

Université de Montréal

**L'impact des cellules souches issues de la moelle sur la
néovascularisation dans un modèle de souris de
rétinopathie induite par l'oxygène**

par

Martine Blais

Sciences biomédicales

Médecine

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

Août, 2011

© Martine Blais, 2011

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

L'impact des cellules souches issues de la moelle sur la néovascularisation dans un
modèle de souris de rétinopathie induite par l'oxygène

Présenté par :
Martine Blais

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Denis-Claude Roy, président-rapporteur
Dr. Sylvain Chemtob, directeur de recherche
Dr. Jean-François Bouchard, membre du jury

Résumé

La rétinopathie induite par l'oxygène (RIO) est un modèle animal semblable aux rétinopathies vue chez l'homme. Dans ce modèle, une destruction des microvaisseaux rétiniens est suivie d'une néovascularisation pathologique qui chez l'homme peut mener à un détachement de la rétine et subséquemment une perte de vision. Afin de remédier à cette revascularisation anarchique, un traitement de cellules souches (hématopoïétiques et mésenchymateuses) a été effectué chez des souris soumises à ce modèle. Les cellules injectées ont pu migrer à la rétine et induire une revascularisation saine (surtout les cellules souches mésenchymateuses). L'injection du milieu de culture de ces cellules induit aussi une revascularisation semblable à celle vue chez les souris traitées avec les cellules indiquant que l'effet thérapeutique des cellules semble être accompli par l'entremise de facteurs paracrines. Ces résultats suggèrent que ces cellules peuvent jouer un rôle au niveau de l'angiogénèse et indiquent un potentiel thérapeutique pour les rétinopathies.

Mots-clés : cellules souches, cellules mésenchymateuses, cellules souches hématopoïétiques, néovascularisation, rétinopathie du prématuré, angiogénèse, inflammation, ischémie, rétinopathie induite par l'oxygène

Abstract

Oxygen induced retinopathy (OIR) is an animal model that mimics the developing phases of retinopathies seen in humans such as diabetic retinopathy and retinopathy of prematurity. An initial destruction of retinal microvasculature is followed by pathological neovascularization that can lead to retinal detachment in humans and therefore blindness. Utilizing bone marrow derived stem cells (mesenchymal and hematopoietic), we aimed to repopulate the retina with normal vessels which are affected in the OIR model. Cells injected into the vitreous migrated to the retina and reduced both the area of vasoobliteration and neovascularization. Injection of conditioned cell medium also induced proper vascular repair similar to that seen in mice injected with cells indicating that the cells therapeutic effect is achieved through paracrine action. These results suggest that bone marrow stem cells play a role in angiogenesis and could be a potential therapeutic aid in treating retinopathies.

Keywords : stem cells, mesenchymal stem cells, hematopoietic stem cells, neovascularisation, retinopathy of prematurity, angiogenesis, inflammation, ischemia, oxygen induced retinopathy

Table des matières

Introduction	8
1. La vision et les rétinopathies	8
1.1 La rétine	8
1.2 Rétinopathie de prolifération	14
1.3. Rétinopathie du prématuré	18
1.4 Rétinopathie induite par l'oxygène – Modèle animal	23
2. Les cellules souches	25
2.1 Concepts de base des cellules souches	26
2.2 Rôles et effets des traitements de cellules souches	36
2.3. Les cellules souches issues de la moelle	41
2.4. Effet des HSCs et MSCs sur les rétinopathies	46
Matériels et Méthodes	47
Résultats	56
Discussion	71
Conclusion	76
Bibliographie	i

Liste des tableaux

Tableau 1. <i>Types de cellules souches étudiés en vision</i>	33
---	----

Liste des figures

Figure 1. <i>Structure de l'œil</i>	10
Figure 2. <i>Facteurs pro- et anti-angiogéniques</i>	17
Figure 3. <i>La rétinopathie du prématuré</i>	20
Figure 4. <i>Le modèle de RIO</i>	25
Figure 5. <i>Division cellulaire de cellules souches</i>	27
Figure 6. <i>Potentiel de différenciation des cellules</i>	28
Figure 7. <i>Sources de cellules souches</i>	29
Figure 8. <i>Cellules de la moelle</i>	31
Figure 9. <i>Méthode d'isolation des cellules souches de la moelle osseuse</i>	49
Figure 10. <i>Expression de marqueurs HSC</i>	57
Figure 11. <i>CFU-F Assay</i>	59
Figure 12. <i>Différenciation des MSCs</i>	60
Figure 13. <i>Migration des cellules à la rétine interne</i>	61
Figure 14. <i>Migration des cellules vers la vasculature</i>	62
Figure 15. <i>Injection de cellules souches dans le modèle de RIO</i>	65
Figure 16. <i>Effet des MSCs et de leu MdC sur la croissance aortique</i>	66
Figure 17. <i>Injection de MdC dans le modèle de RIO</i>	68
Figure 18. <i>Effet paracrine des MSCs sur la rétine centrale avasculaire</i>	69

*En l'honneur de l'individu qui saura
rendre cet œuvre utile à l'humanité*

Remerciements

Ces travaux ont été réalisés grâce à l'aide, au support et à l'encouragement de certaines personnes que je tiens à remercier. Tout d'abord un grand merci au laboratoire Chemtob, un groupe d'étudiants et de professionnels exceptionnels qui forment une équipe splendide. Votre aide, votre générosité et vos connaissances m'ont été indispensables lors de ma maîtrise. Je serai infiniment reconnaissante de la sagesse, de la sympathie et de l'aide qui m'est venue du Dr. Carlos Rivera, un chercheur savant et sympathique. J'aimerais aussi remercier M. Ankush Madaan pour sa collaboration à mon projet. Je souhaite souligner le laboratoire Sapiiha. Le Dr. Sapiiha et son équipe sont de merveilleux collaborateurs avec qui l'entraide et l'agrément étaient toujours présent.

Au Dr. Sylvain Chemtob, je vous offre mon entière reconnaissance pour le rôle essentiel que vous avez joué dans le développement de mon projet. Merci pour m'avoir si bien accueilli dans votre équipe, de m'avoir enseigné, de m'avoir ouvert les yeux aux multiples possibilités de la science. Grâce à l'expérience que j'ai vécue sous votre supervision, j'ai pu développer ma pensée critique et mon raisonnement scientifique.

Enfin, je tiens aussi à remercier ma famille et mes amis pour leur support moral. Plus spécifiquement j'aimerais noter mon appréciation particulière pour le support continu de mes parents qui m'ont inspiré confiance et détermination. À mon oncle Lucien Dufresne et ma tante Claudette Landry, j'aimerais leur remercier pour avoir été mon nid familial ici à Montréal durant ce séjour. Votre amour, encouragement et compagnie sympathique m'ont permis de vivre une expérience des plus positives.

Introduction

« L’œil... Tout l’univers est en lui, puisqu’il voit, puisqu’il reflète » ¹. L’écrivain français, comme nous tous, reconnaissait le rôle primordial que joue la vision dans nos vies. Imaginez le plus beau moment de votre vie, votre endroit favori au monde, les personnes qui vous tiennent à cœur. Vous allez alors vous apercevoir combien nous sommes non seulement dépendants de la vision mais comment ce sens enrichit nos vies. C’est pourquoi la recherche en vision est un domaine de recherche indispensable. Selon un rapport produit par la National Coalition for Vision Health en 2007, le coût annuel qu’impose la perte de vision au Canada est 7.9 milliards de dollars. Si on considère aussi l’impact indirect de la cécité sur la société via le chômage et autres subventions ou pertes de productivité, ce montant grimpe à 15.8\$ milliards ². La rétinopathie du prématuré est la cause principale de cécité chez les enfants. Cette pathologie, qui atteint les bébés prématurés, mène souvent à la myopie, à la réduction de la vision périphérique puis parfois la cécité. Présentement, les traitements utilisés en clinique sont des techniques invasives qui arrêtent la progression de la pathologie mais ne favorisent pas une revascularisation saine ³. Dans le but de remédier à cette carence, nous avons évalué le potentiel thérapeutique des cellules souches issues de la moelle dans un modèle animal de rétinopathie.

1. La vision et les rétinopathies

1.1 La rétine

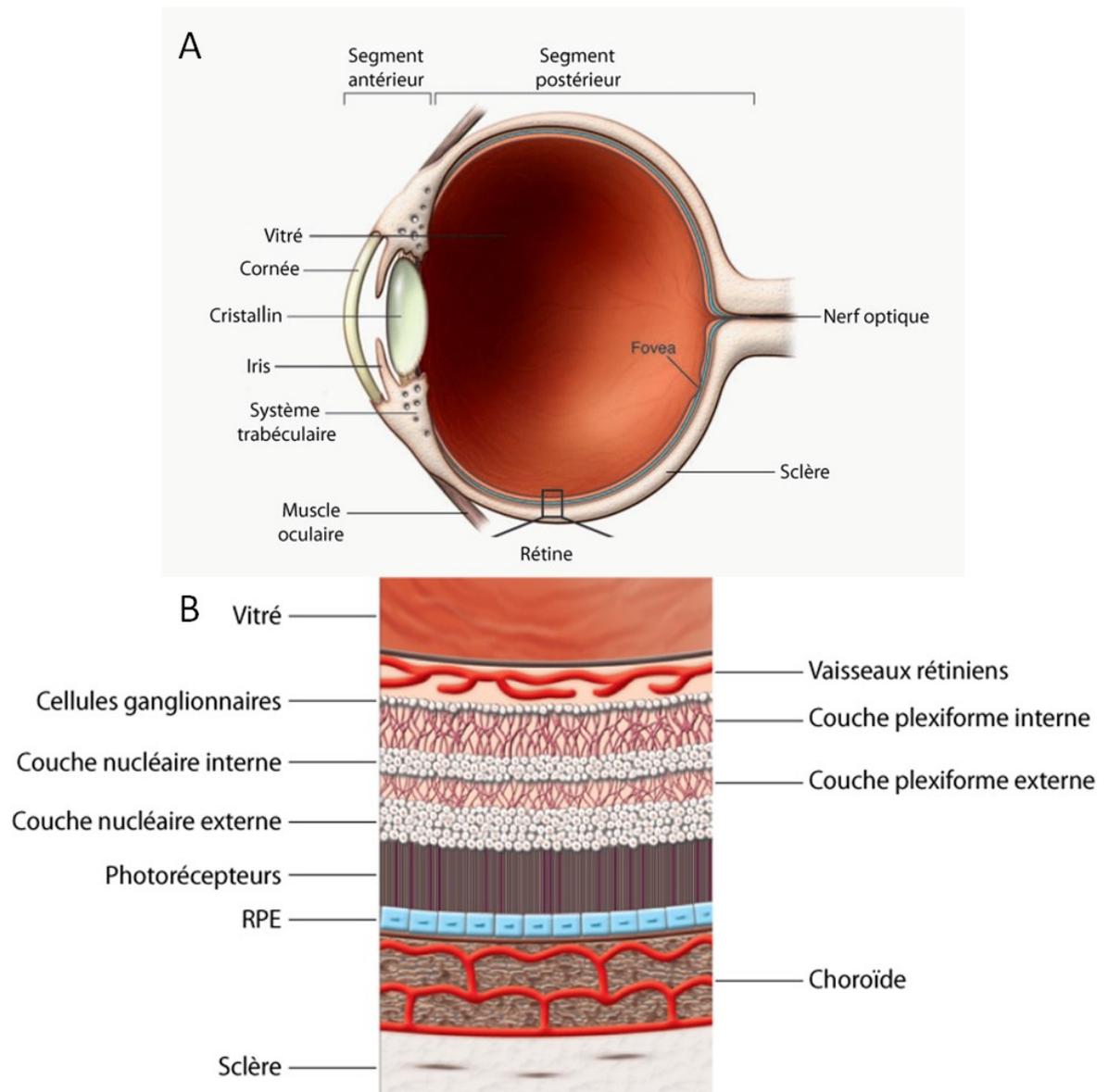
1.1.1 Anatomie et physiologie de l’œil

L’œil est un organe spécialisé et complexe qui nous permet de former une image congruente à partir de plusieurs petites unités d’information, appelées photons. Afin d’accomplir toutes les étapes de transduction de photons en image, l’œil comprend plusieurs structures (**fig. 1 A**). Les photons commencent par passer par la cornée, une surface protectrice qui réfracte la lumière de façon majeure et préliminaire. La lumière

passé ensuite par le cristallin dont l'aire de sa surface est régulée par l'iris, un tissu dynamique qui se contracte selon le niveau de luminosité. Le cristallin est le réfracteur de précision qui permet aux photons de rencontrer la rétine à la bonne profondeur formant une image claire. Ces structures forment le segment antérieur de l'œil. La lumière passe ensuite par l'humeur vitré, un matériel viscoélastique permettant d'absorber les chocs et protéger la rétine. L'humeur vitré est surtout composée d'eau, de collagène et d'acide hyaluronique puis joue aussi le rôle d'échafaud pour les cellules gliales et endothéliales qui migrent vers la rétine ou vers ce dernier. Les photons terminent sur la rétine, un tissu hypervasculaire à fonctions multiples. La rétine et l'humeur vitré forment le segment postérieur de l'œil ⁴. L'œil comprend aussi d'autres structures annexes tels que la sclère, les corps ciliaires, le nerf optique, la glande lacrimale et les muscles oculaires mais la rétine est le tissu le plus essentiel à la vision ⁵.

1.1.2 Anatomie et physiologie de la rétine

Plus spécifiquement, la rétine est un tissu spécialisé composé de plusieurs couches de divers types cellulaires ainsi que des couches de vascularisation (**fig. 1 B**). La rétine est subdivisée en deux sections : la rétine interne et la rétine externe. La rétine interne comprend une couche de fibres nerveuses, une couche de cellules ganglionnaires, une couche plexiforme et une couche nucléaire. La rétine externe comprend une couche plexiforme, une couche nucléaire, ainsi que les segments internes et externes des photorécepteurs. La rétine repose sur l'épithélium rétinien pigmenté qui sert de rideau noir absorbant les photons et empêchant leur réfléchissement ⁵. Ces multiples couches comprennent des cellules neuronales, gliales et vasculaires qui forment un réseau complexe semblable à l'organisation du système nerveux central dont la rétine en est le prolongement ⁶.



4

Figure 1. *Structure de l'œil*. L'œil comprend 2 segments: antérieur et postérieur. Dans le segment postérieur on retrouve la rétine, un tissu spécialisé hypervasculaire, qui permet la transduction de photons en message électro-chimique. La rétine comprend des cellules neuronales, des cellules gliales ainsi des réseaux de vaisseaux sanguins dans multiples couches organisées.

Les cellules neuronales telles que les cônes, les bâtonnets, les cellules bipolaires, les cellules ganglionnaires, les cellules amacrines et les cellules horizontales permettent la transduction et la modulation des influx nerveux qui constituent la vision. Un photon est transmis via une réaction chimique avec le rétinol dans les photorécepteurs qui est ensuite transmis par message électrochimique aux cellules bipolaires. Cet influx nerveux est acheminé aux cellules ganglionnaires qui elles acheminent le message au niveau central via le nerf optique. Les cellules amacrines et horizontales jouent plutôt un rôle dans la modulation de ces messages ⁵.

La rétine contient aussi des cellules gliales. Les astrocytes et les cellules de Müller, cellules uniques à la rétine, sont les deux types de macroglies présents dans la rétine ⁴. Les cellules de Müller permettent le maintien de l'homéostasie ionique et des neurotransmetteurs ⁷. Les astrocytes jouent aussi un rôle au niveau de l'homéostasie, mais leur fonction principale est le guidage de la formation du lit vasculaire lors du développement ⁸. Les microglies sont aussi des cellules gliales de la rétine. Celles-ci sont les cellules immunitaires résidentes de la rétine. Les microglies ressemblent aux macrophages en ce qui concerne la fonction ; ce sont des cellules phagocytaires qui relâchent plusieurs cytokines, radicaux libres et enzymes ⁹. Enfin, il y a aussi les cellules vasculaires qui font partie de la rétine ¹⁰. La diversité de cellules au niveau de la rétine est immense. Si l'on considère les sous-types cellulaires, la rétine contient plus de cinquante sortes de cellules différentes ¹¹.

1.1.3 Anatomie et physiologie de la vasculature rétinienne

Due à une demande élevée en oxygène, la rétine est le tissu le plus vascularisé du corps humain ⁶. La rétine est irriguée par deux sources vasculaires différentes. La rétine externe est desservie par les vaisseaux choroïdiens alors que les nutriments de la rétine interne proviennent du réseau vasculaire superficiel de l'artère ophtalmique qui entre par le nerf optique (**fig. 1 B**) ⁵. La vasculature rétinienne comprend les cellules endothéliales et les péricytes; elles n'ont pas de cellules musculaires lisses car celles-ci

ne sont pas présentes dans la microvasculature. Les cellules endothéliales forment l'intima du vaisseau et assurent son étanchéité¹². Les péricytes sont agencés à la membrane basale des cellules endothéliales permettant ainsi une communication et association entre ces deux types cellulaires. Cette interaction est ce qui permet aux péricytes de réguler le flux sanguin, la stabilité, la perméabilité et la différenciation des cellules endothéliales¹³.

Le tissu de l'œil a évolué pour devenir un tissu immuno-privilegié. Grâce à la barrière hémato-rétinienne (BHR) puis à un milieu intraoculaire anti-inflammatoire, la rétine peut minimiser les réponses immunitaires dans l'œil, et conséquemment diminuer le dommage à la structure rétinienne¹⁴. La BHR est un homologue de la barrière hémato-encéphalique (BHE) qui est présente au niveau du système nerveux central. Ces deux barrières empêchent l'entrée de molécules provenant de la circulation périphérique tels que des contaminants, drogues ou toxines afin de permettre le fonctionnement approprié de ces deux systèmes¹⁵. Cependant, le privilège dans la rétine n'est que partiel car il y a tout de même une réaction inflammatoire accrue lorsqu'il y a un irritant ou de l'hypoxie dans l'œil⁴. Les cellules gliales sont une partie intégrante de la BHR. Plus spécifiquement, les prolongements d'astrocytes entourent les vaisseaux dans le plexus interne alors que les prolongements des cellules de Muller forment la barrière sur les vaisseaux du plexus externe¹⁰. Cela met en évidence l'étendue des liens entre les divers types cellulaires et couches rétiniennes permettant ainsi une homéostasie et communication continue entre ces cellules⁴. D'infimes changements au niveau de cette organisation étanche peut mener à une perte d'acuité visuelle ou même à la cécité⁶. Cette relation joue un rôle primordial lors du développement.

1.1.4 Développement vasculaire rétinien

La vascularisation des tissus est essentielle au développement, en permettant l'accès à l'oxygène et aux nutriments, de même que l'élimination des déchets métaboliques. Le développement rétinien est donc relié de très près au développement

vasculaire. La demande métabolique, plus spécifiquement l'oxygène, régule la formation de nouveaux vaisseaux¹⁶. Il y a deux mécanismes qui mènent à la formation de nouveaux vaisseaux : la vasculogénèse et l'angiogénèse. Lors de la vasculogénèse, les nouveaux vaisseaux sont formés à partir de cellules vasculaires progénitrices qui se différencient et s'accumulent pour former un tube endothélial précoce. Au contraire, l'angiogénèse se fait à partir de vaisseaux matures via la migration de cellules endothéliales existantes. Ces deux processus prennent place lors du développement ainsi qu'en conditions pathologiques¹⁰.

Lors du développement du fœtus, les cellules neuronales migrent à partir du nerf optique vers la périphérie. Leur activité métabolique nécessite des nutriments. C'est alors que les astrocytes activés forment un réseau sur lequel les cellules endothéliales vont migrer permettant ainsi la formation d'un réseau de vaisseaux superficiels⁴. Chez l'homme, durant la 16^{ième} semaine de gestation, la vascularisation débute au centre de la rétine où se trouve le nerf optique et s'étend vers la périphérie. C'est seulement à quarante semaines, que le réseau vasculaire devient mature¹⁷. La première étape se fait par vasculogénèse et crée le plexus interne dans la rétine centrale humaine. Ensuite, l'angiogénèse prend la relève puis crée le restant des vaisseaux de la rétine périphérique, augmentant ainsi la densité vasculaire centrale et pour développer le plexus externe. Contrairement à la vasculogénèse, l'angiogénèse est induite par un niveau d'hypoxie physiologique transitoire due à l'augmentation de l'activité métabolique des neurones rétinienens lorsqu'ils se différencient et deviennent fonctionnels¹⁰. Ce manque d'oxygène local cause une augmentation de production du facteur 1 induit par l'hypoxie (HIF-1), ce qui provoque une augmentation du facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) par les astrocytes de la rétine interne et des cellules de Müller de la rétine externe. Au contraire, la vasculogénèse est indépendante des niveaux de HIF1 et VEGF. Avec le développement de nouveaux vaisseaux, et l'apport d'oxygène supplémentaire, il y a une diminution de l'expression de VEGF par les cellules gliales. Il y a donc une communication cellulaire très complexe lors du développement puisque la vasculature

influence le développement neuronal et à leur tour, les cellules neuronales affectent le développement vasculaire ¹⁸.

1.2 Rétinopathie de prolifération

Les rétinopathies de prolifération sont des maladies oculaires d'origine vasoproliférative. La croissance vasculaire excessive et pathologique est la cause principale de ces pathologies. Cette néovascularisation peut mener au détachement de la rétine ainsi qu'à la cécité. Plus spécifiquement, la rétinopathie du prématuré (ROP) et la rétinopathie diabétique, deux exemples de rétinopathie de prolifération, sont les deux principales causes de cécité chez les cinquante ans et moins dans les pays industrialisés ¹⁹.

1.2.1 L'hypoxie

Dans les rétinopathies de prolifération, la néovascularisation a lieu suite à une hypoxie rétinienne. Chez les patients diabétiques, l'hyperglycémie engendre une dégénérescence vasculaire qui mène à un manque d'oxygène dans la rétine ²⁰. Chez les bébés prématurés, plusieurs facteurs développementaux combinés à des traitements d'oxygène causent une oblitération vasculaire ¹⁹.

Les humains, tout comme les rongeurs, ont des mécanismes qui leur permettent de percevoir le niveau d'oxygène afin de s'adapter rapidement à l'hypoxie : l'augmentation de la respiration, et du flux sanguin sont des réponses de survie. Lorsque ce manque d'oxygène persiste, des mécanismes additionnels doivent prendre la relève pour que le corps puisse s'adapter à cette hypoxie. Ces mécanismes dépendent sur les prolyl hydroxylases (PHDs), senseurs d'oxygène. En normoxie, ces derniers hydroxylent les prolines dans la sous-unité alpha de HIF créant une liaison avec la protéine von Hippel-Lindau (VHL). Cette liaison avec VHL, une protéine faisant partie du complexe E3 ubiquitine ligase, mène à la destruction de HIF-1 α par les protéosomes. En hypoxie, HIF α ne peut être hydroxylé par les PHDs, ce qui produit une sous-unité

HIF α stable. Elle est alors transportée dans le noyau où elle se lie à la sous-unité beta. Le complexe HIF-1 est ainsi formé et peut induire la transcription de gènes cibles tels que le VEGF, l'EPO, le facteur de transcription nucléaire κ B (NF- κ B) et les récepteurs de type Toll (TLR) ²¹.

Alors, suite à ce manque d'oxygène, HIF-1 induit une sécrétion des facteurs de croissance chez les cellules gliales et neuronales de la rétine ce qui permet la néovascularisation ²⁰.

1.2.1 La néovascularisation

Cette formation de nouveaux vaisseaux, appelée néovascularisation, se fait principalement par angiogénèse chez l'humain post-embryonnaire. L'angiogénèse comprend une prolifération et une migration de cellules endothéliales suite à une induction de VEGF. Le VEGF est un facteur proangiogénique qui comporte cinq isoformes, dont le VEGF165, le plus abondant et actif chez l'être humain. Cette protéine se lie à deux différents récepteurs : Flk-1 (VEGFR-2) et le Flt-1 (VEGFR-1), récepteurs exprimés par la majorité des cellules endothéliales vasculaires ²². Cette libération de VEGF suffit pour induire des embranchements à partir de cellules endothéliales déjà présentes dans la vasculature. Ces embranchements sont soumis à une réorganisation structurale, formant un tube endothélial primitif. Ensuite, il y a recrutement de cellules murales, soit des péricytes ou des cellules musculaires lisses, qui eux déclenchent la maturation et la stabilité du nouveau vaisseau ¹³.

Au départ, la communauté scientifique croyait que la vasculogénèse se produisait seulement durant le développement embryonnaire mais c'est maintenant évident que celle-ci joue aussi un rôle crucial dans la néovascularisation post-natale ¹³. Récemment, il a été démontré que des cellules progénitrices circulantes d'origine hématopoïétique contribuent à la néovascularisation par vasculogénèse. Ces cellules, qui ressemblent à des hémangioblastes, résident dans la moelle et entrent en circulation en réponse à une insulte hypoxique, à des cytokines spécifiques ou à l'inoculation de tumeur ²³.

La néovascularisation est régulée non seulement par le VEGF mais aussi par plusieurs autres facteurs pro-angiogéniques ainsi qu'anti-angiogéniques (**fig. 2**). L'équilibre entre ces promoteurs et suppresseurs de l'angiogénèse contrôle de façon serrée la mise en marche de l'angiogénèse. Parfois, cet équilibre s'ajuste mal selon les conditions menant à des formations pathologiques tels que l'on voit dans les rétinopathies de prolifération ¹⁸.

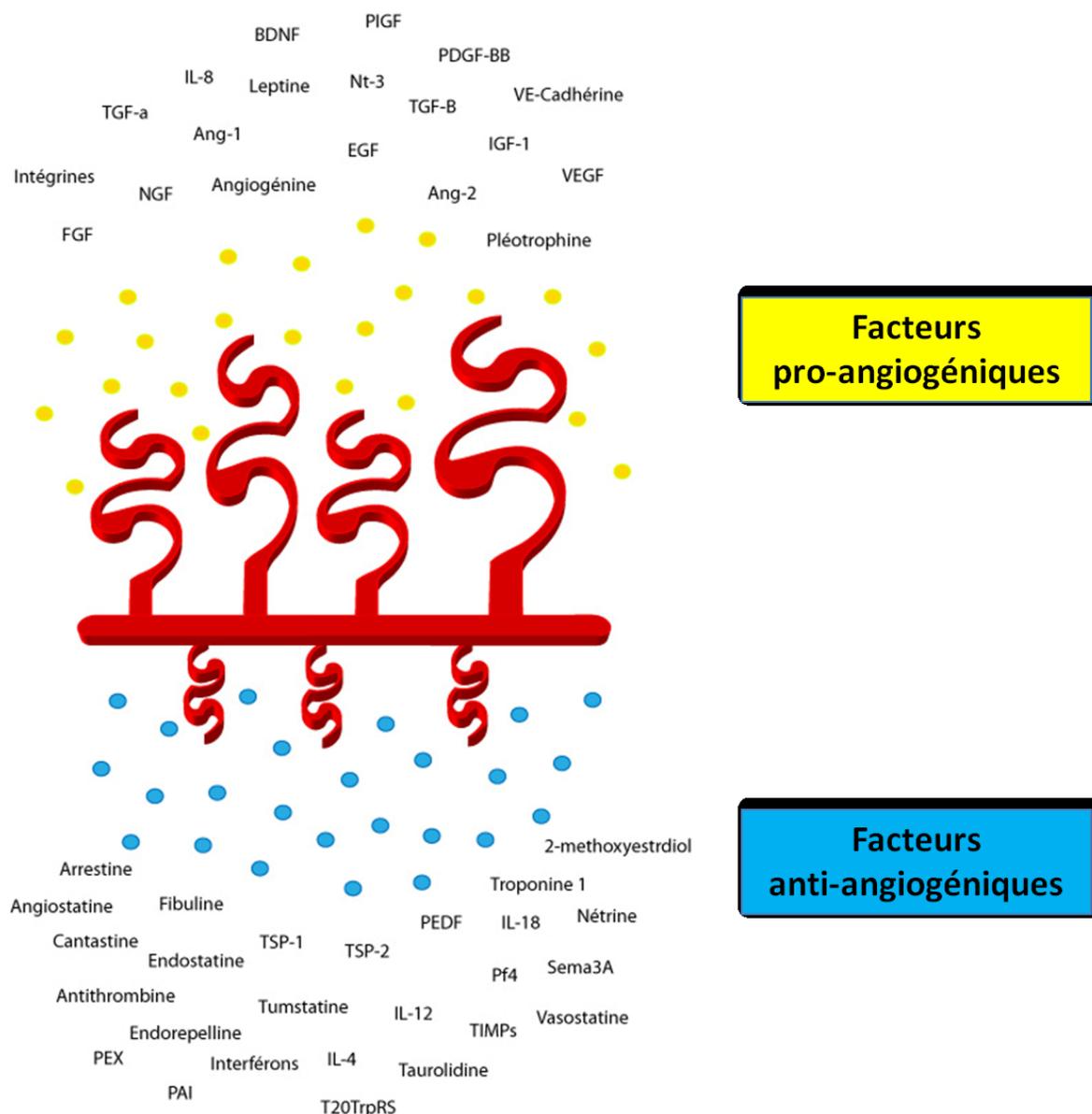


Figure 2. *Facteurs pro- et anti-angiogéniques*. L'équilibre entre les multiples facteurs pro-angiogéniques et anti-angiogéniques contrôle le développement vasculaire. Si la balance penche vers les facteurs anti-angiogéniques il y a une répulsion et une régression de vaisseaux. Alors que si la balance penche vers les facteurs pro-angiogéniques, il y a une collatéralité et une formation de nouveaux vaisseaux (BDNF, facteur neurotrophique dérivé du cerveau; PIGF, facteur de croissance placentaire; IL-8, interleukine 8; PDGF-BB, facteur de croissance dérivé des plaquettes BB; TGF- α , facteur de croissance transformant alpha; TGF- β , facteur de croissance transformant bêta; Nt-3, neurotrophine 3; Ang-1, angiopoïétine 1; Ang-2, angiopoïétine 2; FGF, facteur de croissance fibroblastique; NGF, facteur de croissance neuronale; EGF, facteur de croissance épidermique; IGF-1, facteur de croissance apparenté à l'insuline 1; VEGF, facteur de croissance endothélial vasculaire; TSP-1, thrombospondine-1; TSP-2, thrombospondine-2; PEX, domaine de type hémopexine de MMP-2; PAI, inhibiteur des activateurs de plasminogène; IL-4, interleukine 4; IL-12, interleukine 12; IL-18, interleukine 18; Pf4, facteur 4 plaquettaire; PEDF, facteur dérivé de l'épithélium pigmentaire; Sema3A, sémaphorine 3A).

En résumé, dans les rétinopathies de prolifération, les cellules gliales et neuronales perçoivent une hypoxie et relâchent des facteurs de croissance qui induisent une prolifération pathologique de nouveaux vaisseaux ²⁴.

1.2.1 L'inflammation

La néovascularisation est aussi combinée à une inflammation qui a des effets désastreux sur la perméabilité vasculaire et la récupération des tissus ²⁵. Le concept d'inflammation est lié de près avec celui de l'hypoxie. Selon plusieurs études le mécanisme de signalisation de l'hypoxie déclenche l'activation du système inflammatoire en aval. Grocott *et al.* ²⁶ et plusieurs autres ^{27 28} ont démontré que les personnes qui souffrent du manque d'oxygène en altitude possèdent de haut niveau de cytokine puis une fuite vasculaire pouvant mener à l'œdème pulmonaire ou cérébral. De plus, les niveaux d'interleukine 6, de son récepteur et de la protéine C-réactive sont élevés après trois nuits en altitude (plus de 3400 m) ²⁹. Cette réaction inflammatoire suite à une diminution de la quantité d'oxygène distribuée aux tissus par le sang a pour cause l'interaction entre la signalisation de PHD-HIF et les membres de la famille du facteur de transcription NF- κ B ²¹. Dans les rétinopathies de prolifération, l'hypoxie rétinienne

cause une augmentation du nombre des cellules inflammatoires, y compris les neutrophiles, les macrophages et les lymphocytes T de type CD4 et CD8²⁵. De plus, on remarque des différences de niveaux chez certaines cytokines dont le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α), IL-1 β , IL-6, IL-17, IL-18, RANTES et la protéine C-réactive³⁰⁻³²

1.3. Rétinopathie du prématuré

1.3.1. Définition et épidémiologie

La rétinopathie du prématuré est une maladie vasoproliférative qui atteint les bébés prématurés et peut mener à la cécité. Cette pathologie se développe surtout dans les bébés ayant un poids sous la norme à la naissance (≤ 1250 g). La ROP est la cause principale de cécité juvénile dans le monde avec une prévalence de 50 000³. L'incidence de cécité chez ces enfants ayant la ROP est cependant petite, environ 1 cas par 820 bébés, grâce au suivi médical et aux traitements. Néanmoins, la ROP est associée avec une réduction de qualité de vision même chez les bébés où la ROP régresse suite ou non à un traitement. L'étude de cette pathologie mène non seulement à des développements au niveau du traitement mais aussi à des progrès dans la compréhension de l'angiogénèse, des interconnexions neuro-vasculaires puis de l'interférence métabolique vasculaire³³.

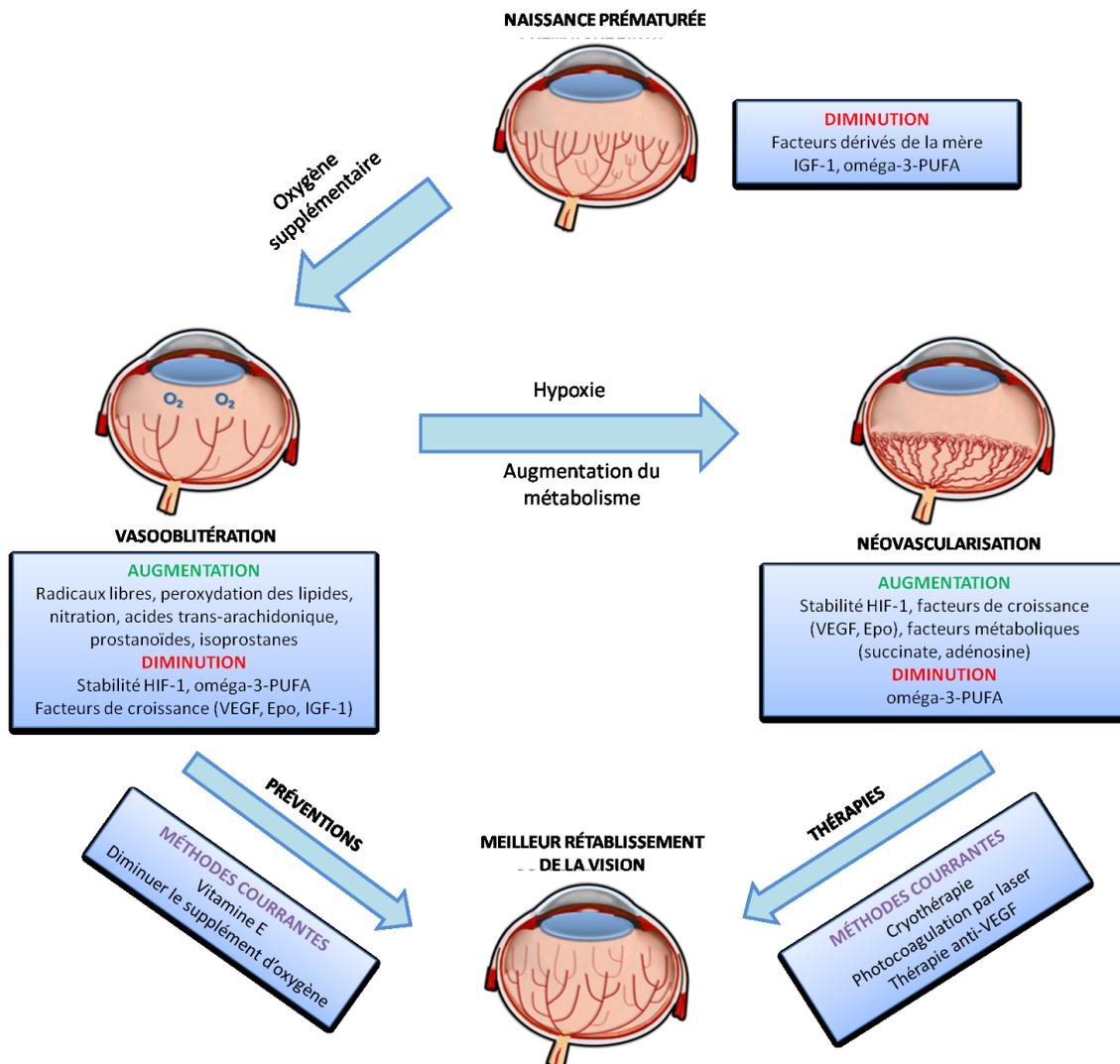
1.3.2. Physiopathologie – Phase 1 Vaso-oblitération

Comme mentionné ci-haut, la vasculature rétinienne est complète seulement lorsque le bébé ou fœtus a environ 36 semaines post-menstruel. Les prématurés sont donc nés avec une vasculature incomplète³⁴. De plus, une des caractéristiques des prématurés qui affectent leur survie est leurs poumons sous-développés. En conséquence, ces bébés reçoivent presque toujours un traitement d'oxygène tel que la ventilation ou le CPAP (ventilation en pression positive continue). Ces hauts niveaux d'oxygène viennent affecter l'équilibre physiologique de la rétine. Le lit vasculaire

rétinien n'a pas d'innervation du système nerveux autonome, il est donc dépendant des facteurs locaux pour réguler la tension d'oxygène dans le tissu. Chez le nouveau-né prématuré, l'autorégulation locale du flux sanguin est très limitée comparé à un adulte³³. Ce manque de régulation combiné au traitement d'oxygène élevé mène à des niveaux d'oxygène trop élevé. Une surproduction de radicaux libres survient puis une destruction de la microvasculature rétinienne prend place. Subséquemment, ce surcroît d'oxygène annule aussi l'hypoxie physiologique de la rétine en développement puis supprime la synthèse du VEGF astrocytaire. Cela mène à une régression des vaisseaux immatures¹⁰. L'absence de facteurs de croissance provenant de la mère puis de certains facteurs de survie de la vasculature et des cellules neuronales joue aussi un rôle à ce niveau. Tous ces facteurs mènent à une vasooblitération, qui est la caractéristique centrale de cette première phase de la ROP (**fig. 3**)³³.

1.3.2. Physiopathologie – Phase 2 Néovascularisation

Avec le développement et le retour à l'air ambiante du nouveau-né, la rétine devient active ce qui cause une ischémie dans la zone non perfusée de la rétine. Il y a alors un immense relargage de VEGF par les astrocytes mais aussi les autres cellules neuronales. Ceci déclenche une angiogénèse accrue dans la rétine. Lorsqu'il y a une ischémie ailleurs dans le corps tel que dans le cœur ou le cerveau, cette angiogénèse est favorable au rétablissement³⁵. Cependant, dans la rétine, il y a un dérèglement des processus angiogénique qui entraîne une croissance vasculaire anormale, excessive et désordonnée¹⁹. C'est ce qu'on considère la phase 2 de la ROP : phase de néovascularisation (**fig. 3**). Généralement cela se passe quand le bébé atteint 32 à 34 semaines (âge post-menstruel)¹⁰



36

Figure 3. *La rétinopathie du prématuré.* Les prématurés naissent avec une microvasculature qui n'est pas encore complètement développée. La combinaison du traitement d'oxygène par ventilateur et l'absence des facteurs de croissance de la mère mène à une destruction des micro-vaisseaux. Avec le développement du nouveau-né, le métabolisme de la rétine s'active causant une hypoxie locale et un relargage de facteurs de croissance. Cela cause une néovascularisation accrue et pathologique pouvant mener à un détachement de la rétine.

1.3.3 Diagnostiques et impacts de la ROP

Il y a plusieurs niveaux de rétinopathie chez le prématuré. Ceux-ci sont définis selon l'apparition de vaisseaux à l'endroit où les zones vasculaires et avasculaires se rencontrent. Cette interface apparaît comme une ligne pour la ROP de stade 1, une crête à trois dimensions pour le stade 2 puis une crête avec des bourgeonnements de vaisseaux dans l'humeur vitrée pour le stade 3. C'est au troisième stade que le traitement est prescrit. Souvent des bébés atteignent les 2 premiers stades sans atteindre le troisième. « Plus disease » est une ROP de stade 3 où 2 quadrants ou plus de l'œil du patient contiennent des veines dilatées et des artères tortueuses près du disque optique. Parfois, les bourgeonnements peuvent progresser puis former des bandes fibreuses qui causent un détachement partiel de la rétine (stade 4), ou bien un détachement de la rétine au complet (stade 5) ¹⁷.

Lors de la deuxième phase de la ROP, il y a non seulement une réponse angiogénique mais aussi une réponse inflammatoire. L'infiltration de cellules inflammatoire déclenche des modifications de la matrice extracellulaire puis des changements vasculaires. Les nouveaux vaisseaux sont susceptibles aux fuites vasculaires, ce qui cause un épaissement de la rétine, de l'œdème, et des saignements ³³. La combinaison de l'infiltration inflammatoire puis les fuites vasculaires favorisent une prolifération de cellules gliales agissant en fibroblastes. C'est ce qui peut mener à la formation d'une cicatrice fibreuse et le détachement rétinien par force de traction. La fibrose est un processus biologique adaptatif qui se fait dans tous les tissus. Malgré cela, la composition cellulaire et la structure anatomique de la rétine fait en sorte que l'effet de la fibrose dans la rétine est dévastateur plutôt que réparateur ⁴.

Il faut noter que souvent il y a une régression de la ROP après ou même sans qu'il y ait eu de traitement et aucune cécité a lieu. Ces enfants développent une vision normale durant leurs premières années. Cependant, au cours de leur développement ultérieur, leur acuité visuelle diminue sous la norme. Il y a aussi été démontré que la

fonction de la rétine périphérique est appauvrie même lorsqu'aucune thérapie n'a été nécessaire. De plus, certains déficits ont été remarqués dans la sensibilité des bâtonnets, puis cette sensibilité n'est nullement proportionnelle à la sévérité de la condition initiale¹⁰. Les traitements actuels de la ROP en clinique laissent donc encore à désirer.

1.3.4 Traitements pour la ROP

Débutant en 1988, la cryothérapie était le traitement de choix pour la ROP de niveau 3+. Cette thérapie utilise l'application de froid à très basse température sur la rétine via la surface oculaire. Ce traitement affecte la sclère ainsi que la choroïde. Un traitement de 5 heures consécutives à -150°Celsius ou de 8 heures cumulatives à -240°Celsius était recommandé¹⁷.

Dans les années 90, il y eut une transition du traitement vers l'utilisation de la thérapie de photo coagulation au laser. Cette thérapie applique un laser à la surface interne de la rétine en passant par la pupille qui a été dilatée. Ce traitement, comme la cryothérapie vise à détruire la majorité des cellules périphériques qui produisent le VEGF dans la rétine diminuant ainsi la croissance vasculaire malsaine. Ces thérapies d'ablation conventionnelles (laser ou cryothérapie) causent la perte permanente du champ visuel périphérique et induit souvent une myopie cliniquement significative¹⁷. De plus, ces interventions sont très invasives et elles sont utilisées que tardivement (stade 3+), ne limitant donc que partiellement les dommages fonctionnels et conduisant ainsi à des conséquences néfastes¹⁹.

L'utilisation d'agents anti-angiogéniques est maintenant le traitement à l'horizon. Les anti-VEGF, surtout Bevacizumab, sont maintenant utilisés en clinique pour traiter la ROP aigue¹⁷. Il y a aussi la thérapie photo-dynamique, les stéroïdes angiostatiques et les antagonistes d'intégrines qui émergent comme traitement³⁵.

1.4 Rétinopathie induite par l'oxygène – Modèle animal

L'efficacité de nouveaux traitements pour la ROP est souvent étudiée dans le contexte du modèle animal de la rétinopathie induite par l'oxygène. De plus, l'étude des modèles animaux de rétinopathie induite par l'oxygène a permis à la communauté scientifique de progresser sur la pathogénèse de la ROP ainsi que de découvrir certains mécanismes sous-jacents³⁴. Contrairement aux humains, les souris, les rats, les chats et les chiens naissent avec des yeux qui ne sont pas complètement vascularisés. Leur état de vasculature à la naissance est alors parallèle à celui des bébés prématurés. L'exposition de ces animaux néonataux à l'hyperoxie mène à la perte des vaisseaux rétiniens, à l'arrêt du développement vasculaire qui est suivi d'une néovascularisation¹⁰. Ces modèles animaux reproduisent les deux phases de la ROP : phase I de vaso-oblitération et phase II de néovascularisation. Un des premiers modèles animaux a été le chat puisque son système nerveux et visuel ressemble beaucoup à celui de l'humain. Pour des raisons de coût et de disponibilité, ce modèle a vite été mis de côté. Le lapin quant à lui ne développe la pathologie que dans une petite région de la rétine. Le rat et la souris sont les modèles les plus utilisés en raison de leur peu de variabilité, leur prix économique ainsi que la disponibilité de mutant³⁷.

En 1994, Smith *et al.*³⁸ ont développé un modèle de souris de rétinopathie reproductible et quantifiable permettant d'étudier la néovascularisation *in vivo*. Ce modèle animal reproduit les deux phases de la rétinopathie du prématuré en exposant des souriceaux à 75% d'oxygène à partir du jour post-natal 7 (P7). La vasculature rétinienne au jour P7 est celle qui ressemble de plus près à celle des prématurés avec une régression maximale des vaisseaux hyaloïdes puis un développement vasculaire rétinien minimal³⁹. Ces souriceaux restent en hyperoxie pendant cinq jours et sont ensuite remis en condition normoxique (21% d'oxygène) au jour P12. L'exposition à l'hyperoxie augmente le niveau de radicaux libres et conduit à la destruction des vaisseaux rétiniens (phase de vaso-oblitération) (**fig. 4 C**). Lorsqu'au jour P12 ces souriceaux retournent en normoxie, la rétine continue de se développer et requiert une quantité d'oxygène

supérieure à la production du réseau vasculaire qui a été en partie détruit. Ce manque d'oxygène crée une hypoxie locale ce qui produit un relâchement accrue de VEGF³⁸. Cette relation entre l'hypoxie et les niveaux de VEGF concordant est très bien établie dans la littérature⁴⁰⁻⁴². D'autres facteurs de croissance et angiogéniques sont aussi relâchés ce qui mène à une angiogénèse accélérée et pathogénique (phase de néovascularisation) (**fig. 4 D**). La première phase peut être quantifiée en mesurant l'aire de la surface avasculaire sur un montage à plat de rétine (voir matériel et méthodes) soit au jour P12 (**fig. 4 C**) soit à P17 (plus petite aire avasculaire). La néovascularisation quant à elle, est à son seuil maximal au jour P17 (**fig. 4 D**) où l'on peut calculer l'aire que recouvrent les bourgeonnements de vaisseaux sur un montage à plat de rétine³⁸.

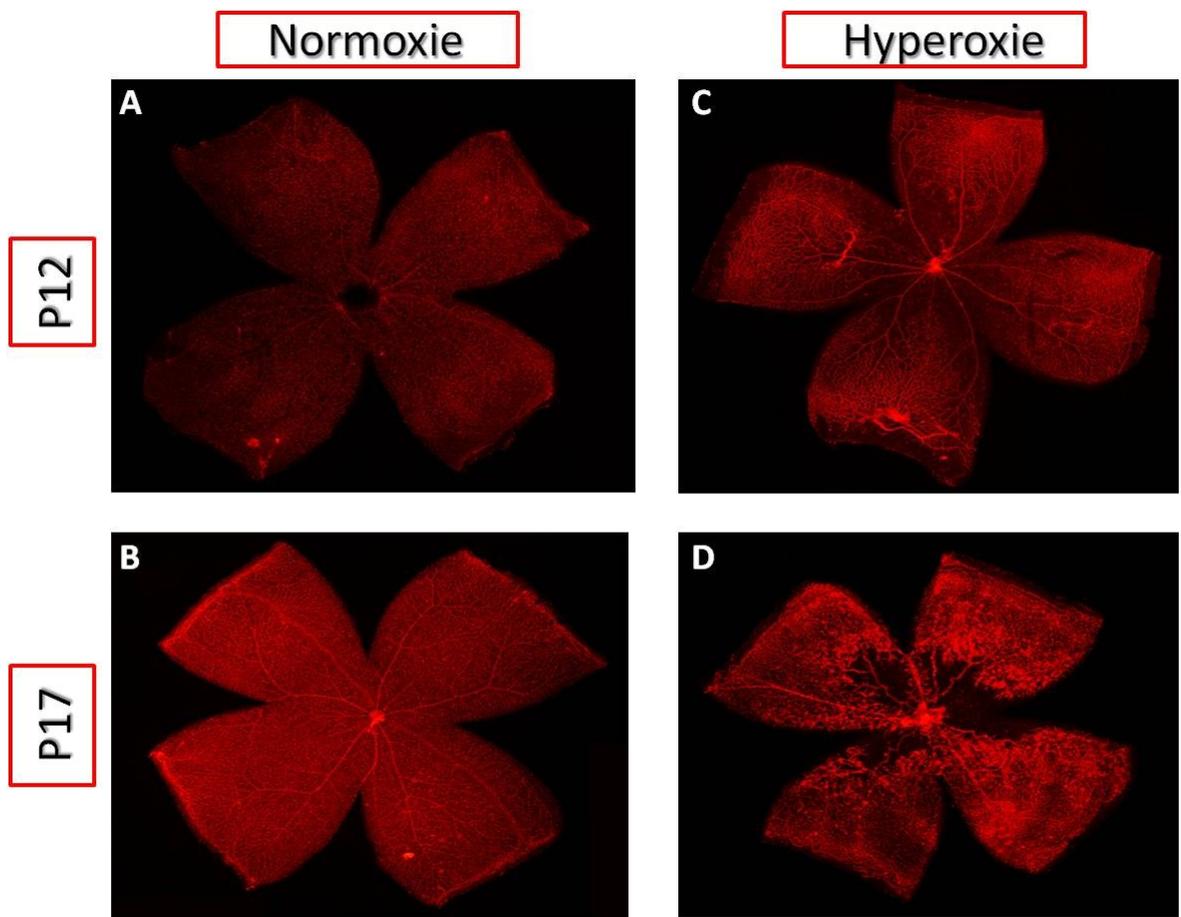


Figure 4. *Le modèle de RIO*. Le modèle RIO reproduit les deux phases de la ROP en soumettant les souris à des conditions hyperoxiques (75% d'oxygène) pendant 5 jours entre les jours post-nataux 7 et 12. La première phase de la ROP, la vaso-oblitération, est évidente au jour P12 (C) alors que la phase 2 de néovascularisation est évidente à P17 (D).

Ce modèle permet l'étude de la néovascularisation et des mécanismes sous-jacents, puis l'évaluation de nouvelles interventions médicales. Toutefois, on doit reconnaître certaines différences et faiblesses chez le modèle lorsqu'on le compare avec la pathologie chez l'humain. Une des différences majeures entre le modèle et la pathologie humaine est l'absence de fibrose pré-rétinienne et le rétablissement des vaisseaux au jour P21 chez le modèle de souris. De plus, la vaso-oblitération rétinienne se développe au centre de la rétine de souris alors que chez le prématuré, celle-ci prend place à la périphérie. Certaines théories tentent d'expliquer ces différences mais ce n'est toujours pas très bien compris⁴³.

2. Les cellules souches

Toutes les interventions pour la ROP priment sur la destruction ou l'inhibition de la néovasculature au lieu de promouvoir la collatéralité et la maturation des vaisseaux. Ces traitements permettent l'alignement de l'offre et la demande d'oxygène mais au détriment de la vision. Souvent ils ne parviennent pas à inhiber toute la néovascularisation pathologique. Finalement, ces traitements sont associés à des dommages tissulaires de même qu'à plusieurs complications locales et systémiques³⁵.

Récemment, plusieurs découvertes ont été accomplies dans le domaine des cellules souches. Ce traitement de type cellulaire pourrait combler les lacunes des autres traitements en préservant la structure et la fonction rétinienne avant que cela mène à l'œdème, aux saignements, la fibrose et enfin au détachement rétinien. Les thérapies cellulaires à base de cellules souches sont un domaine de recherche émergent rempli de promesses pour diverses pathologies. Un certain enthousiasme se manifeste pour l'utilité

thérapeutique de ces cellules dans les pathologies dégénératives de type neuronal et même vasculaire afin de prévenir, stabiliser ou même de restaurer les fonctions suite aux dégénérescences ⁴⁴. Il y a toujours beaucoup d'inconnus dans ce domaine et plusieurs utilités thérapeutiques restent à être explorées. Néanmoins, certains facteurs doivent être considérés avant de proposer une approche thérapeutique : la source de cellules souches, la sécurité, les effets secondaires, le phénotype cellulaire, la plasticité, et le mécanisme d'action.

2.1 Concepts de base des cellules souches

2.1.1 Définition

Lors du développement humain, l'organisme commence d'une cellule (l'ovule fertilisé) puis devient un organisme complet avec plus de deux cent types cellulaires. Cette tendance phylogénétique à passer de cellules pluripotentes à des cellules matures est une partie intégrale du développement humain. Ce processus où les cellules se différencient et progressent vers une cellule sans plasticité est nécessaire pour produire tous les tissus spécialisés de l'humain et pour minimiser les risques de prolifération tumorale. Il y a donc une diminution du pouvoir régénératif avec l'âge. Ce manque de régénérescence à l'âge adulte a poussé la communauté scientifique à étudier les cellules primitives au pouvoir régénérateur ¹¹.

À la base, une cellule doit remplir deux conditions pour être considérée comme une cellule souche. Cette cellule doit d'abord pouvoir s'auto-renouveler sans perdre sa plasticité (division symétrique). Deuxièmement, elle doit aussi pouvoir perdre sa plasticité et se différencier dans divers sous-types cellulaires matures. Une cellule souche doit donc pouvoir accomplir une division cellulaire asymétrique où les deux cellules filles ont un différent phénotype ⁴⁵ (**fig. 5**).

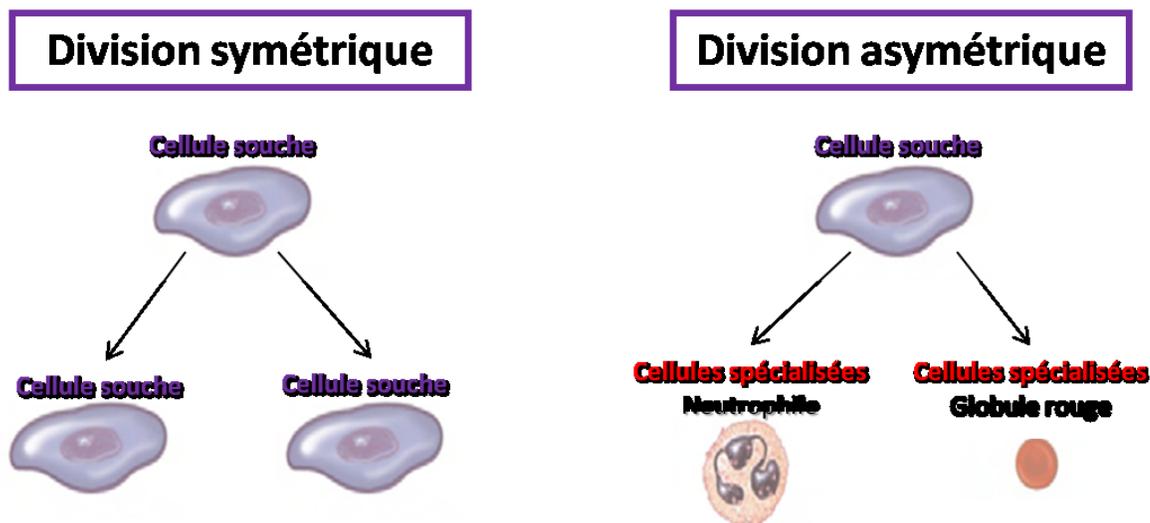


Figure 5. *Division cellulaire de cellules souches.* Une cellule souche est une cellule qui peut s'auto-renouveler ainsi que se différencier en divers sous-types cellulaires. L'auto-renouvellement se fait par division symétrique alors que la différenciation en cellules spécialisées se fait par division asymétrique.

Il existe plusieurs types de cellules souches ayant des potentiels de différenciation variables. Une cellule peut être totipotente, pluripotente, multipotente ou bien unipotente (**fig. 6**). Les cellules dites totipotentes sont celles qui peuvent produire un être humain au complet. Seule la morula, structure de huit cellules ou moins d'un embryon d'un à trois jours, peut mener la formation d'un humain complet. Après ce stade de développement, les cellules sont dites pluripotentes. Ce genre de cellules provient du blastocyste qui est formé de seize à trente-deux cellules durant les jours embryonnaires cinq à quatorze. Les cellules pluripotentes donnent lieu à plus de deux cent types cellulaires sans pouvoir créer un humain complet. Ce sont ces cellules embryonnaires qui sont utilisées en recherche aux fins expérimentales et qui mènent à beaucoup de désaccord au niveau éthique. Il y a aussi des cellules multipotentes qui sont des cellules différenciées, contrairement aux cellules totipotentes et pluripotentes, mais qui peuvent se différencier en différents sous-types cellulaires. Les cellules souches hématopoïétiques (HSC) de la moelle en sont un exemple. Les HSCs prolifèrent dans la moelle tout au long de notre vie et certaines se différencient en

cellules hématopoïétiques matures afin de renouveler ces cellules. Les cellules multipotentes sont souvent aussi appelées des cellules progénitrices. Enfin, une cellule unipotente est une cellule spécialisée qui ne peut s'auto-renouveler ⁴⁶.

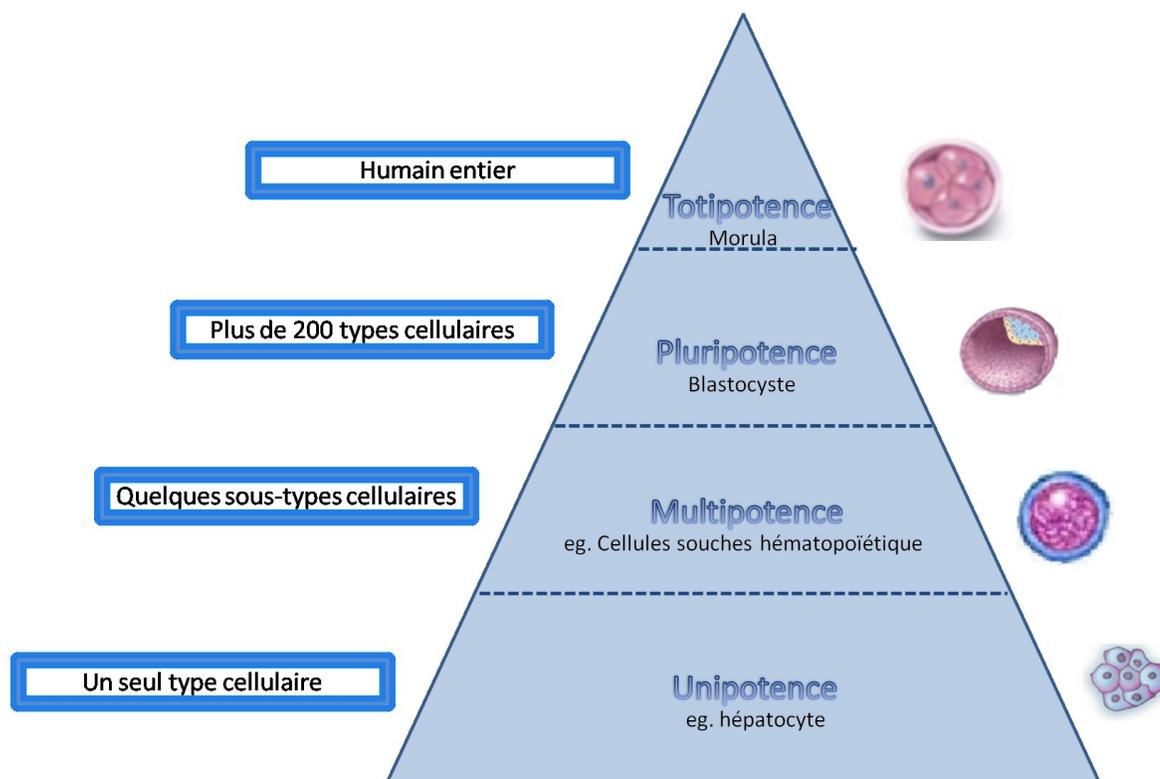


Figure 6. *Potentiel de différenciation des cellules.* Les cellules peuvent être catégorisées selon leur potentiel de différenciation. Une cellule totipotente est celle qui peut mener à la formation d'un humain complet, alors qu'une cellule pluripotente peut devenir n'importe quelle cellule humaine mais ne peut former l'humain entier. Les cellules multipotentes sont des cellules différenciées qui peuvent tout de même se diviser en une variété de sous-type cellulaire. Une cellule unipotente est une cellule spécialisée qui ne peut donner qu'un type cellulaire, elle est restreinte à un seul phénotype

2.1.2 Sources et types de cellules souches

Il y a une grande variété de cellules souches étudiées et utilisées en recherche (**tableau 1**). Notamment, certains chercheurs trouvent encore aujourd'hui de nouvelles sources de cellules souches ⁴⁷⁻⁴⁹. On peut reconnaître trois différentes catégories de

sources de cellules souches : les cellules embryonnaires, les cellules souches issues de la moelle puis les cellules progénitrices de tissus (**fig. 7**)⁴⁶.

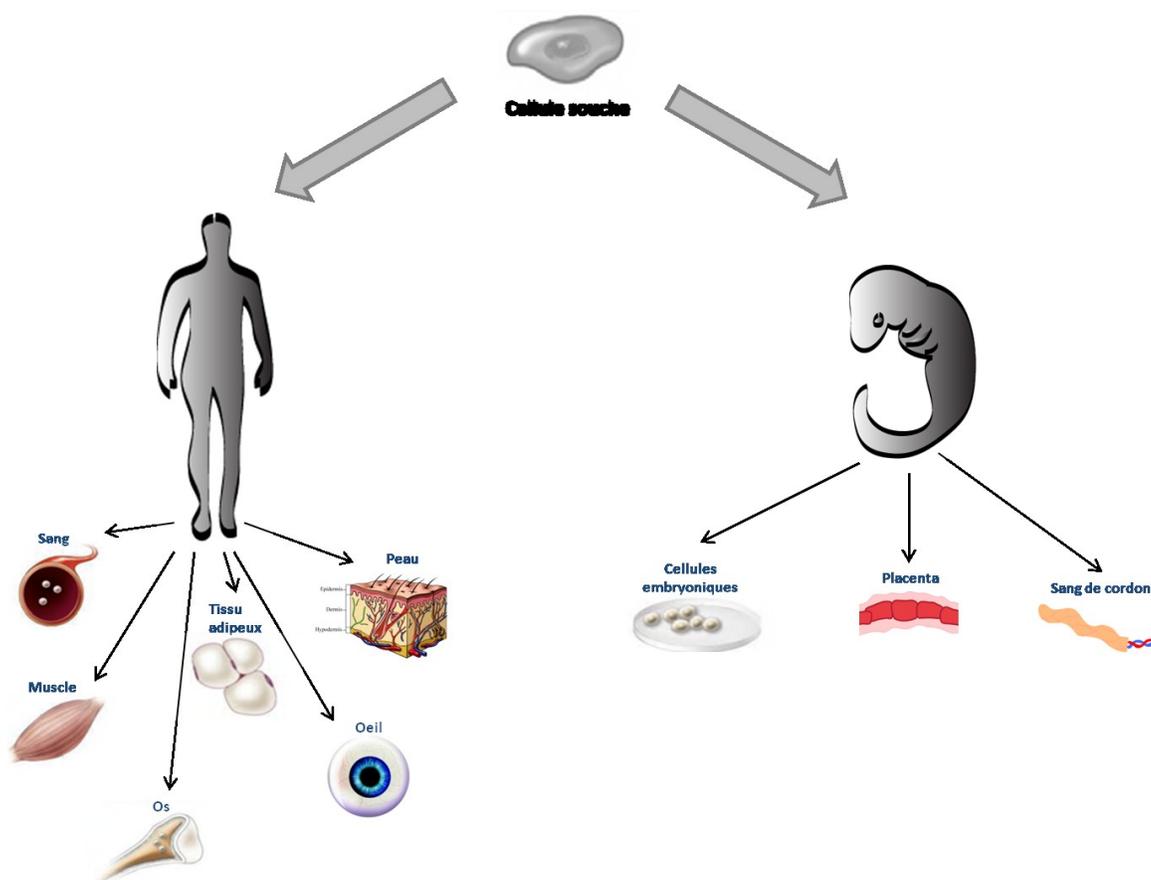
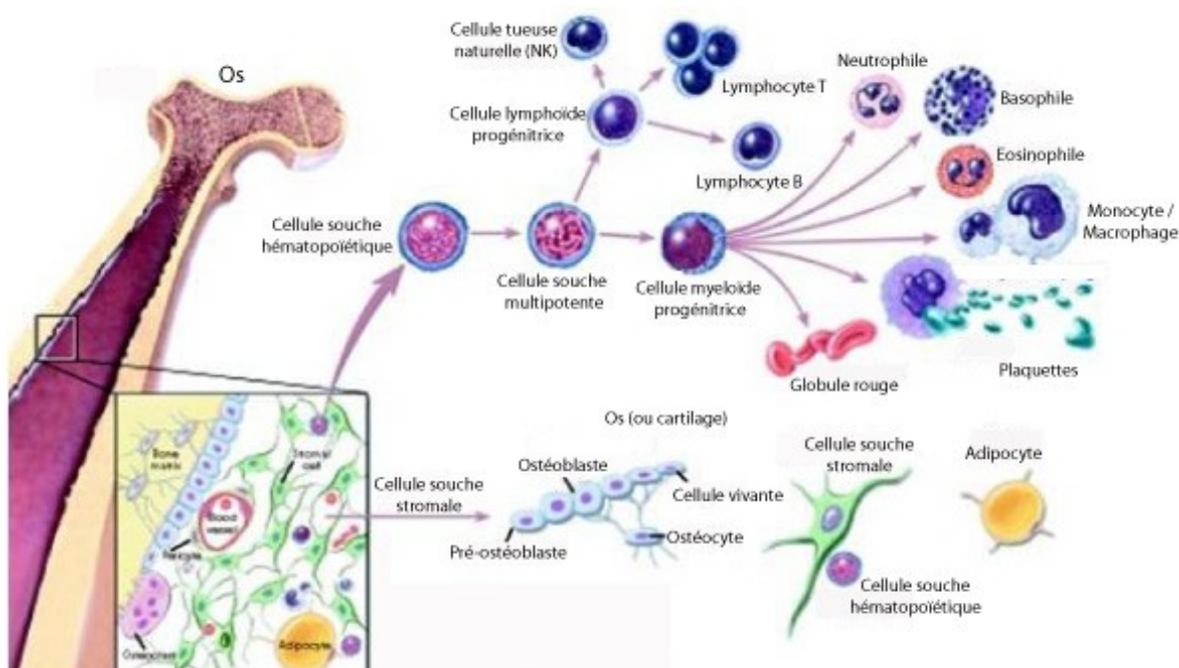


Figure 7. Sources de cellules souches. Les cellules souches peuvent provenir de tissus embryonnaires ou de tissus adultes. Les cellules du blastocyste sont les cellules souches embryonnaires principales, mais le placenta et le sang de cordon contiennent aussi des cellules souches. Chez l'adulte, on retrouve des niches de cellules souches dans le sang, dans les muscles, dans la moelle, dans le tissu adipeux, dans l'œil et même dans la peau.

Les cellules embryonnaires ont été les premières cellules souches à être découvertes et ensuite étudiées. Ces cellules pluripotentes proviennent de la masse cellulaire interne de l'embryon au stade de blastocyste. Dans le développement humain, ces cellules vont former les trois feuillets embryonnaires (ectoderme, endoderme, mésoderme). Ces trois feuillets embryonnaires sont la source de tous les types

cellulaires de l'humain ⁴⁶. La cellule embryonnaire renferme donc un potentiel thérapeutique immense car elle pourrait théoriquement venir en aide à n'importe quel tissu endommagé. Néanmoins, ces cellules présentent quelques obstacles surtout au niveau éthique. La controverse provient du besoin de détruire un embryon afin d'obtenir les cellules. De plus, l'insuffisance de disponibilité de ce tissu, la carence en connaissances des signaux de différenciation cellulaire, le risque d'induction de tumeur et les risques de contamination avec l'acide sialique Neu5Gc représentent d'importantes difficultés à surmonter ⁵⁰.

La moelle osseuse est le lieu de l'homéostasie hématopoïétique. Cette cavité contient deux types de cellules souches principales : les cellules souches hématopoïétiques (HSC) et les cellules souches mésenchymateuses (MSC) (**fig. 8**). Les HSCs sont les cellules souches adultes qui ont été les plus étudiées; elles sont déjà utilisées en clinique comme traitement. Les HSCs sont les cellules multipotentes qui génèrent toutes les cellules hématopoïétiques y compris myéloïdes et lymphoïdes. Elles sont donc responsables de maintenir le contenu de cellules de la circulation sanguine ⁴⁶. Le stroma de la moelle osseuse contient aussi des MSCs. Ces cellules, aussi connues sous le nom de cellules souches stromales sont les cellules qui réapprovisionnent le stroma de la moelle. Lors des dernières décennies, d'autres fonctions ont été élaborées pour les MSCs. Celles-ci sécrèteraient aussi des facteurs solubles qui supportent et régulent l'hématopoïèse ⁵¹.



(<http://stemcells.nih.gov/>)⁵²

Figure 8. *Cellules de la moelle*. La moelle osseuse contient deux types de cellules souches: les cellules souches hématopoïétiques (HSC) et les cellules souches stromales mésenchymateuses (MSC). Les HSCs sont présentes dans la cavité de la moelle et donnent lieu à toutes les cellules hématopoïétiques matures myéloïdes ainsi que lymphoïdes. Les MSC jouent plutôt un rôle de support pour l'hématopoïèse et elles se retrouvent dans un réseau qui interagit de près avec l'os.

La moelle osseuse contient aussi d'autres types de cellules souches qui portent différents noms selon le groupe de chercheurs. Les cellules progénitrices endothéliales (EPC) résident aussi dans la moelle, ainsi que des cellules progénitrices adultes multipotentes (MAPC)⁴⁶. Les EPCs, décrites pour la première fois par Asahara *et al.*⁵³ entrent en circulation et se dirigent vers un endroit d'ischémie lorsqu'il a lieu et sont impliquées dans l'angiogénèse. De plus certaines études font référence aux cellules souches de la moelle (BMC) qui représentent une population hétérogène de cellules souches. Ces cellules ont la capacité de se différencier en plusieurs types de cellules telles qu'un hépatocyte, une cellule endothéliale, une cellule épithéliale, une cellule musculaire cardiaque ou squelettique, une cellule neuronale ou même un astrocyte. Ceci

indique que les cellules de la moelle ont le potentiel de transdifférentiation leur permettant de devenir une cellule d'un tissu autre que le leur. Toutefois, ce n'est pas tous les BMCs qui se différencient dans ces sous-types cellulaires ce qui rend la compréhension du rôle et du mécanisme de différenciation de ce groupe de cellules variées presque insurmontable ⁵⁴.

Il y a aussi des cellules souches qui ne sont pas endogènes, elles sont plutôt une fabrication humaine. Les cellules pluripotentes induites (iPSCs) sont générées via la reprogrammation d'une cellule somatique adulte vers un phénotype de pluripotence. Les iPSCs ressemblent de près aux cellules souches embryonnaires; elles sont pluripotentes, elles peuvent former les trois feuillets embryonnaires, elles peuvent se différencier en n'importe quel sous-type cellulaire, elles expriment les mêmes gènes et antigènes à leur surface que les cellules souches embryonnaires. L'induction de pluripotence peut être accomplie par une variété de méthodes telles que le transfert cellulaire, la fusion cellulaire, la reprogrammation indirecte (spécimens de cellules embryonnaires) et la reprogrammation directe. Cette dernière reçoit beaucoup d'attention car elle est réalisée via une introduction de nouveaux gènes. Les rétrovirus, les lentivirus, les adénovirus et les plasmides de transfection. Ces cellules arborent quelques avantages sur les cellules souches embryonnaires : les iPSCs impliquent moins de thématiques morales puis elles ne posent pas de problèmes au niveau de la compatibilité. Toutefois, la sécurité et la stabilité de ce nouveau type cellulaire reste à être confirmé ⁵⁵.

Enfin, certains tissus contiennent des niches de cellules progénitrices. Ces cellules résident dans leur niche jusqu'à ce qu'il y ait une insulte ou un signal développemental qui les attire à l'extérieur de la niche ⁴⁶. Le sang de cordon est une niche de cellules souches qui ressemblent de très près à la cavité de la moelle. On y retrouve des cellules progénitrices de cellules érythroïdes, myéloïdes et de lymphocytes B ⁵⁶. Le sang de cordon est aussi une source importante d'EPCs, MSCs et HSCs. Les cellules multipotentes de cette source font preuve d'une meilleure prolifération que

celles dans la moelle adulte^{57 58}. Des cellules progénitrices ont aussi été retrouvées dans le sang de menstruation, appelées cellules régénératives endométriale (ERC)⁴⁷. L'œil contient deux niches de cellules souches. La première est localisée dans le corps ciliaire de l'œil adulte⁵⁹. La deuxième est dans le limbe entre la cornée et la sclérotique⁵⁰. La circulation sanguine est une autre source de cellules progénitrices, plus spécifiquement une source d'EPCs. Ces cellules progénitrices hématopoïétiques portent aussi parfois le nom de cellules angiogéniques circulantes (CAC)⁴⁸. En condition normale, très peu d'EPCs circulent dans le sang. Lors d'une ischémie, une insulte ou une pathologie telle que le diabète ou des tumeurs, celles-ci sont plus nombreuses en circulation puis sont impliquées dans la néovascularisation²³. Il existe aussi des cellules progénitrices neuronales (NPCs) chez l'adulte. Les NPCs ont été identifiées dans le ventricule latéral de la zone sous-ventriculaire et dans la zone sous-granulaire dans le gyrus denté de l'hippocampe. Il y a certaines évidences que les NPCs sont aussi peut-être ailleurs dans le cerveau tels que dans le cortex, la matière blanche sous-corticale, la moelle épinière⁶⁰. Les NPCs ont la capacité de se différencier en neurone, astrocyte et oligodendrocyte, mais avec l'âge elles perdent de leur multipotence et se différencient par préférence en astrocyte¹¹.

Tableau 1. *Types de cellules souches étudiés en vision*

Type de cellule	Sources	Fonction de base	Capacité de différenciation	Marqueurs courants
Cellule souche embryonnaire ⁶¹	Morula (stade à 8 cellules)	Génère l'embryon	Pluripotence	Phosphatase alcaline, Nanog, c-myc, Smad-2, Oct-3/4, SSEA-1,3,4
Cellule souche pluripotente induite	Cellule somatique adulte	Aucune, cellule créé par l'homme	Pluripotence	Même que les cellules souches

				embryonnaires
Cellule souche neuronale ⁶⁰	Zone sous-ventriculaire de l'humain adulte	Neurogénèse pour le bulbe olfactif et l'hippocampe	Cellule neuronale olfactoire, myocyte, autres cellules neuronales	Nestine, Notch, Numb, Musashi-1, Préséniline FGFR-4, Fz9, Sox2
Cellule souche hématopoïétique ⁴⁶	Cavité médullaire des os longs	Régénération des cellules du sang	Cellules myéloïdes et lymphoïdes du sang et trans-différenciation	CD34, C-Kit, Sca-1, Thy-1
Cellule souche mésenchymateuse ⁴⁵	Cavité des os longs	Supporter l'hématopoïèse et renouvellement du stroma	Adipocyte, ostéocyte, chondrocyte et trans-différenciation	CD105, CD73, CD90, CD106, CD29, CD44
Cellule progénitrice endothéliale ⁶²	Circulation sanguine	Néovascularisation	Cellule endothéliale	CD34, CD133, CD309 (VEGFR-2)
Cellule souche rétinienne ⁵⁹	Zone antérieur uvéale de l'œil	Signification évolutive seulement	Cellule neuronale primitive	Nestine, β III tubuline, EGF-R, FGF-R, Shh, Pax6, Six 3/6
Cellule souche limbale ⁵⁰	Le limbe (entre la cornée et la sclérotique)	Régénération de l'épithélium de la cornée	Cellule épithéliale de la cornée	Vimentine, kératine 19, α -énolase, EGF-R, p63, Pax6, Shh, ABCG2/BCRP

SSEA, antigène spécifique de l'état embryonnaire; FGFR-4, récepteur 4 du facteur de croissance fibroblastique; Fz9, Frizzle 9; Sca-1, antigène 1 de cellules souches; VEGFR-2, récepteur 2 du facteur de croissance vasculaire; EGF-R, récepteur du facteur de croissance épidermique; ABCG2/BCRP, transporteur à cassette liant l'ATP

Les cellules souches se retrouvent un peu partout, et certaines niches sont encore à découvrir. Leur potentiel et leur utilité sont encore des sujets à débats; en particulier le phénotype de chaque type cellulaire varie d'un laboratoire à un autre, ainsi que les techniques d'isolement et d'identification.

2.1.3. Sécurité des cellules souches

La découverte des cellules souches et de leur rôle prometteur a formé deux mouvements d'opinions opposés. D'un côté, certains craignent l'utilisation de cellules souches pour des raisons morales autant que médicales. D'autre part, certains croient que ces découvertes sont très prometteuses et que les cellules souches sont le traitement universel de demain. Tout compte fait, ces deux opinions sont nécessaires à l'avancement de recherche en traitement cellulaire afin de pousser les découvertes et ainsi éviter de prendre des démarches qui mettraient la santé des patients à risque ⁵¹.

L'utilisation de cellules souches présente plusieurs controverses. Tout d'abord, la source des cellules peut être un sujet de désaccord. Les cellules embryonnaires ont le plus grand potentiel régénératif mais elles sont aussi au centre de plusieurs débats législatifs. Les normes d'utilisation, si la manipulation elle-même est permise, varient d'un pays à l'autre et elles sont généralement restreintes. Le phénotype est un autre sujet sans consensus. La méthode d'identification de chaque type de cellules souches reste toujours vague.

Plusieurs marqueurs et essais ont été proposés mais les critères changent continuellement créant ainsi une variabilité dans le monde scientifique ⁴⁵. La recherche en cellules souches est relativement nouvelle. Ce faisant, il y a toujours un certain manque de connaissances quand aux mécanismes des cellules souches et des voies cellulaires de différenciation ⁵⁰. Enfin, certaines précautions sont nécessaires afin

d'éviter les risques associés avec la thérapie cellulaire : développement de tumeur, réaction contre un antigène animal, une fibrose, un rejet de greffe et une réaction inflammatoire systémique ⁶³. De plus, on doit prendre en considération une certaine perte de validité dans la recherche causée par une grande variabilité au niveau des cellules utilisées, l'administration du traitement, le modèle animal utilisé et la méthode d'analyse ⁵⁰.

Ces obstacles mettent en évidence le besoin d'approfondir et d'élargir nos recherches sur les cellules souches. Néanmoins, cela n'empêche pas qu'il y a des découvertes importantes qui ont déjà été accomplies. De plus, certaines applications des cellules souches sont déjà utilisées en clinique ⁶⁴. L'approbation de ces traitements cellulaires démontrent qu'ils sont sécuritaires lorsqu'utilisés selon un protocole établi. Au Canada, plusieurs traitements sont en essais cliniques (<http://clinicaltrials.gov/>) et d'autres sont déjà acceptés tels que les greffes de moelle pour rebâtir le système immunitaire chez les patients atteints de maladies d'immunodéficiences ou après une ablation myéloïde par chimiothérapie ⁵⁶. En d'autres mots, après de rigoureuses recherches un traitement cellulaire peut être sécuritaire si les paramètres du traitement sont bien établis permettant ainsi leur approbation par les institutions gouvernementales.

2.2 Rôles et effets des traitements des cellules souches

Le rôle des cellules souches durant le développement commence à être élucidé. Toutefois, leur rôle chez l'adulte est également important d'un point vu physiologique et même thérapeutique. Plusieurs découvertes ont été accomplies dans ce domaine lors des derniers 15 ans mais beaucoup reste à être exploré. À présent, les cellules souches démontrent une certaine promesse pour une multitude de pathologies. Les cellules souches hématopoïétiques sont présentement utilisées pour reconstituer le système immunitaire chez les personnes avec une immunodéficiences causée par une pathologie ou la myéloablation ⁵⁶. Récemment, les MSCs ont été ajoutées aux traitement d'HSCs afin de diminuer la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD) et puisque celles-ci jouent

un rôle de support dans l'hématopoïèse⁵⁸. Au niveau cardiaque, il a été démontré que les cellules souches (EPC, BMC ou CAC), injectées de façon systémique ou trans-endocarde, augmentent la fonction cardiaque suite à un infarctus du myocarde⁶⁵. Au niveau pulmonaire, les MSCs semblent préserver la structure alvéolaire dans les maladies chroniques de poumons provoquées par une ischémie. Selon un modèle animal, ces cellules pourraient réduire le risque qu'ont les bébés prématurés de développer la dysplasie broncho-pulmonaire⁶⁶. De plus, les cellules souches stromales peuvent réduire la grandeur d'un infarctus neuronal et par la suite, améliorer la fonction neuronale chez des animaux subissant des ischémies cérébrales⁶⁰. Les cellules souches sont aussi utilisées en combinaison avec la chimiothérapie pour pouvoir augmenter la dose de d'agents cytotoxiques administrée aux patients souffrant d'un glioblastome, d'un neuroblastome, du cancer du sein, d'un tumeur de moelle épinière ou autres cancers. D'ailleurs, une multitude d'essais cliniques ayant recours aux cellules souches sont déjà en place. Les traitements tentent de contrer des pathologies telles que les cancers hématologiques, la maladie de Crohn, la sclérodermie, l'hypertension pulmonaire, la sclérose en plaques, la myélofibrose et la neuromyéélite optique (<http://clinicaltrials.gov/>)⁶⁷. Il y a aussi des articles qui ont proposé une implication des cellules souches endogènes dans le développement de pathologies ischémiques telles que les infarctus (cardiaques et neuronaux), et la rétinopathie diabétique^{20 60}.

Les cellules souches, qu'elles soient endogènes ou administrées, semblent pouvoir migrer vers le tissu endommagé, surtout lors d'une ischémie. Le mécanisme cellulaire et l'effet de la cellule souche varie selon l'environnement où elle se trouve. Ces cellules ont une grande plasticité qui leur permet d'adapter à leur environnement puis agir conformément⁴⁶. Néanmoins, le mécanisme de l'effet thérapeutique des cellules souches est toujours sujet à débat. Les deux explications principales sont la différenciation cellulaire et l'effet paracrine de cellules souches. La différenciation des cellules pourrait venir en aide aux tissus en remplaçant les cellules endommagées par des nouvelles cellules fonctionnelles. D'autre part, certains affirment que le pouvoir

régénérateur des cellules souches provient d'un effet paracrine. Ces cellules relâcheraient des facteurs selon l'environnement du tissu affecté qui aideraient à promouvoir la stabilité, la réparation et la survie cellulaire. La combinaison de ces deux mécanismes seraient une troisième théorie ⁴⁴.

2.2.1 Les cellules souches et l'œil

La découverte des cellules souches a déclenché de l'enthousiasme pour la médecine en vision dans l'espérance d'utiliser ce genre de traitement pour rétablir la vision. Au niveau du segment antérieur de l'œil, les cellules souches ont déjà un impact remarquable en clinique. Un traitement de cellules souches permet la réépithélialisation de la cornée menant à un rétablissement de vision. Le réseau trabéculaire aussi peut être régénéré à partir de cellules souches, ce qui peut venir en aide aux personnes souffrantes de glaucome ⁴⁴.

Malgré cela, les découvertes les plus intéressantes ont été accomplies dans le segment postérieur de l'œil, où l'organisation cellulaire rend le rétablissement de la vision beaucoup plus complexe. La plupart des dégénérescences rétiniennes sont initiées par une perte ou un dommage à un type de neurone. Il faudrait donc remplacer ces cellules par une mono-couche de cellules différenciées et fonctionnelles à un endroit précis. Parfois, la pathologie se développe et touche plusieurs type cellulaire; dans ces cas une greffe de plusieurs couches serait nécessaire rendant la procédure encore plus complexe. La communauté scientifique cherche à isoler des cellules neuronales progénitrices qui peuvent être placées en culture et différenciées en différents types de neurones de la rétine pour effectuer un traitement de greffe contre la cécité. Cependant, très peu de ces mécanismes de différenciation ont été complètement élucidés. Nous en sommes donc encore loin de l'utilisation de greffe cellulaire dans la rétine ⁵⁰.

Les rats RCS sont un modèle animal de dégénérescence neuronale dans la rétine. Selon Inoue *et al.* ⁶⁴, cette dégénérescence peut être retardée si on traite ces souris avec des MSCs dans l'espace sous-rétinienne. De plus, ce traitement induit aussi une

préservation de la fonction rétinienne. Dans le cas de la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA), des cellules souches de type iPSC ont démontré un potentiel de rétablissement fonctionnel partiel de l'épithélium rétinien pigmentaire⁴⁴. Alors que ces cellules souches injectées dans la rétine semblent exercer un effet sur la vision de ces modèles animal, ils n'ont toujours pas été capables de complètement se différencier en un phénotype rétinien spécifique. Certaines cellules semblent pouvoir se différencier *ex vivo*, mais ne peuvent migrer et s'intégrer fonctionnellement dans la rétine adulte après avoir été injectées⁶⁸.

La majorité de la recherche en cellules souches en ce qui a trait à la vision traite de pathologies neuronales. Pourtant, les dysfonctions vasculaires sont une source courante de problèmes oculaires. Seulement quelques études ont traité de l'impact des cellules souches sur la vasculature rétinienne. Ces études indiquent une co-influence entre la vasculature et les cellules souches. Plus spécifiquement, Otani *et al.*⁶⁹ ont découvert que des cellules souches hématopoïétiques « lineage negative » (Lin-) de la moelle osseuse pouvaient s'incorporer dans la rétine en développement et stabiliser la vasculature rétinienne dans un modèle de dégénération rétinienne (*rd1 et rd10*). En 2006, Ritter *et al.*³⁵ ont démontré que des progéniteurs myéloïdes CD44^{high} de la moelle pouvaient accélérer la revascularisation de la rétine en même temps de prévenir la néovascularisation pathologique de souris soumis au modèle de RIO. Les cellules dans cette étude se différenciaient en cellules de type microglial après leur injection dans ce milieu. Ces études offrent des voies d'exploration pour permettre l'identification des meilleures sources et types de cellules souches ainsi que la découverte du mécanisme d'action derrière l'effet protecteur.

2.2.2 Les cellules souches et la néovascularisation

Dès le début du développement, les cellules souches et la néovascularisation sont liées l'une à l'autre. Durant l'embryogenèse, la vasculogénèse se fait à l'aide de précurseurs de cellules endothéliales. Nous savons maintenant que même à l'âge adulte,

des cellules ressemblant aux précurseurs embryonnaires persistent et jouent un rôle dans la néovascularisation. Les facteurs angiogéniques tels que le VEGF, l'érythropoïétine (EPO), le facteur dérivé des cellules de stroma (SDF-1), le facteur de croissance fibroblastique (FGF) et le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) sont de puissants stimuli qui attirent et mobilisent les cellules souches aux tissus ischémiques²⁰. Après la découverte du potentiel angiogénique de différentes cellules souches (EPCs, HSCs, MSCs), des études *in vivo* ont été exécutées pour confirmer ce rôle dans l'organisme. Une incorporation minimale des cellules dans la vasculature a souvent été notée mais tout de même avec un effet significatif sur la croissance vasculaire via la sécrétion de facteurs de croissance comme le VEGF^{70 71}.

D'autres recherches ont discerné un type de cellules progénitrices neuronales qui pouvaient se différencier en cellules endothéliales ou cellules musculaires lisses dans la cicatrice ischémique d'un infarctus^{72 73}. D'autant plus, El-Helou *et al.*⁷⁴ ont démontré que des cellules souches exprimant la nestine (marqueur de cellules souches neuronales) se différenciaient en cellule endothéliale, puis formaient de nouveau vaisseaux dans le myocarde ischémique. Une augmentation de la fonction cardiaque post-infarctus était évidente dans le groupe ayant reçu le traitement cellulaire.

Ces études témoignent de la présence des cellules progénitrices endothéliales dans les tissus ischémiques. Toutefois, certains chercheurs ont observé des effets néfastes causés par ces cellules souches. Des niveaux élevés d'EPCs sont maintenant définis comme facteur de risque pour la néovascularisation pathologique^{20 75}. De plus une étude de Yodoi *et al.*⁷⁶ démontre que les cellules souches hématopoïétiques CD34+ participent à la néovascularisation pathologique dans le modèle de néovascularisation choroïdienne (CNV). De plus, cette étude a révélé que le niveau de cellules CD34+ circulantes augmentait chez les patients de DMLA avec une néovascularisation active. Ceci est indicatif d'une double fonction des cellules souches surtout dans le milieu oculaire. Le milieu particulier de la rétine semble pouvoir réagir différemment selon le type et la source de cellules souches présentes.

2.3. Les cellules souches issues de la moelle

Dans cette étude, nous nous sommes attardés aux HSCs et aux MSCs provenant de la moelle osseuse. Ces cellules sont facilement accessibles de façon non invasive. Du côté clinique il serait intéressant d'utiliser le sang de cordon de nouveau-né car celui-ci contient aussi des HSCs et des MSCs. Les HSCs ont été étudiées en profondeur et certaines études démontrent un rôle prometteur pour ces cellules dans la rétine. Les MSCs ont été définies plus récemment mais des découvertes intéressantes émergent quotidiennement. Leur potentiel de transdifférentiation et leur effet anti-inflammatoire rendent les MSCs un candidat intéressant pour le rétablissement de vasculature chez les personnes souffrant de rétinopathie proliférative.

2.3.1. Les cellules souches hématopoïétiques

Les cellules souches hématopoïétiques ont la capacité de s'auto-renouveler ainsi que de se différencier en cellules hématopoïétiques matures. Cette différenciation est ce qui permet le renouvellement des cellules myéloïdes et lymphoïdes en circulation. Les cellules sanguines ont une durée de vie limitée et doivent être remplacées continuellement. Les HSCs possèdent une grande plasticité suggérant une contribution à la régénération de tissu non hématopoïétique. Des souris ayant subi une irradiation létale suivie d'une reconstitution par des HSCs, obtiennent des cellules exogènes dans la moelle mais aussi au niveau du cerveau, du cœur, des muscles squelettique et du foie. Cette plasticité pourrait permettre aux HSCs d'induire une préservation neuronale en même temps que leur effet angiogénique dans les rétinopathies de prolifération ⁷⁷. D'autre part, les HSCs peuvent être mobilisées en utilisant certaines cytokines comme le facteur stimulant les colonies de granulocytes (G-CSF) ⁷⁸. L'expression de la chimiokine SDF-1 induit aussi une mobilisation des HSCs vers l'environnement ischémique via le récepteur CXCR4 localisé sur les HSCs ⁷⁹.

Le premier marqueur des HSCs a été le CD34. Celui-ci est toujours le marqueur le plus utilisé dans le but d'obtenir une population de cellules enrichies en HSCs

humains. CD34 est exprimé sur environ 1 à 4 % des cellules mononuclées de la moelle osseuse et moins de 0.1% dans les cellules du sang périphérique. Chez la souris, l'expression de CD34 n'est pas la même. Les HSCs de la moelle expriment le CD34 au stade fœtal, par contre seulement 10% des HSCs adultes expriment toujours le CD34. L'antigène 1 de cellule souche (SCA-1), CD90 (Thy-1) puis CD117 (c-kit) sont de meilleurs marqueurs. Toutefois, ils ne sont pas idéals pour l'isolation car l'expression de ceux-ci par les HSCs est variable. Souvent, une déplétion de la moelle osseuse est utilisée afin d'isoler les HSCs. En éliminant les cellules matures lymphocytaires (CD45, CD3, CD4, CD8), myéloïdes (CD11/b, Mac-1) et érythroïdes (TER-119) on obtient une population de cellule enrichie en HSCs dite « Lineage negative » (Lin-) ⁴⁶.

2.3.2. Les cellules souches stromales mésenchymateuses

Récemment, les chercheurs s'intéressent beaucoup aux MSCs dans le cadre d'études cliniques et fondamentales. Ces cellules sont très attrayantes car elles sont faciles à isoler, ne semblent pas former des tératomes, peuvent proliférer et être multipliées en culture, ne semblent pas induire des réactions négatives même dans des greffes allogéniques, et elles disposent de propriétés immuno-modulatoires ^{51 63}. La nomenclature de ce type cellulaire a souvent varié en commençant par le « fibroblast colony-forming unit » (CFU-F). D'autres nomenclatures ont suivi telles que cellule progénitrice mésenchymateuse, cellule de moelle stromale, cellule souche mésenchymateuse, cellule souche stromale, cellule souche stromale mésenchymateuse et cellule multipotente stromale mésenchymateuse ⁸⁰. Les MSCs peuvent provenir du sang de cordon, du placenta, du tissu adipeux et de la moelle osseuse. Elles sont situées de façon périvasculaire dans ces tissus et leur quantité est proportionnelle à la densité de la microvasculature ⁵¹. La moelle osseuse contient très peu de MSCs; leur fréquence est d'environ 1 sur 1×10^5 à 1×10^6 selon des essais CFU-F ⁵⁸, ils représentent environ 0.01 à 0.001% des cellules mononuclées de la moelle osseuse ⁴⁵ Généralement, il n'y a pas de MSCs en circulation à cause de leur quantité minimale. Cependant, lorsque l'organisme

subit une hypoxie chronique il y a une mobilisation des MSCs dans la circulation. C'est pourquoi on observe souvent une augmentation des MSCs circulants chez les personnes diabétiques⁸¹. Les MSCs, d'origine mésodermique, diminuent avec l'âge ce qui vient expliquer certains phénomènes de vieillissement dans les tissus mésenchymateux. Ces cellules produisent des cellules mésodermiques (par différenciation cellulaire) pouvant remplacer les cellules mortes ou dysfonctionnelles afin de maintenir l'intégrité des tissus. De plus, ces cellules semblent pouvoir produire des sous-types cellulaires qui migrent vers les tissus endommagés et aident à la réparation du tissu¹³. Les MSCs sont aussi importantes pour l'homéostasie du stroma de la moelle. Elles régénèrent le stroma puis elles sécrètent des facteurs de croissance qui supportent et régulent l'hématopoïèse⁵¹.

La définition et les méthodes d'isolement des MSCs varient beaucoup d'un laboratoire à un autre. Certains utilisent des cellules de moelle Lin- et CD34-, d'autres utilisent des cellules de moelle adhérentes, ou une déplétion de CD34, CD45 et CD11b des cellules de moelle, ou la moelle totale et plusieurs autres méthodes. Afin de remédier à cette variabilité, le *International Society for Stem Cell Therapy* ont établi certains critères d'inclusion pour les MSCs. D'abord une MSC est une cellule adhérente au plastique⁴⁵.

Deuxièmement, une MSC doit avoir un profil d'expression spécifique d'antigène. Afin de déterminer si une population de cellules est constituée de MSCs, plus de 95% des cellules doivent exprimer CD105, CD73, CD90 et moins de 2% peuvent exprimer CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79 α et CD19⁴⁵. Cependant, ce profil d'expression n'est applicable qu'aux cellules humaines. Les antigènes des MSCs des souris ont beaucoup moins été étudiés. Toutefois, la présence des marqueurs CD106, CD105, CD73, CD29 et CD44 puis l'absence de TER-119, CD45, CD11b et CD31 sont souvent utilisées pour les études dans les souris tout dépendant de la souche^{82 83}.

Finalement, une MSC doit pouvoir se différencier en adipocyte, en ostéocyte et en chondrocyte⁴⁵. Leur capacité de différenciation a d'abord été suggérée par Friedstein *et al.*⁸⁴ mais seulement dans le contexte de régénération du stroma de la moelle. C'est seulement 25 ans plus tard que Krause *et al.*⁸⁵ ont démontré le vaste potentiel régénérateur des MSCs. Dans cette étude les MSCs ont été greffées dans plusieurs différents organes et elles ont adopté un différent phénotype épithélial dans le foie, le poumon, la voie gastro-intestinale et la peau. Les MSCs peuvent aussi se différencier en cellule musculaire lisse, cellule musculaire squelettique, cardiomyocyte, cellule endothéliale et même en cellule non-mésodermique telle qu'une cellule neuronale^{58 64}. Le micro-environnement et les cellules présentes affectent fortement le phénotype adopté par le MSC¹³.

Les MSCs sont prélevées des os de pattes arrières chez les souris et de la crête iliaque chez l'homme. Ces cellules sont parfois enrichies selon différentes méthodes avant d'être mises en culture. Après 24 à 72 heures, le milieu est échangé pour éliminer les cellules non adhérentes. En recherche, les MSCs proviennent idéalement de souris d'environ 6 à 10 semaines car les MSCs subissent des changements génétiques moléculaires lors de la vieillesse qui peuvent nuire à leur effet thérapeutique. De plus, sous l'âge de 6 semaines, la quantité de cellules prélevées est trop petite⁸⁶.

Avec leur vaste potentiel de différenciation, les MSCs peuvent être utilisées pour traiter une large gamme de pathologies dont la fibrose pulmonaire, les dommages à la moelle épinière et les problèmes cardiovasculaires. D'ailleurs les MSCs sécrètent des facteurs neurotrophiques qui favorisent la survie des cellules neuronales⁶⁴. Les MSCs peuvent servir de thérapie pour le GVHD, la maladie de Crohn, le diabète de type I, les infarctus du myocarde, la maladie pulmonaire obstructive chronique (MPOC), la sclérose latérale amyotrophique, la greffe de moelle, la leucodystrophie métachromatique, l'insuffisance rénale et l'ostéogenèse imparfaite⁵¹. Présentement, il y a 182 essais cliniques enregistrés au monde qui évaluent le potentiel thérapeutique des MSCs dans une multitude de pathologies (<http://clinicaltrials.gov/>)⁶⁷. Plus récemment,

des études suggèrent que les MSCs exercent leur effet par activité paracrine. Dans plusieurs études moins de 1% des MSCs injectées subsistaient dans la zone de dommages pour plus d'une semaine⁵¹. Des études au niveau du cœur et des accidents de moelle épinière démontrent que les facteurs neurotrophiques relâchés par les MSCs pourraient être la source du mécanisme de réparation⁶⁶. Effectivement, ces cellules stromales relâchent le facteur de croissance neuronale (NGF) et le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF). De plus, ces facteurs semblent exercer un effet pro-angiogénique sur les cellules endothéliales et induire le recrutement des précurseurs endothéliaux nécessaires à la néovascularisation²⁰. D'autres études récentes continuent de défendre le rôle de la différenciation et la fusion cellulaire comme mécanisme dans ces mêmes systèmes mais les cellules greffées sont souvent peu nombreuses⁵¹.

Une dernière caractéristique très importante des MSCs est leur propriété d'immunosuppression. Dès les premières études de greffe, il est devenu évident que les MSCs étaient immuno-privilegiées car aucune réjection immunitaire ne prenait place, même dans des cas de greffe allogénique⁵¹. D'autant plus, les MSCs possèdent des propriétés d'immunosuppression qui comprennent une inhibition de la prolifération des cellules T, cellules B et les cellules NK (« natural killer » ou tueuse naturelle) ainsi qu'une inhibition de sécrétion des facteurs pro-inflammatoires. D'ailleurs, les MSCs modifient leur profil de sécrétion selon la situation et l'environnement. En situation de stress, les MSCs augmentent la sécrétion de neurotrophines, chimiokines et cytokines. Ce relargage de facteurs trophiques peut moduler la réponse immunitaire et promouvoir la survie de cellules neuronales autant que endothéliales en initiant des cascades anti-apoptotiques. Au niveau immunitaire, les MSCs sécrètent plus d'IL-10, IL-6, IL-7, VEGF, RANTES et IL-1 α tout dépendant du stress initiateur⁸⁷. Une autre étude démontre que si l'on traite une dépression de la fonction du myocarde induite par LPS avec des MSCs, les niveaux des cytokines pro-inflammatoires TNF- α , IL-1 β et IL-6 diminuent significativement⁸⁸. Certaines études animales affirment qu'un traitement avec MSCs peut réduire l'inflammation de souris atteintes de septicémie en réduisant les

cytokines pro-inflammatoires. Les animaux traités faisaient preuve d'une diminution de dommage aux organes et une augmentation des chances de survie. Les auteurs ont suggéré un mécanisme où les MSCs atténuent la septicémie via une sécrétion de IL-10 des macrophages induite par la prostaglandine E2 ⁸⁹. Cette caractéristique immunosuppressive peut être avantageuse dans certains traitements mais peut aussi aggraver certaines pathologies et doit donc être considérée avec importance. Ainsi, l'utilité et l'effet des MSCs dans différents milieux restent à être complètement élucidés.

2.4. Effet des HSCs et MSCs sur les rétinopathies

Les MSCs semblent être une avenue de traitement intéressante pour les rétinopathies grâce à leur effet anti-inflammatoire combiné à leur effet anti-apoptotique. Cette approche pourrait stabiliser le milieu rétinien et permettre une revascularisation saine. Afin de déterminer le niveau d'impact des MSCs dans le modèle de RIO, l'effet des MSCs a été comparé aux HSCs. Tout d'abord, ces deux types cellulaires ont été isolés et caractérisés. On a ensuite comparé leur migration et leur effet dans le modèle de RIO afin de déterminer si les MSCs pourraient être un outil thérapeutique pour les rétinopathies de prolifération.

Matériels et Méthodes

Animaux

Toutes procédures et manipulations effectuées sur des animaux ont reçus l'approbation du Comité institutionnel de bonnes pratiques animales en recherche (CIBPAR) du CHU Sainte-Justine, en vertu de la loi de 1968-69 sur les animaux utilisés en recherche et avec les recommandations du Conseil canadien de protection des animaux (CCPA).

Modèle de RIO

Les souriceaux C57Bl/6 ont été placés avec une mère CD1 adoptive allaitante au jour post-natal 5 (P5) car celles-ci sont moins portées au cannibalisme en hyperoxie. Ensuite, ces portées ont été placées dans une chambre hyperoxique avec un flux stable de $75\pm 2\%$ d'oxygène de P7 à P12. Comme les mères sont plus susceptibles que les petits aux effets toxiques de l'oxygène, elles sont échangées entre les cages normoxiques et hyperoxiques à chaque jour. Au jour post-natal 12, les portées sont retournées en normoxie, soit 21% d'oxygène. Au jour post-natal 17, où la néovascularisation est à son maximum, les souriceaux sont sacrifiés, les yeux énucléés et préparés afin d'analyser leur rétine. Le poids des souriceaux a été pris en considération afin d'exclure les souris sous-développées éliminant ainsi la différence de gain de poids comme variable (Stahl et al. 2010)

Préparation de cellules (HSC et MSC)

(HSC) Des souris C57Bl6 mutante GFP (TgUBCGFP30Scha/J Jackson Laboratory #004353) de 6 à 8 semaines ont été sacrifiées par CO₂. Les pattes arrières ont été désarticulées et nettoyées jusqu'à l'os à l'aide de ciseau et scalpel. Les os sont ensuite rapidement stérilisés dans de l'éthanol 70% et rincés dans la solution de tampon (PBS 1X, 2%FBS 1mM EDTA). Utilisant une seringue de 10cc contenant la solution de tampon, les cellules de la cavité interne (moelle) sont évacuées des deux côtés de l'os jusqu'à ce que l'os devienne blanc. Les cellules mononuclées sont séparées à l'aide de

centrifugation par gradient de densité avec le Ficoll (Stem Cell Technologies). Une sélection négative a ensuite été effectuée avec des anticorps de cellules hématopoïétiques conjugués à la biotine incubés avec des billes magnétiques anti-biotine (Mouse Hematopoietic Progenitor Enrichment Kit, Stem Cell Technologies). Les cellules ont été triées avec un aimant afin d'obtenir une population de cellules hématopoïétiques immatures (HSC ou Lin⁻). Ces cellules sont injectées immédiatement dans le modèle de RIO (**fig. 9A**).

(MSC) Des souris C57Bl6 mutante GFP (TgUBCGFP30Scha/J Jackson Laboratory #004353) de 6 à 8 semaines ont été sacrifiées par CO₂. Les pattes arrières ont été désarticulées et nettoyées jusqu'à l'os à l'aide de ciseau et scalpel. Les os sont ensuite rapidement stérilisés dans de l'éthanol 70% et rincés dans la solution de tampon (PBS 1X, 2%FBS 1mM EDTA). Les os ont été écrasés et rincés afin d'éliminer les cellules de la cavité de la moelle. Ils ont ensuite été digérés avec la collagénase type I de *Clostridium histolyticum* (Sigma-Aldrich) pour faire relâcher les MSCs qui sont isolés par filtration sur un filtre de 40µm. Ces cellules ont été mises en culture avec du Mesencult complet (Stem Cell Technologies) et le milieu a été échangé après 72hrs permettant aux MSCs d'adhérer au plastique ainsi que d'éliminer les cellules contaminantes. (**fig. 9B**).

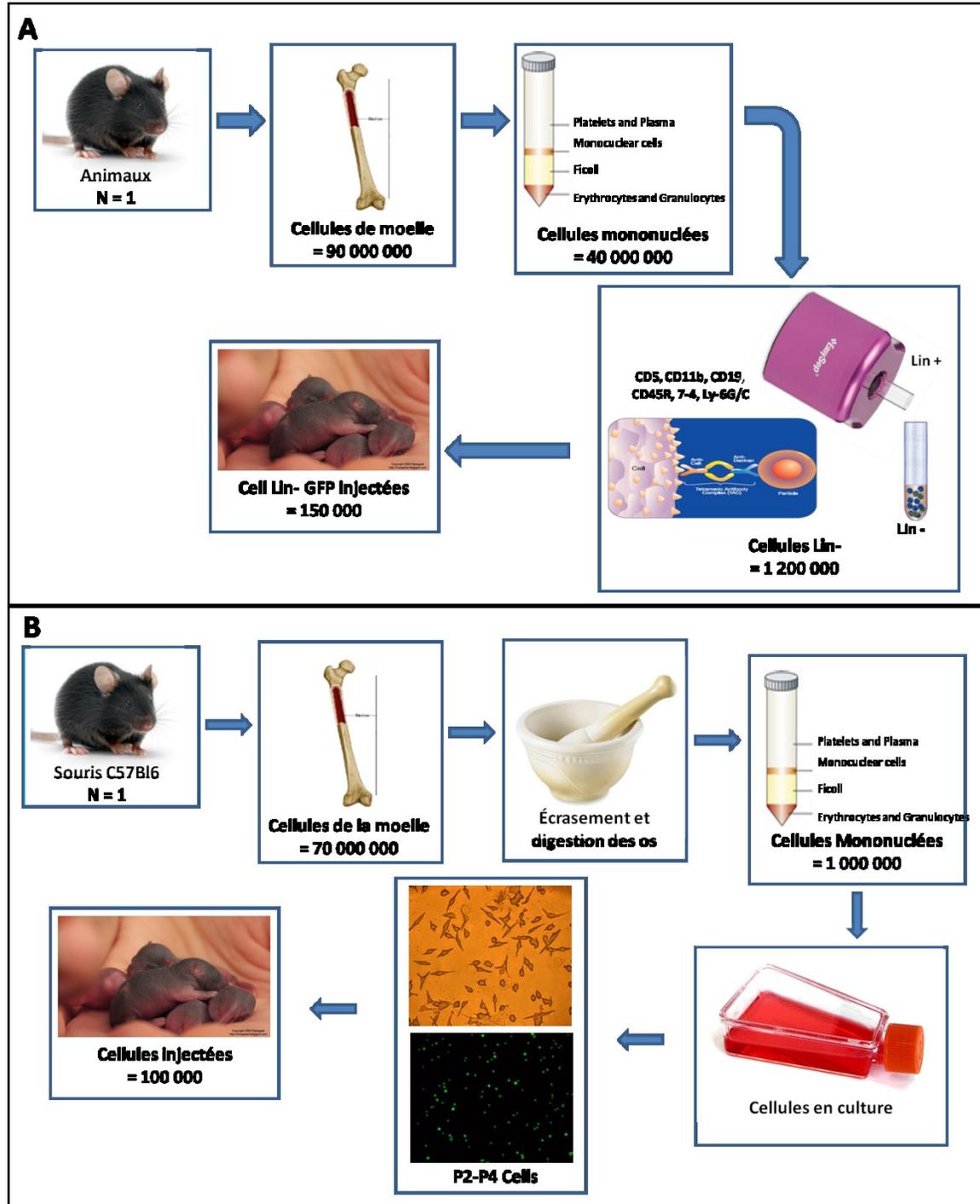


Figure 9. Méthode d'isolation des cellules souches de la moelle osseuse. (A) Afin d'isoler des HSC, on sacrifie une souris C57BL/6 GFP pour obtenir les os de pattes arrières (iliaque, fémur et tibia). Utilisant une aiguille et une seringue on évacue les cellules de la cavité de la moelle. Les cellules mononuclées

sont ensuite isolées par centrifugation par gradient de densité avec le Ficoll. Les cellules matures (Lin+) sont éliminées à l'aide d'une séparation magnétique de billes magnétiques liées à des anticorps dirigés contre des marqueurs de cellules matures (CD5, CD11b, CD19, CD45R, 7-4, Ly-6G/C. Les cellules Lin- sont enfin injectées dans le vitré de souriceaux. **(B)** Afin d'isoler des MSC, on sacrifie une souris C57BL/6 GFP pour obtenir les os de pattes arrières (iliaque, fémur et tibia). Ces os sont écrasés et digérés par la collagénase pour permettre le détachement des MSC des os. Les cellules mononuclées sont ensuite isolées par centrifugation par gradient de densité avec le Ficoll. Ces cellules sont mises en culture et subissent environ 2 passages avant d'être injectées dans le vitré de souriceaux.

Caractérisation des cellules souches par analyse FACS

Le phénotype des cellules souches Lin- a été analysé par cytométrie en flux à 2 couleurs. Les cellules ont été marquées avec CKIT-APC (Biolegend) et SCA1-FITC (Biolegend) pour 30 minutes à 4°C après avoir été lavées avec 100 ul de PBS+2%FBS+1mM EDTA pour 10 minutes à température ambiante. Ils ont ensuite été lavés 3 fois de plus avec PBS+2%FBS+1mM EDTA. Les cellules marquées ont été analysées par un FACSCalibur (BD Biosciences). Les données ont été analysées à l'aide du logiciel Macintosh CELL Quest.

Caractérisation des MSCs par essai de différenciation

Le potentiel de différenciation des MSCs a été évalué à l'aide de 2 essais de différenciation. Dans le premier, un supplément qui comprend de l'hydrocortisone, de l'isobutylméthylxanthine et de l'indométacine (R & D Systems) a été ajouté aux MSCs pendant 14 jours afin de les différencier en adipocyte. L'identité des adipocytes a ensuite été confirmée après un marquage avec FABP4 (R & D Systems) et DAPI (Molecular Probes). Pour le deuxième essai, nous avons eu recours à un supplément comprenant de l'ascorbate-phosphate, du B-glycérophosphate et du BMP-2 recombinant humain (R & D Systems) pendant 21 jours afin de différencier les MSCs en ostéocytes. Les ostéocytes ont été identifiés après un marquage à l'ostéopontin (R & D Systems) et le DAPI (Molecular Probes).

CFU-F Assay

Les essais CFU-F ont été effectués à partir de cellules souches mésenchymateuses (voir préparation de cellules) de souris C57Bl/6. Les MSCs isolées ont immédiatement été mises en culture dans des plaques à 6 puits à trois différentes densités (1000, 5000 et 10000 cellules/cm²) en duplicatas dans du milieu de Mesencult complet (Stem Cell Technologies). Celles-ci ont ensuite soit été incubés en normoxie à 21% d'oxygène et 5% de dioxyde de carbone ou soit en hypoxie à 5% d'oxygène et 5% de dioxyde de carbone pour 13 jours sans changement de milieu. Au treizième jour, les cellules ont été marquées avec le HEMA 3 Stain Set (Fisher Diagnostics). Les colonies de cellules sont visualisées et comptées sous un microscope inversé à contraste de phase (Eclipse TE300, Nikon)

Mise en culture des MSCs

Les MSCs une fois en culture ont été mises en normoxie (21% d'oxygène) ou en hypoxie (5% d'oxygène) selon le cas. Le milieu de culture a été échangé pour du milieu frais à tous les 2 à 3 jours. Lorsque les MSCs atteignaient une confluence de plus de 80% celles-ci sont sous-cultivées. Ces cellules ont subi 1 à 2 passages avant d'être injectées dans le modèle de RIO. De plus, pour les expériences d'analyse protéique, les MSCs ont aussi subis un traitement pro-inflammatoire d'IL-1 β 10 ng/ml pendant 24hrs avant d'être collectées pour l'analyse.

Explants d'aorte

Des souris de 6 à 10 semaines ont été anesthésiées et perfusées avec de la saline jusqu'à ce que le sang soit tout évacué. L'aorte a été prélevée (sevrée au niveau de la crosse aortique et le début de l'aorte abdominale) et dégagée des tissus adipeux et conjonctifs adjacents. L'aorte a ensuite été sectionnée de façon transversale en segments de 1mm et transférée dans un pétrole à 24 puits. Les segments ont été recouverts de Matrigel réduit de facteurs de croissances (BD Biosciences) et mis en culture avec du EBM 10% FBS pour 72 heures. Un traitement de MSC (50 000,

100 000, 200 000 cellules dans du Mesencult complet), ou de milieu de culture conditionné de MSCs (poussées en hypoxie-5% ou en normoxie-21% dans du DMEM pendant 24 heures) a été ajouté aux explants ainsi que du Mesencult et du DMEM comme contrôle respectif. La croissance aortique a été visualisée 24 et 48 heures après le traitement à l'aide d'un microscope inversé à contraste de phase (Eclipse TE300, Nikon). Les explants ne faisant preuve d'aucune croissance après 72hrs ont été exclus.

Concentration de milieu de culture de MSCs pour injection

Des MSCs ont été isolées de souris C57Bl/6 et cultivées soit en normoxie (21% oxygène) ou hypoxie (5% oxygène) dans du Mesencult complet. Après 1 à 2 passage, lorsque les cellules sont de 80-95% confluentes, les cellules ont été lavées trois fois pour enlever le sérum afin de changer le milieu à du DMEM sans sérum. Après 24 heures, ce milieu sans sérum est collecté et filtré pour éliminer les cellules et débris cellulaire. La solution a ensuite été concentrée 40 fois par l'entremise d'un centrifugeur de 5kDa (Millipore).

Injections intra vitréennes

Les animaux soumis aux modèles de RIO ont reçu des injections intravitréennes de 1µl de traitement de cellules ou de milieu de culture à l'aide d'une seringue de 10µl Hamilton pourvu d'un capillaire de verre étiré alors qu'ils étaient anesthésiés sous isoflurane 3%. Plus spécifiquement, les souris ont soit été injectées avec une suspension de 50000 à 150000 cellules (soit MSC ou Lin-) dans 1ul de PBS 0.5% BSA 2mM EDTA ou du milieu de culture concentré de MSCs poussées en normoxie ou en hypoxie. Ces souris ont aussi reçu une injection de 1ul de PBS 0.5% BSA 2mM EDTA ou de DMEM selon le cas dans l'œil controlatéral comme témoin. Ces injections ont été effectuées au jour P7 ou P12.

Montage à plat

L'état vasculaire de la rétine a été évalué par montage à plat. Au jour P12 ou P17, les souris ont été sacrifiées et énucléées. Les yeux ont été fixés dans le paraformaldéhyde 4% pendant 1.5hrs à 4°C. La rétine a ensuite été séparée du globe oculaire et des autres tissus de l'œil, perméabilisée avec du méthanol d'abord et ensuite marquer avec la lectine *Griffonia simplicifolia* (GS lectine) conjuguée au TRITC (Sigma-Aldrich, cat : L5264). Les montages à plat ont visualisés avec un microscope à fluorescence (Nikon Eclipse, E800) et un microscope confocal (Zeiss LSM5)

Cryosections

La localisation et la nature des cellules injectées ont été évaluées par immunohistochimie sur des cryosections d'yeux (12 µm d'épaisseur) à l'aide de microscope à épifluorescence (Nikon Eclipse, E800) et microscope confocal (Zeiss LSM5). Les animaux ont été perfusés d'abord avec du PBS et ensuite avec du paraformaldéhyde 4% avant d'énucléer les yeux. Les yeux ont été fixés dans du paraformaldéhyde 4% pour 4 heures, incubés avec dans une solution de sucrose 30% pour 18 heures à 4°C, inclus dans de l'OCT et sectionnés. Les sections ont ensuite été lavées avec du PBS et bloquées avec du PBS 1% BSA et 1% Triton. Les cryosections ont été marquées avec le DAPI (Molecular Probes).

Transcription inverse et l'amplification en chaîne par polymérase en temps réel (RT-PCR)

De l'ARN provenant de MSCs en culture ainsi que de la partie centrale de rétine ont été obtenus en utilisant le TRizol (Invitrogen) suivi d'un traitement à la DNase I (QIAGEN) afin d'enlever les contaminants d'ADN. Pour l'ARN rétinien, les yeux de souris P14 traitées et contrôles ont été énucléés rapidement, la rétine centrale découpée et séparée de la rétine périphérique. L'ARN a ensuite été converti en cDNA utilisant la M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen). Des amorces de souris pour le VEGFA, FGF2, IL-10, IL-1β et IL-1ra ont été construites à l'aide du Primer Bank puis le software

NCBI Primer Blast. L'analyse quantitative de l'expression génique a été réalisée avec un ABI Prism 7700 Sequence Detections System et le SYBR Green Master mix kit (BioRad). Les valeurs de chaque gène ont été normalisées avec les niveaux d'expression de 18S (18S Universal Primers - Ambion). Les paires d'amorces utilisées (sens/antisens) sont les suivantes: IL-10, GCT CTT ACT GAC TGG CAT GAG / CGC AGC TCT AGG AGC ATG TG (produit PCR de 105 paires de bases); IL-1 β , CTG GTA CAT CAG CAC CTC ACA / GAGCTC CTT AAC ATG CCC TG (produit PCR de 155 paires de bases); IL-1ra, GCT CAT TGC TGG GTA CTT ACA A / CCA GAC TTG GCA CAA GAC AGG (produit PCR de 132 paires de bases) ; VEGFA, GCC CTG AGT CAA GAG GAC AG / CTC CTA GGC CCC TCA GAA GT (produit PCR de 215 paires de bases); FGF2, GCG ACC CAC ACG TCA AAC TA / TCC CTT GAT AGA CAC ACC TCC TC (produit PCR de 62 paires de bases)

Imagerie et analyse d'image

Des images partielles des montages à plat marquées avec GS lectine ont été prises avec grossissement de 4X sur un microscope à épifluorescence (Nikon Eclipse, E800) et importées dans Adobe Photoshop. Les images partielles ont été fusionnées pour produire une image de la rétine entière en ayant recourt à la fonction « automated photomerge » de Adobe Photoshop (CS3). L'aire de la rétine totale ainsi que l'aire avasculaire ont été tracées dans ImageJ et le nombre de pixels calculés. L'aire de néovascularisation a été calculée à l'aide d'une macro qui permet de sélectionner par contraste les bourgeonnements vitréens de la rétine, une technique décrite par *Stahl et al* (2009). Parallèlement, l'aire de croissance aortique et de l'aorte totale ont aussi été calculées de la même façon dans ImageJ avec des photos à 2X prises avec le microscope inversé à contraste de phase (Eclipse TE300, Nikon).

Analyse statistique

Les données sont présentées comme moyennes \pm SEM. La comparaison entre les groupes a été effectuée utilisant le Student T-test (pour 2 groupes seulement) ou le ANOVA (3 groupes ou plus). $P < 0.05$ était considéré comme statistiquement significatif.

Résultats

Les cellules Lin- expriment les marqueurs de cellules souches hématopoïétiques SCA1 et CKIT

Les cellules souches hématopoïétiques de souris n'ont pas un marqueur unique pour les identifier. Alors que le CD34 est un marqueur de HSC dans l'humain, l'expression de cet épitope est plutôt variable chez la souris. Ainsi, les marqueurs stem cell antigen 1 (Sca1), stem cell growth factor receptor (c-Kit) et Thy-1 sont de meilleurs marqueurs pour les HSC chez la souris⁹⁰⁻⁹². Afin de confirmer la nature des cellules Lin- et confirmer leur potentiel comme cellules souches hématopoïétiques, nous avons procédé à une analyse par FACS pour les marqueurs Sca1 et c-Kit.

Nous avons analysé l'expression de ces marqueurs dans chaque fraction cellulaire des étapes d'isolation des cellules Lin-. Une petite population des cellules de moelle exprimait ces marqueurs; soit 7,577% et 13,58% pour Sca-1 et c-Kit respectivement (**fig. 10 A**). Leur niveau d'expression a augmenté quelque peu dans la fraction de cellules mononuclées (**fig. 10 B**) pour enfin être beaucoup plus enrichi dans la fraction de cellules Lin- (**fig. 10 C**). L'expression de c-Kit est 4.2 fois plus haute chez les cellules Lin- que les cellules de la moelle complète (**fig. 10 F; p<0,01**). L'expression de Sca1 est beaucoup plus variable d'une souris à une autre dans les cellules Lin- mais il semble tout de même avoir un enrichissement (**fig. 10 D**). Tout compte fait, une portion des cellules Lin- expriment le Sca-1 et le cKit (**fig. 10 E,G**) indiquant que cette fraction cellulaire contient une population hétérogène qui comprend des HSCs.

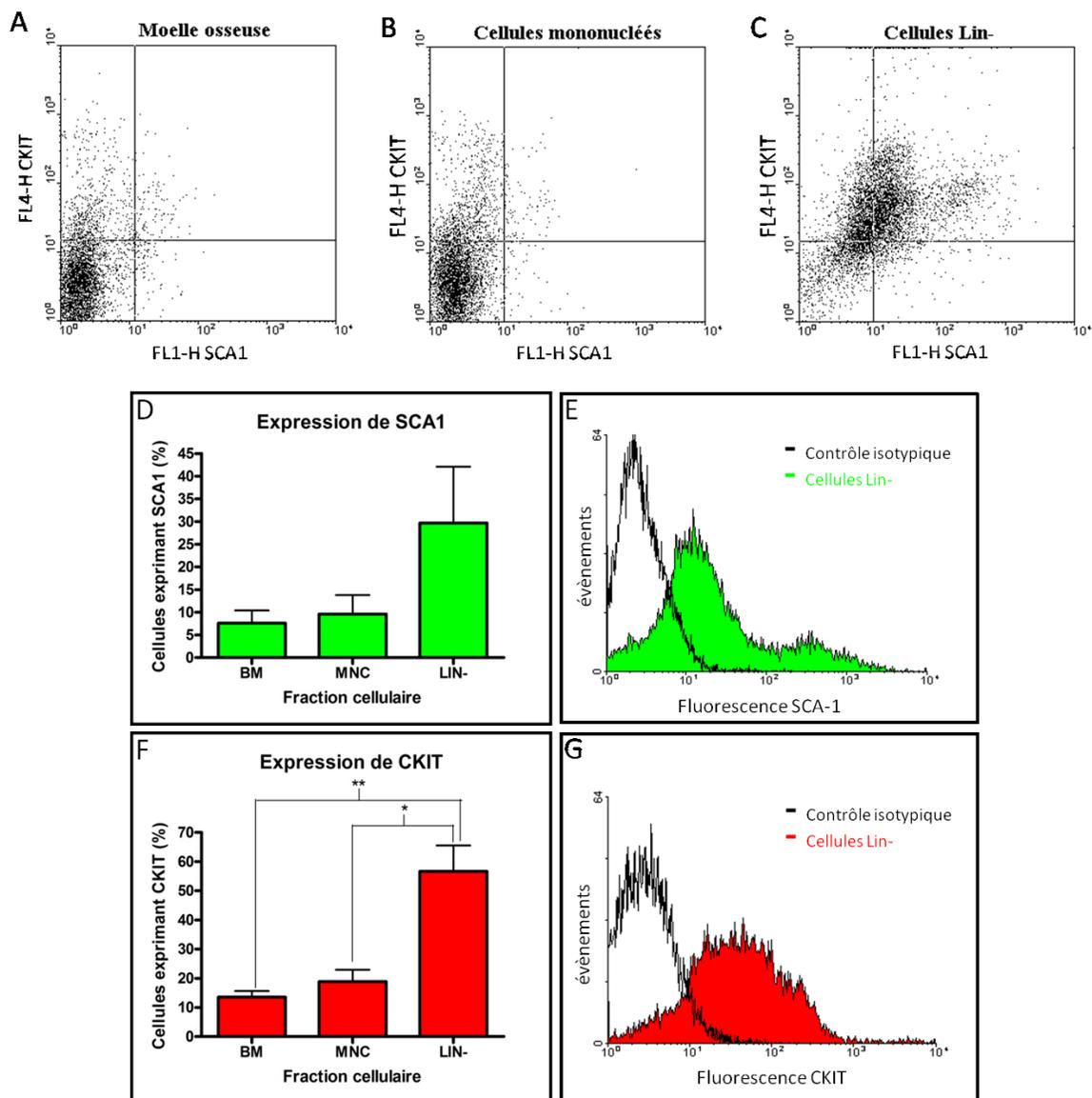


Figure 10. *Expression de marqueurs HSC*. Une analyse par FACS a été effectuée en utilisant les anticorps SCA1 (A et B) et CKIT (C et D) conjugués aux fluorochromes FITC et APC respectivement. L'expression des anticorps SCA1 et CKIT augmente à chaque étape de purification entre la moelle osseuse – BM (E), les cellules mononuclées – MNC (F) et les cellules Lin- (B,D,G). $n=3$ * $p<0.05$, ** $p<0.01$

Les MSCs forment plus de « colony forming unit fibroblast » lorsqu'ils poussent en hypoxie

Afin de déterminer le potentiel des cellules souches, nous avons effectué des essais CFU-F sur les MSCs isolées. Ce genre d'essai permet de quantifier les MSCs fonctionnels présents dans la fraction isolée de la moelle. Lorsque les cellules de moelle ont été mises en culture pendant 13 jours, des colonies fibroblastiques formaient autour d'un centre où le MSC original se retrouvait (**Fig. 11 A**). Les essais CFU-F en normoxie contenaient environ 1,65 colonies par 10 000 cellules de moelle. Les CFU-F en hypoxie (5% d'oxygène) formaient 3,492 colonies par 10 000 cellules, soit plus de deux fois le nombre de colonies en normoxie (**Fig. 11 C; p < 0,0001**). Ceci suggère une plus grande prolifération chez les MSCs lorsqu'ils sont en milieu hypoxique; une observation déjà validée dans la littérature^{93 94}. Conséquemment, la culture de MSCs a été accomplie en milieu hypoxique (5% oxygène, 5% dioxyde de carbone, 90% azote) par défaut si non spécifié.

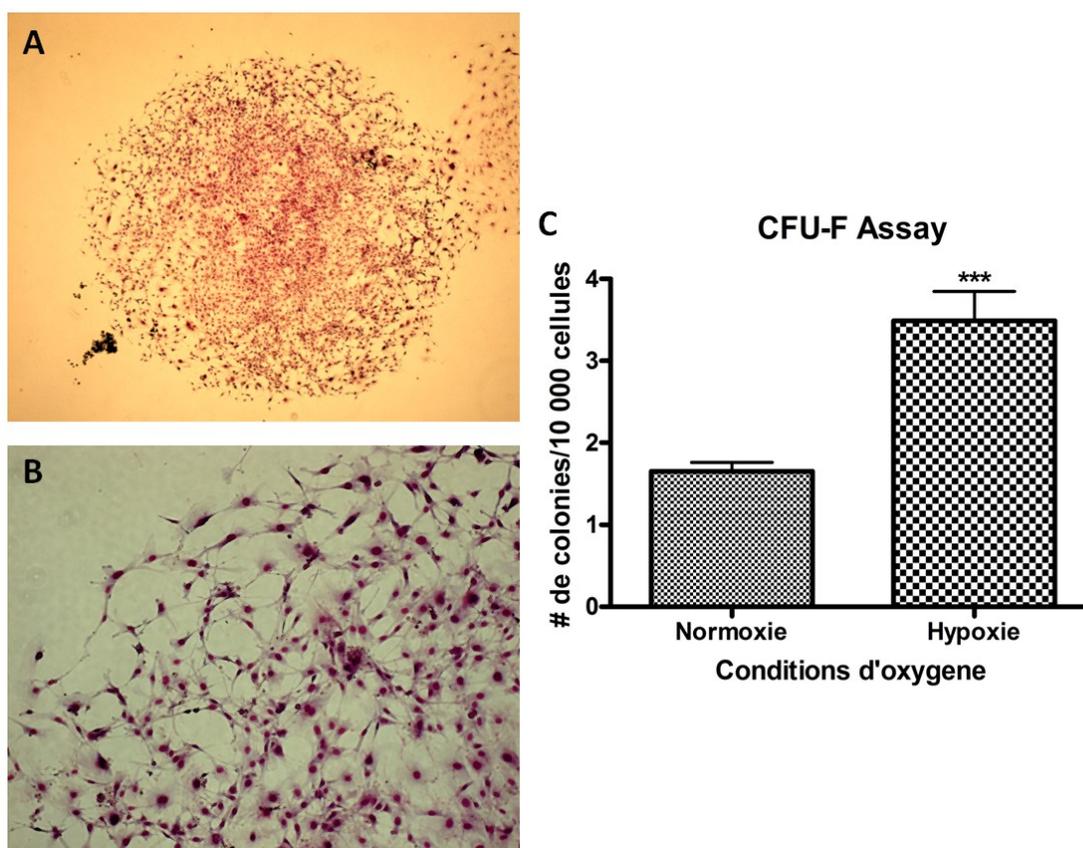


Figure 11. *CFU-F Assay*. Le « Colony Forming Unit Fibroblast Assay » est un essai qui permet d'identifier la présence de MSC ainsi que de quantifier le potentiel de cellules souches avec la quantité des colonies. Les cellules ont été fixées et marquées avec le HEMA 3 stain pour pouvoir visualiser les colonies (A) ainsi que la morphologie fibroblastique des colonies (B). Lorsque les cellules sont poussées en hypoxie (5% d'oxygène) versus normoxie (21% d'oxygène) la quantité de colonie double en conséquence (C). (mean±SEM,***p<0.0001 comparé au contrôle normoxique; compilation de n= 12 essais)

Les MSCs peuvent se sous-différencier en adipocytes et ostéocytes

Selon *l'International Society for Cellular Therapy*⁴⁵, un des critères d'inclusion pour les MSCs est le potentiel de différenciation en adipocyte, ostéocyte et chondrocyte. En plaçant les MSCs sous des conditions spécifiques *in vitro*, nous avons pu modifier le phénotype de ceux-ci. Après 14 jours en culture avec un milieu pro-adipocytaire, les cellules expriment le FABP4, un marqueur spécifique des adipocytes (Fig. 12 A-C).

Après 21 jours dans un milieu pro-ostéocyte, les cellules expriment l'ostéopontine, un marqueur d'ostéocyte (**Fig. 12 D-F**).

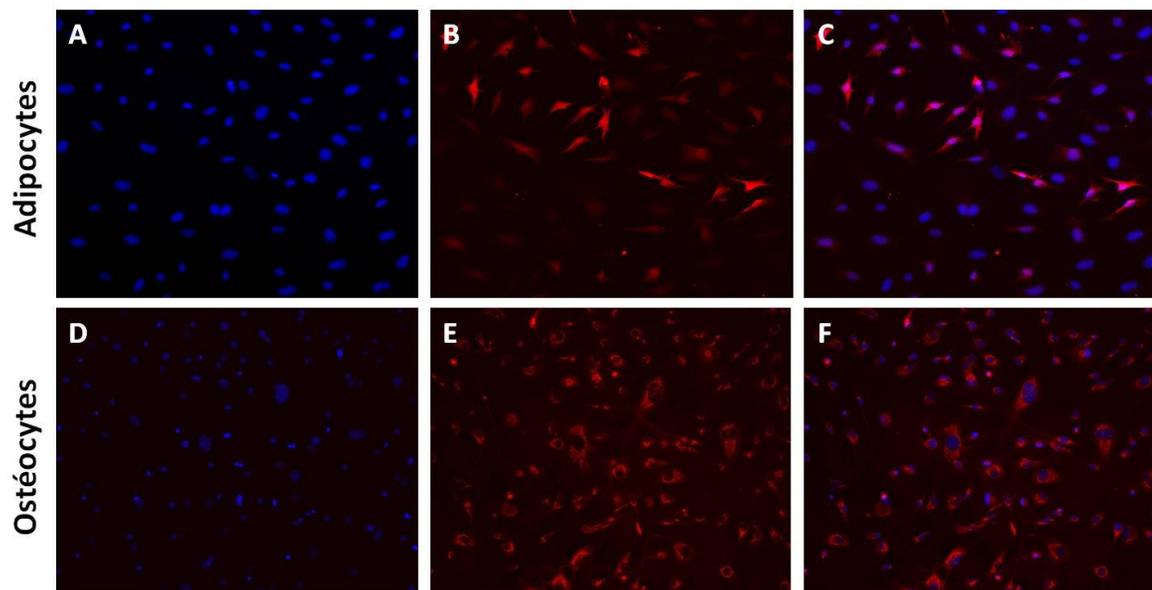


Figure 12. *Différenciation des MSCs*. Les MSC peuvent se différencier en adipocytes ou ostéocytes s'ils sont mis dans un milieu de culture supplémenté de certains facteurs de croissance. Les MSC différenciées en adipocytes (A,B,C) sont identifiées à l'aide d'un anticorps contre le FABP4 (B) tandis que les ostéocytes (D,E,F) sont identifiés avec un anticorps contre l'ostéopontin (E), puis tous deux avec l'anticorps secondaire Alexa Fluor 594. Les noyaux des cellules ont été marqués avec le DAPI (A,D).

Les cellules Lin⁻ et les MSCs migrent et s'intègrent dans la rétine lorsqu'injectées dans des souris RIO

Dans le but d'investiguer l'intégration des cellules dans la rétine, nous avons injecté les deux types cellulaires dans des souris soumis au modèle de RIO. Les cellules Lin⁻ et les MSCs ont été isolées de souris transgénique GFP afin qu'on puisse observer le sort de ces cellules après injection. Celles-ci ont été injectées à P12 dans le vitré des souris, puis les rétines analysées à P17. Sur les montages à plat comme les sections de rétine, on pouvait identifier des cellules exprimant le GFP. Sur les sections de rétine nous avons remarqué que la majorité des cellules migraient à la couche de cellules ganglionnaires et quelques une jusqu'à la couche plexiforme interne (**fig. 13 A-E**), mais

aucune cellule a été trouvée dans la rétine externe. Les cellules injectées se retrouvaient donc dans la couche superficielle où se retrouve la vasculature rétinienne. De plus, les cellules injectées s'établissaient proche de la vasculature parfois même de façon périvasculaire comme on peut voir sur les montages à plat de rétines (**fig. 14 A-E**), indiquant une relation potentielle avec la microvasculature.

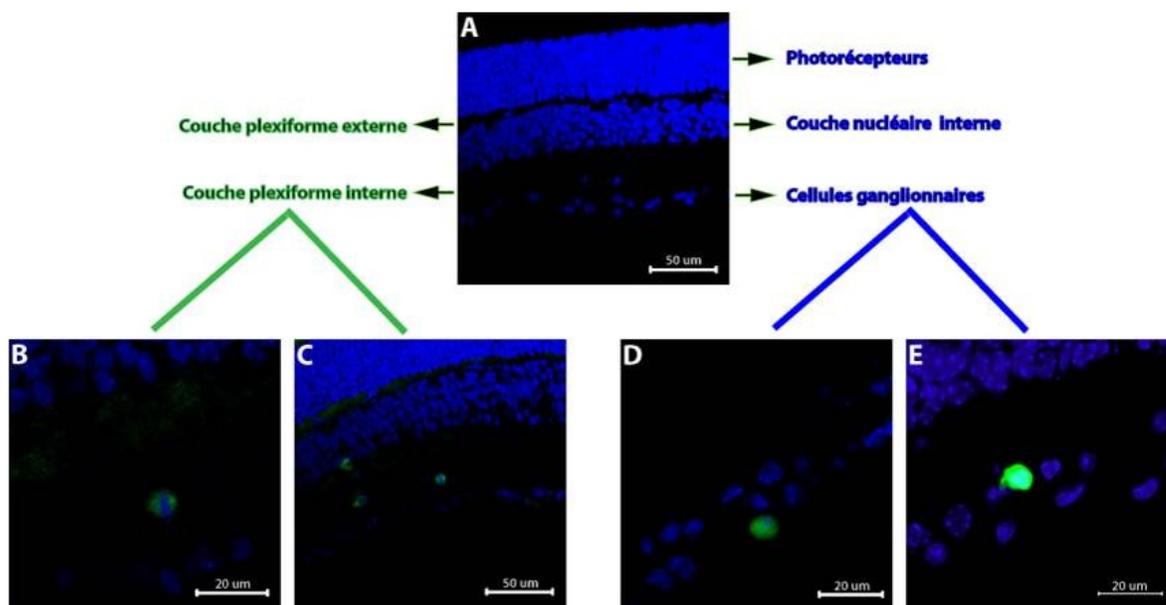


Figure 13. *Migration des cellules à la rétine interne.* Des souris C57BL/6 soumises au modèle de RIO ont été injectées à P12 avec 150 000 cellules souches (Lin- ou MSC) dans le vitré de l'œil. Ces cellules qui expriment le GFP (vert) migrent du corps vitré à la rétine interne. Plus spécifiquement, les cellules injectées se retrouvent au niveau de la couche plexiforme interne (B : cellules Lin-, C : MSC) ainsi que la couche de cellules ganglionnaires (D : cellules Lin-, E : MSC). Les rétines des souris ont été récupérées à P17, sectionnées (12µm) puis marquées au DAPI.

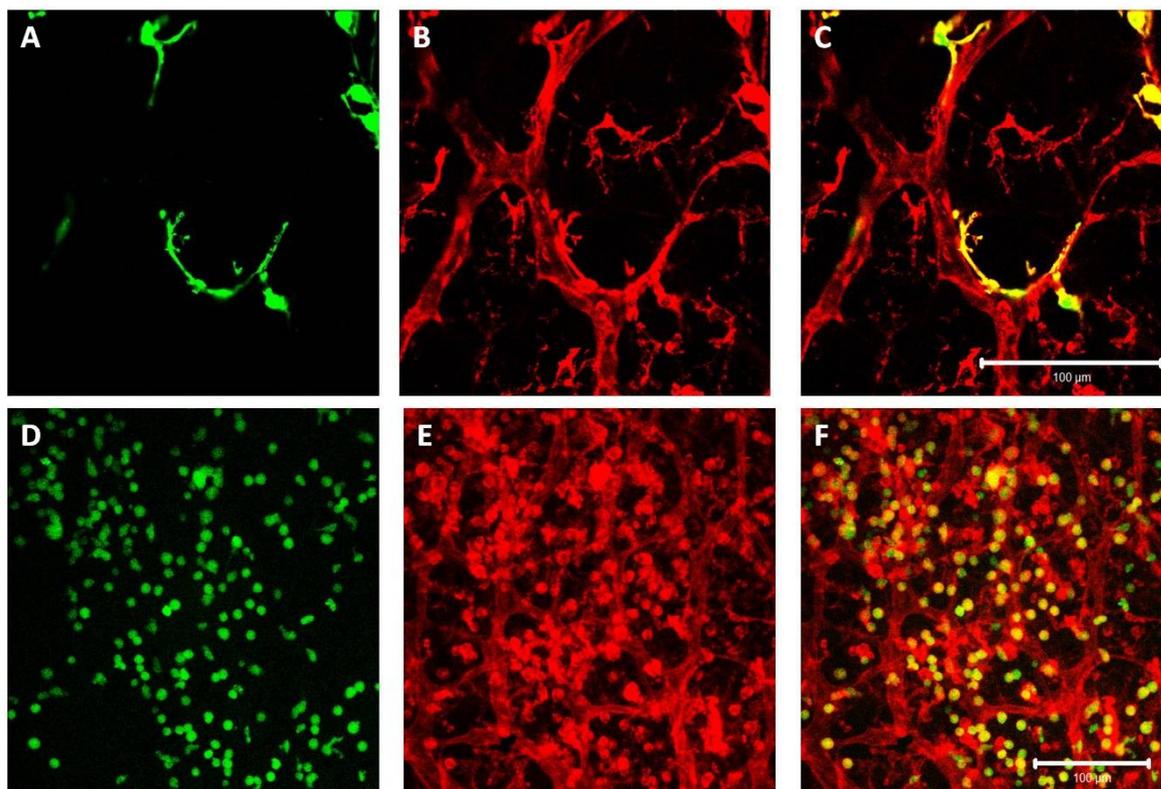


Figure 14. *Migration des cellules vers la vasculature.* Des souris C57BL/6 soumis au modèle de RIO ont été injectées à P12 avec 150 000 cellules souches (Lin- ou MSC) dans le vitré de l'œil. Les cellules, qui expriment le GFP (A,D) se retrouvent en proximité de la vasculature marqué à la lectine (B,E). Certaines des cellules adoptent une morphologie périvasculaire (C), alors que la majorité garde une morphologie circulaire. Les rétines de souris ont été récupérées à P17, marquées à la lectine TRITC et visualisées par montage à plat.

Les MSCs induisent une revascularisation lorsqu'injectées dans le modèle de RIO après l'insulte d'hyperoxie

Due au potentiel régénérateur des cellules souches, nous avons injecté celles-ci dans le modèle de RIO. Afin de déterminer si ces cellules peuvent avoir un effet préventif sur l'insulte de radicaux libres durant la phase d'hyperoxie, nous avons effectué des injections à P7, soit avant l'hyperoxie. Lorsque les rétines de ces souris ont été analysées par montage à plat à P12, après l'hyperoxie, la zone centrale de destruction était semblable entre les rétines contrôles et les rétines traitées avec cellules Lin- (**fig. 15**

B,C). La zone avasculaire des rétines traitées avec les MSCs était un peu diminuée comparé au contrôle mais pas de façon significative (**fig. 15 D; p=0,0656**). Comme deuxième expérience, nous avons effectué des injections à P12, soit après l'insulte, pour voir si ce traitement pouvait aider à la revascularisation. Les rétines traitées à P12 ont été analysées par montage à plat au jour P17. Les rétines contrôles développaient une zone avasculaire qui représentait environ 9,935 % de l'aire de la rétine en question (**fig. 15 E**). Certaines des rétines traitées avec des cellules Lin⁻ semblaient avoir une réduction de la zone vasculaire (**fig. 15 F**) mais non significative alors que la zone avasculaire des rétines traitées avec MSC était trois fois plus petite (**fig. 15 G; p<0,0001**).

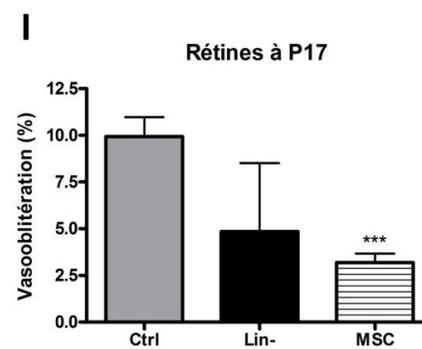
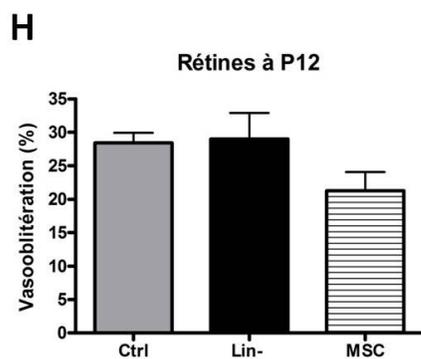
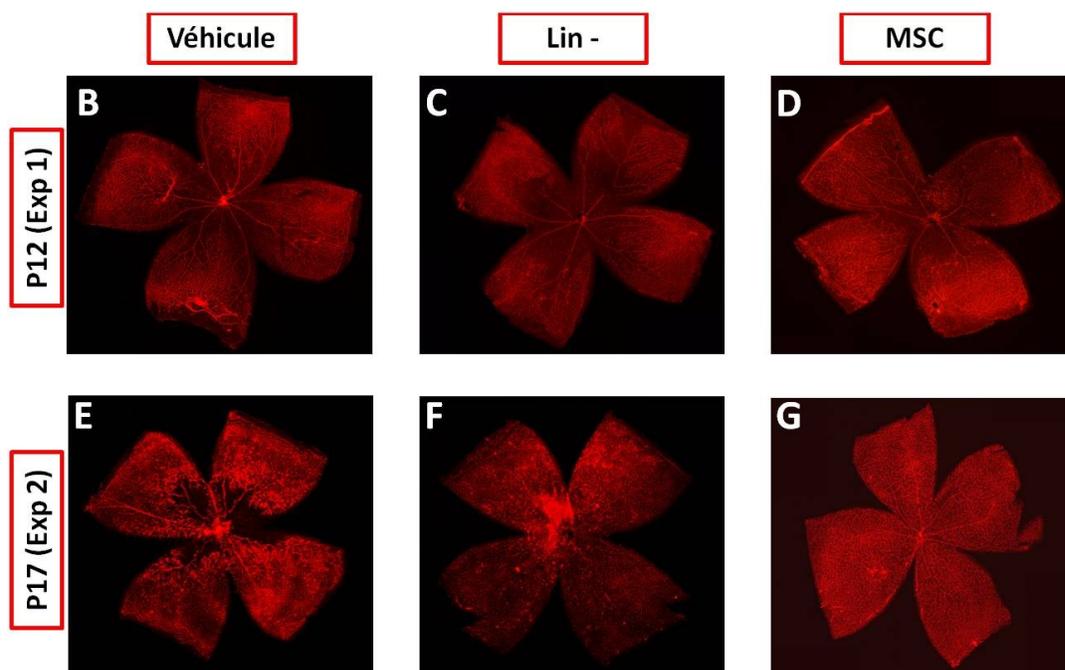
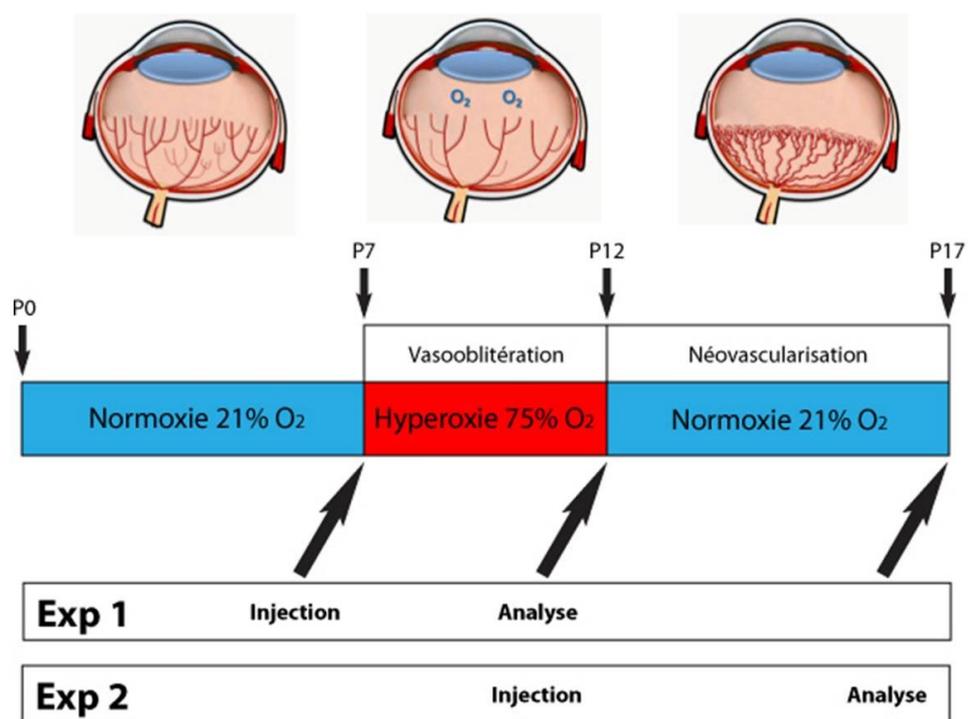


Figure 15. *Injection de cellules souches dans le modèle de RIO.* **(B,C,D,H)** Des souris C57BL/6 soumis au modèle de RIO ont été injectées à P7 (avant l'insulte d'hyperoxie) avec soit 150 000 cellules souches Lin- ou MSC et le véhicule d'injection dans le vitré de l'œil controlatéral. Les rétines contrôles (B) développent une zone de vaso-oblitération qui est évidente à P12, soit après avoir été exposées à l'hyperoxie. Les rétines traitées avec des cellules Lin- (C) ont une zone de taille similaire alors que les rétines traitées avec des MSC (D) semblent avoir une petite réduction non significative de la zone. Les rétines de souris ont été récupérées à P12, marquées à la lectine TRITC et visualisées par montage à plat. **(E,F,G,I)** Des souris C57BL/6 soumis au modèle de RIO ont été injectées à P12 (après l'insulte d'hyperoxie) avec soit 150 000 cellules souches Lin- ou MSC et le véhicule d'injection dans le vitré de l'œil controlatéral. Les rétines contrôles (E) ont toujours une zone de vaso-oblitération à P17 alors que les rétines traitées avec des cellules Lin- (F) semblent avoir une plus petite zone de vaso-oblitération mais non significative. Les rétines traitées avec des MSCs (G) font preuve d'une réduction significative de la zone d'oblitération. Les rétines de souris ont été récupérées à P17, marquées à la lectine TRITC et visualisées par montage à plat. (mean±SEM, ***p<0.0001 comparé au contrôle injecté avec véhicule; H n=9-5-2, I n= 15-4-14)

Les MSCs ont un potentiel pro-angiogénique qui est généré par l'entremise de facteurs relâchés.

L'effet revasculateur des MSCs nous a poussés à confirmer le potentiel angiogénique des MSC *in vitro*. Nous avons effectué des essais d'explants d'aorte nous permettant d'analyser l'effet pro-angiogénique des MSCs. Les explants d'aorte traités avec 10 000 MSCs semblaient avoir tendance à développer une plus grande formation de tubes, signe de croissance aortique. Plus spécifiquement, les explants traités avec 10 000 MSCs dans du DMEM développaient une croissance aortique d'environ 140,1 % (en relation avec la grosseur de l'explant) (**fig. 16 C; p>0,05**) versus 63,54 % pour les aortes contrôles traités avec seulement du DMEM (**fig. 16 B**). Cependant, seulement quelques MSCs prenaient la forme allongée des tubes dans la croissance aortique indiquant que l'effet angiogénique ne provenait pas entièrement de la différenciation des MSCs. Conséquemment, nous avons étudié l'effet du milieu de culture (MdC) des MSCs sur les explants d'aorte dans le but d'analyser l'effet des facteurs relâchés par ces cellules. Nous avons traité les explants d'aorte soit avec du milieu de culture de MSCs en hypoxie (5% d'oxygène) ou du milieu de culture de MSCs en normoxie (21%

d'oxygène) afin de comparer l'effet des facteurs relâchés par les MSCs en différentes conditions. La croissance aortique des explants traités avec du MdC MSCs normoxiques étaient presque trois fois plus grande que celle des explants contrôles (**fig. 16 D; $p < 0,05$**). Le traitement avec MdC MSCs hypoxiques induisait une encore plus grande croissance aortique d'environ 266,6%, soit quatre fois plus grande que le contrôle (**fig. 16 E; $p < 0,01$**). Les MSCs ont donc un plus grand effet pro-angiogénique paracrine lorsque ces cellules sont exposées à de basse concentration d'oxygène.

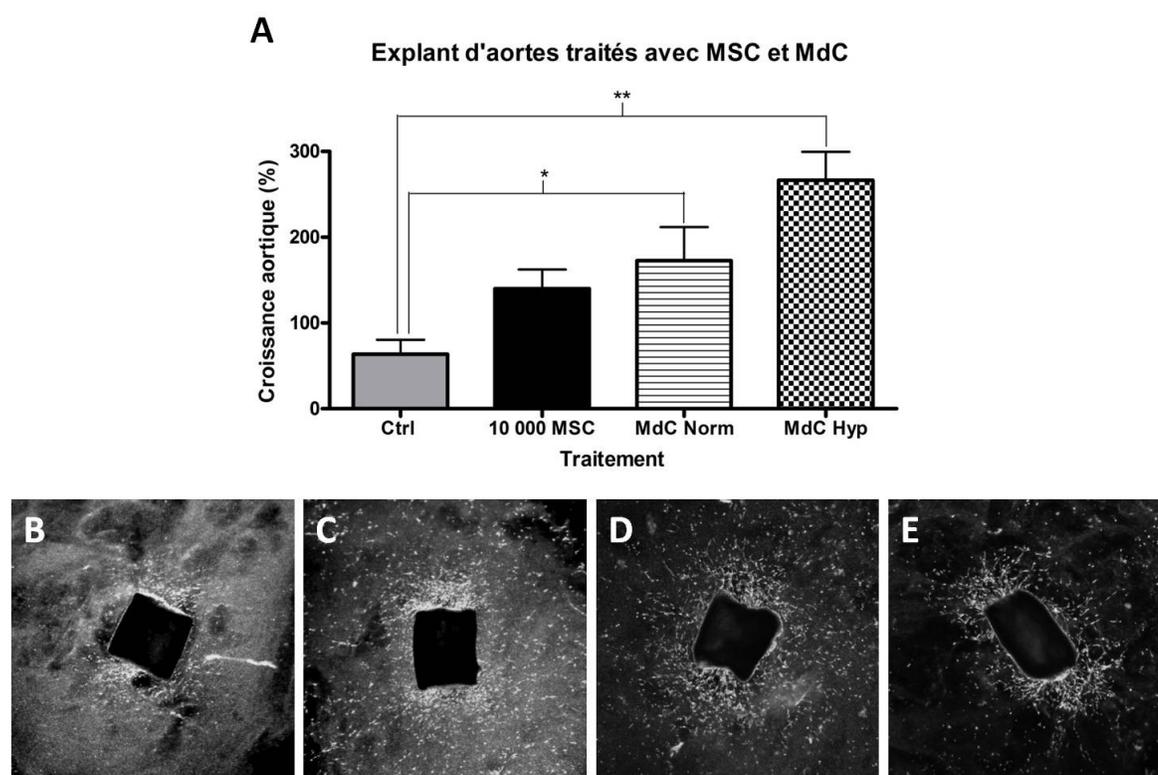


Figure 16. *Effet des MSCs et de leur MdC sur la croissance aortique.* Des explants d'aorte de souris C57BL/6 de 8 à 10 semaines ont été mis en culture pendant 3 jours et ensuite traités avec soit 10 000 MSC (C), du milieu de culture de MSC poussées en normoxie (21% d'oxygène) (D), ou du milieu de culture de MSC poussées en hypoxie (5% d'oxygène) (E). Les aortes contrôles ont été traitées avec du DMEM (B). Les photos ont été prises 48hrs après le traitement et la croissance aortique calculé selon l'aire de la croissance aortique en fonction de l'aire de l'explant d'aorte. (mean±SEM, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ comparé au contrôle DMEM; n= 10-5-6-6)

Le MdC des MSCs a aussi un effet bénéfique sur la vaso-oblitération et la néovascularisation dans le modèle de RIO

Sachant que le milieu de culture des MSCs a un effet pro-angiogénique sur les explants d'aorte ainsi qu'un effet anti-inflammatoire (Parekkadan & Milwid, 2010), nous avons voulu investiguer l'effet du MdC dans le modèle animal de RIO. L'injection du MdC normoxique concentré dans le vitré de souris RIO à P12 n'as pas eu d'effet significatif sur le phénotype de la vasculature rétinienne (**fig. 17 B**) à P17; ces dernières détenaient un phénotype semblable aux rétines contrôles traitées avec du DMEM (**fig. 17 A**). Ni la zone de vaso-oblitération, ni la quantité de néovascularisation n'était pas significativement différente entre les rétines traitées avec le MdC normoxique et les rétines contrôles. Cependant, l'injection du MdC hypoxique (5% d'oxygène) dans le même modèle a un effet significatif sur les deux paramètres de la vasculature (**fig. 17 C; p<0,01**). La zone de vaso-oblitération des rétines traitées avec le MdC hypoxique est réduite de 43% comparée à la zone que l'on voit chez les rétines traitées avec le véhicule contrôle. D'autant plus, la néovascularisation couvre environ 7,182 % de la rétine contrôle, alors qu'elle ne couvre 3,196% des rétines traitées avec le MdC hypoxiques, soit une réduction de 55,5%. Ces rétines traitées au MdC hypoxiques font preuve d'une vasculature plus étendue et beaucoup moins pathologique que les rétines contrôles et traités avec MdC normoxique.

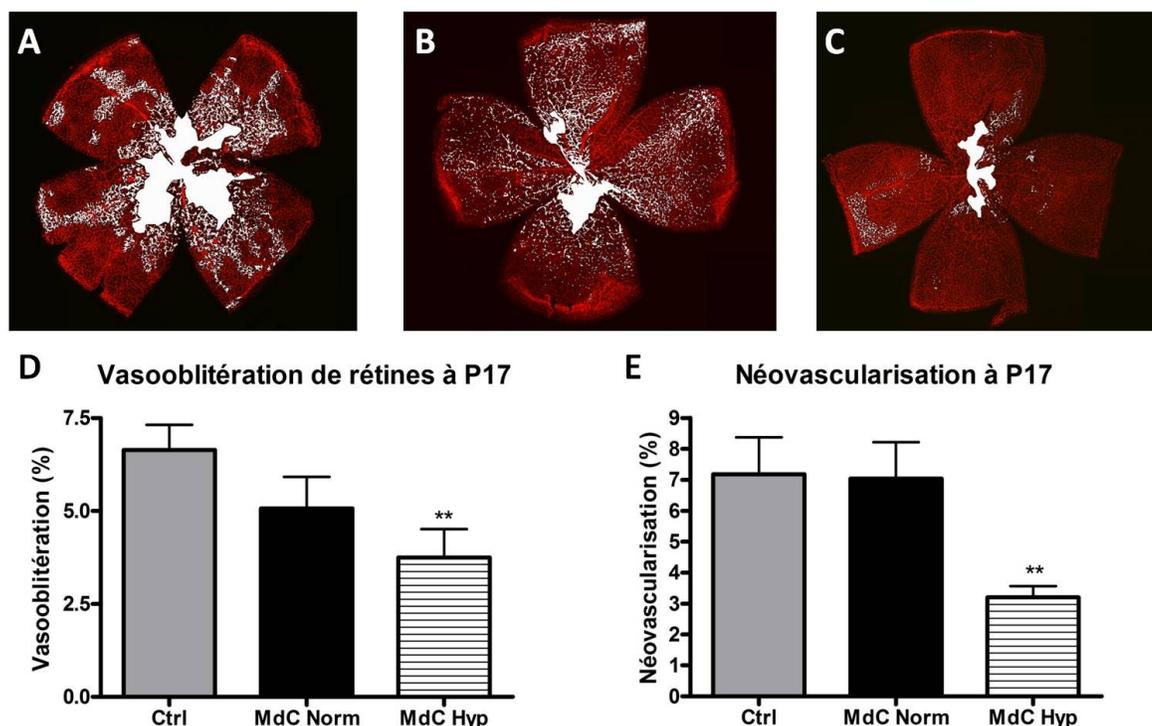


Figure 17. *Injection de MdC dans le modèle de RIO.* Des souris C57BL/6 soumis au modèle de RIO ont été injectées à P12 avec du milieu de culture concentré (80 fois) de MSC et du DMEM dans le vitré de l'œil controlatéral. Les rétines contrôles (A) présentent avec une zone d'oblitération ainsi que des bourgeonnements de néovascularisation. Les rétines traitées avec du milieu de culture de MSC en normoxie (B) développent une zone de vaso-oblitération plus petite mais de façon non significative et un niveau de néovascularisation semblable aux contrôles. Cependant, les rétines traitées avec du milieu de culture de MSC en hypoxie (C) ont une plus petite zone de vaso-oblitération ainsi que moins de néovascularisation. Les rétines de souris ont été récupérées à P17, marquées à la lectine TRITC et visualisée par montage à plat. (mean±SEM, **p<0,01 comparé au contrôle injecté avec véhicule; n=29-9-15, n=10-9-14)

Les MSCs expriment des facteurs de croissances ainsi que des cytokines anti-inflammatoires qui sont augmentés dans la rétine centrale de souris traitées avec MSCs.

Après avoir remarqué que l'effet des MSCs se faisait par l'entremise de facteurs sécrétés nous nous sommes intéressés à découvrir quels étaient ces facteurs. L'injection de MSCs provenant de souris GFP nous a permis d'observer une concentration de

migration de cellules GFP au centre de la rétine où la vaso-oblitération a lieu (**fig. 18 A-D**). Une analyse d'expression génique par RT-PCR de cette région a indiqué une variation dans l'expression de IL-10, IL-1 β , VEGFA et FGF2 (**fig. 18 E**). La rétine centrale des souris traitées avec les MSCs exprimait 1.8 fois plus de IL-10, une cytokine anti-inflammatoire et 2.5 fois moins de IL-1 β , une cytokine pro-inflammatoire. De plus, ces rétines centrales disposaient aussi d'une expression élevée en FGF (3.4 fois plus) et VEGFA (4.4 fois plus), deux facteurs de croissance pro-angiogénique. C'est possible que ces facteurs soient exprimés par d'autres types cellulaires rétinien en réaction aux MSCs mais nous avons toutefois confirmé de façon *in vitro* l'expression de IL-10 par les MSCs (**fig. 18 F**). Plus profondément, l'expression de IL-10 par les MSCs semblaient augmenter lorsque ces cellules étaient soit en hypoxie (5% d'oxygène) ou soit dans un milieu pro-inflammatoire (traitement avec IL-1 β 10 ng/ml). Les MSCs ont donc un effet anti-inflammatoire ainsi que pro-angiogénique dans la rétine centrale de la souris.

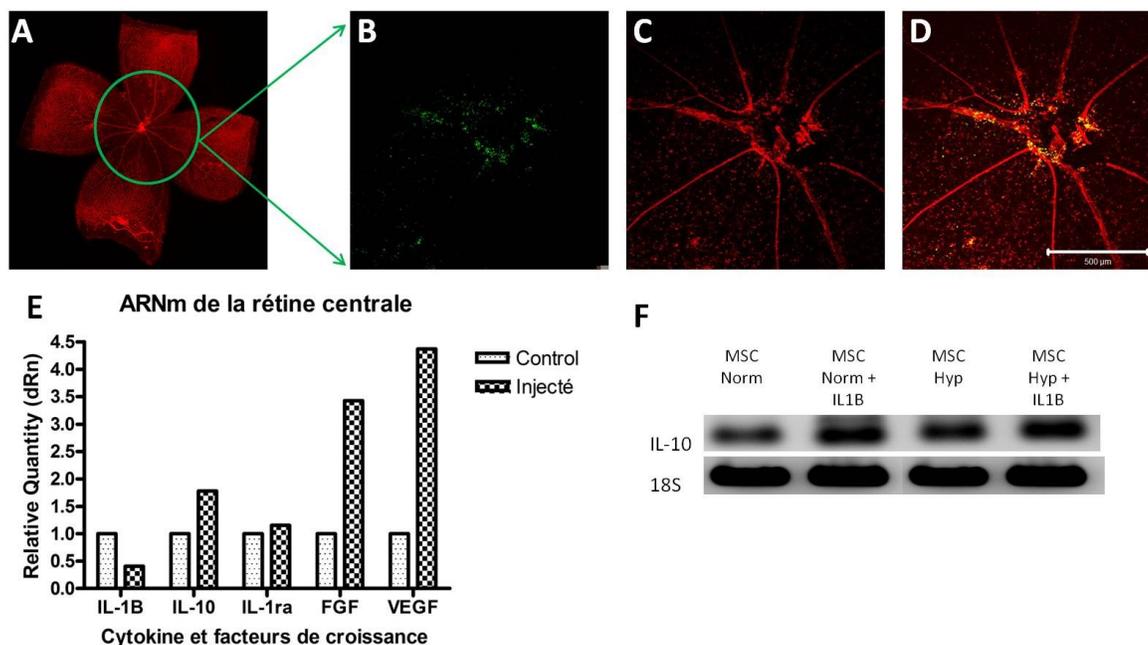


Figure 18. *Effet paracrine des MSCs sur la rétine centrale avasculaire.* (A,B,C,D) Les cellules injectées exprimant le GFP (B) migrent à la rétine et se retrouvent surtout au niveau de la rétine centrale comme on peut voir dans des montages à plat de rétine marqués à la lectine (C). Une analyse par RT-qPCR a été

effectuée sur cette zone centrale de la rétine qui a démontrée une augmentation d'expression de certaines protéines dont IL-10, FGF, VEGF, puis la diminution de IL-1 β (E). Les valeurs ont été normalisées avec l'expression de 18S puis exprimé comme quantité relative au contrôle. Les MSCs en culture expriment le IL-10 en condition basale. Cette expression semble augmenter lorsque les MSCs sont en conditions inflammatoires (traitement avec IL-1 β 10ng/ml) ou mises en hypoxie (F).

Discussion

Depuis la découverte des méthodes d'isolement, les cellules souches mésenchymateuses sont devenues un sujet de recherche enthousiasmant. L'étude du rôle et des retombées de ces cellules a mené à des découvertes importantes. Les MSCs sont maintenant utilisées en clinique pour traiter une variété de pathologies. Tout de même, le vaste potentiel des MSCs reste à être exploré. Notre étude vient ajouter aux connaissances sur les MSCs et leur fonctionnement. Nos résultats suggèrent que les cellules souches stromales sont un outil thérapeutique potentiel pour traiter les rétinopathies. L'effet multidimensionnel des MSCs semble pouvoir surpasser l'effet restreint des thérapies anti-angiogéniques modernes. La thérapie cellulaire offre l'avantage d'un traitement dynamique; une cellule, contrairement aux traitements traditionnels, peut s'adapter à son milieu et modifier son effet selon les conditions environnantes. De plus, les MSCs combinent un traitement anti-inflammatoire à un traitement pro-angiogénique de façon localisée. Cela permet aux MSCs d'induire une prolifération vasculaire physiologique nécessaire au bon fonctionnement de la rétine. Cette approche pourrait encourager un bon développement rétinien tandis que les traitements traditionnels ne font qu'empêcher la progression de la pathologie vers un pronostic irréversible (détachement de rétine, cécité)⁵¹.

Les expériences de caractérisation des cellules souches ont démontré une certaine hétérogénéité chez celles-ci. Seulement un certain pourcentage des HSCs exprimait Sca-1 et c-kit. Conséquemment, la population de cellules injectées était une population mixte. Cette hétérogénéité peut mener à une diminution dans la puissance pharmacologique du traitement cellulaire. Les cellules contaminantes peuvent avoir des effets néfastes puis même induire une variation dans les effets ce qui peut expliquer la variabilité des résultats rétiens de cette l'expérience. Les MSCs peuvent également contenir des cellules contaminantes telles que des cellules myéloïdes adhérentes et des cellules hématopoïétiques⁵¹. Toutefois, cette hétérogénéité ne semble pas affecter les résultats. Ce serait fondamental d'approfondir la recherche sur la caractérisation des

HSCs et des MSCs afin de pouvoir obtenir la population de cellules la plus enrichie. Cela augmenterait la puissance pharmacologique du traitement car une plus petite quantité de cellules serait nécessaire pour effectuer le même rétablissement.

L'effet régénérateur a été le sujet principal de la majorité des études effectuées sur les MSCs. Cependant, le rôle préventif des MSCs pourrait être un aspect intéressant en clinique. Les résultats de cette étude suggèrent par contre que l'effet protecteur des MSCs dans le modèle de RIO est soit nul ou négligeable. La quantité de vaso-oblitération n'était pas significativement différente entre les souris contrôles et les souris traitées. Le manque d'auto-régulation et l'hyperoxie ne pouvait pas être contré par la présence de cellules souches. Toutefois, l'absence d'effet protecteur sur la vasculature n'est pas indicatif d'absence de protection sur d'autres types cellulaires. La fonction anti-apoptotique des MSCs pourrait affecter la survie des cellules neuronales qui sont essentielles au bon fonctionnement de la rétine. Cette sauvegarde neuronale pourrait diminuer le déclin dans l'acuité visuelle qu'on voit plus tard chez les enfants ayant développé une rétinopathie. Au niveau vasculaire, la caractéristique d'adaptation de la cellule souche pourrait être la cause de l'absence d'effet thérapeutique durant la phase de vaso-oblitération. En raison de l'hyperoxie, le profil sécrétoire des MSCs serait modifié pour adapter à ce milieu en haute teneur d'oxygène. La quantité de facteurs trophiques relâchée par les MSCs, tels que le IL-10, diminuerait en conséquence. L'éventualité d'un traitement de MSCs prophylactique serait pourtant pratique car ces cellules adaptent selon les besoins. Les mécanismes thérapeutiques seraient activés selon le besoin et la gravité de la pathologie dès le début du développement de la pathologie. Ce serait donc intéressant d'administrer le traitement chez les patients à risque en guise de traitement préservatif. Toutefois, les effets néfastes de ce genre de traitement prophylactique restent à être établis.

Dans cette étude, les MSCs semblaient avoir un effet thérapeutique plus puissant que celui des HSCs. Cette différence peut être expliquée en partie par l'hétérogénéité des cellules HSCs. Néanmoins, les MSCs présentent aussi un potentiel plus élargi avec

ses multiples effets dont un anti-inflammatoire. Les mécanismes bénéfiques des HSCs qui ont été suggérés comprennent seulement des mécanismes unitaires où les HSCs affectent un seul aspect de la pathologie. Dans l'étude de Ritter, les HSCs exerçaient leur effet en se différenciant en microglie³⁵. Otani tant qu'à lui, suggérait dans son étude que les cellules se différenciaient en cellule endothéliale induisant un effet pro-angiogénique. L'augmentation de la stabilité vasculaire menait ensuite à une préservation des cellules neuronales⁹⁵. Les MSCs tant qu'à elles, peuvent exercer plus d'un effet de façon simultanée ce qui sera discuté plus loin.

Les MSCs ont un potentiel pro-angiogénique qui leur permet de s'intégrer et stabiliser la vasculature⁹⁶. Cette étude confirme ce potentiel pro-angiogénique avec les résultats d'explant d'aorte. Curieusement, très peu des MSCs ajoutées aux explants d'aorte s'incorporaient à la croissance aortique. Cette observation laissait entendre que l'effet pro-angiogénique des MSCs ne provenait que partiellement de la différenciation cellulaire. Les études menées avec le milieu de culture des MSCs confirment l'existence de facteurs trophiques pro-angiogéniques soutenant la croissance aortique. De plus, la quantité de facteurs pro-angiogéniques était augmentée lorsque les MSCs étaient cultivées en hypoxie. Ceci concorde avec la théorie que le profil sécrétoire des MSCs varie selon leur environnement⁵¹. Cela suggère que les MSCs qui se retrouvent dans la rétine au jour P12, un milieu maintenant hypoxique suite à la destruction des vaisseaux, sécrèteraient plus de facteurs que durant l'hyperoxie (P7-P12) où une quantité négligeable de facteurs serait relâchée. Les cellules n'induiraient donc aucune revascularisation ou prévention de régression expliquant l'absence d'effet des MSCs durant cette période.

Les résultats *in vivo* avec le milieu de culture conditionné (MdC) dans le modèle de RIO confirme l'hypothèse du mécanisme par effet paracrine. Tout comme dans les explants d'aorte, le milieu de culture a réussi à avoir le même effet que les cellules dans le modèle *in vivo*. Cela indique que les facteurs sécrétés par les MSCs sont suffisants pour induire un effet bénéfique. Toutefois, on distingue une différence de puissance

entre le traitement cellulaire et le MdC. Lorsqu'on compare la cellule qui relâche des facteurs selon les besoins du tissu pendant 5 jours à une seule injection de facteurs bénéfiques, il est évident que la puissance thérapeutique diffère. Encore une fois, le MdC hypoxique réussit à avoir un effet alors que le MdC normoxique n'y arrive pas. La quantité et les molécules sécrétées dans ces deux milieux de culture est fort probablement la cause de la divergence.

Une particularité des rétinopathies est l'existence de facteurs de croissance dans la rétine sans toutefois pouvoir avoir une revascularisation. Certains groupes ont suggéré que cette néovascularisation prend place vers le vitré à cause de certaines barrières répulsives²⁴. Les MSCs présentent un grand avantage car celles-ci migrent à la partie centrale et vaso-oblitérée de la rétine sécrétant des facteurs qui peuvent contrecarrer les molécules répulsives. La rétine avasculaire est un endroit hyper-inflammatoire dans le modèle de RIO et dans les rétinopathies²⁴. Les MSCs viennent réduire cette inflammation via une sécrétion d'IL-10, une molécule anti-inflammatoire. La diminution d'IL-1 β dans la rétine centrale avasculaire du modèle de RIO témoigne de cette réduction d'inflammation. Des facteurs de croissance (FGF et VEGF) viennent se combiner à cet effet anti-inflammatoire pour favoriser une revascularisation vers cette rétine centrale moins répulsive. Plusieurs études suggèrent qu'une infection est un facteur de risque pour la rétinopathie du prématuré. La septicémie est associée à une augmentation du risque de développement de la ROP³⁰. Cette corrélation combinée aux évidences d'effet thérapeutique des MSCs chez les septicémies adultes suggèrent qu'un traitement de MSCs diminuerait les chances de développer la ROP.

Cette étude illustre des découvertes intéressantes quand aux possibilités de thérapie avec les MSCs. Toutefois, il y a des aspects de cette étude qui restent à être explorés. Tout d'abord, une évaluation fonctionnelle de la vision serait nécessaire afin de confirmer que l'effet physiologique se transmet en effet fonctionnel. Un examen électrophysiologique à l'aide d'ERG (électrorétinogramme) permettrait d'analyser les ondes A et B des souris. D'autant plus, des études sur l'effet neuronal des MSCs

pourraient approfondir leur rôle thérapeutique. Cela pourrait déterminer si en effet ces cellules ont un effet trophique pour les autres cellules de la rétine. En particulier, la ROP et le modèle de RIO sont associés avec un amincissement des couches plexiformes. Cet amincissement est causé par la mort cellulaire et la régression synaptique des cellules neuronales suite à l'hyperoxie⁹⁷. Ce serait très intéressant si les MSCs, qui sécrètent des neurotrophines, pouvaient encourager la survie et la formation de synapse dans ce milieu hostile. De plus, le mécanisme par lequel les MSCs induisent un rétablissement vasculaire reste à être complètement compris. IL-10 semble être un joueur important mais les détails du mécanisme et de la signalisation doivent toutefois être élaborés.

Une autre avenue importante à développer en recherche sur les MSCs serait tout ce qui se rapporte à la migration cellulaire. Les cellules sont injectées dans l'humeur vitré et finissent par migrer jusqu'à la rétine dans les couches superficielles près de la vasculature. Cette migration est spécifique à la région centrale avasculaire de la rétine. Les facteurs attractifs seraient une importante découverte car cela pourrait permettre le développement d'une méthode d'augmentation de migration et ainsi de puissance thérapeutique. Quelques facteurs sécrétés par l'endothélium endommagé ou ischémique peuvent induire une migration de cellules souches y compris les MSCs. Des facteurs angiogéniques comme les VEGF, le SDF-1, le FGF et le PDGF peuvent mobiliser les cellules endogènes pour qu'elles migrent à l'endroit ischémique. Les MSCs, expriment les récepteurs pour ces molécules leur permettant de percevoir les gradients de concentration et se diriger vers la zone ischémique^{20,22}. Cette migration spécifique joue fort probablement un rôle dans l'efficacité du traitement. L'étude de l'absence ou le bouleversement des signaux d'attraction serait utile pour déterminer les facteurs qui modulent l'activité endogène et exogène des MSCs.

Conclusion

Dans cette étude, nous avons illustré le potentiel thérapeutique des cellules souches mésenchymateuses pour les rétinopathies. Nos expériences ont démontré que leur effet est effectué par l'entremise de facteurs relâchés dont IL-10, FGF2 et VEGF. Ces résultats suggèrent non seulement un avenir thérapeutique pour ces cellules en vision mais stipule aussi des preuves pour la futilité de la différenciation dans le rôle des cellules souches en régénérescence.

Bibliographie

1. Maupassant Gd. *Le Horla*. Paris: Éditions Paul Ollendorff, 1887.
2. Breslin CW. Our vision of vision health: the National Coalition for Vision Health. *Can J Ophthalmol* 2007;42(6):790-1.
3. Gilbert C. Retinopathy of prematurity: a global perspective of the epidemics, population of babies at risk and implications for control. *Early Hum Dev* 2008;84(2):77-82.
4. Friedlander M. Fibrosis and diseases of the eye. *J Clin Invest* 2007;117(3):576-86.
5. Kolb B, Whishaw I. *Cerveau & comportement*. Paris, France: de Boek, 2002.
6. Otani A, Friedlander M. Retinal vascular regeneration. *Semin Ophthalmol* 2005;20(1):43-50.
7. Newman E, Reichenbach A. The Muller cell: a functional element of the retina. *Trends Neurosci* 1996;19(8):307-12.
8. Fruttiger M. Development of the mouse retinal vasculature: angiogenesis versus vasculogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43(2):522-7.
9. Colton CA, Gilbert DL. Production of superoxide anions by a CNS macrophage, the microglia. *FEBS Lett* 1987;223(2):284-8.
10. Luty GA, Chan-Ling T, Phelps DL, Adamis AP, Berns KI, Chan CK, et al. Proceedings of the Third International Symposium on Retinopathy of Prematurity: an update on ROP from the lab to the nursery (November 2003, Anaheim, California). *Mol Vis* 2006;12:532-80.
11. Klassen H, Sakaguchi DS, Young MJ. Stem cells and retinal repair. *Prog Retin Eye Res* 2004;23(2):149-81.
12. Alm AK, Norstrom E, Sundelin J, Nystedt S. Stimulation of proteinase activated receptor-2 causes endothelial cells to promote blood coagulation in vitro. *Thromb Haemost* 1999;81(6):984-8.
13. Ball SG, Shuttleworth CA, Kielty CM. Platelet-derived growth factor receptors regulate mesenchymal stem cell fate: implications for neovascularization. *Expert Opin Biol Ther* 2010;10(1):57-71.

14. Caspi RR. A look at autoimmunity and inflammation in the eye. *J Clin Invest* 2010;120(9):3073-83.
15. Mendes-Jorge L, Ramos D, Luppo M, Llombart C, Alexandre-Pires G, Nacher V, et al. Scavenger function of resident autofluorescent perivascular macrophages and their contribution to the maintenance of the blood-retinal barrier. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50(12):5997-6005.
16. Ashton N. Studies of the Retinal Capillaries in Relation to Diabetic and Other Retinopathies. *Br J Ophthalmol* 1963;47:521-38.
17. Mintz-Hittner HA, Kennedy KA, Chuang AZ. Efficacy of intravitreal bevacizumab for stage 3+ retinopathy of prematurity. *N Engl J Med* 2011;364(7):603-15.
18. Dorrell M, Uusitalo-Jarvinen H, Aguilar E, Friedlander M. Ocular neovascularization: basic mechanisms and therapeutic advances. *Surv Ophthalmol* 2007;52 Suppl 1:S3-19.
19. Sapiéha P, Zaniolo K, Hamel D, Joyal JS, Chemtob S. [Supply and demand: the influence of energy metabolism on angiogenesis]. *Med Sci (Paris)* 2009;25(4):346-8.
20. Liu X, Li Y, Liu Y, Luo Y, Wang D, Annex BH, et al. Endothelial progenitor cells (EPCs) mobilized and activated by neurotrophic factors may contribute to pathologic neovascularization in diabetic retinopathy. *Am J Pathol* 2010;176(1):504-15.
21. Eltzschig HK, Carmeliet P. Hypoxia and inflammation. *N Engl J Med* 2011;364(7):656-65.
22. Zacchigna S, Pattarini L, Zentilin L, Moimas S, Carrer A, Sinigaglia M, et al. Bone marrow cells recruited through the neuropilin-1 receptor promote arterial formation at the sites of adult neoangiogenesis in mice. *J Clin Invest* 2008;118(6):2062-75.
23. Hildbrand P, Cirulli V, Prinsen RC, Smith KA, Torbett BE, Salomon DR, et al. The role of angiopoietins in the development of endothelial cells from cord blood CD34+ progenitors. *Blood* 2004;104(7):2010-9.

24. Joyal JS, Sitaras N, Binet F, Rivera JC, Stahl A, Zaniolo K, et al. Ischemic neurons prevent vascular regeneration of neural tissue by secreting semaphorin 3A. *Blood* 2011;117(22):6024-35.
25. Li J, Wang JJ, Zhang SX. Preconditioning with endoplasmic reticulum stress mitigates retinal endothelial inflammation via activation of X-box binding protein 1. *J Biol Chem* 2011;286(6):4912-21.
26. Grocott MP, Martin DS, Levett DZ, McMorrow R, Windsor J, Montgomery HE. Arterial blood gases and oxygen content in climbers on Mount Everest. *N Engl J Med* 2009;360(2):140-9.
27. Semenza GL. Life with oxygen. *Science* 2007;318(5847):62-4.
28. Hackett PH, Roach RC. High-altitude illness. *N Engl J Med* 2001;345(2):107-14.
29. Hartmann G, Tschop M, Fischer R, Bidlingmaier C, Riepl R, Tschop K, et al. High altitude increases circulating interleukin-6, interleukin-1 receptor antagonist and C-reactive protein. *Cytokine* 2000;12(3):246-52.
30. Dammann O. Inflammation and retinopathy of prematurity. *Acta Paediatr* 2010;99(7):975-7.
31. Kowluru RA, Odenbach S. Role of interleukin-1beta in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Br J Ophthalmol* 2004;88(10):1343-7.
32. Sood BG, Madan A, Saha S, Schendel D, Thorsen P, Skogstrand K, et al. Perinatal systemic inflammatory response syndrome and retinopathy of prematurity. *Pediatr Res* 2010;67(4):394-400.
33. Stahl A, Smith LE. An eye for discovery. *J Clin Invest* 2010;120(9):3008-11.
34. Connor KM, Krah NM, Dennison RJ, Aderman CM, Chen J, Guerin KI, et al. Quantification of oxygen-induced retinopathy in the mouse: a model of vessel loss, vessel regrowth and pathological angiogenesis. *Nat Protoc* 2009;4(11):1565-73.
35. Ritter MR, Banin E, Moreno SK, Aguilar E, Dorrell MI, Friedlander M. Myeloid progenitors differentiate into microglia and promote vascular repair in a model of ischemic retinopathy. *J Clin Invest* 2006;116(12):3266-76.

36. Rivera JCS, P. Joyal, J-S. Duhamel, F. Shao, Z. Sitaras, N. Picard, E. Zhou, E. Lachapelle, P. Chemtob, S. Understanding Retinopathy of Prematurity: Update on Pathogenesis. *Neonatology* unpublished.
37. Madan A, Penn JS. Animal models of oxygen-induced retinopathy. *Front Biosci* 2003;8:d1030-43.
38. Smith LE, Wesolowski E, McLellan A, Kostyk SK, D'Amato R, Sullivan R, et al. Oxygen-induced retinopathy in the mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994;35(1):101-11.
39. Dorrell MI, Otani A, Aguilar E, Moreno SK, Friedlander M. Adult bone marrow-derived stem cells use R-cadherin to target sites of neovascularization in the developing retina. *Blood* 2004;103(9):3420-7.
40. Aiello LP, Pierce EA, Foley ED, Takagi H, Chen H, Riddle L, et al. Suppression of retinal neovascularization in vivo by inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) using soluble VEGF-receptor chimeric proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92(23):10457-61.
41. Ferrara N, Kerbel RS. Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature* 2005; 438(7070):967-74.
42. Witmer AN, Vrensen GF, Van Noorden CJ, Schlingemann RO. Vascular endothelial growth factors and angiogenesis in eye disease. *Prog Retin Eye Res* 2003;22(1):1-29.
43. Friedlander M, Dorrell MI, Ritter MR, Marchetti V, Moreno SK, El-Kalay M, et al. Progenitor cells and retinal angiogenesis. *Angiogenesis* 2007;10(2):89-101.
44. Marchetti V, Krohne TU, Friedlander DF, Friedlander M. Stemming vision loss with stem cells. *J Clin Invest* 2010;120(9):3012-21.
45. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006;8(4):315-7.
46. van Haaften T, Thebaud B. Adult bone marrow-derived stem cells for the lung: implications for pediatric lung diseases. *Pediatr Res* 2006;59(4 Pt 2):94R-9R.

47. Meng X, Ichim TE, Zhong J, Rogers A, Yin Z, Jackson J, et al. Endometrial regenerative cells: a novel stem cell population. *J Transl Med* 2007;5:57.
48. Reinisch A, Hofmann NA, Obenauf AC, Kashofer K, Rohde E, Schallmoser K, et al. Humanized large-scale expanded endothelial colony-forming cells function in vitro and in vivo. *Blood* 2009;113(26):6716-25.
49. Humphries A, Graham TA, McDonald SA. Stem cells and inflammation in the intestine. *Recent Results Cancer Res* 2011;185:51-63.
50. Limb GA, Daniels JT, Cambrey AD, Secker GA, Shortt AJ, Lawrence JM, et al. Current prospects for adult stem cell-based therapies in ocular repair and regeneration. *Curr Eye Res* 2006;31(5):381-90.
51. Parekkadan B, Milwid JM. Mesenchymal stem cells as therapeutics. *Annu Rev Biomed Eng* 2010;12:87-117.
52. Stem Cell Basics: What are adult stem cells?. Dans Stem Cell Information (World Wide Web site). Bethesda, MD: National Institutes of Health, U.S. Department of Health and Human Services, 2001 (cité le 12 juillet, 2011) Disponible à <http://stemcells.nih.gov/info/basics/basics4.asp>
53. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997;275(5302):964-7.
54. Tomita M, Adachi Y, Yamada H, Takahashi K, Kiuchi K, Oyaizu H, et al. Bone marrow-derived stem cells can differentiate into retinal cells in injured rat retina. *Stem Cells* 2002;20(4):279-83.
55. Patel M, Yang S. Advances in reprogramming somatic cells to induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Rev* 2010;6(3):367-80.
56. Crisa L, Cirulli V, Smith KA, Ellisman MH, Torbett BE, Salomon DR. Human cord blood progenitors sustain thymic T-cell development and a novel form of angiogenesis. *Blood* 1999;94(11):3928-40.
57. Murohara T, Ikeda H, Duan J, Shintani S, Sasaki K, Eguchi H, et al. Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization. *J Clin Invest* 2000;105(11):1527-36.

58. Tocci A, Forte L. Mesenchymal stem cell: use and perspectives. *Hematol J* 2003;4(2):92-6.
59. Lord-Grignon J, Abdouh M, Bernier G. Identification of genes expressed in retinal progenitor/stem cell colonies isolated from the ocular ciliary body of adult mice. *Gene Expr Patterns* 2006;6(8):992-9.
60. Nakano-Doi A, Nakagomi T, Fujikawa M, Nakagomi N, Kubo S, Lu S, et al. Bone marrow mononuclear cells promote proliferation of endogenous neural stem cells through vascular niches after cerebral infarction. *Stem Cells* 2010;28(7):1292-302.
61. Wobus AM, Boheler KR. Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy. *Physiol Rev* 2005;85(2):635-78.
62. Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, et al. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* 2000;95(3):952-8.
63. Pierro M, Thebaud B. Mesenchymal stem cells in chronic lung disease: culprit or savior? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2010;298(6):L732-4.
64. Inoue Y, Iriyama A, Ueno S, Takahashi H, Kondo M, Tamaki Y, et al. Subretinal transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells delays retinal degeneration in the RCS rat model of retinal degeneration. *Exp Eye Res* 2007;85(2):234-41.
65. Perin EC, Silva GV, Henry TD, Cabreira-Hansen MG, Moore WH, Coulter SA, et al. A randomized study of transendocardial injection of autologous bone marrow mononuclear cells and cell function analysis in ischemic heart failure (FOCUS-HF). *Am Heart J* 2011;161(6):1078-87 e3.
66. van Haaften T, Byrne R, Bonnet S, Rochefort GY, Akabutu J, Bouchentouf M, et al. Airway delivery of mesenchymal stem cells prevents arrested alveolar growth in neonatal lung injury in rats. *Am J Respir Crit Care Med* 2009;180(11):1131-42.
67. Clinical Trials Search. Dans ClinicalTrials (Word Wide Web site). Bethesda, MD: National Institutes of Health, U.S. Department of Health and Human Services, 2001 (cité le 10 août, 2011) Disponible à <http://clinicaltrials.gov>

68. MacLaren RE, Pearson RA. Stem cell therapy and the retina. *Eye (Lond)* 2007;21(10):1352-9.
69. Otani A, Kinder K, Ewalt K, Otero FJ, Schimmel P, Friedlander M. Bone marrow-derived stem cells target retinal astrocytes and can promote or inhibit retinal angiogenesis. *Nat Med* 2002;8(9):1004-10.
70. Iba O, Matsubara H, Nozawa Y, Fujiyama S, Amano K, Mori Y, et al. Angiogenesis by implantation of peripheral blood mononuclear cells and platelets into ischemic limbs. *Circulation* 2002;106(15):2019-25.
71. Ziegelhoeffer T, Fernandez B, Kostin S, Heil M, Voswinckel R, Helisch A, et al. Bone marrow-derived cells do not incorporate into the adult growing vasculature. *Circ Res* 2004;94(2):230-8.
72. Amoh Y, Li L, Yang M, Moossa AR, Katsuoka K, Penman S, et al. Nascent blood vessels in the skin arise from nestin-expressing hair-follicle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(36):13291-5.
73. Wurmser AE, Nakashima K, Summers RG, Toni N, D'Amour KA, Lie DC, et al. Cell fusion-independent differentiation of neural stem cells to the endothelial lineage. *Nature* 2004;430(6997):350-6.
74. El-Helou V, Beguin PC, Assimakopoulos J, Clement R, Gosselin H, Brugada R, et al. The rat heart contains a neural stem cell population; role in sympathetic sprouting and angiogenesis. *J Mol Cell Cardiol* 2008;45(5):694-702.
75. Kang L, Chen Q, Wang L, Gao L, Meng K, Chen J, et al. Decreased mobilization of endothelial progenitor cells contributes to impaired neovascularization in diabetes. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2009;36(10):e47-56.
76. Yodoi Y, Sasahara M, Kameda T, Yoshimura N, Otani A. Circulating hematopoietic stem cells in patients with neovascular age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48(12):5464-72.
77. Grant MB, May WS, Caballero S, Brown GA, Guthrie SM, Mames RN, et al. Adult hematopoietic stem cells provide functional hemangioblast activity during retinal neovascularization. *Nat Med* 2002;8(6):607-12.

78. Pitchford SC, Hahnel MJ, Jones CP, Rankin SM. Troubleshooting: Quantification of mobilization of progenitor cell subsets from bone marrow in vivo. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2010;61(2):113-21.
79. Lai P, Li T, Yang J, Xie C, Zhu X, Xie H, et al. Upregulation of stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) expression in microvasculature endothelial cells in retinal ischemia-reperfusion injury. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2008;246(12):1707-13.
80. Meirelles Lda S, Nardi NB. Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion, and characterization. *Br J Haematol* 2003;123(4):702-11.
81. Rochefort GY, Delorme B, Lopez A, Herault O, Bonnet P, Charbord P, et al. Multipotential mesenchymal stem cells are mobilized into peripheral blood by hypoxia. *Stem Cells* 2006;24(10):2202-8.
82. Peister A, Mellad JA, Larson BL, Hall BM, Gibson LF, Prockop DJ. Adult stem cells from bone marrow (MSCs) isolated from different strains of inbred mice vary in surface epitopes, rates of proliferation, and differentiation potential. *Blood* 2004;103(5):1662-8.
83. Tropel P, Noel D, Platet N, Legrand P, Benabid AL, Berger F. Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells from adult mouse bone marrow. *Exp Cell Res* 2004;295(2):395-406.
84. Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol* 1976;4(5):267-74.
85. Krause DS, Theise ND, Collector MI, Henegariu O, Hwang S, Gardner R, et al. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 2001;105(3):369-77.
86. Wilson A, Shehadeh LA, Yu H, Webster KA. Age-related molecular genetic changes of murine bone marrow mesenchymal stem cells. *BMC Genomics* 2010;11:229.
87. Zhukareva V, Obrocka M, Houle JD, Fischer I, Neuhuber B. Secretion profile of human bone marrow stromal cells: donor variability and response to inflammatory stimuli. *Cytokine* 2010;50(3):317-21.

88. Weil BR, Manukyan MC, Herrmann JL, Wang Y, Abarbanell AM, Poynter JA, et al. Mesenchymal stem cells attenuate myocardial functional depression and reduce systemic and myocardial inflammation during endotoxemia. *Surgery* 2010;148(2):444-52.
89. Nemeth K, Leelahavanichkul A, Yuen PS, Mayer B, Parmelee A, Doi K, et al. Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nat Med* 2009;15(1):42-9.
90. Osawa M, Hanada K, Hamada H, Nakauchi H. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science* 1996;273(5272):242-5.
91. Spangrude GJ, Heimfeld S, Weissman IL. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science* 1988;241(4861):58-62.
92. Uchida N, Weissman IL. Searching for hematopoietic stem cells: evidence that Thy-1.1lo Lin- Sca-1+ cells are the only stem cells in C57BL/Ka-Thy-1.1 bone marrow. *J Exp Med* 1992;175(1):175-84.
93. King JA, Miller WM. Bioreactor development for stem cell expansion and controlled differentiation. *Curr Opin Chem Biol* 2007;11(4):394-8.
94. Dellatore SM, Garcia AS, Miller WM. Mimicking stem cell niches to increase stem cell expansion. *Curr Opin Biotechnol* 2008;19(5):534-40.
95. Otani A, Dorrell MI, Kinder K, Moreno SK, Nusinowitz S, Banin E, et al. Rescue of retinal degeneration by intravitreally injected adult bone marrow-derived lineage-negative hematopoietic stem cells. *J Clin Invest* 2004;114(6):765-74.
96. Au P, Tam J, Fukumura D, Jain RK. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells facilitate engineering of long-lasting functional vasculature. *Blood* 2008;111(9):4551-8.
97. Dorfman AL, Cuenca N, Pinilla I, Chemtob S, Lachapelle P. Immunohistochemical evidence of synaptic retraction, cytoarchitectural remodeling, and cell death in the inner retina of the rat model of oxygen-induced retinopathy (OIR). *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52(3):1693-708.

