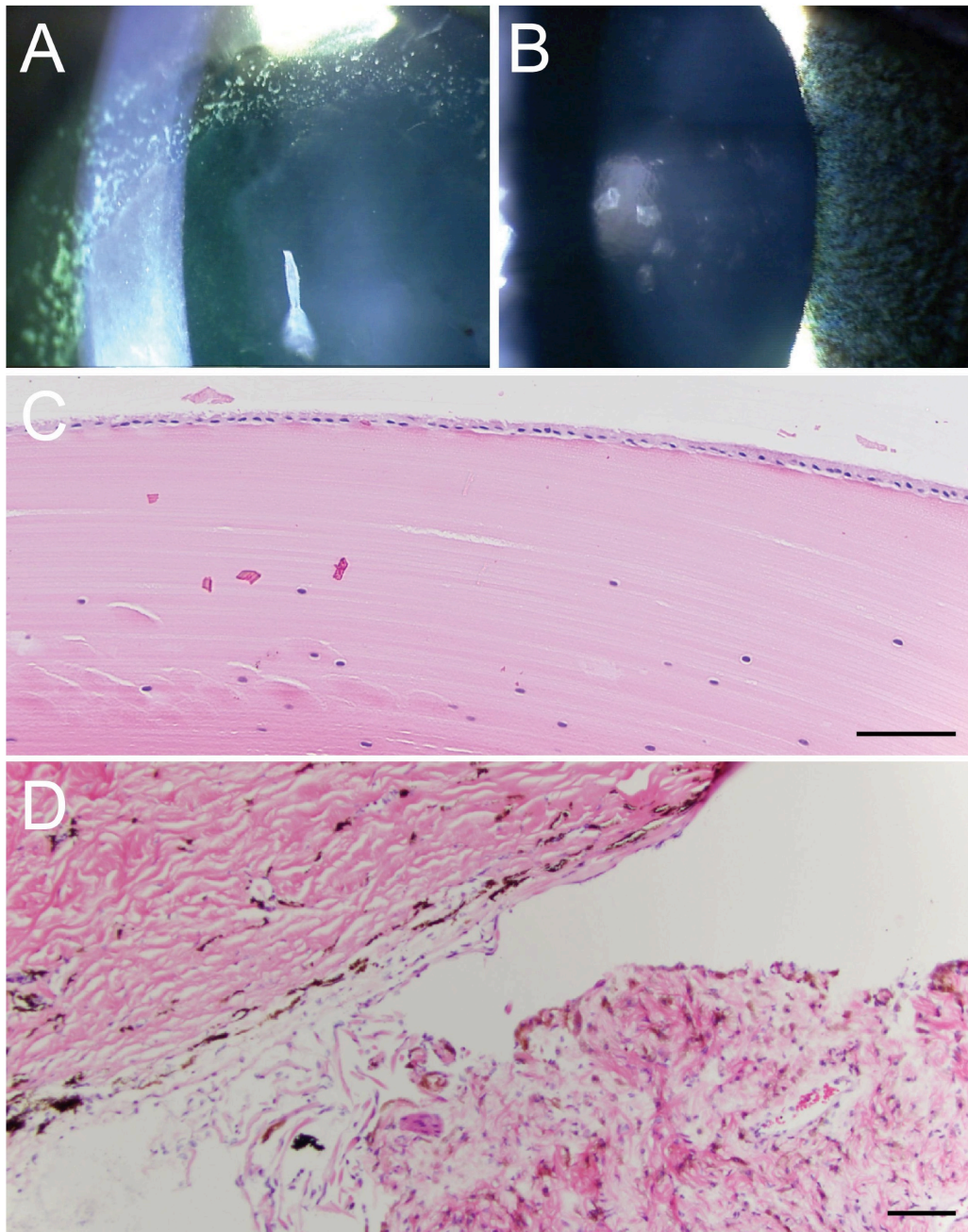
**Figure A9.** Immunofluorescence staining (red) of  $\alpha$ -smooth muscle actin (column 1), type I collagen (column 2) and fibronectin (column 3).

**(Row 1)** Centrally scraped cornea grafted with 200K CEC and 100  $\mu$ M ROCKi. **(Row 2)** Centrally scraped cornea grafted with 1M CEC and 100  $\mu$ M ROCKi. **(Row 3)** Entirely scraped cornea grafted with 1M CEC. **(Row 4)** Non-grafted entirely scraped cornea. **(Row 5)** Non-grafted centrally scraped cornea. **(Row 6)** Normal non-operated control. Cell nuclei counterstaining with Hoescht (blue). DiOC labelling (green). *Scale bar:* 10  $\mu$ m.



**Figure S1.** Scanning (A, B) and transmission electron microscopy (C, D) of scraped non-grafted controls immediately after the 3-hour-eyes-down positioning period.

(A) Junction between the denuded Descemet's membrane and the peripheral endothelium in a centrally scraped cornea. (B, C) No cells remained in the central regions of centrally and entirely scraped corneas. (D) No cells were observed in the peripheral region of the entirely scraped cornea. *Scale bar:* 50  $\mu\text{m}$  (A, B); 10  $\mu\text{m}$  (C, D).



**Figure S2.** Ectopic deposition of injected corneal endothelial cells.

The discrete deposits on the recipient endothelium, just outside the junction with the graft (**A**) gradually detached and were not visible after the first week following surgery. CEC deposits on the anterior lens capsule (**B**) flattened and faded with time, and were not seen in histology at one month after surgery (**C**). No CEC were observed in histology sections of the trabeculum of injected eyes at one month (**D**). *Scale bars:* 100  $\mu\text{m}$  (C); 500  $\mu\text{m}$  (D).

**PARTIE IV –DISCUSSION GÉNÉRALE,  
PERSPECTIVES ET CONCLUSION**

## 1. Discussion générale

Étant données les limitations de l'allo-transplantation traditionnelle pour le traitement de la décompensation endothéliale irréversible, dont l'attrition postopératoire des cellules endothéliales du donneur, le risque de rejet immunologique et la pénurie mondiale en tissus cornéens, la recherche d'alternatives à cette approche est impérative. Grâce à la capacité des CEC humaines à proliférer sous stimulation *in vitro*, la transplantation de CEC amplifiées en culture est maintenant possible.<sup>83</sup> Les monocouches endothéliales reconstruites avec des CEC cultivées sur des supports sont fragiles ou difficilement intégrables dans la cornée du receveur, ou requièrent quand même des tissus cornéens donneurs dont la disponibilité est limitée.<sup>80</sup> L'injection intracamérale de CEC éliminerait le besoin en un support et donc, en tissus donneurs, tout en offrant les mêmes avantages que les greffons reconstruits par génie tissulaire. Dans cette étude, nous avons entrepris d'évaluer les caractéristiques structurales et fonctionnelles d'un endothélium cornéen reconstitué par injection de CEC allogéniques dans la chambre antérieure d'un modèle félin de déficience endothéliale.

### **Modèle animal**

Le modèle félin est adéquat pour l'étude d'un endothélium reconstitué à partir de CEC cultivées, car ses cellules endothéliales, comme chez l'humain, ne se divisent pas *in vivo*.<sup>154, 192</sup> Ainsi, les résultats et conclusions tirés de cette étude se rapprochent plus de la réalité clinique que ceux d'études sur des modèles tels le lapin, dont le potentiel endothélial régénératif *in vivo* est bien documenté.<sup>154, 155</sup>

### **L'innocuité locale de la thérapie par injection cellulaire**

L'injection intracamérale de CEC a été minimalement invasive et n'a engendré que très peu d'inflammation postopératoire lorsque comparée avec les techniques de greffe cornéenne traditionnelles. Il n'y a pas eu de signes de rejet pendant le suivi, tels des précipités kératiques ou des lignes de Khodadoust, similairement aux études antérieures.<sup>95, 114, 115, 145, 146, 148, 152, 153, 313</sup> Mimura et collègues n'ont d'ailleurs pas noté d'épisode de rejet immunologique pendant le suivi d'une durée de un an suite à l'injection de CEC

allogéniques chargées de particules de fer chez un modèle lapin.<sup>146</sup> Il est possible que l'immunogénicité d'un endothélium transplanté par injection intracamérale de CEC sans autres couches cornéennes et sans biomatériaux soit moindre que celle des allo-greffes traditionnelles et des greffons reconstruits par génie tissulaire. Par contre, des épisodes de rejet peuvent survenir même plusieurs années après une DSAEK ou une KP.<sup>323, 324</sup> Le risque de rejet immunologique à plus long terme avec l'injection intracamérale de CEC n'est donc pas exclu.

Aucune étude précédente portant sur la thérapie par injection cellulaire n'a rapporté de dépôts ectopiques de CEC dans la chambre antérieure.<sup>95, 114, 115, 145, 146, 148, 152, 153, 313</sup> Dans la présente étude, nous avons noté des dépôts de CEC sur l'endothélium receveur à l'extérieur de la zone désendothélialisée. Les dépôts sur le receveur sont disparus après une semaine et n'ont pas été identifiés à la MET ni en immunofluorescence à un mois, suggérant ainsi que les cellules se sont détachées avec le temps et ont été éliminées à travers le trabéculum. L'absence de dépôts de CEC sur la capsule antérieure du cristallin en histologie indique qu'elles se sont aussi graduellement détachées. Malgré leur disparition avec le temps, il est possible que l'axe visuel soit obstrué, du moins transitoirement, si les CEC se déposent sur le cristallin centralement.

Une seule étude d'injection intracamérale de CEC a rapporté la présence de CEC injectées dans l'angle irido-cornéen inférieur; les chercheurs n'avaient pas noté de répercussion sur la TIO, par contre.<sup>152</sup> Nous n'avons pas identifié de CEC dans l'angle irido-cornéen de nos sujets en histologie. L'obstruction trabéculaire, si présente, était transitoire et négligeable, sans élévation postopératoire de la TIO, similairement aux études précédentes.<sup>95, 145, 146</sup>

### **Fonctionnalité incomplète du nouvel endothélium cornéen**

L'objectif primaire de notre étude était d'évaluer la performance clinique, l'intégrité structurelle et le phénotype fonctionnel du nouvel endothélium. Dans toutes les greffes, la performance de celui-ci a été supérieure à celui des contrôles entièrement désendothérialisés et non-greffés, mais inférieure à un endothélium intact, suggérant une fonctionnalité incomplète.



Dans nos expériences préliminaires, l'ensemencement *in vitro* de  $2 \times 10^5$  ou de  $1 \times 10^6$  CEC cultivées sur la DM dénudée des cornées devitalisées a permis de former une monocouche endothéliale hypercellulaire exprimant des protéines de fonction endothéliale (**Figs. 17 et 18**). Suite à l'injection de  $2 \times 10^5$  CEC dans la chambre antérieure d'yeux de lapin *ex vivo*, des CEC ont été visualisées sur la DM dénudée centralement immédiatement à la fin de la période de 3 heures cornée-vers-le-bas à une densité moyenne (min, max) de 1790 (1211, 2095) cellules/mm<sup>2</sup>, démontrant qu'elles y avaient adhéré (**Fig. 16**). Alors que  $2 \times 10^5$  et  $1 \times 10^6$  CEC suffisent pour repeupler une surface dénudée de 7 et 18 mm, respectivement, dans des conditions de culture cellulaire et même dans des conditions *ex vivo*, leur adhérence à la DM pourrait être limitée par des facteurs liés à l'environnement *in vivo* qui sont plus difficiles à contrôler. Ces facteurs incluent, sans s'y limiter, les mouvements de la tête et des yeux, la circulation de l'humeur aqueuse dans la chambre antérieure, de légers niveaux d'inflammation intraoculaire et des facteurs de croissance endogènes pouvant affecter la survie ou le comportement des CEC injectées. Même si les CEC injectées sont adhérentes à la DM à la fin des 3 heures de positionnement cornée-vers-le-bas, tel que suggéré par nos expériences *ex vivo*, il est possible que ces facteurs *in vivo* contribuent à leur détachement ultérieur.

Considérant que l'injection de  $2 \times 10^5$  CEC n'a produit qu'un endothélium partiellement fonctionnel suite à une désendothélialisation sur 7 mm, nous avons émis l'hypothèse que l'injection de plus de CEC ( $1 \times 10^6$ ) permettrait de contourner les obstacles *in vivo* et mènerait à l'adhésion d'un plus grand nombre de CEC à la DM et à de meilleurs résultats. Toutefois, les cornées désendothélialisées centralement et greffées avec  $2 \times 10^5$  CEC étaient plus claires et minces que celles greffées avec  $1 \times 10^6$  CEC. Malgré les signes d'instabilité ultrastructurelle, leur nouvelle monocouche endothéliale démontrait une plus grande densité cellulaire et exprimait les protéines de fonction ZO-1 et Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, absentes dans la multicouche endothéliale des cornées désendothélialisées centralement et greffées avec  $1 \times 10^6$  CEC.

Okumura et collègues ont injecté  $2 \times 10^5$  CEC avec et sans supplémentation en ROCKi dans des yeux de lapin et de primates entièrement désendothélialisés, suivi d'un positionnement cornée-vers-le-bas pour 3 heures.<sup>95</sup> Nous comparons nos résultats à ceux obtenus chez les primates, dont les cellules endothéliales ne se multiplient pas

spontanément, comme chez l'humain et le félin.<sup>137, 206, 207</sup> Les cornées des primates ont retrouvé une transparence, épaisseur et expression de protéines de fonction endothéliale normales après l'injection de  $2 \times 10^5$  CEC supplémentées avec ROCKi. Nos résultats avec les cornées désendothélialisées centralement et greffées avec  $2 \times 10^5$  CEC sont compatibles avec les observations de Okumura et al.<sup>95</sup>

Contrairement aux cornées avec injection de CEC, la monocouche endothéliale formée dans les contrôles désendothélialisés centralement et non-greffés était hautement fonctionnelle. Ainsi, il semble que la désendothélialisation seule sans injection de CEC ait eu un effet thérapeutique supérieur et ce, par simple migration de cellules endothéliales périphériques du receveur vers la DM dénudée. L'œdème cornéen persistant et le processus de guérison fibrotique observés chez les contrôles entièrement désendothélialisés et non-greffés suggèrent qu'un nombre critique de cellules endothéliales restantes chez l'hôte est requis pour un repeuplement efficace de la région désendothélialisée.

### **La contribution des CEC injectées au nouvel endothélium**

Un de nos objectifs secondaires était d'estimer la contribution des CEC injectées au nouvel endothélium. Bien que secondaire, la réponse à cet objectif nous permet de tirer des conclusions quant à l'efficacité de la thérapie par injection intracamérale de CEC pour la reconstitution d'un endothélium fonctionnel.

Dans nos expériences préliminaires d'ensemencement de cornées *in vitro* avec CEC félines cultivées, l'endothélium reconstitué exprimait le DiOC à un mois, servant ainsi de contrôle positif (**Fig. 18**). Contrairement à ces contrôles et aux études antérieures où les CEC injectées étaient marquées avec un traceur cellulaire fluorescent,<sup>95, 114, 115, 145, 146, 152</sup> l'expression de DiOC dans nos greffes *in vivo* variait de minime à non-existante. La monocouche endothéliale des cornées greffées avec  $2 \times 10^5$  CEC ne démontrait pas d'expression de DiOC, alors que les multicouches des cornées greffées avec  $1 \times 10^6$  CEC l'exprimaient minimalement.

Le photoblanchiment du traceur fluorescent avec le temps ou sa libération des cellules endothéliales injectées pourraient expliquer cette faible expression dans nos spécimens. Cependant, il est plus probable que la DM dénudée ait été repeuplée par les cellules

endothéliales du receveur avec une contribution limitée des CEC injectées. Lors de nos expériences d'optimisation de la technique de désendothélialisation mécanique dans des yeux *ex vivo*, la DM était complètement dénudée à la fin des 3 heures cornée-vers-le-bas, suggérant que des CEC du receveur résiduelles dans la zone dénudée ou détachées par désendothélialisation et restées dans la chambre antérieure n'ont pas participé à la formation du nouvel endothélium. Il est donc plus plausible que les CEC du receveur ayant repeuplé la zone dénudée provenaient des régions périphériques non-désendothélialisées.

Les GTPases Rho et leurs effecteurs agissant en aval, les ROCK, ont un rôle essentiel dans la motilité et l'adhésion cellulaire par l'entremise de la modulation du cytosquelette intracellulaire.<sup>264</sup> Plus précisément, les ROCK phosphorylent la chaîne légère de la myosine, la phosphatase des chaînes légères de la myosine, la kinase de Lin-11/Isl-11/Mec-3 et l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  1, régulant ainsi la force contractile des complexes d'actine-myosine, l'assemblage de fibres de stress et la formation d'adhésions focales avec la matrice extracellulaire.<sup>280</sup> À ces fonctions, se rajoute l'implication des ROCK dans le contrôle de la transcription génique, la progression à travers le cycle cellulaire et l'apoptose,<sup>325, 326</sup> quoique la nature exacte de cette implication varie selon le type de cellule et reste encore à éclaircir.<sup>327</sup> La régulation négative de cette voie à l'aide d'un inhibiteur sélectif du ROCK, Y-27632, a été étudiée *in vitro* et *in vivo* sur des CEC primates, bovines, humaines et de lapin.<sup>95, 256-258, 279-283</sup> Les effets décrits sont le renforcement de l'adhésion cellulaire au substrat, la migration, la prolifération et la guérison, ainsi que la suppression de l'apoptose. Okumura et collègues ont démontré que la supplémentation en ROCKi des CEC injectées dans la chambre antérieure d'un modèle primate aide au rétablissement d'un endothélium plus fonctionnel.<sup>95</sup> Par contre, comme la contribution des CEC injectées au nouvel endothélium chez le primate est inconnue, il n'est pas clair si l'effet du ROCKi a été médié par une augmentation de l'adhérence des CEC injectées, une stimulation de la migration des cellules endothéliales périphériques du receveur, ou une combinaison des deux mécanismes.

### **Domage endothélial et guérison fibrotique**

Dans nos études préliminaires d'injection de CEC félines dans la chambre antérieure d'yeux de lapin *ex vivo*, les CEC injectées s'étaient déposées les unes sur les autres par endroits, suggérant la possibilité de formation de multicouche. Dans le cadre de nos expériences *in vivo*, une multicouche a été observée dans les cornées greffées avec  $1 \times 10^6$  CEC, dans une des cornées désendothélialisées centralement et greffées avec  $2 \times 10^5$  CEC, et dans les contrôles entièrement désendothélialisés. Lors de l'évaluation d'un nouvel endothélium, son analyse de profil en histopathologie est donc essentielle afin de documenter la formation d'une multicouche ou d'une membrane fibreuse rétrocornéenne.

Quoiqu'un spécimen ait démontré des signes d'empilement cellulaire (cornée désendothélialisée centralement et greffée avec  $1 \times 10^6$  CEC), la plupart ont révélé une multicouche formée de cellules d'allure fibroblastique entourées d'une matrice extracellulaire abondante. Ceci a coïncidé avec l'expression de collagène de type I, de fibronectine et de  $\alpha$ -SMA, suggérant une transition vers un phénotype myofibroblastique, plutôt qu'un empilement des CEC injectées. Il a été démontré que des CEC ayant subi une transition mésenchymateuse sécrètent du collagène de type I plutôt que du collagène de type IV normalement produit,<sup>165, 167</sup> et de la fibronectine.<sup>167, 169, 170</sup> Le  $\alpha$ -SMA est également un marqueur de transition mésenchymateuse<sup>164, 171</sup> et sa présence a été documentée dans des états de guérison pathologique comme dans la kératopathie bulleuse du pseudophaque chez l'humain,<sup>168</sup> la brûlure alcaline des cornées de lapin,<sup>166</sup> ou après gel transcornéen chez les félins,<sup>169</sup> ainsi que suite à plusieurs passages des CEC lors de leur culture *in vitro*.<sup>11, 108</sup> Nos CEC avant injection n'exprimaient pas de  $\alpha$ -SMA et avaient une morphologie polygonale, démontrant que les CEC transplantées n'avaient pas subi de transition mésenchymateuse pendant leur culture.

Les cellules d'allure fibroblastique dispersées au sein de la membrane fibreuse rétrocornéenne observée dans nos cornées entièrement désendothélialisées auraient pu provenir de différentes sources. Un envahissement par des kératocytes stromaux à travers des bris dans la DM<sup>261-263</sup> est peu probable, car une attention particulière a été portée à la préservation de la DM au moment de l'opération; un bris aurait été facilement identifiable

sous la haute magnification du microscope opératoire en rétro-illumination co-axiale. L'intégrité de la DM a aussi été confirmée en MET, quoique de par les petites dimensions des spécimens analysés en MET, il n'est pas exclu que des bris aient quand même été présents dans les régions non-analysées. Une contribution significative des cellules inflammatoires circulantes<sup>262, 319</sup> est également peu probable, car l'inflammation postopératoire intracamérale était minime et les analyses histopathologiques n'ont pas démontré de cellules inflammatoires dans le stroma. L'implication improbable des cellules stromales et inflammatoires est davantage appuyée par l'expression du marqueur endothélial K8/18 dans tous les spécimens avec multicouche fibreuse, suggérant que les cellules endothéliales en étaient la source la plus plausible. Des membranes fibreuses rétrocornéennes composées de cellules endothéliales d'allure fibroblastique et similaires aux membranes notées dans notre étude ont été précédemment décrites.<sup>165, 167, 169, 212, 319, 321, 322</sup> Dans notre étude, étant donné qu'elles se sont formées dans des cornées désendothélialisées injectées ou non avec des CEC, elles semblaient provenir des cellules endothéliales de l'hôte ayant migré de la périphérie, bien que la contribution des CEC du donneur à la réaction fibrotique ne peut être exclue.

Une multicouche endothéliale, en association avec une transformation myofibroblastique, perte des contacts intercellulaires et prolifération excessive, a été décrite dans le contexte d'une guérison endothéliale suivant un gel transcornéen chez le félin et le lapin.<sup>154, 165, 167, 169, 319</sup> Ce mécanisme de guérison est contraire à celui décrit après une désendothélialisation mécanique sur moins de 4 mm de diamètre, qui implique une préservation de la différenciation endothéliale et des jonctions intercellulaires.<sup>165, 210, 213, 317, 320</sup>

Nous avons établi un modèle de déficience endothéliale par désendothélialisation mécanique plutôt que par un gel transcornéen, afin de limiter le dommage induit à l'endothélium, épargner les autres couches cornéennes et minimiser la réaction inflammatoire postopératoire. Après une désendothélialisation mécanique sur un diamètre de 7 mm sans injection de CEC, les cellules endothéliales périphériques du receveur ont augmenté leur taille et se sont étendues afin de couvrir le déficit créé. Ceci a mené à la formation d'une monocouche confluyente avec préservation de la différenciation endothéliale et des jonctions intercellulaires, semblable à celle décrite dans la littérature

suite à une désendothélialisation mécanique sur un plus petit diamètre.<sup>165, 210, 213, 317, 320</sup>  
D'un autre côté, la guérison de déficits d'un diamètre de 18 mm avec ou sans injection de CEC s'est déroulée par un mécanisme fibrotique similaire à celui induit par un gel transcornéen. Ces résultats sont compatibles avec la littérature, et suggèrent que la guérison endothéliale est influencée par la taille et la nature du dommage créé, et donc par le nombre et l'intégrité des cellules endothéliales résiduelles, des variables qui devraient être prises en considération lors de l'investigation de la guérison suivant une injection intracamerale de CEC. Dans le contexte de l'étude d'un endothélium reconstruit par une nouvelle approche thérapeutique, des modèles de déficience endothéliale de différentes tailles et sévérités pourraient être investigués afin de déterminer à quel stade de la maladie la nouvelle approche apporterait le plus grand bénéfice.

Lors de l'établissement de notre protocole opératoire, nous avons décidé de préserver la DM pour permettre aux CEC injectées d'adhérer à leur substrat naturel, pour minimiser le risque d'envahissement par des kérateocytes stromaux et éviter une réaction fibrotique secondaire à l'activation de ces kérateocytes. Le fait de préserver la DM nous a permis de mieux cibler le suivi de la ré-endothélialisation par les cellules endothéliales injectées et/ou du receveur. Dans l'éventuel cas d'un transfert en clinique, il est possible qu'un descemetorexis soit nécessaire pour les patients souffrant de dystrophie endothéliale de Fuchs dont la DM est anormale et contribue à la baisse de l'acuité visuelle par une diffusion des rayons lumineux au niveau des guttae.<sup>45</sup> Si laissée en place avant l'injection des CEC cultivées, cette DM malade pourrait contribuer à des résultats chirurgicaux sous-optimaux.

## 2. Perspectives

Les études antérieures de thérapie par injection intracamérale de CEC cultivées pour la décompensation endothéliale irréversible ont rapporté des résultats prometteurs. La présente étude apporte des nuances importantes aux connaissances actuelles sur cette nouvelle approche de transplantation endothéliale, étant donné qu'elle se distingue de la plupart des études précédentes par l'utilisation d'un modèle animal dont les cellules endothéliales cornéennes présentent un potentiel réplicatif similaire à celles humaines. Ces nuances sont d'autant plus pressantes dans le contexte d'une étude clinique sur la thérapie par injection intracamérale de CEC débutée récemment au Japon.<sup>313</sup>

À notre avis, plusieurs questions devraient être répondues avant de transférer cette thérapie avec succès en clinique. Est-ce que cette technique permet d'obtenir des résultats visuels plus rapidement et supérieurs à ceux obtenus présentement avec la DSAEK ou la DMEK? Est-ce que la DM devrait être enlevée avant de traiter des patients souffrant de différentes endothéliopathies primaires avec cette technique? Est-ce que les résultats chirurgicaux seraient les mêmes si la DM est pelée? Est-ce qu'un positionnement cornée-vers-le-bas post-injection est faisable dans le contexte clinique?

Mais au-delà de ces questions sans réponse, l'efficacité même de l'injection intracamérale de CEC reste à confirmer. Dans notre étude, la désendothélialisation seule avec injection de ROCKi sans CEC a permis de reconstituer l'endothélium le plus sain et ce, par simple migration de cellules endothéliales périphériques du receveur vers la DM dénudée. Nos résultats questionnent l'utilité de la thérapie par injection intracamérale de CEC pour la reconstitution d'un endothélium fonctionnel et suggèrent un effet thérapeutique médié principalement par une stimulation de la guérison endothéliale du receveur sous l'influence de l'inhibiteur de ROCK. Un effet thérapeutique semblable du ROCKi seul a d'ailleurs été mis en évidence par son administration en gouttes topiques chez le lapin et le primate suite à un gel transcornéen ou à un dommage endothélial mécanique.<sup>252, 257, 258</sup> La régulation du cytosquelette intracellulaire et, par conséquent, de l'adhésion et de la migration des CEC,<sup>95, 256, 279-283</sup> dans lesquelles la familles des protéines ROCK et leurs inhibiteurs sont impliqués, pourrait expliquer, du moins en

partie, cette stimulation de la guérison endothéliale. Okumura et al. ont suggéré la contribution d'un effet pro-mitotique en démontrant que le ROCKi favorise la prolifération des CEC<sup>282</sup> et que cet effet passe par la régulation de deux protéines de la phase G1 du cycle cellulaire, la cycline D et la p27, dont l'activation et l'inhibition respectives induisent la progression de la phase G1, dans laquelle les CEC sont arrêtées, vers la phase S.<sup>328</sup>

À la lumière de ces observations, des études investiguant l'effet de ROCKi suite à une désendothélialisation centrale chez un modèle avec un endothélium non-régénératif *in vivo* permettraient de tirer des conclusions plus solides quant à l'utilité de la thérapie par injection intracamérale de CEC cultivées. À notre connaissance, ceci n'a pas encore été étudié. Le déficit créé dans nos deux contrôles désendothélialisés centralement et injectés avec ROCKi sans CEC a été recouvert en moins de 2 semaines. Une étude avec groupe contrôle serait nécessaire pour déterminer si cet effet est supérieur à ce qui serait obtenu sans ROCKi. Dans l'éventualité d'une confirmation de l'effet thérapeutique du ROCKi seul sur les CEC périphériques restantes, il restera à savoir si le même effet serait possible en présence de cellules malades, par exemple porteuses d'une dystrophie de Fuchs. En ce sens, le traitement topique avec ROCKi en gouttes ophtalmiques d'une cornée atteinte de dystrophie de Fuchs rapporté par Koizumi et al. s'avère prometteur et justifie des investigations additionnelles.<sup>256</sup>



### **3. Conclusion**

En conclusion, une injection allogénique de CEC avec supplémentation en ROCKi et positionnement cornée-vers-le-bas chez le félin a reconstitué un endothélium partiellement fonctionnel. Le nouvel endothélium des cornées greffées avec  $2 \times 10^5$  CEC a montré une meilleure fonctionnalité et intégrité anatomique que les cornées greffées avec  $1 \times 10^6$  CEC, mais est demeuré inférieur aux contrôles normaux. L'expression limitée de DiOC dans toutes les cornées greffées suggère une faible contribution des CEC injectées à la formation du nouvel endothélium, principalement reconstitué par la migration des cellules périphériques restantes du receveur. La désendothélialisation sans injection de CEC a permis la reconstitution de l'endothélium le plus sain, à condition que suffisamment de cellules endothéliales de l'hôte ait été laissées intactes. Ces résultats mettent en question l'utilité du traitement de la déficience endothéliale par injection intracamérale de CEC. Étant donné les récents résultats prometteurs avec l'administration de gouttes topiques de ROCKi dans un modèle lapin,<sup>252</sup> il est possible qu'une désendothélialisation combinée à un traitement avec ROCKi soit suffisante pour reconstituer un endothélium fonctionnel par l'entremise d'un mécanisme stimulant la guérison endothéliale. Des études additionnelles sur l'effet thérapeutique du ROCKi sans injection de CEC sur la guérison d'un déficit endothélial sont nécessaires afin de valider ces conclusions.

## Références

1. Smolek MK, Klyce SD. Chapter 8: Cornea. In: Tasman W, Jaeger EA, Bilyk JR, editors. *Duane's Foundations of Clinical Ophthalmology on CD-ROM. Volume 1: Ocular Anatomy, Embryology, and Teratology*. Philadelphia, PA: Lippincott, Williams & Wilkins; 2005.
2. American Academy of Ophthalmology. Chapter 1: Structure and Function of the External Eye and Cornea. In: Reidy JJ, editor. *External Disease and Cornea. Basic and Clinical Science Course*. San Francisco, CA: American Academy of Ophthalmology; 2012. p. 3-10.
3. DelMonte DW, Kim T. Anatomy and physiology of the cornea. *J Cataract Refractive Surg*. 2011;37(3):588-98.
4. Doughty MJ, Zaman ML. Human corneal thickness and its impact on intraocular pressure measures: a review and meta-analysis approach. *Surv Ophthalmol*. 2000;44(5):367-408.
5. Freegard TJ. The physical basis of transparency of the normal cornea. *Eye (Lond)*. 1997;11(4):465-71.
6. Dua HS, Faraj LA, Said DG, Gray T, Lowe J. Human corneal anatomy redefined: a novel pre-Descemet's layer (Dua's layer). *Ophthalmol*. 2013;120(9):1778-85.
7. McKee HD, Irion LC, Carley FM, Brahma AK, Jafarinasab MR, Rahmati-Kamel M, et al. Re: Dua et al.: Human corneal anatomy redefined: a novel pre-Descemet layer (Dua's layer) (*Ophthalmol* 2013;120:1778-85). *Ophthalmol*. 2014;121(5):e24-5.
8. Proulx S, Carrier P, Deschambeault A, Brunette I, Germain L. Séminaire du Centre LOEX de l'Université Laval; 10 novembre 2006; Québec, QC.
9. Edelhauser HF. The Balance Between Corneal Transparency and Edema: The Proctor Lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006;47(5):1754-67.
10. Kinoshita S, Adachi W, Sotozono C, Nishida K, Yokoi N, Quantock AJ, et al. Characteristics of the human ocular surface epithelium. *Prog Retin Eye Res*. 2001;20(5):639-73.
11. Peh GS, Beuerman RW, Colman A, Tan DT, Mehta JS. Human corneal endothelial cell expansion for corneal endothelium transplantation: an overview. *Transplantation*. 2011;91(8):811-9.
12. Beebe DC. Maintaining transparency: a review of the developmental physiology and pathophysiology of two avascular tissues. *Semin Cell Dev Biol*. 2008;19(2):125-33.
13. Hassell JR, Birk DE. The molecular basis of corneal transparency. *Exp Eye Res*. 2010;91(3):326-35.
14. Vanmeter WS, Lee WB, Katz DG. Chapter 16A: Corneal Edema. In: Tasman W, Jaeger EA, McLeod SD, editors. *Duane's Clinical Ophthalmology on CD-ROM. Volume 4: External Diseases*. Philadelphia, PA: Lippincott, Williams & Wilkins; 2005.

15. Robert L, Legeais JM, Robert AM, Renard G. Corneal collagens. *Pathol Biol.* 2001;49(4):353-63.
16. Jester JV, Moller-Pedersen T, Huang J, Sax CM, Kays WT, Cavangh HD, et al. The cellular basis of corneal transparency: evidence for 'corneal crystallins'. *J Cell Sci.* 1999;112(5):613-22.
17. Boote C, Dennis S, Huang Y, Quantock AJ, Meek KM. Lamellar orientation in human cornea in relation to mechanical properties. *J Struct Biol.* 2005;149(1):1-6.
18. Abass A, Hayes S, White N, Sorensen T, Meek KM. Transverse depth-dependent changes in corneal collagen lamellar orientation and distribution. *J R Soc Interface.* 2015;12(104):20140717.
19. Bourne WM. Biology of the corneal endothelium in health and disease. *Eye (Lond).* 2003;17(8):912-8.
20. Kabosova A, Azar DT, Bannikov GA, Campbell KP, Durbeej M, Ghohestani RF, et al. Compositional differences between infant and adult human corneal basement membranes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007;48(11):4989-99.
21. Iwamoto T, Smelser GK. Electron Microscopy of the Human Corneal Endothelium with Reference to Transport Mechanisms. *Invest Ophthalmol.* 1965;4:270-84.
22. Laing RA, Sanstrom MM, Berrospi AR, Leibowitz HM. Changes in the corneal endothelium as a function of age. *Exp Eye Res.* 1976;22(6):587-94.
23. Svedbergh B, Bill A. Scanning electron microscopic studies of the corneal endothelium in man and monkeys. *Acta Ophthalmol.* 1972;50(3):321-36.
24. Murphy C, Alvarado J, Juster R, Maglio M. Prenatal and postnatal cellularity of the human corneal endothelium. A quantitative histologic study. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1984;25(3):312-22.
25. Mishima S. Clinical Investigations on the Corneal Endothelium: XXXVIII Edward Jackson Memorial Lecture. *Am J Ophthalmol.* 1982;93(1):1-29.
26. Sherrard ES. The corneal endothelium in vivo: its response to mild trauma. *Exp Eye Res.* 1976;22(4):347-57.
27. Joyce NC. Proliferative capacity of the corneal endothelium. *Prog Retin Eye Res.* 2003;22(3):359-89.
28. Egan CA, Savre-Train I, Shay JW, Wilson SE, Bourne WM. Analysis of telomere lengths in human corneal endothelial cells from donors of different ages. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1998;39(3):648-53.
29. Konomi K, Joyce NC. Age and topographical comparison of telomere lengths in human corneal endothelial cells. *Mol Vis.* 2007;13:1251-8.
30. Senoo T, Obara Y, Joyce NC. EDTA: a promoter of proliferation in human corneal endothelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000;41(10):2930-5.
31. Bourne WM, Nelson LR, Hodge DO. Central corneal endothelial cell changes over a ten-year period. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1997;38(3):779-82.

32. Speedwell L, Novakovic P, Sherrard ES, Taylor DS. The infant corneal endothelium. *Arch Ophthalmol*. 1988;106(6):771-5.
33. Nucci P, Brancato R, Mets MB, Shevell SK. Normal endothelial cell density range in childhood. *Arch Ophthalmol*. 1990;108(2):247-8.
34. Whikehart DR, Parikh CH, Vaughn AV, Mishler K, Edelhauser HF. Evidence suggesting the existence of stem cells for the human corneal endothelium. *Mol Vis*. 2005;11:816-24.
35. Hirata-Tominaga K, Nakamura T, Okumura N, Kawasaki S, Kay EP, Barrandon Y, et al. Corneal endothelial cell fate is maintained by LGR5 through the regulation of hedgehog and Wnt pathway. *Stem cells*. 2013;31(7):1396-407.
36. McGowan SL, Edelhauser HF, Pfister RR, Whikehart DR. Stem cell markers in the human posterior limbus and corneal endothelium of unwounded and wounded corneas. *Mol Vis*. 2007;13:1984-2000.
37. Bonanno JA. Molecular mechanisms underlying the corneal endothelial pump. *Exp Eye Res*. 2012;95(1):2-7.
38. Geroski DH, Matsuda M, Yee RW, Edelhauser HF. Pump function of the human corneal endothelium. Effects of age and cornea guttata. *Ophthalmol*. 1985;92(6):759-63.
39. Verkman AS, Ruiz-Ederra J, Levin MH. Functions of aquaporins in the eye. *Prog Retin Eye Res*. 2008;27(4):420-33.
40. Thiagarajah JR, Verkman AS. Aquaporin deletion in mice reduces corneal water permeability and delays restoration of transparency after swelling. *J Biol Chem*. 2002;277(21):19139-44.
41. Edelhauser HF. The resiliency of the corneal endothelium to refractive and intraocular surgery. *Cornea*. 2000;19(3):263-73.
42. American Academy of Ophthalmology. Chapter 2: Examination Techniques for the External Eye and Cornea. In: Reidy JJ, editor. *External Disease and Cornea. Basic and Clinical Science Course*. San Francisco, CA: American Academy of Ophthalmology; 2012. p. 11-46.
43. Kitagawa K, Kojima M, Sasaki H, Shui YB, Chew SJ, Cheng HM, et al. Prevalence of primary cornea guttata and morphology of corneal endothelium in aging Japanese and Singaporean subjects. *Ophthalmic Res*. 2002;34(3):135-8.
44. Zoega GM, Fujisawa A, Sasaki H, Kubota A, Sasaki K, Kitagawa K, et al. Prevalence and risk factors for cornea guttata in the Reykjavik Eye Study. *Ophthalmol*. 2006;113(4):565-9.
45. Zhang J, Patel DV. The pathophysiology of Fuchs' endothelial dystrophy: a review of molecular and cellular insights. *Exp Eye Res*. 2015;130:97-105.
46. Liskova P, Palos M, Hardcastle AJ, Vincent AL. Further genetic and clinical insights of posterior polymorphous corneal dystrophy 3. *JAMA Ophthalmol*. 2013;131(10):1296-303.

47. Aldave AJ, Han J, Frausto RF. Genetics of the corneal endothelial dystrophies: an evidence-based review. *Clin Genet.* 2013;84(2):109-19.
48. American Academy of Ophthalmology. Chapter 10: Corneal Dystrophies and Ectasias. In: Reidy JJ, editor. *External Disease and Cornea. Basic and Clinical Science Course.* San Francisco, CA: American Academy of Ophthalmology; 2012. p. 267-303
49. Abell RG, Vote BJ. Cost-effectiveness of femtosecond laser-assisted cataract surgery versus phacoemulsification cataract surgery. *Ophthalmol.* 2014;121(1):10-6.
50. Siu GD, Young AL, Jhanji V. Alternatives to corneal transplantation for the management of bullous keratopathy. *Curr Opin Ophthalmol.* 2014;25(4):347-52.
51. Gomes JA, Haraguchi DK, Zambrano DU, Izquierdo Junior L, Cunha MC, de Freitas D. Anterior stromal puncture in the treatment of bullous keratopathy: six-month follow-up. *Cornea.* 2001;20(6):570-2.
52. Hsu JK, Rubinfeld RS, Barry P, Jester JV. Anterior stromal puncture. Immunohistochemical studies in human corneas. *Arch Ophthalmol.* 1993;111(8):1057-63.
53. Sridhar MS, Vemuganti GK, Bansal AK, Rao GN. Anterior stromal puncture in bullous keratopathy: a clinicopathologic study. *Cornea.* 2001;20(6):573-9.
54. Pires RT, Tseng SC, Prabhasawat P, Puangsricharn V, Maskin SL, Kim JC, et al. Amniotic membrane transplantation for symptomatic bullous keratopathy. *Arch Ophthalmol.* 1999;117(10):1291-7.
55. Espana EM, Grueterich M, Sandoval H, Solomon A, Alfonso E, Karp CL, et al. Amniotic membrane transplantation for bullous keratopathy in eyes with poor visual potential. *J Cataract Refract Surg.* 2003;29(2):279-84.
56. Georgiadis NS, Ziakas NG, Boboridis KG, Terzidou C, Mikropoulos DG. Cryopreserved amniotic membrane transplantation for the management of symptomatic bullous keratopathy. *Clin Experiment Ophthalmol.* 2008;36(2):130-5.
57. Alino AM, Perry HD, Kanellopoulos AJ, Donnenfeld ED, Rahn EK. Conjunctival flaps. *Ophthalmol.* 1998;105(6):1120-3.
58. Moffatt SL, Cartwright VA, Stumpf TH. Centennial review of corneal transplantation. *Clin Experiment Ophthalmol.* 2005;33(6):642-57.
59. Bahar I, Kaiserman I, McAllum P, Slomovic A, Rootman D. Comparison of posterior lamellar keratoplasty techniques to penetrating keratoplasty. *Ophthalmol.* 2008;115(9):1525-33.
60. Anshu A, Price MO, Tan DT, Price FW, Jr. Endothelial keratoplasty: a revolution in evolution. *Surv Ophthalmol.* 2012;57(3):236-52.
61. Melles GR, Ong TS, Ververs B, van der Wees J. Descemet membrane endothelial keratoplasty (DMEK). *Cornea.* 2006;25(8):987-90.
62. 2014 Eye Banking Statistical Report. Washington, DC: Eye Bank Association of America, 2015.

63. Price MO, Price FW. Descemet's stripping endothelial keratoplasty. *Curr Opin Ophthalmol.* 2007;18(4):290-4.
64. Ang M, Wilkins MR, Mehta JS, Tan D. Descemet membrane endothelial keratoplasty. *Br J Ophthalmol.* 2016;100(1):15-21.
65. Patel SV. Graft survival and endothelial outcomes in the new era of endothelial keratoplasty. *Exp Eye Res.* 2012;95(1):40-7.
66. Terry MA. Endothelial keratoplasty: history, current state, and future directions. *Cornea.* 2006;25(8):873-8.
67. Price MO, Jordan CS, Moore G, Price FW, Jr. Graft rejection episodes after Descemet stripping with endothelial keratoplasty: part two: the statistical analysis of probability and risk factors. *Br J Ophthalmol.* 2009;93(3):391-5.
68. Monnereau C, Bruinsma M, Ham L, Baydoun L, Oellerich S, Melles GR. Endothelial cell changes as an indicator for upcoming allograft rejection following Descemet membrane endothelial keratoplasty. *Am J Ophthalmol.* 2014;158(3):485-95.
69. Monnereau C, Quilendrin R, Dapena I, Liarakos VS, Alfonso JF, Arnalich-Montiel F, et al. Multicenter study of Descemet membrane endothelial keratoplasty: first case series of 18 surgeons. *JAMA Ophthalmol.* 2014;132(10):1192-8.
70. Price MO, Price FW, Jr. Endothelial keratoplasty - a review. *Clin Experiment Ophthalmol.* 2010;38(2):128-40.
71. Tan DT, Dart JK, Holland EJ, Kinoshita S. Corneal transplantation. *Lancet.* 2012;379(9827):1749-61.
72. Gain P, Jullienne R, He Z, Aldossary M, Acquart S, Cognasse F, et al. Global Survey of Corneal Transplantation and Eye Banking. *JAMA Ophthalmol.* 2015:1-8.
73. Tan JC, Holland SP, Dubord PJ, Moloney G, McCarthy M, Yeung SN. Evolving indications for and trends in keratoplasty in British Columbia, Canada, from 2002 to 2011: a 10-year review. *Cornea.* 2014;33(3):252-6.
74. Tan TE, Peh GS, George BL, Cajucom-Uy HY, Dong D, Finkelstein EA, et al. A cost-minimization analysis of tissue-engineered constructs for corneal endothelial transplantation. *PloS One.* 2014;9(6):e100563.
75. Boimer C, Lee K, Sharpen L, Mashour RS, Slomovic AR. Evolving surgical techniques of and indications for corneal transplantation in Ontario from 2000 to 2009. *Can J Ophthalmol.* 2011;46(4):360-6.
76. Robert MC, Choronzey ME, Lapointe J, Gauvin Meunier LP, Harissi-Dagher M, Germain M, et al. Evolution of Corneal Transplantation in the Province of Quebec From 2000 to 2011. *Cornea.* 2015;34(8):880-7.
77. Zhang AQ, Rubenstein D, Price AJ, Cote E, Levitt M, Sharpen L, et al. Evolving surgical techniques of and indications for corneal transplantation in Ontario: 2000 - 2012. *Can J Ophthalmol.* 2013;48(3):153-9.

78. Cao KY, Dorrepaal SJ, Seamone C, Slomovic AR. Demographics of corneal transplantation in Canada in 2004. *Can J Ophthalmol.* 2006;41(6):688-92.
79. Rasouli M, Caraiscos VB, Slomovic AR. Efficacy of Routine Notification and Request on reducing corneal transplantation wait times in Canada. *Can J Ophthalmol.* 2009;44(1):31-5.
80. Proulx S, Brunette I. Methods being developed for preparation, delivery and transplantation of a tissue-engineered corneal endothelium. *Exp Eye Res.* 2012;95(1):68-75.
81. Lee R. The outlook for population growth. *Science.* 2011;333(6042):569-73.
82. Christensen K, Doblhammer G, Rau R, Vaupel JW. Ageing populations: the challenges ahead. *Lancet.* 2009;374(9696):1196-208.
83. Joyce NC, Zhu CC. Human corneal endothelial cell proliferation: potential for use in regenerative medicine. *Cornea.* 2004;23(8):S8-19.
84. Senoo T, Joyce NC. Cell cycle kinetics in corneal endothelium from old and young donors. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000;41(3):660-7.
85. Brunette I, Le Francois M, Tremblay MC, Guertin MC. Corneal transplant tolerance of cryopreservation. *Cornea.* 2001;20(6):590-6.
86. Chen KH, Azar D, Joyce NC. Transplantation of adult human corneal endothelium ex vivo: a morphologic study. *Cornea.* 2001;20(7):731-7.
87. Haydari MN, Perron MC, Laprise S, Roy O, Cameron JD, Proulx S, et al. A short-term in vivo experimental model for Fuchs endothelial corneal dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012;53(10):6343-54.
88. Proulx S, Audet C, Uwamaliya J, Deschambeault A, Carrier P, Giasson CJ, et al. Tissue engineering of feline corneal endothelium using a devitalized human cornea as carrier. *Tissue Eng A.* 2009;15(7):1709-18.
89. Proulx S, Bensaoula T, Nada O, Audet C, d'Arc Uwamaliya J, Devaux A, et al. Transplantation of a tissue-engineered corneal endothelium reconstructed on a devitalized carrier in the feline model. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009;50(6):2686-94.
90. Zhu C, Joyce NC. Proliferative response of corneal endothelial cells from young and older donors. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004;45(6):1743-51.
91. Yokoo S, Yamagami S, Yanagi Y, Uchida S, Mimura T, Usui T, et al. Human corneal endothelial cell precursors isolated by sphere-forming assay. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005;46(5):1626-31.
92. Li W, Sabater AL, Chen YT, Hayashida Y, Chen SY, He H, et al. A novel method of isolation, preservation, and expansion of human corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007;48(2):614-20.
93. Zhu YT, Hayashida Y, Kheirkhah A, He H, Chen SY, Tseng SC. Characterization and comparison of intercellular adherent junctions expressed by human corneal endothelial cells in vivo and in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008;49(9):3879-86.

94. Ishino Y, Sano Y, Nakamura T, Connon CJ, Rigby H, Fullwood NJ, et al. Amniotic membrane as a carrier for cultivated human corneal endothelial cell transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004;45(3):800-6.
95. Okumura N, Koizumi N, Ueno M, Sakamoto Y, Takahashi H, Tsuchiya H, et al. ROCK inhibitor converts corneal endothelial cells into a phenotype capable of regenerating in vivo endothelial tissue. *Am J Pathol.* 2012;181(1):268-77.
96. Tchah H. Heterologous corneal endothelial cell transplantation: human corneal endothelial cell transplantation in Lewis rats. *J Korean Med Sci.* 1992;7(4):337-42.
97. Walshe J, Harkin DG. Serial explant culture provides novel insights into the potential location and phenotype of corneal endothelial progenitor cells. *Exp Eye Research.* 2014;127:9-13.
98. Engelmann K, Bohnke M, Friedl P. Isolation and long-term cultivation of human corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1988;29(11):1656-62.
99. Melles GR, Lander F, Rietveld FJ. Transplantation of Descemet's membrane carrying viable endothelium through a small scleral incision. *Cornea.* 2002;21(4):415-8.
100. Proulx S, Bourget JM, Gagnon N, Martel S, Deschambeault A, Carrier P, et al. Optimization of culture conditions for porcine corneal endothelial cells. *Mol Vis.* 2007;13:524-33.
101. Bahn CF, MacCallum DK, Lillie JH, Meyer RF, Martonyi CL. Complications associated with bovine corneal endothelial cell-lined homografts in the cat. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1982;22(1):73-90.
102. Blake DA, Yu H, Young DL, Caldwell DR. Matrix stimulates the proliferation of human corneal endothelial cells in culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1997;38(6):1119-29.
103. Miyata K, Drake J, Osakabe Y, Hosokawa Y, Hwang D, Soya K, et al. Effect of donor age on morphologic variation of cultured human corneal endothelial cells. *Cornea.* 2001;20(1):59-63.
104. Amano S. Transplantation of cultured human corneal endothelial cells. *Cornea.* 2003;22(7):S66-74.
105. Jackel T, Knels L, Valtink M, Funk RH, Engelmann K. Serum-free corneal organ culture medium (SFM) but not conventional minimal essential organ culture medium (MEM) protects human corneal endothelial cells from apoptotic and necrotic cell death. *Br J Ophthalmol.* 2011;95(1):123-30.
106. Bednarz J, Doubilei V, Wollnik PC, Engelmann K. Effect of three different media on serum free culture of donor corneas and isolated human corneal endothelial cells. *Br J Ophthalmol.* 2001;85(12):1416-20.
107. Joyce NC. Proliferative capacity of corneal endothelial cells. *Exp Eye Res.* 2012;95(1):16-23.
108. Engelmann K, Bednarz J, Valtink M. Prospects for endothelial transplantation. *Exp Eye Res.* 2004;78(3):573-8.



109. Yue BY, Sugar J, Gilboy JE, Elvart JL. Growth of human corneal endothelial cells in culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1989;30(2):248-53.
110. Pistsov MY, Sadovnikova E, Danilov SM. Human corneal endothelial cells: isolation, characterization and long-term cultivation. *Exp Eye Res.* 1988;47(3):403-14.
111. Engelmann K, Friedl P. Optimization of culture conditions for human corneal endothelial cells. *In Vitro Cell Dev Biol.* 1989;25(11):1065-72.
112. Engelmann K, Friedl P. Growth of human corneal endothelial cells in a serum-reduced medium. *Cornea.* 1995;14(1):62-70.
113. Choi JS, Williams JK, Greven M, Walter KA, Laber PW, Khang G, et al. Bioengineering endothelialized neo-corneas using donor-derived corneal endothelial cells and decellularized corneal stroma. *Biomaterials.* 2010;31(26):6738-45.
114. Mimura T, Yamagami S, Usui T, Seiichi, Honda N, Amano S. Necessary prone position time for human corneal endothelial precursor transplantation in a rabbit endothelial deficiency model. *Curr Eye Res.* 2007;32(7-8):617-23.
115. Mimura T, Yokoo S, Araie M, Amano S, Yamagami S. Treatment of rabbit bullous keratopathy with precursors derived from cultured human corneal endothelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005;46(10):3637-44.
116. Sumide T, Nishida K, Yamato M, Ide T, Hayashida Y, Watanabe K, et al. Functional human corneal endothelial cell sheets harvested from temperature-responsive culture surfaces. *Faseb J.* 2006;20(2):392-4.
117. Lai JY, Chen KH, Hsiue GH. Tissue-engineered human corneal endothelial cell sheet transplantation in a rabbit model using functional biomaterials. *Transplantation.* 2007;84(10):1222-32.
118. Nitschke M, Gramm S, Gotze T, Valtink M, Drichel J, Voit B, et al. Thermo-responsive poly(NiPAAm-co-DEGMA) substrates for gentle harvest of human corneal endothelial cell sheets. *J Biomed Mater Res A.* 2007;80(4):1003-10.
119. Ide T, Nishida K, Yamato M, Sumide T, Utsumi M, Nozaki T, et al. Structural characterization of bioengineered human corneal endothelial cell sheets fabricated on temperature-responsive culture dishes. *Biomaterials.* 2006;27(4):607-14.
120. Hitani K, Yokoo S, Honda N, Usui T, Yamagami S, Amano S. Transplantation of a sheet of human corneal endothelial cell in a rabbit model. *Mol Vis.* 2008;14:1-9.
121. Koizumi N, Sakamoto Y, Okumura N, Okahara N, Tsuchiya H, Torii R, et al. Cultivated corneal endothelial cell sheet transplantation in a primate model. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007;48(10):4519-26.
122. Mimura T, Amano S, Usui T, Araie M, Ono K, Akihiro H, et al. Transplantation of corneas reconstructed with cultured adult human corneal endothelial cells in nude rats. *Exp Eye Res.* 2004;79(2):231-7.
123. Lange TM, Wood TO, McLaughlin BJ. Corneal endothelial cell transplantation using Descemet's membrane as a carrier. *J Cataract Refract Surg.* 1993;19(2):232-5.

124. Wencan W, Mao Y, Wentao Y, Fan L, Jia Q, Qinmei W, et al. Using basement membrane of human amniotic membrane as a cell carrier for cultivated cat corneal endothelial cell transplantation. *Curr Eye Res.* 2007;32(3):199-215.
125. Jumblatt MM, Maurice DM, Schwartz BD. A gelatin membrane substrate for the transplantation of tissue cultured cells. *Transplantation.* 1980;29(6):498-9.
126. Schwartz BD, McCulley JP. Morphology of transplanted corneal endothelium derived from tissue culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1981;20(4):467-80.
127. Madden PW, Lai JN, George KA, Giovenco T, Harkin DG, Chirila TV. Human corneal endothelial cell growth on a silk fibroin membrane. *Biomaterials.* 2011;32(17):4076-84.
128. Yoeruek E, Saygili O, Spitzer MS, Tatar O, Bartz-Schmidt KU, Szurman P. Human anterior lens capsule as carrier matrix for cultivated human corneal endothelial cells. *Cornea.* 2009;28(4):416-20.
129. Mohay J, Lange TM, Soltau JB, Wood TO, McLaughlin BJ. Transplantation of corneal endothelial cells using a cell carrier device. *Cornea.* 1994;13(2):173-82.
130. Griffith M, Osborne R, Munger R, Xiong X, Doillon CJ, Laycock NL, et al. Functional human corneal equivalents constructed from cell lines. *Science.* 1999;286(5447):2169-72.
131. Doillon CJ, Watsky MA, Hakim M, Wang J, Munger R, Laycock N, et al. A collagen-based scaffold for a tissue engineered human cornea: physical and physiological properties. *Int J Artif Org.* 2003;26(8):764-73.
132. Mimura T, Yamagami S, Yokoo S, Usui T, Tanaka K, Hattori S, et al. Cultured human corneal endothelial cell transplantation with a collagen sheet in a rabbit model. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004;45(9):2992-7.
133. McIntosh Ambrose W, Salahuddin A, So S, Ng S, Ponce Marquez S, Takezawa T, et al. Collagen Vitrigel membranes for the in vitro reconstruction of separate corneal epithelial, stromal, and endothelial cell layers. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2009;90(2):818-31.
134. Joo CK, Green WR, Pepose JS, Fleming TP. Repopulation of denuded murine Descemet's membrane with life-extended murine corneal endothelial cells as a model for corneal cell transplantation. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2000;238(2):174-80.
135. Bahn CF, Meyer RF, MacCallum DK, Lillie JH, Lovett EJ, Sugar A, et al. Penetrating keratoplasty in the cat. A clinically applicable model. *Ophthalmol.* 1982;89(6):687-99.
136. Gospodarowicz D, Greenburg G, Alvarado J. Transplantation of cultured bovine corneal endothelial cells to species with nonregenerative endothelium. The cat as an experimental model. *Arch Ophthalmol.* 1979;97(11):2163-9.
137. Insler MS, Lopez JG. Extended incubation times improve corneal endothelial cell transplantation success. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1991;32(6):1828-36.
138. Insler MS, Lopez JG. Heterologous transplantation versus enhancement of human corneal endothelium. *Cornea.* 1991;10(2):136-48.

139. Bohnke M, Eggli P, Engelmann K. Transplantation of cultured adult human or porcine corneal endothelial cells onto human recipients in vitro. Part II: Evaluation in the scanning electron microscope. *Cornea*. 1999;18(2):207-13.
140. Engelmann K, Drexler D, Bohnke M. Transplantation of adult human or porcine corneal endothelial cells onto human recipients in vitro. Part I: Cell culturing and transplantation procedure. *Cornea*. 1999;18(2):199-206.
141. Amano S, Mimura T, Yamagami S, Osakabe Y, Miyata K. Properties of corneas reconstructed with cultured human corneal endothelial cells and human corneal stroma. *Jpn J Ophthalmol*. 2005;49(6):448-52.
142. Quantock AJ, Sano Y, Young RD, Kinoshita S. Stromal architecture and immune tolerance in additive corneal xenografts in rodents. *Acta Ophthalmol*. 2005;83(4):462-6.
143. Hori J, Niederkorn JY. Immunogenicity and immune privilege of corneal allografts. *Chem Immunol Allergy*. 2007;92:290-9.
144. Amano S, Shimomura N, Yokoo S, Araki-Sasaki K, Yamagami S. Decellularizing corneal stroma using N<sub>2</sub> gas. *Mol Vis*. 2008;14:878-82.
145. Mimura T, Shimomura N, Usui T, Noda Y, Kaji Y, Yamagami S, et al. Magnetic attraction of iron-endocytosed corneal endothelial cells to Descemet's membrane. *Exp Eye Res*. 2003;76(6):745-51.
146. Mimura T, Yamagami S, Usui T, Ishii Y, Ono K, Yokoo S, et al. Long-term outcome of iron-endocytosing cultured corneal endothelial cell transplantation with magnetic attraction. *Exp Eye Res*. 2005;80(2):149-57.
147. Patel SV, Bachman LA, Hann CR, Bahler CK, Fautsch MP. Human corneal endothelial cell transplantation in a human ex vivo model. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009;50(5):2123-31.
148. Bartakova A, Kunzevitzky NJ, Goldberg JL. Regenerative Cell Therapy for Corneal Endothelium. *Curr Ophthalmol Rep*. 2014;2(3):81-90.
149. Kunzevitzky NJ, Arrieta E, Alvarez-Delfin K, Bartakova A, Moysidis S, Weisman AD, et al. A rabbit model for corneal endothelial dysfunction. Abstract at The Association for Research in Vision and Ophthalmology Annual Meeting; Orlando, FL. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014(55):2040.
150. Raju HB, Hu Y, Vedula A, Dubovy SR, Goldberg JL. Evaluation of magnetic micro- and nanoparticle toxicity to ocular tissues. *PloS One*. 2011;6(5):e17452.
151. Raju HB, Hu Y, Padgett KR, Rodriguez JE, Goldberg JL. Investigation of nanoparticles using magnetic resonance imaging after intravitreal injection. *Clin Experiment Ophthalmol*. 2012;40(1):100-7.
152. Mimura T, Yamagami S, Yokoo S, Yanagi Y, Usui T, Ono K, et al. Sphere therapy for corneal endothelium deficiency in a rabbit model. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005;46(9):3128-35.

153. Frisco-Cabanos HL, Watanabe M, Okumura N, Kusamori K, Takemoto N, Takaya J, et al. Synthetic molecules that protect cells from anoikis and their use in cell transplantation. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2014;53(42):11208-13.
154. Van Horn DL, Sendele DD, Seideman S, Bucu PJ. Regenerative capacity of the corneal endothelium in rabbit and cat. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1977;16(7):597-613.
155. Gwon A. Chapter 13. The Rabbit in Cataract/IOL Surgery. In: *Animal Models in Eye Research.* Dayton, OH: Elsevier; 2008. 184-204 p.
156. Koizumi N, Okumura N, Shiina T, Suzuki S, Nakamura S, Sakamoto Y, et al. Efficacy and Safety Evaluation of Cell-Injection Therapy using Cultivated Human Corneal Endothelial Cells. Abstract at the Association for Research in Vision and Ophthalmology Annual Meeting; Fort Lauderdale, FL: *Invest Ophthalmol Vis Sci;* 2013(54):2201.
157. Elflein HM, Hofherr T, Berisha-Ramadani F, Weyer V, Lampe C, Beck M, et al. Measuring corneal clouding in patients suffering from mucopolysaccharidosis with the Pentacam densitometry programme. *Br J Ophthalmol.* 2013;97(7):829-33.
158. Greenstein SA, Fry KL, Bhatt J, Hersh PS. Natural history of corneal haze after collagen crosslinking for keratoconus and corneal ectasia: Scheimpflug and biomicroscopic analysis. *J Cataract Refract Surg.* 2010;36(12):2105-14.
159. Otri AM, Fares U, Al-Aqaba MA, Dua HS. Corneal densitometry as an indicator of corneal health. *Ophthalmol.* 2012;119(3):501-8.
160. Merjava S, Neuwirth A, Mandys V, Jirsova K. Cytokeratins 8 and 18 in adult human corneal endothelium. *Exp Eye Res.* 2009;89(3):426-31.
161. Zaniolo K, Bostan C, Rochette Drouin O, Deschambeault A, Perron MC, Brunette I, et al. Culture of human corneal endothelial cells isolated from corneas with Fuchs endothelial corneal dystrophy. *Exp Eye Res.* 2012;94(1):22-31.
162. Geroski DH, Kies JC, Edelhauser HF. The effects of ouabain on endothelial function in human and rabbit corneas. *Curr Eye Res.* 1984;3(2):331-8.
163. Barry PA, Petroll WM, Andrews PM, Cavanagh HD, Jester JV. The spatial organization of corneal endothelial cytoskeletal proteins and their relationship to the apical junctional complex. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1995;36(6):1115-24.
164. Darby I, Skalli O, Gabbiani G. Alpha-smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing. *Lab Invest.* 1990;63(1):21-9.
165. Ichijima H, Petroll WM, Barry PA, Andrews PM, Dai M, Cavanagh HD, et al. Actin filament organization during endothelial wound healing in the rabbit cornea: comparison between transcorneal freeze and mechanical scrape injuries. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1993;34(9):2803-12.
166. Ishizaki M, Zhu G, Haseba T, Shafer SS, Kao WW. Expression of collagen I, smooth muscle alpha-actin, and vimentin during the healing of alkali-burned and lacerated corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1993;34(12):3320-8.

167. Kay ED, Cheung CC, Jester JV, Nimni ME, Smith RE. Type I collagen and fibronectin synthesis by retrocorneal fibrous membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1982;22(2):200-12.
168. Ljubimov AV, Burgeson RE, Butkowski RJ, Couchman JR, Wu RR, Ninomiya Y, et al. Extracellular matrix alterations in human corneas with bullous keratopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1996;37(6):997-1007.
169. Petroll WM, Barry-Lane PA, Cavanagh HD, Jester JV. ZO-1 reorganization and myofibroblast transformation of corneal endothelial cells after freeze injury in the cat. *Exp Eye Res.* 1997;64(2):257-67.
170. Sabet MD, Gordon SR. Ultrastructural immunocytochemical localization of fibronectin deposition during corneal endothelial wound repair. Evidence for cytoskeletal involvement. *Biol Cell.* 1989;65(2):171-9.
171. Skalli O, Schurch W, Seemayer T, Lagace R, Montandon D, Pittet B, et al. Myofibroblasts from diverse pathologic settings are heterogeneous in their content of actin isoforms and intermediate filament proteins. *Lab Invest.* 1989;60(2):275-85.
172. Gospodarowicz D, Greenburg G, Alvarado J. Transplantation of cultured bovine corneal endothelial cells to rabbit cornea: clinical implications for human studies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1979;76(1):464-8.
173. Lagali N, Stenevi U, Claesson M, Fagerholm P, Hanson C, Weijdegard B, et al. Donor and recipient endothelial cell population of the transplanted human cornea: a two-dimensional imaging study. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010;51(4):1898-904.
174. Yuksel H, Turkcu FM, Ari S, Cinar Y, Cingu AK, Sahin M, et al. Anterior segment parameters of rabbits with rotating Scheimpflug camera. *Vet Ophthalmol.* 2015;18(3):210-3.
175. Jun AS, Chakravarti S, Edelhauser HF, Kimos M. Aging changes of mouse corneal endothelium and Descemet's membrane. *Exp Eye Res.* 2006;83(4):890-6.
176. Labbe A, Liang H, Martin C, Brignole-Baudouin F, Warnet JM, Baudouin C. Comparative anatomy of laboratory animal corneas with a new-generation high-resolution in vivo confocal microscope. *Curr Eye Res.* 2006;31(6):501-9.
177. Meyer LA, Ubels JL, Edelhauser HF. Corneal endothelial morphology in the rat. Effects of aging, diabetes, and topical aldose reductase inhibitor treatment. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1988;29(6):940-8.
178. Reichard M, Hovakimyan M, Wree A, Meyer-Lindenberg A, Nolte I, Junghans C, et al. Comparative in vivo confocal microscopical study of the cornea anatomy of different laboratory animals. *Curr Eye Res.* 2010;35(12):1072-80.
179. Doughty MJ. Analyses of areas and shapes of cells on the corneal surface of the albino rabbit by scanning electron microscopy. *Curr Eye Res.* 1990;9(4):295-306.
180. Sailstad DM, Peiffer RL, Jr. Specular microscopic observations of the corneal endothelium in the normal rabbit. *Lab Anim.* 1981;15(4):393-5.

181. Jackson AJ, Gardiner T, Archer DB. Morphometric analysis of corneal endothelial giant cells in normal and traumatized corneas. *Ophthalmic Physiol Opt.* 1995;15(4):305-10.
182. Tuft SJ, Williams KA, Coster DJ. Endothelial repair in the rat cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1986;27(8):1199-204.
183. Lee W, Miyagawa Y, Long C, Zhang M, Cooper DK, Hara H. Effect of Rho-kinase Inhibitor, Y27632, on Porcine Corneal Endothelial Cell Culture, Inflammation and Immune Regulation. *Ocul Immunol Inflamm.* 2015:1-15.
184. Fujita M, Mehra R, Lee SE, Roh DS, Long C, Funderburgh JL, et al. Comparison of proliferative capacity of genetically-engineered pig and human corneal endothelial cells. *Ophthalmic Res.* 2013;49(3):127-38.
185. Kim SY, Yang J, Lee YC. Safety of moxifloxacin and voriconazole in corneal storage media on porcine corneal endothelial cells. *J Ocul Pharmacol Ther.* 2010;26(4):315-8.
186. Schroeter J, Ruggeri A, Thieme H, Meltendorf C. Impact of temporary hyperthermia on corneal endothelial cell survival during organ culture preservation. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2015;253(5):753-8.
187. Majo F, Rochat A, Nicolas M, Jaoude GA, Barrandon Y. Oligopotent stem cells are distributed throughout the mammalian ocular surface. *Nature.* 2008;456(7219):250-4.
188. Ilmonen M, Lehtosalo JI, Virtanen J, Uusitalo H, Palkama A. Initial healing of the posterior corneal surface following perforating trauma in guinea pig: a scanning electron microscope study. *Acta Ophthalmol.* 1984;62(5):787-95.
189. Asano-Kato N, Toda I, Hori-Komai Y, Takano Y, Tsubota K. Epithelial ingrowth after laser in situ keratomileusis: clinical features and possible mechanisms. *Am J Ophthalmol.* 2002;134(6):801-7.
190. Hwang H, Kim M. Endothelial damage of a donor cornea depending on the donor insertion method during Descemet-stripping automated endothelial keratoplasty in porcine eyes. *Jpn J Ophthalmol.* 2009;53(5):523-30.
191. Sweatt AJ, Ford JG, Davis RM. Wound healing following anterior keratectomy and lamellar keratoplasty in the pig. *J Refract Surg.* 1999;15(6):636-47.
192. Brunette I, Rosolen SG, Carrier M, Abderrahman M, Nada O, Germain L, et al. Comparison of the pig and feline models for full thickness corneal transplantation. *Vet Ophthalmol.* 2011;14(6):365-77.
193. Bahn CF, Glassman RM, MacCallum DK, Lillie JH, Meyer RF, Robinson BJ, et al. Postnatal development of corneal endothelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1986;27(1):44-51.
194. Bartholomew LR, Pang DX, Sam DA, Cavender JC. Ultrasound biomicroscopy of globes from young adult pigs. *Am J Vet Res.* 1997;58(9):942-8.
195. Sanchez I, Martin R, Ussa F, Fernandez-Bueno I. The parameters of the porcine eyeball. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2011;249(4):475-82.

196. Faber C, Scherfig E, Prause J, Sorensen K. Corneal thickness in pigs measured by ultrasound pachymetry in vivo. *Scand J Lab Anim Sci.* 2008(35):39-43.
197. Schroeter J, Meltendorf C, Ohrloff C, Rieck P. Influence of temporary hypothermia on corneal endothelial cell density during organ culture preservation. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2008;246(3):369-72.
198. Meltendorf C, Ohrloff C, Rieck P, Schroeter J. Endothelial cell density in porcine corneas after exposure to hypotonic solutions. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2007;245(1):143-7.
199. Lee SE, Mehra R, Fujita M, Roh DS, Long C, Lee W, et al. Characterization of porcine corneal endothelium for xenotransplantation. *Semin Ophthalmol.* 2014;29(3):127-35.
200. Nicholls S, Bailey M, Mitchard L, Dick A. Can the corneal endothelium of the pig proliferate in vivo? *Acta Ophthalmol.* 2009(87):s244.
201. Gwon A. Chapter 14: The Primate in Cataract/IOL Surgery. In: Tsonis PA, editor. *Animal Models in Eye Research.* Dayton, OH: Elsevier; 2008. p. 205-208.
202. Zurawski CA, McCarey BE, van Rij G, Fernandes A. Corneal biometrics of the Rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *J Med Primatol.* 1989;18(6):461-6.
203. Kaufman PL, Calkins BT, Erickson KA. Ocular biometry of the cynomolgus monkey. *Curr Eye Res.* 1981;1(5):307-9.
204. Lapuerta P, Schein SJ. A four-surface schematic eye of macaque monkey obtained by an optical method. *Vision Res.* 1995;35(16):2245-54.
205. Ollivier FJ, Brooks DE, Komaromy AM, Kallberg ME, Andrew SE, Sapp HL, et al. Corneal thickness and endothelial cell density measured by non-contact specular microscopy and pachymetry in Rhesus macaques (*Macaca mulatta*) with laser-induced ocular hypertension. *Exp Eye Res.* 2003;76(6):671-7.
206. Matsubara M, Tanishima T. Wound-healing of corneal endothelium in monkey: an autoradiographic study. *Jpn J Ophthalmol.* 1983;27(3):444-50.
207. Van Horn DL, Hyndiuk RA. Endothelial wound repair in primate cornea. *Exp Eye Res.* 1975;21(2):113-24.
208. Koizumi N, Sakamoto Y, Okumura N, Tsuchiya H, Torii R, Cooper LJ, et al. Cultivated corneal endothelial transplantation in a primate: possible future clinical application in corneal endothelial regenerative medicine. *Cornea.* 2008;27(1):S48-55.
209. Insler MS, Lopez JG. Transplantation of cultured human neonatal corneal endothelium. *Curr Eye Res.* 1986;5(12):967-72.
210. Petroll WM, Jester JV, Barry-Lane P, Cavanagh HD. Assessment of f-actin organization and apical-basal polarity during in vivo cat endothelial wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1995;36(12):2492-502.
211. Petroll WM, Jester JV, Barry-Lane PA, Cavanagh HD. Effects of basic FGF and TGF beta 1 on F-actin and ZO-1 organization during cat endothelial wound healing. *Cornea.* 1996;15(5):525-32.

212. Petroll WM, Jester JV, Bean JJ, Cavanagh HD. Myofibroblast transformation of cat corneal endothelium by transforming growth factor-beta1, -beta2, and -beta3. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1998;39(11):2018-32.
213. Petroll WM, Ma L, Jester JV, Cavanagh HD, Bean J. Organization of junctional proteins in proliferating cat corneal endothelium during wound healing. *Cornea.* 2001;20(1):73-80.
214. Cohen KL, Tripoli NK, Cervantes G, Smith D. Cat endothelial morphology after corneal transplant. *Curr Eye Res.* 1990;9(5):445-50.
215. Lopatin DE, Van Poperin N, MacCallum DK, Meyer RF, Lillie JH. Changes in aqueous immunoglobulin and albumin levels following penetrating keratoplasty. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1989;30(1):122-31.
216. Ohno K, Mitooka K, Nelson LR, Hodge DO, Bourne WM. Keratocyte activation and apoptosis in transplanted human corneas in a xenograft model. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002;43(4):1025-31.
217. Ohno K, Nelson LR, Mitooka K, Bourne WM. Transplantation of cryopreserved human corneas in a xenograft model. *Cryobiology.* 2002;44(2):142-9.
218. Tripoli NK, Cohen KL, Proia AD. Cat keratoplasty wound healing and corneal astigmatism. *Refract Corneal Surg.* 1992;8(3):196-203.
219. Melles GR, Eggink FA, Lander F, Pels E, Rietveld FJ, Beekhuis WH, et al. A surgical technique for posterior lamellar keratoplasty. *Cornea.* 1998;17(6):618-26.
220. Shao C, Fu Y, Lu W, Fan X. Bone marrow-derived endothelial progenitor cells: a promising therapeutic alternative for corneal endothelial dysfunction. *Cells Tissues Organs.* 2011;193(4):253-63.
221. Carrington SD, Woodward EG. Corneal thickness and diameter in the domestic cat. *Ophthalmic Physiol Opt.* 1986;6(4):385-9.
222. Aubin ML, Powell CC, Gionfriddo JR, Fails AD. Ultrasound biomicroscopy of the feline anterior segment. *Vet Ophthalmol.* 2003;6(1):15-7.
223. Gilger BC, Davidson MG, Colitz CM. Experimental implantation of posterior chamber prototype intraocular lenses for the feline eye. *Am J Vet Res.* 1998;59(10):1339-43.
224. Gilger BC, Davidson MG, Howard PB. Keratometry, ultrasonic biometry, and prediction of intraocular lens power in the feline eye. *Am J Vet Res.* 1998;59(2):131-4.
225. Konrade KA, Hoffman AR, Ramey KL, Goldenberg RB, Lehenbauer TW. Refractive states of eyes and associations between ametropia and age, breed, and axial globe length in domestic cats. *Am J Vet Res.* 2012;73(2):279-84.
226. Moodie KL, Hashizume N, Houston DL, Hoopes PJ, Demidenko E, Tremblay BS, et al. Postnatal development of corneal curvature and thickness in the cat. *Vet Ophthalmol.* 2001;4(4):267-72.



227. Alario AF, Pirie CG. Intra and inter-user reliability of central corneal thickness measurements obtained in healthy feline eyes using a portable spectral-domain optical coherence tomography device. *Vet Ophthalmol.* 2013;16(6):446-50.
228. Gilger BC, Wright JC, Whitley RD, McLaughlin SA. Corneal thickness measured by ultrasonic pachymetry in cats. *Am J Vet Res.* 1993;54(2):228-30.
229. Bourne WM, Nelson LR, Buller CR, Huang PT, Geroski DH, Edelhauser HF. Long-term observation of morphologic and functional features of cat corneal endothelium after wounding. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1994;35(3):891-9.
230. Franzen AA, Pigatto JA, Abib FC, Albuquerque L, Laus JL. Use of specular microscopy to determine corneal endothelial cell morphology and morphometry in enucleated cat eyes. *Vet Ophthalmol.* 2010;13(4):222-6.
231. Huang PT, Nelson LR, Bourne WM. The morphology and function of healing cat corneal endothelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1989;30(8):1794-801.
232. Kafarnik C, Fritsche J, Reese S. In vivo confocal microscopy in the normal corneas of cats, dogs and birds. *Vet Ophthalmol.* 2007;10(4):222-30.
233. Ling TL, Vannas A, Holden BA. Long-term changes in corneal endothelial morphology following wounding in the cat. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1988;29(9):1407-12.
234. Rufer F, Schroder A, Erb C. White-to-white corneal diameter: normal values in healthy humans obtained with the Orbscan II topography system. *Cornea.* 2005;24(3):259-61.
235. Bawa G, Tkatchenko TV, Avrutsky I, Tkatchenko AV. Variational analysis of the mouse and rat eye optical parameters. *Biomed Opt Express.* 2013;4(11):2585-95.
236. Bhardwaj V, Rajeshbhai GP. Axial length, anterior chamber depth: a study in different age groups and refractive errors. *J Clin Diagn Res.* 2013;7(10):2211-2.
237. Doors M, Cruysberg LP, Berendschot TT, de Brabander J, Verbakel F, Webers CA, et al. Comparison of central corneal thickness and anterior chamber depth measurements using three imaging technologies in normal eyes and after phakic intraocular lens implantation. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2009;247(8):1139-46.
238. Elbaz U, Barkana Y, Gerber Y, Avni I, Zadok D. Comparison of different techniques of anterior chamber depth and keratometric measurements. *Am J Ophthalmol.* 2007;143(1):48-53.
239. Fontana ST, Brubaker RF. Volume and depth of the anterior chamber in the normal aging human eye. *Arch Ophthalmol.* 1980;98(10):1803-8.
240. Rabsilber TM, Khoramnia R, Auffarth GU. Anterior chamber measurements using Pentacam rotating Scheimpflug camera. *J Cataract Refract Surg.* 2006;32(3):456-9.
241. Schmucker C, Schaeffel F. In vivo biometry in the mouse eye with low coherence interferometry. *Vision Res.* 2004;44(21):2445-56.
242. Brown AS, Zhang M, Cucevic V, Pavlin CJ, Foster FS. In vivo assessment of postnatal murine ocular development by ultrasound biomicroscopy. *Curr Eye Res.* 2005;30(1):45-51.

243. Nissirios N, Ramos-Esteban J, Danias J. Ultrasound biomicroscopy of the rat eye: effects of cholinergic and anticholinergic agents. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2005;243(5):469-73.
244. Toni MC, Meirelles AE, Gava FN, Camacho AA, Laus JL, Canola JC. Rabbits' eye globe sonographic biometry. *Vet Ophthalmol*. 2010;13(6):384-6.
245. Henriksson JT, McDermott AM, Bergmanson JP. Dimensions and morphology of the cornea in three strains of mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009;50(8):3648-54.
246. Hayashi S, Osawa T, Tohyama K. Comparative observations on corneas, with special reference to Bowman's layer and Descemet's membrane in mammals and amphibians. *J Morphol*. 2002;254(3):247-58.
247. Nautscher N, Bauer A, Steffl M, Amselgruber WM. Comparative morphological evaluation of domestic animal cornea. *Vet Ophthalmol*. 2015.
248. Cafaro TA, Ortiz SG, Maldonado C, Esposito FA, Croxatto JO, Berra A, et al. The cornea of Guinea pig: structural and functional studies. *Vet Ophthalmol*. 2009;12(4):234-41.
249. Merindano MD, Costa J, Canals M, Potau JM, Ruano D. A comparative study of Bowman's layer in some mammals: Relationships with other constituent corneal structures. *Eur J Anat*. 2002;6(3):133-9.
250. MacCallum DK, Bahn CF, Lillie JH, Meyer RF, Martonyi CL. Evidence for corneal endothelial cell hypertrophy during postnatal growth of the cat cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1983;24(2):247-50.
251. Peiffer RL, Jr., DeVanzo RJ, Cohen KL. Specular microscopic observations of clinically normal feline corneal endothelium. *Am J Vet Res*. 1981;42(5):854-5.
252. Okumura N, Inoue R, Okazaki Y, Nakano S, Nakagawa H, Kinoshita S, et al. Effect of the Rho Kinase Inhibitor Y-27632 on Corneal Endothelial Wound Healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2015;56(10):6067-74.
253. Ichijima H, Petroll WM, Jester JV, Barry PA, Andrews PM, Dai M, et al. In vivo confocal microscopic studies of endothelial wound healing in rabbit cornea. *Cornea*. 1993;12(5):369-78.
254. Ichijima H, Jester JV, Petroll WM, Cavanagh HD. Laser and tandem scanning confocal microscopic studies of rabbit corneal wound healing. *Scanning*. 1994;16(5):263-8.
255. Gordon SR, Staley CA. Role of the cytoskeleton during injury-induced cell migration in corneal endothelium. *Cell Motil Cytoskeleton*. 1990;16(1):47-57.
256. Koizumi N, Okumura N, Ueno M, Nakagawa H, Hamuro J, Kinoshita S. Rho-associated kinase inhibitor eye drop treatment as a possible medical treatment for Fuchs corneal dystrophy. *Cornea*. 2013;32(8):1167-70.
257. Okumura N, Koizumi N, Kay EP, Ueno M, Sakamoto Y, Nakamura S, et al. The ROCK inhibitor eye drop accelerates corneal endothelium wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013;54(4):2493-502.

258. Okumura N, Koizumi N, Ueno M, Sakamoto Y, Takahashi H, Hirata K, et al. Enhancement of corneal endothelium wound healing by Rho-associated kinase (ROCK) inhibitor eye drops. *Br J Ophthalmol.* 2011;95(7):1006-9.
259. Alvarado JA, Gospodarowicz D, Greenburg G. Corneal endothelial replacement. I. In vitro formation of an endothelial monolayer. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1981;21(2):300-16.
260. Xu YG, Xu YS, Huang C, Feng Y, Li Y, Wang W. Development of a rabbit corneal equivalent using an acellular corneal matrix of a porcine substrate. *Mol Vis.* 2008;14:2180-9.
261. Brown SI, Kitano S. Pathogenesis of the retrocorneal membrane. *Arch Ophthalmol.* 1966;75(4):518-25.
262. Jakobiec FA, Bhat P. Retrocorneal membranes: a comparative immunohistochemical analysis of keratocytic, endothelial, and epithelial origins. *Am J Ophthalmol.* 2010;150(2):230-42.e2.
263. Sherrard ES, Rycroft PV. Retrocorneal membranes. I. Their origin and structure. *Br J Ophthalmol.* 1967;51(6):379-86.
264. Riento K, Ridley AJ. Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003;4(6):446-56.
265. Hall A. Rho family GTPases. *Biochem Soc Trans.* 2012;40(6):1378-82.
266. Zhou Q, Gensch C, Liao JK. Rho-associated coiled-coil-forming kinases (ROCKs): potential targets for the treatment of atherosclerosis and vascular disease. *Trends Pharmacol Sci.* 2011;32(3):167-73.
267. Liao JK, Seto M, Noma K. Rho kinase (ROCK) inhibitors. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2007;50(1):17-24.
268. Honjo M, Tanihara H, Inatani M, Kido N, Sawamura T, Yue BY, et al. Effects of rho-associated protein kinase inhibitor Y-27632 on intraocular pressure and outflow facility. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001;42(1):137-44.
269. Waki M, Yoshida Y, Oka T, Azuma M. Reduction of intraocular pressure by topical administration of an inhibitor of the Rho-associated protein kinase. *Curr Eye Res.* 2001;22(6):470-4.
270. Fukunaga T, Ikesugi K, Nishio M, Sugimoto M, Sasoh M, Hidaka H, et al. The effect of the Rho-associated protein kinase inhibitor, HA-1077, in the rabbit ocular hypertension model induced by water loading. *Curr Eye Res.* 2009;34(1):42-7.
271. Nishio M, Fukunaga T, Sugimoto M, Ikesugi K, Sumi K, Hidaka H, et al. The effect of the H-1152P, a potent Rho-associated coiled coil-formed protein kinase inhibitor, in rabbit normal and ocular hypertensive eyes. *Curr Eye Res.* 2009;34(4):282-6.
272. Wang RF, Williamson JE, Kopczynski C, Serle JB. Effect of 0.04% AR-13324, a ROCK, and norepinephrine transporter inhibitor, on aqueous humor dynamics in normotensive monkey eyes. *J Glaucoma.* 2015;24(1):51-4.

273. Yamamoto K, Maruyama K, Himori N, Omodaka K, Yokoyama Y, Shiga Y, et al. The novel Rho kinase (ROCK) inhibitor K-115: a new candidate drug for neuroprotective treatment in glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2014;55(11):7126-36.
274. Challa P, Arnold JJ. Rho-kinase inhibitors offer a new approach in the treatment of glaucoma. *Expert Opin Investig Drugs.* 2014;23(1):81-95.
275. Cholkar K, Trinh HM, Pal D, Mitra AK. Discovery of novel inhibitors for the treatment of glaucoma. *Expert Opin Drug Discov.* 2015;10(3):293-313.
276. Garnock-Jones KP. Ripasudil: first global approval. *Drugs.* 2014;74(18):2211-5.
277. Honjo M, Tanihara H, Kameda T, Kawaji T, Yoshimura N, Araie M. Potential role of Rho-associated protein kinase inhibitor Y-27632 in glaucoma filtration surgery. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007;48(12):5549-57.
278. Van de Velde S, Van Bergen T, Vandewalle E, Kindt N, Castermans K, Moons L, et al. Rho kinase inhibitor AMA0526 improves surgical outcome in a rabbit model of glaucoma filtration surgery. *Prog Brain Res.* 2015;220:283-97.
279. Li S, Wang C, Dai Y, Yang Y, Pan H, Zhong J, et al. The stimulatory effect of ROCK inhibitor on bovine corneal endothelial cells. *Tissue Cell.* 2013;45(6):387-96.
280. Pipparelli A, Arsenijevic Y, Thuret G, Gain P, Nicolas M, Majo F. ROCK inhibitor enhances adhesion and wound healing of human corneal endothelial cells. *PLoS One.* 2013;8(4):e62095.
281. Bi YL, Zhou Q, Du F, Wu MF, Xu GT, Sui GQ. Regulation of functional corneal endothelial cells isolated from sphere colonies by Rho-associated protein kinase inhibitor. *Exp Ther Med.* 2013;5(2):433-7.
282. Okumura N, Ueno M, Koizumi N, Sakamoto Y, Hirata K, Hamuro J, et al. Enhancement on primate corneal endothelial cell survival in vitro by a ROCK inhibitor. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009;50(8):3680-7.
283. Peh GS, Adnan K, George BL, Ang HP, Seah XY, Tan DT, et al. The effects of Rho-associated kinase inhibitor Y-27632 on primary human corneal endothelial cells propagated using a dual media approach. *Sci Rep.* 2015;5:9167.
284. Okumura N, Koizumi N, Ueno M, Sakamoto Y, Takahashi H, Hamuro J, et al. The new therapeutic concept of using a rho kinase inhibitor for the treatment of corneal endothelial dysfunction. *Cornea.* 2011;30(1):S54-9.
285. Short BG. Safety evaluation of ocular drug delivery formulations: techniques and practical considerations. *Toxicol Pathol.* 2008;36(1):49-62.
286. Heiligenhaus A, Steinmetz B, Lapuente R, Krallmann P, Althaus C, Steinkamp WK, et al. Recombinant tissue plasminogen activator in cases with fibrin formation after cataract surgery: a prospective randomised multicentre study. *Br J Ophthalmol.* 1998;82(7):810-5.
287. Wedrich A, Menapace R, Ries E, Polzer I. Intracameral tissue plasminogen activator to treat severe fibrinous effusion after cataract surgery. *J Cataract Refract Surg.* 1997;23(6):873-7.

288. Siatiri H, Beheshtnezhad AH, Asghari H, Siatiri N, Moghimi S, Piri N. Intracameral tissue plasminogen activator to prevent severe fibrinous effusion after congenital cataract surgery. *Br J Ophthalmol*. 2005;89(11):1458-61.
289. Zalta AH, Sweeney CP, Zalta AK, Kaufman AH. Intracameral tissue plasminogen activator use in a large series of eyes with valved glaucoma drainage implants. *Arch Ophthalmol*. 2002;120(11):1487-93.
290. Taylor MJ, Hunt CJ. Dual staining of corneal endothelium with trypan blue and alizarin red S: importance of pH for the dye-lake reaction. *Br J Ophthalmol*. 1981;65(12):815-9.
291. Landshman N, Ben-Hanan I, Assia E, Ben-Chaim O, Belkin M. Relationship between morphology and functional ability of regenerated corneal endothelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1988;29(7):1100-9.
292. Barak V, Goike H, Panaretakis KW, Einarsson R. Clinical utility of cytokeratins as tumor markers. *Clin Biochem*. 2004;37(7):529-40.
293. Kasper M, Stosiek P, Lane B. Cytokeratin and vimentin heterogeneity in human cornea. *Acta histochemica*. 1992;93(2):371-81.
294. Pronk A, Leguit P, Hoynck van Papendrecht AA, Hagelen E, van Vroonhoven TJ, Verbrugh HA. A cobblestone cell isolated from the human omentum: the mesothelial cell; isolation, identification, and growth characteristics. *In Vitro Cell Dev Biol*. 1993;29a(2):127-34.
295. Stosiek P, Kasper M, Conrad K. Immunohistochemistry of cytokeratin expression in human blood vessel endothelia with special reference to synovial connective tissue. *Acta histochemica*. 1990;89(1):61-6.
296. Sramek SJ, Wallow IH, Bindley C, Sterken G. Fibronectin distribution in the rat eye. An immunohistochemical study. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1987;28(3):500-5.
297. Kohno T, Sorgente N, Ishibashi T, Goodnight R, Ryan SJ. Immunofluorescent studies of fibronectin and laminin in the human eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1987;28(3):506-14.
298. Gordon SR. Changes in distribution of extracellular matrix proteins during wound repair in corneal endothelium. *J Histochem Cytochem*. 1988;36(4):409-16.
299. Gordon SR. Fibronectin antibody labels corneal stromal collagen fibrils in situ along their length and circumference and demonstrates distinct staining along the cell and stromal interfaces of Descemet's membrane. *Curr Eye Res*. 2014;39(3):312-6.
300. 2013 Eye Banking Statistical Report. Washington, DC: Eye Bank Association of America, 2014.
301. Poinard C, Tuppin P, Loty B, Delbosc B. [The French national waiting list for keratoplasty created in 1999: patient registration, indications, characteristics, and turnover]. Article in French. *J Fr Ophtalmol*. 2003;26(9):911-9.
302. Reinhard T, Bohringer D, Bogen A, Sundmacher R. The transplantation law: a chance to overcome the shortage of corneal grafts in Germany? *Transplant Proc*. 2002;34(4):1322-4.

303. Sony P, Sharma N, Sen S, Vajpayee RB. Indications of penetrating keratoplasty in northern India. *Cornea*. 2005;24(8):989-91.
304. Chu W. The past twenty-five years in eye banking. *Cornea*. 2000;19(5):754-65.
305. Bohringer D, Bohringer S, Poxleitner K, Birnbaum F, Schwartzkopff J, Maier P, et al. Long-term graft survival in penetrating keratoplasty: the biexponential model of chronic endothelial cell loss revisited. *Cornea*. 2010;29(10):1113-7.
306. Guerra FP, Anshu A, Price MO, Giebel AW, Price FW. Descemet's membrane endothelial keratoplasty: prospective study of 1-year visual outcomes, graft survival, and endothelial cell loss. *Ophthalmol*. 2011;118(12):2368-73.
307. Lass JH, Sugar A, Benetz BA, Beck RW, Dontchev M, Gal RL, et al. Endothelial cell density to predict endothelial graft failure after penetrating keratoplasty. *Arch Ophthalmol*. 2010;128(1):63-9.
308. Patel SV, Hodge DO, Bourne WM. Corneal endothelium and postoperative outcomes 15 years after penetrating keratoplasty. *Am J Ophthalmol*. 2005;139(2):311-9.
309. Price MO, Price FW, Jr. Endothelial cell loss after descemet stripping with endothelial keratoplasty influencing factors and 2-year trend. *Ophthalmol*. 2008;115(5):857-65.
310. Terry MA, Chen ES, Shamie N, Hoar KL, Friend DJ. Endothelial cell loss after Descemet's stripping endothelial keratoplasty in a large prospective series. *Ophthalmol*. 2008;115(3):488-96.e3.
311. Tourtas T, Laaser K, Bachmann BO, Cursiefen C, Kruse FE. Descemet membrane endothelial keratoplasty versus descemet stripping automated endothelial keratoplasty. *Am J Ophthalmol*. 2012;153(6):1082-90.e2.
312. Anshu A, Price MO, Price FW, Jr. Risk of corneal transplant rejection significantly reduced with Descemet's membrane endothelial keratoplasty. *Ophthalmol*. 2012;119(3):536-40.
313. Okumura N, Kinoshita S, Koizumi N. Cell-based approach for treatment of corneal endothelial dysfunction. *Cornea*. 2014;33(11):S37-41.
314. Yoeruek E, Spitzer MS, Tatar O, Biedermann T, Grisanti S, Luke M, et al. Toxic effects of recombinant tissue plasminogen activator on cultured human corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008;49(4):1392-7.
315. Boulze Pankert M, Goyer B, Zaguia F, Bareille M, Perron MC, Liu X, et al. Biocompatibility and functionality of a tissue-engineered living corneal stroma transplanted in the feline eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014.
316. Jabs DA, Nussenblatt RB, Rosenbaum JT. Standardization of uveitis nomenclature for reporting clinical data. Results of the First International Workshop. *Am J Ophthalmol*. 2005;140(3):509-16.
317. Matsuda M, Bourne WM. Long-term morphologic changes in the endothelium of transplanted corneas. *Arch Ophthalmol*. 1985;103(9):1343-6.

318. McCarey BE, Edelhauser HF, Lynn MJ. Review of corneal endothelial specular microscopy for FDA clinical trials of refractive procedures, surgical devices, and new intraocular drugs and solutions. *Cornea*. 2008;27(1):1-16.
319. Michels RG, Kenyon KR, Maumence AE. Retrocorneal fibrous membrane. *Invest Ophthalmol*. 1972;11(10):822-31.
320. Honda H, Ogita Y, Higuchi S, Kani K. Cell movements in a living mammalian tissue: long-term observation of individual cells in wounded corneal endothelia of cats. *J Morphol*. 1982;174(1):25-39.
321. Miyamoto T, Sumioka T, Saika S. Endothelial mesenchymal transition: a therapeutic target in retrocorneal membrane. *Cornea*. 2010;29(1):S52-6.
322. Silbert AM, Baum JL. Origin of the retrocorneal membrane in the rabbit. *Arch Ophthalmol*. 1979;97(6):1141-3.
323. Dunn SP, Gal RL, Kollman C, Raghinaru D, Dontchev M, Blanton CL, et al. Corneal graft rejection 10 years after penetrating keratoplasty in the cornea donor study. *Cornea*. 2014;33(10):1003-9.
324. Guilbert E, Bullet J, Sandali O, Basli E, Laroche L, Borderie VM. Long-term rejection incidence and reversibility after penetrating and lamellar keratoplasty. *Am J Ophthalmol*. 2013;155(3):560-9.e2.
325. Olson MF, Ashworth A, Hall A. An essential role for Rho, Rac, and Cdc42 GTPases in cell cycle progression through G1. *Science*. 1995;269(5228):1270-2.
326. Zhang L, Valdez JM, Zhang B, Wei L, Chang J, Xin L. ROCK inhibitor Y-27632 suppresses dissociation-induced apoptosis of murine prostate stem/progenitor cells and increases their cloning efficiency. *PloS One*. 2011;6(3):e18271.
327. Olson MF. Applications for ROCK kinase inhibition. *Curr Opin Cell Biol*. 2008;20(2):242-8.
328. Okumura N, Nakano S, Kay EP, Numata R, Ota A, Sowa Y, et al. Involvement of cyclin D and p27 in cell proliferation mediated by ROCK inhibitors Y-27632 and Y-39983 during corneal endothelium wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014;55(1):318-29.
329. Van Herick W, Shaffer RN, Schwartz A. Estimation of width of angle of anterior chamber. Incidence and significance of the narrow angle. *Am J Ophthalmol*. 1969;68(4):626-9.
330. The Standardization of Uveitis Nomenclature (SUN) Working Group. Standardization of nomenclature for reporting clinical data. Results of the First International Workshop. *Am J Ophthalmol*. 2005;140(3):509-16.

# Annexe 1: Protocole de mise en suspension de CEC cultivées

## CEC-CA\_PROTOCOLE DE MISE EN SUSPENSION DE CEC CULTIVÉES

VERSION 17/02/2014

### À L'ARRIVÉE DES CULTURES CELLULAIRES AU LABORATOIRE :

1. Allumer la hotte à flux laminaire environ 30 min avant de commencer à travailler.
2. Les flacons de culture (T25) contenant les cellules endothéliales arrivent en position verticale. Pour pouvoir les entreposer :
  - a. Sous la hotte à flux laminaire allumée et stérile, avec une pipette 10 mL, enlever le milieu de culture du flacon T25.
  - b. Changer de pipette. Ajouter 5 mL de milieu de culture frais au flacon.
  - c. Changer le bouchon du flacon pour un bouchon ventilé. Si le goulot du flacon est mouillé, essuyer l'extérieur du goulot avec un tampon d'alcool avant de mettre le bouchon ventilé.
  - d. Entreposer les flacons en position horizontale à 37°C dans l'incubateur.

**Attention :** S'assurer que le milieu de culture ne touche pas au bouchon ventilé lors du transfert du flacon de la hotte à l'incubateur. Si c'est le cas, essuyer l'extérieur du goulot avec un tampon d'alcool et changer le bouchon.
3. Laisser la hotte à flux laminaire allumée.

*N.B. : Si hotte utilisée par d'autres personnes, laisser une note « NE PAS ÉTEINDRE » sur la vitre de la hotte.*

### AVANT DE COMMENCER :

1. En arrivant au laboratoire le matin, vérifier que la hotte est allumée et stérile et que la centrifugeuse est à 21°C.
2. Placer le milieu de culture, le BSS et la trypsine dans un bain d'eau chaude et les garder ainsi pendant environ 30 minutes (ou jusqu'à ce qu'ils soient à la température de la pièce).

**Attention :** S'assurer que le niveau d'eau est inférieur au niveau des goulots des contenants placés dans le bain.
3. Après avoir désinfecté tout le matériel nécessaire avec de l'alcool 70%, le placer sous la hotte.
4. Récupérer le flacon de culture contenant les cellules endothéliales de l'incubateur.
5. Observer les cellules au microscope de culture. Prendre en note leur morphologie et leur confluence (i.e. le pourcentage d'occupation du pétri). Rechercher une contamination éventuelle, la documenter si c'est le cas et prendre les mesures nécessaires.

### SUSPENSION DES CELLULES ENDOTHÉLIALES :

- Attention :** Travailler toujours au milieu de la hotte à flux laminaire.  
Ne pas passer par dessus un contenant ouvert (i.e. travailler de biais).  
Changer de pipette (ou de tip, dans le cas d'une micropipette) avant une nouvelle utilisation :
- si celle-ci a été en contact avec du non-stérile, ou
  - si elle a été utilisée pour aspirer des cellules.

1. Désinfecter la surface du flacon T25 avec de l'alcool 70%, tout en évitant de vaporiser de l'alcool sur le bouchon. Placer le flacon au milieu de l'espace de travail sous la hotte à flux laminaire.
2. Trypsiner la culture de cellules endothéliales :
  - a. Avec une pipette de 10 mL, aspirer le vieux milieu de culture du flacon T25.
  - b. Changer de pipette. Mélanger la trypsine dans son tube.
  - c. Prélever 2 mL de trypsine avec la pipette et l'ajouter au flacon de culture. Rincer les cellules. Aspirer ce milieu.



- d. Changer de pipette. Prélever un autre 2 mL de trypsine et l'ajouter au flacon T25.
- e. Placer le flacon dans l'incubateur à 37°C pour 5 minutes.
- f. Récupérer le flacon et observer les cellules au microscope afin de s'assurer qu'elles sont détachées (i.e. flottantes). Si « non », remettre le flacon dans l'incubateur pour 2 min et pendre en note ce temps additionnel. Possibilité de changer la trypsine une 2<sup>e</sup> fois.

*N.B. : Taper légèrement le flacon sur le comptoir aide à faire décoller les cellules plus « accrochantes ».*

3. Avec une nouvelle pipette 10 mL, prélever 2 mL de milieu de culture frais et l'ajouter au flacon T25 pour neutraliser la trypsine.  
*N.B. : La quantité de milieu de culture ajoutée doit être équivalente à la quantité de trypsine ajoutée en (d).*
4. Avec la même pipette, aspirer tout le contenu du flacon T25 et le placer dans un tube 50 mL.
5. Changer de pipette. Ajouter 2 mL de milieu de culture frais au flacon T25. Rincer, aspirer le contenu du flacon et l'ajouter au tube 50 mL contenant maintenant les cellules endothéliales.
6. Vérifier au microscope qu'il ne reste plus de cellules dans le flacon T25. S'il en reste, répéter l'étape (5) et prendre en note le volume additionnel de milieu de culture utilisé pour ce rinçage.
7. Avec une pipette 10 mL, mélanger les cellules contenues dans le tube de 50 mL. Prélever 200 µL de cellules bien homogénéisées dans un Eppendorf.
8. Centrifuger les deux tubes (50 mL) pour 5 minutes (réglages : 1 300 RPM, 216 rotor, 21°C).
9. Pendant ce temps, effectuer un décompte cellulaire :
  - a. Ajouter 200 µL de bleu de trypan au tube d'Eppendorf. Mélanger le contenu du tube avec la micropipette.
  - b. Aspirer le 10 µL et le placer dans l'hématimètre sans forcer.
  - c. Placer l'hématimètre sous le microscope pour compter les cellules.
    - i. Observer chacune des moitiés de l'hématimètre se présentant sous forme de tableaux A et B (*voir image ci-bas*).
    - ii. Compter les cellules dans chacun des carreaux marqués par X dans l'image ci-bas pour le Tableau A et B respectivement et prendre en note le décompte.

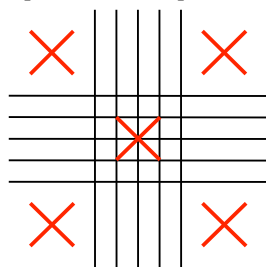


Tableau A

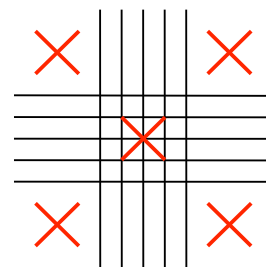


Tableau B

- iii. Calculer les totaux A et B :

Total A = somme des décomptes cellulaires dans les 5 carreaux marqués par X dans le Tableau A.

Total B = somme des décomptes cellulaires dans les 5 carreaux marqués par X dans le Tableau B.

10. Calculer le volume de BSS:ROCKi à ajouter aux cellules pour avoir le nombre désiré de cellules à injecter dans la seringue :

Nombre total de cellules dans le Falcon (somme des 10 carrés) x 2 x 1000 x 5,8 mL  
= Total cellules  
= (Total A + Total B) x (2) x (1 000) x (Volume total, *incluant les rinçages*, de trypsine et de milieu de culture ajouté aux cellules = ici, 6 ml)

Nombre de cellules à injecter  
= 200 000 ou 1 000 000

Quantité de liquide à injecter  
= 0.2 mL

Quantité de BSS:ROCKi à ajouter aux cellules dans le tube 50 mL  
= X  
= (Total cellules) x (Quantité de liquide à injecter) ÷ (Nombre de cellules à injecter)  
= (Total cellules) x (0.2 mL) ÷ (200 000 ou 1 000 000)

11. Préparer la concentration désirée de ROCKi :

Concentration initiale de ROCKi = 1000 µM ou 1 mM

- a. Avec une pipette 10 mL, placer 1.8 mL de BSS dans un tube 50 mL.
- b. Avec une micropipette, ajouter le contenu de chacun des 2 aliquots de ROCKi à ce tube.  
*N.B. : On obtient une concentration finale de ROCKi de 100 µM.*
- c. Filtrer le contenu du tube 15 mL (4 mL de BSS:ROCKi) en utilisant un filtre 0.22 µm dans un nouveau tube 15 mL.

12. Avec une pipette 10 mL, enlever le surnageant du tube 50 mL contenant les cellules endothéliales centrifugées.  
Utiliser une micropipette pour enlever l'excès de surnageant.

**Resuspendre cellules dans BSS :ROCKi**

13. Changer de tip. Ajouter le volume de BSS:ROCKi calculé en (9) au tube 50 mL contenant les cellules endothéliales.  
Secouer légèrement le tube, tout en évitant de produire des bulles.
14. Changer de tip. Prélever 200 µL de cellules suspendues dans le ROCKi:BSS et les placer dans un tube d'Eppendorf 1.5 mL.
15. Avec une seringue 1 cc et une aiguille 20 gauge, aspirer 0.1 cc d'air puis aspirer tout le contenu de ce tube d'Eppendorf, puis 1 cc d'air.
16. Amener la seringue en salle de chirurgie (Cristina m'amène le plat) dans plat de trempage stérile (déballer **sous la hotte**, y placer la seringue avec les cellules et réemballer sans sceller).

# Annexe 2: Protocole chirurgical

CEC-CA\_PROTOCOLE OPÉRATOIRE

VERSION 28/02/2014

Date : \_\_\_\_\_ GLPX: \_\_\_\_\_ OD: \_\_\_ OS: \_\_\_

**Intervention:** début (ouverture) \_\_\_\_\_:\_\_\_\_\_ fin (retrait du spéculum) \_\_\_\_\_:\_\_\_\_\_ durée: \_\_\_\_\_

**Anesthésie:** début (intubation) \_\_\_\_\_:\_\_\_\_\_ fin (extubation) \_\_\_\_\_:\_\_\_\_\_ durée: \_\_\_\_\_

**Commentaires concernant l'anesthésie :**

**Chirurgien(s) :** \_\_\_\_\_ **Assistant(s) interne(s) :** \_\_\_\_\_

**Équipe de l'animalerie :** \_\_\_\_\_

**Suspension des cellules endothéliales à injecter :** \_\_\_\_\_

Ouverture de matériel stérile : \_\_\_\_\_ Préparation injectables : \_\_\_\_\_

Navette SOP-incubateur/labo : \_\_\_\_\_ Prise de notes : \_\_\_\_\_

Microscope et photos/vidéos per-op : \_\_\_\_\_ Soluté en externe: \_\_\_\_\_

## Protocole opératoire :

Constriction médicamenteuse à l'arrivée de l'animal dans la salle. Fait par: \_\_\_\_\_

\_\_ 1 gttes q 15 min x 2

\_\_ pilocarpine 2% \_\_ adéquate \_\_ insuffisante

\_\_ Voltaren: \_\_ 1 gtte q 5 min x 3 Fait par: \_\_\_\_\_

Badigeon Bétadine 0.5% & quelques gouttes dans les culs de sac 0.5%. Fait par: \_\_\_\_\_

Mise en place des champs et de l'écarteur à paupières.

Injections juxtabulbaires :

\_\_ Tobramycin (10 mg / 0.25 ml) Préparé par: \_\_\_\_\_ Injecté ss.conj. par: \_\_\_\_\_

\_\_ Cefazolin (55 mg / 0.25 ml) Préparé par: \_\_\_\_\_ Injecté ss.conj. par: \_\_\_\_\_

\_\_ Dexamethasone (1.2 mg / 0.3 ml) Préparé par: \_\_\_\_\_ Injecté ss.conj. par: \_\_\_\_\_

Marquage de la zone centrale à désendothélialiser :

\_\_ Hanna 7 mm usagé et émoussé

\_\_ crayon Royal régulier (bleu)

Incision limbique avec couteau 20. **Heure (hh:mm) :** \_\_\_\_\_

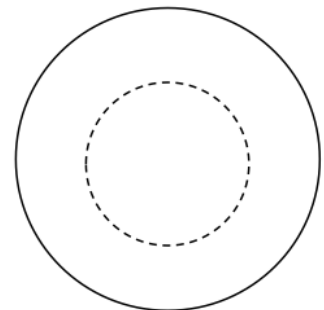
Miochol-E : \_\_ oui \_\_ non

Pelage endothélial en dedans de la zone marquée.

\_\_ scraper (Terry avec irrigation)

\_\_ sous irrigation continue

\_\_ commentaires :



- degré de manipulations des tissus :      \_\_léger \_\_modéré \_\_sévère
- lésion de la Descemet:      \_\_aucune perçue \_\_léger \_\_modéré \_\_sévère
- lésion du stroma:      \_\_aucune perçue \_\_léger \_\_modéré \_\_sévère

Rinçage de la chambre antérieure avec BSS en tentant d'occlure le site d'entrée par positionnement tangentiel de la canule:

- \_\_ irrigation manuelle
- \_\_ irrigation continue
- \_\_ canule 27

Fermeture de la plaie :

- \_\_ **Heure (hh:mm) :** \_\_\_\_\_
- \_\_ Points séparés (nombre total)
- \_\_ N10.0 aiguille CU1 30 cm/Alcon

Vérification de l'étanchéité de la plaie.

Positionnement de l'animal sur le côté, iris perpendiculaire au sol, tout en préservant la stérilité.

\_\_Alteplase:

- concentration dans la seringue :      \_\_\_\_\_ µg/ml
- volume injecté :      \_\_\_\_\_ ml
- quantité totale injectée :      \_\_\_\_\_ µg
- volume estimé CA :      \_\_\_\_\_ ml
- concentration estimée dans la CA avant l'injection des cellules :      \_\_\_\_\_ µg / ml
- **concentration estimée dans la CA en fin d'intervention :**      \_\_\_\_\_ µg / ml

Injection de cellules endothéliales dans la CA par la plaie :

- \_\_ **Heure (hh:mm) :** \_\_\_\_\_
- \_\_ seringue 1cc préparée sous hotte en per-opératoire
- \_\_ canule 30
- \_\_ cellules injectées dans l'angle contralatéral (loin du cristallin et de l'iris)
- \_\_ volume de liquide injecté:      \_\_\_\_\_ ml
- \_\_ nombre de cellules injectées:      \_\_\_\_\_ cellules
- \_\_ ROCKi:

- concentration dans la seringue :      \_\_\_\_\_ µg/ml
- volume injecté :      \_\_\_\_\_ ml
- quantité totale injectée :      \_\_\_\_\_ µg
- volume estimé CA :      \_\_\_\_\_ ml
- **concentration estimée dans la CA en fin d'intervention :**      \_\_\_\_\_ µg / ml

Positionnement de l'animal cornée-vers-le-bas, iris parallèle au sol :

- **Heure (hh:mm) :** \_\_\_\_\_
- stérilité préservée      \_\_oui \_\_non
- position adéquate :      \_\_oui \_\_non
- difficultés d'intubation :      \_\_oui \_\_non
- commentaires :

Redressement de l'animal.      **Heure (hh:mm) :** \_\_\_\_\_

Œdème central :   \_\_non \_\_oui \_\_léger \_\_modéré \_\_sévère

- \_\_ Tobradex onguent
- \_\_ Collier élizabéthain

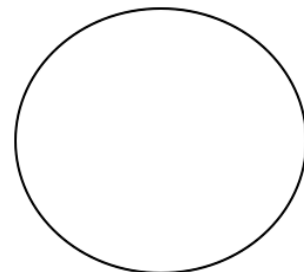
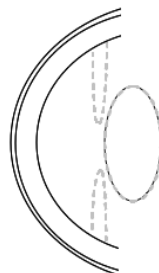
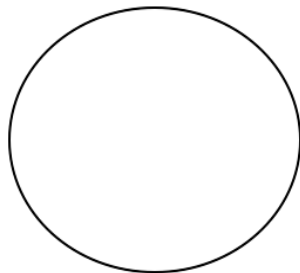
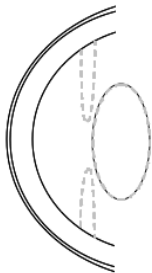
# Annexe 3: Feuillet de suivi clinique

## CEC-CA\_FEUILLET DE SUIVI CLINIQUE

VERSION 18/02/2014

GLPX : \_\_\_\_\_ Examen par : \_\_\_\_\_ Date : \_\_\_\_\_ Jour # : \_\_\_\_\_ Sem # : \_\_\_\_\_

OEIL DROIT (EXPÉRIMENTAL)		__LAF fixe HMR __LAF portable	OEIL GAUCHE (CONTRÔLE)
		<b>Pachymétrie centrale</b> (µm) __Tomey SP3000 __Pachette	
		<b>TIO</b> (mmHg) (TonoVet)	
		Sécrétions oculaires (0-2)	
		Plaie (0-3) & sutures (0-2)	
Receveur	Zone greffée	<b>CORNÉE</b>	
		<b>Transparence</b> (0-4)	
		<b>Vascularisation</b> (Oui/Non)	
		<b>Épithélium</b> (% On/Off)	
		<b>Membrane de Descemet</b> Plis (Oui/Non)	
		<b>Endothélium</b> Agrégats de CEC (0-2) Cristaux/arc-en-ciel (Oui/Non) KPs (Oui/Non) KPs limités à la greffe (Oui/Non)	
		<b>Fibrose</b> (0-2)	
		<b>CHAMBRE ANTÉRIEURE</b>	
		Cellules inflammatoires (0-4)	
		Tyndall (0-4)	
		Membrane de fibrine (aspect, épaisseur)	
		<b>IRIS</b>	
		Dépôts (CEC) (0-2)	
		Synéchies (étendue totale en degrés)	
		<b>CRISTALLIN</b>	
		Dépôts (CEC) (0-2)	
		Vacuoles (0-2)	
		Opacité corticale (0-2)	



**CONCLUSIONS / COMMENTAIRES:**

**Sédation :**  Oui  Non  Dexdomitor  Kétamine Posologie : \_\_\_\_\_

**Constriction :**  Oui  Non  Pilocarpine 0.5%  Autre : Posologie : \_\_\_\_\_

Vascularisation du receveur	non: ___ oui: ___ stable: ___	aggravation: ___	amélioration: ___
Vascularisation du greffon	non: ___ oui: ___ stable: ___	aggravation: ___	amélioration: ___
Inflammation intraoculaire	non: ___ oui: ___ stable: ___	aggravation: ___	amélioration: ___
Rejet actif de la greffe	non: ___ oui: ___ probable: ___	possible : ___	non applicable: ___
Échec de la greffe	non: ___ oui: ___ probable: ___	non applicable: ___	
Complications	non: ___ oui: ___ probable: ___		
IB avisée	non: ___ oui: ___ n/a: ___		

**CONDUITE:**

Signature: \_\_\_\_\_

**Prescriptions :**

## Annexe 4: Lexique des classifications pour le suivi clinique

CEC-CA\_LEXIQUE DES CLASSIFICATIONS  
VERSION 03/09/2013

### Pachymétrie

Prendre la mesure centrale du greffon si opéré, sinon, de la cornée. Si la machine indique ‘out of range’, l’inscrire. S’il est impossible de prendre la mesure pour une autre raison, inscrire imprenable et la raison. Si la mesure n’a pas été effectuée, inscrire non fait.

### Échelle de description de la plaie opératoire

- 0: déhiscence de plaie
- 1: absence de cicatrices
- 2: cicatrices légères
- 3: cicatrices sévères

### Échelle de description de l’état des sutures

- 0: bien en place
- 1: lâches (au moins un point lâche)
- 2: cassées (au moins un point cassé)

### Meilleure transparence dans zone greffée et receveur (Échelle adaptée de Proulx et al.<sup>89</sup>)

- 4/4: Cornée claire, détails iridiens visibles
- 3/4: Opacité légère, détails iridiens visibles
- 2/4: Opacité modérée, détails iridiens moins visibles, contour iridien visible
- 1/4: Opacité plus sévère, détails iridiens non visibles, mais contour iridien visible
- 0/4: Cornée blanche, aucun détail iridien, contour iridien non visible

### Classification de la vascularisation cornéenne superficielle ou profonde

- 0: absence
- 1:  $\leq 1$  quadrant (i.e. on retrouve une vascularisation dans un seul quadrant, où qu’il soit. Un quadrant = 90 degrés)
- 2:  $\leq 2$  quadrants
- 3:  $\leq 3$  quadrants
- 4:  $\leq 4$  quadrants

### S’il y a lieu, inscrire le degré de perfusion

- 0 : fantôme (non perfusé)
- 1 : actif à bas débit
- 2 : actif à haut débit

### Classification des sécrétions oculaires

- 0: absentes
- 1: discrètes
- 2: modérées

### **Échelle de gradation des agrégats de CEC (au niveau de l'endothélium, iris ou cristallin)**

0 : absents

1 : amas de cellules

2 : plaque ou membrane de CEC

### **Échelle de gradation de la fibrose**

0 : absente

1 : légère

2 : sévère

### **Classification de la profondeur de la chambre antérieure**

(Adaptée de Van Herrick<sup>329</sup> pour le modèle félin, dont la chambre antérieure est plus profonde que celles des humains<sup>222-225</sup>)

Mesurer la CA près de l'angle en temporal à une distance d'une épaisseur de cornée du limbe.

0: Absence de chambre antérieure

1: profondeur  $\leq 1$  épaisseur de cornée

2: profondeur  $\leq 2$  épaisseurs de cornée

3: profondeur  $\leq 3$  épaisseurs de cornée

4: profondeur  $\leq 4$  épaisseurs de cornée

<b>Grade</b> <sup>330</sup>	<b>Cellules (fente 1x1 mm)</b>	<b>Tyndall</b>
0	<1	Aucun
0.5+	1-5	
1+	6-15	Léger
2+	16-25	Modéré (détails de l'iris et du cristallin clairs)
3+	26-50	Marqué (détails de l'iris et du cristallin flous)
4+	>50	Intense (fibrine ou humeur acqueuse plasmôïde)

### **Cristallin: Vacuoles et opacité corticale**

0: absence

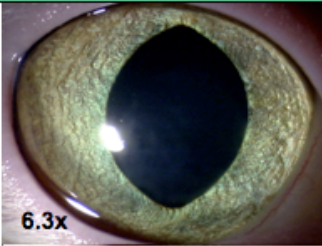
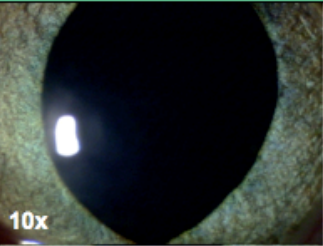
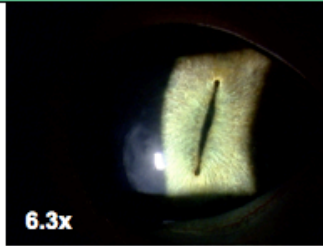
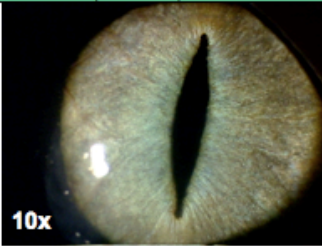
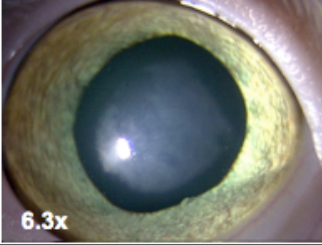
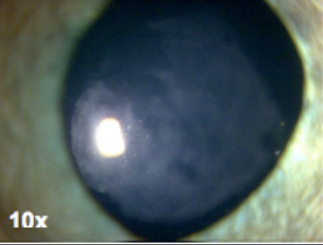
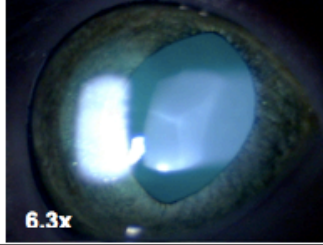

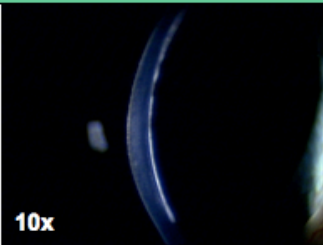


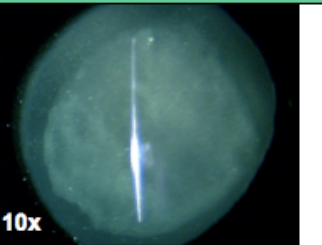
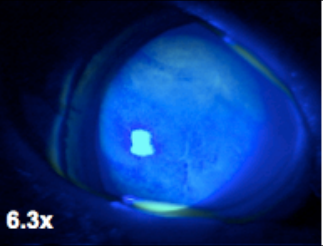
1: léger

2: important



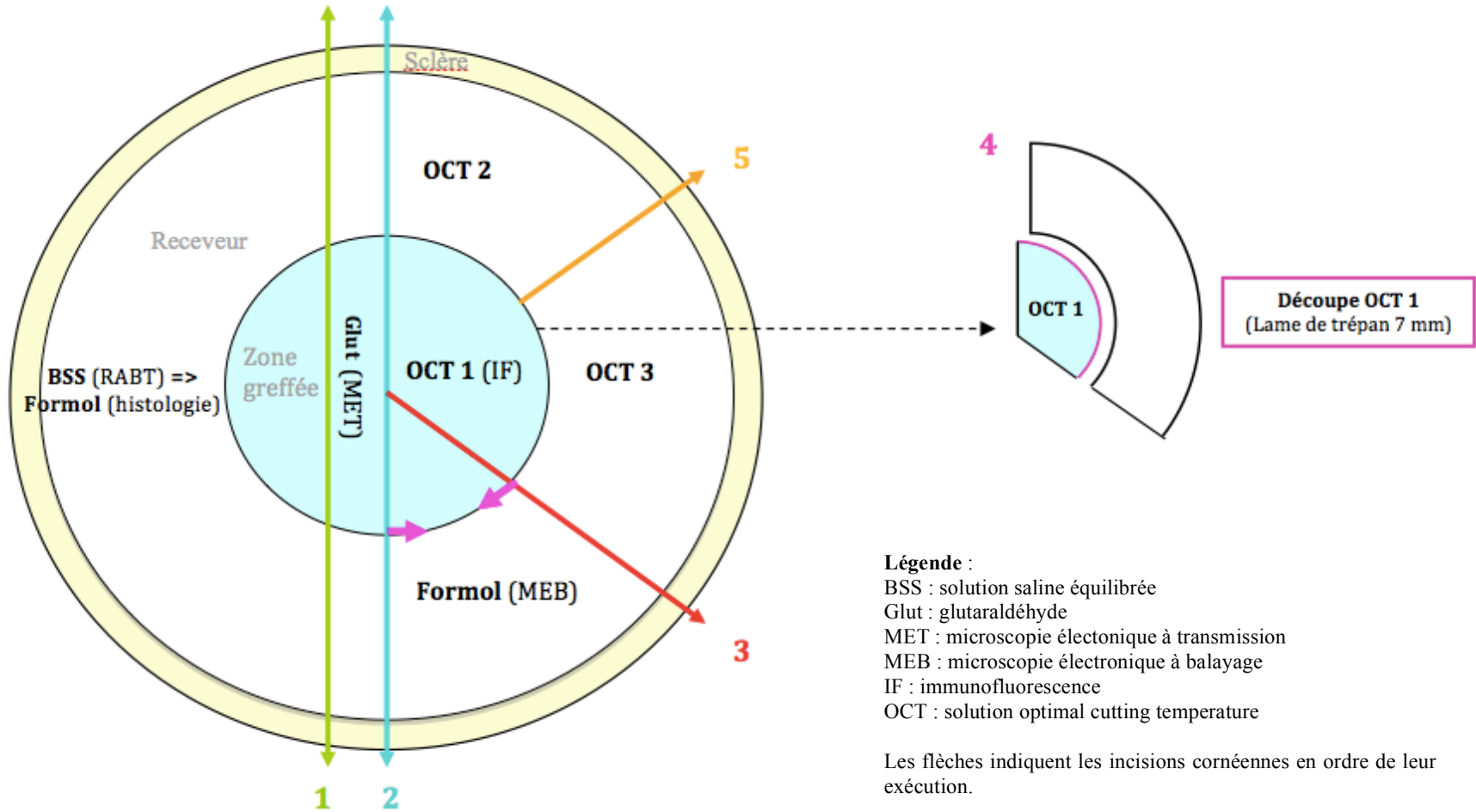
# Annexe 5: Protocole de photographie à la lampe à fente

CEC-CA\_PROTOCOL DE PHOTOGRAPHIE À LA LAMPE À FENTE  
VERSION 14/02/2014

Vue de face avec diffuseur		Vue de face sans diffuseur (en fente)	
Focus sur iris	 6.3x	 10x	Focus sur iris
			 6.3x
			 10x
Focus sur cornée	 6.3x	 10x	Focus sur cristallin
			 6.3x
			 10x
Fente fine centrale		Rétro-illumination	
	 10x		 6.3x
	 16x		 10x
Photos avec fluorescéine			
		 6.3x	

# Annexe 6: Distribution du tissu cornéen pour les tests histopathologiques

CEC-CA\_PROTOCOLE DE DISTRIBUTION DES TISSUS POUR HISTOPATHOLOGIE  
VERSION 07/03/2014



## Annexe 7: Prise de photos au stéréomicroscope

CEC-CA\_PROTOCOLE DE PRISE DE PHOTOS AU STÉRÉOMICROSCOPE DISCOVERY.V12  
VERSION 26/08/2013

\*\*\* Se familiariser avec le mode d'emploi du stéréomicroscope avant de commencer.

\*\*\* Les étapes suivantes se font avec ou sans coloration selon le protocole.

1. Démarrer l'ordinateur et le stéréomicroscope.
2. S'assurer d'avoir le bon spécimen. Placer le bouton cornéo-scléral dans un pétri et y ajouter du BSS frais jusqu'à ce qu'il soit immergé.  
**Attention** : Utiliser une pince pour manipuler le spécimen. Essayer de l'agripper par l'encoche de sclère en évitant le plus possible de toucher à la cornée.
3. Installer le pétri au centre de la platine du microscope. **Utiliser la platine pour ajuster la position du spécimen; ne pas déplacer le spécimen directement.**
4. S'assurer d'utiliser l'objectif 1.5X. Ajuster le grossissement à 15X et mettre au point l'image.
5. Prendre en note la position de la cornée sous le microscope :
  - Indiquer 12h par un crochet.
  - Indiquer les points de suture (encoche sclérale) par 2 crochets.**Attention** : Éviter dorénavant de tourner la cornée sur elle-même pour maintenir ces points-repère dans cette position jusqu'à la fin de la prise de photos.
6. Ajuster l'éclairage et le prendre en note. Une fois l'image optimale obtenue, prendre 3 photos au centre. **S'assurer de la qualité des images; si insatisfaisante, prendre des photos additionnelles.**

### Important :

- ✓ Sauvegarder chaque photo en format « .zvi » **et** en format « .tif »
- ✓ Nommer les photos selon la formule suivante :  
ID\_OD/OS\_Date chx\_E2invivo\_temps adhésion\_centre/périphérie\_grossissement\_No. photo\_STEREO

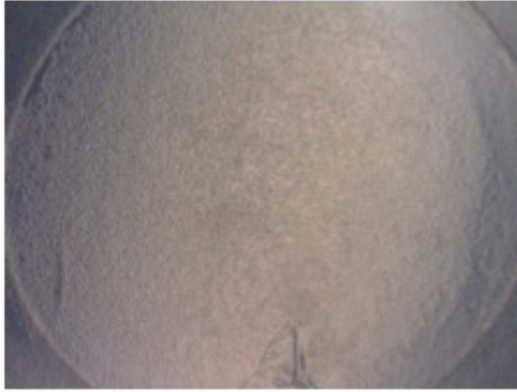
7. Passer au grossissement 60X et mettre l'image au point.
  - Ajuster l'éclairage (et le décrire dans le tableau ci-dessous).
  - Prendre 1 photo de l'endothélium natif seulement.
  - Prendre minimum 6 photos au centre (zone transplantée) et 4 photos en périphérie (jonction entre zone transplantée et endothélium natif). Choisir des endroits représentatives sans chevauchement de toute la cornée et des endroits d'intérêt particulier (eg. plis de la cornée).
  - Prendre en note la portion de la cornée qui a été magnifiée à partir de la position initiale de la cornée (au grossissement 15X).
  - **S'assurer de la qualité des images avant de passer au grossissement suivant.**
8. Passer au grossissement 120X. Répéter les mêmes étapes que pour le grossissement 60X.

EXEMPLES DE PHOTOS AUX DIFFÉRENTS GROSSISSEMENTS

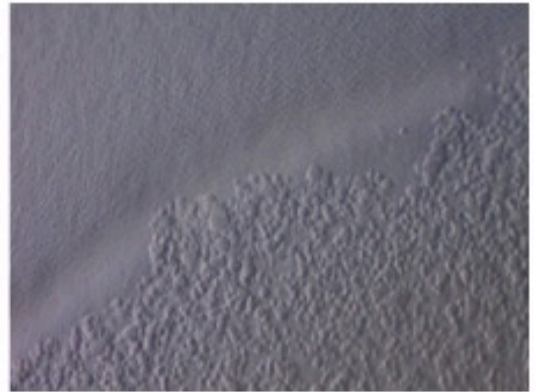
Centre

Périphérie

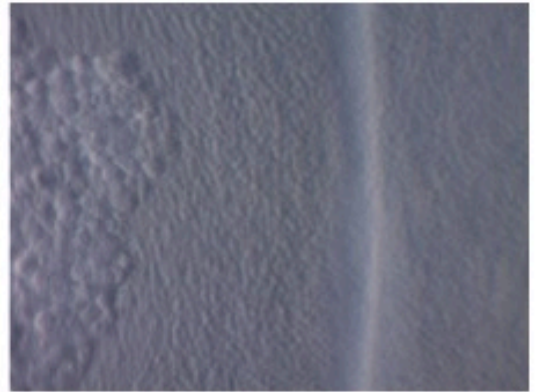
15X



60X




120X



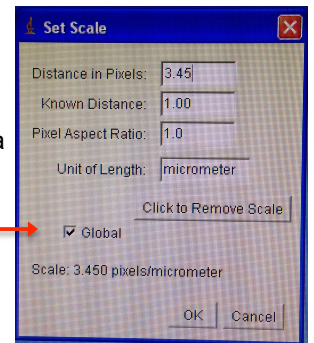
# Annexe 8: Protocole de préparation de photos pour études morphométriques


CEC-CA\_PROTOCOLE DE MAGNIFICATION POUR ÉTUDES MORPHOMÉTRIQUES  
AU MICROSCOPE SPÉCULAIRE  
VERSION 20/08/2013

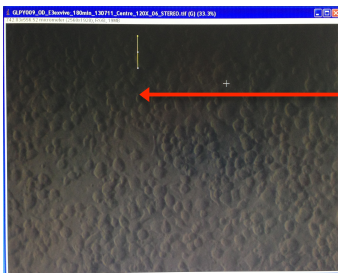


1. Ouvrir l'application « **ImageJ** » (icône  sur le bureau).
2. Dans **ImageJ**, appuyer sur « **File** », puis sur « **Open** » et ouvrir la photo désirée en format « .tif ». (Pour le décompte cellulaire, choisir une photo prise avec objectif 1.5X, grossissement 120X, au centre de la zone transplantée).

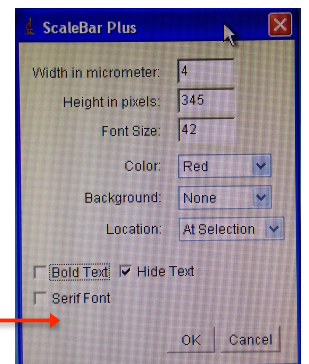
3. Définir l'échelle de la photo en appuyant sur « **Analyze** », puis sur « **Set Scale** ». Dans la fenêtre qui s'ouvre, introduire les réglages suivants et appuyer sur « **OK** » :




4. En utilisant le bouton , tirer une ligne verticale droite dans le coin supérieur gauche d'une région de la photo avec une densité cellulaire représentative de la zone transplantée.

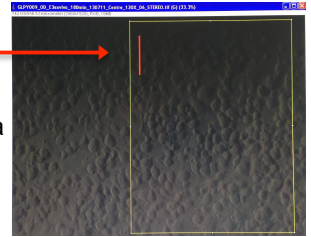


5. Pour insérer une barre-échelle, appuyer sur « **Analyze** » => « **Tools** » => « **Scale Bar** ». Dans la fenêtre qui s'ouvre, introduire les réglages suivants, puis appuyer sur « **OK** » :



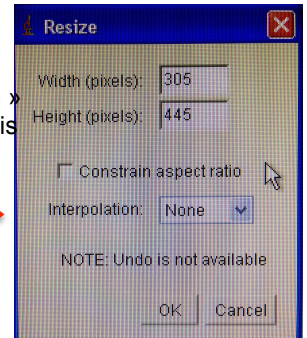


6. En utilisant le bouton , sélectionner un rectangle dans une région représentative de la zone transplantée, incluant la barre-échelle au coin supérieur gauche et au minimum 100 cellules.



7. Pour isoler le rectangle, appuyer sur « **Image** », puis sur « **Crop** ».

8. Afin d'ajuster la taille de l'image à celle requise par le logiciel Konan, appuyer sur « **Image** » => « **Adjust** » => « **Size** ». Dans la fenêtre qui s'ouvre, introduire les réglages suivants puis appuyer sur « **OK** » :



9. Enregistrer la photo obtenue en appuyant sur « **File** » => « **Save As** ».

10. Placer la photo sauvegardée sur une clé USB pour transfert à l'ordinateur du microscope spéculaire.

