

Université de Montréal

Homéostasie des fluides et pathophysiologies dans la
rétine: l'épithélium rétinien pigmenté

par

BENOIT-BÉLANGER, Élodie

Département de biochimie et médecine moléculaire

Faculté des arts et des sciences

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de

Maître ès sciences (M.Sc.)

en Biochimie

31 août 2023

Université de Montréal

Faculté des arts et des sciences

Ce mémoire intitulé

Homéostasie des fluides et pathophysiologies dans la rétine: l'épithélium rétinien pigmenté

présenté par

BENOIT-BÉLANGER, Élodie

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Pascal CHARTRAND

(président-rapporteur)

Dr Przemyslaw SAPIEHA

(directeur de recherche)

Dr Jean VACHER

(membre du jury)

Résumé

Les altérations de la barrière hémato-rétinienne (BRB) sont associées à des maladies rétinienne telles que la rétinopathie diabétique et la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA). L'intégrité de la BRB est cruciale pour maintenir un microenvironnement rétinien en homéostasie et est étroitement régulé grâce à la régulation du transport transcellulaire et paracellulaire. Ici, nous décrirons brièvement la BRB interne, en mettant davantage l'accent sur la structure et la fonction de la BRB externe dans les états sains et malades. Nous avons hypothétisé que le dysfonctionnement des aquaporines exprimées dans des composantes de la BRB est suffisant pour générer un œdème diabétique dans une rétine diabétique. Bien que les résultats indiquent qu'aucune des aquaporines ciblées n'est suffisante pour générer un œdème cystoïde dans un modèle murin - et ce même en l'exacerbant en augmentant la perméabilité vasculaire rétinienne, nous mettons à l'avant un outil de segmentation semi-automatisé ainsi que deux modèles de recherches engageants. Le modèle murin de DT1 induit via STZ a été étudié de façon longitudinale sur un intervalle de temps modéré et pourra être ajusté pour des expériences futures en mettant à profit un outil de quantification semi-automatique performant. D'autre part, le modèle *in vitro* de la sénescence de l'ÉPR est conceptuellement établi et partiellement mis sur pied. Finalement, les résultats sont prometteurs et incitent à approfondir des cibles alternatives dans un modèle conceptuellement similaire, mais soit exacerbé ou plus anatomiquement près de l'humain.

Mots clefs: DME, DMLA, DR, algorithme, segmentation, ÉPR, glies de Müller, BRB, homéostasie, sénescence

Abstract

Alterations in the blood-retina barrier (BRB) are associated with retinal diseases such as diabetic retinopathy and age-related macular degeneration (AMD). The integrity of the BRB is crucial for maintaining a tightly regulated and retinal microenvironment in homeostasis through the regulation of transcellular and paracellular transport. Here, we will briefly describe the inner BRB, with a greater emphasis on the structure and function of the outer BRB in both healthy and diseased states. We hypothesized that dysfunction of aquaporins expressed in components of the BRB is sufficient to generate diabetic edema in a diabetic retina. Although the results indicate that none of the targeted aquaporin are sufficient to generate a cystoid edema in a murine model, even when exacerbated by increasing retinal vascular permeability, we present a semi-automated segmentation tool and two engaging research models. A murine model and a programming tool were developed to efficiently assess semi-automated quantitation of retinal edema. On the other hand, the in vitro model of RPE senescence is conceptually established and partially implemented. Ultimately, the results are promising and encourage further exploration of alternative targets in a conceptually similar model, either exacerbated or more anatomically close to humans.

Keywords: DME, AMD, DR, algorithm, segmentation, RPE, Müller glia, BRB, homeostasis, senescence

Table des matières

Résumé	5
Abstract	7
Liste des tableaux	13
Liste des figures	15
Liste des sigles et des abréviations	25
Remerciements	29
Introduction	31
0.1. L'œil	32
0.1.1. Le segment antérieur	32
0.1.2. Segment postérieur	33
0.1.3. La rétine	34
0.1.4. La circulation oculaire	34
0.2. La cascade visuelle	37
0.3. L'épithélium pigmenté rétinien	40
0.3.1. Caractéristiques physiologiques	40
0.3.2. Phagocytose	42
0.3.3. Barrière hémato-rétinienne	42
0.3.4. Homéostasie aqueuse	43

0.4.	Dérégulation de l'homéostasie aqueuse dans le segment postérieur	44
0.4.1.	L'œdème maculaire diabétique (DME)	45
0.4.1.1.	Épidémiologie	45
0.4.1.2.	Facteurs de risques	47
0.4.1.3.	Pathogénèse actuelle	47
0.4.1.4.	Les outils diagnostiques	49
0.4.1.5.	Les thérapies	49
0.4.2.	Dégénérescence maculaire liée à l'âge.....	50
0.4.2.1.	Épidémiologie	50
0.4.2.2.	Facteurs de risques	50
0.4.2.3.	Pathogénèse actuelle	51
0.4.2.4.	Les thérapies	52
0.5.	La sénescence.....	53
0.5.1.	Question et hypothèse de travail	55
Chapitre 1.	Matériel et méthodes	59
1.0.1.	Matériel et méthodes	59
1.0.1.1.	Induction du diabète de type 1 murin - protocole d'injections répétées de faibles doses de STZ	59
1.0.1.2.	Optical Coherence Tomography (OCT)	60
1.0.1.3.	Électroretinogramme (ERG)	62
1.0.1.4.	Injection intravitréenne (IVT)	64
1.0.1.5.	Miles Assay	65
1.0.2.	In vitro Assays.....	65
1.0.2.1.	Isolation et culture primaire d'épithélium pigmenté murin	65
1.0.2.2.	Isolation et culture primaire d'épithélium pigmenté de porcs .	66
1.0.2.3.	Extraction de mélanosomes à partir de RPE primaire porcines	66

1.0.2.4.	Réaction en chaine quantitative par polymérase (qPCR)	66
1.0.2.5.	Essai protéique de type bicinchoninic acid (BCA)	67
1.0.2.6.	Immunobuvardage (WB)	67
1.0.2.7.	Culture, passage et cryo-congélation de cellules ARPE-19	67
1.0.2.8.	Induction de la sénescence	68
1.0.2.9.	Essai de la SA-b-Galactosidase	68
1.0.2.10.	Immunohistochimie (IHC)	68
1.0.3.	Analyses statistiques	69
Chapitre 2.	Le rôle des aquaporines de l'épithélium rétinien pigmenté dans l'œdème maculaire diabétique	71
2.1.	Résultats	71
2.1.1.	Induction et validation du modèle murin diabétique	72
2.1.2.	Les glies de Müller et la perméabilité	73
2.1.3.	Génération et optimisation des outils de mesures : la programmation	75
2.1.4.	L'étude longitudinale	86
Chapitre 3.	La caractérisation de la sénescence de l'épithélium rétinien pigmenté	91
3.0.1.	Mise en contexte	92
3.0.2.	Résultats	92
Chapitre 4.	Discussion	97
4.0.1.	Le rôle des aquaporines dans la pathogenèse de l'œdème diabétique	98
4.0.1.1.	Validation du modèle	99
4.0.1.2.	Les limites du modèle	103
4.0.1.3.	Différences anatomiques	105
4.0.2.	Caractérisation de l'épithélium rétinien pigmenté sénescant	106

Chapitre 5. Conclusion	111
Références bibliographiques	115
Annexe A. La mise en fonction et l’optimisation des algorithmes	131
A.1. Rendre la fonction <i>measurethickness</i> opérationnelle	131
A.2. Ajustement de la fonction <i>measurethickness</i> numéro 1: <i>measurethicknessadjusted</i> . 133	
Annexe B. L’évaluation du modèle et des traitements	137
B.1. Données statistiques supplémentaires du modèle murin d’œdème rétinien.....	137
B.2. Données statistiques supplémentaires de l’effet de l’inhibition de l’aquaporine 4.....	139
B.3. Données statistiques supplémentaires de l’effet de l’inhibition des aquaporines 1 et 3	139
B.4. Optimisation de culture primaire d’ÉPR.....	143
B.5. Donnés additionnelles de la caractérisation de la sénescence de cellules ARPE- 19: qPCR.....	145
Annexe C. Amorces	147

Liste des tableaux

0.1	Liste du SASP	55
C.1	Liste des amorces	148

Liste des figures

- 0.1 Coupe transversale de l'œil - figure 9.6 du chapitre 9 - Oeil et vision du manuel Neurosciences : A la découverte du cerveau de Bear et al., 2016 (11). *Les structures présentes à la surface de l'œil régulent le flux de lumière qui pénètre dans l'œil et contribue à sa diffraction sur la rétine.* Le segment antérieur comprend les structures entre la cornée et le cristallin alors que le segment postérieur comprend la section du globe derrière le cristallin jusqu'au nerf optique. 35
- 0.2 Mouvement aqueux intrarétinien, figure tirée de Spaide et al., 2016 (111). Les glies de Müller (beige) sont en mesure d'effectuer des échanges aqueux bidirectionnels (flèches bleues) (A) via leur membrane cytoplasmique et via un transport facilité par les aquaporines de type 4 qui sont agrégées autour des capillaires (cercles rouges) du plexus vasculaire interne (vers le haut des figures A-B) et du plexus vasculaire externe (vers le bas des figure A-B). 37
- 0.3 Mécanisme de phototransduction - figure tirée de Salesse et al., 2017. (104) 40
- 0.4 Phototransduction, figure tirée de Salesse et al., 2017 (104). La figure met en évidence l'isomérisation du chromophore de la rhodopsine (le 11-cis rétinol) en tout-trans rétinol, puis son oxydation dans la portion apicale du segment externe d'un bâtonnet (violet). Le produit métabolique oxydé devra être transporté successivement par l' *interphotoreceptor binding protein* (IRBP) et la *cellular retinol binding protein-I* (CRBP-I) dans le cytoplasme de l'ÉPR (rose) pour régénérer le chromophore. Cette régénération est effectuée par trois enzymes clefs : la lécithine rétinol acyltransférase (LRAT), la rétinoloïde isomérohydrolase

	(RPE65) et la rétinol déshydrogénase 5 (RDH5). Le substrat traverse l'interface entre l'ÉPR et le photorécepteur par la CRBP-I et l'IRBP où il se liera à l'opsine pour régénérer la rhodopsine des bâtonnets.....	41
0.5	<i>Charte des critères de classification d'une maculopathie diabétique.</i> (10)	48
1.1	Scans d'OCT typiques et nomenclature systématique A) Représentation schématique du fond de l'œil murin (<i>fundus scan</i>). L'œil est divisé en 9 cadrans, les cadrans fréquemment examinés ont leur abréviations en leur centre. B)'B6_.929.._OSTU009.tif' : Un exemple de scan typique d'OCT. <i>Fundus scan</i> dans la section supérieure gauche, les différentes couches de la rétines (lignes blanches) vues de façon transversale (<i>b-scan</i>) dans la partie supérieure droite ainsi que l'identification de l'image et les paramètres dans la section inférieure gauche. C)La nomenclature systématique ainsi que la signification des abréviations s'y retrouvant. D) 'B6_1149.._OD..009.tif': Un exemple de scan typique d'OCT. Figure partiellement réalisée à l'aide de BioRender (A).....	61
1.2	Technicalités d'OCT ainsi que nomenclature utilisée ultérieurement A) Représentation exagérée d'un <i>b-scan</i> "à niveau" d'une rétine murine versus une mesure générant un "angle" (ceci peut survenir durant les mesures et est mentionné plus tard). L'outil sur-mesure décrit ultérieurement (comme tous les outils semi-automatiques ou automatiques) permet de calculer l'épaisseur verticale (flèche verte) de tous les " <i>a-scans</i> " d'un <i>b-scan</i> donné et de les additionner, puis d'en faire la moyenne, la médiane, etc. <i>.Pour des fins d'analogie, dans l'exemple ci-haut, un "a-scan" mesure un pixel de large.</i> B) Un schéma tiré de Subhash, M. et al. (82), illustre les différents types de scans d'OCT. Si le <i>b-scan</i> (B-b) est un scan 2D transversal du tissu étudié, un <i>a-scan</i> (B-a) correspond à un scan vectoriel axial (1D) d'un <i>b-scan</i> . Un <i>c-scan</i> (B-c)est une série adjacente de b-scan permettant de mettre en relief le volume du tissu étudié.....	62

- 1.3 **Motif typique d'ERG murin de type 'full field'**. Tel quel visualisé puis décrit dans l'article de Jae,SA. et al, 2013 (60). C'est à partir de cette référence que les mesures pertinentes sont calculées. a-wave: le point le plus négatif du signal. Aa: Amplitude de l'a-wave. Ab : Amplitude de la b-wave. La: le temps implicite de la a-wave. b-wave: correspond à la valeur de l'amplitude du point maximal du deuxième potentiel oscillateur (OP) de laquelle on additionne l'Aa. Lb: le temps implicite de la b-wave. Time : temps. 63
- 2.1 **Le modèle murin.**A) Des souris B6 sont âgées de 6-8 semaines au moment de l'induction de diabète de type 1 via le protocole d'injections répétées de faibles doses de STZ [50 mg STZ/kg] décrit dans plusieurs publications du laboratoire (27; 79). B) Chronologie de l'étude longitudinale sur un modèle murin diabétique depuis 10 semaines. C) Mise en place finale des injections IVT: les deux yeux d'une souris reçoivent le même traitement. NOTA : l'examen de type ERG n'est pas systématique. STZ: Streptozotocine. sem.: semaine. IVT: Injection(s) intravitréenne(s). Xéno: Xénobiotique. ERG :Électrorétinogramme. OCT : tomographie par cohérence optique. Figure réalisée à l'aide de BioRender..... 73
- 2.2 **Effets du modèle murin de diabète-induit sur les paramètres de l'électrorétinographie** Des souris B6 saines et diabétiques (environ 8 semaines) ont été maintenues dans l'obscurité totale pendant plus de huit heures avant d'enregistrer les potentiels visuels en réponse à une intensité lumineuse de 10,0 cd s/m² (avec des pupilles dilatées) à l'aide d'une électrode DTL et de l'appareil COLORHOME (DiagnosysLLC). Avant et entre les sessions, la pièce était faiblement éclairée à la lumière rouge. Expérience réalisée avant l'IVT (A) Graphe de l'a-wave (B) Graphe de la b-wave. (C) Ratios b-wave/a-wave. Cit-Tre: Groupe citrate allant recevoir le traitement. STZ-Veh: Groupe diabétique allant recevoir le véhicule. STZ-Tre: Groupe diabétique allant recevoir le traitement.

- Scotopic b/a : ratio des signaux 'b-wave'/'a-wave'. La taille d'échantillonnage de chaque groupe est inscrit au centre de sa barre correspondante. N=inscrit en bas au centre de chaque graphique. Test statistique (A-I): *Unbalanced ONE-WAY ANOVA* Détaillé dans l'annexe B..... 74
- 2.3 **Validation des effets de l'aquaporine 4 : Miles Assay** A) Perméabilité de la rétine. B) Perméabilité de la choroïde. (A-B) 48 heures post-IVT de l'inhibiteur d'AQP4 TGN-020 [155 µM] ou de véhicule, du colorant Evans Blue [45 mg/kg] est injecté dans la veine caudale de souris B6 saines et diabétiques et laissé en circulation pendant deux (2) heures avant d'être mesuré via différents échantillons (sérum, reins, etc. - voir la procédure 1.0.1.5). Cit-Véh: Groupe citrate allant recevoir le véhicule. Cit-Tra: Groupe citrate allant recevoir le traitement. STZ-Véh: Groupe diabétique allant recevoir le véhicule. STZ-Tra: Groupe diabétique allant recevoir le traitement. 'n' : correspond ici à une souris et sa valeur est inscrite au centre de la base de chaque barre. Test statistique : t-test. 75
- 2.4 **Outil de mesure quantitatif du logiciel est inadéquat.** Figure modifiée de la Figure # 4 de l'article de Dysli et al., 2015(39). [Ma traduction de la section correspondante du texte accompagnateur] : *Coupe histologique et [b-scans] de rétine de souris C57BL/6J. L'algorithme de segmentation automatisé définit la limite sclère-choroïde comme l'ÉPR, résultant en des valeurs d'épaisseur totale plus élevées.* choroid: choroïde; total retina: rétine neurale; sclera: sclère; RPE (vert) : indication de l'emplacement réel de l'ÉPR; RPE (rouge) : indication erronée de l'ÉPR par l'algorithme du logiciel intégré..... 77
- 2.5 **Corrélation faible à modérée de la qualité de l'image et de l'intensité de l'ILM.** Des souris adultes B6 (C57BL/6J) sont anesthésiées à l'aide de kétamine-xylazine [1 dl/kg] avant d'induire la dilatation de leur pupille IsoptoAtropine 1 % [Alcon (Novartis)]. Ensuite, le programme *Heidelberg Eye Explorer* est utilisé pour

	scanner la rétine des animaux et enregistrer 2-4 scan IR-OCT/œil comprenant 25 <i>b-scans</i> . A) Scan de qualité médiane (Q :20) ayant une faible intensité au niveau de l'ILM. B) Scan de qualité très élevée (Q :32) ayant une faible intensité au niveau de l'ILM. C) Scan de qualité inférieure (Q :18) ayant une intensité satisfaisante au niveau de l'ILM. D) Scan de qualité très élevée (Q :35) ayant une haute intensité au niveau de l'ILM.....	78
2.6	L'algorithme original	80
2.7	La fonction de mesure d'épaisseur originelle	82
2.8	La fonction du calcul de la distance	83
2.9	L'algorithme ultime fait appel à la version définitive (Figure 2.10) de la fonction <i>measurethickness</i> ainsi qu'à la fonction <i>computedistance</i> (Figure 2.8).	84
2.10	La fonction chimérique finale : les sections pertinentes.	85
2.11	Quantification longitudinale de l'épaisseur du segment postérieur - AQP1& 3 inhibées Des souris contrôles (Cit) et diabétiques (STZ) pendant au moins 9 semaines reçoivent des injections intravitréennes de véhicule (Veh) ou de xénobiotiques (Tra) : Acétazolamide [IC50*100] & DFP00173 [IC50*100] au jour D01. Parallèlement, leur segment postérieur est examiné via l'OCT à plusieurs moments prédéfinis. Finalement, l'algorithme mis sur pied (Figure 2.9) est utilisé pour extraire l'épaisseur, sous forme de microns, des images d'OCT. Chaque trajectoire correspond à un œil. *Deux techniques d'injections intravitréennes ont été utilisées.N :2 'n': un œil.....	87
2.12	Quantification longitudinale de l'épaisseur du segment postérieur - AQP1&3 inhibées et addition de VEGF165 Des souris contrôles (Cit) et diabétiques (STZ) pendant au moins 9 semaines reçoivent des injections	

intravitréennes de véhicule (Veh) ou de xénobiotiques (Tra) : Acétazolamide [IC50*100] & DFP00173 [IC50*100] (47; 110; 2) ainsi que du facteur de croissance endothélial VEGF [15 nM] au jour D01. Parallèlement, leur segment postérieur est examiné via l'OCT à plusieurs moments prédéfinis. Finalement, l'algorithme mis sur pied (Figure 2.9) est utilisé pour extraire l'épaisseur, sous forme de microns, des images d'OCT. Chaque trajectoire correspond à un œil. N :3 'n' : un œil... 88

2.13 Effets des xénobiotiques inhibiteurs d'aquaporines sur les paramètres de l'électrorétinographie

Des souris B6 saines et diabétiques ont été maintenues dans l'obscurité totale pendant plus de huit heures avant d'enregistrer les potentiels visuels en réponse à une intensité lumineuse de 10,0 cd s/m² (avec des pupilles dilatées) à l'aide d'une électrode DTL et de l'appareil COLORHOME (DiagnosysLLC). Avant et entre les sessions, la pièce était faiblement éclairée à la lumière rouge. Expérience réalisée 48 heures post-IVT (D-F) de traitement inhibiteur de l'aquaporine 4, TGN-020 [155 µM] ou de véhicule ou finalement 8 jours post-IVT de traitement inhibant les aquaporines 1 et 3, Acétazolamide [1 mM] et DFP00173 [25 µM] ou de véhicule(A-C). a-wave: graphes aux barres beiges (A;D). b-wave: graphes aux barres bleues (B;E). Ratios b-wave/a-wave: graphes aux barres brunes (C;F). Cit-Tre: Groupe citrate allant ou ayant reçu le traitement. STZ-Veh: Groupe diabétique allant ou ayant reçu le véhicule. STZ-Tre: Groupe diabétique allant ou ayant reçu le traitement. Scotopic b/a : ratio des signaux 'b-wave'/'a-wave'. La taille d'échantillonnage de chaque groupe est inscrit au centre de sa barre correspondante. N=inscrit en bas au centre de chaque graphique. Test statistique (A-I): *Unbalanced ONE-WAY ANOVA* détaillé dans l'annexe B 90

3.1 Détermination de la dose d'H2O2 efficace 7 jours post traitement

Quantification d'ARNm de trois marqueurs jugés pertinents pour la caractérisation

	de la sénescence cellulaire de l'ÉPR, afin d'établir le dosage d'H ₂ O ₂ efficace 7 jours post traitement. (A) marqueur : CDKN1A. (B) marqueur : CDKN2A (C) marqueur : CD63 N: nombre de réplicats expérimentaux.	94
3.2	Expression des <i>Zona Occludens 1</i> lors de la sénescence cellulaire. Les cellules ARPE-19, confluentes pendant plusieurs jours puis traitées à différentes concentrations de peroxyde d'hydrogène, sont fixées puis perméabilisées à l'aide du tampon IHC (BSA 3%, Triton 100X 0,1-0,3 %) puis lavées au PBS avant d'incuber le tout avec l'anticorps primaire ZO-1 [ThermoFisher (#33-9100)] stock [5 µg/mL] plus de huit heures à 4 degrés Celsius. Suivant l'incubation à l'anticorps secondaire de deux heures et celle du DAPI [0.5 ng/mL] de 10 minutes, elles sont lavées une dernière fois avant d'être séchées puis montées sur une lamelle microscopique à l'aide du <i>fluoromount</i> . (A-C) La progression des cultures primaires stagnent entre la progression de référence de 7-14 jours. D)Le même phénomène survient sur un Transwell E)Référence : Figure 3, Belkinsop et al., 2013 (15)	95
B.1	<i>Unbalanced ONE-WAY ANOVA</i> avant IVT de la figure 2.2 (A-C). Des souris B6 saines et diabétiques ont été maintenues dans l'obscurité totale pendant plus de huit heures avant d'enregistrer les potentiels visuels en réponse à une intensité lumineuse de 10,0 cd s/m ² (avec des pupilles dilatées) à l'aide d'une électrode DTL et de l'appareil COLORDOME (DiagnosysLLC). Avant et entre les sessions, la pièce était faiblement éclairée à la lumière rouge. Expérience réalisée avant l'IVT (A-C) Figures 1 et 2: données de l'a-wave. Figures 3-4: données de la b-wave. Figures 5-6: Données des ratios. Groupe '1': Cit-Tre. Groupe '2': STZ-Veh. Groupe '3':STZ-Tre.	138
B.2	<i>Unbalanced ONE-WAY ANOVA</i> suite au traitement de TGN-020 [155 µM] de la figure 2.13 (D-F). Des souris B6 saines et diabétiques ont été maintenues dans l'obscurité totale pendant plus de huit heures avant d'enregistrer	

les potentiels visuels en réponse à une intensité lumineuse de 10,0 cd s/m² (avec des pupilles dilatées) à l'aide d'une électrode DTL et de l'appareil COLORDOME (DiagnosysLLC). Avant et entre les sessions, la pièce était faiblement éclairée à la lumière rouge. Expérience réalisée 48 heures post-IVT de traitement inhibiteur de l'aquaporine 4, TGN-020 [155 µM] ou de véhicule. Figures 1 et 2: données de l'a-wave. Figures 3-4: données de la b-wave. Figures 5-6: Données des ratios. Groupe '1': Cit-Tra (Citrates-Traitement). Groupe '2': (STZ-Véhicule). Groupe '3':STZ-Tra (STZ-Traitement). 139

B.3 Unbalanced ONE-WAY ANOVA suite au traitement d'Acétazolamide et de DFP00173 [155 µM] de la figure 2.13. (A-C) Des souris B6 saines et diabétiques ont été maintenues dans l'obscurité totale pendant plus de huit heures avant d'enregistrer les potentiels visuels en réponse à une intensité lumineuse de 10,0 cd s/m² (avec des pupilles dilatées) à l'aide d'une électrode DTL et de l'appareil COLORDOME (DiagnosysLLC). Avant et entre les sessions, la pièce était faiblement éclairée à la lumière rouge. Expérience réalisée 48 heures post-IVT de traitement inhibiteur de l'aquaporine 4, TGN-020 [155 µM] ou de véhicule. Figures 15 et 16: données de l'a-wave. Figures 17-18: données de la b-wave. Figures 19-20: Groupe '1': Cit-Tra (Citrates-Traitement). Groupe '2': (STZ-Véhicule). Groupe '3':STZ-Tra (STZ-Traitement). 140

B.4 Quantification longitudinale de l'épaisseur du segment postérieur - AQP1&3 inhibées Des souris contrôles (Cit) et diabétiques (STZ) pendant au moins 9 semaines reçoivent des injections intravitréennes de véhicule (Veh) ou de xénobiotiques (Tra): Acétazolamide [IC50*100] DFP00173 [IC50*100] au jour D01. Parallèlement, leur segment postérieur est examiné via l'OCT à plusieurs moments prédéfinis. Finalement, l'algorithme mis sur pied (Figure 2.9) est utilisé pour extraire l'épaisseur, sous forme de microns, des images d'OCT. Chaque

- trajectoire correspond à un œil. *Deux techniques d'injections intravitréennes ont été utilisées. N:2 'n':un œil. 141
- B.5 Quantification longitudinale de l'épaisseur du segment postérieur - AQP13 inhibées et addition de VEGF165.** Des souris contrôles (Cit) et diabétiques (STZ) pendant au moins 9 semaines reçoivent des injections intravitréennes de véhicule (Veh) ou de xénobiotiques (Tra) :Acétazolamide [IC50*100] DFP00173 [IC50*100] (47; 110; 2) ainsi que du facteur de croissance endothélial VEGF [15nM] au jour D01. Parallèlement, leur segment postérieur est examiné via l'OCT à plusieurs moments prédéfinis. Finalement, l'algorithme mis sur pied (Figure 2.9) est utilisé pour extraire l'épaisseur, sous forme de microns, des images d'OCT. Chaque trajectoire correspond à un œil. N:3 'n':un œil. 142
- B.6 L'évolution de culture primaire d'ÉPR primaire murin stagne avant la confluence complète.** La cornée de souris C57BL/6J adultes (4-6 semaines) est excisée jusqu'à l'ora serrata; le vitré puis la rétine neurale sont enlevés avant de digérer l'ÉPR avec d'hyaluronidase [1 mg/mL] puis avec de la Trypsine [0.5%*m/v*].L'étape de digestion à la trypsine sera ultérieurement remplacée par le décollement de l'ÉPR via un lavage au PBS à température pièce. L'ÉPR est aspiré et resuspendu dans du DMEM-FBS20% avant d'être ensemencé. Les cultures ne seront pas manipulées durant les premières soixante-douze (72) heures.. (A-C) La progression des cultures primaires stagne entre la progression de référence de 7-14 jours. D)Le même phénomène survient sur un Transwell E)Référence : Figure 3, Belkinsop et al., 2013 (15) 143
- B.7 La densité d'ensemencement idéale pour l'ÉPR de porc primaire est de [64 kc/cm²-128 kc/cm²] sur une surface non poreuse.** Des yeux de jeunes porcs (5-6 mois) fraîchement abattus (<3 heures) sont nettoyés et désinfectés avec des lavages en série (Dexidin 2 Solution (Laboratoire ATLAS Inc, #02238982),

- Dexidin 4 Solution (Laboratoire ATLAS Inc, #00832111)) avant d'exciser la cornée jusqu'à l'ora serata; le vitré puis la rétine neurale sont enlevés avant de digérer l'ÉPR avec d'hyaluronidase [1 mg/mL] puis avec de la Trypsine [0.5%*m/v*]. L'ÉPR est aspiré et re-suspendu dans du DMEM-FBS20% avant d'être ensemencé. (A-E):3 jours post ensemencement. (F-J): 6 jours ensemencement. (A;F)16 *kc/cm*² (B;G)32 *kc/cm*² (C-H)64 *kc/cm*² (D;I)128 *kc/cm*² (E;J)256 *kc/cm*² 144
- B.8 **CD63.** Quantification d'ARNm du gène CD63, afin d'établir la courbe dose-temps d'H₂O₂ efficace pour l'induction de la sénescence de l'ÉPR. Normalisé avec l'ARNm des gènes PPIA et GUSB. N: nombre de réplicats expérimentaux. 145
- B.9 **CDKN2A.** Quantification d'ARNm du gène CDKN2A, afin d'établir la courbe dose-temps d'H₂O₂ efficace pour l'induction de la sénescence de l'ÉPR. Normalisé avec l'ARNm des gènes PPIA et GUSB. N: nombre de réplicats expérimentaux. 146
- B.10 **CDKN1A.** Quantification d'ARNm du gène CDKN1A, afin d'établir la courbe dose-temps d'H₂O₂ efficace pour l'induction de la sénescence de l'ÉPR. Normalisé avec l'ARNm des gènes PPIA et GUSB. N: nombre de réplicats expérimentaux. . 146

Liste des sigles et des abréviations

ANOVA	Analyse des variances, de l'anglais <i>ANalysis Of VAriance</i>
AQP	Aquaporine
BAB	barrière sang-humeur aqueuse, de l'anglais <i>blood-aqueous barrier</i>
BCA	acide bicinchoninic, de l'anglais <i>bicinchoninic acid</i>
BRB	barrière hémato-rétinienne, de l'anglais <i>blood-retina barrier [inner/outer]</i>
DME	(Édème maculaire diabétique, de l'anglais <i>Diabetic Macular Edema</i>
DT1	Diabète de type 1
DT2	Diabète de type 2
ERG	Électrorétinogramme
EPR	Épithélium rétinien pigmenté
ECL	de l'anglais <i>enhanced chemiluminescence</i>

ESASO	École européenne des études avancées en ophtalmologie, de l'anglais <i>European School for Advanced Studies in Ophthalmology</i>
FBS	Sérum de veau foetal, de l'anglais <i>Fetal Bovine Serum</i>
ffERG DA	Réponse globale d'ERG (adaptation à l'obscurité), de l'anglais <i>full-field ERG, Dark Adaptation</i>
GDP	Guanosine diphosphate
GMP	Guanosine monophosphate
GTP	Guanosine triphosphate
IC ₅₀	Concentration inhibitrice médiane, de l'anglais <i>Inhibitory Concentration 50(%)</i>
IHC	Immunohistochimie, de l'anglais <i>Immunohistochemistry</i>
ILM	Membrane limitante interne, de l'anglais <i>Inner Limiting Membrane</i>
IMC	Indice de masse corporelle
IP	Intrapéritonéale
IR-OCT	Réflectance infrarouge - tomographie par cohérence optique, de l'anglais <i>Infrared Reflectance - Optical Coherence Tomographie</i>
IVT	Injection intravitréenne, de l'anglais <i>Intravitreal Injection</i>

MSE	Erreur quadratique moyenne, de l'anglais <i>Mean Square Error</i>
n	Unité de la population d'échantillonnage
N	Réplicat expérimental
NA	Nasal médian (domaine)
NDR	Retract d'un voisinage, de l'anglais <i>Neighbourhood Deformation Retract</i>
NU	Nasal supérieur (domaine), de l'anglais <i>Nasal Up</i>
OCT	Tomographie par cohérence optique, de l'anglais <i>Optical Coherence Tomography</i>
OD	Œil droit, du Latin <i>Oculus Dexter</i>
ON	Nerf optique, de l'anglais <i>Optic Nerve</i>
OPL	Couche plexiforme externe, de l'anglais <i>Outer Plexiform Layer</i>
OS	Œil gauche, du Latin <i>Oculus Sinistra</i>
PFA	Paraformaldéhyde
qPCR	Réaction en chaîne quantitative par polymérase, de l'anglais <i>quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
RD	Rétinopathie diabétique

RIPA	Essai de l'immunoprécipitation-radio, de l'anglais <i>Radio-immunoprecipitation Assay</i>
SASP	Phénotype sécrétoire associé à la sénescence, de l'anglais <i>Senescence Associated Secretory Phenotype</i>
SSB	Tampon d'échantillon de type SDS, de l'anglais <i>SDS Sample Buffer</i>
STZ	Streptozotocine
Te	Temporal médian (domaine)
TJ	Protéines de jonctions serrées, de l'anglais <i>Tight Junctions (proteins)</i>
TU	Temporal supérieur (domaine), de l'anglais <i>Temporal Up</i>
UNV	Unité neurovasculaire
WB	Immunobuvardage, de l'anglais <i>Western Blot</i>

Remerciements

De mes études supérieures, je ressors grandie, et j'en suis redevable à tant de gens qui ont tapissé mon parcours. Voici une série de mentions non exhaustive.

D'abord et avant tout, il se doit que j'offre mes premiers remerciements au Dr Przemyslaw (Mike) Sapiha, mon directeur de recherche. J'ai pour lui beaucoup de gratitude d'avoir mis à ma dispositions les ressources matérielles nécessaires au bon déroulement des recherches. Par son excellence distinctive, il a aussi, au fil des ans, mis sur pied une équipe (que je remercie grandement) dont l'expertise n'a d'égal que la détermination - offrant ainsi une véritable mine d'or de ressources professionnelles variées. Finalement, le Dr Sapiha a, selon mon humble opinion, un flair scientifique inégalé et pratiquement toutes les qualités des plus grands businessmen de ce monde, mais il est avant tout un très bon vivant.

Je tiens ensuite à mentionner les membres de votre comité de thèse pour leur contribution, leur expertise et leur évaluation du travail qui suit. Dr Chartrand, Dr Vacher, c'est un honneur de vous avoir sur ce comité.

Je suis également reconnaissante envers l'Université de Montréal - le département de Biochimie et médecine moléculaire plus spécifiquement, le corps professoral enthousiaste ainsi que le personnel administratif bienveillant. L'ensemble offre un environnement agréable et favorisant la curiosité intellectuelle où tout passionné de science peut s'émanciper. Ensuite, le département m'a également soutenu financièrement pendant les deux années d'études supérieures via des bourses d'accueil et d'excellence. Similairement, il faut souligner l'appui généreux du FROUM qui a été la première source de financement pendant tout mon parcours.

À Dre Marissé Masis-Solano, pour le partage de son travail de programmation qui a servi de pilier pour faire avancer le projet, et à M. Charles-Édouard Giguère, qui a fourni un gabarit pour les analyses de trajectoires et a offert son support généreusement, merci pour votre collaboration essentielle à la réussite de ce projet. Au fantastique personnel du centre de recherche du HMR, tout comme à tout le personnel de l'animalerie - entre autres le Dr Mikhail Sergeev et Marie-Laure Durand qui sont particulièrement engagés et passionnés, merci de votre soutien.

Un merci tout particulier est réservé à tous les être chers qui m'entourent pour leur soutien moral, leur encouragement et leur compréhension tout au long de mon parcours académique : Mélissa, The Aurora Boréalis Hunting Crew, Julie-Anne, Justin, Gabriel, tante Suzanne, oncle Yvan et Soufiane.

Merci à tous les étudiants du 4 étage du Pavillon Claudine d'Amour du Centre de recherche du HMR. Merci pour les beaux moments et pour les échanges interculturels enrichissants.

La dernière mention, mais non la moindre, à ma Mamie Solange, qui par sa prestance noble et son amour de l'enseignement nous a toujours laissé entrevoir la beauté de l'éducation.

Introduction

L'œil est un organe extraordinaire qui joue un rôle crucial dans notre perception du monde. La vision nous permet de nous connecter à notre environnement, d'explorer et de comprendre le monde qui nous entoure. Sa précision et sa complexité en font l'un des sens les plus importants pour notre bien-être et notre expérience de vie. Les deux principales causes de la cécité chez les adultes des pays industrialisés, la rétinopathie diabétique et la dégénérescence maculaire liée à l'âge, ont fait l'objet d'une investigation approfondie par rapport à leur pathogenèse. La microcirculation oculaire dysfonctionnelle participe au développement des deux maladies(91; 88). Le système de barrière sanguin-oculaire, un système primordial dans le maintien de l'homéostasie aqueuse, est composé de deux barrières principales : la barrière sang-humeur aqueuse (BAB) et la barrière sang-rétinienne (BRB)(28; 38; 91; 88). La barrière physiologique étroite et restrictive de la rétine régulant le flux d'ions, de protéines et d'eau que forme la BRB est essentielle pour maintenir l'œil en tant que site privilégié et pour assurer une fonction visuelle normale. Elle est constituée de deux composantes : la BRB interne, formée de jonctions étanches entre les cellules endothéliales des capillaires rétiens, et la BRB externe, formée par la couche unicellulaire de l'épithélium pigmentaire rétinien(28; 88). Les altérations de la BRB jouent un rôle crucial dans le développement des maladies rétiennes. Les deux maladies rétiennes les plus fréquentes et les plus pertinentes, la rétinopathie diabétique et la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA), sont directement associées à des altérations des deux composantes de la BRB(91; 88).

0.1. L'œil

L'œil est souvent considéré comme l'organe le plus important relié à nos cinq sens en raison de son rôle essentiel dans la perception visuelle. La vision est un sens qui nous permet de percevoir le monde qui nous entoure, d'interagir avec notre environnement et d'acquérir une grande quantité d'informations sur les formes, les couleurs, les mouvements et les distances. La vision est également un sens relié avec nos autres sens. Par exemple, la vision joue un rôle crucial dans notre capacité à coordonner nos mouvements et à interagir avec notre environnement. Elle complète et enrichit notre perception en fournissant des informations visuelles qui se combinent avec les informations tactiles, auditives et olfactives.

0.1.1. Le segment antérieur

Le segment antérieur de l'œil, fait référence à la partie frontale de l'œil qui est visible à l'extérieur et comprend plusieurs structures essentielles pour la vision et la santé oculaire. Il comprend des éléments tels que la cornée, la chambre antérieure, l'iris, le corps ciliaire et le cristallin (fig. 0.1). Chaque composant du segment antérieur joue un rôle clé dans le fonctionnement global de l'œil. Parmi ces éléments caractéristiques, le trabéculum est particulièrement intéressant dans ce contexte scientifique défini. Le trabéculum est une structure essentielle située dans l'angle iridocornéen de l'œil(19). Il joue un rôle crucial dans le maintien de l'homéostasie aqueuse de la rétine en régulant le flux du liquide intraoculaire, l'humeur aqueuse. Cette dernière fournit des nutriments et de l'oxygène aux structures de l'œil, en particulier à la cornée et au cristallin, qui ne sont pas directement vascularisés. Il contribue également à maintenir la pression intraoculaire, ce qui est important pour le maintien de la forme et de la fonction de l'œil(19). Cet élément clef du segment antérieur est composé d'une structure en treillis, de faisceaux de tissu conjonctif, de cellules spécialisées et de canaux qui permettant de filtrer l'humeur aqueuse avant son arrivée au canal de Schlemm. Le trabéculum régule le flux de l'humeur aqueuse en ajustant la résistance à l'écoulement dans les mailles trabéculaires (formant les canaux)(19). Cette régulation est cruciale pour maintenir une pression intraoculaire appropriée, car une pression excessive peut endommager

les structures délicates de l'œil, notamment la rétine neurale. En plus de son rôle dans le maintien de l'homéostasie aqueuse de la rétine, le trabéculum est également impliqué dans la modulation de la réponse inflammatoire de l'œil. Il est rapporté que des changements dans le trabéculum peuvent contribuer à l'inflammation oculaire et à d'autres maladies oculaires, telles que l'uvéite et la sclérose en plaques(19). En conclusion, le segment antérieur de l'œil comprend des structures essentielles pour la vision claire et le bon fonctionnement de l'œil. Chaque composante, de la cornée au cristallin, joue un rôle spécifique dans la réfraction de la lumière, la mise au point de l'image, la régulation de la quantité de lumière et l'accommodation. De plus, plusieurs structures ont aussi évoluées afin de maintenir l'homéostasie des fluides dans la rétine - par exemple l'humeur aqueuse qui assure l'apport en nutriments dans les régions où le système vasculaire ne se rend point. Comprendre la structure et la fonction du segment antérieur de l'œil est crucial pour diagnostiquer et traiter les troubles oculaires, ainsi que pour maintenir une vision optimale, mais également une santé oculaire globale.

0.1.2. Segment postérieur

Le segment postérieur de l'œil fait référence à la partie arrière de l'œil qui comprend la rétine, le vitré, la choroïde, l'uvée et le nerf optique (fig. 0.1). Cette région de l'œil joue un rôle essentiel dans la formation de l'image visuelle et la transmission des signaux visuels au cerveau(8). Le vitré est un gel transparent et gélatineux qui remplit l'espace entre le cristallin et la rétine. Il aide à maintenir la forme de l'œil et à soutenir la rétine. Bien qu'il soit principalement composé d'eau, le vitré contient également des fibres de collagène et d'acide hyaluronique, entre autres, qui lui confèrent sa consistance similaire à de la gélatine(8). Outre le vitré brièvement mentionné ci-haut, les composantes de cette structure sophistiquée sont centrales aux questions amenées dans ce mémoire et seront de ce fait abordées en plus amples détails.

0.1.3. La rétine

La rétine est la couche sensible à la lumière (fig. 0.1). Elle est composée de cellules photoréceptrices, de cellules ganglionnaires, de cellules bipolaires et de cellules horizontales, qui travaillent ensemble pour capturer et transmettre le potentiel d'action, généré en réponse à un stimulus visuel, au lobe occipital (104; 8). La rétine doit contenir des vaisseaux sanguins qui fournissent les nutriments et l'oxygène nécessaires aux cellules rétinienne. La composition des types cellulaires qui tapissent la rétine varie selon la fonction anatomique de la région étudiée(8). Par exemple, l'épaisseur de la rétine n'est pas homogène, elle varie en fonction de la proximité du nerf optique ainsi que de la distance qui sépare la région étudiée de la macula (99; 114). Autrement dit, la périphérie du globe oculaire ne reçoit pas beaucoup de stimuli et est plus mince.

Inversement, la macula est une petite région de la rétine située près du centre de l'œil jouant un rôle crucial dans notre vision centrale et notre capacité à percevoir les détails fins. Du point de vue anatomique et physiologique, elle présente des caractéristiques uniques qui la distinguent du reste de la rétine (la composition des types cellulaires, l'épaisseur, multi-nucléation de l'ÉPR, par exemple) (8; 114). La macula se trouve au centre de la rétine et a une apparence légèrement plus foncée que le reste de la rétine en raison de la concentration élevée de pigments photosensibles et est d'ailleurs responsable de notre acuité visuelle maximale. Cette région du segment postérieur est de petite taille, mesurant environ 5,5 mm de diamètre, et entoure une zone appelée la fovéa (fig. 0.1), qui est le point central de la macula(8). La fovéa, est d'une importance particulière. Elle est caractérisée par une densité extrêmement élevée de cônes et peu de bâtonnets. Cette zone avasculaire unique permet une vision centrale extrêmement nette et détaillée(8).

0.1.4. La circulation oculaire

La circulation oculaire comprend la circulation vasculaire (dans l'endothélium et de part et d'autre de la BRB). Elle fait aussi référence à la circulation de fluides quelconques à travers toutes les couches de la rétine. Le réseau vasculaire de l'œil inclut l'uvée ainsi que le

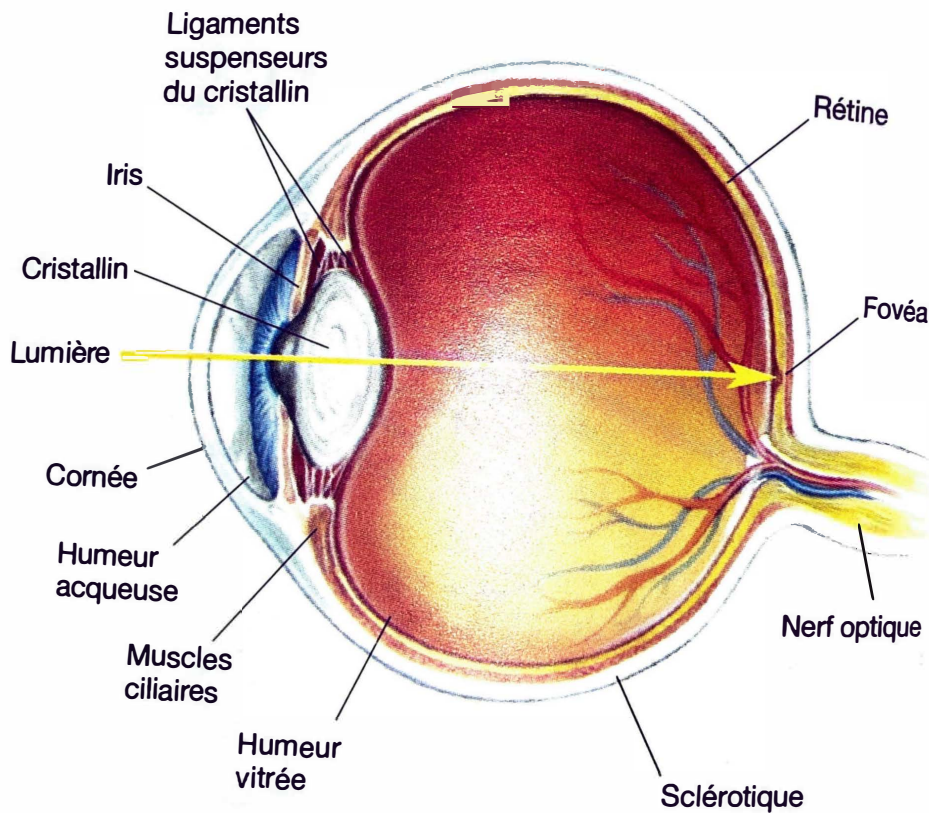


Fig. 0.1. Coupe transversale de l'œil - figure 9.6 du chapitre 9 - Oeil et vision du manuel Neurosciences : A la découverte du cerveau de Bear et al., 2016 (11). *Les structures présentes à la surface de l'œil régulent le flux de lumière qui pénètre dans l'œil et contribue à sa diffraction sur la rétine.* Le segment antérieur comprend les structures entre la cornée et le cristallin alors que le segment postérieur comprend la section du globe derrière le cristallin jusqu'au nerf optique.

plexus vasculaire interne et le plexus vasculaire externe (fig. 0.2). L'uvée est une couche de tissu vascularisé située entre la sclérotique et la rétine. Elle comprend l'iris, le corps ciliaire et la choroïde. Ici, l'intérêt est mis sur la choroïde puisqu'elle fournit une vascularisation importante à la rétine externe, en particulier aux cellules photoréceptrices, ainsi qu'une élimination des déchets métaboliques en plus de réguler la température de l'œil. Le plexus interne et externe fournissent quant à eux une vascularisation à la rétine neurale. L'intégrité de ces différentes composantes du réseau vasculaire est requise pour maintenir l'homéostasie aqueuse dans la rétine (91).

La circulation vasculaire est essentielle pour maintes raisons, dont son apport en nutriments et en oxygène. En cas d'hypoxie, les cellules commencent à sécréter des molécules pro-angiogéniques pour signaler les capillaires entourant le tissu hypoxique. Le principal facteur de croissance pro-angiogénique qui joue un rôle crucial dans l'angiogenèse est le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF)-A (48). Brièvement, le facteur de croissance aura pour effet de stimuler l'endothélium quiescent et d'induire une cascade de perméabilisation de la structure ainsi que de dégradation de la membrane basale. Les cellules endothéliales dans le réseau capillaire environnant qui reçoivent la plus grande dose de VEGF-A se transforment en cellules de pointe caractérisées par des structures étendues appelées filopodes. Ces filopodes se projettent vers le centre angiogénique en suivant le gradient de VEGF-A et en dégradant la membrane basale et la MEC à l'aide d'enzymes protéolytiques. Lorsque la cellule de pointe se projette vers le centre angiogénique, les cellules endothéliales adjacentes à la cellule de pointe, également appelées cellules de tige, se multiplient pour soutenir l'élongation de la pousse. Cela permettrait à la cellule de pointe de migrer plus loin vers le tissu hypoxique. Lorsque le sang circule dans les nouvelles pousses formées, les cellules du tissu hypoxique commencent à recevoir plus d'oxygène et ralentissent progressivement la libération de facteurs pro-angiogéniques (61). Ensuite, les cellules périvasculaires couvriront l'endothélium nouvellement formé pour induire la quiescence et la stabilisation. Une circulation vasculaire fonctionnelle est donc importante au bon maintien de l'homéostasie des fluides de la rétine.

Bien que les nutriments et les ions diffusent dans toutes couches de la rétine neurale, la pression intraoculaire force continuellement de l'eau dans la rétine, tandis que la pression osmotique choroïdienne attire de l'eau à travers l'épithélium pigmentaire rétinien (ÉPR) et vers la choroïde(113) (figure 0.2, B)). La principale voie d'entrée aqueuse est via la glie de Müller provenant des capillaires rétinien(113; 17), tel que schématisé dans la figure 0.2, B).

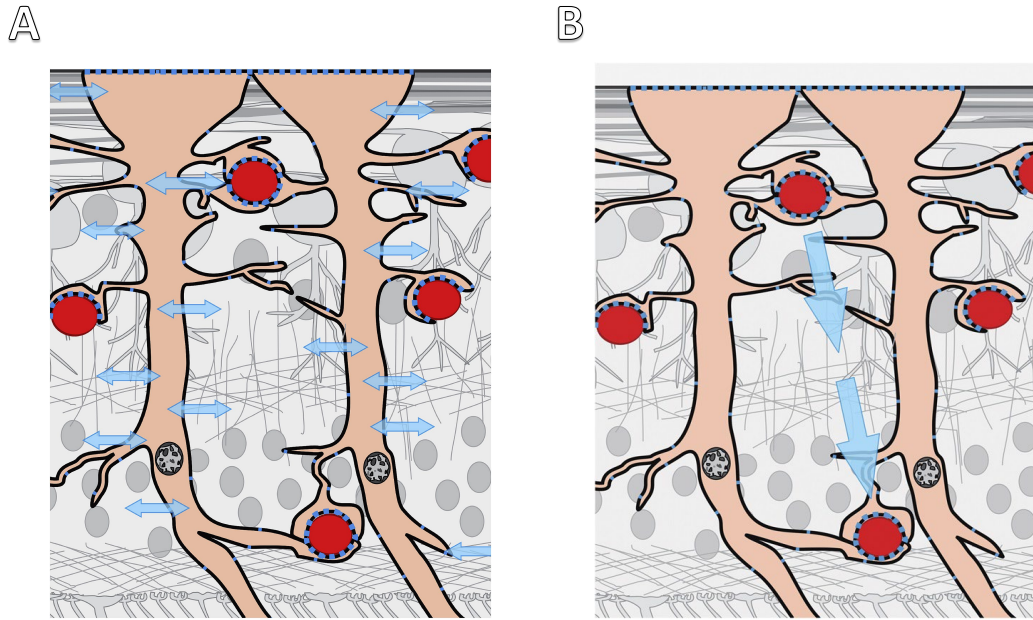


Fig. 0.2. Mouvement aqueux intrarétinien, figure tirée de Spaide et al., 2016 (111). Les glias de Müller (beige) sont en mesure d'effectuer des échanges aqueux bidirectionnels (flèches bleues) (A) via leur membrane cytoplasmique et via un transport facilité par les aquaporines de type 4 qui sont agrégées autour des capillaires (cercles rouges) du plexus vasculaire interne (vers le haut des figures A-B) et du plexus vasculaire externe (vers le bas des figure A-B).

0.2. La cascade visuelle

La rétine contient deux types de photorécepteurs : les bâtonnets et les cônes. Les cônes sont responsables de la vision des couleurs et de la vision détaillée, tandis que les bâtonnets sont plus sensibles à la lumière faible et sont responsables de la vision périphérique. Ces cellules convertissent les signaux lumineux en signaux électriques, qui sont ensuite transmis aux cellules bipolaires et ganglionnaires de la rétine. Les cellules bipolaires jouent un rôle de relais dans la transmission des signaux visuels de la rétine aux cellules ganglionnaires. Elles reçoivent les signaux des cellules photoréceptrices et les transmettent aux cellules ganglionnaires par le biais de synapses spécifiques. Les cellules ganglionnaires regroupent les signaux visuels provenant de plusieurs cellules bipolaires et envoient les informations au cerveau via le nerf optique(104; 51; 8). Les deux types de photorécepteurs ont un segment externe composé de disques membranaires contenant un photopigment sensible à la lumière. Chacun

a également un segment interne qui contient le noyau de la cellule et donne naissance aux terminaisons synaptiques qui sont en contact avec les cellules bipolaires et horizontales. Bien que chacun ait un type de photopigment qui lui soit propre, les étapes de la cascade visuelle sont autrement les mêmes. La terminologie utilisée se référera donc au photopigment et au complexe des bâtonnets.

La phototransduction (schématisée dans la figure 0.3) est le processus par lequel la cellule absorbe la lumière et crée une réponse pouvant atteindre le cortex visuel primaire (104; 51). La réponse est caractérisée par un changement dans le nombre de neurotransmetteurs qui sont libérés sur les neurones cibles. Les photopigments se trouvent dans les membranes des disques des segments externes des photorécepteurs et correspondent aux premières molécules interagissant avec la lumière. Ils initient la cascade visuelle. Dans les bâtonnets, le photopigment s'appelle la rhodopsine. Les sept domaines transmembranaires de la portion protéique de la molécule, appelée opsine, traversent la bicouche membranaire. L'opsine forme une poche dans laquelle se trouve la partie absorbant la lumière du photopigment, une molécule appelée rétinol ou rétinaldéhyde. Les photopigments des bâtonnets et des trois types de cônes diffèrent dans la partie protéique de la molécule, ce qui permet au rétinol d'absorber des longueurs d'onde spécifiques de lumière. D'abord, le rétinol se trouve dans une conformation appelée 11-cis-rétinal. Une fois un photon de lumière absorbé par le rétinol, une partie de cette double liaison se rompt, transformant le rétinol en une forme tout-trans rétinol et déclenche une série d'altérations dans la partie opsine de la molécule. Les changements dans la rhodopsine entraînent une cascade d'événements dans la cellule (104; 51).

Le prochain composant de la cascade visuelle est une protéine G trimérique appelée transducine, qui, dans son état inactif, est liée au GDP. La molécule de rhodopsine altérée active la transducine, lui permettant d'échanger son GDP contre du GTP. La sous-unité alpha de la transducine active ensuite une phosphodiesterase dans la membrane des disques, à proximité. La phosphodiesterase hydrolyse le GMP cyclique, réduisant ainsi la concentration de GMP cyclique dans l'ensemble du segment externe. Éventuellement, cette molécule n'est plus en concentration assez suffisante pour maintenir ouverts les canaux ioniques à la surface de la

membrane du segment externe (schématisé dans la figure 0.3) (104; 51). Dans l'obscurité, les canaux ioniques étant ouverts, l'afflux des ions sodium et calcium chargés positivement dépolairise la cellule. Le courant entrant est contré par des ions potassium chargés positivement qui sortent par les canaux potassiques, influençant l'hyperpolarisation. Cependant, les résultats combinés de ces flux ioniques entraînent la dépolairisation des photorécepteurs dans l'obscurité. À la noirceur, l'état dépolairisé de la membrane, qui est d'environ -40 mV, déclenche une libération continue de neurotransmetteurs des terminaisons synaptiques des cellules photoréceptrices. L'absorption de la lumière réduit la concentration de GMP cyclique dans le segment externe, ce qui entraîne la fermeture des canaux régulés par le GMP cyclique. En conséquence, la charge positive transportée par les ions potassium sort de la cellule plus rapidement que la charge positive transportée par les ions sodium et calcium ne rentre. La cellule devient hyperpolarisée, c'est-à-dire plus négative et réduit sa libération de neurotransmetteur (104; 51).

La rhodopsine activée est rapidement phosphorylée par la rhodopsine kinase, ce qui permet à la protéine arrestine de se lier à la rhodopsine. L'arrestine liée bloque la capacité de la rhodopsine activée à activer la transducine, tronquant ainsi efficacement la cascade de la phototransduction. En hydrolysant le GTP, la transducine activée possède un mécanisme de temporisation intégré pour s'éteindre peu de temps après son activation. Sans la transducine activée, la phosphodiesterase s'éteint également. Enfin, à travers une voie en plusieurs étapes, la cellule convertit la rhodopsine en une forme capable d'absorber la lumière à nouveau. Dans l'obscurité également, l'enzyme guanylate cyclase reconstitue les niveaux de GMP cyclique. Le GMP cyclique ouvre les canaux ioniques, permettant l'afflux d'ions et la dépolairisation de la cellule(104; 51).

L'une des caractéristiques importantes de cette cascade est qu'elle offre une amplification de signal exponentielle : une seule molécule de rhodopsine activée par la lumière peut activer environ 800 molécules de transducine (104). Bien que chaque transducine n'active qu'une seule molécule de phosphodiesterase, chaque phosphodiesterase est capable de dégrader jusqu'à six molécules de GMP cyclique, ce qui entraîne la fermeture d'environ 200

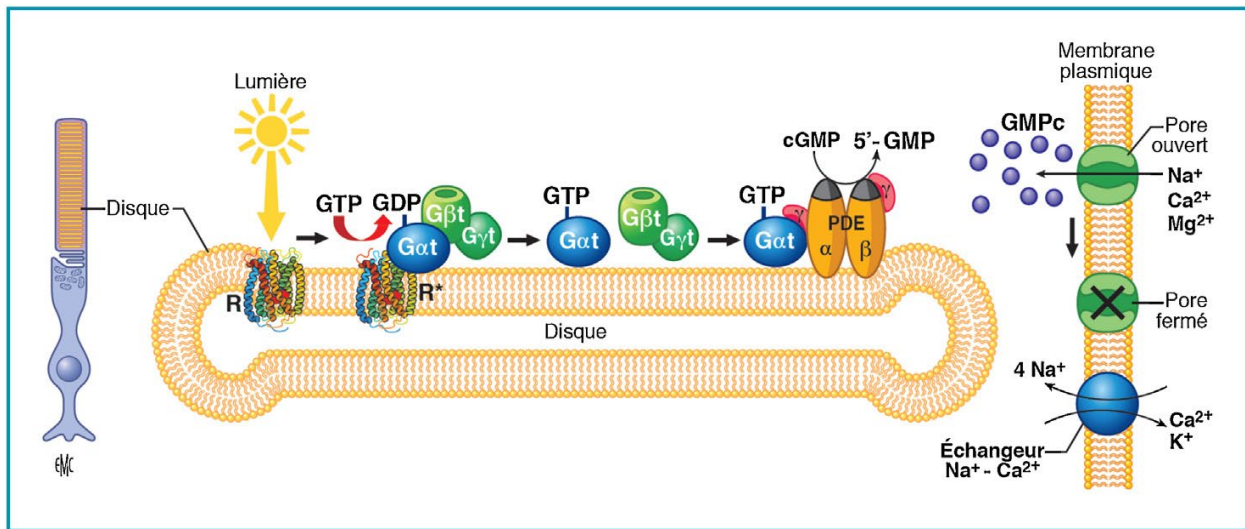


Fig. 0.3. Mécanisme de phototransduction - figure tirée de Salesse et al., 2017. (104)

canaux ioniques (104). Ce nombre de canaux représente qu'une fraction minimale (2 %) du nombre de canaux présents dans chaque bâtonnet qui sont ouverts dans l'obscurité, et leur fermeture entraîne un changement net du potentiel membranaire d'environ 1 millivolt. Les protéines présentes dans les photorécepteurs limitent la durée de cette cascade d'amplification et rétablissent les différentes molécules dans leurs états inactivés (104). Toute cette cascade visuelle ne serait possible sans la monocouche de cellules ne faisant pas partie de la rétine neurale sous-jacente aux photorécepteurs : l'épithélium pigmenté rétinien (ÉPR).

0.3. L'épithélium pigmenté rétinien

0.3.1. Caractéristiques physiologiques

L'ÉPR est une monocouche de cellules épithéliales de forme hexagonale située juste sous les photorécepteurs et assise sur la membrane basale et la choroïde. Elle a une myriade de fonctions, dont de nombreuses sont cruciales pour le bien-être de l'œil. Ses principales fonctions comprennent la phagocytose des débris de photorécepteurs, la barrière hémato-rétinienne

(BHR ou BRB), l'homéostasie de l'eau, la prévention de la photo-oxydation en bloquant la lumière avec ses pigments, le transport du glucose ainsi que la transformation essentielle du tout-trans-rétinol en 11-cis-rétinal(108), tel que figuré dans la figure 0.4. , elle empêche également l'entrée de molécules toxiques et de composants plasmatiques(108; 46; 28).

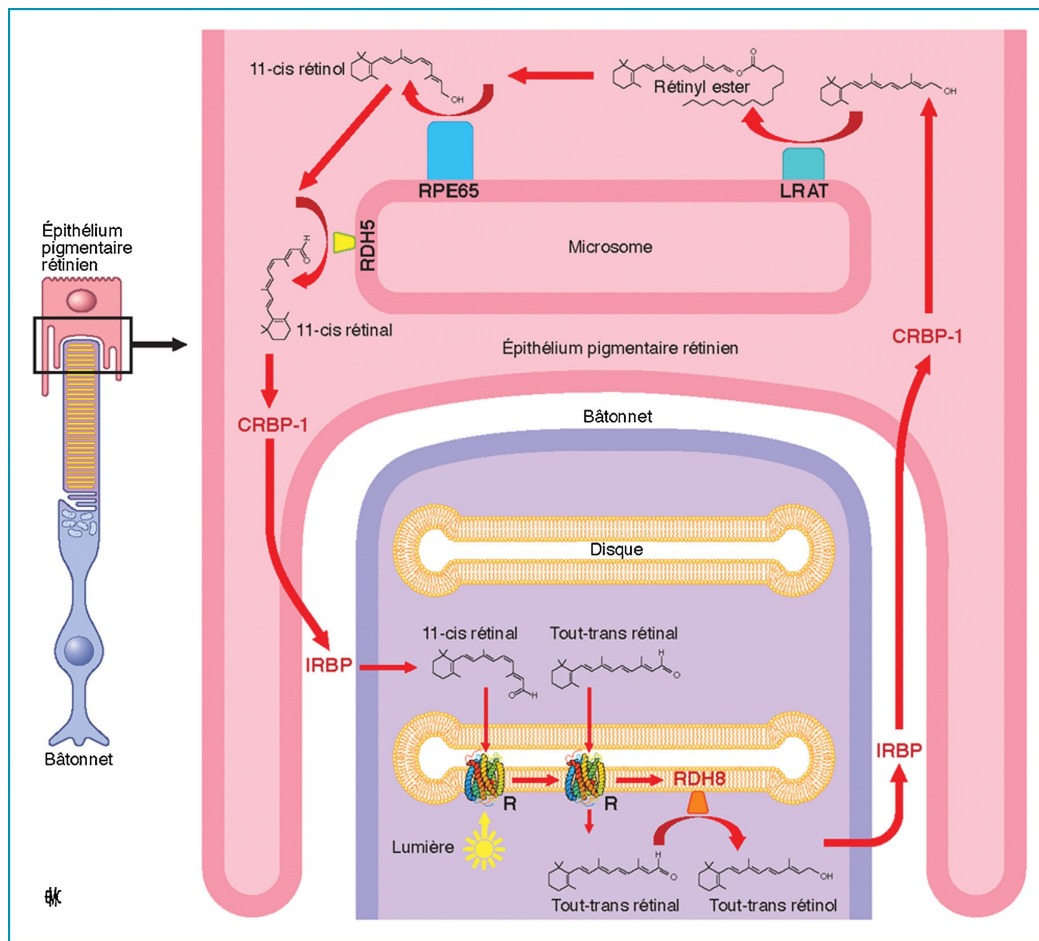


Fig. 0.4. Phototransduction, figure tirée de Salesse et al., 2017 (104). La figure met en évidence l'isomérisation du chromophore de la rhodopsine (le 11-cis rétinol) en tout-trans rétinol, puis son oxydation dans la portion apicale du segment externe d'un bâtonnet (violet). Le produit métabolique oxydé devra être transporté successivement par l' *interphotoreceptor binding protein* (IRBP) et la *cellular retinol binding protein-I* (CRBP-I) dans le cytoplasme de l'ÉPR (rose) pour régénérer le chromophore. Cette régénération est effectuée par trois enzymes clés : la lécithine rétinol acyltransférase (LRAT), la rétinol isomérohydrolase (RPE65) et la rétinol déshydrogénase 5 (RDH5). Le substrat traverse l'interface entre l'ÉPR et le photorécepteur par la CRBP-I et l'IRBP où il se liera à l'opsine pour régénérer la rhodopsine des bâtonnets.

0.3.2. Phagocytose

La relation métabolique entre les villosités apicales de l'ÉPR et les photorécepteurs est considérée comme essentielle pour le maintien de la fonction visuelle. Le cycle de la vitamine A, décrit plus haut, est certainement un exemple, mais n'est pas le seul. Un autre processus à la base de cette relation capitale est la phagocytose des segments externes des photorécepteurs (51; 28).

0.3.3. Barrière hémato-rétinienne

Dans l'oeil, la préservation et l'entretien de l'environnement approprié est possible grâce au système des barrières sang-oculaire, permettant le fonctionnement optimal des cellules visuelles. Il est formé par deux barrières principales : la barrière sang-humeur aqueuse et la barrière sang-rétinienne (BRB). La BRB est particulièrement étanche et restrictive, et constitue une barrière physiologique qui régule le flux d'ions, de protéines et d'eau dans et hors de la rétine. La BRB est composée de deux composants, la BRB interne (iBRB) formée de jonctions serrées entre les cellules endothéliales des capillaires rétiniens, et la BRB externe (oBRB) formée de jonctions serrées entre les cellules épithéliales pigmentaires rétiniennes (108; 46; 28). La BRB est essentielle pour maintenir l'œil comme un site privilégié et est indispensable au fonctionnement visuel normal.

La iBRB est maintenue par ce que l'on réfère comme l'unité neurovasculaire rétinienne (UNV) : des cellules endothéliales vasculaires rétiniennes (avec leur double membrane basale) entourées de péricytes et de cellules gliales, notamment les astrocytes, les cellules de Müller et les microglies. Cette section de la BRB est avant tout fonctionnelle dû aux jonctions serrées (zonulae occludentes) entre les cellules endothéliales rétiniennes voisines (108; 46; 28). Ces jonctions serrées spécialisées restreignent la perméabilité diffusionnelle de la couche endothéliale rétinienne à des valeurs de l'ordre de $0,14 \times 10^{-5} \text{ cm s}^{-1}$ (testé à l'aide de la fluorescéine de sodium) (29). Cette couche continue de cellules endothéliales, qui constitue la structure principale de la iBRB, repose sur une lame basale recouverte d'extensions d'astrocytes et des cellules de Müller. Les péricytes sont également présents en contact étroit avec les cellules

endothéliales. Pourtant, ils ne forment pas une couche continue et ne contribuent donc pas directement à la barrière diffusionnelle (30). Les astrocytes, les cellules de Müller et les péricytes sont considérés comme influençant l'activité des cellules endothéliales rétiniennes et de la iBRB en transmettant aux cellules endothéliales des signaux régulateurs indiquant les changements dans le microenvironnement du circuit neuronal rétinien. L'UNV est composée de cellules endothéliales vasculaires rétiniennes avec leur double membrane basale, entourées de péricytes et de cellules gliales, notamment les astrocytes, les cellules de Müller et les microglies (88).

La BRB externe (oBRB) est établie par la monocouche d'ÉPR, reliée par des jonctions serrées (zonulae occludentes) à leurs sommets. La membrane de Bruch, sous-jacente à l'ÉPR, sépare la rétine neurale des choriocapillaires fenestrés et joue un rôle fondamental dans la régulation de l'accès des nutriments du sang aux photorécepteurs, ainsi que dans l'élimination des déchets et le maintien de l'adhérence rétinienne (28).

0.3.4. Homéostasie aqueuse

Dans le segment postérieur, l'homéostasie aqueuse est créée et activement maintenue par trois composantes : le réseau vasculaire (la choroïde, le plexus interne et externe), l'ÉPR ainsi que les glies de Müller (111). D'un point de vue cellulaire, l'homéostasie aqueuse est régulée par un transport actif ou un transport passif des molécules d'eau de part et d'autre des bicouches lipidiques membranaires concernées (fig. 0.2 (A)). Bien qu'un transport passif bidirectionnel de l'eau soit possible à travers la membrane cytoplasmique et qu'il soit responsable de certaines homéostasies de l'eau dans tout le corps, il est certainement beaucoup moins efficace que le transport médié par les canaux aqueux de la famille des aquaporines. En tant que tels, les aquaporines sont exprimées dans une multitude de types de cellules, de tissus et de systèmes impliqués dans le transport de l'eau tels que les reins, les poumons, le système gastro-intestinal, les épithéliums, les endothéliums, les glandes exocrines, le système cardiovasculaire, l'œil, etc. Elles sont également exprimées dans des types de cellules/tissus

pas aussi évidemment impliqués dans le transport aqueux, tels que les globules rouges, certains leucocytes, certains adipocytes ainsi que le muscle squelettique(33). Les aquaporines forment une famille de protéines responsables de la majorité de l'homéostasie de l'eau dans tout le corps via le transport bidirectionnel de molécules d'eau et de petites espèces neutres facultativement telles que le glycérol et l'urée à travers la membrane cytosolique.

Bien qu'il ait été rapporté que la régulation des mécanismes chez les organismes végétaux lorsqu'un contact avec des ions de métaux lourds se produit, de plus en plus de preuves concernant les cellules mammifères indiquent la présence d'un mécanisme totalement différent. Les aquaporines sont une famille de protéines hautement conservées. Bien que les métaux lourds soient encore considérés comme des inhibiteurs puissants de l'AQP chez les souris et les êtres humains (2), des études récentes ont rapporté la localisation subcellulaire d'AQP (AQP4) dans les vésicules du système nerveux (65), ce qui est concomitant avec une autre étude qui rapporte l'invagination du canal d'eau après son inhibition (85). Comme le domaine de régulation est le site des actions des médicaments chez les aquaporines mammifères également (125), il semble qu'il y ait deux mécanismes d'action plausibles. Bien que les AQP soient exprimées dans une grande variété de tissus/types de cellules, leur expression dépend de l'âge (106).

0.4. Dérégulation de l'homéostasie aqueuse dans le segment postérieur

Les mécanismes par lesquels l'ischémie ou l'inflammation entraînent une accumulation de liquide (et de protéines) dans le tissu rétinien, ainsi que les conséquences fonctionnelles de l'œdème (en particulier en ce qui concerne l'induction de l'apoptose neuronale), sont largement non résolus (18; 13). La plupart des auteurs privilégient l'œdème vasogénique (extracellulaire) comme principal pathomécanisme dans les cas d'œdème inflammatoire et ischémique. Les médiateurs inflammatoires tels que les cytokines pro-inflammatoires, les prostaglandines et/ou le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) provoquent une

ouverture des barrières hématorétiniennes qui entraîne une fuite de sérum dans le parenchyme rétinien (18).

0.4.1. L'œdème maculaire diabétique (DME)

Le diabète est l'un des plus grands problèmes de santé publique et sa prévalence devrait continuer à augmenter dans les décennies à venir (16; 53; 63). Le diabète a de nombreuses complications telles que les maladies cardiaques et les accidents vasculaires cérébraux, les maladies rénales et la rétinopathie diabétique (DR), pour n'en nommer que quelques-unes. La rétinopathie diabétique est la principale cause de perte de vision chez les adultes actifs en Amérique du Nord (81; 1; 91). Plus spécifiquement, l'œdème maculaire diabétique (DME), qui est une accumulation de liquides (et de protéines) entre les couches de la rétine, est la cause la plus courante de perte de vision due à la DR (80; 111; 13).

0.4.1.1. **Épidémiologie.** Bien avant l'avènement de la médecine moderne, le diabète en tant que maladie a été mentionné il y a environ 3 500 ans, en Égypte. Plus tard, les collections médicales indiennes ont même discriminé entre une forme congénitale et une forme tardive de l'affliction (6; 119). Beaucoup plus tard, au début du XXe siècle, plusieurs scientifiques éminents sont réputés avoir été très proches de la première découverte/isolation de l'insuline, à savoir le physiologiste français Eugène Gley, le médecin roumain Nicolae Constantin Paulescu, George Zuelzer d'Allemagne et Ernest Scott des États-Unis (6; 119). Cette découverte officielle en 1921, considérée comme l'une des plus grandes avancées de l'histoire du traitement du diabète, revient au canadien Dr Frederick Banting et au candidat au doctorat Charles Best. Il est inutile de retourner des millénaires en arrière pour apprécier un progrès phénoménal : nos connaissances du diabète sucré (appelé ci-après diabète), de son diagnostic ainsi que de son traitement ont parcouru un long chemin incroyable depuis la découverte officielle de l'insuline, il y a un peu plus d'un siècle (119). C'est maintenant généralement une maladie gérable avec notre technologie actuelle si les patients ont le privilège d'y avoir accès. Bien que beaucoup de progrès aient été réalisés, le diabète reste une pathologie avec

une panoplie de complications. En raison de sa nature polygénique avec des facteurs environnementaux importants, la plupart des démographies sont touchées de manière disparate (âge, origine ethnique, géographie et statut socio-économique) (109). De plus, des études concernant sa prévalence prévue s'accordent à dire qu'elle devrait augmenter considérablement dans les décennies à venir (16; 53; 63), en particulier dans les pays à revenu faible à modéré (53; 63).

Le diabète sucré est divisé en deux types distincts, nommés conséquemment. C'est la combinaison de la disposition génétique ainsi que des facteurs environnementaux tels que l'alimentation, le microbiome et le mode de vie (activité physique) qui prédispose chaque individu à l'un ou l'autre type de diabète dans une mesure variable (109). Le diabète de type 1 (DT1) affecte principalement les personnes d'ascendance caucasienne/européenne, avec son composant génétique influençant plus fortement le début de la pathologie (109; 37). Son apparition est connue pour être plus précoce que son homologue, car une partie du composant génétique de la pathologie correspond à un ensemble de gènes associés à l'auto-immunité des îlots pancréatiques (109). Le diabète de type 2 (DT2) est couramment associé à une résistance à l'insuline et bien qu'il s'agisse également d'une pathologie polygénique, l'étiologie environnementale a un impact crucial sur le début de la maladie. En effet, certains des plus grands facteurs de risque du DT2 sont l'IMC, l'alimentation et le mode de vie (sédentaire)(109). Ainsi, la démographie de ce sous-type ne dépend pas tant de l'origine ethnique que de la géographie et du statut socio-économique.

Quelle que soit la légère différence de physiopathologie, leur similitude vaut la peine d'être soulignée. Le facteur commun est que l'hyperglycémie chronique entraîne une série d'effets indésirables(109). Comme mentionné brièvement, ces complications comprennent les maladies cardiaques et les accidents vasculaires cérébraux, les maladies rénales, la neuropathie et une des deux pathologies d'intérêt de mon passage à la maîtrise : la rétinopathie diabétique (DR). La rétinopathie diabétique se subdivise en deux type: la rétinopathie diabétique proliférative ou non proliférative. Un DME peu survenir tout aussi bien dans un sous-type comme dans l'autre (7). Bien qu'un indice glycémique chroniquement élevé et la

durée du diabète sucré soient tous deux des facteurs de risques prévalents (69; 7), des études épidémiologiques ont quantifié et mis en évidence un risque significativement accru de DME chez les patients DT2 prenant de l'insuline d'abord, chez les patients DT2 ne prenant pas d'insuline ensuite comparé aux patients souffrant de DT1 (68). Ces données sont d'un intérêt particulier puisque l'incidence de DR 25 ans après le début de la condition est de plus de 95 % chez les individus ayant un DT1 et 60 % chez les individus ayant un DT2 (67). Ces données sont concomitantes avec les observations cliniques citant l'absence de présentation de DME chez les enfants.

0.4.1.2. **Facteurs de risques.** Bien qu'il y ait certainement un chevauchement, les facteurs de risque pour le DME sont plus diversifiés que ceux du DR (37). Voici une liste non exhaustive de la plupart d'entre eux, dans l'ordre chronologique d'importance : l'hyperglycémie chronique (par rapport à l'administration intensive d'insuline aiguë chez certains patients), l'hypertension artérielle, la dyslipidémie (les statines réduisent le DME), la néphropathie, possiblement l'anémie (jamais étudiée de manière indépendante), l'apnée du sommeil, les glitazones potentiellement ainsi que les grossesses (37). Il existe de nombreux types de complications causées par l'hyperglycémie chronique. En effet, elle est connue pour induire la sénescence dans les cellules endothéliales vasculaires, ce qui entraîne une fuite vasculaire. Des études plus récentes sont concomitantes avec ces résultats. Pourtant, elles ajoutent que les cellules exposées à une forte teneur en glucose de manière intermittente présentent encore plus de marqueurs associés à la sénescence (76). Par conséquent, l'hyperglycémie provoque la rupture des deux composants de la barrière hémato-rétinienne via l'induction de la sénescence dans les cellules endothéliales vasculaires du choriocapillaire, ce qui entraîne une fuite vasculaire, ainsi que via l'altération du transport des fluides dans l'ÉPR (36).

0.4.1.3. **Pathogenèse actuelle.** La rétinopathie diabétique est considérée comme une maladie microvasculaire étroitement liée à l'hyperglycémie et à l'inflammation chronique (123). De plus, des irrégularités ou des interruptions dans la monocouche de l'ÉPR favorisent la néovascularisation choroïdienne (70). Il a été démontré que la maladie était associée avec le début d'un dérèglement vasculaire de la rétine précoce. Dans les phases ultérieures de la

maladie, l'hypoxie du tissu rétinien est un déclencheur important de la néovascularisation qui menace la vue(91). La pathologie est subdivisée en trois formes distinctes : l'accumulation progressive de changements microvasculaires (rétinopathie non proliférante), la non-perfusion capillaire rétinienne ainsi que l'œdème maculaire (DME) (5). Bien que l'accumulation de liquides puisse être présente dans la rétine à n'importe quel stade de la RD (37; 91), la présence de poches de liquide est nécessaire pour avoir une maculopathie diabétique. En effet, le DME comprend à la fois une fuite vasculaire diffuse et focale (5), ce qui est reflété dans le tableau de classification de l'École européenne des études avancées en ophtalmologie (ESASO) (Figure 0.5) (10).

L'accumulation de liquide - caractérisée par des poches (œdème cystoïde) ou un épaissement d'une couche donnée (œdème non-cystoïde)- est susceptible d'être localisée dans la couche plexiforme externe (OPL) et/ou dans l'espace sous-rétinien (entre la couche des photorécepteurs et l'épithélium pigmentaire rétinien (ÉPR)).

Stage	T	C	E and/or D
Early DME	T1	C1	E0 and D0
	T1	C2	E0 and D0
Advanced DME	T1	C1	E1 and D0 or D1
	T1	C2	E1 and D0 or D1
	T2	C1	E0 and D0 or D1
	T2	C1	E1 and D0 or D1
	T2	C2	E0 and D0 or D1
	T2	C2	E1 and D0 or D1
	T2	C3	E0 and D0 or D1
Severe DME	T1	C1	E2 and D0 or D1
	T1	C2	E2 and D0 or D1
	T2	C1	E2 and D0 or D1
	T2	C2	E2 and D0 or D1
	T2	C3	E2 and D0 or D1
Atrophic maculopathy	T0	C0	E2 and D0 or D1
	T0	C1	E2 and D0 or D1
	T0	C2	E2 and D0 or D1

Adapted from Panozzo et al. [73]. DM, diabetic maculopathy; EZ, ellipsoid zone; ELM, external limiting membrane; DRIL, disorganization of the inner retinal layers; IVD, incomplete posterior vitreous detachment; PVD, complete posterior vitreous detachment; VMT, vitreomacular traction; ERM, epiretinal membrane; DME, diabetic macular edema.

<i>Thickening (T)</i>	
0	Less than 10% increase above upper normal values
1	More than 10% but less than 30% increase above upper normal values
2	More than 30% increase above upper normal values
<i>Cysts (C)</i>	
0	Absent
1	Mild
2	Moderate
3	Severe
<i>EZ and/or ELM status (E)</i>	
0	Intact
1	Disrupted
2	Absent
<i>DRIL (D)</i>	
0	Absent
1	Present
<i>Hyperreflective foci (H)</i>	
0	Less than 30 in number
1	More than 30 in number
<i>Subretinal fluid (F)</i>	
0	Absent
1	Present
<i>Vitreoretinal relationship (V)</i>	
0	Absence of any visible adhesion or traction between vitreous cortex and retina
1	IVD
2	PVD
3	VMT
4	ERM

Fig. 0.5. *Charte des critères de classification d'une maculopathie diabétique.* (10)

Dans ce contexte, il existe trois mécanismes connus menant à l'accumulation de liquide rétinien : la voie exsudative, la voie transsudative et la voie mixte. Dans la voie exsudative, il y a une fuite du plexus capillaire rétinien ainsi qu'un drainage altéré. Dans la voie

transsudative, il y a une hyperperméabilité choroïdienne ainsi qu'un dysfonctionnement de la fonction de pompe de l'ÉPR. Dans la voie mixte, il y a une fuite de néovascularisation choroïdienne. Cela étant dit, le DME correspond au type exsudatif.

0.4.1.4. **Les outils diagnostiques.** La première classification des différents phénotypes de la rétinopathie diabétique (RD) remonte au Symposium d'Airlie House en 1968. Les phénotypes ont été classés en treize étapes différentes, dont plusieurs ont été accompagnés d'un montage photographique, facilitant la reproductibilité et la standardisation du processus (10). Ce document a également exposé les connaissances disponibles sur la RD à l'époque, ainsi que les thérapies recommandées en fonction de leur classification (10). L'introduction de la tomographie en cohérence optique (OCT) en 1991 a permis une caractérisation plus pertinente de la maculopathie diabétique (MD) et une étude longitudinale non invasive de l'évolution du phénotype ainsi que des effets des thérapies développées(10). Elle est encore largement considérée comme la référence aujourd'hui, car elle est plus précise dans sa quantification de l'épaississement rétinien(37; 5). Bien que l'OCT reste la référence aujourd'hui, l'OCT angiographie (OCTA) pourrait lentement remplacer l'ancienne technique si elle est disponible. En effet, l'OCTA combine les avantages de l'OCT et de l'angiographie à la fluorescéine pour analyser l'intensité de la lumière réfléchie et ses variations temporelles, générant un contraste entre les vaisseaux et les tissus(99).

0.4.1.5. **Les thérapies.** Il existe trois principaux types de thérapies, présentés dans leur ordre chronologique d'apparition : la photocoagulation (thérapie au laser), qui offre de bons résultats à long terme, mais peut causer des dommages collatéraux, les stéroïdes, qui offrent de bons résultats à court terme et les agents anti-VEGF (bêvacizumab et ranibizumab), dont les effets à long terme sont encore incertains(37). Un sénolytique, inhibiteur de Bcl-xL, est en voie de compléter la phase clinique 2 pour le traitement de DME (117). Cette approche thérapeutique a pour avantage de minimiser l'impact sur les tissus sains.

0.4.2. Dégénérescence maculaire liée à l'âge

La dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) est une maladie oculaire progressive qui affecte la macula, une petite zone de la rétine responsable de la vision centrale. Elle est la principale cause de perte de vision chez les personnes âgées de plus de 50 ans. La DMLA de type exsudatif, également connue sous le nom de DMLA néovasculaire, est une forme avancée de la DMLA qui se caractérise par la croissance anormale de vaisseaux sanguins anormaux dans la macula, la région centrale de la rétine responsable de la vision centrale et des détails fins. Cette forme de DMLA représente environ 10 à 15% de tous les cas de DMLA (66; 91; 52; 107).

La DMLA de type exsudatif est souvent considérée comme une manifestation plus sévère de la maladie, car elle est associée à une perte de vision plus rapide et plus significative que la DMLA de type atrophique (sèche). Elle se caractérise par la formation de nouveaux vaisseaux, également appelés néovascularisation chorioretinienne, qui se développent dans la choroïde, la couche vasculaire située sous la rétine. Ces vaisseaux sanguins anormaux sont fragiles et peuvent fuir du liquide et du sang dans la rétine, entraînant des dommages et une altération de la fonction visuelle.

0.4.2.1. **Épidémiologie.** Cette maladie neurodégénérative est une des principales causes de cécité dans le monde pour la population âgée de plus de 50 ans(52; 107; 97; 116; 66; 91). En 2020, on estime que la prévalence de la maladie est de 196 millions de cas et que celle-ci augmentera à 288 millions en 2040 (52; 97; 116; 66; 91).

0.4.2.2. **Facteurs de risques.** Plusieurs facteurs de risque sont associés au développement de la DMLA. L'âge est le principal facteur de risque, car la prévalence de la maladie augmente avec l'avancée en âge. Les antécédents familiaux de DMLA, le tabagisme, l'hypertension artérielle, l'obésité, l'exposition excessive aux rayons ultraviolets, une alimentation pauvre en antioxydants et une prédisposition génétique (le gène du facteur de complément H) sont également des facteurs qui peuvent contribuer au développement de la maladie (52; 107; 97; 116; 66; 91).

En plus de l'implication du système immunitaire inné suggéré via la prédisposition génétique reliée au gène du facteur de complément H, et au dérèglement de la BRB interne, des études suggèrent que la sénescence de l'ÉPR peut jouer un rôle dans le développement et la progression de maladies rétiniennes telles que la DMLA (44). L'accumulation de cellules sénescents dans l'ÉPR peut contribuer à l'inflammation chronique, à la formation de dépôts anormaux et à la détérioration des tissus rétiniens(44).

0.4.2.3. Pathogénèse actuelle. La DMLA est classifiée en deux types : la DMLA dite sèche (atrophie géographique) ou encore la DMLA dite exsudative. Bien que la DMLA de forme exsudative est souvent considérée comme une manifestation plus sévère de la maladie dû à la rapidité accrue de la perte de vision, il est possible pour l'atrophie géographique de progresser en un type exsudatif de la pathologie (52; 107; 97; 116; 66). De ce fait, les éléments de la pathogénèse de l'atrophie géographique se retrouvent également dans la pathogénèse de la version exsudative. Par souci de concision, ils ne seront mentionnés que dans la première définition.

L'atrophie géographique est considérée comme une conséquence de la dégénérescence progressive des cellules de la rétine, en particulier des cellules photoréceptrices de la région maculaire et des cellules du pigment épithélial rétinien. La formation des dépôts de drusen, qui sont des accumulations de matériel lipidique et protéique dans la rétine, est souvent observée avant le développement de l'atrophie géographique. Ces dépôts peuvent entraîner une inflammation et des dommages aux cellules rétiniennes, contribuant ainsi à la progression de la maladie (44). La DMLA de type exsudatif se distingue par une augmentation de la production d'un facteur de croissance appelé le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF). Une surproduction de VEGF stimule la croissance de nouveaux vaisseaux sanguins anormaux dans la choroïde et la rétine, créant ainsi un environnement favorable à la fuite de liquide et de sang (48). Cette néovascularisation entraîne une accumulation de liquide sous ou dans la rétine, provoquant un œdème maculaire et des dommages aux cellules rétiniennes responsables de la vision centrale (107; 66; 91).

0.4.2.4. **Les thérapies.** Qu'elle soit précoce, de type exsudative ou sèche, le diagnostic de la DMLA repose sur des examens complémentaires tels que l'examen du fond d'œil, la tomographie en cohérence optique (OCT) et la fluorescéine angiographie si l'OCT-A n'est pas accessible(99). Les thérapies actuelles pour la DMLA de type exsudatif comprennent les injections intravitréennes d'agents anti-VEGF tels que l'Avastin (bevacizumab), le Lucentis (ranibizumab) et l'Eylea (aflibercept)(66; 107). Ces médicaments bloquent le VEGF réduisant ainsi la croissance des néovaisseaux, ce qui permet de stabiliser ou d'améliorer la vision chez de nombreux patients. Les traitements par laser et la photodynamique sont également utilisés dans certains cas spécifiques(107).

Cependant, il est important de souligner que la DMLA de type exsudatif est une maladie chronique et progressive, et que les traitements actuellement sur le marché ne sont pas curatifs, mais visent plutôt à ralentir sa progression et à préserver la fonction visuelle. Une surveillance régulière par un ophtalmologiste est essentielle pour détecter et traiter rapidement toute rechute ou progression de la maladie(24; 55). Étant une forme avancée de la DMLA, ce type de la pathologie est caractérisé par la croissance anormale de vaisseaux sanguins dans la rétine. Elle entraîne une perte de vision significative et nécessite une prise en charge médicale. Les traitements actuels visent à bloquer la croissance des vaisseaux sanguins anormaux et à préserver la fonction visuelle.

Actuellement, il n'existe également pas de traitement curatif pour la forme sèche de la pathologie. Les options thérapeutiques se concentrent principalement sur la gestion des symptômes et la prévention de la progression de la maladie. Des suppléments vitaminiques, tels que les vitamines C et E, le zinc et les caroténoïdes, ont été étudiés pour leur effet potentiel sur la réduction du risque de progression de l'atrophie géographique (97). De plus, des essais cliniques sont en cours pour évaluer l'efficacité de thérapies émergentes telles que les thérapies géniques et les thérapies cellulaires pour traiter cette condition(52; 107; 97; 116; 66). Parmi ces thérapies émergentes potentielles, un sénolytique inhibiteur de Bcl-xL, est en voie de compléter la phase clinique 2 pour le traitement de la DMLA (117). Cette approche thérapeutique a pour avantage de minimiser l'impact sur les tissus sains. Elle est

conceptuellement plus curative que les thérapies actuelles sur le marché puisqu'elle favorise, à tout le moins, la régénération d'un réseau vasculaire sain (117).

0.5. La sénescence

La sénescence cellulaire est un processus complexe qui se produit lorsque les cellules cessent de se diviser et entrent dans un état de vieillissement permanent. Cela peut être dû à divers facteurs, notamment le vieillissement naturel, le stress cellulaire ou l'accumulation de lésions de l'ADN.

Le vieillissement dans l'œil sain ne peut pas être expliqué sans sénescence. En effet, bien que la présence de cellules sénescents dans un tissu favorise normalement la réparation/le remodelage après une blessure ou pendant la croissance, le vieillissement peut être défini comme l'accumulation de cellules sénescents persistantes dans un tissu donné, entraînant une perte progressive de la fonction tissulaire (24; 55). La sénescence peut être décrite comme un arrêt de la prolifération provoqué par divers stimuli possibles, et bien que la cellule soit généralement encore quelque peu métaboliquement active, elle est généralement accompagnée d'une certaine perte de fonction cellulaire (24; 55; 54). La sénescence a été étudiée au cours des cinquante dernières années ; elle est assez bien décrite *in vivo*, mais mal comprise *in vivo* (24; 55). Étant donné que la sénescence peut être caractérisée différemment en fonction du tissu et des différents cocktails de facteurs de stress qui entraînent son induction, il est compréhensible qu'elle soit délicate à prononcer. Néanmoins, les marqueurs les plus courants sont l'activité de la SA--Galactosidase, les inhibiteurs du cycle cellulaire p16INK4a, p21 (et dans une moindre mesure p53), ainsi que certains phénotypes associés à la sénescence (SASP) (76; 55). Il existe de nombreux types de sénescence : la sénescence répliquative (également connue sous le nom de raccourcissement des télomères), la sénescence induite par oncogènes (OIS), la sénescence induite par le stress oxydatif (OSIS), la sénescence épigénétique, la sénescence induite par des dommages à l'ADN, la sénescence secondaire ou la sénescence paracrine, la sénescence induite par la chimiothérapie et la sénescence associée

à la dysfonction mitochondriale (MIDAS) (55). Il convient de noter les récents développements concernant la sénescence répliquative par un laboratoire basé au CHUM. Ghadaouia et al. ont récemment amélioré le modèle de raccourcissement des télomères, relatant qu'il s'agissait de dommages irréversibles de l'ADN non-téломérique après une dernière division suivant le décoiffage des télomères qui conduisait à une sénescence stable plutôt que le simple décoiffage des télomères (49).

Tel que mentionné précédemment, l'état métabolique décrit par la sénescence est variable selon le type cellulaire qu'il décrit et variable dans son phénotype sécrétoire(127; 35). Ceci étant dit, la mention du SASP en général évoque une série de facteurs récurrents (35). En plus de faire partie d'un vieillissement physiologique, la sénescence peut à la fois être causale ou conséquentielle à une pathologie sous-jacente. Il y a plusieurs mécanismes reliés à la sénescence dans des conditions pathologiques (21), par exemple un mécanisme dans lequel les cellules sénescents peuvent induire la sénescence dans les cellules voisines (84). Ceci correspond à la sénescence secondaire ou paracrine et est d'un intérêt particulier dans une pathologie telle la DMLA (15; 74; 56; 21).

En général, le SASP est considéré comme hautement dépendant du type cellulaire et divers en termes de facteurs sécrétés(127; 21). Cependant, il existe plusieurs marqueurs SASP partagés par la plupart des cellules exprimant le SASP. Ces marqueurs comprennent, mais ne sont pas limités à la liste du tableau ?? (p.54) des composantes communes du SASP (35; 100; 22).

Cependant, il est important de réitérer qu'aucun de ces marqueurs n'est vraiment spécifique à ce phénotype unique (100; 127; 35). Autrement dit, le vaste phénotype de ces sécrétions chevauche souvent partiellement de phénotype associé à d'autres réponses biologiques telles la prolifération ou l'inflammation (100). Ce phénotype générique comporte aussi des marqueurs communs à des états métaboliques basaux ou « sains » de certain type cellulaire (100). Des efforts sont actuellement déployés pour profiler davantage le SASP de différentes cellules en caractérisant les facteurs spécifiques qui sont sécrétés afin de développer de meilleurs biomarqueurs spécifiques au tissu étudié (22).

Tableau 0.1. Liste du SASP

Abréviation	Nom
SA-b-Gal	Beta-galactosidase associée à la sénescence
FGFs	Facteurs de croissance des fibroblastes
PDGF	Facteur de croissance dérivé des plaquettes
VEGF	Facteur de croissance endothélial vasculaire
TGF-bêta	Facteur de croissance transformant bêta
TNF-alpha	Facteur de nécrose tumorale-alpha
GM-CSF	Facteur de stimulation des colonies granulocytaires-macrophagiques
SDF-1	Facteur stromal dérivé des cellules-1
TIMPs	Inhibiteur tissulaire des métalloprotéinases
PAI-1	Inhibiteur de l'activateur du plasminogène-1
IFN-gamma	Interféron-gamma
IL-1 alpha	Interleukine-1 alpha
IL-1 bêta	Interleukine-1 bêta
IL-6	Interleukine-6
IL-8	Interleukine-8
CCL2	Ligand de la chimiokine 2
MMPs	Métalloprotéinases de matrice
MCP-1	Protéine chimiotactique des monocytes-1
IGFBPs	Protéines de liaison aux facteurs de croissance de type insuline

0.5.1. Question et hypothèse de travail

Les concepts et les facteurs présentés dans cette introduction mettent en évidence le fait que nous avons parcouru un long chemin depuis l'avènement de l'insuline en ce qui concerne notre compréhension du mécanisme du diabète et de ses complications. Bien que le diabète en tant que maladie soit théoriquement gérable avec les technologies actuelles, de nombreuses personnes n'ont pas accès aux ressources nécessaires pour le prévenir, le diagnostiquer ou le prendre en charge. Lorsque des complications se développent, de nombreuses personnes répondent de manière insatisfaisante aux thérapies actuelles. Enfin, les estimations mondiales prévoient une prévalence croissante de la maladie et cette augmentation s'accompagne d'une augmentation des complications liées à l'augmentation de l'espérance de vie. Compte tenu de cela, nous constatons toujours un besoin poignant de comprendre les facteurs qui conduiront à l'apparition de ces complications et de définir de nouvelles cibles thérapeutiques. Il est donc nécessaire d'étudier les facteurs qui maintiennent l'homéostasie de l'eau dans la rétine. Ainsi, nous proposons d'étudier les facteurs responsables du maintien de l'homéostasie des fluides

réiniens et leur modulation dépendante de l'âge dans deux types de cellules pertinents. Les aquaporines (AQP) ont été choisies comme cibles, car elles sont responsables de la plupart de l'homéostasie de l'eau en permettant un transport efficace bidirectionnel de l'eau (et éventuellement du glycérol) à travers la membrane cytoplasmique (120). Les deux types de cellules d'intérêt sont l'ÉPR ainsi que la glie de Müller, tous deux jouant un rôle significatif dans le maintien de l'homéostasie de l'eau dans la rétine.

Certains ont émis l'hypothèse que le DME n'est pas observé dans les débuts du DT1 contrairement au DT2 en raison d'un diagnostic tardif courant du DT2. Comme le soulignent les différents concepts présentés dans l'introduction, nous supposons que les glies de Müller et l'ÉPR exprimant des aquaporines jouent un rôle dans le développement de la maculopathie diabétique. Notre équipe a décidé d'étudier le rôle des aquaporines, des glies de Müller et de l'ÉPR dans le développement de l'œdème en tant que complication du diabète. C'est en ayant connaissance de cette mise en contexte et de ces hypothèses que la question de recherche suivante a été formée : la dérégulation des aquaporines dans l'ÉPR ou les glies de Müller est-elle suffisante pour induire un phénotype d'œdème dans un modèle dans lequel un tel phénotype n'est généralement pas observé ? Notre principale hypothèse est que la dérégulation des aquaporines dans ces deux types cellulaires pertinents serait suffisante pour induire un œdème dans un modèle de souris diabétique induit par le STZ (un modèle dans lequel ce phénotype n'est normalement pas observé). Cette hypothèse générale peut être subdivisée en la liste d'hypothèses alternatives suivantes *in vivo* :

H1 : Le dysfonctionnement des AQPs dans l'EPR et dans les glies de Müller est suffisant pour générer un stade précoce de DME selon la classification ESASO chez une souris diabétique.

H1 : Le dysfonctionnement des AQPs dans l'EPR est suffisant pour générer un stade précoce de DME selon la classification ESASO chez une souris diabétique.

H1 : Le dysfonctionnement des AQPs dans les glies de Müller est suffisant pour générer un stade précoce de DME selon la classification ESASO chez une souris diabétique.

In vitro, ce problème de recherche se traduit par les questions suivantes : un EPR sénescence possède-t-il des AQP fonctionnelles ? Ou : la sénescence affecte-t-elle la fonction des AQP de manière similaire aux inhibiteurs des AQP ? (Cela pourrait être un modèle à la fois pour le DME et la DMLA.) Avec l'hypothèse alternative suivante :

H1 : La sénescence impacte significativement la fonction des AQP dans l'EPR.

Deux modèles seront utilisés : une souris diabétique induite par STZ ainsi qu'une culture primaire de l'EPR de souris. Ensuite, des xénobiotiques ciblant une sélection d'aquaporines seront utilisées pour caractériser l'impact de la dysrégulation des aquaporines sur la formation des œdèmes dans un contexte de souris diabétique.

L'objectif global *in vivo* consisterait à caractériser la dérégulation des aquaporines dans l'EPR et/ou les glies de Müller dans un modèle de souris diabétique induite par STZ. L'approche expérimentale proposée consiste à utiliser une imagerie non invasive de la rétine dans le cadre d'une observation longitudinale des couches rétinienne pour caractériser l'induction d'une diminution post-diabète induite par STZ des aquaporines pertinentes dans l'un ou les deux types cellulaires sélectionnés. Plus précisément, cette approche sera utilisée pour l'AQP1, qui est l'aquaporine la plus exprimée dans l'EPR, chez les souris diabétiques induites par STZ ; ensuite pour l'AQP4, qui est l'aquaporine la plus exprimée dans les glies de Müller, chez les souris diabétiques induites par STZ ; puis pour répéter l'approche à la fois pour l'AQP1 et l'AQP4, afin de cibler les deux types cellulaires, chez les souris diabétiques induites par STZ ; enfin, appliquer l'approche susmentionnée à un cocktail d'aquaporines et d'aquaglycéroporines, chez les souris diabétiques induites par STZ.

Grâce à cette approche, nous nous attendons à obtenir des images en coupe de bonne qualité de la rétine. Cela nous permettra de faire deux choses : évaluer qualitativement toute perturbation des couches rétinienne et enregistrer quantitativement l'épaisseur rétinienne. Enfin, à la fin de l'étude longitudinale, il sera possible de fixer les yeux et de réaliser des cryosections pour détecter des marqueurs choisis (marqueurs de perméabilité vasculaire (VEGF) ou marqueurs structuraux (vers un type de cellule/couche spécifique, par exemple, RPE65)).

Par conséquent, les images en coupe nous informeront de la présence d'un phénotype (qualitativement et quantitativement) et de son évolution et de son importance (quantitativement). Cela nous permettra également de classer l'effet de la perturbation selon le tableau *ESASO* (Figure 0.5).

En ce qui concerne les expériences *in vitro*, l'objectif global est d'évaluer si l'impact de la sénescence sur la perméabilité de la barrière hémato-rétinienne est comparable à l'effet d'une diminution directe des aquaporines sur la perméabilité de la barrière hémato-rétinienne. Plus précisément, cela consisterait à cultiver des cultures primaires de l'EPR polarisées et confluentes, à induire la sénescence chez certaines et à évaluer leur perméabilité, tandis que d'autres auraient une ou plusieurs aquaporines diminuées à l'aide de xénobiotiques avant d'évaluer leur perméabilité. Toute donnée recueillie à partir d'un test de perméabilité nous informerait directement sur le degré de perturbation d'une fonction pertinente d'un composant de la barrière hémato-rétinienne. Toute donnée d'expression nous aiderait à confirmer la sénescence et/ou à établir la relation (linéaire, logarithmique) entre le degré de diminution et la perturbation de la perméabilité (s'il y en a).

Chapitre 1

Matériel et méthodes

1.0.1. Matériel et méthodes

Pour les expériences *in vivo*, les souris C57BL/6J ont accès à des croquettes de diète normale usuelles de manière *ad libitum*. Elles sont dans une pièce aux conditions contrôlées : température et humidité dans un intervalle (usuel) et ayant un cycle circadien de douze heures de lumière et de douze heures de noirceur.

Outre le fait que la lignée soit déjà disponible dans l'animalerie du laboratoire, cette lignée murine a été choisie pour conduire le projet pour plusieurs raisons. D'abord et avant tout, c'est une lignée qui est séquencée et très bien caractérisée génétiquement. Cela facilite un traitement ultérieur plus poussé, plus durable ou plus précis temporellement, telle l'utilisation de petits ARN interférents ou une invalidation génétique conditionnelle. Pouvoir modifier l'ampleur ou la spécificité des paramètres de l'étude permet de faciliter l'élucidation du mécanisme sous-jacent. En bref, cette lignée est choisie pour l'étude pour des raisons de commodité, de coût, de connaissance préalable de la lignée, pour assurer une reproductibilité des résultats inter-centres de recherche et le dernier, mais non le moindre, pour pouvoir transférer efficacement les résultats vers l'étude des mécanismes biochimiques sous-jacents.

1.0.1.1. Induction du diabète de type 1 murin - protocole d'injections répétées de faibles doses de STZ. La glycémie des souris est toujours mesurée à l'aide de bandelettes de glycémie AlphaTRAK2 (Zoetis, #71681) vers 15:00-16:30, en fonction des

habitudes alimentaires circadiennes des animaux. Elle est mesurée avant le début de l'induction du diabète, une semaine après le début de l'induction du diabète, au besoin après une réinjection subséquente - si nécessaire et quelques jours avant le début des expériences animales. Les souris reçoivent 5 injections intrapéritonéale (IP) de 50 mg STZ/kg masse corporelle (rapportée être la dose la plus efficace pour les mâles C57BL/6J. Au moins une souris par portée reçoit une injection contrôle (n'ayant que le tampon de citrate - pH 4,5). Tous les tampons et toutes les solutions sont préparées dans l'heure avant les injections et le STZ est protégé de la lumière. Les souris sont considérées diabétiques si leur glycémie 'à jeun' dépasse les 20 mM (360 mg/dL). Ceci étant dit, il est attendu que la glycémie des souris-contrôles demeure en deçà de 15-16 mM (270-288 mg/dL) (126; 58). Tout animal donc l'indice glycémique qui ne se conforme pas aux intervalles ci-haut pendant 8-13 semaines est exclu de sa cohorte expérimentale.

1.0.1.2. **Optical Coherence Tomography (OCT)**. Le programme *Heidelberg Eye Explorer* est utilisé pour scanner la rétine des animaux et enregistrer leur *b-scans* avec les paramètres suivant : IR-OCT 25 Sections, angle de 30 degrés de la lentille que nous utilisons Déviation est incorrectement fixé à 7,7 (valeur pour l'œil humain) 2-4 scan/œil sont recueillis via la procédure suivante : Les souris sont anesthésiées à l'aide de kétamine-xylozine [1 dl/kg] et leur pupilles sont dilatées à l'aide d'une goutte/œil de Mydriacyl [Alcon (Novartis)] ou d'IsptoAtropine 1 % [Alcon (Novartis)]. L'examen est réalisé une fois que les solutions topiques ont eu le temps de faire effet, 2-5 min. Dès que la mesure est prise, ou entre les mesures si besoin est, une goutte d'*hydrasens* [Bayer] ou d'*Eye Lube - marque* est appliquée afin de prévenir toute sécheresse oculaire. Une fois les mesures prises, une injection intrapéritonéale de Révertor (<1 dl/kg) est injectée. Les cages des souris anesthésiées sont placées de façon intermittente ou continue sur un tapis électrique chauffant puis observées jusqu'à leur réveil. Les images résultantes sont exportées avec leur nom systématique.

Les sections des noms systématiques (Fig 1.1, C)) sont définies comme suit : il y a trois sections délimitées par un tiret bas. La première correspond à une abréviation de la lignée

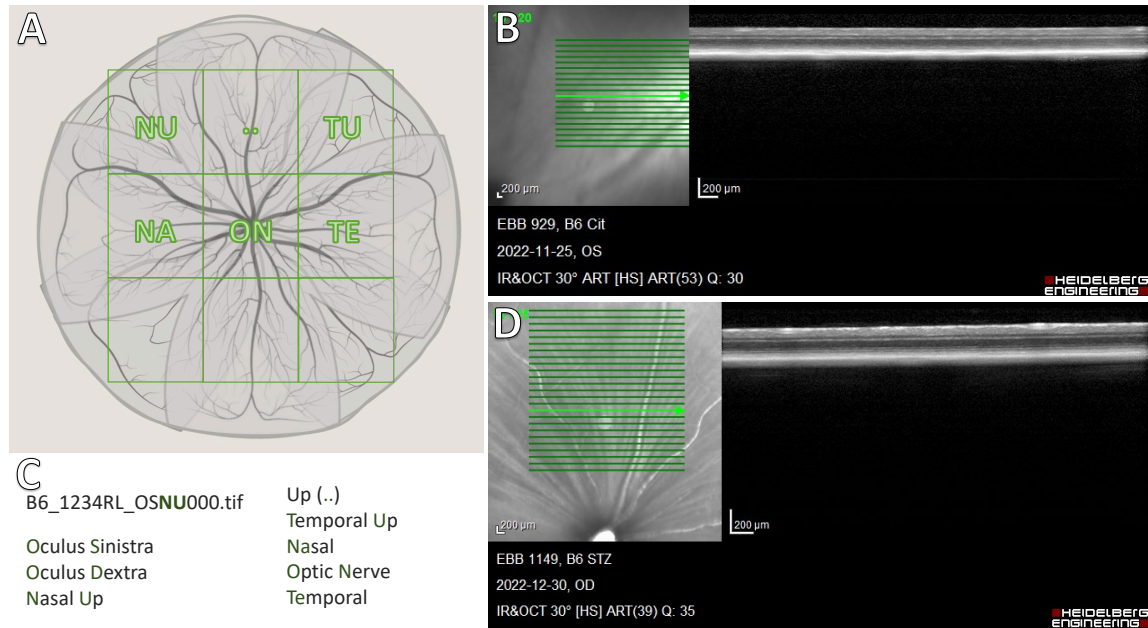


Fig. 1.1. Scans d'OCT typiques et nomenclature systématique A) Représentation schématique du fond de l'œil murin (*fundus scan*). L'œil est divisé en 9 cadrans, les cadrans fréquemment examinés ont leur abréviations en leur centre. B) 'B6_929.._OSTU009.tif' : Un exemple de scan typique d'OCT. *Fundus scan* dans la section supérieure gauche, les différentes couches de la rétines (lignes blanches) vues de façon transversale (*b-scan*) dans la partie supérieure droite ainsi que l'identification de l'image et les paramètres dans la section inférieure gauche. C) La nomenclature systématique ainsi que la signification des abréviations s'y retrouvant. D) 'B6_1149.._OD..009.tif': Un exemple de scan typique d'OCT. Figure partiellement réalisée à l'aide de BioRender (A).

murine (C57BL/6J - B6). La deuxième correspond au numéro de la souris ainsi que l'emplacement de son/ses poinçon/s permettant de l'identifier. La troisième section correspond à l'œil inspecté, la région approximative de la rétine par rapport au nerf optique ainsi qu'au numéro correspondant au *b-scan* visualisé (jusqu'à vingt-cinq par région). Pour être facilement utilisable dans l'algorithme, il est idéal que le nom de chaque image enregistré comporte le même nombre de caractères. Donc, une absence de poinçon est remplacée par un point et un point est également ajouté pour compléter à quatre caractères tout nombre d'identifications d'une souris. La nomenclature systématique décrite ci-dessus permet d'exclure les *chiers cachés* des dossiers lors de l'extraction et de l'analyse des scans via l'algorithme optimisé. De plus, cette nomenclature permet d'identifier chaque souris (deuxième section, Fig. 1.1 C): le numéro de l'animal additionné à l'abréviation du poinçonnage de ce dernier), de ségréguer

l'œil droit de l'œil gauche de chaque souris, de différencier la région du fond de l'œil scanné ainsi que de numérotter les nombreux *b-scans* (représentés par les lignes horizontales vertes de la région supérieure gauche de chaque image produite) d'une région donnée. Parmi la multitude de *b-scans* générés, celui qui est visualisé dans une image donnée est représenté par une flèche vert fluorescent dans le fond de l'œil. À noter que le nerf optique se retrouve toujours en bordure de l'image du fond de l'œil. En effet, il sert de repère visuel pour assurer une distance de mesure constante de chaque région donnée.

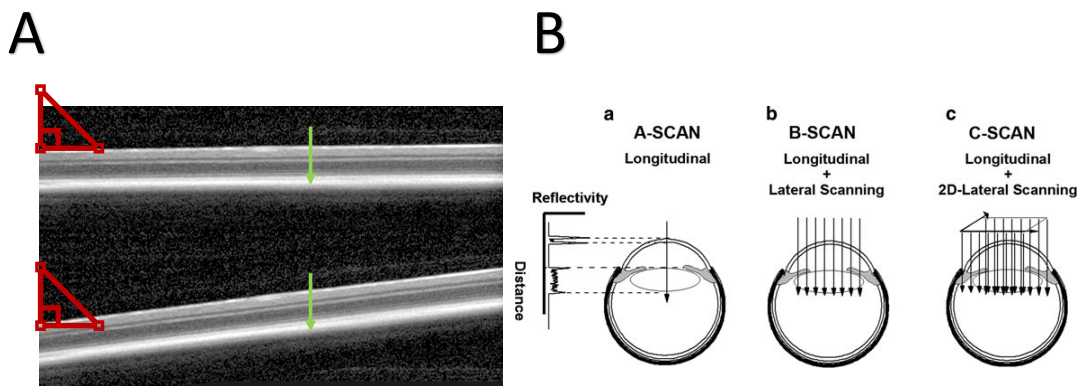


Fig. 1.2. Technicalités d'OCT ainsi que nomenclature utilisée ultérieurement
 A) Représentation exagérée d'un *b-scan* "à niveau" d'une rétine murine versus une mesure générant un "angle" (ceci peut survenir durant les mesures et est mentionné plus tard). L'outil sur-mesure décrit ultérieurement (comme tous les outils semi-automatiques ou automatiques) permet de calculer l'épaisseur **verticale** (flèche verte) de tous les "*a-scans*" d'un *b-scan* donné et de les additionner, puis d'en faire la moyenne, la médiane, etc. .*Pour des fins d'analogie, dans l'exemple ci-haut, un "a-scan" mesure un pixel de large.* B) Un schéma tiré de Subhash, M. et al. (82), illustre les différents types de scans d'OCT. Si le *b-scan* (B-b) est un scan 2D transversal du tissu étudié, un *a-scan* (B-a) correspond à un scan vectoriel axial (1D) d'un *b-scan*. Un *c-scan* (B-c) est une série adjacente de *b-scan* permettant de mettre en relief le volume du tissu étudié.

1.0.1.3. **Électroretinogramme (ERG)**. Les souris sont entreposées dans la noirceur totale pour un minimum de huit (8) heures précédant la mesure de l'électrorétinogramme (ERG) à l'aide de l'appareil COLORDOME (DiagnosysLLC) et du logiciel correspondant.

Toutes les manipulations sont effectuées sous une faible lumière rouge s'il n'est point réaliste de les effectuer dans le noir. Les souris sont anesthésiées à l'aide de kétamine-xylazine [1dl/kg], des gouttes oculaires sont utilisées afin de réduire la fréquence de clignotement (*Alcaline drop*) ainsi que de dilater les pupilles (*Mydriacyl 1%*). Finalement, après avoir laissé un court laps de temps s'écouler pour que les gouttes fassent effet, une gelée oculaire (*Eye Lube*) est appliquée afin de prévenir la sécheresse oculaire ainsi que d'aider au maintien de l'électrode en position. D'abord, insérer une électrode dite *grounding* dans la queue et une autre dans la bouche en contact avec la langue. Ensuite, installer les électrodes dans la gelée oculaire de façon transversale pour que la plus grande section possible de l'électrode soit en contact avec la cornée. Les mesures sont prises, une fois le COLORDOME descendu et que les mesures basales sont stables, à partir de la neuvième étape jusqu'à la dernière (onzième). Les 'ondes' (waves) sont ensuite ajustées et analysées à l'aide du logiciel de l'appareil.

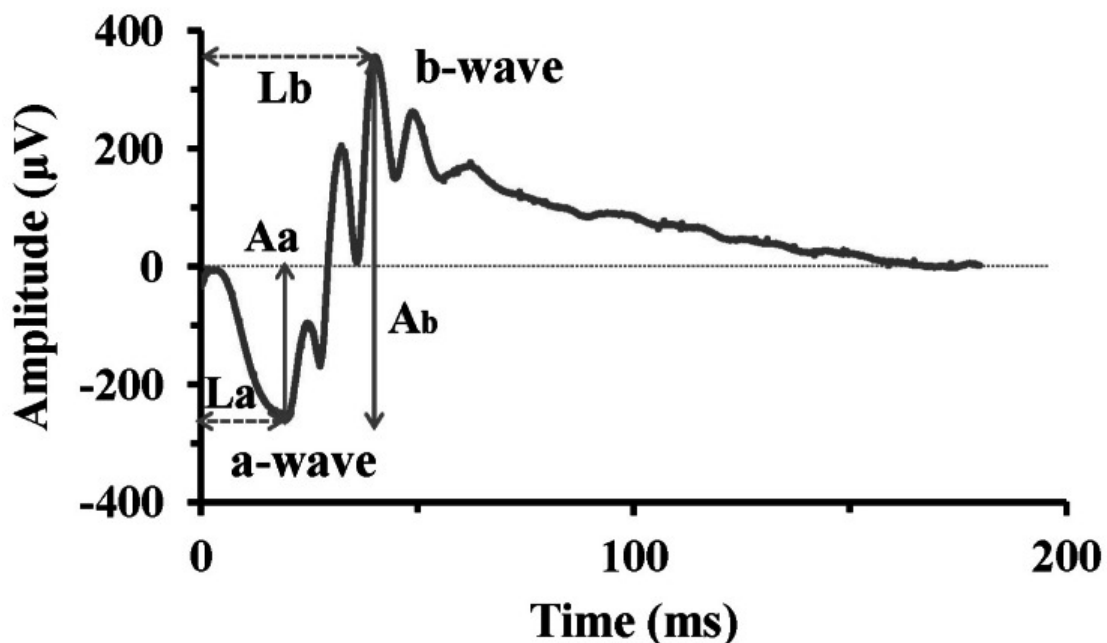


Fig. 1.3. Motif typique d'ERG murin de type 'full field'. Tel quel visualisé puis décrit dans l'article de Jae,SA. et al, 2013 (60). C'est à partir de cette référence que les mesures pertinentes sont calculées. a-wave: le point le plus négatif du signal. Aa: Amplitude de l'a-wave. Ab : Amplitude de la b-wave. La: le temps implicite de la a-wave. b-wave: correspond à la valeur de l'amplitude du point maximal du deuxième potentiel oscillateur (OP) de laquelle on additionne l'Aa. Lb: le temps implicite de la b-wave. Time : temps.

La a-wave représente la réponse des photorécepteurs, alors que la b-wave correspond aux activités des cellules bipolaires ou des cellules de Müller(60). À noter que bien que les données aient été recueillies systématiquement au moins pour les 'étapes' 10 et 11, seule l'étape 11 est représentée en graphique.

1.0.1.4. **Injection intravitréenne (IVT).** L'animal est anesthésié avec le protocole standard de l'animalerie (oxygène, isofluorane). Lorsqu'il est endormi, la pointe du capillaire d'une seringue *Hamilton* est insérée dans la sclère à environ 2-3 mm de l'ora serrata. Dès que l'extrémité du capillaire se trouve dans le vitré murin, 1 μ L de solution est lentement libérée avant de retirer le capillaire de l'orifice et d'appliquer un gel oculaire lubrifiant. La procédure est répétée pour l'autre œil. Les solutions comprennent les composés actifs suivant, seuls ou en cocktails.

L'agent DMSO a été utilisé pour préparer les solutions d'IVT. Dans toute solution, sa concentration finale ne dépasse point 2 % afin de minimiser les effets néfastes associés.

Les inhibiteurs Acétazolamide (SIGMA, CAT #: A6011) et DFP00173 (MedChem Express) , inhibant respectivement les aquaporines de type 1 et 3. Ces aquaporines sont exprimées de façon prédominante dans l'ÉPR et très peu ailleurs dans la rétine. Les concentrations utilisées expérimentalement correspondent à Acétazolamide (500 nM [IC50*100]) & DFP00173 (0,25 mM [IC50*100]) (59; 2). Il est à noter que l'Acétazolamide doit être utilisé en deçà de douze (12) heures après sa re-suspension.

Similairement, la petite molécule TGN-020 (MilliporeSigma - CAT #: SML0136 - 5 MG) est un inhibiteur très spécifique (dans l'intervalle de concentration utilisé) à l'aquaporine de type 4. Les concentrations ayant été utilisées expérimentalement correspondent à TGN-020 (155 μ M - 310 μ M [IC50*50-IC50*100]) (59; 2). Rapidement, la concentration expérimentale a été établie à l'[IC50*50] puisque la dilution du TGN-020 (et le DMSO) dans le PBS est très propice à sa précipitation. Le PBS est le véhicule de choix, même pour une petite molécule plus hydrophobe comme le TGN-020, car un véhicule hydrophile s'accumule dans le Trabéculum et génère un modèle de glaucome (128). Même après des étapes de sonication

supplémentaire ainsi qu'un soin particulier au maintien des échantillons à des températures "physiologiques", il s'est avéré que la solution la plus stable était celle du TGN-020 [IC50*50].

Murine VEGF (PEPROTECH, #450-32-2UG).

Les xénobiotiques, leur validation ainsi que leur stabilité/caractéristiques physiques menant à l'optimisation de la solution injectée (pseudo-modèle de glaucome) Trabéculum doit être introduit. Procédé de sonication, faire les solutions fraîches et conserver les solutions à une température aussi stable et tiède que possible ('physiologique').

1.0.1.5. **Miles Assay.** Le poids ainsi que la glycémie de chaque animal sont notés en deçà de 24 heures avant l'expérience. Le jour de l'expérience, le colorant azoïque Evans Blue est laissé dans la circulation sanguine de chaque animal à une concentration de 45 mg/kg pendant deux (2) heures, avant de prélever un échantillon sanguin, de réaliser une perfusion cardiaque avec du PBS ainsi que de récolter les organes désirés. Les temps de circulations et les moments clefs de la procédure sont enregistrés. De plus, à partir du prélèvement sanguin, toute manipulation est réalisée sous l'anesthésie de la souris. Les organes sont fixés une heure sur glace dans une solution de paraformaldéhyde (PFA) 4%, nettoyés/disséqués puis incubés 16 heures à 65°C dans du formamide. Les organes sont pesés immédiatement suite à l'incubation et après 48 heures de séchage dans un environnement contrôlé à 35°C pendant quarante-huit (48) heures. Finalement, l'absorbance du plasma ainsi que des solutions de formamide de chaque échantillon est mesurée à 620 nm ainsi qu'à 740 nm (*TECAN SPARK & TECAN Method Editor*).

1.0.2. In vitro Assays

1.0.2.1. **Isolation et culture primaire d'épithélium pigmenté murin.** Le protocole d'induction de la sénescence via un stress oxydatif est tel que décrit dans l'article de *Fernandez-Godino et al. (2016) Isolation, Culture and characterisation of primary mouse RPE cells. Nature(43)*. Brièvement, la cornée est excisée jusqu'à l'ora serata; le vitré puis la rétine neurale sont enlevés avant de digérer l'ÉPR avec de l'hyaluronidase [1 mg/mL] puis avec de la Trypsine [0.5% m/v]. L'étape de digestion à la trypsine sera ultérieurement

remplacée par le décollement de l'ÉPR via un lavage au PBS à température pièce. L'ÉPR est aspiré et resuspendu dans du DMEM-FBS20% avant d'être ensemencé. Les cultures ne seront pas manipulées durant les premières soixante-douze (72) heures.

NOTA: La procédure est décrite pour le modèle murin, mais certaines étapes ont été utilisées pour l'adaptation du protocole pour des tentatives de culture primaire avec des yeux de porcs.

1.0.2.2. Isolation et culture primaire d'épithélium pigmenté de porcs. Ce protocole est réalisé grâce à un accord avec la MAPAQ et aux dons subséquents de l'abattoir *Les Viandes Noisieux*. Des yeux de jeunes porcs (5-6 mois) fraîchement abattus (<3 heures) sont transportés de l'abattoir au centre de recherche hospitalier sur glace. La chaire orbitale est enlevée et les globes oculaires sont désinfectés avec des lavages en série (Dexidin 2 Solution (Laboratoire ATLAS Inc, #02238982), Dexidin 4 Solution (Laboratoire ATLAS Inc, #00832111)) avant d'exécuter les procédures suivantes basées sur le protocole de référence de l'institut INSERM(26). La cornée est excisée jusqu'à l'ora serrata, le vitré ainsi que la rétine neurale sont enlevés avant de digérer l'ÉPR avec de l'hyaluronidase [1 mg/mL] puis avec de la Trypsine [0.5%*m/v*]. L'étape de digestion à la trypsine sera ultérieurement remplacée par le décollement de l'ÉPR via un lavage au PBS à température pièce. L'ÉPR est aspiré et resuspendu dans du DMEM-FBS20% avant d'être ensemencé. Les cultures ne seront pas manipulées durant les premières soixante-douze (72) heures.

1.0.2.3. Extraction de mélanosomes à partir de RPE primaire porcines. Le protocole d'extraction de mélanosomes à partir d'ÉPR primaires porcines est tel que décrit dans (90).

1.0.2.4. Réaction en chaîne quantitative par polymérase (qPCR). L'ARN est d'abord extrait à l'aide de la méthode utilisant le réactif TriZol. La RT-PCR est faite La réaction est préparée avec du SyberGreen and les amorces correspondant (liste des amorces utilisées dans l'annexe C. à une concentration de 0,4 μ M.

1.0.2.5. **Essai protéique de type bicinchoninic acid (BCA)**. La préparation de la dilution en série pour couvrir l'intervalle suivant [0,6 - 0,0000] mg/mL du standard protéique (SIGMA-ALDRICH, #P0914-1AMP) se fait en parallèle à la décongélation des échantillons protéiques. Dans les puits correspondants, 60 µL de standard protéique (SIGMA-ALDRICH, #P0914-1AMP) OU d'échantillon sont ajoutés avant de compléter avec 240 µL de la préparation QuantiPro BCA Assay Kit (SIGMA-ALDRICH, #QPBCA-1KT - SLCP6510). Bercer à température pièce pendant 15 minutes avant de mesurer l'absorbance à 562 nm avec les paramètres appropriés (type de plaque, couleur, absence ou présence du couvercle, etc.).

1.0.2.6. **Immunobuvardage (WB)**. Les protéines p16INK4a (abcam, #ab211542), p21INK2a (abcam, #ab109199), p53 (abcam, #ab131442), b-actine (Cell Signaling, #3700) ont été détectées à l'aide d'anticorps monoclonaux. Les échantillons protéiques sont isolés puis conservés dans du tampon RIPA 1X. Le jour de l'immunobuvardage, les échantillons sont préparés selon la recette suivante : 20 à 40 µg de protéines, SSB 1X dans du tampon RIPA pour compléter au volume de chargement requis. Ils sont par la suite migrés dans un gel de polyacrylamide avant d'être transféré sur une membrane PVDF ou de nitrocellulose. Les protéines sont détectées à l'aide du *Luminescent Image Analyzer ImageQuant LAS 4000* (GE) grâce au kit de détection *Clarity Western ECL Substrate* (BIO RAD, #170-5061) via des anticorps secondaire de chèvre (BIO RAD, #1706515 & BIO RAD, #1706516) correspondant. Les images sont traitées à l'aide d'ImageJ (version).

1.0.2.7. **Culture, passage et cryo-congélation de cellules ARPE-19**. Les cellules ARPE-19 (ATCC, #CRL-2302) sont maintenues en culture et passées en conformité avec les recommandations du vendeur ATCC. Outre durant les manipulations, elles sont maintenues à 37 degrés Celcius avec 5% de CO₂. Toute expérience est réalisée sur des cellules ayant subi trois ou quatre passages suivant leur réception. Du milieu DMEM/F-12 (gibco, #11039-021 ou CORNING, #10-080-CV) enrichi de 10 % de sérum veau foetal (FBS) (MULTICELL, #090450), de 1 % de Pénicilline G/Sulfate de Streptomycine (P/S) est utilisé pour la culture (renouvelé 2-3 fois/semaine) autant que pour les passages. Pour ces derniers, les cellules sont détachées à la Trypsine 0,05 % (m/v) - 0,53 mM EDTA à 37 degrés Celcius avant d'être

centrifugées puis resuspendues dans le volume désiré. Finalement, pour la cryo-congélation, la solution utilisée est 90 % FBS, 10 % DMSO. Un quart de T75 (SARSTEDT AG Co, #83-3911) confluent est congelé dans des cryotubes (SARSTEDT AG & Co, #72.377) à -80 degrés Celsius. Les jonctions serrées (TJ) sont fonctionnelles entre 3 et 14 jours en culture [après confluence totale]. (Terasaki, H. et al.,2015) (115).

1.0.2.8. **Induction de la sénescence.** Le protocole d'induction de la sénescence via un stress oxydatif est tel que décrit dans Hernandez-Segura A., et al. (2018) (54). Brièvement, dans un environnement stérile, un tapis cellulaire (ARPE-19) confluent depuis 11-14 jours est traité au peroxyde d'hydrogène à un vaste intervalle de concentrations [150 µM - 200 µM - 300 µM - 600 µM - 1200 µM] durant deux heures à 37 degrés Celsius. Subséquemment, du milieu de culture (DMEM-FBS10%) est rapidement remis dans les puits et les plaques sont incubées jusqu'à la récolte des échantillons plusieurs jours post traitement.

1.0.2.9. **Essai de la SA-b-Galactosidase.** Les cellules sont fixées à l'aide d'une solution de PFA 4% pendant 15 minutes à température pièce. Suite à trois lavages au PBS (point de pause optionnel), la solution BetaGal est ajoutée puis laissée incuber jusqu'à ce que le contrôle positif soit visiblement bleu. Les cellules sont lavées à nouveau avant de procéder à un IHC, si nécessaire.

1.0.2.10. **Immunohistochimie (IHC).** Les cellules fixées sont perméabilisées à l'aide du tampon IHC (BSA 3 %, Triton 100X 0,1-0,3 %) puis lavées au PBS avant d'incuber le tout avec l'anticorps primaire plus de huit heures à 4C. Les cellules seront lavées avant de les incuber deux heures à température pièce avec l'anticorps secondaire. Elles sont lavées à nouveau au PBS avant d'y mettre du DAPI [0.5 ng/mL] 10 minutes. Elles sont lavées une dernière fois avant d'être séchées puis montées sur une lamelle microscopique à l'aide du *fluoromount*.

CDKN2A Ab. Host: Rabbit, reacts with : mouse from: abcam [ab211542].

Zonula Occludens - 1 (ZO-1) - ThermoFisher (33-9100) stock [0,5 mg/mL]: Hôte/Isotype : Souris/IgG, réagis avec : Chien, humain, souris, singe rhésus.

1.0.3. Analyses statistiques

Tel que mentionné précédemment, certains animaux ont été exclus si leur glycémie n'était pas assez élevée après l'induction du DT1 et/ou avant les expériences. Certaines mesures découlant de ces expériences ont été exclues si l'écart-type correspondant dépassait un seuil préétabli. Les animaux ont été répartis de manière aléatoire dans les groupes de traitement et de contrôle. Les données sont exprimées sous la forme de moyenne \pm erreur standard de la moyenne. Les différences entre les groupes ont été analysées à l'aide du t-test ou de l'analyse de la variance. Les différences étaient considérées comme statistiquement significatives pour une valeur de $P < 0,05$.

Les analyses sont réalisées à l'aide du logiciel MATLAB R2022b ainsi que plusieurs ajouts décrits ici-bas.

Violin.m Violin plot by Hoffman, Copyrights

Gramm (ggplot2-like package for MATLAB) : Version 2.25 par Pierre Morel,(83). L'ensemble gramm est un analogue de l'ensemble ggplot2 dans 'R'. Ces ensembles permettent de générer des figures et des graphes complexes de qualité de publication.

M-Code Package: Copyright (c) 2015, Florian Knorn - All rights reserved. Cet ensemble permet d'insérer un algorithme MATLAB dans une figure d'un fichier LaTeX, en conservant les accents que l'on retrouve dans l'éditeur MATLAB. Ces accents facilitent la lecture ainsi que la compréhension de l'algorithme.

Chapitre 2

Le rôle des aquaporines de l'épithélium rétinien pigmenté dans l'œdème maculaire diabétique

2.1. Résultats

Le contexte de recherche étant maintenant établi dans les premiers chapitres de ce mémoire, voici un rappel de la question centrale du mémoire : la dérégulation des aquaporines dans l'EPR ou dans les glies de Müller est-elle suffisante pour induire un phénotype d'œdème dans un modèle dans lequel un tel phénotype n'est généralement pas observé ? Nous avançons d'abord que la dérégulation des aquaporines dans ces deux types cellulaires pertinents serait suffisante pour induire un œdème dans un modèle murin de diabète-induit (Figure 2.1). La validation de ce modèle est faite via plusieurs marqueurs, telle une glycémie surpassant 20 mM (360 mg/dL) sur une période de plus de 8 à 10 semaines, une perte de poids qualitative progressive ainsi qu'une polyurie (qualitative) après plusieurs semaines de diabète. La haute glycémie chronique pendant un minimum de huit semaines constitue un prérequis pour inclure un animal donné dans toute expérience subséquente. Autrement, l'effet du modèle sur la vision des souris a aussi été jaugé via des évaluations d'électrorétinographie (ERG) (tel qu'indiqué à la figure 2.1). Les résultats en découlant seront décortiqués en fonction des sous-divisions des hypothèses alternatives mentionnées précédemment 0.5.1.

2.1.1. Induction et validation du modèle murin diabétique

Le modèle décrit ci-après est le résultat de considérations diverses comprenant des recommandations théoriques (en lien avec les xénobiotiques), des limites physiologiques ainsi que des essais-erreurs. En effet, lorsque remis en solution, les xénobiotiques doivent être conservés à des températures tièdes jusqu'à des températures « physiologiques » puis être utilisés promptement. Pour avoir un effet plus chronique dans la rétine des animaux, des groupes de souris ont reçu deux injections d'inhibiteurs à une semaine d'intervalle. Cependant, l'inflammation générée suite à deux insultes rapprochées était importante et nuisait de façon apparente à la prise de mesure via la technique de tomographie par cohérence optique. De ce fait, une injection unique a été priorisée pour les expériences subséquentes. Considérant cette limitation, il est intéressant de pouvoir concentrer plusieurs mesures de façon subséquente à l'unique IVT, autant que les animaux puissent supporter les sédations répétées. Le modèle final comprend donc une seule IVT, plusieurs évaluations nécessitant une sédation avant et après cette dernière de façon rapprochée, quelques jours sans sédation et d'autres mesures afin de jauger les effets potentiels à plus long-terme.

Afin d'évaluer l'impact du modèle sur la vision des souris, la technique non invasive d'électrorétinographie a été utilisée. Durant ce processus, les enregistrements étaient conformes aux normes ISCEV pour les potentiels évoqués visuels, notamment l'utilisation d'électrodes cornéennes, de mydriase et d'une séquence de préadaptation standard (98). Néanmoins, Les enregistrements ne sont pas conformes aux normes ISCEV pour les facteurs suivants: les mesures d'ERG recueillies suite à une adaptation à la noirceur (DA) comprennent usuellement des réponses à des intensités de flash (en unités photopiques, phot) de 0,01, 3 et 10 phot cd · s · m⁻² (DA 0,01 ; DA 3 ; DA 10(98)). Dans les évaluations effectuées, les faibles intensités de flash ont été omises.

Il y a une grande variabilité dans le groupe diabétique qui recevra le véhicule. Les faibles tendances semblent être telles que l'amplitude de l'onde 'a' des groupes contrôles (Cit) est inférieure à celle des groupes diabétiques (STZ) alors que le ratio a-wave/b-wave est plus important pour les yeux des souris non diabétiques. En conclusion, le modèle de diabète

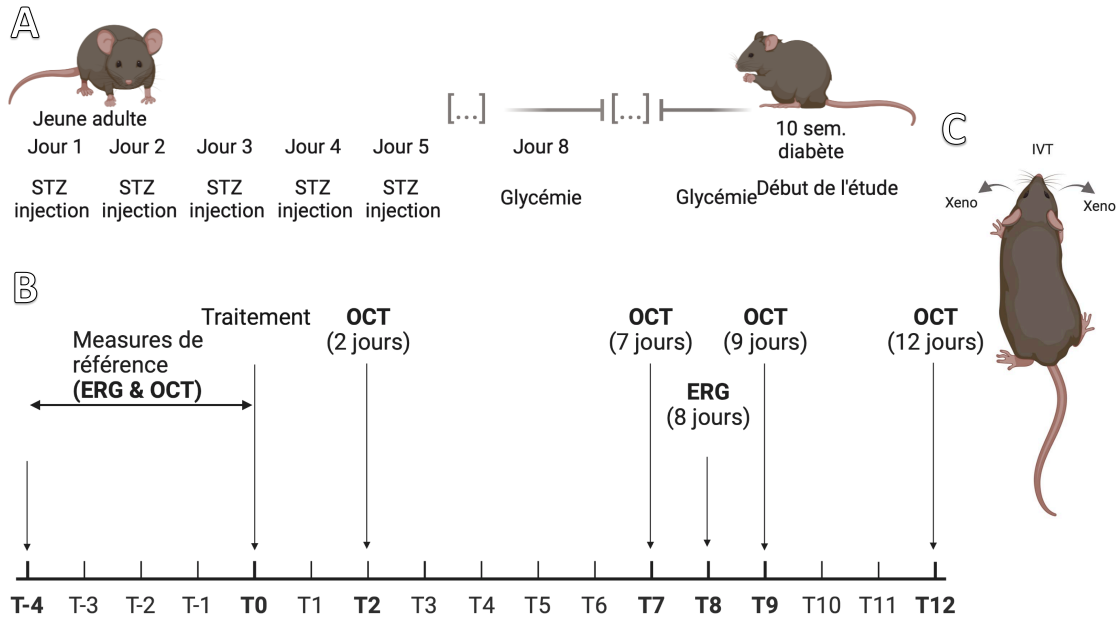


Fig. 2.1. Le modèle murin. A) Des souris B6 sont âgées de 6-8 semaines au moment de l'induction de diabète de type 1 via le protocole d'injections répétées de faibles doses de STZ [50 mg STZ/kg] décrit dans plusieurs publications du laboratoire (27; 79). B) Chronologie de l'étude longitudinale sur un modèle murin diabétique depuis 10 semaines. C) Mise en place finale des injections IVT: les deux yeux d'une souris reçoivent le même traitement. NOTA : l'examen de type ERG n'est pas systématique. STZ: Streptozotocine. sem.: semaine. IVT: Injection(s) intravitréenne(s). Xéno: Xénobiotique. ERG :Électrorétinogramme. OCT : tomographie par cohérence optique. Figure réalisée à l'aide de BioRender.

induit, une pathologie systémique, semble avoir un effet modéré, dans le jeu de données recueilli, sur la réponse mixte bâtonnet-cône. Le modèle lui-même n'induit pas une différence significative dans aucun des signaux mesurés ('ondes'), ni dans celui calculé (ratio) (figure 2.2. Bien qu'il ait été attendu que le ratio diminue pour les groupes diabétiques, la tendance de la réponse mixte bâtonnet-cône est contraire à celle attendue.

2.1.2. Les glies de Müller et la perméabilité

Premièrement, préalablement à la vérification de la première sous-division de l'hypothèse principale - à savoir si le dysfonctionnement des AQP dans l'EPR et dans les glies de Müller est suffisant pour générer un stade précoce de DME selon la classification ESASO chez une souris diabétique - il s'est avéré judicieux de confirmer si l'effet des inhibitions des aquaporines dans les deux types cellulaire combiné était additif ou délétère. En effet, en

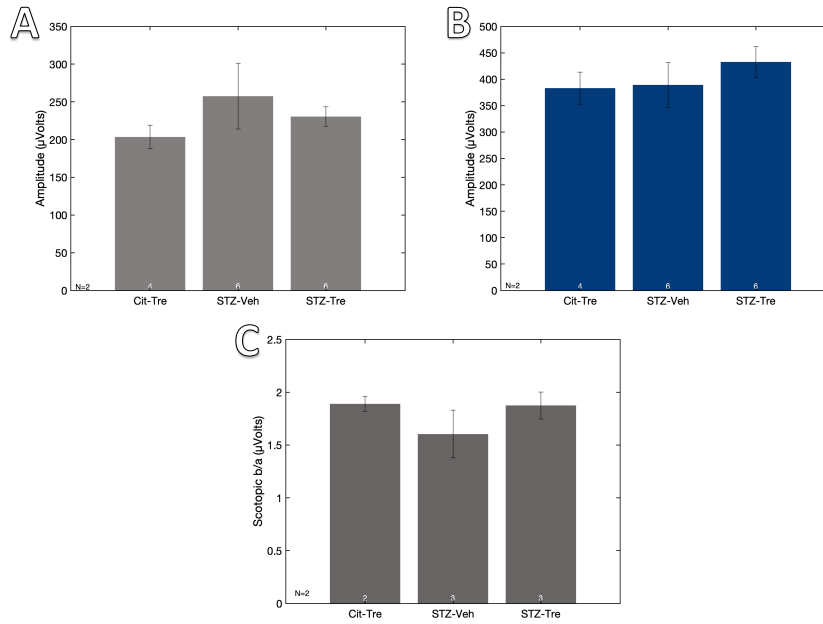


Fig. 2.2. Effets du modèle murin de diabète-induit sur les paramètres de l'électrorétinographie Des souris B6 saines et diabétiques (environ 8 semaines) ont été maintenues dans l'obscurité totale pendant plus de huit heures avant d'enregistrer les potentiels visuels en réponse à une intensité lumineuse de 10,0 cd s/m² (avec des pupilles dilatées) à l'aide d'une électrode DTL et de l'appareil COLORDOME (DiagnosysLLC). Avant et entre les sessions, la pièce était faiblement éclairée à la lumière rouge. Expérience réalisée avant l'IVT (A) Graphe de l'a-wave (B) Graphe de la b-wave. (C) Ratios b-wave/a-wave. Cit-Tre: Groupe citrate allant recevoir le traitement. STZ-Veh: Groupe diabétique allant recevoir le véhicule. STZ-Tre: Groupe diabétique allant recevoir le traitement. Scotopic b/a : ratio des signaux 'b-wave'/'a-wave'. La taille d'échantillonnage de chaque groupe est inscrit au centre de sa barre correspondante. N=inscrit en bas au centre de chaque graphique. Test statistique (A-I): *Unbalanced ONE-WAY ANOVA* Détaillé dans l'annexe B.

considérant la littérature disponible et les notions introduites dans le premier chapitre de cet ouvrage (figure 0.2), l'on peut s'attendre à ce que l'inhibition des aquaporines exprimées dans les glies de Müller limite l'apport d'eau dans la rétine. Pour démystifier cet effet, la technique du *Miles Assay* fût utilisée. Cette technique permet d'avoir une bonne idée de l'effet induit et est beaucoup plus rapide à réaliser que l'étude longitudinale qu'impliquent les expériences d'OCT.

Le modèle STZ a un effet remarquable sur la perméabilité rétinienne (figure 2.3, A)). Le modèle de DT1-induit a ici pratiquement aucun effet sur la perméabilité de la choroïde (figure 2.3, B)). Ensuite, l'inhibition des aquaporines de type AQP4 dans la rétine n'a aucun

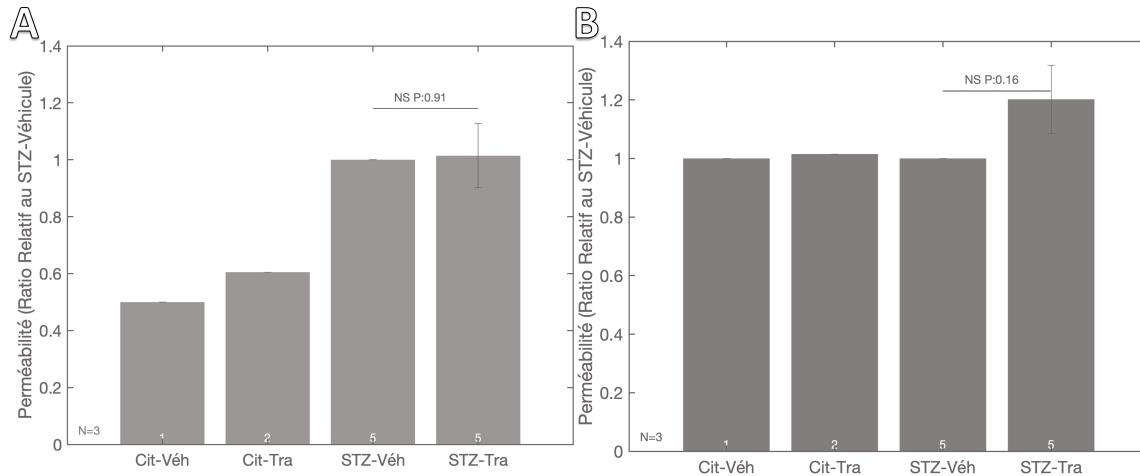


Fig. 2.3. Validation des effets de l'aquaporine 4 : Miles Assay A) Perméabilité de la rétine. B) Perméabilité de la choroïde. (A-B) 48 heures post-IVT de l'inhibiteur d'AQP4 TGN-020 [155 μ M] ou de véhicule, du colorant Evans Blue [45 mg/kg] est injecté dans la veine caudale de souris B6 saines et diabétiques et laissé en circulation pendant deux (2) heures avant d'être mesuré via différents échantillons (sérum, reins, etc. - voir la procédure 1.0.1.5). Cit-Véh: Groupe citrate allant recevoir le véhicule. Cit-Tra: Groupe citrate allant recevoir le traitement. STZ-Véh: Groupe diabétique allant recevoir le véhicule. STZ-Tra: Groupe diabétique allant recevoir le traitement. 'n' : correspond ici à une souris et sa valeur est inscrite au centre de la base de chaque barre. Test statistique : t-test.

effet significatif sur la perméabilité. Le même traitement n'a pas non plus d'effet significatif sur la choroïde, mais il est néanmoins plus visuellement appréciable. Il s'avère donc que l'inhibition de l'AQP4 a un effet dissonant à l'effet attendu via l'inhibition des aquaporines exprimées dans l'EPR sur la perméabilité rétinienne.

2.1.3. Génération et optimisation des outils de mesures : la programmation

Considérant les résultats préalables des effets dissonants de l'inhibition des aquaporines dans les deux types cellulaires d'intérêt, la sous-hypothèse selon laquelle l'inhibition combinée des AQPs dans les deux types cellulaires générerait un DME fût abandonnée. De plus, suivant également ces résultats, la sous-hypothèse selon laquelle le dysfonctionnement des

AQPs dans les glies de Müller soit suffisant pour générer un stade précoce de DME fût mise de côté. Il aurait été possible de poursuivre cette hypothèse en exacerbant l'expression ou l'activité des AQP4. Ce choix permet d'approfondir les résultats préliminaires étant le plus concordant avec l'hypothèse principale. Donc, dans le but d'évaluer si le dysfonctionnement des AQPs dans l'EPR est suffisant pour générer un stade précoce de DME selon la classification ESASO chez une souris diabétique, la technique d'OCT telle qu'indiqué dans le modèle expérimental *in vivo* (Figure 2.1) est privilégiée. Bien que le logiciel d'exploitation de l'appareil d'OCT possède un outil pour quantifier cette mesure, cet outil s'est rapidement avéré inadéquat (figure 2.4). En effet, un examen de type OCT génère une série de vingt-cinq images, dénommées *b-scans*, par acquisition. Un *b-scans* correspond à une coupe horizontale transversale de la région d'intérêt (Fig. 1.2 - B). Ici, les lentilles utilisées permettent de visualiser adéquatement la région postérieure de l'œil, plus précisément la rétine. Un *a-scans* correspondra ici à une colonne, d'une taille d'un pixel de large, d'un *b-scans* donné (Fig. 1.2 - B). Dans le contexte de ce projet, un *b-scans* correspond en d'autre mot à une concaténation séquentielle d'une multitude d'*a-scans*. Il s'avère que l'outil de mesure quantitatif du logiciel ne permet que de mesurer un *a-scans* à la fois, manuellement. En plus d'être très inefficace, cela introduit des biais puisque l'on doit choisir avec précision une région restreinte que l'on désire mesurer. Additionnellement, le logiciel délimite automatiquement les différentes couches de la rétine. Ceci dit, tel qu'indiqué plus bas (Figure 2.4), cette segmentation est erronée plus souvent qu'autrement (39). Dysli et al. précisent en effet qu'une trouvaille importante de leur étude est que la délimitation de l'ÉPR de l'outil de segmentation du logiciel intégré (Spectralis OCT d'Heidelberg & ARTORG) est décalée dans la sclère et d'une ampleur de mesure hétérogène. Il faut donc inévitablement précéder la mesure manuelle peu efficace d'un ajustement manuel, aussi très coûteux en temps, moins systématique et donc plus biaisé.

De ce fait, cette approche expérimentale nécessite d'abord et avant tout la mise en fonction et l'optimisation d'un algorithme fonctionnel permettant de mesurer l'épaisseur rétinienne de façon semi-automatique ou à tout le moins très rapidement. Le canevas obtenu

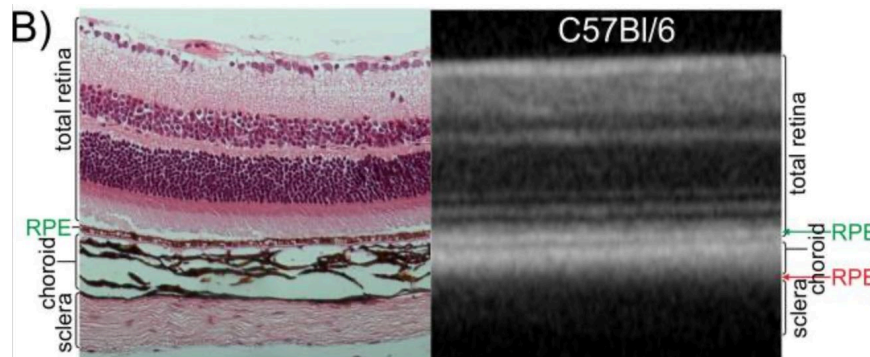


Fig. 2.4. Outil de mesure quantitatif du logiciel est inadéquat. Figure modifiée de la Figure # 4 de l'article de Dysli et al., 2015(39). [Ma traduction de la section correspondante du texte accompagnateur] : *Coupe histologique et [b-scans] de rétine de souris C57BL/6J. L'algorithme de segmentation automatisé définit la limite sclère-choroïde comme l'ÉPR, résultant en des valeurs d'épaisseur totale plus élevées.* choroid: choroïde; total retina: rétine neurale; sclera: sclère; RPE (vert) : indication de l'emplacement réel de l'ÉPR; RPE (rouge) : indication erronée de l'ÉPR par l'algorithme du logiciel intégré.

du Dre Marissé Masis-Solano a offert les bases de plusieurs solutions pour résoudre le problème technique mentionné ci-haut ainsi qu'une alternative pour éliminer des biais dans le traitement des données relatives à cette section essentielle du projet. Ceci étant dit, il était inadéquat pour les besoins et non fonctionnel au moment de son acquisition. Il y a donc eu trois objectifs qui se sont établis suite à l'obtention de ce code : le rendre opérationnel, le rendre facile d'utilisation pour des utilisateurs ayant peu de, voir pratiquement aucune, connaissances en programmation ainsi que de l'optimiser en fonction des besoins du projet.

Lors de la mise en fonction du masque, plusieurs choses doivent être prises en compte, dont une assomption. L'assomption est que la proportion des *b-scans* mesurés avec un angle (exemple — Fig. 2.5, A-B et illustré dans la Fig. 1.2 - A) est équivalente dans toutes les conditions. De plus, l'ampleur des angles est aussi équivalente dans toutes les conditions puisque ces variables sont aléatoires bien que plutôt contrôlables tant que les conditions expérimentales le permettent. Cette assomption est nécessaire puisque l'algorithme mesure *verticalement* l'épaisseur de la rétine entre la première ligne détectée (ILM) et la dernière

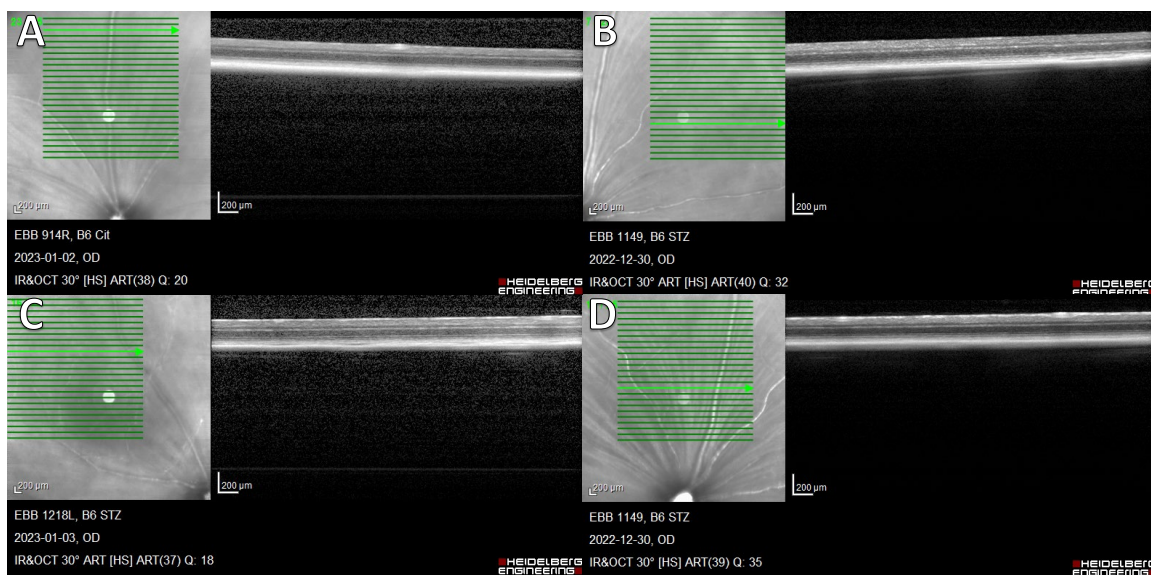


Fig. 2.5. Corrélation faible à modérée de la qualité de l’image et de l’intensité de l’ILM. Des souris adultes B6 (C57BL/6J) sont anesthésiées à l’aide de kétamine-xylazine [1 dl/kg] avant d’induire la dilatation de leur pupille IsoptoAtropine 1 % [Alcon (Novartis)]. Ensuite, le programme *Heidelberg Eye Explorer* est utilisé pour scanner la rétine des animaux et enregistrer 2-4 scan IR-OCT/œil comprenant 25 *b-scans*. A) Scan de qualité médiane (Q :20) ayant une faible intensité au niveau de l’ILM. B) Scan de qualité très élevée (Q :32) ayant une faible intensité au niveau de l’ILM. C) Scan de qualité inférieure (Q :18) ayant une intensité satisfaisante au niveau de l’ILM. D) Scan de qualité très élevée (Q :35) ayant une haute intensité au niveau de l’ILM.

ligne surpassant le seuil correspondant à l’intensité typique de la choroïde. Il est théoriquement possible de générer un algorithme pour redresser automatiquement les images - mais la fréquence des rétines désaxées ne semblait pas mériter le temps qu’il aurait fallu pour mettre sur pied un tel algorithme.

Ensuite, il faut considérer dans l’analyse des résultats que le même « poids » est accordé à chaque moyenne de *b-scans* provenant de différentes régions du globe oculaire. En effet, un 'n' correspond à la moyenne de l’épaisseur de la rétine d’un œil (plusieurs régions de fundus) de souris. Cette moyenne comprend de nombreux *b-scans* pris dans les régions décrites dans la représentation du fundus de la figure 1.1 (A) . Avant d’être compilée en une seule valeur pour chaque œil, la moyenne des *b-scans* de chaque région est évaluée. Si l’écart-type de cette dernière dépasse un seuil arbitraire établi à 20 µm ($\tilde{8} \%$), cette valeur

est exclue de la compilation. Ceci dit, si l'écart-type des *b-scans* de la région centrale est grandement supérieure à l'écart-type des *b-scans* des régions distales tout en étant inférieur au seuil de rejet, les deux moyennes ont le même poids dans le graphe final. Ces préalables étant mentionnés, voici (figure 2.6) un des trois fichiers englobant l'algorithme tel qu'il a été transmis. Un survol des caractéristiques importantes est fait plus bas pour ensuite permettre la justification des modifications qui devaient avoir lieu.

Finalement, il n'y a pas nécessairement de corrélation entre la « qualité » de l'image et une détection adéquate des limites de la région cible (la rétine neurale de part et d'autre) (Figure 2.5). La qualité affichée par le logiciel correspond plus à une absence de bruit. Selon les critères applicables dans le contexte de ce projet, il est possible d'obtenir une image avec très peu de bruit de fond, mais dont les différents tissus de la rétine ont une relativement faible intensité de signal à l'écran. Pourtant, il faut tout de même viser à obtenir une image de « qualité » (indiquée par le logiciel) durant l'expérience. En effet, plus la qualité indiquée par l'appareil est élevée, plus les mesures s'enregistrent rapidement, diminuant la sécheresse oculaire de l'animal et permettant de prendre les mesures de plusieurs zones du fundus, si désiré. À l'inverse, s'attarder trop longtemps rend la prise de mesure difficile (peut réduire le nombre de *b-scans* mesurés dans une région de fundus donnée) et augmente le risque que l'animal se réveille/ait des spasmes.

Comme première étape de tout algorithme d'analyse de données externes, les premières commandes servent à rapatrier les fichiers d'intérêts. Puisque j'avais déjà établi une nomenclature systématique (figure 1.1) avant l'obtention de ce canevas et qu'il n'a pas été créé expressément pour ce projet, il a fallu modifier les commandes indiquant le chemin de l'ordinateur (chemin du dossier de destination utilisé pour les fichiers - lignes 2-3, figure 2.6) en conséquences (lignes 3-11 de la figure 2.9). Les chemins affichés autant pour le dossier mère que pour les fichiers sont plutôt exhaustifs avec des commentaires clarifiant la pertinence des commandes d'informations (facile d'utilisation). De plus, la nomenclature systématique explicite, préalablement établie, permet d'ignorer les fichiers dits *cachés* (lignes 8-9, figure 2.6), allégeant ainsi le code (optimisation). Les fichiers *cachés* sont des fichiers qui peuvent

```

1 clear
2 myFolder='/Volumes/ONstrain/Natalia_mouse/np';
3 myFiles=dir(myFolder);
4 %%Calculate total thickness in all the subjects
5
6 totalthickness=zeros(26,3);
7
8 %for i=1:(size(myFiles,1)-3) %There are 2 hidden files in this folder
9 for i=9:(size(myFiles,1)) %There are 2 hidden files in this folder
10
11 oneMouse=( [myFolder filesep myFiles(i).name] );
12 [meanthickness,thickness_sd]=measurethickness(oneMouse);
13 totalthickness(i,2)=meanthickness;
14 totalthickness(i,3)=thickness_sd;
15
16 end

```

Fig. 2.6. L'algorithme original

être générés lors de la créations d'un dossier. Bien qu'ils soient détectables par l'algorithme, il est indésirable de le faire puisqu'ils ne contiennent pas des données pertinentes à l'analyse et généreront l'arrêt du programme en cours (rendre fonctionnel).

Ensuite, le paragraphe restant contient les commandes pour analyser les fichiers importés, c'est-à-dire mesurer la distance entre la couche de la membrane limitante interne (ILM) et l'ÉPR pour chaque vecteur vertical de la zone définie manuellement du *b-scan*, et ce, pour tous les *b-scans* de la région numérisée (ON,..,TU,NU,etc., Figure 1.1 - A)) d'en calculer leur moyenne et d'exporter cette dernière ainsi que l'écart-type standard correspondant sous forme vectorielle. Dans le reste de cet ouvrage, cette zone définie manuellement sera référée comme la zone ou la section rognée.

Pour alléger le texte du programme, ce canevas fait appel à une fonction appelée *measurethickness*. Cette fonction originelle est détaillée dans la figure 2.7. Similairement au fichier mère (figure 2.6), la fonction *measurethickness* commence par des commandes établissant les dossiers d'origines, et dans ce cas-ci, les dossiers d'exportations (lignes 3-5, figure 2.7). Les paragraphes suivants, dans la section **Crop mouse OCT**, servent respectivement à générer des noms d'exportations des fichiers qui seront subséquemment créés puis exportés ainsi qu'à rogner les images originales. Maintenant, ces paragraphes ne sont pas adaptables

en fonctions du nombre de *b-scans*, parfois variable d'une région numérisée à une autre. De ce fait, cette section est remplacée par la section correspondante (lignes 6-18) des versions ultérieures de la fonction (*measurethickness* dans l'annexe A.1 et *measurethicknessadjusted* dans l'annexe A.2).

Les fichiers *Cropped* et *Mask* sont créés puis désignés comme les fichiers d'exportations pour les images générées de façon intermédiaire avant de pouvoir mesurer l'épaisseur rétinienne. Ensuite, la dernière section de la fonction *measurethickness*, **Create mask** sert à délimiter la membrane limitante interne, puis l'épithélium pigmenté via ce que l'on réfère comme un « masque ». Ce sont les paramètres que l'on confère au masque qui régissent sa sensibilité et sa spécificité à détecter des éléments d'une image (ici les éléments d'intérêt sont les couches ILM et l'ÉPR) par rapport à leur arrière-plan.

La seule modification nécessaire pour adapter l'algorithme à mes besoins en lien avec la section de l'algorithme calculant la distance préalablement est le bon ratio de microns par pixel (figure 2.8). Il n'est pas possible de contrôler la taille de l'image exportée suite au Scan OCT. Suite à un ensemble d'images ayant un ratio différent, des mesures systématiques de l'équivalence microns/pixels ont été calculées pour au moins un *b-scan* de chaque zone de fundus d'un ensemble expérimental donné. Il s'avère que l'équivalence applicable pour le projet est de 7,14 microns pour 1 pixel (Ligne 11). Les anciennes équivalences applicables sont annotées aux lignes 13 à 17.

Uniformément dans tous les fichiers utilisés, des commentaires explicatifs sont laissés afin qu'un utilisateur ultérieur - et ce, peu importe son niveau de compétences - soit en mesure de comprendre l'outil tout aussi bien que de modifier les sections de manière individuelle afin de répondre à ses besoins. Dû à deux limites techniques brièvement mentionnées ici-bas et discutée ultérieurement (section 4.0.1.2), il y a un besoin crucial d'ajuster la section *measurethickness* de l'algorithme. Sans ces modifications, une proportion importante des épaisseurs rétiniennes moyennes ne possède pas un écart-type permettant de les inclure dans le jeu de données retenues.

```

1     function [meanthickness,thickness_sd]=measurethickness(myFolder)
2 myFolder=fullfile(myFolder);
3 mkdir(fullfile(myFolder, 'Cropped'));
4 mkdir(fullfile(myFolder, 'Mask'));
5
6 %% Crop mouse OCT
7 destFolder=(fullfile(myFolder, 'Cropped'));
8 % myfile= dir ([myFolder filesep '*010.tif']);
9 % myfile=myfile.name(1:10);
10 % filename=append (myfile, '%03d');
11
12 myfile= dir ([myFolder filesep '*015.tif']);
13 myfile=myfile.name(1:8);
14 filename=append (myfile, '%03d');
15 myoct=imread([myFolder filesep sprintf(filename,0) '.tif']);
16 [J,rect] = imcrop(myoct);
17 %myfiles=dir(oneMouse);
18
19 for i=0:24
20     myoct=imread([myFolder filesep sprintf(filename,i) '.tif']);
21     smalloct=imcrop(myoct,[rect]);
22     imwrite(smalloct,fullfile (destFolder, [sprintf(filename,i) '.tif']));
23 end
24 %% Create mask
25 sourcefolder=(fullfile(myFolder, 'Cropped'));
26 destFolder=(fullfile(myFolder, 'Mask'));
27
28 for i=0:24
29     smalloct=imread([sourcefolder filesep sprintf(filename,i) '.tif']);
30     grayoct=mat2gray (smalloct>150);
31     grayoct=grayoct (:, :, 1);
32     mask=edge (grayoct);
33     imwrite(mask,fullfile (destFolder, [sprintf(filename,i) '.tif']));
34 end
35 %imStep= imfilter(a, heaviside(-1:1)' - 0.5);
36 %% Distance between fist and last lines
37 sourcefolder=(fullfile(myFolder, 'Mask'));
38 totaldistance=zeros(1,25);
39 totalstd=zeros(1,25);
40
41 for i=0:24
42     mask=imread([sourcefolder filesep sprintf(filename,i) '.tif']);
43     distance=computedistance (mask);
44     totaldistance(1, (i+1))= mean(distance);
45     totalstd(1, (i+1))= std(distance);
46 end
47 meanthickness=mean(totaldistance);
48 thickness_sd=mean(totalstd);

```

Fig. 2.7. La fonction de mesure d'épaisseur originelle

```

1     function [distance]=computedistance(mask)
2
3     outline=zeros(size(mask));
4     distance=zeros(1,(size(mask,2)));
5     for i=1:size(mask,2)
6         firstelement=find(mask(:,i),1,'first');
7         outline(firstelement,i)=1;
8
9         lastelement=find(mask(:,i),1,'last');
10        outline(lastelement,i)=1;
11        distance(1,i)=(((lastelement-1)-firstelement))*7.14;
12
13        %49 pixels are equivalent to 200 microns based on the scale of the ...
14        uncropped image
15        % 1 pixel=4.08 microns(big images)
16
17        %21 pixels are equivalent to 200 microns based on the scale of the ...
18        uncropped image
19        % 1 pixel=9.52 microns (small images)
20    end

```

Fig. 2.8. La fonction du calcul de la distance

Premièrement, tel qu'introduit plus haut (Figure 2.5), la qualité de l'image selon le logiciel OCT Spectralis de Heidelberg ne corrèle pas toujours à une intensité suffisante afin d'avoir une bonne délimitation du masque, spécifiquement lors de la détection de l'ILM. L'intensité de la région choroïde/ÉPR est pratiquement toujours suffisante. À l'inverse, une faible qualité de l'image selon le logiciel OCT Spectralis de Heidelberg indique beaucoup de bruit - donc généralement peu de contraste entre les différentes couches de la rétine ainsi qu'avec le vitré et la choroïde. Il faut donc produire un masque qui intensifiera le contraste de la partie supérieure des images rognées en conséquence, sans modifier la valeur d'intensité établie pour le seuil dans aucune section de l'image rognée.

Modifier le seuil d'intensité déterminant la position du masque serait bien subjectif, d'autant plus qu'il a été établi avec expertise par Dr Marissé Masis-Solano, ophtalmologue. Le seuil d'intensité doit donc rester tel quel. De ce fait, une fois les dossiers sources et le dossier d'exportation établi, la version définitive de la fonction *measurethickness* établie que si une section de la partie supérieure de l'image rognée (*a-scan #1*) correspond à l'ILM (si son pixel > seuil), alors il y a de fortes chances qu'un pixel à proximité sur la même rangée

```

1   clear
2   %Mouse
3   myWorkingFolder='C:\Users\elodi\Documents\MATLAB\DATE TIMEPOINT ...
    BATCH\MOUSE#';
4   myFiles=dir(fullfile(myWorkingFolder, 'O*'));
5   myRawOCTScans=dir(fullfile(myWorkingFolder, '*B6*.tif')); ...
    %Both shots for both eyes (all OCT files)
6   myRawRightOculusScans=dir(fullfile(myWorkingFolder, 'B6*OD*.tif'));
7   myRawRightOculusUpScans=dir(fullfile(myWorkingFolder, 'B6*OD*U*.tif'));
8   myRawRightOculusONScans=dir(fullfile(myWorkingFolder, 'B6*ODON*.tif')); ...
    %Need to discriminate because the code doesn't work for ON yet.
9   myRawLeftOculusScans=dir(fullfile(myWorkingFolder, 'B6*OS*.tif'));
10  myRawLeftOculusUpScans=dir(fullfile(myWorkingFolder, 'B6*OS*U*.tif'));
11  myRawLeftOculusONScans=dir(fullfile(myWorkingFolder, 'B6*OSON*.tif')); ...
    %Need to discriminate because the code doesn't work for ON yet.
12
13  %%Calculate total thickness in all the b-scans for one shot of a subject.
14  totalthickness=zeros(1,2);
15      oneMouse=[myWorkingFolder filesep myRawRightOculusScans.name];
16      [meanthickness, thickness_sd]=measurethicknessadj_2(oneMouse);
17      totalthickness(1,1)=meanthickness;
18      totalthickness(1,2)=thickness_sd;

```

Fig. 2.9. L’algorithme ultime fait appel à la version définitive (Figure 2.10) de la fonction *measurethickness* ainsi qu’à la fonction *computedistance* (Figure 2.8).

(*a-scan* #2) « doit » dépasser ce seuil également (Lignes 12-13). Cette déduction logique se base sur l’assomption mentionnée préalablement (section). C’est-à-dire qu’à priori, à cet ordre de grossissement, la rétine est plutôt horizontale sur les images. De plus, on assume qu’il y aura une proportion égale d’angles (et d’amplitudes d’angles) qui positionneront la rétine en diagonale, d’un côté ou de l’autre. Cela diminue donc possiblement l’écart-type des mesures d’un *a-scan* à un autre puisque cela délimitera l’ILM d’une région qui n’atteignait autrement pas le seuil alors qu’elle changera à peine la valeur de l’a mesure de ce *a-scan* d’une image sur laquelle la rétine est en angle. Ceci est explicable par l’angle minime de la rétine sur le *b-scan* et que l’*a-scan* #2 où l’on ajoute un pixel détectable par le masque est à proximité de l’*a-scan* original (#1). Cela minimise la divergence possible entre la localisation réelle de l’ILM et sa localisation estimée. Finalement, puisque l’algorithme définit l’ILM comme le premier pixel correspondant au critère du masque (>seuil) qu’il rencontre en partant du haut de l’*a-scan* (lignes 40-49, figure 2.10), l’ajout d’un deuxième pixel reconnu sur une image en angle ne modifiera la valeur de la mesure que dans 50 % des cas : les

```

1 function [meanthickness,thickness_sd]=measurethicknessadj_2(Folder)
2 %Sections for path, new folders & Crop Mouse b-scan are unchanged:omitted.
3 %%Create mask
4 sourcefolder=(fullfile(Folder, 'Cropped'));
5 destinationFolder=(fullfile(Folder, 'MaskChimera'));
6     smallOCT=imread([sourcefolder filesep sprintf(filename,i)]);
7     grayoct=mat2gray(smallOCT);
8     grayoct=grayoct(:,:,1);
9     for r=1:size(grayoct,1)/2
10         for c=1:(size(grayoct,2)-10)
11             for z=1:9
12                 if grayoct(r,c+z)==true
13                     grayoct(r,c)=true;
14                 end
15             end
16         end
17     end
18     masktop=edge(grayoct);
19 %mask bottom
20     grayoct=mat2gray(smallOCT>150);
21     grayoct=grayoct(:,:,1);
22     mask=edge(grayoct);
23     black=false(round(size(grayoct,1)/2),size(grayoct,2));
24     white=true(round(size(grayoct,1)/2),size(grayoct,2));
25     Check=cat(1,black,white);
26 myMaskChimera=false(size(smallOCT,1),size(smallOCT,2));
27     for r=1:size(grayoct,1) %loop doesn't work for double(mat2gray) or ...
28         uint8 structures...
29         for c=1:(size(grayoct,2)-20)
30             if Check(r,c)==true
31                 myMaskChimera(r,c)=mask(r,c);
32             if Check(r,c+20)==true
33                 myMaskChimera(r,c)=true;
34             else
35                 myMaskChimera(r,c)=masktop(r,c);
36             end
37         end
38     end
39     imwrite(mask,fullfile(destinationFolder, sprintf(filename,i)));
40 %% Distance between first and last lines
41 sourcefolder=(fullfile(Folder, 'MaskChimera'));
42 totaldistance=zeros(1,25);
43 totalstd=zeros(1,25);
44 for i=1:size(oneShot,1)
45     mask=imread([sourcefolder filesep sprintf(filename,i)]);
46     distance=computedistanceOG(mask);
47     totaldistance(1,(i+1))=mean(distance);
48     totalstd(1,(i+1))=std(distance);
49 end
50 meanthickness=mean(totaldistance);
51 thickness_sd=mean(totalstd);
52 end

```

Fig. 2.10. La fonction chimérique finale : les sections pertinentes.

cas où l'angle de l'image fait en sorte que le 'nouveau pixel reconnu' se trouve plus haut que le pixel valide original. En bref, cette modification augmente grandement le nombre de régions de fundus ayant des mesures valides à ajouter au jeu de données via la diminution de leur écart-type. Cette diminution est réalisée grâce à une extrapolation logique basée sur une assumption préétablie. Finalement, bien que cette extrapolation affecte l'entièreté des images où l'extrapolation était nécessaire, elle affectera moins de la moitié des images où l'extrapolation n'était pas nécessaire - et les affectera peu. Ensuite, le traitement d'image de la moitié inférieure de l'image rognée demeure inchangé (Lignes 22-24, figure 2.10). Le prochain changement concerne la concaténation des morceaux de l'image rognée pour former un masque chimérique (Lignes 26-39, figure 2.10). Autrement, la modification textuelle des fonctions (leur nom) est simplement un souci de garder une trace des différentes versions de l'algorithme.

2.1.4. L'étude longitudinale

Parallèlement à l'optimisation de l'algorithme de mesure, le diabète de type 1 est induit au sein des groupes de souris adultes. Dix semaines plus tard, l'évaluation de base de tomographie de cohérence optique est réalisée. Le processus tel que décrit dans la figure 2.1 est prêt à être entamé. Ici-bas (figure 2.11), ce sont les petites molécules Acétazolamide et DFP00173 (inhibiteurs d'AQP de type 1 et 3, respectivement) qui sont injectés dans le vitré de chaque œil des souris, inhibant respectivement les aquaporines de type 1 et 3. Ces aquaporines sont exprimées de façon prédominante dans l'ÉPR et très peu ailleurs dans la rétine. Ce cocktail a donc pour but de freiner le transport aqueux de la rétine via l'ÉPR. L'ensemble de la population statistique fût récolté via deux répliques indépendantes de l'expérience (figure 2.11). Le processus de rognage intrinsèque à l'outil de mesure de la rétine permet d'avoir une confirmation visuelle de la présence ou de l'absence d'une poche de forme cystoïde dans chacun des *b-scan* recueillis. Via cette évaluation qualitative des rétines murines, et selon la classification ESASO, les conditions de ce modèle ne sont pas suffisantes pour générer un œdème « maculaire » diabétique. Néanmoins, l'algorithme permet d'évaluer

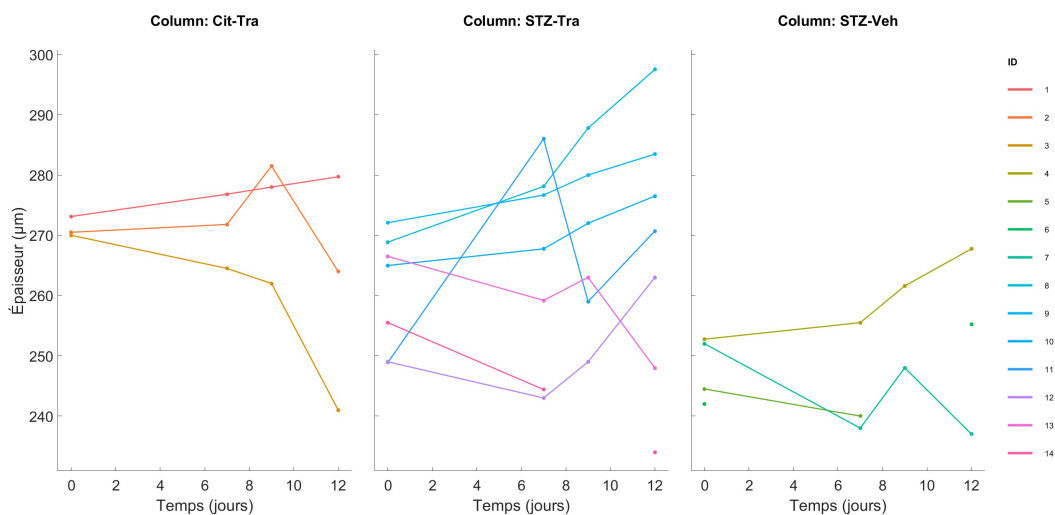


Fig. 2.11. Quantification longitudinale de l'épaisseur du segment postérieur - AQP1& 3 inhibées Des souris contrôles (Cit) et diabétiques (STZ) pendant au moins 9 semaines reçoivent des injections intravitréennes de véhicule (Veh) ou de xénobiotiques (Tra) : Acétazolamide [IC50*100] & DFP00173 [IC50*100] au jour D01. Parallèlement, leur segment postérieur est examiné via l'OCT à plusieurs moments prédéfinis. Finalement, l'algorithme mis sur pied (Figure 2.9) est utilisé pour extraire l'épaisseur, sous forme de microns, des images d'OCT. Chaque trajectoire correspond à un oeil. *Deux techniques d'injections intravitréennes ont été utilisées. N :2 'n': un oeil.

la présence de rétention d'eau significative dans une ou l'autre des conditions. Il permet d'évaluer la présence d'œdèmes au sens général du terme. Dans le but de simplifier les figures, les points temporels évalués ne comprennent pas la phase d'inflammation aiguë qui affecte les mesures dans les 48 heures suivant l'insulte physique de l'IVT. Les graphes comprenant ces jeux de données additionnels se trouvent en annexe B.4 et B.5. Il est possible de constater que le modèle murin de diabète-induit tend à avoir des rétines d'une épaisseur inférieure à celle des souris contrôles (figure 2.11). Ensuite, une fois le traitement de xénobiotiques exécuté, les rétines ont une forte tendance à gagner en épaisseur - sans pour autant que cette différence soit significative. En conclusion, chez une souris non pathologique, l'inhibition des AQPs 1&3 de l'ÉPR n'est pas suffisante pour induire une augmentation significative d'épaisseur rétinienne dans les jours suivant une insulte. En effet, l'analyse de la régression linéaire du modèle longitudinal indique une légère diminution des valeurs moyennes de l'épaisseur par

point temporel évalué (- 0.55). Ceci dit, bien que la tendance inverse soit observée dans chez les souris diabétiques (STZ-Véhicule + 0.3) et exacerbée chez les souris diabétiques ayant reçu les xénobiotiques (STZ-Tra: + 0.6), rien n'est significatif (Cit-Tra vs STZ-Tra, p-value: 0,10).

Considérant l'absence d'œdèmes cystoïdes dans le modèle avec les conditions précédentes, en plus des observations quasi significatives mentionnées ci-haut, il est apparu comme intéressant de pousser le modèle un peu plus loin. Le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGFA) a donc été additionné au cocktail de l'injection intravitréenne pour exacerber un symptôme de la pathologie de rétinopathie diabétique soupçonné de contribuer au développement de DME. De ce fait, les concentrations d'inhibiteurs, déjà relativement élevées, demeurent les mêmes et du VEGF165 murin y est additionné pour atteindre une concentration finale de 15 nM.

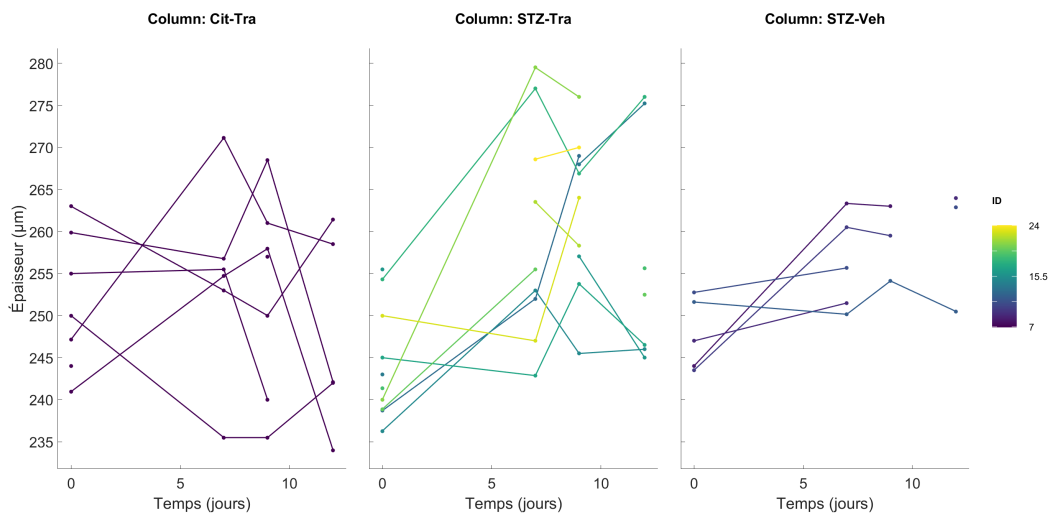


Fig. 2.12. Quantification longitudinale de l'épaisseur du segment postérieur - AQP1&3 inhibées et addition de VEGF165 Des souris contrôles (Cit) et diabétiques (STZ) pendant au moins 9 semaines reçoivent des injections intravitréennes de véhicule (Veh) ou de xénobiotiques (Tra) : Acétazolamide [IC50*100] & DFP00173 [IC50*100] (47; 110; 2) ainsi que du facteur de croissance endothélial VEGF [15 nM] au jour D01. Parallèlement, leur segment postérieur est examiné via l'OCT à plusieurs moments prédéfinis. Finalement, l'algorithme mis sur pied (Figure 2.9) est utilisé pour extraire l'épaisseur, sous forme de microns, des images d'OCT. Chaque trajectoire correspond à un œil. N :3 'n' : un oeil.

Similairement à l'ensemble d'expériences précédentes, l'évaluation visuelle confirme que les conditions de ce modèle (figure 2.12) ne sont pas suffisantes pour générer un œdème maculaire diabétique. Aucune poche de forme cystoïde est décelée durant le processus de rognage. D'autre part, l'addition de VEGF dans le mélange de xénobiotiques apporte quelques changements aux variations temporelles des épaisseurs rétiniennes des souris. Contrairement aux expériences sans VEGF, le groupe contrôle 'Cit-Tra' demeure plutôt stable (- 0.17 par point temporel évalué) par rapport à l'épaisseur moyenne initiale - dénotant un effet certain du facteur de croissance endothélial perméabilisant. Cet effet est aussi présent pour toutes les souris diabétiques, particulièrement le groupe 'STZ-Tra' chez qui l'épaisseur moyenne des rétines augmente de façon constante et significative (p-value: 0.0017). En conclusion, dans le modèle pathologique reproduit, une perméabilisation supplémentaire aiguë du réseau vasculaire couplé à une inhibition spontanée des aquaporines exprimées dans l'ÉPR est suffisante pour engendrer un œdème, mais insuffisante pour engendrer un œdème cystoïde selon la classification de l'ESASO.

Dans le but d'alléger la figure 2.13, le texte accompagnateur ainsi que le corps du texte, les analyses statistiques sont détaillées dans l'annexe B. Bien qu'il n'y ait eu aucune différence significative entre chacun des groupes avant l'IVT (figure 2.2), que des tendances, il est important de mentionner que de façon subséquente à l'insulte, les groupes de diabète induit réagissent toujours différemment du groupe contrôle non diabétique. De plus, la grande variabilité intragroupe n'est plus présente. Autrement dit, le modèle en tant que tel n'a pas d'effet sur les paramètres de l'ERG tant qu'il n'y a pas d'insulte. Selon ces résultats, le modèle affecterait avant tout la capacité de régénération.

Ensuite, en ce qui a trait à l'effet des inhibiteurs, il est possible de remarquer que l'injection de xénobiotiques inhibant les aquaporines 1 et 3, à des concentrations de 100 fois leur IC50 respectif (47; 110; 2) ne semble avoir aucun effet sur les ondes a, b ou sur la ratio (annexe B). Inversement, suite à l'injection de l'inhibiteur de l'aquaporine 4 à une concentration de 155 μM soit 50 * IC50 (59; 2), les amplitudes des ondes *a* et *b* sont comparables à celles du groupe contrôle non diabétique. La variabilité intragroupe diminue grandement

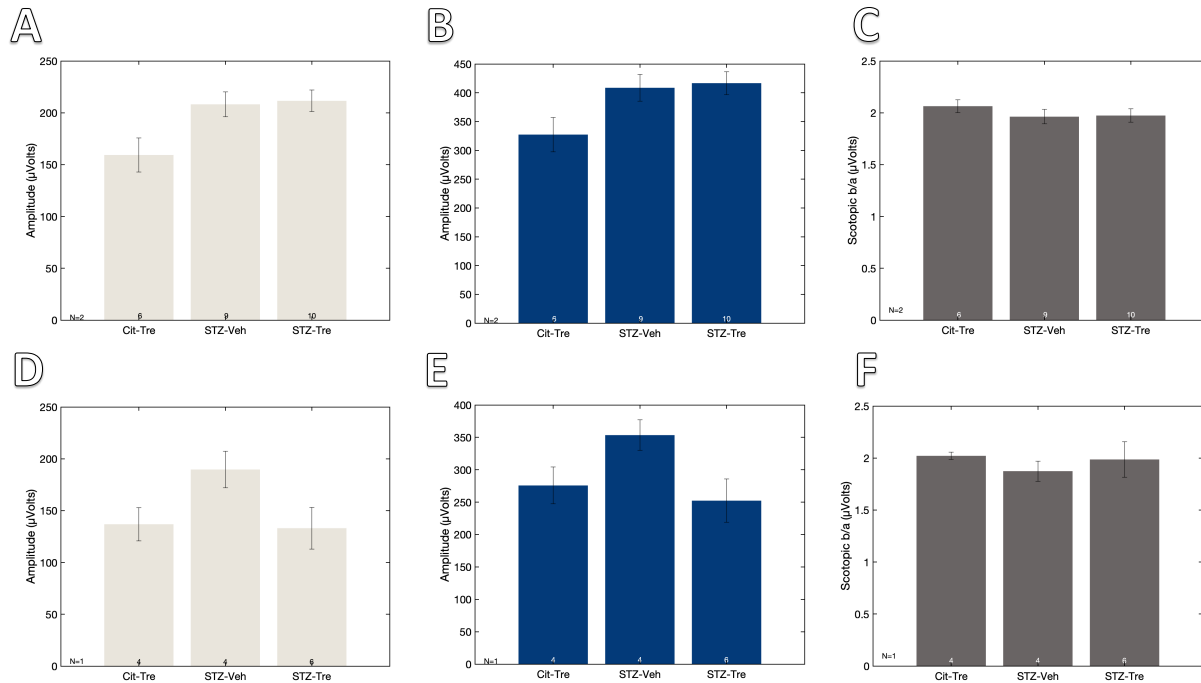


Fig. 2.13. Effets des xénobiotiques inhibiteurs d’aquaporines sur les paramètres de l’électrorétinographie Des souris B6 saines et diabétiques ont été maintenues dans l’obscurité totale pendant plus de huit heures avant d’enregistrer les potentiels visuels en réponse à une intensité lumineuse de 10,0 cd s/m² (avec des pupilles dilatées) à l’aide d’une électrode DTL et de l’appareil COLORDOME (DiagnosysLLC). Avant et entre les sessions, la pièce était faiblement éclairée à la lumière rouge. Expérience réalisée 48 heures post-IVT (D-F) de traitement inhibiteur de l’aquaporine 4, TGN-020 [155 µM] ou de véhicule ou finalement 8 jours post-IVT de traitement inhibant les aquaporines 1 et 3, Acétazolamide [1 mM] et DFP00173 [25 µM] ou de véhicule(A-C). a-wave: graphes aux barres beiges (A;D). b-wave: graphes aux barres bleues (B;E). Ratios b-wave/a-wave: graphes aux barres brunes (C;F). Cit-Tre: Groupe citrate allant ou ayant reçu le traitement. STZ-Veh: Groupe diabétique allant ou ayant reçu le véhicule. STZ-Tre: Groupe diabétique allant ou ayant reçu le traitement. Scotopic b/a : ratio des signaux ‘b-wave’/‘a-wave’. La taille d’échantillonnage de chaque groupe est inscrit au centre de sa barre correspondante. N=inscrit en bas au centre de chaque graphique. Test statistique (A-I): *Unbalanced ONE-WAY ANOVA* détaillé dans l’annexe B

et les valeurs du groupe STZ-Veh sont significativement différentes des deux autres groupes (annexe B). Les aquaporines de type 4, retrouvées dans les glias de Müller, joueraient potentiellement un rôle clef dans l’effet du modèle post-insulte. À noter que bien que les ratios de tous les groupes demeurent similaires ou inchangés, les valeurs des deux types d’ondes tendent à diminuer suivant l’insulte (figure 2.13 C;F).

Chapitre 3

La caractérisation de la sénescence de l'épithélium rétinien pigmenté

La dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA), une cause majeure de cécité, débute dans la barrière rétinienne externe-vasculaire (oBRB) formée par l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR), la membrane de Bruch et la choriocapillaire. Il est connu que l'ÉPR soit bien impliqué dans la pathogenèse de la DMLA, notamment puisqu'une des origines principales du drusen est l'ÉPR (13; 44). Il est rapporté que ces protéines soient larguées sous forme de vésicules extracellulaires suite à des stressseurs associés à la DMLA, même dans des conditions homéostatiques (44). De plus, les mécanismes de l'initiation et de la progression de la DMLA restent mal compris. Il en va de même pour les mécanismes de propagation du dysfonctionnement de l'ÉPR (44).

Bien que la caractérisation de la sénescence dans l'ÉPR se soit révélée des plus intéressantes comme suite logique dans l'évolution du premier projet, cette quête peut apporter des réponses pertinentes pour plusieurs désordres physiologiques de la rétine. En effet, il est intéressant d'élucider la possibilité que la sénescence de l'ÉPR soit responsable des dysfonctionnements des AQP, présumés pathogéniques dans le DME. D'autre part, la sénescence de l'ÉPR est aussi soupçonnée jouer un rôle important dans d'autres pathologies, telle la DMLA (15; 74; 56).

3.0.1. Mise en contexte

Tel que mentionné précédemment, le SASP est considéré comme hautement dépendant du type cellulaire et divers en termes de facteurs sécrétés(127). Bien que plusieurs articles mentionnent ou étudient la sénescence de l'ÉPR (74; 56; 4; 15; 70). La plupart des articles mentionnent très peu de marqueurs avant d'y apposer l'étiquette de la sénescence et il y a beaucoup d'hétérogénéité entre les choix de marqueurs d'un papier à l'autre. Ensuite, plusieurs des articles étudient la sénescence dans des cultures ayant perdu nombreuses de caractéristiques clefs - mitigeant les résultats qui en découlent. Finalement, l'ÉPR est un type cellulaire exprimant une variété de cytokines et de chimiokines retrouvées dans le SASP « générique » (70). Il va de soi que l'expression de certains d'entre eux peut servir d'indicateur si leur expression varie grandement. Il n'en demeure pas moins que la sénescence de l'ÉPR est un état mal caractérisé dans ce type cellulaire.

3.0.2. Résultats

Les phénotypes caractéristiques de l'ERP, tels que la morphologie hexagonale, la pigmentation et la polarisation de la monocouche totalement confluite sont les caractéristiques recherchées pour affirmer qu'une culture est appropriée pour être davantage étudiée (105; 14). Bien que cette culture primaire soit considérée ardue par plusieurs (43), des optimisations ont été réalisées sur différents modèles durant le cours de ce projet. Certaines difficultés ont persisté dans plusieurs d'entre eux, notamment le manque de prolifération ainsi que le manque d'adhésion à la surface de culture. Les cellules des essais de culture primaire d'ÉPR de souris ont toujours conservé leur forme hexagonale caractéristique, mais prolifèrent très peu à pas du tout (annexe B.6). Les essais de culture primaire d'ÉPR de porcs ont adopté la forme caractéristique de fibroblaste associée à une prolifération accrue, et ce que dans des endroits très localisés. Le reste de la surfaceensemencée prolifère peu (qualitatif) et les cellules ayant adopté une forme de fibroblaste ne retrouvent pas leur morphologie caractéristique, même lorsqu'elles sont localement 'confluentes' à 100 %. La densité d'ensemencement a été déterminée expérimentalement en fonction de la prolifération inattendue (annexe B.7).

Néanmoins, tous les essais de culture d'ÉPR primaires ont eu les mêmes problèmes d'adhésion : elles adhèrent très bien entre elles, mais très peu à toutes les surfaces de culture testées : une boîte de pétri avec un fond de plastique ou poreux (Transwell), enduite de concentrations variées de protéines (FBS ou laminine). Les cultures primaires porcines formaient donc une surface somme toute résistante lorsqu'elles étaient ensemencées au-delà de la densité idéale. Elles ne formaient alors plus une monocouche telle que dans des conditions physiologiques. De ce fait, la lignée d'ÉPR immortalisé, ARPE-19, est utilisée dans les expériences subséquentes, au troisième ou au quatrième passage suite à sa réception. Les cellules sont mises en culture jusqu'à confluence totale sur une surface non poreuse et n'ayant reçu aucun enduit protéique. Les cultures totalement confluentes sont maintenues pendant deux semaines avant d'exécuter divers essais afin d'allouer le temps aux jonctions serrées de se former adéquatement en culture. (Terasaki, H. et al.,2015) (115). Les cultures d'ARPE-19 complètement confluentes ont une morphologie semi-ellipsoïde (ressemblant aux fibroblastes) et semi-hexagonale. De plus, elles sont très peu ou pas pigmentées au moment des expériences.

Afin d'établir les conditions d'induction de sénescence via un stress oxydatif, des doses variées de peroxyde d'hydrogène ont été utilisées pour traiter les cultures. Divers marqueurs d'intérêts ont été quantifiés ou qualifiés dans ces cultures sur un intervalle élargi de laps de temps post-traitement. Dans les PCR quantitatives exécutées, ces marqueurs sont normalisés en fonction de l'expression des gènes PPIA et GUSB. Les graphes entiers, chargés d'informations, se trouvent en annexe B.9, B.10 et B.8. Les graphes comprenant les informations des réponses aux doses variées sept jours post traitements sont présentés vide infra.

D'abord, tous les changements d'expression sont relativement modérés sept jours post traitement. Ensuite, l'expression d'ARNm de p21 demeure stable jusqu'à une diminution prononcée en réponse à la plus forte dose du traitement. Excepté pour le traitement de 200 μ M, l'expression de l'ARNm de p16 croît de façon graduelle et semble atteindre un plateau quelque peu sous le log2 fold change. Ensuite, l'expression d'ARNm de CD63, un marqueur de vésicule extracellulaire, augmente avec les doses suggérées dans le protocole de référence

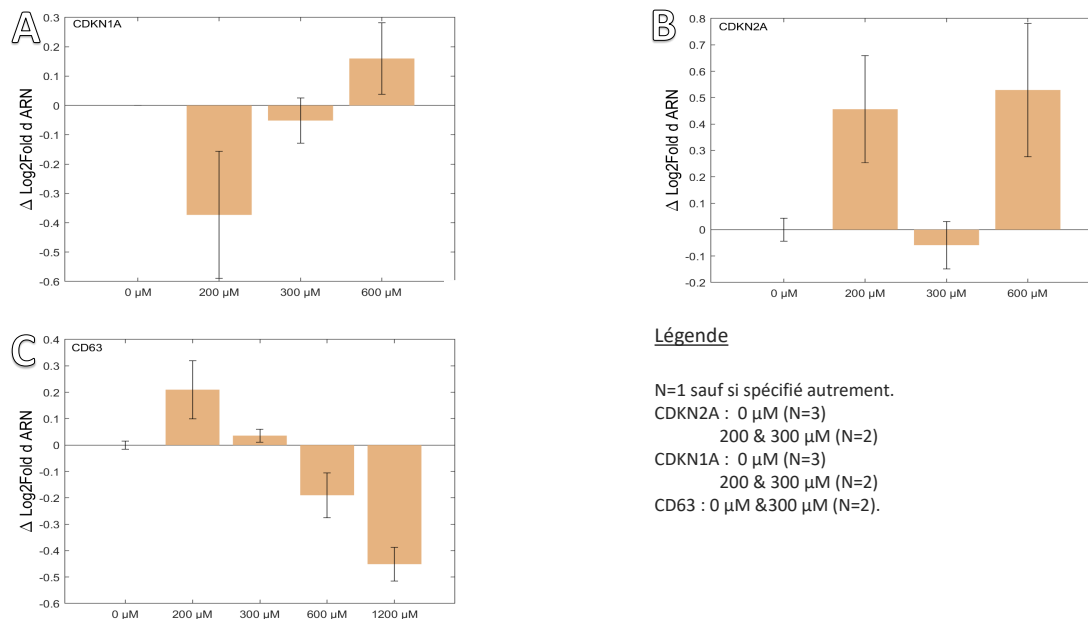


Fig. 3.1. Détermination de la dose d'H₂O₂ efficace 7 jours post traitement Quantification d'ARNm de trois marqueurs jugés pertinents pour la caractérisation de la sénescence cellulaire de l'ÉPR, afin d'établir le dosage d'H₂O₂ efficace 7 jours post traitement. (A) marqueur : CDKN1A. (B) marqueur : CDKN2A (C) marqueur : CD63 N: nombre de réplicats expérimentaux.

(54). L'intervalle de doses de peroxyde d'hydrogène va jusqu'à quatre fois la concentration répertoriée dans le protocole de référence par Hernandez et al., 2018(54).

Dans un intervalle élargi de réponse à la dose de peroxyde d'hydrogène et au laps de temps post-traitement, le marqueur d'intérêt Zona Occludens 1 (TJ) a été observé de façon semi-quantificative dans ces cultures via la technique d'immunohistochimie.

Somme toute, une diminution du nombre de noyaux est légèrement observable plus le temps passe suivant le traitement. Cette diminution est proportionnelle à la croissance de la taille des cellules. Ensuite, il est possible d'observer de manière qualitative que les TJ ont une apparence plus discontinue dans les conditions de hautes doses de peroxyde d'hydrogène (figure 3.2). Néanmoins, il y a une faible corrélation visuelle entre les marqueurs (nombre de noyaux/cellules et TJ) et les conditions. En effet, il y a plusieurs cellules, dans toutes les conditions, qui présentent plus d'un (parfois deux) noyau(x) par cellule. Bien que les cellules d'ÉPR puissent être binucléées, cette polynucléation semble ici être plus ou moins aléatoire.

Enfin, il semble y avoir une faible corrélation visuelle entre la taille cellulaire (définie par ZO-1) ainsi que la taille des noyaux (DAPI).

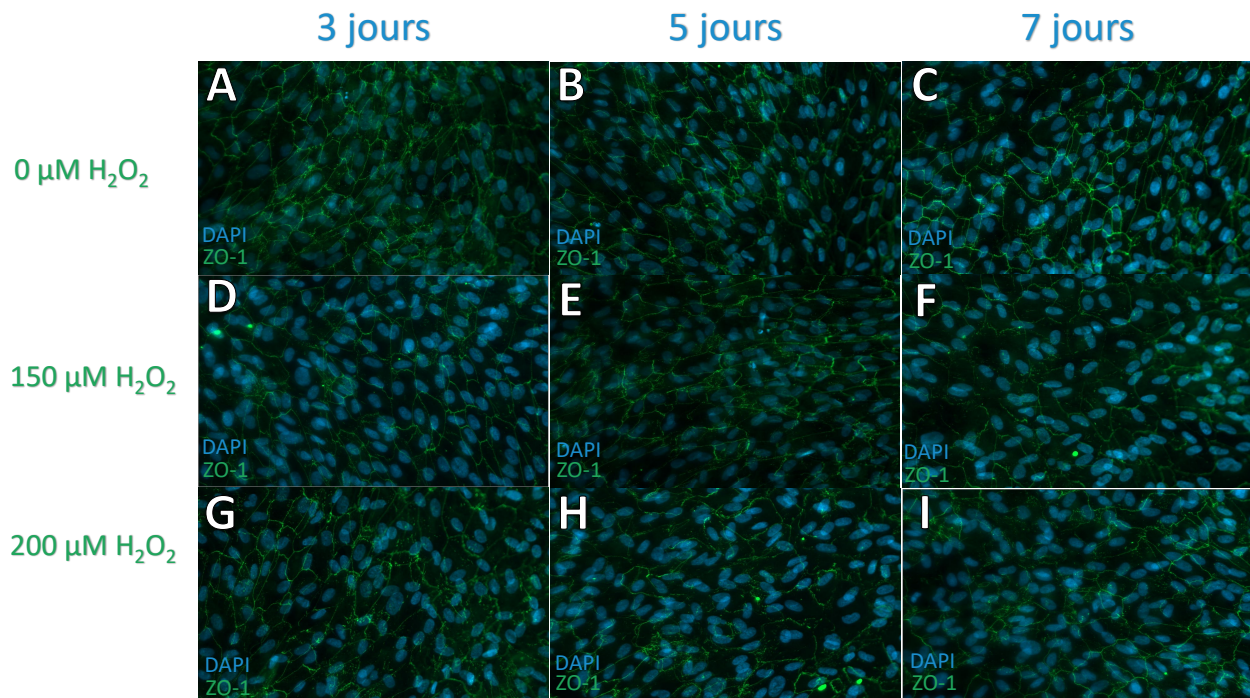


Fig. 3.2. Expression des *Zona Occludens 1* lors de la sénescence cellulaire. Les cellules ARPE-19, confluentes pendant plusieurs jours puis traitées à différentes concentrations de peroxyde d'hydrogène, sont fixées puis perméabilisées à l'aide du tampon IHC (BSA 3%, Triton 100X 0,1-0,3 %) puis lavées au PBS avant d'incuber le tout avec l'anticorps primaire ZO-1 [ThermoFisher (#33-9100)] stock [5 µg/mL] plus de huit heures à 4 degrés Celsius. Suivant l'incubation à l'anticorps secondaire de deux heures et celle du DAPI [0.5 ng/mL] de 10 minutes, elles sont lavées une dernière fois avant d'être séchées puis montées sur une lamelle microscopique à l'aide du *fluoromount*. (A-C) La progression des cultures primaires stagne entre la progression de référence de 7-14 jours. D) Le même phénomène survient sur un Transwell E) Référence : Figure 3, Belkinsop et al., 2013 (15)

Chapitre 4

Discussion

Les efforts de recherche décrits au long de ce mémoire se sont vus dirigés de manière à pouvoir élucider la question centrale suivante : la dérégulation des aquaporines dans l'ÉPR ou les glies de Müller est-elle suffisante pour induire un phénotype d'œdème dans un modèle dans lequel un tel phénotype n'est généralement pas observé ?

Pour ce faire, la question a été fractionnée en quatre [4] petits objectifs plus abordables : évaluer si le dysfonctionnement des AQP dans l'un [1] ou l'autre [2] des types cellulaires d'intérêt est suffisant pour générer un stade précoce de DME selon la classification ESASO chez une souris diabétique, ou si le dysfonctionnement des AQP dans les deux types cellulaires - ÉPR et Müller - est suffisant pour générer un stade précoce de DME [3]. Finalement, est-ce que ce dysfonctionnement est présent dans l'ÉPR sénescence [4]. Deux modèles sont utilisés pour atteindre ces objectifs. D'abord, un modèle *in vivo* de souris C57BL/6J diabétiques induites via STZ (DT1) permettant de réaliser une étude longitudinale de la rétine grâce à l'OCT. Dans ce modèle, les aquaporines sont inhibées via des petites molécules, des xénobiotiques disponibles commercialement ou à des fins de recherche. Ensuite, le deuxième modèle est une lignée immortalisée d'ÉPR mise en culture jusqu'à confluence et soumise à des doses variées de peroxyde d'hydrogène dans le but de caractériser la sénescence pour ce type cellulaire ainsi que de comparer cet état métabolique à l'effet de la dérégulation des aquaporines sur la capacité de l'ÉPR à réguler les fluides aqueux de part et d'autre de la

barrière qu'il forme. Ce dernier protocole a pour avantage d'être plus accessible que des tests *in vivo* ainsi que d'une culture cellulaire primaire.

4.0.1. Le rôle des aquaporines dans la pathogenèse de l'œdème diabétique

Plusieurs éléments de la littérature semblaient présager que l'inhibition des AQP4s aurait un effet opposé à celle des AQP1-3, dont les bases fondamentales présentées dans l'introduction de ce mémoire à partir des données de Spaide et al., 2016,(111). Oosuka et al., 2020, affirment quant à eux avoir confirmé la chose avec une dose d'inhibiteur beaucoup plus élevée, mais avec un modèle autrement similaire au mien (87). Finalement, il est rapporté par plusieurs équipes que l'expression des AQP4 augmente grandement dans un contexte de rétinopathie diabétique (85; 121). Donc, pour évaluer si l'inhibition des AQPs dans les deux types cellulaires - ÉPR et Müller - est suffisant pour générer un stade précoce de DME, il a fallu confirmer si le dysfonctionnement des AQPs dans ces deux types cellulaires aurait un effet additif ou délétère sur la quantité de fluides aqueux étant emmagasinés dans la rétine. La technique du Miles Assay utilisée pour évaluer cet effet est donc concomitante avec la littérature en indiquant que l'inhibition des AQP4 des glies de Müller résultent en une diminution de fluides se trouvant dans la rétine neurale.

Chen et al., 2021 offre une revue complète des œdèmes périhématomales post-hémorragie intracérébral (23). Dans cette revue se trouve une définition des deux types d'œdèmes que l'on retrouve dans l'encéphale : l'œdème cytotoxique ainsi que l'œdème vasogénique. Les caractéristiques de l'œdème vasogénique sont exhaustives et d'un certain intérêt pour contraster mon modèle. Dans un comparatif avec ce dernier, il est possible de faire le parallèle entre la dysfonction de la barrière hémato-encéphalique (BBB) aux suites de l'AVC ainsi qu'à la dysfonction du BRB dû au DT1-induit. Les deux conditions comprennent des bris de l'intégrité des TJ du réseau endothélial et une production accrue de VEGF, par exemple. Une caractéristique d'un œdème vasculaire est que l'insulte physique induira certainement

une activation rapide de la cascade du complément et déclenchera une réponse inflammatoire qui exacerbera la perméabilité de la BRB (23; 38). Il est facile de faire le parallèle entre l'insulte physique de l'IVT et l'hémorragie intracérébrale qui correspondent à OU surviennent en même temps que l'élément déclencheur. Un œdème cytotoxique mène quant à lui à une expression accrue d'AQP4 (23) ainsi qu'un changement dans leur localisation cellulaire (65) et exacerbe la perméabilité de la BBB (23). Or, les glies de Müller augmentent en quantité après quelques semaines seulement de diabète (102), tout comme l'expression d'AQP4 dans celles-ci. De plus, plusieurs papiers associent cette pathologie métabolique aux œdèmes cytotoxiques dans les glies de Müller (102; 18; 17), et dans les neurones (18; 17). De plus, l'expression accrue des AQP4s a été identifiée dans des tissus cérébraux suivant une ischémie (23). Pour terminer, bien que ce dernier type d'œdème accompagne éventuellement le diabète, il n'est pas nécessairement associé à l'induction d'un réel gonflement du tissu atteint(23). Ces faits rapportés supportent la notion selon laquelle une expression accrue des AQP4s est bien plus pertinente dans la pathogenèse du DME que leur inhibition. Il reste donc à confirmer si le mécanisme d'œdème cytotoxique dans les glies de Müller est un des facteurs essentiels au DME.

Sommairement, mon modèle possède plusieurs similarités avec les composantes d'un œdème cytotoxique ainsi qu'avec un œdème vasogénique que l'on retrouve dans un œdème périhématomal. Bien que la majorité des facteurs contribuant à ces deux types d'œdème soient intrinsèques à mon modèle, la contribution probable de l'insulte physique, qui n'est pas requise dans la pathogenèse d'intérêt, ne peut être ignorée.

4.0.1.1. **Validation du modèle.** Les expériences d'électrorétinographie peuvent communiquer des informations sur le modèle en tant que tel ainsi que sur les effets des inhibiteurs. Ces deux aspects de la validation du modèle seront discutés de façon subséquente.

Le modèle de diabète induit, une pathologie systémique, semble avoir un effet modéré dans la figure 2.2 considérant que les pathologies métaboliques systémiques ont généralement un effet sur l'amplitude des ondes « b », diminuant ainsi le ratio « b »/« a ». D'abord, avant toute insulte, il n'existe pas de différence significative entre les amplitudes des ondes a et

b. Ceci est cohérent avec la littérature en ce qui a trait aux stages précoces d'une DR (78). De plus, les effets rapportés sont généralement visibles via la mesure des illuminations éphémères de faibles intensités (98). Or, seules les deux plus hautes intensités ont été enregistrées (près de 10 phot cd · s · m⁻² et 10 phot cd · s · m⁻²) - et de celles-ci, seule la plus forte est analysée. Il y a donc potentiellement une micro adaptation au stimuli lumineux/diminution de la réponse en représentant en graphique la deuxième étape mesurée. De ce fait, il est possible que l'effet significatif ne soit pas perceptible dû aux paramètres sélectionnés ainsi qu'au type d'analyse choisie plutôt qu'à un manque d'effet systémique du modèle. Il n'en demeure pas moins que la tendance mentionnée dans la majorité des études menées au cours des deux dernières décennies, rapportée dans la revue de McAnany et al. (78), est contraire à la tendance obtenue avec tous les groupes expérimentaux de ce mémoire - c'est-à-dire une amplitude normale (ou légèrement réduite) des ondes *a* et *b* au stade précoce de la rétinopathie diabétique lorsque ces ondes sont enregistrées via des stimulations approximatives aux recommandations minimales de l'ISCEV. Même en tenant compte de la grande variabilité des groupes d'animaux de la condition 'STZ-Veh' (allant recevoir le traitement véhicule), cette tendance inverse est présente autant pour les ondes *a* que les ondes *b* (figure 2.2). Ce n'est donc pas unique à un type cellulaire ou une section isolée de la cascade de phototransduction. Il est aussi intéressant de remarquer que cette tendance est d'autant plus polarisée suite à l'insulte de l'IVT que la différence entre l'amplitude des conditions 'Cit' et 'STZ' est maintenant significative (figure 2.13).

En étudiant le jeu de données des effets du modèle murin de diabète-induit (figure 2.2), on note aussi que les valeurs des amplitudes des ondes des groupes citrates sont concordantes avec les valeurs que l'on retrouve dans la littérature pour un modèle murin non pathologique (*swiss mouse*) d'âge similaire (34). Ce n'est pas le cas pour les amplitudes des ondes des groupes de souris diabétiques. Un des points clefs de ce papier est que la diète des animaux a un grand potentiel de rétablissement des amplitudes à des valeurs « contrôles » (34). Ensuite, leur jeu de données met en évidence que pour un modèle murin, le nombre de semaines durant lesquelles les animaux étaient diabétiques va avoir un impact sur les valeurs des amplitudes

des ondes (34). Finalement, ce papier mentionne avoir utilisé deux méthodes différentes pour calculer l'amplitude des ondes « *b* », sans préciser quelle méthode a été utilisée à quel moment. De plus, une des mises en évidence apportée par Pinto et al., 2017 est que la lignée des animaux a un impact devant être souligné sur les motifs des signaux reçus en plus de l'impact sur leur amplitude (92). Ces faits peuvent offrir des pistes de solutions pouvant expliquer les disparités entre le jeu de données de ce mémoire ainsi que les jeux correspondant dans la littérature. Plusieurs études évaluent la réponse de la rétine entière à l'ERG suite à une adaptation à l'obscurité (ffERG DA) chez des personnes diabétiques. Pourtant, le nombre d'articles rapportant le ffERG DA est inférieur au nombre rapportant l'ERG adapté à la lumière(78). Donc, il n'y a pas un éventail si important de littérature utilisable pour comparer les résultats recueillis.

Sommairement, le manque de réduction de l'onde « *b* » autrement rapportée dans des études évaluant des stades plus avancés de la rétinopathie diabétique (78) peut indiquer que le modèle de diabète induit n'est pas étudié à un stade de rétinopathie diabétique assez avancé. Cette déduction supporte la pertinence d'introduire le facteur de croissance vasculaire ayant un effet perméabilisant pour exacerber le modèle. Il n'en demeure pas moins, cependant, que les répercussions favorables au développement d'un DME (autrement néfastes pour l'intégrité structurelle de la rétine) dû à une rétinopathie diabétique avancée seront amoindries ou encore absentes. Il y a peu de recherche étudiant la pathologie de rétinopathie diabétique via l'ERG et utilisant un modèle murin - encore moins avec C57BL/6J spécifiquement. De plus, des études publiées, peu sont des études longitudinales évaluant la progression des ERG (78). Il demeure que les valeurs d'amplitude des groupes murins diabétiques significativement plus élevées que celles des groupes contrôles non-diabétiques vont à l'encontre de ce qui est rapporté chez l'humain ainsi que pour ce qui est attendu pour un tel modèle. Ceci invite à relativiser les conclusions tirées de ce modèle avant de les transposer à d'autres modèles.

En ce qui a trait à l'effet des inhibiteurs dans l'essai d'ERG, il est possible de remarquer que l'injection de xénobiotiques inhibant les aquaporines 1 et 3, à des concentrations de 100 fois leur IC50 respectif (47; 110; 2) ne semble avoir aucun effet sur les ondes a, b ou sur leur

ratio (annexe B, figure B.3). Inversement, suite à l'injection de l'inhibiteur de l'aquaporine 4 à une concentration de 155 μM soit 50 * IC50 (59; 2), les amplitudes des ondes a et b sont comparables à celles du groupe contrôle non diabétique. La variabilité intragroupe diminue grandement et les valeurs du groupe STZ-Veh sont significativement différentes des deux autres groupes (annexe B, figure B.2). Les aquaporines de type 4, retrouvées dans les glies de Müller, joueraient potentiellement un rôle clef dans l'effet du modèle post-insulte.

Les effets modérés et la grande variabilité intragroupe ne sont plus applicables après les IVT. En effet, il est alors possible de remarquer que les éléments de chaque groupe réagissent de façon très similaire - et que cette réaction est à la fois dépendante de leur condition métabolique ainsi que du traitement qu'ils reçoivent. Autrement dit, le modèle en tant que tel n'a pas d'effet sur les paramètres de l'ERG tant qu'il n'y a pas d'insulte. Selon ces résultats, le modèle affecterait avant tout la capacité de régénération. Suivant les variations d'amplitudes suite à l'inhibition des aquaporines 1 & 3 puis de l'aquaporine 4, l'on peut conclure que cette différence est exacerbée par une rétention d'eau accrue (inhibition d'AQP1 & 3) et minimisée par une diminution de l'apport d'eau dans la rétine (inhibition d'AQP4). Elle semble donc dépendante de la quantité de fluides aqueux dans l'environnement. Dans une étude sur les mécanismes expliquant que la déshydratation est un facteur de risque d'accident vasculaire cérébral, Faraco et al. (41) affirment via l'étude d'un modèle murin (C57BL/6J) que la déshydratation n'affecte pas significativement l'amplitude des potentiels neuronaux. Ceci étant dit, il reste à approfondir si un déséquilibre de l'homéostasie aqueuse dans le sens inverse pourrait avoir de telles conséquences. Il est certain que les glies de Müller hyperplasiques peuvent intégrer cette eau supplémentaire, créant plus de passages directs (sans diffusion dans les couches plexiformes de la rétine) pour un même stimulus donné (102).

Si cette divergence avec la littérature n'est pas entièrement dépendante de la quantité de fluides aqueux dans l'environnement des couches neuronales de la rétine, elle est peut-être partiellement explicable par l'agent sédatif utilisé. Un des désavantages d'un modèle animal autre que l'*Homo sapiens* est la nécessité d'utiliser un sédatif pour obtenir la coopération des

individus lors des expériences. Ici, tel que mentionné précédemment, le sédatif de prédilection pour l'ERG est une concoction de kétamine-xylazine [1 dl/kg]. Or, la kétamine et la xylazine sont lipophiles (50) et le mélange est rapporté avoir un effet sur le potentiel neuronal. Les doses injectées sont uniquement calculées en fonction du poids de l'animal alors que les souris diabétiques ont moins de gras. Le mélange sédatif lipophile a donc le potentiel d'aller de façon prédominante dans les tissus riches en lipides (86), rétine y comprise.

Finalement, il faut toutefois relativiser les résultats expérimentaux obtenus suite à l'utilisation des xénobiotiques et les conclusions qui en découlent. En effet, des essais pharmacologiques d'atteinte des cibles (entre les petites molécules inhibitrices et les aquaporines ciblées) n'ont pas été exécutées dans le cadre de ce mémoire afin de corroborer les études déjà rapportées dans la littérature.

4.0.1.2. **Les limites du modèle.** Pour commencer, l'inflammation générée par l'injection contribue certainement à l'épaississement de la rétine. De plus, puisque l'ampleur de l'inflammation dépend de l'ampleur de l'insulte physique appliquée, cette inflammation est indirectement dépendante de la méthode d'injection. Trois méthodes d'injections différentes sont à répertorier dans ce projet. Ces différentes techniques d'injections ont été explorées dans le but d'optimiser l'opération. Les points focaux à optimiser étaient : le temps durant lequel l'animal est sédaté (une réduction du temps d'opération réduit les risques de sécheresse oculaire), le contrôle que la mise en place permet d'avoir durant l'opération (réduit les risques de dommages collatéraux) ainsi que le processus d'insertion du capillaire (dans le but de minimiser le reflux suivant le retrait de ce dernier ou de minimiser le risque que le capillaire soit en contact avec le vitré). Il va sans dire que la dernière des méthodes utilisées comportait un maximum d'avantages et un minimum d'inconvénients : une opération rapide, beaucoup de confort durant les manipulations (limitant les contacts avec le vitré) ainsi que peu de reflux hors du globe oculaire suivant l'injection. Il est donc attendu de voir une corrélation inverse avec le temps (nombre d'ensemble d'expérience exécutée + les différentes techniques mise à l'essai jusqu'à ce que la plus efficace et moins dommageable soit utilisée) et l'ampleur de l'inflammation dans la rétine.

Ensuite, l'algorithme est sans aucun doute un très bon outil pour les besoins de ce projet. Il n'en demeure pas moins que tout outil technologique comporte des limites techniques. La première limite technique concerne l'application prévue de l'instrument utilisé. L'appareil d'OCT Spectralis utilisé pour toutes les évaluations est un appareil conçu pour l'œil humain. Les modalités d'imagerie rétinienne optique reposent sur les éléments optiques de l'œil lui-même (principalement la cornée et le cristallin) pour produire des images rétiniennes et sont donc influencées par l'agencement spécifique de ces éléments et d'éventuelles imperfections de courbure (93). En d'autres mots, observer un œil murin via un instrument conçu pour l'œil humain n'est pas adéquat. La résolution s'en trouve affectée pour une prise de mesure sur l'œil murin sain - d'autant plus sur un œil murin pathologique ayant subi une IVT. De ce fait, ce ne sont pas toutes les couches de la rétine qui sont systématiquement distinguables. Puisque le diagnostic de DME requiert l'évaluation de l'intégrité de diverses couches de la rétine selon le tableau de classification de l'École européenne des études avancées en ophtalmologie (ESASO) (Figure 0.5), le diagnostic des DME sur le modèle murin ici présenté est partiel/incomplet.

Deuxièmement, le biais qu'il peut y avoir entre la mesure d'épaisseur calculée et la mesure réelle dû à l'angle de la rétine sur l'image (section 2.1.3) demeure une limite en soi. Il est théoriquement possible de générer un algorithme pour redresser automatiquement les images. Ceci étant dit, la fréquence des rétines en angles ne semblait pas mériter le temps qu'il aurait fallu pour mettre sur pied un tel algorithme (section 2.1.3). Les algorithmes doivent être très performants pour parer au désavantage principal de l'étude des petites rétines. En effet, la résolution du système d'OCT ne permet pas d'obtenir une discrimination distincte des couches, comme il est possible de visualiser via des couches histologiques, par exemple (73). Les paramètres programmés doivent donc distinguer des limites qui sont discutables et sont d'autant plus difficiles à ségréguer lorsque ladite rétine est pathologique. À ce propos, il y a deux types de techniques permettant d'obtenir une image finale plus claire, une image finale ayant un faible ratio signal/bruit (artéfacts). Le premier type est une technique d'*Averaging*, qui est souvent inclus dans les logiciels accompagnant les instruments d'OCT. Elle consiste

à combiner plusieurs images d'une région donnée afin de minimiser le bruit dans l'image résultante (124; 20; 3). Cette méthode est plutôt efficace, par le fait même très commune, et peut-être moins techniquement demandante que son alternative (103). La seule technique d'*Averaging* utilisée pour ce projet correspond à celle qui est incluse dans l'instrument OCT Spectralis: elle utilise un ophtalmoscope *scanneur* laser qui, combiné à l'OCT, donne lieu à un suivi en temps-réel des mouvements de l'œil et une possibilité de fusionner de multiples *b-scans* (124; 64). L'autre technique d'*Averaging* est une forme de traitement d'images réalisée après les enregistrements (118; 40), et demande aussi plus de connaissances techniques en programmation. Finalement, l'alternative correspond au *Denoising* qui consiste à filtrer mathématiquement l'environnement de l'image afin de clarifier cette dernière (124; 72; 96). De ces trois options, seule la première était accessible en fonction des connaissances techniques dans le domaine. Ceci étant dit, c'est une technique qui est toujours d'actualité dans le domaine (94). Elle s'accompagne de limites techniques dans la mesure où un temps d'exposition prolongé est inévitable avec une augmentation du nombre d'images utilisée pour former l'image finale. Plus ce temps de capture est prolongé pour une seule région du fundus, moins il est possible d'en capturer avant que le sédatif perde de son effet. Il aurait fallu faire du développement de l'algorithme l'essence du projet pour pouvoir espérer faire quelque chose de plus performant et encore là, les exemples d'algorithmes poussés que l'on retrouve dans la littérature ne sont pas conçus pour évaluer des rétines murines pathologiques et/ou endommagées (post insulte IVT) (112). Tel qu'il est et en ayant conscience de ces limites, l'algorithme a le meilleur rapport investissement/performance.

4.0.1.3. **Différences anatomiques.** Les expériences longitudinales (figures 2.11 et 2.12) démontrent qu'il faut une perméabilisation du réseau vasculaire chronique ainsi qu'une inhibition chronique des aquaporines de l'ÉPR (ainsi que potentiellement d'autres facteurs d'une rétine diabétique non mis en évidence dans ces études) pour déclencher un déséquilibre durable de l'homéostasie de la rétine. Or, au moment de ce déclenchement, la rétine du modèle a tendance à être plus mince qu'elle le serait usuellement. Il est donc possible d'hypothétiser qu'il faudrait étudier un pareil déséquilibre durable de l'homéostasie de la

rétine sur une période bien plus longue que deux semaines pour espérer générer des œdèmes effleurant les limites mécaniques de la rétine murine.

Les souris sont dépourvues de macula, qui, par définition, est l'unique région où l'on retrouve un DME. D'autre part, c'est là où l'on retrouve le plus souvent des œdèmes de forme cystoïde. La macula présente une architecture plus mince et plus spécialisée que le reste de la rétine. Chez l'homme, son épaisseur est rapportée varier entre 100 et 300 micromètres, tandis que le reste de la rétine neurale a une épaisseur moyenne d'environ 200 à 300 micromètres (57; 32; 31). Il est possible d'hypothétiser qu'avec cette épaisseur réduite ainsi que cette diminution de la variété des types cellulaires s'y trouvant, peut s'amener une certaine diminution de la stabilité structurelle. La perception reliée à cette hypothèse peut sembler encore plus instinctive dans la fovéa, une zone qui ne possède même pas de réseau vasculaire (95) formant un filet dont les mailles relient les différentes couches rétinienne. Ce réseau vasculaire est systématiquement accompagné de péricytes et, dans la rétine, de glias de Müller formant ce que l'on réfère en tant qu'unité neurovasculaire. Cette unité neurovasculaire rétinienne a maintes fonctions en plus de stabiliser le réseau vasculaire. Elle contribue grandement à la formation et au maintien de l'homéostasie des fluides via l'angiogenèse, sa régulation du flux sanguin capillaire, l'élimination de sous-produits cellulaires toxiques ainsi que de contribuer à l'angioarchitecture (7). En plus d'assister à la formation et au maintien de la BRB, cette unité contribue donc à l'architecture du réseau vasculaire et, indirectement via les ramifications cellulaires, à l'intégrité de la rétine neurale entière (7). Sommairement, il est possible que l'absence d'œdème cystoïde soit partiellement dû aux différences anatomiques entre l'Homme et la souris.

4.0.2. Caractérisation de l'épithélium rétinien pigmenté sénescence

In vitro, le problème de recherche se traduisait par les questions suivantes : un EPR sénescence possède-t-il des AQP fonctionnelles ? La sénescence affecte-t-elle la fonction des AQP de manière similaire aux inhibiteurs des AQP ? Ces questions sont applicables à la

fois pour le DME et pour la DMLA. L'hypothèse alternative émise que la sénescence impacte significativement la fonction des AQPs dans l'ÉPR.

Une des lacunes des cultures décrites dans la littérature est que les tests sont exécutés sur des cellules ne possédant pas un nombre important des caractéristiques clés du phénotype d'ÉPR. Elles sont non pigmentées, déformées (plusieurs adoptent une forme de fibroblaste) et sont maintenues en culture à une très faible confluence (<50 %). Finalement, le nombre de passages est rarement divulgué. Or, tous ces facteurs nuisent à la légitimité des résultats qui sont recueillis. Il est bien documenté qu'en plus d'une dérivation génétique non régulée, une multitude de passages engendre fréquemment une dédifférenciation (12; 9). Il est donc impératif de documenter le nombre de passages des cultures et d'exécuter les expériences avec des cultures de faibles passages (105; 9). De manière idiosyncratique aux cellules épithéliales, une culture à faible densité (lors de l'ensemencement ou durant le maintien de la culture) ou des multiples passages sont des stress suffisants pour engendrer une dédifférenciation, une perte de phénotype équivalente à la transition épithélio-mésenchymateuse. Dans l'ÉPR, il est très difficile de récupérer le phénotype approprié - il faut absolument une culture complètement confluente (25) et ce durant plusieurs semaines en maintenant des conditions de culture propices (105). Finalement, cette perte de phénotype s'accompagne de la perte de plusieurs fonctions métaboliques clés de l'ÉPR, dont la phagocytose des segments externes des photorécepteurs, une perte d'expression de la protéine du gène RPE65, transformant le tout-trans rétinol en 11-cis-rétinol dans la cascade visuelle, une grande diminution de production de mélanine qui interagit avec beaucoup de xénobiotiques, etc. . Plusieurs articles décrivent de bons modèles (des cultures primaires utilisées dès les premiers passages), mais ils vont généralement citer très peu de marqueurs de sénescence. Ces marqueurs varient beaucoup d'un article à un autre, mettant en relief le besoin de caractériser la sénescence dans l'ÉPR. De façon générale, les articles étudiant la sénescence de l'ÉPR sont conceptuellement déficients par rapport à un ou plusieurs des facteurs préalablement mentionnés, particulièrement avant 2010 [(56)]. Le modèle expérimental *in vitro* a été conceptualisé dans le but de combler la majorité de ces lacunes.

D'abord, Terasaki, H. et al., 2015 citent que les jonctions serrées (TJ) sont fonctionnelles entre 3 et 14 jours en culture (115). Les cultures sont donc laissées confluentes environ deux semaines avant d'exécuter les essais biochimiques. Ensuite, un vaste choix de marqueurs de sénescence potentiels a été retenu. En plus de ceux présentés dans la section résultats se trouvent les marqueurs suivants ainsi que l'effet attendu suite à l'induction de la sénescence : une augmentation de lipofuscine (détectable en microscopie *Brightfield*) (62), une perte de lamin B1 (122; 45), une diminution de la protéine régulatrice d'autophagie HMGB1 (42) ainsi que des dommages à l'ADN (71; 56; 84).

CD63 est un marqueur spécifique des vésicules extracellulaires (44). Tel que mentionné précédemment, il est rapporté que ces protéines soient larguées sous forme de vésicules extracellulaires suite à des stressseurs associés à la DMLA (44). Il est donc hypothétisé que le nombre de ces vésicules augmente dans un contexte de sénescence.

Somme toute, une diminution du nombre de noyaux est légèrement observable plus le temps passe suivant le traitement. Cette diminution est proportionnelle à la croissance de la taille des cellules. Ensuite, il est possible d'observer de manière qualitative que les TJ ont une apparence plus discontinue dans les conditions de hautes doses de peroxyde d'hydrogène. Néanmoins, il y a une faible corrélation visuelle entre les marqueurs (nombre de noyaux/cellules et TJ) et les conditions. En effet, il y a plusieurs cellules, dans toutes les conditions, qui présentent plus d'un (parfois deux) noyau(x) par cellule. Bien que les cellules d'ÉPR puissent être binucléées, cette polynucléation semble ici être plus ou moins aléatoire. Finalement, il semble y avoir une faible corrélation entre la taille cellulaire (définie par ZO-1) ainsi que la taille des noyaux (DAPI).

Ensuite, peu de variation d'expression d'ARNm de gènes fréquemment associés à la sénescence a été observé, même dans des conditions de traitement particulièrement intenses. Ceci pourrait être indicatif d'un choix de gène(s) de référence(s) inadéquat. Pourtant, PPIA et GUSB sont rapportés être les gènes de références idéaux dans des conditions d'hypoxie ou d'hyperglycémie pour des cellules d'ÉPR (75).

Pour conclure cette section, les difficultés à établir une culture primaire de RPE ont mené au choix d'une lignée immortalisée (ARPE-19). Toute lignée immortalisée possède une dérive génétique rarement quantifiée. Ensuite, bien que les cultures d'ÉPR utilisées pour les essais biochimiques aient un faible passage, qu'elles aient été laissées confluentes assez longtemps pour établir des TJs saines - leur morphologie n'est pas tout à fait hexagonale et elles ne sont pas non plus pigmentées. Les données recueillies via ces cultures demeurent des données de preuve conceptuelle. Il sera toujours pertinent de continuer les efforts d'optimisation d'une culture primaire d'ÉPR.

Chapitre 5

Conclusion

Ce parcours universitaire de deuxième degré a débuté avec l'objectif de répondre à la question centrale suivante : la dérégulation des aquaporines dans l'ÉPR ou les glios de Müller est-elle suffisante pour induire un phénotype d'œdème dans un modèle dans lequel un tel phénotype n'est généralement pas observé. Cette question centrale est posée en reconnaissant la nécessité de caractériser la sénescence dans l'ÉPR comme projet parallèle.

Durant ce parcours, plusieurs objectifs ont été accomplis. Le modèle murin de DT1 induit via STZ a été étudié de façon longitudinale sur un intervalle de temps modéré et pourra être ajusté pour des expériences futures en mettant à profit un outil de quantification semi-automatique performant. L'algorithme, tel qu'il est et en ayant conscience de ses limites, a le meilleur rapport investissement/performance. C'est un très bon outil pour ce projet ainsi que pour tant d'autres projets similaires. Il est simple à utiliser, à comprendre et à maintenir, d'autant plus que ses différentes versions enregistrées à des étapes clés de son développement permettent d'analyser des images (et donc des yeux) de conditions variées. Moyennant un changement de la lentille de l'instrument, il est aussi possible de capturer le segment antérieur de l'œil et d'analyser les images résultantes avec l'outil mis sur pied. D'autre part, le modèle *in vitro* de la sénescence de l'ÉPR est conceptuellement établi et partiellement mis sur pied.

Mises ensemble, les expériences de Miles Assay indiquent que le modèle de DT1-induit a des effets métaboliques significatifs sur la rétine (moins sur la choroïde), en plus des effets

observables à l'œil nu (perte de poids, polyurie, etc.). Les expériences de fERG avant toute insulte indiquent que le fonctionnement global des photorécepteurs n'est pas encore significativement affecté. Le modèle ne correspondrait donc pas tout à fait à un stade de DR avancé (78). En effet, bien que cette variation ne soit pas significative, un plus ample signal dans une rétine diabétique pour un même stimulus pourrait être expliqué par la présence d'œdème cytotoxique (gonflement cellulaire) dans les neurones(23), mais surtout dans les glies de Müller où cet état réduirait la diffraction du stimuli lumineux avant d'être détecté par les photorécepteurs (102). Autrement dit, le modèle en tant que tel n'a pas d'effet sur les paramètres de l'ERG tant qu'il n'y a pas d'insulte. Selon ces résultats, le modèle pathologique murin affecterait avant tout la capacité de régénération.

Aucune des inhibitions des aquaporines ciblées n'est suffisante pour générer un œdème cystoïde - et ce même en exacerbant le modèle en augmentant la perméabilité vasculaire rétinienne. Dans le modèle pathologique reproduit, une perméabilisation supplémentaire aiguë du réseau vasculaire couplée à une inhibition spontanée des aquaporines exprimées dans l'ÉPR est suffisante pour engendrer un œdème, mais insuffisant pour engendrer un œdème cystoïde selon la classification de l'ESASO. Une inhibition des AQP4s n'aurait pas, selon les résultats préliminaires, engendré d'œdème. Les faits rapportés supportent la notion selon laquelle une expression accrue des AQP4s est bien plus pertinente dans la pathogenèse du DME que leur inhibition. Parallèlement à ces arguments, l'œdème cytotoxique est une forme de déséquilibre de l'homéostasie aqueuse qui est vraisemblablement présente dans la rétine de mon modèle (18; 17). Par contre, dans le cerveau, le mécanisme n'est pas rapporté induire un réel gonflement du tissu atteint(23). Il reste donc à confirmer si ce mécanisme est un des facteurs essentiels au DME et/ou si l'expression accrue des AQP4s est l'un des facteurs essentiels au DME.

In vitro, il reste encore à établir un protocole d'isolement pour l'ÉPR permettant d'obtenir une culture primaire pure, complètement confluente et métaboliquement active et à confirmer si un protocole d'isolement pour les cellules de Müller est réalisable. Bien que la caractérisation de l'ÉPR ne soit qu'entamée, la suite du projet n'est pas moins prometteuse.

Il est toujours d'actualité de compléter la caractérisation de la sénescence de l'ÉPR. Cette étape est requise pour implémenter le modèle d'induction de sénescence localisée analogue à l'atrophie géographique et permettant d'étudier la sénescence paracrine *in vitro*. La conceptualisation de cette entreprise est basée sur les techniques appliquées dans l'article de Roversi K. et al, 2022 (101). Dans ledit article, des nanoparticules conjuguées à des anticorps sont utilisées pour amplifier la stimulation d'un laser de manière spécifique à un sous-type cellulaire. Puisque le modèle comprend une progression d'un état métabolique au sein d'une population cellulaire homogène, les nanoparticules sont moins efficaces. Au lieu des nanoparticules, la spécificité de la stimulation du laser serait géographique et générée via un faisceau laser de type *flat-top*. Ce type de faisceau génère une stimulation d'intensité ultragaussienne (plutôt noire/blanche) sur la surface désirée à l'inverse d'une intensité graduelle des faisceau typiques. Théoriquement, cela permet d'obtenir une stimulation homogène dans une zone définie de la monocouche. Ensuite, il est primordial d'optimiser grandement les paramètres du laser pour que les ondes dans le *far red* induisent un état de sénescence plutôt que l'apoptose ou un stress mineur.

En 2017, Park et al. révèlent que plutôt que perméabiliser la vasculature rétinienne, la délétion des péricytes rend le réseau vasculaire hautement susceptible à la signalisation de VEGFA (89). Leur modèle, induit par une expression ciblée de toxine de diphtérie, offre donc une piste alternative pour intensifier le modèle animal expérimental décrit dans ce mémoire. Explorer ce moyen d'exacerber le phénotype du modèle s'avèrerait d'un certain intérêt, peu importe si le modèle demeure un modèle murin ou autre. Puisque les différences anatomiques entre le modèle *in vivo* murin et l'Homme mitigent potentiellement l'aspect transposable des résultats, il serait judicieux de recréer un modèle ayant certaines caractéristiques anatomiques précises en commun avec l'humain (une macula). D'autre part, il serait adéquat et de prioriser une inhibition des AQP1 et 3 conjuguée à une expression accrue des AQP4 sans nécessiter une insulte physique (invalidation génétique conditionnelle dans l'ÉPR, par exemple). Cela permettra de poursuivre les recherches en s'intéressant davantage aux effets de l'altération (à la hausse) de l'expression d'AQP4 et à leurs impacts sur la pathogenèse du

DME. Il serait ensuite pertinent de vérifier s'il est possible d'inverser le phénotype (d'œdème non cystoïde) - d'autant plus si l'expression accrue des AQP4s est suffisante pour générer des œdèmes cystoïdes. Accessoirement, il s'avérerait à propos de déterminer si la sénescence affecte l'expression des aquaporines ou leur localisation cytoplasmique puisqu'il est rapporté que l'hypoxie influence la localisation cellulaire des AQP4 et que ce mécanisme moléculaire est de mieux en mieux compris(65; 77).

Pour conclure, bien qu'aucune des hypothèses de départ explorées minutieusement se soient avérées confirmées dans le modèle pathologique murin, les résultats sont prometteurs et incitent à approfondir des cibles alternatives dans un modèle conceptuellement similaire, mais soit exacerbé ou plus anatomiquement près de l'humain. Le modèle murin de DT1 induit via STZ a été étudié de façon longitudinale sur un intervalle de temps modéré et peut être ajusté pour des expériences futures en mettant à profit un outil de quantification semi-automatique adaptable et performant. D'autre part, le modèle *in vitro* de la sénescence de l'ÉPR est conceptuellement établi et partiellement mis sur pied.

Références bibliographiques

- [1]
- [2] Mohammed ABIR-AWAN, Philip KITCHEN, Mootaz M SALMAN, Matthew T CONNER, Alex C CONNER et Roslyn M BILL : Inhibitors of mammalian aquaporin water channels. *International journal of molecular sciences*, 20(7):1589, 2019.
- [3] Dan ADAM, Simona BEILIN-NISSAN, Zvi FRIEDMAN et Vera BEHAR : The combined effect of spatial compounding and nonlinear filtering on the speckle reduction in ultrasound images. *Ultrasonics*, 44(2):166–181, 2006.
- [4] L Yu ALICE, Rudolf FUCHSHOFER, Daniel KOOK, Anselm KAMPIK, Hans BLOEMENDAL et Ulrich WELGE-LUSSEN : Subtoxic oxidative stress induces senescence in retinal pigment epithelial cells via $\text{tgf-}\beta$ release. *Investigative ophthalmology & visual science*, 50(2):926–935, 2009.
- [5] Filiberto ALTOMARE, Amin KHERANI, Julie LOVSHIN, Diabetes Canada Clinical Practice Guidelines Expert COMMITTEE *et al.* : Retinopathy. *Canadian Journal of Diabetes*, 42:S210–S216, 2018.
- [6] Ahmed AM : History of diabetes mellitus. *Saudi Medical Journal*, pages 373–378, 2002.
- [7] David A ANTONETTI, Paolo S SILVA et Alan W STITT : Current understanding of the molecular and cellular pathology of diabetic retinopathy. *Nature Reviews Endocrinology*, 17(4):195–206, 2021.
- [8] Orhan E ARSLAN : Anatomy and physiology of retina and posterior segment of the eye. *Drug Delivery for the Retina and Posterior Segment Disease*, pages 3–33, 2018.

- [9] ATCC : Passage number effects in cell lines. <https://www.atcc.org/resources/technical-documents/passage-number-effects-in-cell-lines>: :text=Events2023/2023. Accessed: 12/07/2023.
- [10] Francesco BANDELLO et Maria Vittoria CICINELLI : 19th euretina congress keynote lecture: diabetic retinopathy today. *Ophthalmologica*, 243(3):163–171, 2020.
- [11] M.F. BEAR, B.W. CONNORS, M.A. PARADISO et A. NIEOULLON : *Neurosciences: A la découverte du cerveau*. Éditions Pradel, 2016.
- [12] Uri BEN-DAVID, Benjamin SIRANOSIAN, Gavin HA, Helen TANG, Yaara OREN, Kuni-hiko HINOHARA, Craig A STRATHDEE, Joshua DEMPSTER, Nicholas J LYONS, Robert BURNS *et al.* : Genetic and transcriptional evolution alters cancer cell line drug response. *Nature*, 560(7718):325–330, 2018.
- [13] Arthur A BERGEN, Swati ARYA, Céline KOSTER, Matthew G PILGRIM, Dagmara WIATREK-MOUMOULIDIS, Peter J van der SPEK, Stefanie M HAUCK, Camiel JF BOON, Eszter EMRI, Alan J STEWART *et al.* : On the origin of proteins in human drusen: The meet, greet and stick hypothesis. *Progress in Retinal and Eye Research*, 70:55–84, 2019.
- [14] Kapil BHARTI, Anneke I den HOLLANDER, Aparna LAKKARAJU, Debasish SINHA, David S WILLIAMS, Silvia C FINNEMANN, Catherine BOWES-RICKMAN, Goldis MALEK et Patricia A D'AMORE : Cell culture models to study retinal pigment epithelium-related pathogenesis in age-related macular degeneration. *Experimental eye research*, 222:109170, 2022.
- [15] Timothy A. BLENKINSOP, Enrique SALERO, Jeffrey H. STERN et Sally TEMPLE : *The Culture and Maintenance of Functional Retinal Pigment Epithelial Monolayers from Adult Human Eye*, pages 45–65. Humana Press, Totowa, NJ, 2013.
- [16] James P BOYLE, Theodore J THOMPSON, Edward W GREGG, Lawrence E BARKER et David F WILLIAMSON : Projection of the year 2050 burden of diabetes in the us adult population: dynamic modeling of incidence, mortality, and prediabetes prevalence. *Population health metrics*, 8(1):1–12, 2010.

- [17] Andreas BRINGMANN, Thomas PANNICKE, Jens GROSCHE, Mike FRANCKE, Peter WIEDEMANN, Serguei N SKATCHKOV, Neville N OSBORNE et Andreas REICHENBACH : Müller cells in the healthy and diseased retina. *Progress in retinal and eye research*, 25(4):397–424, 2006.
- [18] Andreas BRINGMANN, Ortrud UCKERMANN, Thomas PANNICKE, Ianors IANDIEV, Andreas REICHENBACH et Peter WIEDEMANN : Neuronal versus glial cell swelling in the ischaemic retina. *Acta Ophthalmologica Scandinavica*, 83(5):528–538, 2005.
- [19] J. BUFFAULT, A. LABBÉ, P. HAMARD, F. BRIGNOLE-BAUDOIN et C. BAUDOIN : The trabecular meshwork: Structure, function and clinical implications. a review of the literature. *Journal Français d’Ophthalmologie*, 43(7):e217–e230, 2020.
- [20] Christoph B BURCKHARDT : Speckle in ultrasound b-mode scans. *IEEE Transactions on Sonics and ultrasonics*, 25(1):1–6, 1978.
- [21] Judith CAMPISI et Fabrizio d’Adda di FAGAGNA : Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nature reviews Molecular cell biology*, 8(9):729–740, 2007.
- [22] Cecilia R CHAMBERS, Shona RITCHIE, Brooke A PEREIRA et Paul TIMPSON : Overcoming the senescence-associated secretory phenotype (sasp): a complex mechanism of resistance in the treatment of cancer. *Molecular oncology*, 15(12):3242–3255, 2021.
- [23] Yihao CHEN, Shengpan CHEN, Jianbo CHANG, Junji WEI, Ming FENG et Renzhi WANG : Perihematomal edema after intracerebral hemorrhage: an update on pathogenesis, risk factors, and therapeutic advances. *Frontiers in immunology*, 12:740632, 2021.
- [24] Bennett G CHILDS, Matej DURIK, Darren J BAKER et Jan M VAN DEURSEN : Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy. *Nature medicine*, 21(12):1424–1435, 2015.
- [25] Parul CHOUDHARY, Alex GUTTERIDGE, Emma IMPEY, R Ian STORER, Robert M OWEN, Paul J WHITING, Magda BICTASH et Caroline L BENN : Targeting the camp and transforming growth factor- β pathway increases proliferation to promote re-epithelialization of human stem cell-derived retinal pigment epithelium. *Stem cells*

- translational medicine*, 5(7):925–937, 2016.
- [26] COLLECTIF : Suivi de culture d'épithélium pigmentaire rétinien de porc. *Protocole de l'INSERM*.
- [27] Sergio CRESPO-GARCIA, Pamela R TSURUDA, Agnieszka DEJDA, Rathi D RYAN, Frederik FOURNIER, Shawnta Y CHANEY, Frederique PILON, Taner DOGAN, Gael CAGNONE, Priyanka PATEL *et al.* : Pathological angiogenesis in retinopathy engages cellular senescence and is amenable to therapeutic elimination via bcl-xl inhibition. *Cell Metabolism*, 33(4):818–832, 2021.
- [28] José CUNHA-VAZ, Rui BERNARDES et Conceição LOBO : Blood-retinal barrier. *European journal of ophthalmology*, 21(6_suppl):3–9, 2011.
- [29] Jose CUNHA-VAZ et David MAURICE : Fluorescein dynamics in the eye. *Documenta Ophthalmologica*, 26:61–72, 1969.
- [30] José G CUNHA-VAZ, Manoucher SHAKIB et N ASHTON : Studies on the permeability of the blood-retinal barrier. i. on the existence, development, and site of a blood-retinal barrier. *The British Journal of Ophthalmology*, 50(8):441, 1966.
- [31] Christine A CURCIO, Nancy E MEDEIROS et C Leigh MILLICAN : Photoreceptor loss in age-related macular degeneration. *Investigative ophthalmology & visual science*, 37(7):1236–1249, 1996.
- [32] Christine A CURCIO, Kenneth R SLOAN, Robert E KALINA et Anita E HENDRICKSON : Human photoreceptor topography. *Journal of comparative neurology*, 292(4):497–523, 1990.
- [33] Rebecca E DAY, Philip KITCHEN, David S OWEN, Charlotte BLAND, Lindsay MARSHALL, Alex C CONNER, Roslyn M BILL et Matthew T CONNER : Human aquaporins: regulators of transcellular water flow. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1840(5):1492–1506, 2014.
- [34] Edwiges de Fátima de OLIVEIRA, Alódia BRASIL, Anderson Manoel HERCULANO, Matheus A ROSA, Bruno Duarte GOMES et Fernando Allan de Farias ROCHA : Neuroprotective effects of açai (euterpe oleracea mart.) against diabetic retinopathy. *Frontiers*

- in Pharmacology*, 14:1143923, 2023.
- [35] Florence DEBACQ-CHAINIAUX, Jorge D ERUSALIMSKY, Judith CAMPISI et Olivier TOUSSAINT : Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (sa- β gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nature protocols*, 4(12): 1798–1806, 2009.
- [36] Danielle M DESJARDINS, Phil W YATES, Mohammad DAHROUJ, Yueying LIU, Craig E CROSSON et Zsolt ABLONCZY : Progressive early breakdown of retinal pigment epithelium function in hyperglycemic rats. *Investigative ophthalmology & visual science*, 57(6):2706–2713, 2016.
- [37] Thuan M DIEP et Irena TSUI : Risk factors associated with diabetic macular edema. *Diabetes research and clinical practice*, 100(3):298–305, 2013.
- [38] Andrew F DUCRUET, Brad E ZACHARIA, Zachary L HICKMAN, Bartosz T GROBELNY, Mason L YEH, Sergey A SOSUNOV et E Sander CONNOLLY JR : The complement cascade as a therapeutic target in intracerebral hemorrhage. *Experimental neurology*, 219(2):398–403, 2009.
- [39] Chantal DYSLI, Volker ENZMANN, Raphael SZNITMAN et Martin S ZINKERNAGEL : Quantitative analysis of mouse retinal layers using automated segmentation of spectral domain optical coherence tomography images. *Translational vision science & technology*, 4(4):9–9, 2015.
- [40] Leyuan FANG, Shutao LI, Ryan P MCNABB, Qing NIE, Anthony N KUO, Cynthia A TOTH, Joseph A IZATT et Sina FARSIU : Fast acquisition and reconstruction of optical coherence tomography images via sparse representation. *IEEE transactions on medical imaging*, 32(11):2034–2049, 2013.
- [41] Giuseppe FARACO, Teodora Stella WIJASA, Laibaik PARK, Jamie MOORE, Joseph ANRATHER et Costantino IADECOLA : Water deprivation induces neurovascular and cognitive dysfunction through vasopressin-induced oxidative stress. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 34(5):852–860, 2014.

- [42] Lujia FENG, Liang LIANG, Shaochong ZHANG, Jinglu YANG, Yanan YUE et Xuedong ZHANG : Hmgb1 downregulation in retinal pigment epithelial cells protects against diabetic retinopathy through the autophagy-lysosome pathway. *Autophagy*, 18(2):320–339, 2022.
- [43] Rosario FERNANDEZ-GODINO, Donita L GARLAND et Eric A PIERCE : Isolation, culture and characterization of primary mouse rpe cells. *Nature protocols*, 11(7):1206–1218, 2016.
- [44] Miguel FLORES-BELLVER, Jason MIGHTY, Silvia APARICIO-DOMINGO, Kang V LI, Cui SHI, Jing ZHOU, Hannah COBB, Patrick MCGRATH, German MICHELIS, Patricia LENHART *et al.* : Extracellular vesicles released by human retinal pigment epithelium mediate increased polarised secretion of drusen proteins in response to amd stressors. *Journal of extracellular vesicles*, 10(13):e12165, 2021.
- [45] Adam FREUND, Remi-Martin LABERGE, Marco DEMARIA et Judith CAMPISI : Lamin b1 loss is a senescence-associated biomarker. *Molecular biology of the cell*, 23(11):2066–2075, 2012.
- [46] Aaron H FRONK et Elizabeth VARGIS : Methods for culturing retinal pigment epithelial cells: a review of current protocols and future recommendations. *Journal of tissue engineering*, 7:2041731416650838, 2016.
- [47] Junwei GAO, Xiaohua WANG, Yongjie CHANG, Jianzhao ZHANG, Qianliu SONG, Heming YU et Xuejun LI : Acetazolamide inhibits osmotic water permeability by interaction with aquaporin-1. *Analytical biochemistry*, 350(2):165–170, 2006.
- [48] Holger GERHARDT, Matthew GOLDING, Marcus FRUTTIGER, Christiana RUHRBERG, Andrea LUNDKVIST, Alexandra ABRAMSSON, Michael JELTSCH, Christopher MITCHELL, Kari ALITALO, David SHIMA *et al.* : Vegf guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *The Journal of cell biology*, 161(6):1163–1177, 2003.
- [49] Sabrina GHADAOUIA, Marc-Alexandre OLIVIER, Aurélie MARTINEZ, Tibila KIEN-TEGA, Jian QIN, Patrick LAMBERT-LANTEIGNE, Guillaume B CARDIN, Chantal AUTEXIER, Nicolas MALAQUIN et Francis RODIER : Homologous recombination-mediated

- irreversible genome damage underlies telomere-induced senescence. *Nucleic Acids Research*, 49(20):11690–11707, 2021.
- [50] Marie-Chantal GIROUX, Pierre HÉLIE, Patrick BURNS et Pascal VACHON : Anesthetic and pathological changes following high doses of ketamine and xylazine in sprague dawley rats. *Experimental animals*, 64(3):253–260, 2015.
- [51] Hans E. GROSSNIKLAUS, Eldon E. GEISERT et John M. NICKERSON : Chapter twenty-two - introduction to the retina. In J. Fielding HEJTMANCIK et John M. NICKERSON, éditeurs : *Molecular Biology of Eye Disease*, volume 134 de *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, pages 383–396. Academic Press, 2015.
- [52] Age-Related Eye Disease Study Research GROUP *et al.* : Risk factors associated with age-related macular degeneration: a case-control study in the age-related eye disease study: age-related eye disease study report number 3. *Ophthalmology*, 107(12):2224–2232, 2000.
- [53] Leonor GUARIGUATA, David R WHITING, Ian HAMBLETON, Jessica BEAGLEY, Ute LINNENKAMP et Jonathan E SHAW : Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035. *Diabetes research and clinical practice*, 103(2):137–149, 2014.
- [54] Alejandra HERNANDEZ-SEGURA, Simone BRANDENBURG et Marco DEMARIA : Induction and validation of cellular senescence in primary human cells. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (136), 2018.
- [55] Alejandra HERNANDEZ-SEGURA, Jamil NEHME et Marco DEMARIA : Hallmarks of cellular senescence. *Trends in cell biology*, 28(6):436–453, 2018.
- [56] Shigeru HONDA, Leonard M HJELMELAND et James T HANDA : Senescence associated β galactosidase activity in human retinal pigment epithelial cells exposed to mild hyperoxia in vitro. *British journal of ophthalmology*, 86(2):159–162, 2002.
- [57] D HUANG, EA SWANSON, CP LIN, JS SCHUMAN, WG STINSON et W CHANG : & puliafito, ca (1991). optical coherence tomography. *Science*, 254(5035):1178–1181.
- [58] Jing HUANG et Qiong ZHOU : Gene biomarkers related to th17 cells in macular edema of diabetic retinopathy: cutting-edge comprehensive bioinformatics analysis and in vivo

- validation. *Frontiers in Immunology*, 13:858972, 2022.
- [59] Vincent J HUBER, Mika TSUJITA et Tsutomu NAKADA : Aquaporins in drug discovery and pharmacotherapy. *Molecular aspects of medicine*, 33(5-6):691–703, 2012.
- [60] Seol A JAE, Kun No AHN, Ji Young KIM, Je Hoon SEO, Hyong Kyu KIM et Yong Sook GOO : Electrophysiological and histologic evaluation of the time course of retinal degeneration in the rd10 mouse model of retinitis pigmentosa. *The Korean journal of physiology & pharmacology: official journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology*, 17(3):229, 2013.
- [61] Lars JAKOBSSON, Claudio A FRANCO, Katie BENTLEY, Russell T COLLINS, Bas PONSIOEN, Irene M ASPALTER, Ian ROSEWELL, Marta BUSSE, Gavin THURSTON, Alexander MEDVINSKY *et al.* : Endothelial cells dynamically compete for the tip cell position during angiogenic sprouting. *Nature cell biology*, 12(10):943–953, 2010.
- [62] Martin L KATZ : Potential role of retinal pigment epithelial lipofuscin accumulation in age-related macular degeneration. *Archives of gerontology and geriatrics*, 34(3):359–370, 2002.
- [63] Moien Abdul Basith KHAN, Muhammad Jawad HASHIM, Jeffrey Kwan KING, Romona Devi GOVENDER, Halla MUSTAFA et Juma AL KAABI : Epidemiology of type 2 diabetes—global burden of disease and forecasted trends. *Journal of epidemiology and global health*, 10(1):107, 2020.
- [64] Daniel F KIERNAN, William F MIELER et Seenu M HARIPRASAD : Spectral-domain optical coherence tomography: a comparison of modern high-resolution retinal imaging systems. *American journal of ophthalmology*, 149(1):18–31, 2010.
- [65] Philip KITCHEN, Mootaz M SALMAN, Andrea M HALSEY, Charlotte CLARKE-BLAND, Justin A MACDONALD, Hiroaki ISHIDA, Hans J VOGEL, Sharif ALMUTIRI, Ann LOGAN, Stefan KREIDA *et al.* : Targeting aquaporin-4 subcellular localization to treat central nervous system edema. *Cell*, 181(4):784–799, 2020.
- [66] Ronald KLEIN, Barbara EK KLEIN, Sandra C TOMANY et Karen J CRUICKSHANKS : The association of cardiovascular disease with the long-term incidence of age-related

- maculopathy: the beaver dam eye study. *Ophthalmology*, 110(6):1273–1280, 2003.
- [67] Ronald KLEIN, Michael D KNUDTSON, Kristine E LEE, Ronald GANGNON et Barbara EK KLEIN : The wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy xxii: the twenty-five-year progression of retinopathy in persons with type 1 diabetes. *Ophthalmology*, 115(11):1859–1868, 2008.
- [68] Ronald KLEIN, Michael D KNUDTSON, Kristine E LEE, Ronald GANGNON et Barbara EK KLEIN : The wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy xxiii: the twenty-five-year incidence of macular edema in persons with type 1 diabetes. *Ophthalmology*, 116(3):497–503, 2009.
- [69] Barbara Eden KOBRIN KLEIN : Overview of epidemiologic studies of diabetic retinopathy. *Ophthalmic epidemiology*, 14(4):179–183, 2007.
- [70] Michael R KOZLOWSKI : Rpe cell senescence: a key contributor to age-related macular degeneration. *Medical hypotheses*, 78(4):505–510, 2012.
- [71] Keng Siang LEE, Shuxiao LIN, David A COPLAND, Andrew D DICK et Jian LIU : Cellular senescence in the aging retina and developments of senotherapies for age-related macular degeneration. *Journal of Neuroinflammation*, 18:1–17, 2021.
- [72] Muxingzi LI, Ramzi IDOUGHI, Biswarup CHOUDHURY et Wolfgang HEIDRICH : Statistical model for oct image denoising. *Biomedical optics express*, 8(9):3903–3917, 2017.
- [73] Qihong LI, Adrian M TIMMERS, Kirk HUNTER, Carlos GONZALEZ-POLA, Alfred S LEWIN, David H REITZE et William W HAUSWIRTH : Noninvasive imaging by optical coherence tomography to monitor retinal degeneration in the mouse. *Investigative ophthalmology & visual science*, 42(12):2981–2989, 2001.
- [74] Weiye LI, Myron YANOFF, Yan LI et Zehong HE : Artificial senescence of bovine retinal pigment epithelial cells induced by near-ultraviolet in vitro. *Mechanisms of ageing and development*, 110(3):137–155, 1999.
- [75] Xin LIU, Zaoxia LIU, Qiaoyun GONG, Rui TIAN, Guanfang SU *et al.* : Identification and validation of reference genes for quantitative rt-pcr analysis of retinal pigment epithelium cells under hypoxia and/or hyperglycemia. *Gene*, 580(1):41–46, 2016.

- [76] Morihiko MAEDA, Toshio HAYASHI, Natsumi MIZUNO, Yuichi HATTORI et Masafumi KUZUYA : Intermittent high glucose implements stress-induced senescence in human vascular endothelial cells: role of superoxide production by nadph oxidase. *PLoS One*, 10(4):e0123169, 2015.
- [77] Andrea MARKOU, Lucas UNGER, Mohammed ABIR-AWAN, Ahmed SAADALLAH, Andrea HALSEY, Zita BALKLAVA, Matthew CONNER, Susanna TÖRNROTH-HORSEFIELD, Stuart D GREENHILL, Alex CONNER *et al.* : Molecular mechanisms governing aquaporin relocalisation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1864(4):183853, 2022.
- [78] Park JC McANANY JJ, Persidina OS : Clinical electroretinography in diabetic retinopathy: a review. *Survey Of Ophthalmology*, 67(3):712–722, 2022.
- [79] Khalil MILOUDI, Malika OUBAHA, Catherine MÉNARD, Agnieszka DEJDA, Vera GUBER, Gael CAGNONE, Ariel M WILSON, Nicolas TÉTREULT, Gaëlle MAWAMBO, Francois BINET *et al.* : Notch1 signaling induces pathological vascular permeability in diabetic retinopathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(10):4538–4547, 2019.
- [80] Paul MITCHELL, Lieven ANNEMANS, Meghan GALLAGHER, Rafiq HASAN, Simu THOMAS, Kerry GAIRY, Martin KNUDSEN et Henrietta ONWORDI : Cost-effectiveness of ranibizumab in treatment of diabetic macular oedema (dme) causing visual impairment: evidence from the restore trial. *British journal of ophthalmology*, 96(5):688–693, 2012.
- [81] Quresh MOHAMED, Mark C GILLIES et Tien Y WONG : Management of diabetic retinopathy: a systematic review. *Jama*, 298(8):902–916, 2007.
- [82] Hrebish MOLLY SUBHASH et Ruikang WANG : Optical coherence tomography: Technical aspects. *Biomedical Optical Imaging Technologies, Biological and Medical Physics, Biomedical Engineering*. ISBN 978-3-642-28390-1. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2013, p. 163, pages 163–, 08 2013.

- [83] Pierre MOREL : Gramm: grammar of graphics plotting in matlab. *Journal of Open Source Software*, 3(23):568, 2018.
- [84] Glyn NELSON, James WORDSWORTH, Chunfang WANG, Diana JURK, Conor LAWLESS, Carmen MARTIN-RUIZ et Thomas von ZGLINICKI : A senescent cell bystander effect: senescence-induced senescence. *Aging cell*, 11(2):345–349, 2012.
- [85] Vanina NETTI, Juan FERNÁNDEZ, Luciana MELAMUD, Pablo GARCIA-MIRANDA, Gisela DI GIUSTO, Paula FORD, Miriam ECHEVARRÍA et Claudia CAPURRO : Aquaporin-4 removal from the plasma membrane of human müller cells by aqp4-igg from patients with neuromyelitis optica induces changes in cell volume homeostasis: The first step of retinal injury? *Molecular Neurobiology*, 58:5178–5193, 2021.
- [86] Andrés J ONETTO et Sairah SHARIF : Drug distribution. 2021.
- [87] Shou OOSUKA, Teruyo KIDA, Hidehiro OKU, Taeko HORIE, Seita MORISHITA, Masanori FUKUMOTO, Takaki SATO et Tsunehiko IKEDA : Effects of an aquaporin 4 inhibitor, tgn-020, on murine diabetic retina. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(7):2324, 2020.
- [88] Fionn O’LEARY et Matthew CAMPBELL : The blood–retina barrier in health and disease. *The FEBS Journal*, 290(4):878–891, 2023.
- [89] Do Young PARK, Junyeop LEE, Jaeryung KIM, Kangsan KIM, Seonpyo HONG, Sangyeul HAN, Yoshiaki KUBOTA, Hellmut G AUGUSTIN, Lei DING, Jin Woo KIM *et al.* : Plastic roles of pericytes in the blood–retinal barrier. *Nature communications*, 8(1):15296, 2017.
- [90] Laura PELKONEN, Mika REINISALO, Emmanuelle MORIN-PICARDAT, Heidi KIDRON et Arto URTTI : Isolation of intact and functional melanosomes from the retinal pigment epithelium. *PLoS One*, 11(8):e0160352, 2016.
- [91] Berthold PEMP et Leopold SCHMETTERER : Ocular blood flow in diabetes and age-related macular degeneration. *Canadian journal of ophthalmology*, 43(3):295–301, 2008.
- [92] Lawrence H PINTO, Brandon INVERGO, Kazuhiro SHIMOMURA, Joseph S TAKAHASHI et John B TROY : Interpretation of the mouse electroretinogram. *Documenta*

- Ophthalmologica*, 115:127–136, 2007.
- [93] Michael PIRCHER et Robert J ZAWADZKI : Review of adaptive optics oct (ao-oct): principles and applications for retinal imaging. *Biomedical optics express*, 8(5):2536–2562, 2017.
- [94] Dominika PODKOWINSKI, Ehsan SHARIAN VARNOUSFADERANI, Christian SIMADER, Hrvoje BOGUNOVIC, Ana-Maria PHILIP, Bianca S GERENDAS, Ursula SCHMIDT-ERFURTH, Sebastian M WALDSTEIN *et al.* : Impact of b-scan averaging on spectralis optical coherence tomography image quality before and after cataract surgery. *Journal of ophthalmology*, 2017, 2017.
- [95] Jan M PROVIS, Adam M DUBIS, Ted MADDESS et Joseph CARROLL : Adaptation of the central retina for high acuity vision: cones, the fovea and the avascular zone. *Progress in retinal and eye research*, 35:63–81, 2013.
- [96] Bin QIU, Zhiyu HUANG, Xi LIU, Xiangxi MENG, Yunfei YOU, Gangjun LIU, Kun YANG, Andreas MAIER, Qiushi REN et Yanye LU : Noise reduction in optical coherence tomography images using a deep neural network with perceptually-sensitive loss function. *Biomedical optics express*, 11(2):817–830, 2020.
- [97] Robyn REYNOLDS, Bernard ROSNER et Johanna M SEDDON : Dietary omega-3 fatty acids, other fat intake, genetic susceptibility, and progression to incident geographic atrophy. *Ophthalmology*, 120(5):1020–1028, 2013.
- [98] Frishman L.J. Grigg J. et al. ROBSON, A.G. : Iscev standard for full-field clinical electroretinography (2022 update). *Doc Ophthalmol*, 144.
- [99] Roland ROCHOLZ, Federico CORVI, Julian WEICHSEL, Stefan SCHMIDT et Giovanni STAURENGHI : Oct angiography (octa) in retinal diagnostics. *High resolution imaging in microscopy and ophthalmology: new frontiers in biomedical optics*, pages 135–160, 2019.
- [100] Francis RODIER, Jean-Philippe COPPÉ, Christopher K PATIL, Wieteke AM HOEIJMAKERS, Denise P MUÑOZ, Saba R RAZA, Adam FREUND, Eric CAMPEAU, Albert R

- DAVALOS et Judith CAMPISI : Persistent dna damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nature cell biology*, 11(8):973–979, 2009.
- [101] Katiane ROVERSI, Maryam TABATABAEI, Nicolas DESJARDINS-LECAVALIER, Mohammad BALOOD, Theo CROSSON, Santiago COSTANTINO, May GRIFFITH, Sebastien TALBOT et Christos BOUTOPOULOS : Nanophotonics enable targeted photothermal silencing of nociceptor neurons. *Small*, 18(14):2103364, 2022.
- [102] Elisabeth RUNGGER-BRÄNDLE, André A DOSSO et Peter M LEUENBERGER : Glial reactivity, an early feature of diabetic retinopathy. *Investigative ophthalmology & visual science*, 41(7):1971–1980, 2000.
- [103] Firooz A SADJADI : Perspective on techniques for enhancing speckled imagery. *Optical Engineering*, 29(1):25–30, 1990.
- [104] C SALESSE : Physiologie du signal visuel rétinien: de la phototransduction jusqu’au cycle visuel. *Journal français d’ophtalmologie*, 40(3):239–250, 2017.
- [105] William SAMUEL, Cynthia JAWORSKI, Olga A POSTNIKOVA, R Krishnan KUTTY, Todd DUNCAN, Li Xuan TAN, Eugenia POLIAKOV, Aparna LAKKARAJU et T Michael REDMOND : Appropriately differentiated arpe-19 cells regain phenotype and gene expression profiles similar to those of native rpe cells. *Molecular vision*, 23:60, 2017.
- [106] Kevin L SCHEY, Zhen WANG, Jamie L WENKE et Ying QI : Aquaporins in the eye: expression, function, and roles in ocular disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1840(5):1513–1523, 2014.
- [107] Johanna M SEDDON, Jennifer COTE, Nancy DAVIS et Bernard ROSNER : Progression of age-related macular degeneration: association with body mass index, waist circumference, and waist-hip ratio. *Archives of Ophthalmology*, 121(6):785–792, 2003.
- [108] Rafael SIMÓ, Marta VILLARROEL, Lidia CORRALIZA, Cristina HERNÁNDEZ et Marta GARCIA-RAMÍREZ : The retinal pigment epithelium: something more than a constituent of the blood-retinal barrier—implications for the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010, 2010.

- [109] Jay S SKYLER, George L BAKRIS, Ezio BONIFACIO, Tamara DARSOW, Robert H ECKEL, Leif GROOP, Per-Henrik GROOP, Yehuda HANDELSMAN, Richard A INSEL, Chantal MATHIEU *et al.* : Differentiation of diabetes by pathophysiology, natural history, and prognosis. *Diabetes*, 66(2):241–255, 2017.
- [110] Yonathan SONNTAG, Patrizia GENA, Anna MAGGIO, Tania SINGH, Isabella ARTNER, Michal K OKLINSKI, Urban JOHANSON, Per KJELLBOM, John Dirk NIELAND, Søren NIELSEN *et al.* : Identification and characterization of potent and selective aquaporin-3 and aquaporin-7 inhibitors. *Journal of Biological Chemistry*, 294(18):7377–7387, 2019.
- [111] Richard F SPAIDE : Retinal vascular cystoid macular edema: review and new theory. *Retina*, 36(10):1823–1842, 2016.
- [112] Pratul P SRINIVASAN, Stephanie J HEFLIN, Joseph A IZATT, Vadim Y ARSHAVSKY et Sina FARSIU : Automatic segmentation of up to ten layer boundaries in sd-oct images of the mouse retina with and without missing layers due to pathology. *Biomedical optics express*, 5(2):348–365, 2014.
- [113] W Daniel STAMER, Dean BOK, Jane HU, Glenn J JAFFE et Brian S MCKAY : Aquaporin-1 channels in human retinal pigment epithelium: role in transepithelial water movement. *Investigative ophthalmology & visual science*, 44(6):2803–2808, 2003.
- [114] Austin C STARNES, Carrie HUISINGH, GERALD MCGWIN, Kenneth R SLOAN, Zsolt ABLONCZY, R Theodore SMITH, Christine A CURCIO et Thomas ACH : Multi-nucleate retinal pigment epithelium cells of the human macula exhibit a characteristic and highly specific distribution. *Visual neuroscience*, 33:E001, 2016.
- [115] Hiroto TERASAKI, Makoto SHIRASAWA, Hiroki OTSUKA, Takehiro YAMASHITA, Eisuke UCHINO, Toshio HISATOMI, Shozo SONODA et Taiji SAKAMOTO : Different effects of thrombin on vegf secretion, proliferation, and permeability in polarized and non-polarized retinal pigment epithelial cells. *Current eye research*, 40(9):936–945, 2015.
- [116] J THORNTON, R EDWARDS, P MITCHELL, RA HARRISON, I BUCHAN et Simon P KELLY : Smoking and age-related macular degeneration: a review of association. *Eye*, 19(9):935–944, 2005.

- [117] UNITY : Safety, tolerability and evidence of activity study of ubx1325 in patients with diabetic macular edema (behold). <https://classic.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04857996>, 2021/2023. Accessed: 16/07/2023.
- [118] Mirjam EJ van VELTHOVEN, Dirk J FABER, Frank D VERBRAAK, Ton G van LEEUWEN et Marc D de SMET : Recent developments in optical coherence tomography for imaging the retina. *Progress in retinal and eye research*, 26(1):57–77, 2007.
- [119] Ignazio VECCHIO, Cristina TORNALI, Nicola Luigi BRAGAZZI et Mariano MARTINI : The discovery of insulin: an important milestone in the history of medicine. *Frontiers in endocrinology*, 9:613, 2018.
- [120] AS VERKMAN et Alok K MITRA : Structure and function of aquaporin water channels. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 278(1):F13–F28, 2000.
- [121] Stela VUJOSEVIC, Alessandra MICERA, Silvia BINI, Marianna BERTON, Graziana ESPOSITO et Edoardo MIDENA : Aqueous humor biomarkers of müller cell activation in diabetic eyes. *Investigative ophthalmology & visual science*, 56(6):3913–3918, 2015.
- [122] Haibo WANG, Aniket RAMSHEKAR, Thaonhi CUNG, Chris WALLACE-CARRETE, Chandler ZAUGG, Jasmine NGUYEN, Gregory J STODDARD et M Elizabeth HARTNETT : 7-ketocholesterol promotes retinal pigment epithelium senescence and fibrosis of choroidal neovascularization via iqgap1 phosphorylation-dependent signaling. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(12):10276, 2023.
- [123] Wei WANG et Amy CY LO : Diabetic retinopathy: pathophysiology and treatments. *International journal of molecular sciences*, 19(6):1816, 2018.
- [124] Wei WU, Ou TAN, Rajeev R PAPPURU, Huilong DUAN et David HUANG : Assessment of frame-averaging algorithms in oct image analysis. *Ophthalmic Surgery, Lasers and Imaging Retina*, 44(2):168–175, 2013.
- [125] Andrea J YOOL, Elizabeth A BROWN et Gary A FLYNN : Roles for novel pharmacological blockers of aquaporins in the treatment of brain oedema and cancer. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 37(4):403–409, 2010.

- [126] Chun-lin ZHANG, Hai-ling WANG, Peng-cheng LI, Can-dong HONG, An-qi CHEN, Yan-mei QIU, Ai-ping ZENG, Yi-fan ZHOU, Bo HU et Ya-nan LI : Mfsd2a overexpression alleviates vascular dysfunction in diabetic retinopathy. *Pharmacological Research*, 171: 105755, 2021.
- [127] Hong ZHANG, Kuang-Hung PAN et Stanley N COHEN : Senescence-specific gene expression fingerprints reveal cell-type-dependent physical clustering of up-regulated chromosomal loci. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(6):3251–3256, 2003.
- [128] Jie ZHANG, Liang LI, Haoliang HUANG, Fang FANG, Hannah C WEBBER, Pei ZHUANG, Liang LIU, Roopa DALAL, Peter H TANG, Vinit B MAHAJAN, Yang SUN, Shaohua LI, Mingchang ZHANG, Jeffrey L GOLDBERG et Yang HU : Silicone oil-induced ocular hypertension and glaucomatous neurodegeneration in mouse. *eLife*, 8:e45881, may 2019.

Annexe A

La mise en fonction et l'optimisation des algorithmes

A.1. Rendre la fonction *measurethickness* opérationnelle

```
1 function [meanthickness,thickness_sd]=measurethickness(Folder)
2 Folder=fullfile('C:\Users\elodi\Documents\MATLAB\DATE TIMEPOINT ...
   BATCH\MOUSE#');
3 mkdir(fullfile(Folder, 'Cropped'));
4 mkdir(fullfile(Folder, 'Mask'));
5
6 %% Crop Mouse b-scan & Create Mask
7 oneShot= dir([Folder filesep 'B6*OS*U*.tif']);
   %Etait onefile= dir([Folder filesep '*000.tif']);
8 for i=1:size(oneShot,1)
```

```

9 myScannedLayer=oneShot(i); ...
                                %Etait avant ...
    myfile=onefile.name(1:14), mais produisait erreur ->Intermediate dot ...
    '.' indexing produced a comma-separated list with 4 values, but it ...
    must produce a single value when followed by subsequent indexing ...
    operations.
10 filename=append ([sprintf(myScannedLayer.name, '%03d')]); ...
                                %append: input must be text. -> xyz.name
11
12 %Crop Mouse b-Scan
13 destinationFolder=(fullfile(Folder, 'Cropped'));
14     myOCT=imread([Folder filesep sprintf(filename,i)]); ...
                                %Etait ([Folder filesep sprintf(filename,0) ...
                                '.tif']);
15     smallOCT=imcrop(myOCT);
16     imwrite(smallOCT,fullfile (destinationFolder, ...
                                sprintf(filename,i)));    %Etait %sprintf(filename,i) '.tif', ...
                                mais '.tif' sup pas necessaire
17
18 %Create mask
19 sourcefolder=(fullfile(Folder, 'Cropped'));
20 destinationFolder=(fullfile(Folder, 'Mask'));
21     smallOCT=imread([sourcefolder filesep sprintf(filename,i)]); ...
                                %sprintf(filename,i) '.tif'
22     grayoct=mat2gray(smallOCT>150);
23     grayoct=grayoct(:, :, 1);
24     mask=edge(grayoct);
25     imwrite(mask,fullfile (destinationFolder, sprintf(filename,i)));
26 end
27
28 %% Distance first-last lines.If the section is inserted w/in the for ...
    loop above, output number makes no sense...
29

```

```

30 sourcefolder=(fullfile(Folder, 'Mask'));
31 totaldistance=zeros(1,25);
32 totalstd=zeros(1,25);
33 for i=1:size(oneShot,1)
34 mask=imread([sourcefolder filesep sprintf(filename,i)]);
35 distance=computedistanceOG(mask);
36 totaldistance(1,(i+1))= mean(distance);
37 totalstd(1,(i+1))= std(distance);
38 end
39
40 meanthickness=mean(totaldistance);
41 thickness_sd=mean(totalstd);
42 end

```

A.2. Ajustement de la fonction *measurethickness* numéro 1:*measurethicknessadjusted*.

```

1 function [meanthickness,thickness_sd]=measurethicknessadjusted(Folder)
2 Folder=fullfile('C:\Users\elodi\Documents\MATLAB\DATE TIMEPOINT ...
   BATCH\MOUSE#');
3 mkdir(fullfile(Folder, 'Cropped'));
4 mkdir(fullfile(Folder, 'MaskChimera'));
5
6 %% Crop Mouse b-scan & Create Mask
7 oneShot= dir([Folder filesep 'B6*OD...*.tif']); ...
   %Etait onefile= dir([Folder filesep ...
   '*000.tif']);
8
9 for i=1:size(oneShot,1)

```

```

10 myScannedLayer=oneShot(i); ...
                                     %Etait avant ...
    myfile=onefile.name(1:14), mais produisait erreur ->Intermediate dot ...
    '.' indexing produced a comma-separated list with 4 values, but it ...
    must produce a single value when followed by subsequent indexing ...
    operations.
11 filename=append ([sprintf(myScannedLayer.name, '%03d')]); ...
                                     %append: input must be text. -> xyz.name
12
13 %Crop Mouse b-Scan
14 %destinationFolder=(fullfile(Folder, 'Cropped'));
15     %myOCT=imread([Folder filesep sprintf(filename,i)]); ...
                                     %Etait ([Folder filesep sprintf(filename,0) ...
                                     '.tif']);
16     %smalloct=imcrop(myOCT);
17     %imwrite(smalloct,fullfile (destinationFolder, ...
                                     sprintf(filename,i))); %Etait %sprintf(filename,i) '.tif', ...
                                     mais '.tif' sup pas necessaire
18
19 %Create mask
20 sourcefolder=(fullfile(Folder, 'Cropped'));
21 destinationFolder=(fullfile(Folder, 'MaskChimera'));
22     smalloct=imread([sourcefolder filesep sprintf(filename,i)]); ...
                                     %sprintf(filename,i) '.tif'
23     grayoct=mat2gray(smalloct);
24     grayoct=grayoct(:, :, 1);
25     for r=1:size(grayoct,1)/2
26         for c=1:size(grayoct,2)
27             grayoct(r,c)=imadjust(grayoct(r,c));
28         end
29     end
30     masktop=edge(grayoct);
31 %mask bottom

```

```

32     grayoct=mat2gray (smalloct>150);
33     grayoct=grayoct (:, :, 1);
34     mask=edge (grayoct);
35
36     black=false (round (size (grayoct, 1) / 2), size (grayoct, 2));
37     white=true (round (size (grayoct, 1) / 2), size (grayoct, 2));
38     Check=cat (1, black, white);
39
40     myMaskChimera=false (size (smalloct, 1), size (smalloct, 2));
41     for r=1:size (grayoct, 1)                                %loop doesn't work for ...
42         double(mat2gray) or uint8 structures...
43         for c=1:size (grayoct, 2)
44             if Check (r, c)==true
45                 myMaskChimera (r, c)=mask (r, c);
46             else
47                 myMaskChimera (r, c)=masktop (r, c);
48             end
49         end
50     imwrite (mask, fullfile (destinationFolder, sprintf (filename, i))); ...
51         %imwrite (myMaskChimera, 'ChimeraMAsk.tif');
52 end
53 %% Distance between first and last lines ...
54                                     %If this section is inserted ...
55         within the for loop above, output number makes no sense...
56
57 sourcefolder=(fullfile (Folder, 'MaskChimera'));
58 totaldistance=zeros (1, 25);
59 totalstd=zeros (1, 25);
60
61 for i=1:size (oneShot, 1)
62     mask=imread ([sourcefolder filesep sprintf (filename, i)]);

```

```
61 distance=computedistanceOG(mask);
62 totaldistance(1,(i+1))= mean(distance);
63 totalstd(1,(i+1))= std(distance);
64 end
65
66 meanthickness=mean(totaldistance);
67 thickness_sd=mean(totalstd);
68 end
```


Annexe B

L'évaluation du modèle et des traitements

B.1. Données statistiques supplémentaires du modèle murin d'œdème rétinien

NOTA : Les noms de groupe affichés ci-après indiquent le type de traitement que les souris recevront puisque ceux-ci ont été déterminés avant de prendre ces mesures 'pré-traitement'.

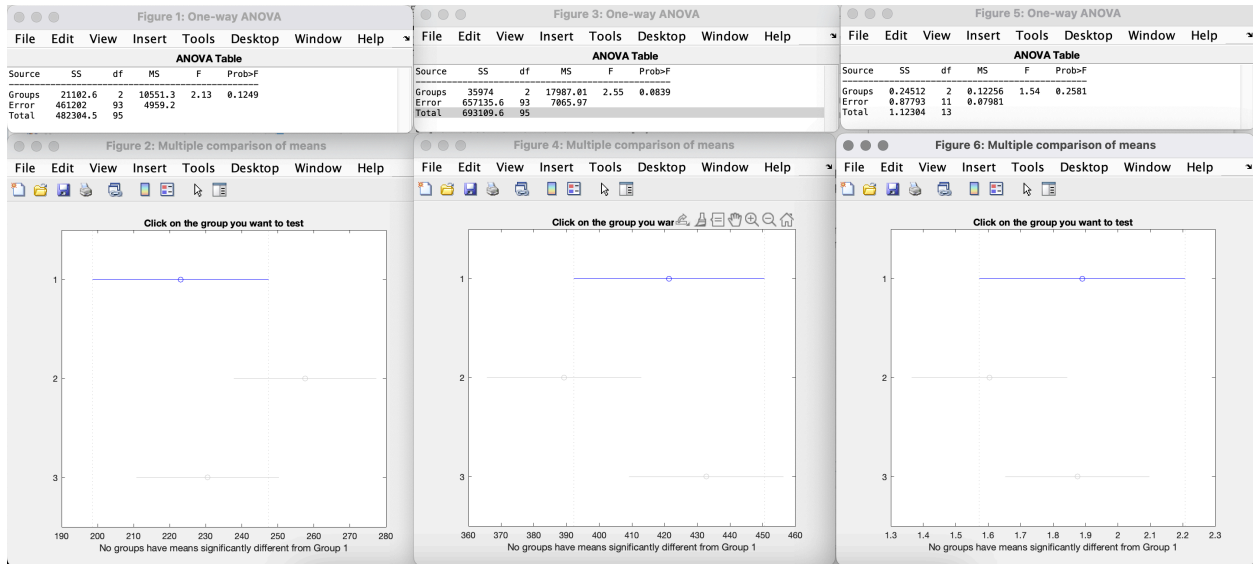


Fig. B.1. Unbalanced ONE-WAY ANOVA avant IVT de la figure 2.2 (A-C). Des souris B6 saines et diabétiques ont été maintenues dans l'obscurité totale pendant plus de huit heures avant d'enregistrer les potentiels visuels en réponse à une intensité lumineuse de 10,0 cd s/m² (avec des pupilles dilatées) à l'aide d'une électrode DTL et de l'appareil COLORDOME (DiagnosysLLC). Avant et entre les sessions, la pièce était faiblement éclairée à la lumière rouge. Expérience réalisée avant l'IVT (A-C) Figures 1 et 2: données de l'a-wave. Figures 3-4: données de la b-wave. Figures 5-6: Données des ratios. Groupe '1': Cit-Tre. Groupe '2': STZ-Veh. Groupe '3':STZ-Tre.

B.2. Données statistiques supplémentaires de l'effet de l'inhibition de l'aquaporine 4

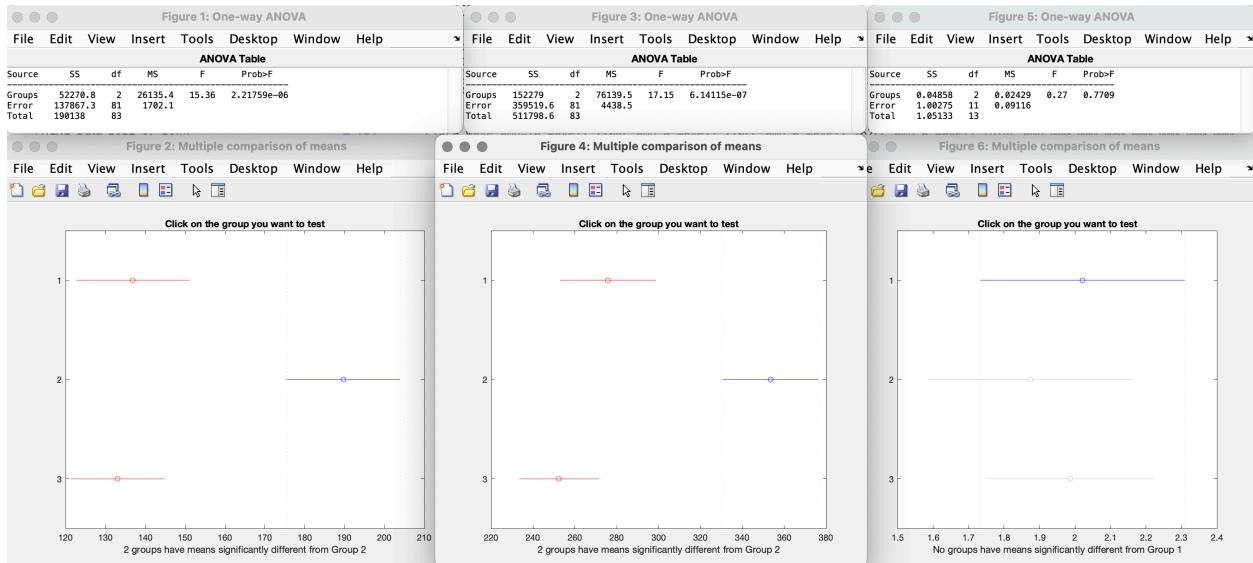


Fig. B.2. Unbalanced ONE-WAY ANOVA suite au traitement de TGN-020 [155 μM] de la figure 2.13 (D-F). Des souris B6 saines et diabétiques ont été maintenues dans l'obscurité totale pendant plus de huit heures avant d'enregistrer les potentiels visuels en réponse à une intensité lumineuse de 10,0 cd s/m² (avec des pupilles dilatées) à l'aide d'une électrode DTL et de l'appareil COLORDOME (DiagnosysLLC). Avant et entre les sessions, la pièce était faiblement éclairée à la lumière rouge. Expérience réalisée 48 heures post-IVT de traitement inhibiteur de l'aquaporine 4, TGN-020 [155 μM] ou de véhicule. Figures 1 et 2: données de l'a-wave. Figures 3-4: données de la b-wave. Figures 5-6: Données des ratios. Groupe '1': Cit-Tra (Citrates-Traitement). Groupe '2': (STZ-Véhicule). Groupe '3': STZ-Tra (STZ-Traitement).

B.3. Données statistiques supplémentaires de l'effet de l'inhibition des aquaporines 1 et 3

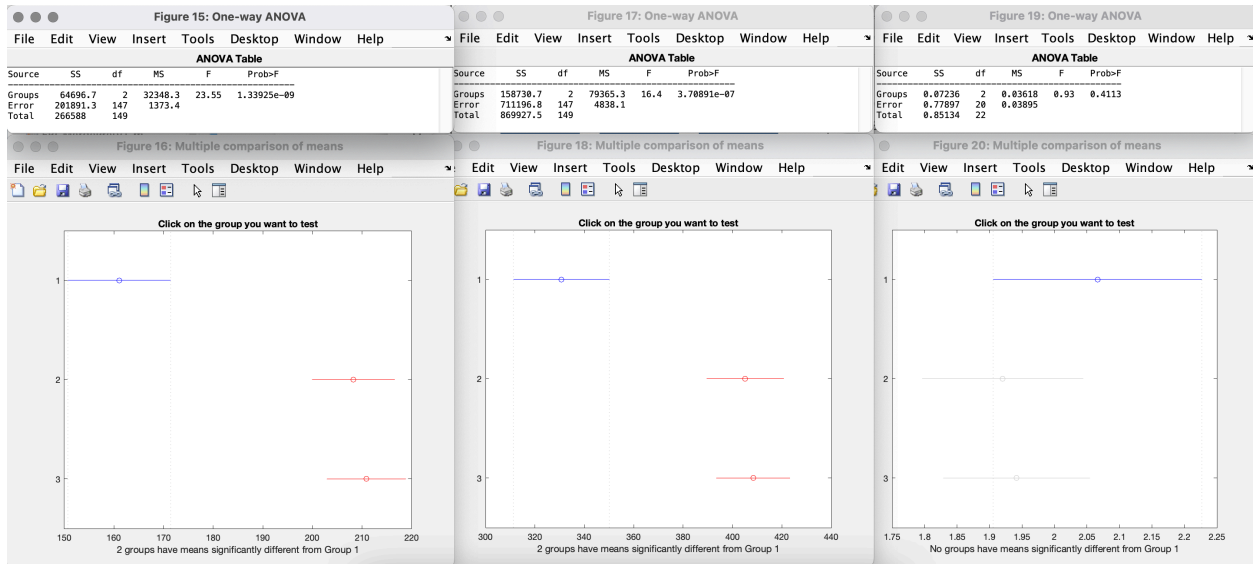


Fig. B.3. Unbalanced ONE-WAY ANOVA suite au traitement d'Acétazolamide et de DFP00173 [155 μ M] de la figure 2.13. (A-C) Des souris B6 saines et diabétiques ont été maintenues dans l'obscurité totale pendant plus de huit heures avant d'enregistrer les potentiels visuels en réponse à une intensité lumineuse de 10,0 cd s/m² (avec des pupilles dilatées) à l'aide d'une électrode DTL et de l'appareil COLORDOME (DiagnosysLLC). Avant et entre les sessions, la pièce était faiblement éclairée à la lumière rouge. Expérience réalisée 48 heures post-IVT de traitement inhibiteur de l'aquaporine 4, TGN-020 [155 μ M] ou de véhicule. Figures 15 et 16: données de l'a-wave. Figures 17-18: données de la b-wave. Figures 19-20: Groupe '1': Cit-Tra (Citrates-Traitement). Groupe '2': (STZ-Véhicule). Groupe '3':STZ-Tra (STZ-Traitement).

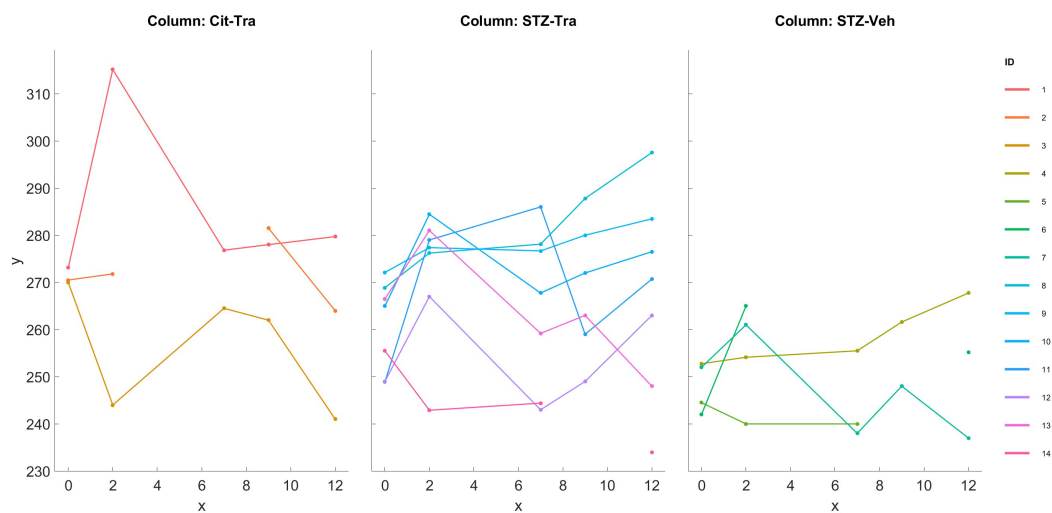


Fig. B.4. Quantification longitudinale de l'épaisseur du segment postérieur - AQP1&3 inhibées Des souris contrôles (Cit) et diabétiques (STZ) pendant au moins 9 semaines reçoivent des injections intravitréennes de véhicule (Veh) ou de xénobiotiques (Tra): Acétazolamide [IC50*100] DFP00173 [IC50*100] au jour D01. Parallèlement, leur segment postérieur est examiné via l'OCT à plusieurs moments prédéfinis. Finalement, l'algorithme mis sur pied (Figure 2.9) est utilisé pour extraire l'épaisseur, sous forme de microns, des images d'OCT. Chaque trajectoire correspond à un oeil. *Deux techniques d'injections intravitréennes ont été utilisées. N:2 'n':un oeil.

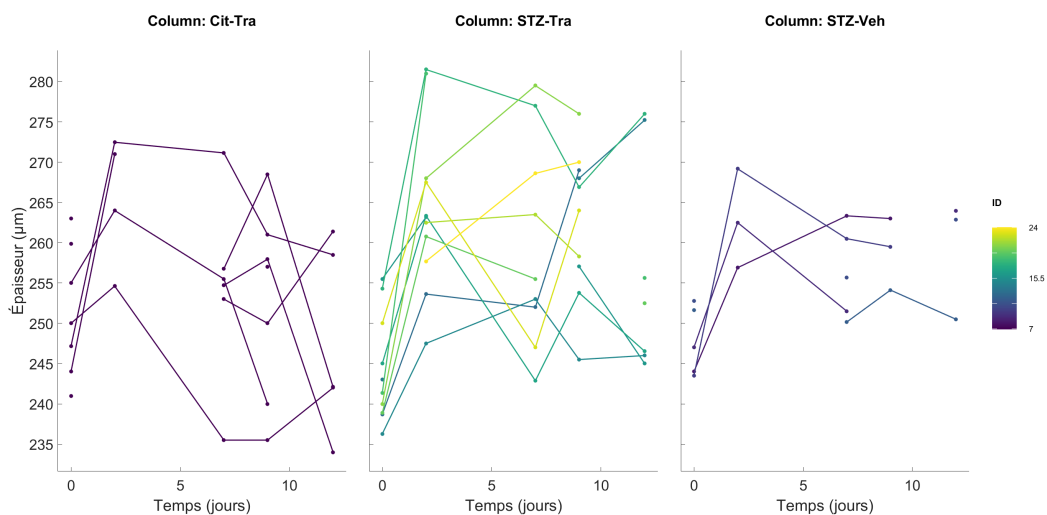


Fig. B.5. Quantification longitudinale de l'épaisseur du segment postérieur - AQP13 inhibées et addition de VEGF165. Des souris contrôles (Cit) et diabétiques (STZ) pendant au moins 9 semaines reçoivent des injections intravitréennes de véhicule (Veh) ou de xénobiotiques (Tra) : Acétazolamide [IC50*100] DFP00173 [IC50*100] (47; 110; 2) ainsi que du facteur de croissance endothélial VEGF [15nM] au jour D01. Parallèlement, leur segment postérieur est examiné via l'OCT à plusieurs moments prédéfinis. Finalement, l'algorithme mis sur pied (Figure 2.9) est utilisé pour extraire l'épaisseur, sous forme de microns, des images d'OCT. Chaque trajectoire correspond à un œil. N:3 'n':un œil.

B.4. Optimisation de culture primaire d'ÉPR

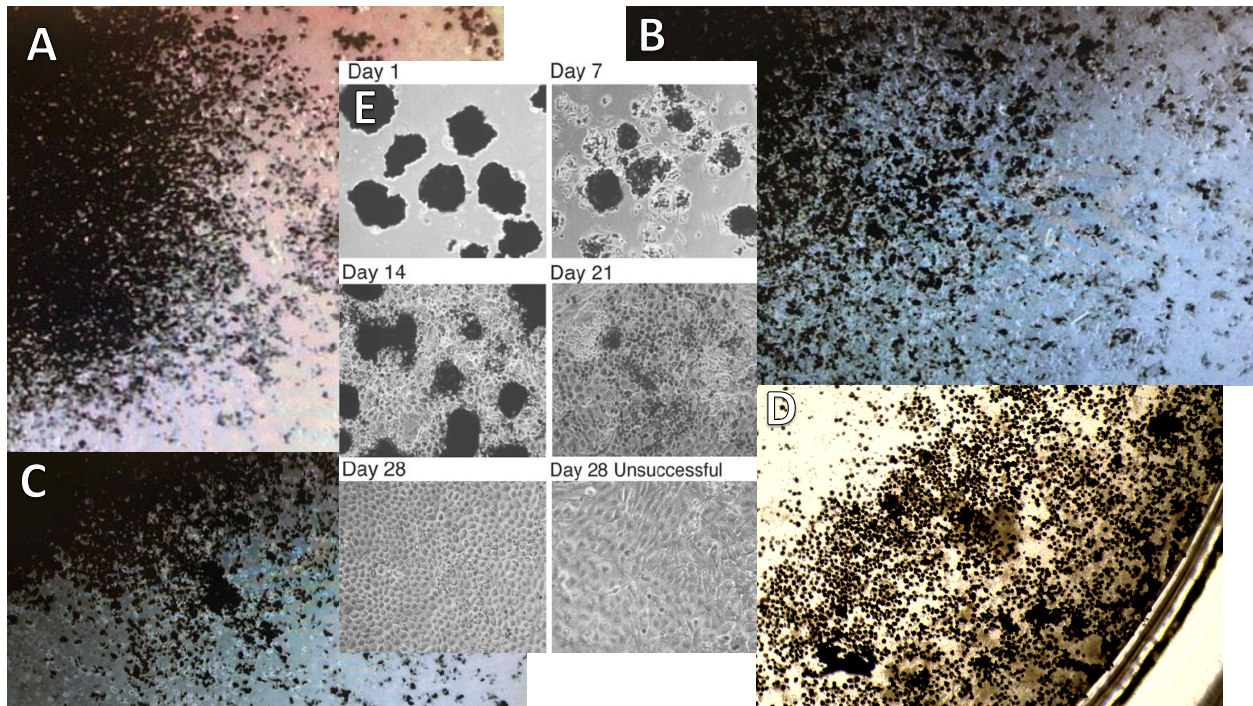


Fig. B.6. L'évolution de culture primaire d'ÉPR primaire murin stagne avant la confluence complète. La cornée de souris C57BL/6J adultes (4-6 semaines) est excisée jusqu'à l'ora serrata; le vitré puis la rétine neurale sont enlevés avant de digérer l'ÉPR avec d'hyaluronidase [1 mg/mL] puis avec de la Trypsine [0.5%*m/v*]. L'étape de digestion à la trypsine sera ultérieurement remplacée par le décollement de l'ÉPR via un lavage au PBS à température pièce. L'ÉPR est aspiré et resuspendu dans du DMEM-FBS20% avant d'être ensemencé. Les cultures ne seront pas manipulées durant les premières soixante-douze (72) heures. (A-C) La progression des cultures primaires stagne entre la progression de référence de 7-14 jours. D) Le même phénomène survient sur un Transwell E) Référence : Figure 3, Belkinsop et al., 2013 (15)

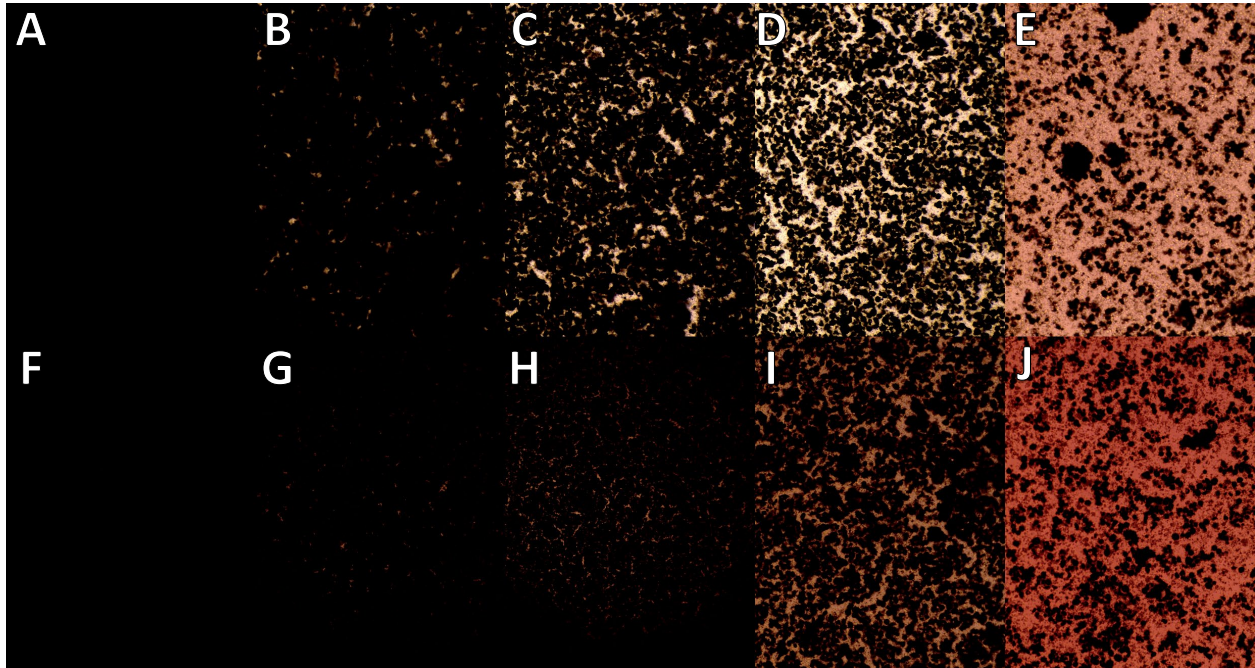


Fig. B.7. La densité d'ensemencement idéale pour l'ÉPR de porc primaire est de [64 kc/cm²-128 kc/cm²] sur une surface non poreuse. Des yeux de jeunes porcs (5-6 mois) fraîchement abattus (<3 heures) sont nettoyés et désinfectés avec des lavages en série (Dexidin 2 Solution (Laboratoire ATLAS Inc, #02238982), Dexidin 4 Solution (Laboratoire ATLAS Inc, #00832111)) avant d'exciser la cornée jusqu'à l'ora serata; le vitré puis la rétine neurale sont enlevés avant de digérer l'ÉPR avec d'hyaluronidase [1 mg/mL] puis avec de la Trypsine [0.5%*m/v*]. L'ÉPR est aspiré et re-suspendu dans du DMEM-FBS20% avant d'être ensemencé. (A-E):3 jours post ensemencement. (F-J): 6 jours ensemencement. (A;F)16 kc/cm² (B;G)32 kc/cm² (C-H)64 kc/cm² (D;I)128 kc/cm² (E;J)256 kc/cm²

B.5. Données additionnelles de la caractérisation de la sénescence de cellules ARPE-19: qPCR

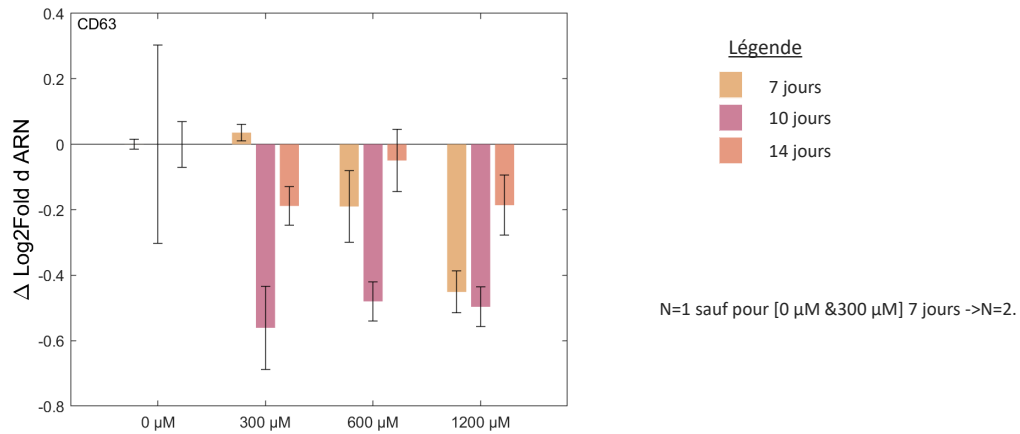


Fig. B.8. CD63. Quantification d'ARNm du gène CD63, afin d'établir la courbe dose-temps d'H₂O₂ efficace pour l'induction de la sénescence de l'ÉPR. Normalisé avec l'ARNm des gènes PPIA et GUSB. N: nombre de réplicats expérimentaux.

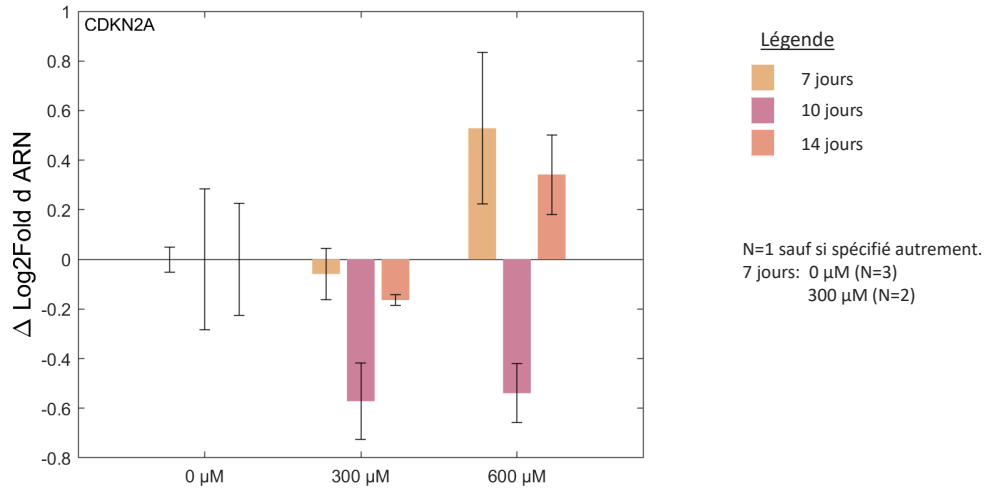


Fig. B.9. CDKN2A. Quantification d'ARNm du gène CDKN2A, afin d'établir la courbe dose-temps d'H₂O₂ efficace pour l'induction de la sénescence de l'ÉPR. Normalisé avec l'ARNm des gènes PPIA et GUSB. N: nombre de réplicats expérimentaux.

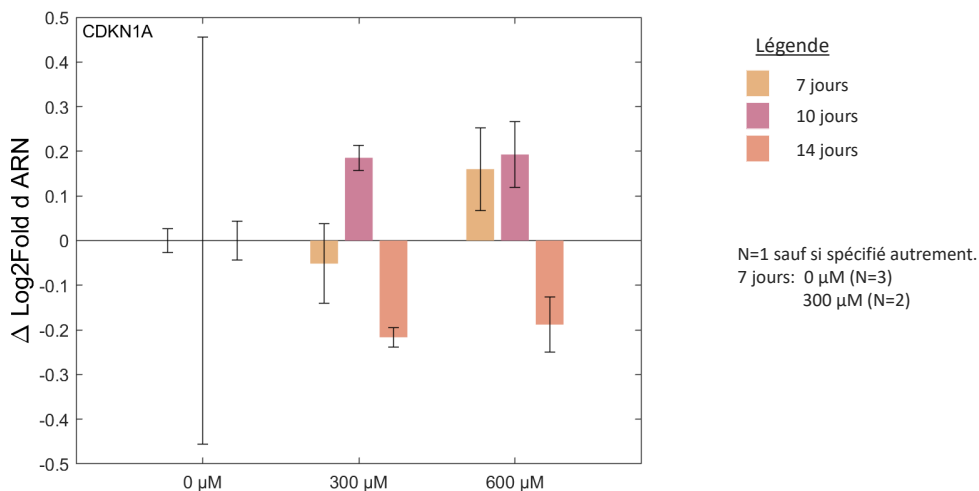


Fig. B.10. CDKN1A. Quantification d'ARNm du gène CDKN1A, afin d'établir la courbe dose-temps d'H₂O₂ efficace pour l'induction de la sénescence de l'ÉPR. Normalisé avec l'ARNm des gènes PPIA et GUSB. N: nombre de réplicats expérimentaux.

Annexe C

Amorces

Tableau C.1. Liste des amorces

Gène	Amorce sens	Amorce anti-sens
AQP1	TGG ACA CCT CCT GGC TAT TG	AAT GGC CCC ACC CAG AAA AT
AQP3	ACC AGC TTT TTG TTT CGG GC	GGC TGT GCC TAT GAA CTG GT
AQP4	TAC TGG TGC CAG CAT GAA TC	GGC CCA ACC CAA TAT ATC CAA
AQP9	CTG AGG GAG CAG AAA AGG GA	GCC ACA TCC AAG GAC AAT CA
CD63	TGA TGT TCC CTG TCC TCT GG	ACC AAC ACC TTC GCA AAG TC
GUSB	AGC CAG TTC CTC ATC AAT GG	GGT AGT GGC TGG TAC GGA AA
LMNB1	CCA GCT GCT CCT CAA CTA TG	AAG TGC AGT AGC AAG AGC TG
CDKN2A	CCG GGG TCG GGT AGA GGA	GCC TCC GAC CGT AAC TAT TCG
CDKN1A	GCT GGT GGC TAT TTT GTC CT	CAT GGG TTC TGA CGG ACA TC
PMEL17	ACC AGA TAC TGA AGG GTG GC	ACA GGC ATG ATA AGC TGG GT
PPIA	AGA CAA GGT CCC AAA GAC	ACC ACC CTG ACA CAT AAA
Rab27a	CCT TCC TGA AGA GGA CAT GTG A	ACA GGG TAG AGA ACC GCT TG
VEGFa	GCA CAA CAA ATG TGA ATG CAG AC	ATA CCG GGA TTT CTT GCG CT