



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par *l'Université Toulouse III - Paul Sabatier*
Discipline ou spécialité : *Physiopathologie*

Présentée et soutenue par *Dawiyat MASSOUDI*
Le *09 septembre 2011*

Titre : *Approches thérapeutiques des opacités cornéennes par modulation de l'activité de protéinases de la matrice extracellulaire*

JURY

Professeur Christophe Egles : Rapporteur
Directrice de Recherche Patricia Rousselle : Rapporteur
Docteur Stéphane Galiacy : Directeur de thèse
Professeur Patrick Calvas : Président du jury

Ecole doctorale : *Biologie-santé-Biotechnologies*
Unité de recherche : *INSERM U563*
Directeur(s) de Thèse : *François MALECAZE & Stéphane GALIACY*
Rapporteurs : *Carole Burillon, Christophe Egles & Patricia Rousselle*

A mes parents, les deux êtres les plus chers de mon existence. Merci de m'avoir appris que dans ce monde, « Rien n'est impossible, qu'il suffit d'y croire et de se donner la peine d'y parvenir ». Dawiyat MASSOUDI

Remerciements

Je me dois tout d'abord d'adresser mes remerciements et mon respect aux membres du jury de cette thèse qui m'ont fait l'honneur d'évaluer ce travail :

A Madame Burillon Carole, Madame Rousselle Patricia et Monsieur Egles Christophe, les rapporteurs de cette thèse, qui ont pris la peine de lire ce manuscrit et de me faire part de leurs remarques.

Je remercie également le Professeur **François MALECAZE** de m'avoir donné l'opportunité de réaliser ce travail de thèse au sein de son équipe.

Et parce que l'on ne fait rien seul(e)...

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements au Docteur **Stéphane GALIACY**, qui est mon co-directeur de thèse, de m'avoir permis d'effectuer cette thèse à ses côtés certes mais aussi de m'avoir encadré, guidé et surtout supporté durant ces trois longues années.

J'exprime ma gratitude à **Pierre FOURNIE** de m'avoir transmis un peu de son savoir-faire chirurgical mais également pour sa disponibilité, sa gentillesse et surtout sa patience.

Un grand merci à **Emilie ANCELE** pour tous ces bons moments passés à l'animalerie Claude Bernard et à l'INSERM.

Comme après la chirurgie vient le moment de la manipulation des échantillons à la paillasse, je me retourne tout d'abord vers **Angélique ERRAUD** pour lui dire MERCI : merci Angélique de m'avoir toujours éclairé de tes lumières « ISO 9001 » lorsque j'en avais besoin. Mes remerciements également à **Christine PERES** pour son aide, sa sympathie de tous les jours. Merci encore Angélique et Christine pour votre aide à la rédaction de ce mémoire de thèse, pour votre patience à mon égard durant mon séjour parmi vous. Je sais qu'il vous en a fallu...

Un grand merci à ma co-thésarde **Jacqueline BUTTERWORTH alias Jackie** pour tous ces bons moments : de délire, de partages scientifiques et de soutien mutuel. **Vive KAP surtout SV !!!!**

Je remercie également **Matthias MACE** pour ses services en informatique que j'ai du solliciter bien plus d'une fois.

Je n'oublie pas de remercier **Alexandre CAUSSE** pour le nombre de questions « académiques » que j'ai du lui poser depuis le début de la rédaction de ce mémoire.

Merci à vous tous, membres de l'équipe FM/PC pour ces moments inoubliables passés en votre compagnie...

Merci à tous ceux que j'ai côtoyé de près comme de loin durant ma thèse à l'Unité 563 ou 1043 de l'INSERM.

Je voudrais également remercier **David J. HULMES**, **Catherine MOALI** ainsi que tous les autres membres de leur équipe (Institut de Biologie et Chimie des Protéines, CNRS UMR 5086, Lyon) pour leur aide précieuse à la réalisation de certaines expériences mais aussi à la rédaction de ce manuscrit.

J'adresse maintenant mes très grands remerciements à **Tania LELIME** dit Tanou (uniquement pour les intimes, évidemment, non mais...☺), ma très chère amie que je considère comme une grande sœur. Merci d'avoir été là durant les bons et les moins bons moments (surtout ceux de cette année 2011!). Merci pour les leçons de « psychologie » qui se terminent toujours par : ***je vais bien, tout va bien !!*** ☺.

Un grand merci aux autres membres de ma famille d'avoir cru en moi et de m'avoir soutenu. : Ma sœur **Yassine**, ma sœur **Nassabia**, mon beau-frère **Roland**, ma sœur **Anita**, mes petits chouchous de **neveux et nièces...**

Avant de refermer cette page de remerciements, je tiens tout particulièrement à exprimer mes sincères, affectueux et profonds sentiments de reconnaissances à **MES PARENTS**.

A toi mon papa ! Merci d'avoir toujours été présent! Merci pour ton soutien et ton respect envers mes choix ! Merci pour ta compréhension et ta gentillesse et cela depuis ma toute petite enfance même lorsque je ne les méritais pas ! Merci d'être mon ***papa poule à moi*** que j'adore énormément...

A ma plus grande idole, ma chère et tendre maman à qui je dédie ce travail de thèse. Je ne trouve point les mots pour exprimer ma vive gratitude et mon profond respect à ton égard. Merci d'avoir cru en moi, d'avoir toujours été là pour moi surtout pendant les moments de doutes. Merci d'avoir su me protéger et trouver les mots justes quand il fallait. Je peux continuer à dire merci encore et encore mais je pense m'arrêter là avec un dernier : ***merci maman d'avoir fait de moi ce que je suis***, tout simplement...

Tables des matières

page

PUBLICATIONS/COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES PAR VOIE D’AFFICHE	10
ABREVIATIONS ET ANGLICISMES	12
LISTE DES ILLUSTRATIONS	14
INTRODUCTION	20
I.1. Situation du sujet	22
I.2. La cornée	23
<u>I.2.1. Formation de la cornée au cours du développement</u>	23
<u>I.2.2. Différentiation cellulaire et production de matrice extracellulaire (MEC) durant le développement du stroma cornéen : cas des aviaires</u>	25
<u>I.2.3. Structure et organisation de la cornée adulte</u>	26
I.2.3.1. L’épithélium cornéen	
<i>I.2.3.1.1. L’assise basale</i>	
<i>I.2.3.1.2. L’assise intermédiaire</i>	
<i>I.2.3.1.3. L’assise superficielle</i>	
I.2.3.2. La lame basale	
I.2.3.3. La couche de Bowman	
I.2.3.4. Le stroma cornéen	
I.2.3.5. La membrane de Descemet	
I.2.3.6. L’endothélium cornéen	
I.3. Les collagènes : constituants fondamentaux de la MEC	30
<u>I.3.1. Les collagènes fibrillaires du stroma cornéen</u>	36
I.3.1.1. Le collagène de type I	
<i>I.3.1.1.1. La biosynthèse du collagène de type I</i>	
<i>I.3.1.1.2. La distribution du collagène de type I</i>	
I.3.1.2. Le collagène de type V	
I.3.1.3. Le collagène de type III	
<u>I.3.2. Les collagènes non fibrillaires du stroma cornéen : les FACIT</u>	45

I.3.2.1. Le collagène de type XII	
I.3.2.2. Le collagène de type XVI	
I.4. Les protéinases dans la régulation du « processing » des collagènes	54
<u>I.4.1. Les Astacines et la maturation du collagène</u>	55
<u>I.4.2. Les Protéinases Tolloïdes</u>	56
I.4.2.1. Les substrats des protéinases Tolloïdes	
<i>I.4.2.1.1. Maturation des protéines de la MEC</i>	
<i>I.4.2.1.2. Activation des facteurs de croissance</i>	
<i>I.4.2.1.3. Contrôle de l'angiogenèse</i>	
<i>I.4.2.1.4. Autres substrats</i>	
I.4.2.2. Les régulateurs endogènes des protéinases Tolloïdes	
<i>I.4.2.2.1. Les inhibiteurs</i>	
<i>I.4.2.2.2. Les activateurs</i>	
<u>I.4.3. Les métalloprotéinases matricielles et le remodelage de la MEC</u>	70
I.4.3.1. La MMP-14	
I.5. Les protéoglycannes : importance dans la structure et la fonction de la cornée	76
<u>I.5.1. Les protéoglycannes cornéens</u>	77
<u>I.5.2. Rôle des protéoglycannes dans la structure et la fonction de la cornée</u>	78
I.6. Synthèse des interactions supramoléculaires qui sont à l'origine de la formation de la fibre de collagène	79
I.7. La cicatrisation	81
<u>I.7.1. Différence entre la cicatrisation cornéenne et la cicatrisation cutanée</u>	81
<u>I.7.2. La cicatrisation cornéenne</u>	82
I.8. Problématique	87
<u>I.8.1. Les cécités d'origine cornéenne: un problème de santé public au niveau international</u>	87
<u>I.8.2. La greffe : seule solution alternative aux opacités cornéennes persistantes</u>	88
I.8.2.1. La greffe de cornée transfixiante	
I.8.2.2. Les greffes de cornée lamellaires	
<i>I.8.2.2.1. Les greffes de cornée lamellaires antérieures</i>	

I.8.2.2.2. Les greffes de cornée lamellaires postérieures

I.9. But	93
MATERIELS ET METHODES	94
RESULTATS	112
III.1. Approche par thérapie génique : réduction de l'opacité cornéenne par surexpression de la MT1-MMP ou MMP-14	114
III.2. Deuxième approche thérapeutique : réduction de l'opacité cornéenne par inhibition de la maturation du collagène : les protéinases Tolloïdes	120
III.3. Etude de l'expression du collagène FACIT de type XII dans le remodelage matriciel mis en place après blessure	138
III.4. Analyse de l'expression du collagène de type XIV au niveau de la cornée murine	144
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	152
IV.1. Approche par thérapie génique : réduction de l'opacité cornéenne par surexpression de la MT1-MMP ou MMP-14	156
IV.2. Deuxième approche thérapeutique : réduction de l'opacité cornéenne par inhibition de la maturation du collagène : les protéinases Tolloïdes	158
IV.3. Etude de l'expression du collagène FACIT de type XII dans le remodelage matriciel mis en place après blessure	164
IV.4. Analyse de l'expression du collagène de type XIV au niveau de la cornée murine	167

IV.5. Perspectives générales sur les collagènes FACIT et la cicatrisation cornéenne 169

CONCLUSION GENERALE 171

ANNEXES 172

BIBLIOGRAPHIE 174

PUBLICATIONS

- 2010 SD. Galiacy, P. Fournié, **D. Massoudi**, E. Ancèle, J-C. Quintyn, A. Erraud, I. Raymond-Letron, F. Rolling, F. Malecaze. **Matrix metalloproteinase 14 overexpression reduces corneal scarring.**
Gene Therapy 2011.
- 2011 **D. Massoudi**, P. Fournié, A. Erraud, M. Malbouyres, C. Moali, D.J.S. Hulmes, F. Malecaze, SD. Galiacy. **Up-regulation of bone morphogenetic protein-1/mammalian tolloid and procollagen C-proteinase enhancer-1 in corneal scarring.**
IOVS 2011.
- 2011 **D. Massoudi**, J. Butterworth, A. Erraud, P. Fournié, F. Malecaze, SD. Galiacy. **Type XII collagen is overexpressed during corneal scarring.**
IOVS 2011.
- 2011 J. Butterworth*, **D. Massoudi***, A. Erraud, P. Fournié, C. Peres, E. Ancèle, M. Macé, F. Malecaze, M. Allouche, P. Calvas, SD. Galiacy. **In vivo reexpression of stem cells markers in adult stromal cells during murine corneal wound repair.**
Stem Cells 2011 (*soumis*). *JB et DM sont copremières auteurs.

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES PAR VOIE D'AFFICHE

- 2011 **D. Massoudi**, P. Fournié, A. Erraud, M. Malbouyres, C. Moali, D. Hulmes, F. Malecaze, SD. Galiacy. « **Tolloid proteinases expression in the wounded cornea** »
XIXème congrès annuel de la Société Française de Biologie de la Matrice Extracellulaire (SFBMec). Toulouse, France. 24-26 mars 2011.
- 2011 SD. Galiacy, P. Fournié, **D. Massoudi**, E. Ancèle, J-C. Quintyn, A. Erraud, I. Raymond-Letron, F. Rolling, F. Malecaze.
« **Matrix metalloproteinase 14 (MMP-14) overexpression reduces corneal scarring** »
XIXème congrès annuel de la Société Française de Biologie de la Matrice Extracellulaire (SFBMec). Toulouse, France. 24-26 mars 2011.
- 2010 **D. Massoudi**, P. Fournié, A. Erraud, M. Malbouyres, C. Moali, D. Hulmes, F. Malecaze, SD. Galiacy. « **Tolloid proteinases expression in the wounded cornea** »
XXIInd Federation of European Connective Tissue Societies Meeting (FECTS Meeting). Davos, Suisse. 3-7 juillet 2010.
- 2009 SD. Galiacy, P. Fournié, **D. Massoudi**, A. Erraud, J-C. Quintyn, I. Raymond-Letron, F. Rolling, F. Malecaze. « **MMP14 overexpression reduces stromal corneal scarring** »
5th Joint Meeting of the European Tissue Repair Society and the Wound Healing Society. Limoges, France. 25-29 août 2009.

ABREVIATIONS ET ANGLICISMES

α-SMA	α -Smooth Muscle Actin
AAV	Adeno associated virus
ADAMTS	a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs
ADNc	AND complémentaire
ALTK	Automated Lamellar Therapeutic Keratoplasty
AP-2	Apolipoprotéine-2
BMP-1	Bone Morphogenetic Protein-1
BSA	Bovine Serum Albumin
CCL4	Tétrachlorure de carbone
CD44	Cluster of Differentiation 44
CS/DS	Chondroïtin/Dermatan Sulfate
CUB	Complement Uegf BMP-1
COL	Collagenic Domain
DALK	Deep Anterior Lamellar Keratoplasty
DMLA	Dégénérescence Maculaire Liée à l'Âge
DMP-1	Dentin Matrix Protein-1
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DO	Densité Optique
DSPP	Dentin SialoPhosphoProtein
EDTA	EthyleneDiamineTetraAcetic acid
EGF	epidermal Growth Factor
FACIT	Fibril Associated Collagens with Interrupted Triple helices
GAG	Glycoaminoglycane
GDF	Growth/Differentiation Factor
GFP	Green Fluorescent Protein
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
HDL	High Density Lipoprotein
HS	Heparan Sulfate
IL	Interleukin
KLAP	Kératoplastie Lamellaire Antérieure Profonde
KO	Knock out
KS	Keratan Sulfate
LOX	Lysyl Oxydase

LOXL	Lysyl Oxydase-like
LTBP	Latent TGF β -binding protein
MBL	Mannan Binding Lectin
MCP-3	Monocyte Chemotactic Protein-3
MEC	Matrice Extracellulaire
MT-MMP	Membrane Type-Matrix Metalloproteinase
MMP	Matrix Metalloproteinase
mTLD	Mammalian Tolloid
mTLL-1	Mammalian Tolloid-like 1
mTLL-2	Mammalian Tolloid-like 2
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NC	Non-Collagenous domain
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
ONT-1	Olfactomedin Noelin Tiarin factor 1 ou Olfactomedin-like protein 3
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PCPE	Procollagen C-proteinase enhancer
PCPs	Procollagen C-proteinases
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFA	Paraformaldéhyde
RER	Réticulum Endoplasmique Rugueux
RIN	RNA Integrity Number
SDF-1	Stromal cell-Derived Factor 1
sFRP	secreted Frizzled Related Protein
SMV	CytoMégaloVirus
SPC	Subtilisin-like Proprotein Convertase.
SV40	Simian Virus 40
TGFβ	Transforming Growth Factor β
TIMP	Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase
TNF-α	Tumor Necrosis Factor- α
TBE	Tris Borate EDTA
Tsg	Twisted gastrulation
vWA	Facteur de von WilleBrand
WT	Wild Type

LISTE DES ILLUSTRATIONS

I. Liste des figures

- Figure 1 :** Représentation schématique de la cornée, partie antérieure du globe oculaire.
- Figure 2 :** L'œil et la cornée.
- Figure 3 :** Développement du stroma cornéen.
- Figure 4 :** Représentation des différentes couches de la cornée humaine.
- Figure 5 :** Représentation schématique simplifiée de la synthèse de molécules de collagènes.
- Figure 6 :** Les membres de la superfamille des collagènes et leurs assemblages supramoléculaires.
- Figure 7 :** Exemple d'assemblage de chaînes α en molécules trimériques : cas des collagènes I et V.
- Figure 8 :** Schémas représentant les gènes codant pour les chaînes α du procollagène I (haut) et les domaines structuraux de la molécule du procollagène (bas).
- Figure 9 :** Biosynthèse du collagène de type I.
- Figure 10 :** Modèle de fibre hétérotypique type I/V.
- Figure 11 :** Les cellules surexprimant une chaîne $\alpha 1$ (V) modifiée et rapidement dégradable assemble anormalement des fibres avec un large diamètre.
- Figure 12 :** Schéma des collagènes de type XIV et XII chez la souris.
- Figure 13 :** Les Homotrimères des FACIT sont capables de se lier aux fibres de collagène de type I (représentées par la structure qui alterne les motifs en noir et blanc).
- Figure 14 :** Interactions entre les FACIT et les fibres des collagènes fibrillaires.
- Figure 15 :** Variants d'épissage du collagène de type XII.
- Figure 16 :** Variants d'épissage du collagène de type XIV.
- Figure 17 :** Situation parmi les protéinases de la famille des métzincines et des sous-familles des MMPs et des Astacines.
- Figure 18 :** Mécanisme de maturation des fibres de collagène de type III.
- Figure 19 :** Structure en domaines des 4 isoformes principales de protéinases Tolloïdes de mammifères.
- Figure 20 :** Maturation de la laminine 332 et du procollagène VII par les protéinases Tolloïdes et association avec les autres protéines des lames basales.
- Figure 21 :** Différents modes d'activation des facteurs de croissance de la famille du TGF- β par les protéinases Tolloïdes.
- Figure 22 :** Clivage du perlécan et de la prolactine par les protéinases tolloïdes.
- Figure 23 :** Schéma récapitulatif décrivant les substrats connus des protéinases Tolloïdes et les fonctions associées.
- Figure 24 :** Structure en domaines des sFRPs.
- Figure 25 :** Protéines décrites pour être capables d'augmenter l'activité des protéinases Tolloïdes sur au moins un de leurs substrats.
- Figure 26 :** Structure en domaines de PCPE-1/PCPE-2, activateurs des protéinases Tolloïdes.
- Figure 27 :** Aspect des fibres de collagène dans les tendons de souris Pcolce^{-/-}.
- Figure 28.** Les différents domaines fonctionnels des MMPs.
- Figure 29.** Domaines structuraux de la MMP-14.
- Figure 30:** Structure des glycosaminoglycannes de la matrice du stroma cornéen.
- Figure 31:** Structure des fibres stromales.

Figure 32 : Schéma d'une fibre de collagène.

Figure 33 : Schéma simplifié de la cascade de cicatrisation cornéenne.

Figure 34 : Cicatrisation d'une plaie du stroma cornéen induite par incision.

Figure 35 : Opacité cornéenne post-infectieuse (Herpes).

Figure 36 : Les causes globales de cécité dans le monde.

Figure 37 : Une greffe de cornée permet de remplacer une cornée opacifiée par une cornée transparente d'un donneur.

Figure 38 : Rejet endothélial de greffe de cornée.

Figure 39 : Dans la kératoplastie lamellaire antérieure profonde (KLAP), seules persistent les couches profondes de la cornée (membrane de Descemet et endothélium).

Figure 40 : Dans l'ALTK, la découpe est automatisée à l'aide d'un microkératome qui permet de « couper » une tranche de cornée d'épaisseur « ajustable ».

Figure 41 : Le principal avantage de la greffe endothéliale cornéenne est le maintien de la cornée antérieure du patient.

Figure 42 : Construction virale utilisée pour la surexpression de la MMP-14 au niveau de la cornée de souris.

Figure 43 : Illustration de la technique d'injection intra-stromale dans une cornée de souris.

Figure 44 : Technique chirurgicale utilisée pour la réalisation du modèle de blessure cornéen.

Figure 45 : Protocole simplifié de la mesure de la concentration d'ARN des extraits cornéens (invitrogen).

Figure 46 : Instruments de « l'Agilent 2100 bioanalyzer ».

Figure 47 : Illustration d'un profil d'électrophorégramme d'un échantillon d'ARN obtenu à partir de la technologie Agilent 2100 bioanalyzer.

Figure 48 : Exemple d'un profil d'amplification (en triplicate) obtenu avec des amorces spécifiques à partir du LightCycler 480.

Article 1: *Matrix metalloproteinase 14 overexpression reduce corneal scarring.*

Figure 1: AAV2/8.gfp expression in the unwounded murine cornea 7, 14 and 56 days after intrastromal injection of $2.10e^{10}$ vg (n=6 mice, two per time point). Epithelium and endothelium show no fluorescence. Only the stromal keratocytes (white arrows) express green fluorescence (*200 magnification).

Figure 2: MMP14 and recombinant MMP14 (rMMP14) expression in unwounded cornea after injection of $4.10e^9$ vg of AAV2/8.mmp14. (a) The mRNA expression of MMP14 and rMMP14 revealed by reverse transcriptase PCR. Expression levels were normalized as a ratio of the expression level of housekeeping genes (HKG) (n=4 mice per time point). MMP14 protein expression was revealed by immunofluorescence in non-injected cornea (b), in unwounded murine cornea 14 days after intrastromal injection of AAV2/8.gfp (c) or AAV2/8.mmp14 (d) (n=3 mice per group). MMP14 was expressed in basal epithelial cell layers (b, c, d). It was weakly expressed in keratocytes in non-injected cornea (b) and in AAV2/8.gfp -injected cornea (c) and strongly expressed in AAV2/8.mmp14-injected cornea (d, white arrows) (*400 magnification).

Figure 3: Histopathology. We present one example of each grade, with corresponding histological observations. (a) Microscope observation, circled area is centered on the wounded area (magnification *40). (b) The α -SMA expression (brown staining; magnification *400). (c) Masson trichrome (magnification *400). We observed increased expression of α -SMA and increased collagen remodeling with higher opacity grade.

Figure 4: Principal component analysis (PCA) of six histological variables (edema, corneal thickness, neovascularization, fibroplasia, neutrophils, α -SMA expression) was performed.

The first two factors arising from the PCA account for 77% (AAV2/8.gfp) and 79% (AAV2/8.mmp14) of the explained variance. (a) AAV2/8.gfp-injected mice (n=15 mice). Two groups of independent variables were visualized: (1) fibroplasia and α -SMA expression; (2) edema, corneal thickness, neovascularization and neutrophils. (b) AAV2/8.mmp14-injected mice (n=19 mice). Two groups of variables were visualized: (1) edema, neovascularization, neutrophils; (2) fibroplasia and α -SMA. Corneal thickness is presented alone and independent from edema and all the other variables.

Article 2: *Up-regulation of bone morphogenetic protein-1/mammalian tolloid and procollagen C-proteinase enhancer-1 in corneal scarring*

Figure 1: Transmission electron microscopy of control (A,C,E) and wounded corneas (B,D,F), the latter 14 days after surgery. (A,B) epithelial basement membrane region, scale bars 200 nm; (C,D) stroma, scale bars 2 μ m; (E,F) stroma, high magnification, scale bars 200 nm.

Figure 2: Q-PCR analysis of fold change in gene expression in the stroma (A,B) and (C) epithelium during mouse corneal wound repair. (A) Collagen III, (B, C) Bmp-1/mTld, Pcpe-1 and Pcpe-2.

Figure 3: Immunohistochemistry of BMP-1/mTLD (A-D) and PCPE-1 (E-H) expression in control (A-E) and wounded corneas, the latter at days 7 (B and F), 21 (C and G) and 28 (D and H) respectively. Scale bar 25 μ m. DAPI-staining nuclei in blue.

Figure 4: Expression of BMP-1/mTLD and PCPE-1 in human corneal lesions. (A-C) 18 months after mechanical trauma, (B-F) 5 years of herpetic keratitis. BMP1/mTLD expression in B and E; PCPE1 expression in C and F. Scale bar 100 μ m. DAPI-staining nuclei in blue.

Figure 49 : Evaluation clinique des opacités cornéennes des souris ayant été traitées avec un inhibiteur de BMP-1 (A33).

Figure 50 : Analyse histologique des cornées traitées avec l'inhibiteur de BMP-1 (A33) en comparaison avec les cornées contrôles.

Figure 51 : Aspect du stroma cornéen en réparation, vu au microscope électronique après 14 jours de traitement avec un inhibiteur de BMP-1.

Figure 52 : Aspect de la lame basale cornéenne en réparation, vu au microscope électronique après deux semaines d'inhibition de BMP-1.

Figure 53 : Evaluation clinique des opacités cornéennes des souris KO pour Pcpe-1 14 jours après incision.

Figure 54 : Evaluation de la restauration structurale de la cornée des souris KO pour Pcpe-1 14 jours après incision.

Figure 55 : Illustrations de l'intégrité structurale des cornées des souris KO pour Pcpe-1 14 jours après l'incision, grâce à l'utilisation d'un collyre à la fluorescéine.

Figure 56 : Aspect du stroma cornéen des souris KO pour Pcpe-1 14 jours après incision vu au microscope électronique.

Figure 57 : Structure de la lame basale cornéenne de souris KO pour Pcpe-1, 14 jours après blessure observée au microscope électronique.

Article 3: *Type XII collagen over expression in human and murine stromal corneal scar.*

Figure 1: Schematic representation of the modular structure of type XII collagen and the different NC3 and NC1 alternatively spliced transcripts.

Figure 2: Type XII collagen expression in human traumatic cornea. Subject was male, presenting corneal scarring for 18 months after a perforating mechanical wound. A: Biomicroscopy picture. Black arrows point toward corneal scar. Type XII collagen was expressed (B) and (D) in all the stromal depth. Area of type XII collagen over expression was also positive for alpha-smooth muscle actin (myofibroblast) (C). Scale bar denotes 100µm. Type XII collagen and alpha-smooth muscle actin staining is shown in red. DAPI-staining nuclei are shown in blue.

Figure 3: Type XII collagen expression in human herpetic cornea. Subject was a female, presenting herpes virus and corneal scarring complication for 5 years. A: Biomicroscopy picture. Black arrows point toward corneal scar areas. Type XII collagen was expressed (B) and (D) in all the stromal depth. Area of type XII collagen over expression was also positive for alpha-smooth muscle actin (myofibroblast) (C). Scale bar denotes 100µm. Type XII collagen and alpha-smooth actin staining is shown in red. DAPI-staining nuclei are shown in blue.

Figure 4: Type XII collagen expression near the wound bed during murine corneal wound repair (n=3 to 5 mice per time point). A: unwounded cornea, B: negative control (goat serum), C: Day 7 post-incision, D: Day 14 post-incision, E: Day 21 post- incision, F: Day 28 post-incision. Type XII collagen staining is shown in red. DAPIstaining nuclei are shown in blue. Scale bar: 25 µm.

Figure 5: Epithelial fold-change in expression of type XII collagen NC1 splice variants during murine corneal wound repair. Black: NC1-Long variant, White: NC1-Short variant. Fold-changes in gene expression were calculated in comparison with levels observed in unwounded corneal epithelia (n=6 to 11 mice per time point, for unwounded epithelia n=36). NC1-L variant expression was increased at days 7, 14 and 21 post-incision, while NC1-S variant expression was only increased at day 21 post-incision. *= P<0.05.

Figure 6: Stromal fold-change in expression of type XII collagen NC1 splice variants during murine corneal wound repair. Black: NC1-Long variant, White: NC1-Short variant. Fold-changes in gene expression were calculated in comparison with levels observed in unwounded corneal stroma (n=9 to 21 mice per time point, for unwounded stroma n=42). NC1-L variant expression was increased at day 21 and day 28. *= P<0.05.

Figure 7: Epithelial fold-change in expression of type XII collagen NC3 splice variants during murine corneal wound repair. Black: NC3-Long variant, White: NC3- Short+Long variants. Fold-changes in gene expression were calculated in comparison with levels observed in unwounded corneal epithelia (n=6 to 11 mice per time point, for unwounded epithelia n=36). NC3-S+L variants expression was increased at day 14 and day 21 post-incision. *= P<0.05.

Figure 8: Stromal fold-change in expression of type XII collagen NC3 splice during murine corneal wound repair. Black: NC3-Long variant, White: NC3-Short+Long variants. Fold-changes in gene expression were calculated in comparison with levels observed in unwounded corneal stroma (n=9 to 21 mice per time point, for unwounded stroma n=42). NC3-S+L variants expression was decreased at day 21 and day 28. *= P<0.05.

Figure 9: Type XII collagen expression in murine corneal scar. Corneas were investigated 7 months after incision. A: unwounded cornea. B: Grade 1 opacity (slight opacity that did not interfere with the visualization of fine iris detail). C: Grade 3 opacity (complete opacification of the stroma in the area of the ablation). Type XII collagen expression was stronger in grade 3 opacity compare to grade 1. Type XII collagen is shown in red. DAPI-staining nuclei are shown in blue. Scale bar: 25 µm.

Supl. Fig. 1: Type XII collagen expression during murine corneal wound repair (n=3 to 5 mice per time point). A: unwounded cornea, B: negative control (goat serum), C: Day 7 post-incision, D: Day 14 post-incision, E: Day 21 post-incision, F: Day 28 post-incision.

Type XII collagen staining is shown in red. DAPI-staining nuclei are shown in blue. Scale bar: 100 μm .

Figure 58 : Absence de l'expression du collagène de type XIV au niveau de la cornée de souris.

Figure 59 : Evolution de l'expression du collagène de type XIV au niveau d'une cornée de souris (zone blessée) après incision.

Figure 60 : Profil d'expression du collagène de type XIV au niveau de la cornée après incision : Evolution de l'expression protéique du collagène de type XIV à côté de la zone lésée.

Figure 61 : Expression protéique du collagène de type XIV en périphérie de la zone blessée au cours de différentes étapes de la cicatrisation coréenne.

II. Liste des tableaux

Tableau 1 : Les Cellules du stroma cornéen.

Tableau 2 : Les protéines de la famille des collagènes.

Tableau 3 : Substrats des protéinases Tolloïdes qui sont connus et décrits dans la littérature ainsi que les séquences clivées.

Tableau 4 : Les différents groupes de MMPs.

Tableau 5 : Liste (non exhaustive) des substrats rapportés de la MMP-14.

Tableau 6 : Liste des anticorps utilisés au cours de cette étude.

Tableau 7 : protocole utilisé dans le LightCycler480 pour les réactions de PCR quantitative en temps réel.

Tableau 8 : Pourcentage d'efficacité de l'ensemble des amorces utilisées lors de cette étude.

Article 1: *Matrix metalloproteinase 14 overexpression reduce corneal scarring.*

Table 1: Opacity score measured 21 days after injection of viral genome ($2.10e^{10}$ vg (D21)) or control solution in unwounded corneas.

Table 2: Opacity score measured after injection of AAV2/8.mmp14 in unwounded corneas (D28–D224).

Table 3: Effect of AAV2/8.mmp14 on corneal repair: clinical corneal opacity evaluation ($4.10e^9$ vg).

Table 4: The mRNA expression for genes involved in corneal wound repair 14 days after corneal incision.

Article 2: *Up-regulation of bone morphogenetic protein-1/mammalian tolloid and procollagen C-proteinase enhancer-1 in corneal scarring*

Table 1: mRNA expression levels in mouse corneal epithelium and stroma, normalized to a set of housekeeping genes, for control (non-wounded) and wounded corneas up to 28 days post-surgery.

Article 3: *Type XII collagen over expression in human and murine stromal corneal scar.*

Table 1: Primer sequences used for the detection of type XII collagen splice variant mRNA. Protein domain positions of these primers are indicated.

INTRODUCTION

I.1. Situation du sujet

Pour l'être vivant, la vision constitue un élément important pour la perception de l'environnement. Cette fonction est rendue possible en partie, grâce à la forme et à la transparence de la cornée qui représente la partie antérieure du globe oculaire (**Figure 1**).

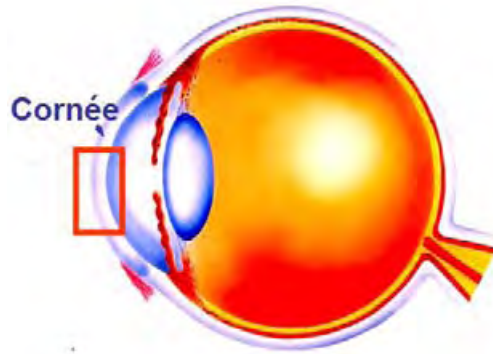


Figure 1 : Représentation schématique de la cornée, partie antérieure du globe oculaire.

Des lésions traumatiques, chimiques, inflammatoires, immunologiques ou infectieuses du tissu conjonctif cornéen peuvent aboutir à la formation d'une cicatrice qui conduit à une altération de la structure cornéenne accompagnée d'une perte de sa fonction.

Les pertes totales ou partielles de la vision constituent des problèmes de société majeurs au niveau international. Les cécités causées notamment par une perte de transparence cornéenne représentent selon l'Organisation Mondiale de la Santé ou OMS, la troisième cause de cécité dans le monde ([Foster and Resnikoff, 2005](#)). Actuellement, le seul traitement curatif contre les cécités dues à une opacification profonde de la cornée est la chirurgie par une greffe de cornée. Ce traitement se heurte cependant à des complications telles que le manque de donneurs, le rejet du greffon, ainsi que l'astigmatisme induit.

De ce fait, ce travail porte sur l'étude de solutions alternatives aux greffes cornéennes, et comporte deux grands axes :

Un axe thérapeutique qui vise à évaluer l'efficacité de la modulation de l'activité de métalloprotéinases dans la résorption de l'opacité cornéenne.

Un axe plus fondamental qui porte sur l'étude de l'implication d'un groupe de collagènes nommé FACIT (Fibril Associated Collagens with Interrupted Triple helices) dans la mise en place et le maintien de l'opacité cornéenne après blessure.

I.2. La cornée

La cornée représente la partie antérieure de l'œil et assure par sa transparence, la fonction de premier dioptré oculaire. Il s'agit, en effet, d'un tissu transparent, avasculaire, très innervé et qui joue un rôle majeur dans la réfraction de l'œil, participant ainsi pour 70% au pouvoir réfractif oculaire (**Figure 2**).

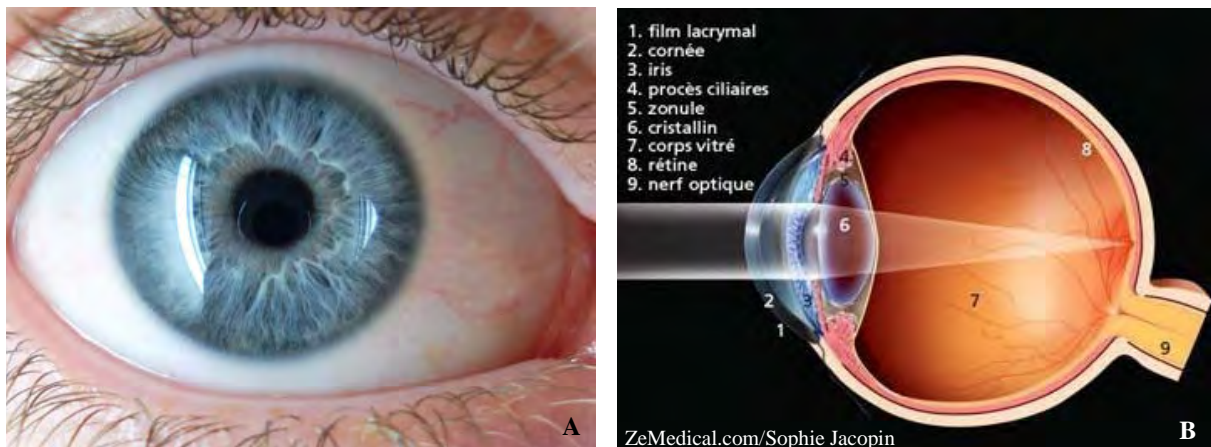


Figure 2 : L'œil et la cornée **A** : Œil vu de face. **B** : Trajectoire de la lumière au niveau d'un œil vu en coupe transversale.

I.2.1. Formation de la cornée au cours du développement

La formation de la cornée débute par la mise en place de sa partie la plus antérieure qui est l'épithélium. Cet élément dérive de l'ectoderme qui persiste après la mise en place de la placode cristallinienne. Des cellules de la crête neurale (**Tableau 1**) migrent ensuite dans l'espace entre l'épithélium cornéen et la placode cristallinienne et forment l'endothélium cornéen ([Hassell and Birk, 2010](#)).

L'épithélium et l'endothélium sont donc les premiers éléments de la cornée à apparaître (à la 5^{ème} semaine de gestation chez l'homme). La cornée primitive est formée,

une fois que l'ectoderme superficiel se détache de la vésicule cristallinienne et se différencie en une bicouche épithéliale qui repose sur une lame basale. Ces cellules développent des complexes jonctionnels à la 6^{ème} semaine de gestation. A 7 semaines, le segment antérieur est formé par l'invasion en plusieurs vagues successives de cellules de la crête neurale sous l'épithélium cornéen pour former l'endothélium, le stroma cornéen et l'iris. L'endothélium forme à ce stade une sorte de bicouche cellulaire cuboïdale (Qazi et al., 2010). Ces cellules commencent à sécréter une lame basale à partir de la 8^{ème} semaine, qui deviendra plus tard la membrane de Descemet [(Wulle, 1972); (Murphy et al., 1984)]. C'est également à la 8^{ème} semaine de gestation que la différenciation des tissus commence à former un œil entièrement fonctionnel.

Au 3^{ème} mois de gestation, les fibroblastes et les fibres de collagène apparaissent ; les fibroblastes commencent à sécréter des glycosaminoglycannes qui forment la substance fondamentale de la cornée primitive.

Le stroma sous l'épithélium cornéen s'épaissit lentement et se condense pour former la couche de Bowman au 4^{ème} mois de gestation. A ce stade, des jonctions serrées commencent également à se former entre les sommets des cellules endothéliales cornéennes. Comme tout processus de développement, la cornée s'agrandit avec la production d'humeur aqueuse et la déshydratation concomitante du stroma conduisant à la formation d'un tissu oculaire transparent : la cornée avasculaire (Qazi et al., 2010).

Cell Type	Cell Derivation	Phenotype
Neural Crest Cells	Neural Ectoderm During neural tube closure	They migrate throughout the developing embryo and contribute to the development of a number of different organs including the eye. The corneal stroma and endothelium are neural crest derivatives
Keratoblasts	Neural Crest Cells That migrate between the corneal epithelium and endothelium during development	They proliferate and produce a hyaluronanrich ECM containing sparse collagen fibrils
Keratocytes	Keratoblasts	They replace the hyaluronanrich ECM with an ECM consistent with transparency containing densely packed collagen fibrils and proteoglycans during late embryonic and post-natal development
Quiescent Keratocytes	Keratocytes	They have a low level of biosynthetic activity to maintain the ECM produced by keratocytes
Hypercellular Myofibroblasts	Keratocytes/Quiescent Keratocytes	They contain α smooth muscle actin, but produce only low levels of ECM resulting in densely packed cells in a sparse ECM
Myofibroblasts	Hypercellular Myofibroblasts	They contain α smooth muscle actin and produce high level of ECM, but containing components such as hyaluronan that are not normally present resulting in an ECM inconsistent with transparency
Wound Fibroblasts	Hypercellular Myofibroblasts Possibly Myofibroblasts	They produce an ECM of densely packed fibrils and proteoglycans that restores transparency
Corneal Fibroblasts	Keratocytes/Quiescent Keratocytes	Result from cell culture in media containing fetal bovine serum. A varying proportion contain α smooth muscle actin

Hassell JR and Birk DE, 2010

Tableau 1 : Les cellules du stroma cornéen : dérivation et phénotype.

I.2.2. Différentiation cellulaire et production de matrice extracellulaire (MEC) durant le développement du stroma cornéen : cas des aviaires

Les cellules de la crête neurale générées à partir de la région la plus dorsale du tube neural et qui migrent dans l'espace entre l'épithélium et l'endothélium cornéens donnent les premières cellules du stroma cornéen qui sont appelées kératoblastes [(**Tableau 1**), (**figure 3**)]. Ces kératoblastes prolifèrent et synthétisent une grande quantité d'hyaluronane qui va être à l'origine de la formation d'une matrice extracellulaire (MEC) stromale embryonnaire [([Coulombre and Coulombre, 1958](#)), ([Toole and Trelstad, 1971](#))]. Les corps protéiques du lumican et du keratocan peuvent être détectés à ce stade, mais leurs chaînes de glycosaminoglycannes (GAG) ne sont pas encore sulfatées et sont donc essentiellement des glycoprotéines ([Cornuet et al., 1994](#)). La cornée, à ce stade, a une épaisseur similaire à celle qu'elle aura à l'éclosion mais elle n'a acquis cependant que 40% de sa transparence finale.

Les kératoblastes dans le stroma embryonnaire se différencient à ce moment là en kératocytes [(**Tableau 1**), (**Figure 3**)]. Ces cellules continuent à proliférer bien qu'à un échelon inférieur, et synthétisent maintenant des quantités importantes de collagènes et de protéoglycannes de type kératane sulfate qui remplacent la MEC riche en hyaluronane/eau avec une densité d'empaquetage des fibres de collagène de type MEC similaire à celle observée dans une cornée adulte [([Funderburgh et al., 1986](#)), ([Cornuet et al., 1994](#)), ([Young et al., 2007](#))]. Le biglycan, un autre membre de cette famille de gènes riches en leucine, est aussi exprimé au même moment où il agit en collaboration avec la décorine pour réguler la croissance du diamètre des fibres ([Zhang et al., 2009](#)). Lorsque la production des fibres de type MEC est complète, la cornée embryonnaire achève à 100% sa transparence finale ([Coulombre and Coulombre, 1958](#)). C'est la synthèse de ces fibres de collagène, d'une MEC riche en protéoglycannes kératane sulfate par les kératocytes qui provoque la stratification et permet ainsi à la cornée d'achever pleinement sa transparence ([Hassell and Birk, 2010](#)).

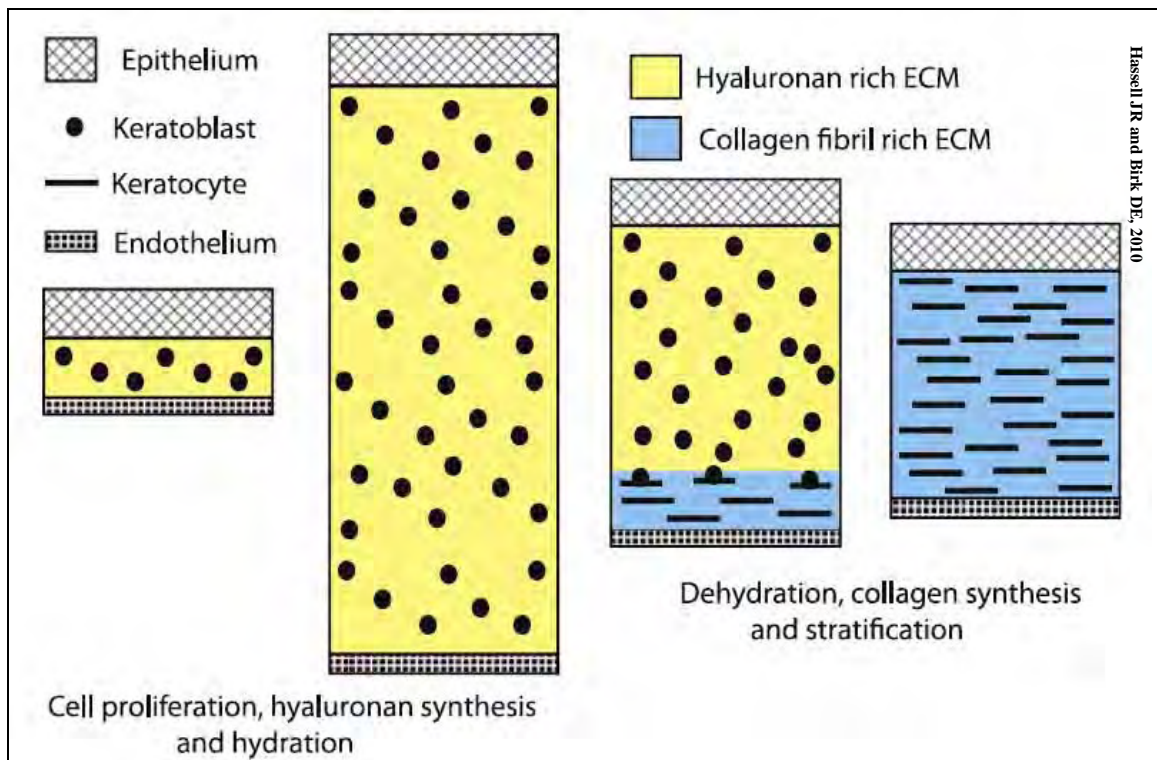


Figure 3: Développement du stroma cornéen : Les kératoblastes qui dérivent des cellules des crêtes neurales envahissent l'espace entre l'épithélium et l'endothélium cornéens en développement, prolifèrent et produisent une MEC très riche en hyaluronane (HA). Ces kératoblastes se différencient ensuite en kératocytes qui synthétisent une MEC riche en fibres de collagène et en protéoglycannes. Cette nouvelle matrice transparente, remplace celle riche en HA qui était synthétisée par les kératoblastes.

I.2.3. Structure et organisation de la cornée adulte

En résumé, la cornée est constituée de 3 structures (de la plus externe à la plus interne) :

- un épithélium
- un stroma
- un endothélium

L'épithélium pluristratifié est séparé du stroma par une lame basale qui est doublée chez certaines espèces dont l'homme de la couche de Bowman tandis que la membrane de Descemet délimite le stroma de la monocouche endothéliale (**Figure 4**).

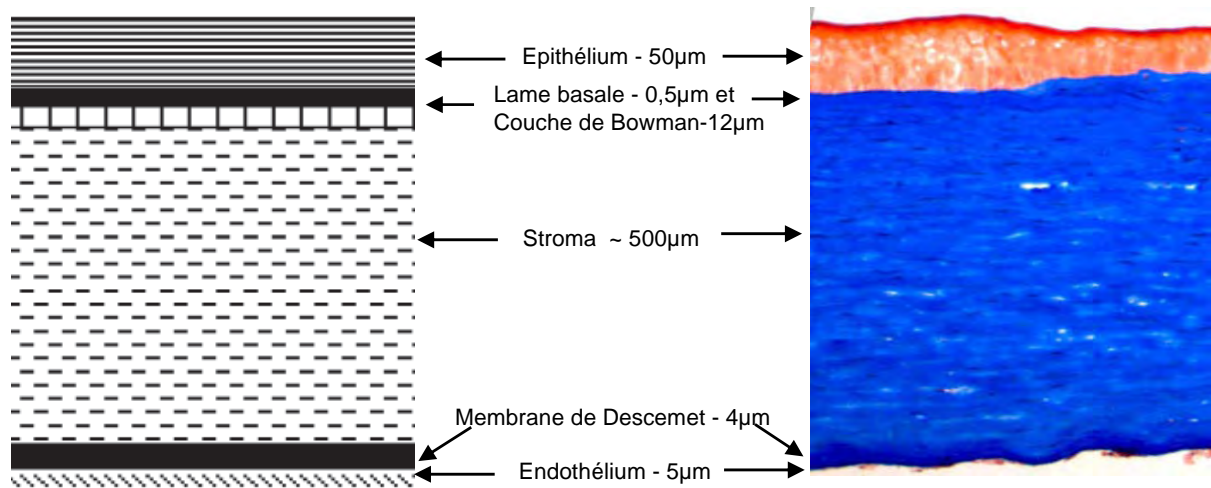


Figure 4 : Représentation des différentes couches de la cornée humaine. La lame basale qui est doublée de la couche de Bowman sépare l'épithélium pluristratifié du stroma. La membrane de Descemet quant à elle délimite le stroma de la monocouche endothéliale. **Image de gauche :** représentation schématique des différentes structures de la cornée humaine [d'après (Michelacci, 2003)]. **Image de droite :** Mise en évidence des différents éléments de la cornée humaine après coloration au Trichrome de Masson.

I.2.3.1. L'épithélium cornéen

L'épithélium constitue la partie la plus externe de la cornée qui est directement en contact avec le film lacrymal et le milieu extérieur. Il représente un peu moins de 10% de l'épaisseur totale de la cornée. Il s'agit d'un épithélium pavimenteux stratifié. Il est composé de trois assises cellulaires : basale, intermédiaire et superficielle.

I.2.3.1.1. L'assise basale

Elle correspond à une assise monostratifiée, faite de larges cellules où les mitoses y sont fréquentes. Ces cellules reposent sur une fine lame basale qui est indissociable de l'épithélium qui la sécrète.

I.2.3.1.2. L'assise intermédiaire

Elle comporte 2 ou 3 couches de cellules polyédriques, 4 ou 5 en périphérie cornéenne avec d'importantes jonctions (desmosomes) les reliant entre elles et aux cellules basales.

1.2.3.1.3. L'assise superficielle

Cette assise est constituée de 2 couches de cellules longues et fines, d'autant plus plates qu'elles deviennent plus superficielles. Elles sont caractérisées par la présence de microvillosités à leur surface augmentant ainsi la surface d'échange avec le film lacrymal. Ces cellules finissent par desquamer (ophzone.no-ip.com/Anatomie/cornea.htm).

1.2.3.2. La lame basale

Les cellules basales de l'épithélium cornéen sécrètent les composants nécessaires à la formation de la lame basale épithéliale. Dans la composition de cette lame basale interviennent essentiellement la laminine 332 (ou laminine de type 5), le collagène de type IV et des protéoglycannes à héparane sulfate ([Ebihara et al., 2000](#)). Cette laminine 332 qui est la composante majoritaire de la lame basale cornéenne est constituée de 3 sous-unités : $\alpha 3$, $\beta 3$ et $\gamma 2$. Cette protéine joue un rôle crucial dans le maintien de la transparence cornéenne. En effet, il existe une maladie héréditaire appelée « laryngo-onycho-cutaneous syndrome » qui provoque entre autre, une opacification de la cornée. Cette anomalie est causée par une déplétion anormale de 226 acides aminés au niveau de l'extrémité N-terminale de la sous-unité $\alpha 3$ de la laminine 332 ([Moore et al., 2005](#)).

Les laminines constituent donc des éléments essentiels pour l'intégrité des lames basales. Elles interviennent notamment dans l'assemblage de ces structures et interagissent avec le réseau formé par le collagène de type IV via le nidogène et d'autres composants de la MEC ([Bystrom et al., 2007](#)).

La lame basale cornéenne joue un rôle indispensable dans le maintien de la polarité des cellules épithéliales mais également dans la cicatrisation car elle sert de support de migration aux cellules épithéliales basales grâce aux interactions entre la laminine 332 et les intégrines $\alpha 3\beta 1$ [[Virtanen et al., 1992](#)], ([Ebihara et al., 2000](#)), ([Lee et al., 2006a](#))].

Les microfibrilles d'ancrage assurent l'adhérence de l'épithélium sur la couche de Bowman. A la différence de l'épithélium cutané, l'épithélium cornéen repose sur une lame basale plane non ondulée, qui autorise un pouvoir réfractif constant.

I.2.3.3. La couche de Bowman

La couche de Bowman est une structure acellulaire, correspondant à une condensation de fibres de collagène (majoritairement de type I et III) et de protéoglycannes à kératane sulfate (Akhtar et al., 2008). Son épaisseur est de 12 microns chez l'homme. Elle ne se régénère pas après traumatisme. Son rôle précis est inconnu. Elle pourrait jouer un rôle de barrière et de protection des interactions épithélio-stromales.

I.2.3.4. Le stroma cornéen

Le stroma correspond à la couche intermédiaire de la structure cornéenne et représente environ 90% de l'épaisseur de cette dernière. Il s'agit d'un tissu conjonctif composé principalement d'une matrice de collagène dans laquelle baignent des cellules de type fibroblastique qui sont les kératocytes. La composition moléculaire du stroma cornéen et l'architecture de certains éléments qui y sont contenus, notamment le collagène de type I sont à l'origine de la transparence de la cornée. En effet, la transparence cornéenne dépend fortement de l'organisation des fibres de collagènes de type I, plus précisément de leur diamètre, de leur empaquetage ainsi que de leur organisation régulière en lamelles au sein du stroma.

I.2.3.5. La membrane de Descemet

La membrane de Descemet est la lame basale de l'endothélium. Elle est composée essentiellement de collagène de type VIII. Cette structure renferme également du collagène de type IV, des laminines 411, 511 (Kabosova et al., 2007). Son épaisseur augmente avec l'âge, de 3 microns à la naissance pour atteindre 8 à 10 microns à l'âge adulte.

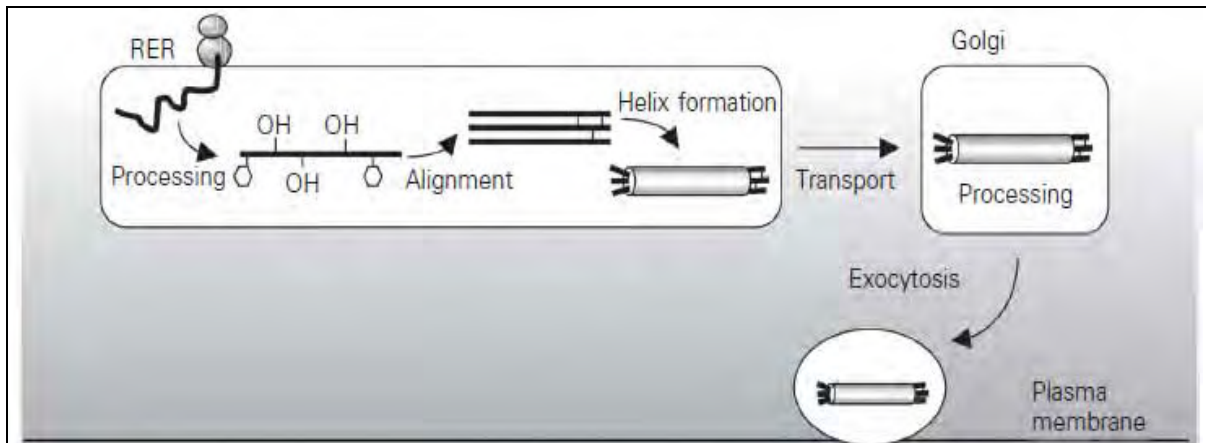
I.2.3.6. L'endothélium cornéen

L'endothélium cornéen est constitué d'une monocouche cellulaire, assurant l'homéostasie hydrique de la cornée. Le terme endothélium est « consacré » par l'usage. Il s'agit en réalité d'un épithélium unistratifié qui ne se régénère pas. La fonction essentielle de l'endothélium est de réguler l'hydratation cornéenne, pour maintenir constant les 78%

d'eau dans le stroma. Il assure d'autre part la nutrition de la cornée en puisant à hauteur de l'humeur aqueuse les nutriments nécessaires à son métabolisme.

I.3. Les collagènes : constituants fondamentaux de la MEC

Les protéines appartenant à la famille des collagènes sont les plus abondantes de l'organisme humain (25 à 30 % des protéines totales). Ce sont des molécules extracellulaires qui peuvent représenter selon les tissus jusqu'à 80 % des protéines de la MEC. Elles jouent un rôle crucial dans le maintien de l'intégrité structurale mais également dans une variété d'autres fonctions des tissus et organes chez l'homme (Ricard-Blum and Ruggiero, 2005). Tous les collagènes sont des trimères de chaînes α dont chacun est composé de produits issus de l'activité d'un, de deux, ou de trois gènes différents. Actuellement, 28 types de collagènes (**Tableau 2**) sont caractérisés et constituent une famille diverse de glycoprotéines (Gordon and Hahn, 2010). Tous les collagènes comportent au moins un domaine en triple hélice. Ces domaines ont besoin d'une proline pour la formation de l'hélice α et d'une glycine tous les trois résidus pour l'empaquetage en triple hélice. De plus, les collagènes contiennent deux acides aminés uniques, un hydroxyproline qui intervient dans la stabilité de la triple hélice et un hydroxylysine qui joue un rôle dans la glycosylation (Canty and Kadler, 2005). Le collagène est synthétisé sous forme de procollagène dans le réticulum endoplasmique rugueux (RER) où chaque chaîne des trois polypeptides a un domaine globulaire en N-terminal et en C-terminal. Les molécules de procollagène sont secrétées après un transport golgien dans la MEC où des protéinases spécifiques au niveau de la surface cellulaire vont cliver les parties globulaires se situant aux extrémités. Les molécules de collagène résultant peuvent alors être associées latéralement pour former des fibres de collagène avec des longueurs et des diamètres variables (**Figure 5**). La lysyl oxydase (LOX) transforme ensuite les groupements amines contenus dans les quelques résidus de lysine situés au niveau des chaînes polypeptidiques de collagène en groupements aldéhydes. Ces groupements aldéhydes réagissent ensuite avec des groupements amines de lysine appartenant à d'autres chaînes pour former des liaisons covalentes transversales (Hassell and Birk, 2010).



Michelacci YM, 2003

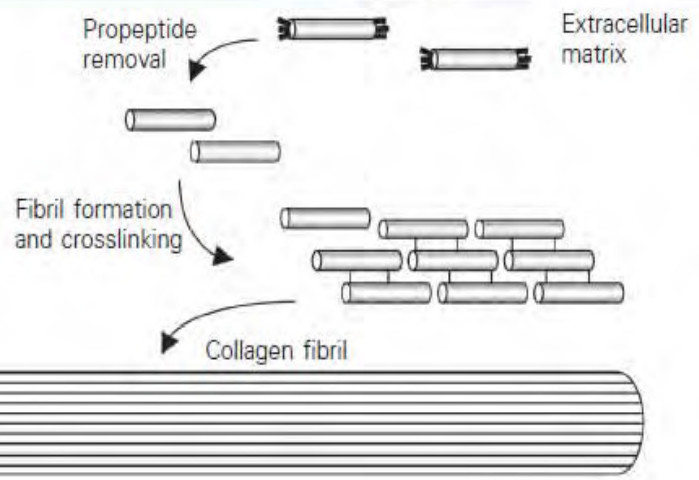


Figure 5 : Représentation schématique simplifiée de la synthèse de molécules de collagène : de la synthèse des chaînes α dans le RER jusqu'à leur assemblage en fibres de collagènes dans le milieu extracellulaire.

Type collagène	Gène	Chaîne α	Nombre d'a.a avec peptide signal incluse	Référence NCBI	Organisation supra moléculaire dans les tissus (connus)	Articles référents
I	<i>COL1A1</i>	$\alpha 1$	1464	NP_000079	Fibres dans le tendon, os, peau, cornée et parois des vaisseaux	(Chu et al., 1982), (Myers et al., 1981)
	<i>COL1A2</i>	$\alpha 2$	1366	NP_000080		
II	<i>COL2A1</i>	$\alpha 1A$	1487	NP_001835	Fibres dans le cartilage	(Miller and Matukas, 1969)
		$\alpha 1B$	= $\alpha 1A$ sans vWC	NP_149162		
III	<i>COL3A1</i>	$\alpha 1$	1466	NP_000081	Forme des fibres hétérotypiques avec le collagène de type I	(Cameron et al., 2002)
IV	<i>COL4A1</i>	$\alpha 1$	1669	NP_001836	Tisse un réseau dans la lame basale	(Timpl and Brown, 1996), (Timpl et al., 1981)
	<i>COL4A2</i>	$\alpha 2$	1712	NP_001837		
	<i>COL4A3</i>	$\alpha 3$	1670	NP_000082		
	<i>COL4A4</i>	$\alpha 4$	1690	NP_000083		
	<i>COL4A5</i>	$\alpha 5$	1685	NP_000486		
	<i>COL4A6</i>	$\alpha 6$	1691	NP_001838 (B isoform NP_378667)		
V	<i>COL5A1</i>	$\alpha 1$	1838	NP_000084	Forme des fibres hétérotypiques avec le collagène de type I	(Birk, 2001)
	<i>COL5A2</i>	$\alpha 2$	1499	NP_000384		
	<i>COL5A3</i>	$\alpha 3$	1745	NP_056534		
VI	<i>COL6A1</i>	$\alpha 1$	1028	NP_001839	Microfibrilles fins ayant une distribution ubiquitaire	(Kielty et al., 1992)
	<i>COL6A2</i>	$\alpha 2$	1019	NP_001840		
	<i>COL6A3</i>	$\alpha 3$	3177	NP_004360		
	<i>COL6A4</i>	$\mu \alpha 4$	mouse=2309 (n'existe pas chez l'homme)	Swiss-Prot A2AX52		
	<i>COL6A5</i>	$\alpha 5$	2611	NP_694996		
	<i>COL6A6</i>	$\alpha 6$	2263	NP_001096078		
VII	<i>COL7A1</i>	$\alpha 1$	2944	NP_000085	Forme des fibres d'ancrage dans la peau à la jonction derme/épiderme (lame basale)	(Keene et al., 1987)
VIII	<i>COL8A1</i>	$\alpha 1$	744	NP_065084; NP_001841	Treillis hexagonal en 3D dans la membrane de Descemet dans l'œil (cornée)	(Kapoor et al., 1986), (Kapoor et al., 1988), (Stephan et al., 2004)
	<i>COL8A2</i>	$\alpha 2$	703	NP_005193		
IX	<i>COL9A1</i>	$\alpha 1$	921	NP_001842	Associé aux fibres de	(Olsen, 1997);

	<i>COL9A2</i>	$\alpha 2$	689	NP_001843	collagène de type II	(Shimokomaki et al., 1990)
	<i>COL9A3</i>	$\alpha 3$	684	NP_001844		
X	<i>COL10A1</i>	$\alpha 1$	680	NP_000484	Structure en « tapis »/ treillis hexagonal dans la zone hypertrophique de la « plaque » de croissance	(Kwan et al., 1991)
XI	<i>COL11A1</i>	$\alpha 1A$	1806	NP_001845	Forme des fibres hétérotypiques avec le collagène de type II	(Mendler et al., 1989)
	<i>COL11A1B</i>	$\alpha 1B$	1818	NP_542196		
	<i>COL11A1C</i>	$\alpha 1C$	1767	NP_542197		
	<i>COL11A2</i>	$\alpha 2$	1736	NP_542411		
	<i>COL11A3</i>	$\alpha 3$	1487	NP_001835		
XII	<i>COL12A1</i>	$\alpha 1$	3063	NP_004361	Associé aux fibres du collagène de type I	(Keene et al., 1991); (Nishiyama et al., 1994) (Zhang et al., 2003)
XIII	<i>COL13A1</i>	$\alpha 1$	717	NP_005194	Transmembranaire et implication possible dans l'adhésion cellulaire	(Latvanlehto et al., 2003)
XIV	<i>COL14A1</i>	$\alpha 1$	1796	NP_066933	Associé aux fibres du collagène de type I	(Young et al., 2000), (Young et al., 2002)
XV	<i>COL15A1</i>	$\alpha 1$	1388	NP_001846	Spécial des lames basales, clivé pour produire un fragment anti-angiogénique (restin)	(Myers et al., 1996), (Ramchandran et al., 1999)
XVI	<i>COL16A1</i>	$\alpha 1$	1604	NP_001847	Composant des microfibrilles riches en fibrilline de la peau et des fibres de collagène de type II du cartilage	(Kassner et al., 2003)
XVII	<i>COL17A1</i>	$\alpha 1$	1497	NP_000485	Composant transmembranaire des hémidesmosomes (jonctions cellule-cellule), avec une attache de l'épiderme à la lame basale au niveau de la peau	(Hopkinson et al., 1998)
XVIII	<i>COL18A1</i>	$\alpha 1$	1516	NP_085059	Clivé pour produire un fragment anti-angiogénique (endostatin)	(Sasaki et al., 1998)
XIX	<i>COL19A1</i>	$\alpha 1$	1142	NP_001849	Agrégats distribués radialement formés par l'association à une extrémité in vitro	(Myers et al., 2003)
XX	<i>COL20A1</i>	$\alpha 1$	Ch=1472 ss	NP_001004392	Peut être associé avec les fibres de	(Koch et al., 2001)

			SP		collagène de type I	
XXI	<i>COL21A1</i>	$\alpha 1$	957	NP_110447	Peut être associé à des fibres, modèle d'expression très répandu	(Fitzgerald and Bateman, 2001)
XXII	<i>COL22A1</i>	$\alpha 1$	1626	NP_690848	Localisé dans les jonctions spécifiques des tissus et peut être associé avec des microfibrilles	(Koch et al., 2004)
XXIII	<i>COL23A1</i>	$\alpha 1$	540	NP_775736	Collagène transmembranaire identifié en culture cellulaire	(Banyard et al., 2003)
XXIV	<i>COL24A1</i>	$\alpha 1$	1714	NP_690850	Exprimé dans les tissus contenant du collagène de type I	(Koch et al., 2003)
XXV	<i>COL25A1</i>	$\alpha 1$	654	NP_942014	Collagène transmembranaire, forme clivée est présente dans les plaques amyloïdes des neurones d'Alzheimer	(Hashimoto et al., 2002)
XXVI	<i>COL26A1</i>	$\alpha 1$	439	NP_597714	Exprimé dans le testicule et l'ovaire d'organismes adultes	(Sato et al., 2002)
XXVII	<i>COL27A1</i>	$\alpha 1$	1860	NP_116277	Expression très rependue particulièrement dans le cartilage	(Boot-Handford et al., 2003), (Pace et al., 2003)
XXVIII	<i>COL28A1</i>	$\alpha 1$	1125	NP_001032852	Constituant caractéristique des nœuds de Ranvier du système nerveux périphérique; entoure les cellules gliales non myélinisées	(Grimal et al., 2010)

Tableau 2: Les protéines de la famille des collagènes [(Canty and Kadler, 2005), (Gordon and Hahn, 2010)]. Cette famille comporte 28 membres qui sont classés ici selon leur localisation tissulaire.

La famille des collagènes peut également être divisée en sous-familles (8 actuellement) selon la structure, la fonction ou encore l'assemblage supramoléculaire des différentes molécules de collagène (**Figure 6**).

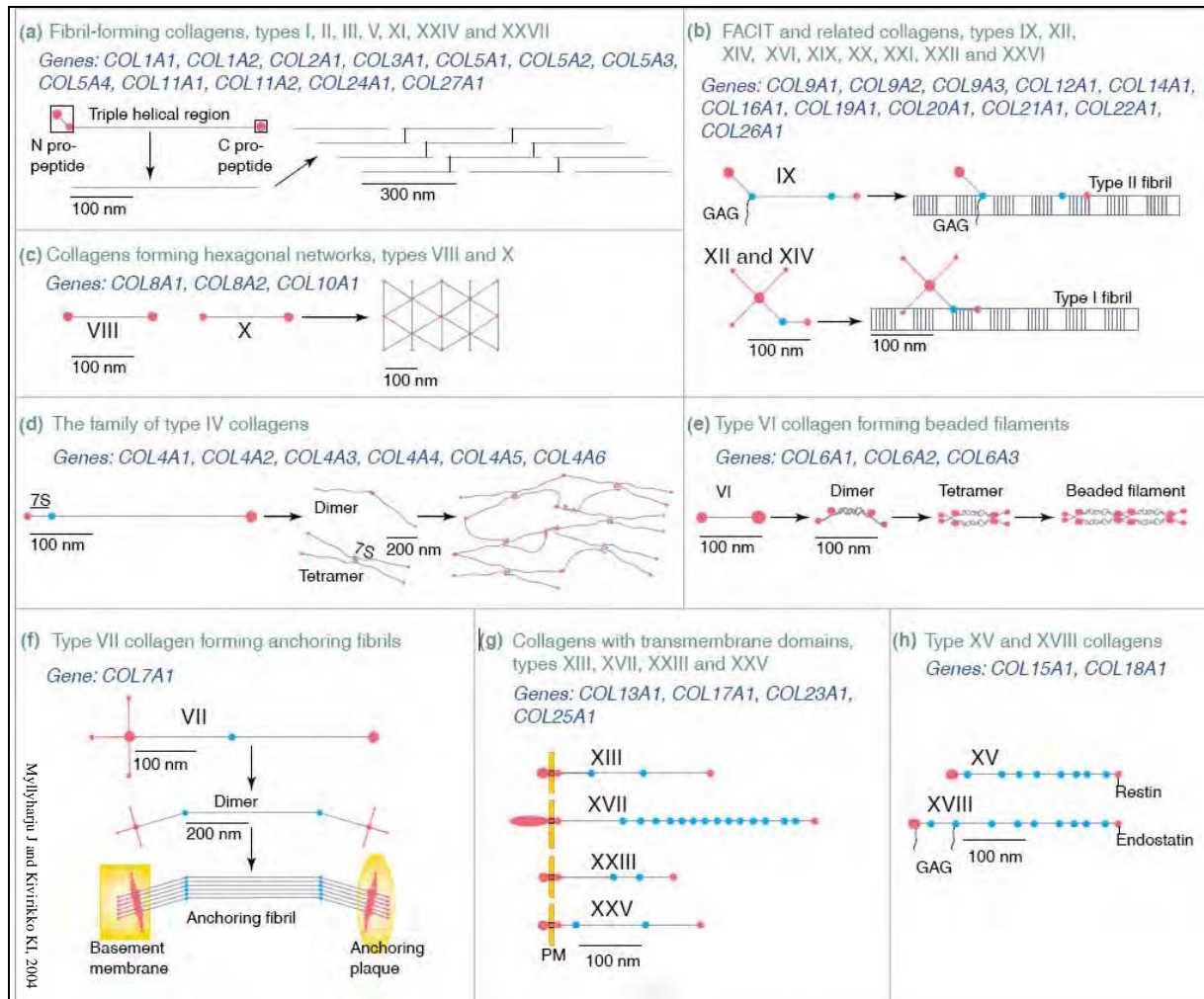


Figure 6 : Les membres de la famille des collagènes et leurs assemblages supramoléculaires. 8 sous-familles sont représentées. a) les collagènes fibrillaires ; b) les fibril-associated collagens with interrupted triple helices (FACIT) ; c) collagènes à réseaux hexagonaux ; d) collagènes des membranes basales ; e) collagènes à filaments perlés ; f) collagène de fibrilles d'ancrage ; g) collagènes transmembranaires ; h) collagènes Multiplexines (Multiple triple helix domains and interruptions). **Abréviation : PM= plasma membrane.**

Le collagène de type XXVIII, nouvellement découvert, pourrait appartenir à la sous-famille de collagènes à filaments perlés [groupe e)] du fait de sa structure (Veit et al., 2006b).

I.3.1. Les collagènes fibrillaires du stroma cornéen

Le collagène du stroma cornéen est composé de plusieurs variétés dont la plus abondante est celle des collagènes fibrillaires. Parmi eux, le collagène de type I et celui de type V (**Figure 7**). Il s'agit de deux hétérotrimères dont le domaine principal en triple hélice a une longueur d'à peu près 1000 résidus d'acides aminés avec une structure parfaite en triplet gly-X-Y ; X étant une proline et Y étant fréquemment une hydroxyproline ([Gordon and Hahn, 2010](#)).

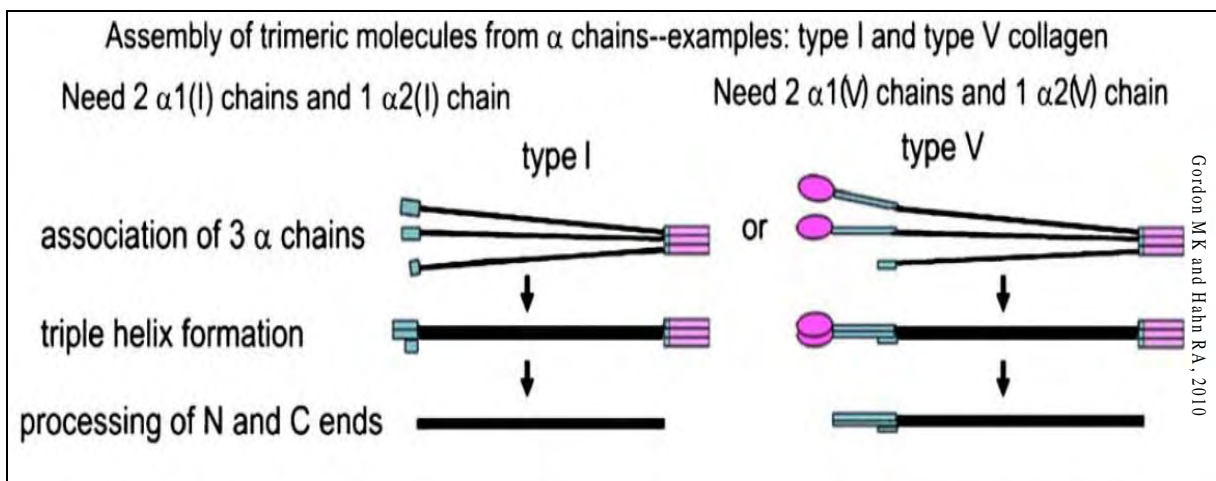


Figure 7 : Exemple d'assemblage de chaînes α en molécules trimériques : cas des collagènes I et V.

I.3.1.1. Le collagène de type I

Les chaînes α sont synthétisées sous la forme de longs précurseurs, appelés prochaînes α dont l'association permet la formation du procollagène. Le procollagène I est en général un hétérotrimère qui contient deux chaînes pro $\alpha 1$ (I) codées par le gène COL1A1 et une chaîne pro $\alpha 2$ (I) codée par le gène COL1A2 (**Tableau 2**). Les chaînes pro α contiennent différents domaines structuraux :

- Une séquence signal de 20 acides aminés clivée durant le transit dans le RER,
- Le propeptide N-terminal,

- c) Un domaine court qui n'est pas sous forme d'une triple hélice, contenant le site protéolytique de clivage du peptide N-terminal,
- d) Le domaine en triple hélice majeur contient 1014 résidus d'acides aminés, caractérisé par les répétitions Gly-X-Y,
- e) Un télopeptide de 28 résidus
- f) Les 220 résidus finaux qui forment une structure globulaire contenant des ponts disulfures (propeptide du C-terminal) (**Figure 8**).

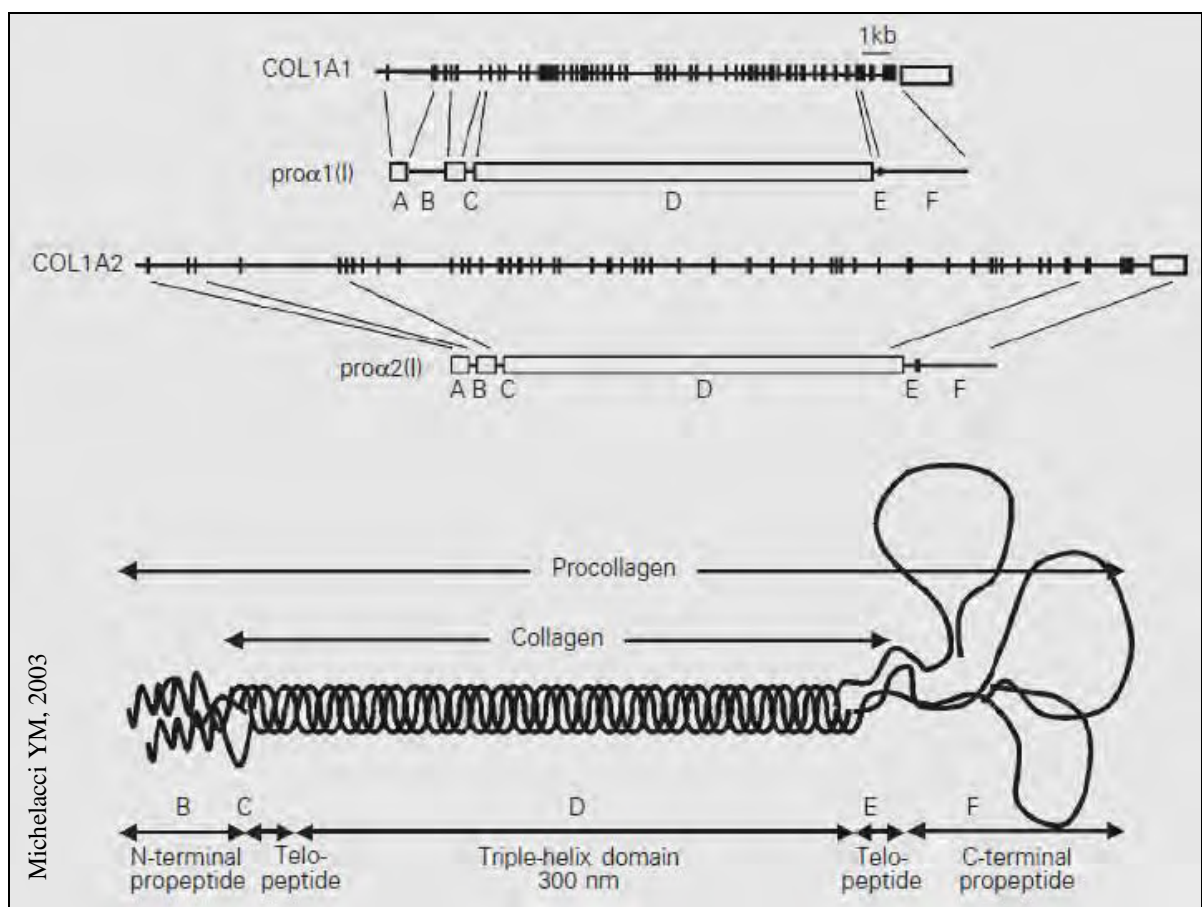


Figure 8 : Schémas représentant les gènes codant pour les chaînes α du procollagène I (haut) et les domaines structuraux de la molécule de procollagène (bas). A, une séquence signal qui est clivée pendant le transit dans le RER ; B, propeptide N-terminal ; C, domaine court qui n'est pas sous forme de triple hélice et qui contient le site de clivage protéolytique des peptides N-terminaux ; D, domaine le plus important en triple hélice caractérisé par les répétitions Gly-X-Y ; E, le télopeptide ; F, propéptides N-terminaux qui contiennent des ponts disulfures.

1.3.1.1.1. La biosynthèse du collagène de type I

Le collagène de type I est synthétisé et sécrété par les cellules mésenchymateuses. Cette biosynthèse se distingue par le nombre élevé d'étapes de maturation de la protéine en vue de son assemblage dans la MEC. Ces modifications post-traductionnelles peuvent être divisées en deux groupes : les étapes intracellulaires aboutissant à la formation du procollagène et les étapes extracellulaires permettant l'assemblage des fibres de collagène (**Figure 9**).

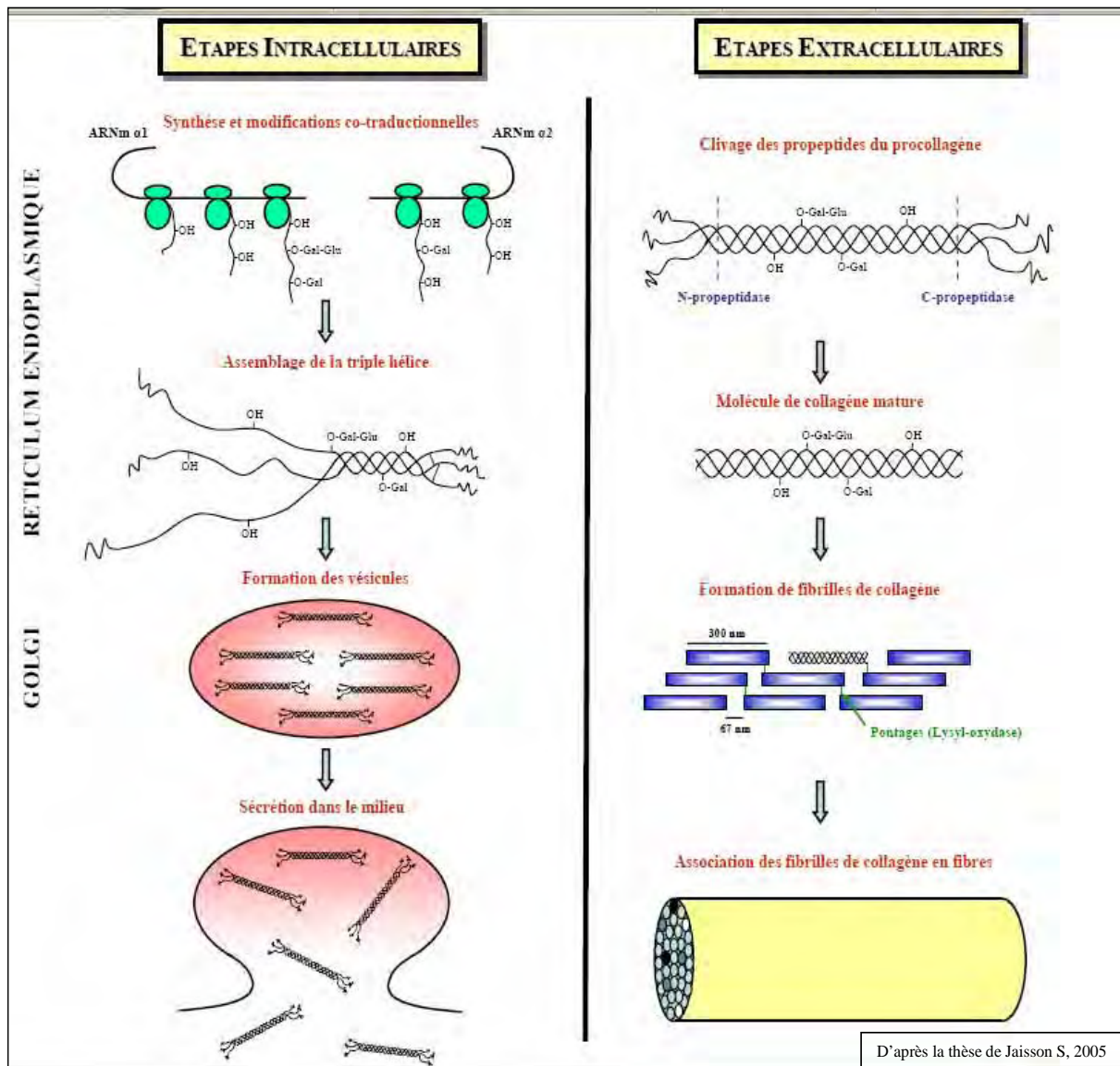


Figure 9 : Biosynthèse du collagène de type I. Les pro-chaînes α de la molécule de procollagène sont synthétisées dans le réticulum endoplasmique. Après hydroxylation de certains résidus de proline et de lysine, l'enroulement des 3 chaînes α débute par leur extrémité C-terminale. Les molécules de procollagène formées migrent vers l'appareil de Golgi pour être sécrétées dans le milieu extracellulaire. Le collagène mature est généré par clivage des propeptides N- et C-terminaux par des endopéptidases spécifiques, puis les molécules de collagène s'organisent pour former des fibrilles de collagène. **Abréviations : Glu : glucose ; Gal : galactose.**

Un grand nombre d'enzymes est impliqué dans les modifications post-traductionnelles des chaînes α . Certaines de ces modifications comme l'hydroxylation de la proline pour former la 3- ou 4-hydroxyproline, celle de la lysine en hydroxylysine et la glycosylation de l'hydroxylysine, augmentent durant l'élongation du peptide dans le RER,

et sont suivies par la formation de la triple hélice dans ce même organite avant le passage dans l'appareil de golgi [(Figure 5), (Michelacci, 2003)]. Les molécules de procollagène de type I obtenues vont être ensuite secrétées dans le milieu extracellulaire où d'autres enzymes vont assurer leur maturation. Il existe parmi les différentes modifications extracellulaires, des étapes de clivage des propeptides en position N- et C-terminale par des N-propeptidases et des C-propeptidases respectivement.

La molécule de collagène de type I mature obtenue possède une structure exclusivement en triple hélice flanquée à ses extrémités de deux régions non hélicoïdales d'environ vingt acides aminés appelés télépeptides (Gelse et al., 2003). Elle forme une structure cylindrique (de 300 nm de long pour un diamètre de 1,4 nm) qui résulte en majorité de l'association de deux chaînes $\alpha 1$ (I) et d'une chaîne $\alpha 2$ (I) sachant qu'elle peut également exister sous forme d'un homotrimère ($\alpha 1$)₃ (Uitto, 1979).

1.3.1.1.2. La distribution tissulaire du collagène de type I

Le collagène de type I, le plus abondant des collagènes, est représenté au sein de la quasi-totalité des tissus de l'organisme, associé à d'autres types de collagène. Par exemple, dans certains tissus comme l'os et le tendon, parmi tous les types de collagène, seul le type I semble être présent en très forte proportion [plus de 99 % de la totalité des collagènes, (Bateman et al., 1986), (Tsuzaki et al., 1993)]. Dans d'autres tissus, comme les vaisseaux, la peau ou la cornée, il est plus faiblement représenté mais reste néanmoins le collagène majeur où il représente respectivement 60%, 85% et 75% de la composante collagénique [(Borel and Bellon, 1985), (Smith et al., 1986), (Michelacci, 2003)]. D'une manière générale, le collagène de type I est présent dans tous les tissus conjonctifs interstitiels, en dehors de quelques exceptions telles que le cartilage hyalin, le cerveau et le corps vitré (Gelse et al., 2003).

I.3.1.2. Le collagène de type V

Le collagène de type V est un collagène fibrillaire mineur quantitativement, qui est présent dans les tissus où le collagène de type I est exprimé. Plusieurs travaux antérieurs avaient montré que le collagène de type I peut s'associer au collagène de type V et former des fibres avec un diamètre très réduit où les épitopes en triple hélice du collagène de type V sont exposés de manière adjacente aux cellules ou aux lames basales [(Modesti et al., 1984), (Gordon et al., 1994)]. Cependant, les études menées par Birk DE en 2001 sur la structure du collagène de type V (molécule largement étudiée au niveau du stroma cornéen) ont montré que ce collagène est localisé au niveau des fibres striées où les épitopes NH₂ sont exposés et les épitopes en triple hélice sont masqués par la structure fibrillaire avec laquelle ils interagissent [(Figure 10), (Birk, 2001)]. Il existe plusieurs isoformes du collagène V qui diffèrent par leur composition en chaînes α (Fichard et al., 1995). L'isoforme la plus répandue est l' $\alpha 1(V)_2 \alpha 2(V)$ qui est également retrouvée au niveau de la cornée [(Birk et al., 1988), (Gordon et al., 1994)]. Le stroma cornéen ne contient qu'une seule population de fibres hétérotypiques collagène I/collagène V (Birk et al., 1988).

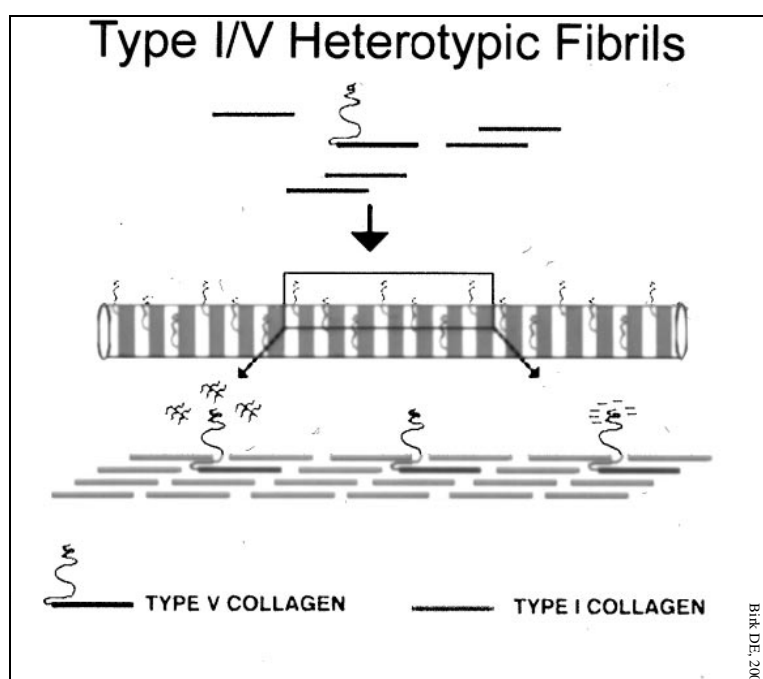


Figure 10: Modèle de fibre hétérotypique type I/V. Ces deux collagènes fibrillaires s'associent pour former une fibre striée. Ce co-assemblage nécessite la projection du domaine NH₂-terminal du collagène de type V à travers la « gap region » et son exposition à la surface de la fibre. La portion en triple hélice du collagène de type V est empaquetée avec les molécules de type I de manière à ce qu'elle soit internalisée.

La cornée est relativement riche en collagène de type V (15 à 20% des collagènes fibrillaires cornéens) par rapport à d'autres tissus et ce dernier joue un rôle central dans l'initiation de l'assemblage fibrillaire (Hassell and Birk, 2010), plus précisément dans la régulation du diamètre des fibres de collagène. En effet, des études *in vitro* d'interactions fibrillaires entre le collagène de type I et le collagène de type V qui miment les caractéristiques d'interactions *in vivo*, ont montré que ces interactions sont en grande partie responsables du contrôle du diamètre des fibres de collagène de type I [(Adachi and Hayashi, 1986), (Birk et al., 1990)] et que le domaine NH₂ du collagène de type V est responsable de l'effet « régulateur » de ce collagène sur le diamètre fibrillaire (Birk, 2001). Comme la réduction du nombre de molécules de collagène de type V est inversement proportionnelle au diamètre fibrillaire, Birk DE a également démontré en 2001 l'implication du collagène de type V dans la régulation du diamètre des fibres du collagène de type I, en surexprimant une chaîne $\alpha 1$ (V) modifiée et rapidement dégradable dans des fibroblastes cornéens. Ces cellules ont effectivement un assemblage de fibres de collagène de diamètre supérieur (37.2 nm) à celui des fibres synthétisées par les fibroblastes transfectés avec le virus contrôle [(24nm) (**Figure 11**)].

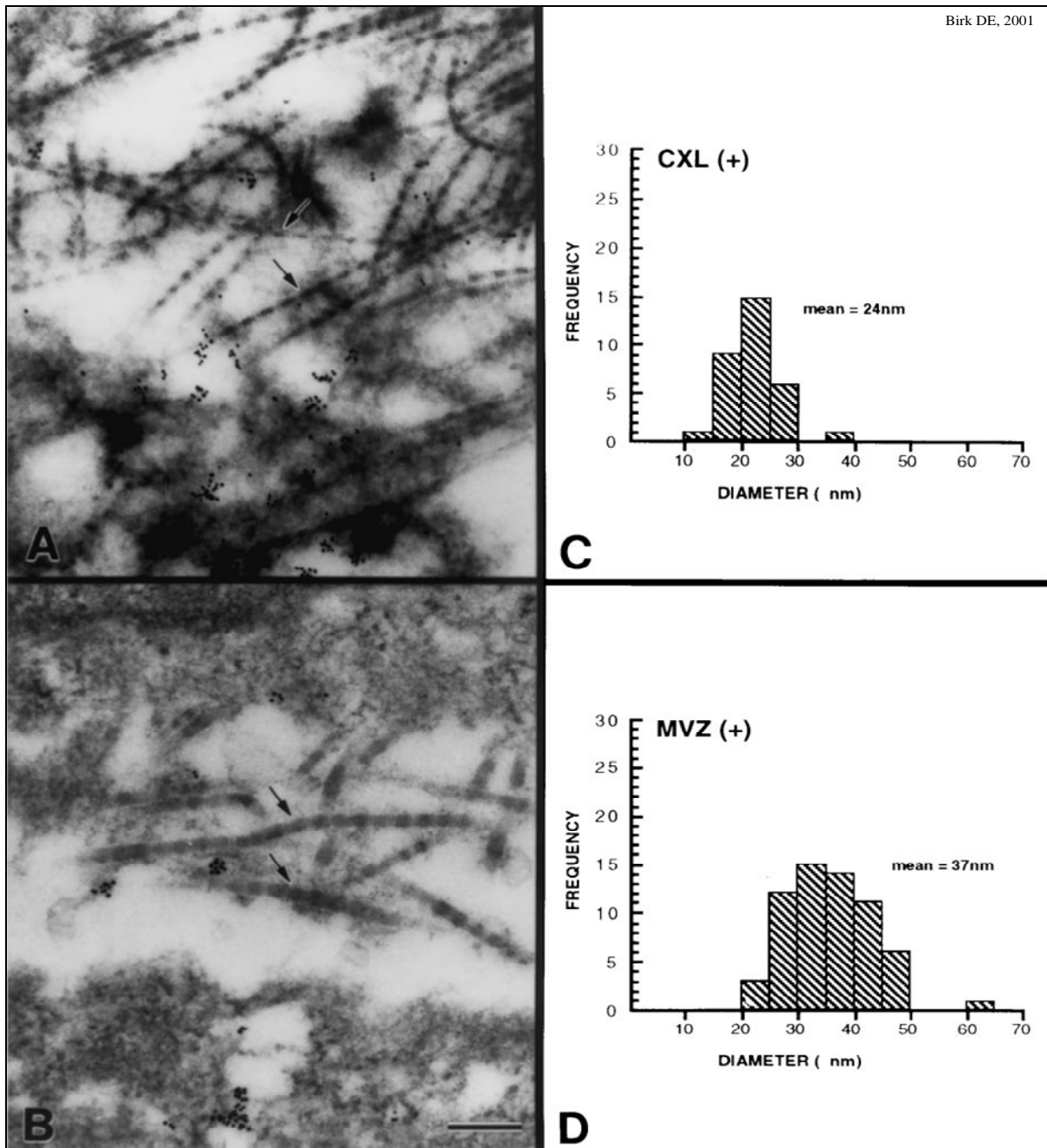


Figure 11: Les cellules surexprimant une chaîne $\alpha 1$ (V) modifiée et rapidement dégradable assemblent anormalement des fibres avec un large diamètre. Les cellules infectées par le virus contrôle (CXL ; A et C) produisent des fibres normales avec un respect du diamètre et de l'espacement de distribution (flèches). Les cellules synthétisant une chaîne $\alpha 1$ (V) défectueuse (B et D) produisent des fibres au diamètre large avec un espacement de distribution compris entre 20 et 65 nm et une moyenne de 37 nm (flèches). Bar = 150nm (Birk, 2001).

Le domaine NH₂ du collagène de type V intervient également dans la régulation de la croissance des fibres de collagène lors de leur formation (Birk, 2001). Ce rôle crucial du collagène de type V dans la régulation de la croissance des fibres de collagène a été confirmé par l'inactivation de ce gène chez la souris [(Figure 21), (Hassell and Birk, 2010)].

I.3.1.3. Le collagène de type III

Le collagène de type III est un homotrimère composé de 3 chaînes α issues du même gène. Ce collagène est largement distribué dans les tissus contenant du collagène de type I à l'exception de l'os (Gelse et al., 2003). Il forme des fibres hétérotypiques en s'associant avec le collagène de type I (Cameron et al., 2002). Il s'agit d'un composant important des fibres réticulaires du tissu interstitiel du poumon, du foie, du derme, de la rate et des vaisseaux. Le collagène de type III peut être également abondant dans les tissus élastiques (Gelse et al., 2003). Cette molécule fait partie des collagènes fibrillaires du stroma cornéen. Elle est très faiblement exprimée à l'état physiologique. Son expression augmente cependant fortement lors de nombreux processus pathologiques cornéens comme la cicatrisation ou l'inflammation (Michelacci, 2003). Le collagène de type III est considéré à l'heure actuelle comme un des principaux marqueurs du remodelage matriciel stromal observé après une agression de la cornée. De surcroît, des études réalisées chez le lapin dans un modèle d'inflammation et de néovascularisation cornéennes ont montré une forte augmentation de ce collagène après la blessure. De manière intéressante, cet accroissement ne s'avère être localisé qu'au niveau de la zone exposée à la brûlure caustique (Saika et al., 1996). Cette molécule pourrait être également impliquée dans le phénomène d'opacification de la cornée observé après une lésion. En effet, Il est possible que la modification de la quantité du collagène de type III et donc la perturbation de la proportion collagène de type I/collagène de type III soit à l'origine de la formation d'un « haze » au niveau de la cornée (Chen et al., 2005).

La cornée renferme également une grande quantité de collagène de type VI qui forme des structures microfibrillaires, d'autres collagènes non fibrillaires (XIII and XVIII) et des collagènes FACIT (collagènes de type XII et de type XIV).

I.3.2. Les collagènes non fibrillaires du stroma cornéen : Les FACIT

Plusieurs types de collagène non-fibrillaires se trouvent souvent associés à la surface des fibres de collagène. Parmi eux, un groupe nommé FACIT (Fibril Associated Collagens with Interrupted Triple helices).

Les collagènes **FACIT** se caractérisent par l'alternance dans leur structure de domaines fibrillaires typiques des collagènes et de répétition de motifs peptidiques de protéines matricielles [(notamment des répétitions du domaine de type III de la fibronectine), (Akimoto et al., 2002)]. Ces collagènes sont incapables de former à eux seuls des fibres de collagène mais peuvent cependant interagir et s'associer latéralement avec les fibres de collagène via leurs domaines en triple hélice [(van der Rest et al., 1990), (Shaw and Olsen, 1991), (Walchli et al., 1994), (Gerecke et al., 2003)]. De plus, les collagènes FACIT sont localisés au niveau de la surface des collagènes fibrillaires. Ils pourraient induire des changements dans les propriétés interactives ainsi que dans l'organisation de ces fibres grâce aux interactions qu'ils établissent entre leurs domaines collagéniques et les fibres de collagène interstitiels [(Nishiyama et al., 1994), (Young et al., 2000), (Young et al., 2002), (Tzortzaki et al., 2003)].

Il existe plusieurs collagènes FACIT [collagènes IX, XII, XIV, XVI, XIX, XX, XXI, XXII, XXVI, (Ansorge et al., 2009)]. Durant cette étude, nous nous sommes intéressés particulièrement à deux d'entre eux: le **collagène** de type **XII** et le **collagène** de type **XIV** (**Figure 12**).

Les collagènes de type XII et de type XIV sont tous deux des homotrimères de chaînes $\alpha 1$ identiques dont chacune est codée par un gène unique (Canty and Kadler, 2005). Ces protéines comportent toutes les deux des domaines collagéniques (**Col 1** et **Col 2**) et des domaines non-collagéniques (**NC1**, **NC2**, **NC3**). Les domaines Col 1 et Col 2 sont localisés vers l'extrémité carboxy-terminale et sont capables de former une triple hélice de collagène (trimère de collagène) typique des collagènes fibrillaires. Les domaines NC1 et NC2 n'ont pas de structure protéique particulière tandis que le domaine NC3, situé dans la partie amino-terminale de la molécule est organisé en domaines peptidiques. En effet, on y retrouve des motifs peptidiques de type facteur A de von Willebrand (vWA), de type III de la fibronectine (FN-III) ou encore de type thrombospondine [(Tsp), (**Figure 12**), (Yamagata

et al., 1991), (Kania et al., 1999), (Akimoto et al., 2002)]. Cette extrémité amino-terminal est très large et révèle être une structure modulaire complexe avec un fort potentiel pour des interactions fonctionnelles [(Yamagata et al., 1991), (Walchli et al., 1993), (Gerecke et al., 1993), (Walchli et al., 1994)].

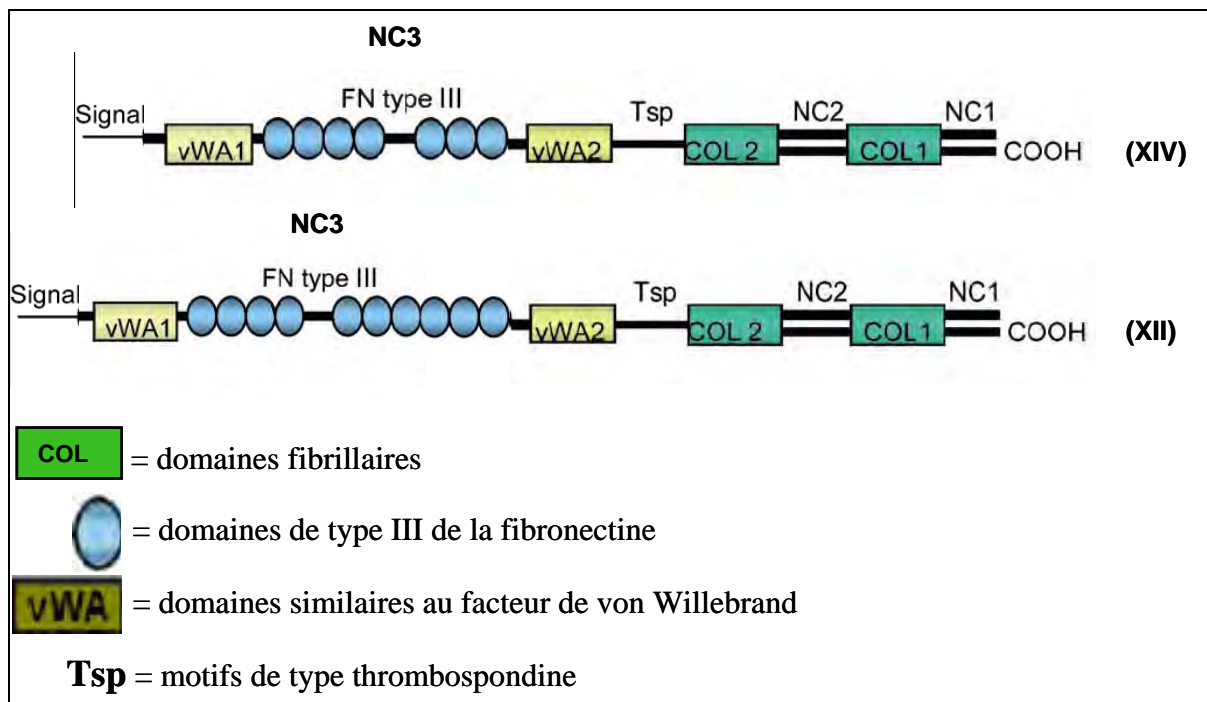


Figure 12 : Schéma des collagènes de type XIV et de type XII chez la souris. Les domaines COL peuvent former des triples hélices. Les domaines NC1 et NC2 n'ont pas de structure particulière. La partie NC3 en revanche, comporte différents motifs péptidiques : motifs de type facteur A de von wilbrand (vWA), de type III de la fibronectine et de type thrombospondine [Reproduit d'après (Gerecke et al., 2003)].

Tandis que les domaines en triple hélice établissent des liaisons avec la fibre de collagène, la partie NC3 est projetée au-delà de la surface de la fibre (**Figure 13**) et peut ainsi interagir avec des fibres de collagène adjacentes (**Figure 14**), d'autres éléments matriciels ou encore avec la surface des cellules environnantes [(Koch et al., 1992), (Gordon et al., 1996), (Meirowitz et al., 2002), (Young et al., 2002)].

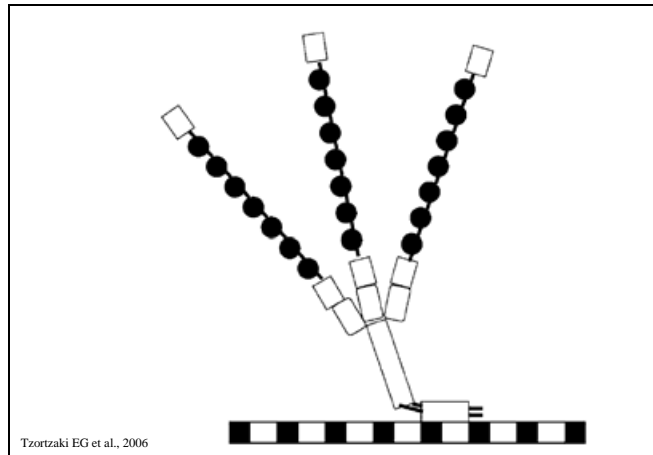


Figure 13: Les Homotrimères des FACIT sont capables de se lier aux fibres de collagène de type I (représentées par la structure qui alterne les motifs en noir et blanc). Les domaines en triple hélice se lient avec la fibre de collagène tandis que la partie NC3 est projetée au-delà de la surface de la fibre et peut ainsi interagir avec une autre fibre, d'autres éléments matriciels ou la surface des cellules.

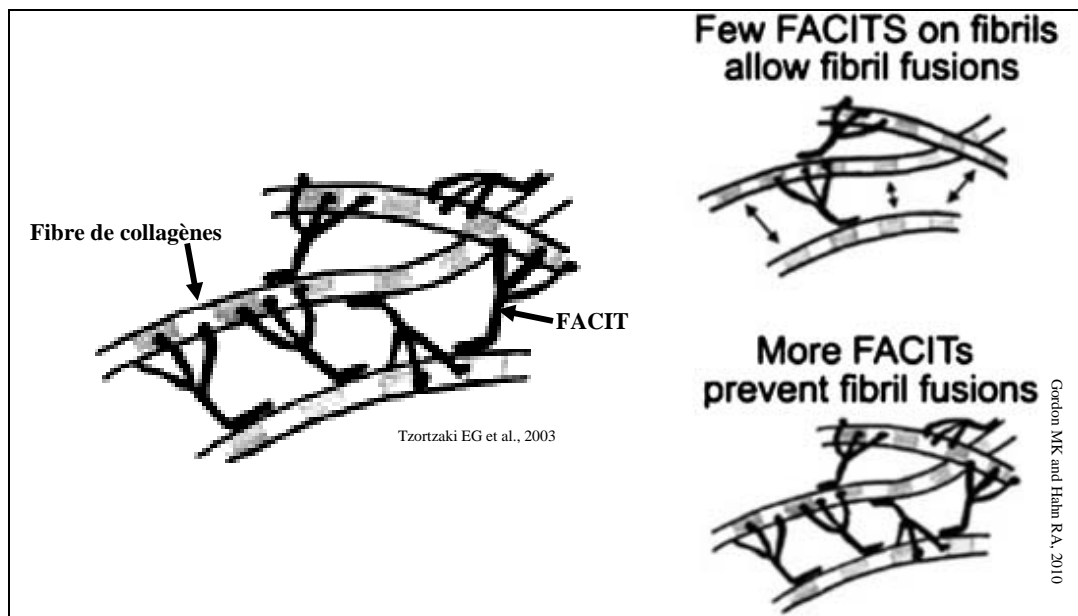


Figure 14: Exemple d'interactions entre les FACIT et les fibres des collagènes fibrillaires.

La différence structurale principale entre le collagène XII et le collagène XIV est le nombre de domaines de type FN-III présent dans la partie NC3 (**Figure 12**).

Ces collagènes ont tout d'abord été découverts et étudiés chez le poulet. Les études initiales ont porté sur leur rôle dans le développement embryonnaire, plus particulièrement des cartilages et de la cornée. Ils ont par la suite été décrits chez d'autres espèces notamment l'homme et la souris. Actuellement, il a été montré que ces collagènes pourraient participer au contrôle de l'organisation, au degré de compaction et aux propriétés biomécaniques des fibres de collagène de type I et de type III en s'intercalant dans la trame de ces collagènes fibrillaires [(Figure 14), (Gordon et al., 1996)].

I.3.2.1. Le collagène de type XII

Le collagène de type XII a été découvert indépendamment en tant qu'un fragment pepsine-résistant, associé au collagène de type I dans les ligaments parodontaux bovins (Yamauchi et al., 1986) et en tant que cDNA « distinct » lors d'une expérience de « screening » de cDNA issus d'ARNm de fibroblastes de tendon d'embryon de poulet codant pour des séquences collagéniques (Gordon et al., 1987). La protéine finale, homotrimère de chaînes $\alpha 1$ a été identifiée par Michel van der Rest et son équipe en 1989 chez le poulet (Dublet et al., 1989). La structure complète a été établie chez le poulet par Yamagata M (Yamagata et al., 1991) et chez la souris par Bohme K (Bohme et al., 1995) confirmant tous les deux que les chaînes polypeptidiques $\alpha 1$ (XII) sont subdivisées en deux domaines collagéniques qui sont en triple hélice (COL1 et COL2) et trois domaines non collagéniques (NC1, NC2 et NC3) [(Figure 12), (Gerecke et al., 1997)]. Ce collagène a ensuite été retrouvé dans divers tissus de l'organisme tels que la cornée, l'os, le tendon, le derme ou encore le muscle lisse lors du développement embryonnaire de certaines espèces comme la souris (Oh et al., 1993) et le poulet (Walchli et al., 1994). La localisation de l'expression du collagène de type XII semble avoir cependant une variation inter-espèces. Par exemple, ce collagène est présent dans le cartilage hyalin des bovins (Watt et al., 1992) alors qu'il semble absent dans celui du poulet (Sugrue et al., 1989) ou encore celui de la souris (Oh et al., 1993).

Malgré ces variations qui peuvent exister entre espèces, l'expression spatio-temporelle du collagène de type XII semble être clairement définie au niveau de la cornée lors du développement embryonnaire. Chez le poulet (modèle animal le plus utilisé dans l'étude de l'expression des FACIT), l'expression du collagène de type XII est détectable dès 5 jours du développement embryonnaire et semble être présent partout au niveau du stroma

primaire. Cependant, à 7 jours de développement, après que le stroma primaire ait commencé à grossir, l'immunoréactivité montre une expression du collagène de type XII largement localisée dans les régions sous-épithéliales et sous-endothéliales de la cornée. Le marquage en sous-endothélial du collagène de type XII est présent avant la mise en place de la membrane de Descemet jusqu'à peu près 9 jours de développement. Il est probablement ensuite confiné dans l'interface entre la membrane de Descemet et le stroma. Sous l'épithélium cornéen, la matrice subit des changements considérables de son expression en collagène de type XII durant le développement. En effet, l'expression du collagène de type XII détectée initialement (jour 5) décroît progressivement jusqu'à devenir quasi-indélectable à 10 jours (Gordon et al., 1996). Cette disparition se produit en même temps que l'invasion du stroma par les fibroblastes et l'amincissement concomitant des zones acellulaires (Gordon et al., 1996). Cependant, à 12 jours, l'immunoréactivité anti-collagène de type XII revient à cet endroit. Ce « retour d'expression » est corrélé avec la maturation de la couche de Bowman [(Fitch et al., 1994), (Gordon et al., 1996)]. Du 14^{ème} jour jusqu'à l'éclosion, la localisation du collagène de type XII reste à ces endroits et le stroma continue à être en majorité négatif pour cette protéine. A l'éclosion, une synthèse flagrante de collagène de type XII est observée au niveau du stroma cornéen et dans la cornée adulte cette expression est détectée partout à travers le stroma (Young et al., 2002).

Actuellement quatre isoformes du collagène de type XII générées par épissage alternatif ont été décrites [(Figure 15), (Kania et al., 1999)] deux dans le domaine NC1 et deux à l'extrémité NC3 de la molécule.

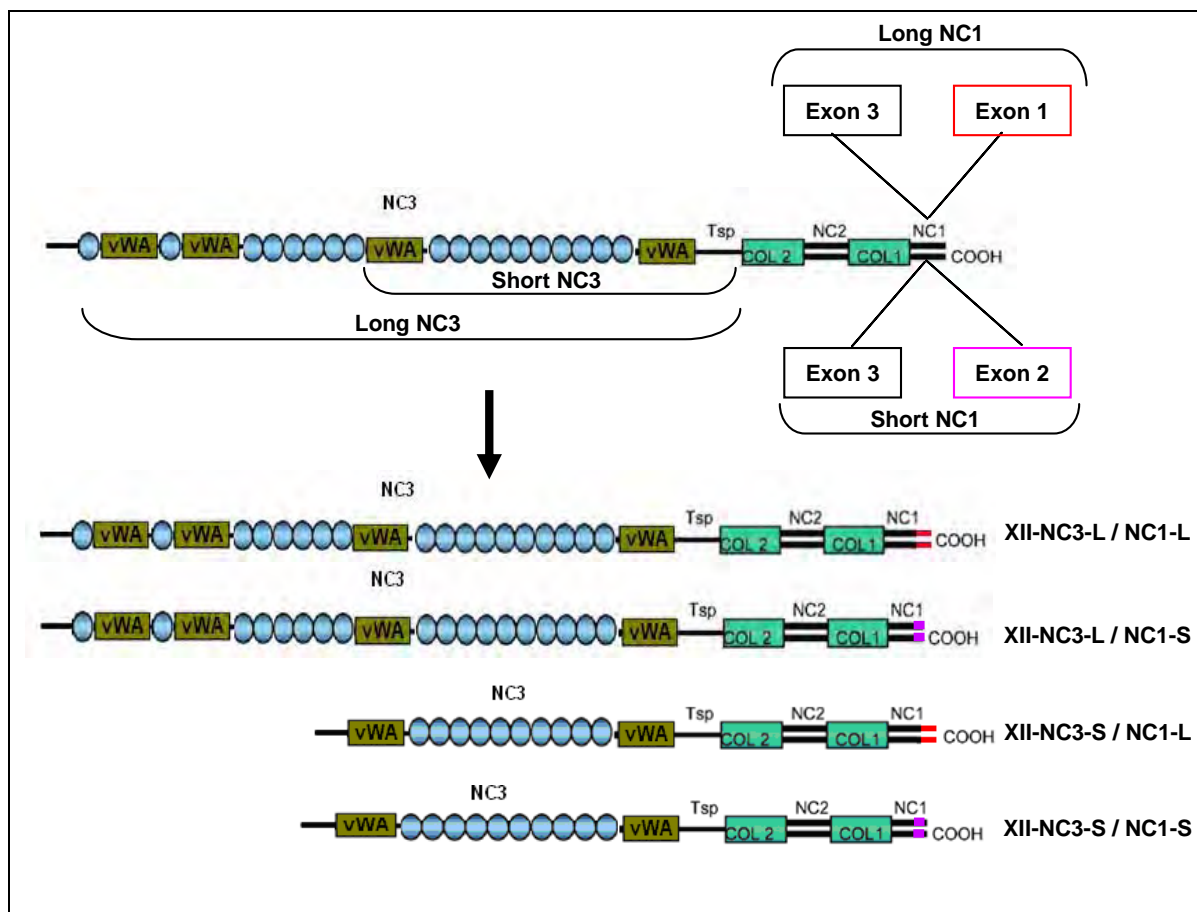


Figure 15: Variants d'épissage du collagène de type XII. Quatre variants d'épissage sont connus à l'heure actuelle : deux issus de l'extrémité NC1 et deux de l'extrémité NC3. Les variants du NC1 diffèrent par un exon (exon 1 pour le variant NC1 long et exon 2 pour le variant NC1 court) tandis que les variants du domaine NC3 se distinguent par le nombre de motifs de type III de la fibronectine et de vWA qui sont présents : le variant NC3 long contient 8 motifs FN-III et 2 motifs vWA de plus que le variant NC3 court. Reproduit d'après (Gerecke et al., 2003).

Les isoformes du collagène de type XII ont une distribution différente du point de vue histologique et développemental : les isoformes contenant la forme longue du NC3 [(XII-NC3-L/NC1-L et XII-NC3-L/NC1-S), (Figure 15)] sont exprimées en majorité durant les stades précoces du développement embryonnaire alors que celles avec la forme courte du NC3 sont prédominantes dans les tissus adultes (Bohme et al., 1995). De plus, l'isoforme XII-NC3-S/NC1-L est présente de manière prédominante dans les ligaments et les tendons alors que la XII-NC3-S/NC1S montre une expression plus généralisée (Kania et al., 1999). Par ailleurs, ces isoformes ont également des propriétés biochimiques différentes du fait de leur différence de structure. Effectivement, les formes longues (XII-NC3-L/NC1-L et XII-NC3-L/NC1-S) de la protéine contiennent un site de fixation à l'héparine supplémentaire au

niveau du 7^{ème} motif de type III de la fibronectine, en plus des chaînes de GAG qui y sont liées de manière covalente [(Koch et al., 1992), (Koch et al., 1995)]. L'épissage alternatif dans le domaine NC1 conduit également à un site supplémentaire de fixation à l'héparine pour les isoformes XII-NC3-L/NC1-L et XII-NC3-C/NC1-L. Le collagène de type XII peut également interagir avec des composants matriciels comme la décorine (Font et al., 1998) ou la ténascine X (Veit et al., 2006a).

Ainsi les isoformes du collagènes de type XII ont des différences structurales accompagnées de différences d'expression spatio-temporelle qui pourraient engendrer par conséquent des fonctions différentes de ces isoformes selon le lieu et le moment où elles sont exprimées.

I.3.2.2. Le collagène de type XIV

Le collagène de type XIV a été découvert chez l'homme au niveau de la peau et du placenta, et a été nommé d'abord undulin (Schuppan et al., 1990). Il a ensuite été identifié comme une protéine collagénique homotrimérique chez l'homme (Keene et al., 1991) et chez les bovins [(Lunstrum et al., 1991), (Dublet and van der Rest, 1991)]. Les séquences d'ADNc complètes pour l'homme (Bauer et al., 1997) et le poulet [(Gerecke et al., 1993), (Walchli et al., 1993)] ont permis de déduire la structure putative.

Le collagène de type XIV affiche une large distribution au niveau de l'organisme mais souvent avec un profil complémentaire ou réciproque à celui du collagène de type XII. Par exemple, au niveau de la peau des bovins en développement, le collagène de type XIV a été retrouvé en profondeur dans le tissu conjonctif, ou dans le derme réticulaire [(Lunstrum et al., 1991), (Lethias et al., 1993)] alors que le collagène de type XII est localisé dans le tissu conjonctif lâche du derme papillaire (Lunstrum et al., 1991). En revanche, ces collagènes sont tous deux retrouvés autour des follicules pileux. Un autre exemple d'expression croisée de ces molécules chez le poulet : le collagène de type XII est exprimé par une grande variété de tissus à 6 jours de développement mais disparaît progressivement dans la plus part des tissus excepté dans le tendon, le ligament et le gésier alors que le collagène de type XIV est quant à lui à peine détectable à 6 jours de développement. L'expression de ce dernier augmente ensuite durant le développement jusqu'à devenir à 17 jours, l'expression des protéines FACIT la mieux détectée chez l'embryon de poulet (Walchli et al., 1994).

Tout comme le collagène de type XII, celui du type XIV affiche également une expression variable au cours du développement embryonnaire de la cornée. En effet, au 5^{ème} jour de développement, l'expression du collagène de type XIV se trouve localisée au niveau du stroma de la cornée primaire qui ne mesure à ce stade, que 10µm d'épaisseur. A 7 jours, la cornée subit une invasion de cellules mésenchymateuses périoculaires et augmente en épaisseur. L'expression du collagène de type XIV est fortement localisée à ce moment là dans la matrice sous-jacente à l'épithélium. Ce matériel sous-épithélial est en réalité une matrice du « stroma primaire » qui continue à être déposée par l'épithélium plusieurs jours après l'invasion mésenchymateuse [(Trelstad and Coulombre, 1971), (Fitch et al., 1994)] et sera par la suite envahie progressivement par les cellules mésenchymateuses stromales. A ce stade le stroma cornéen est également positif pour le collagène XIV mais ce marquage forme un gradient qui part de la partie stromale située en sous-épithéliale et qui s'estompe au fur et à mesure que l'on se rapproche de l'endothélium. Ce profil d'expression est encore plus accentué à 10-12 jours. Le collagène de type XIV finit par être fortement exprimé de manière uniforme au niveau du stroma secondaire après sa contraction tout en persistant dans la zone sous-épithéliale [(16 jours), (Gordon et al., 1996)]. Cependant, à partir du 19^{ème} jour du développement cornéen, l'expression du collagène de type XIV subit une décroissance dramatique jusqu'à devenir quasi-indéetectable à l'éclosion et à l'état adulte (Young et al., 2002).

Actuellement, comme le collagène de type XII, le type XIV existe sous quatre isoformes générées par épissage alternatif; deux dans l'extrémité NC1 et deux dans le domaine NC3 (**Figure 16**). L'isoforme la plus longue en NC1 contient 31 acides aminés de plus que la courte (Walchli et al., 1993). La plus grande isoforme en NC3 contient 8 motifs de domaines de type III de la fibronectine et 2 motifs peptidiques de type facteur A de von Willebrand alors que la forme courte ne contient que 7 domaines de type III de la fibronectine et 2 motifs peptidiques de type facteur A de von Willebrand [(Gerecke et al., 1993), (Gerecke et al., 2003)].

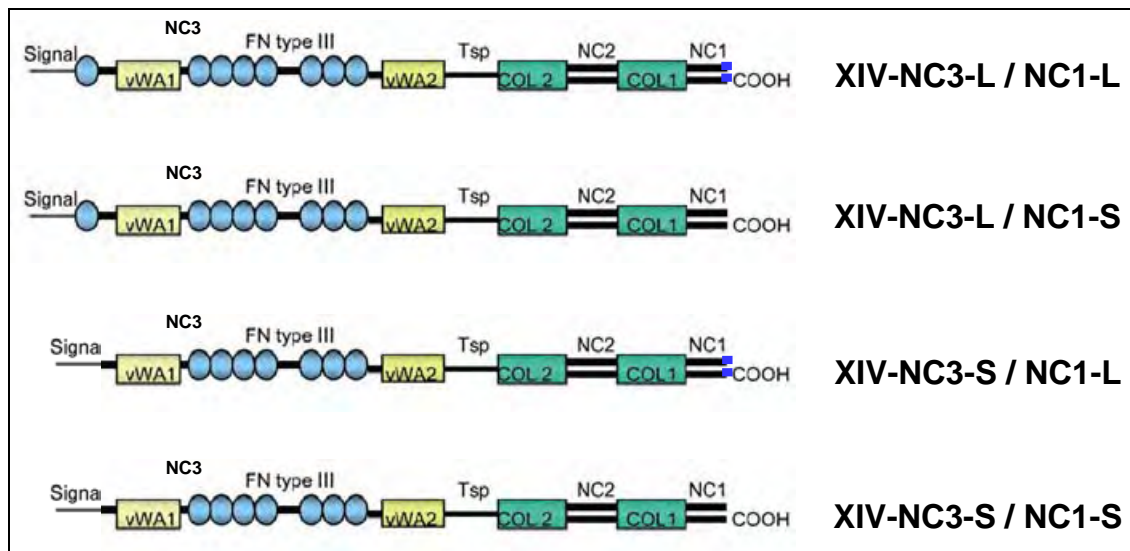


Figure 16: Variants d'épissage du collagène de type XIV [Reproduit d'après (Gerecke et al., 2003)].

La distribution spatio-temporelle des variants d'épissage du collagène de type XIV en amino-terminal est peu connue. En revanche, le profil d'expression des variants d'épissage en NC1 du collagène XIV a été établi au cours du développement aviaire dans des tissus comme le tendon (Young et al., 2000) et la cornée (Young et al., 2002). Au niveau du tendon, ces deux variants sont abondamment exprimés au 14^{ème} jour du développement avec cependant une expression du variant long au moins deux fois plus importante que celle du court. Au 19^{ème} jour en revanche ces variants montrent une diminution importante de leur expression allant de 3 (variant court) à 5 (variant long) fois moins que la valeur observée au 14^{ème} jour. A l'éclosion, leurs ARNm sont à peine détectables : le variant long est 17-18 fois moins exprimé et le court 7-8 fois moins abondant qu'au 14^{ème} jour (Young et al., 2000). Le collagène de type XIV est également présent durant les stades précoces du développement de la cornée jusqu'au 17^{ème} jour. A partir du 19^{ème} jour, son expression décroît jusqu'à devenir nulle à l'éclosion. Les deux variants NC1 sont présents du 10^{ème} au 17^{ème} jour de développement et montrent un profil d'expression coordonné avec un pic d'expression au 14^{ème} jour. Leur expression décroît ensuite significativement au 19^{ème} jour pour disparaître à l'éclosion et à l'état adulte (Young et al., 2002).

Ces changements d'expression sont corrélés avec des stades spécifiques de la fibrillogenèse qui a lieu au niveau du tendon mais également de la cornée, ce qui laisserait penser que le collagène de type XIV pourrait jouer un rôle majeur dans ce processus [(Young et al., 2000), (Young et al., 2002)].

I.4. Les protéinases dans la régulation du « processing » des collagènes

Les protéinases constituent la plus grande famille d'enzymes chez les vertébrés. Plus de 200 gènes codent pour les métalloprotéinases (**Figure 17**). La majorité d'entre eux est active dans les processus de différenciation et de remodelage tissulaires observés durant l'embryogenèse, au niveau des tissus adultes que ça soit de manière physiologique ou en présence de pathologies. La plupart des métalloprotéinases appartiennent à la famille des metzincines (Sterchi et al., 2008).

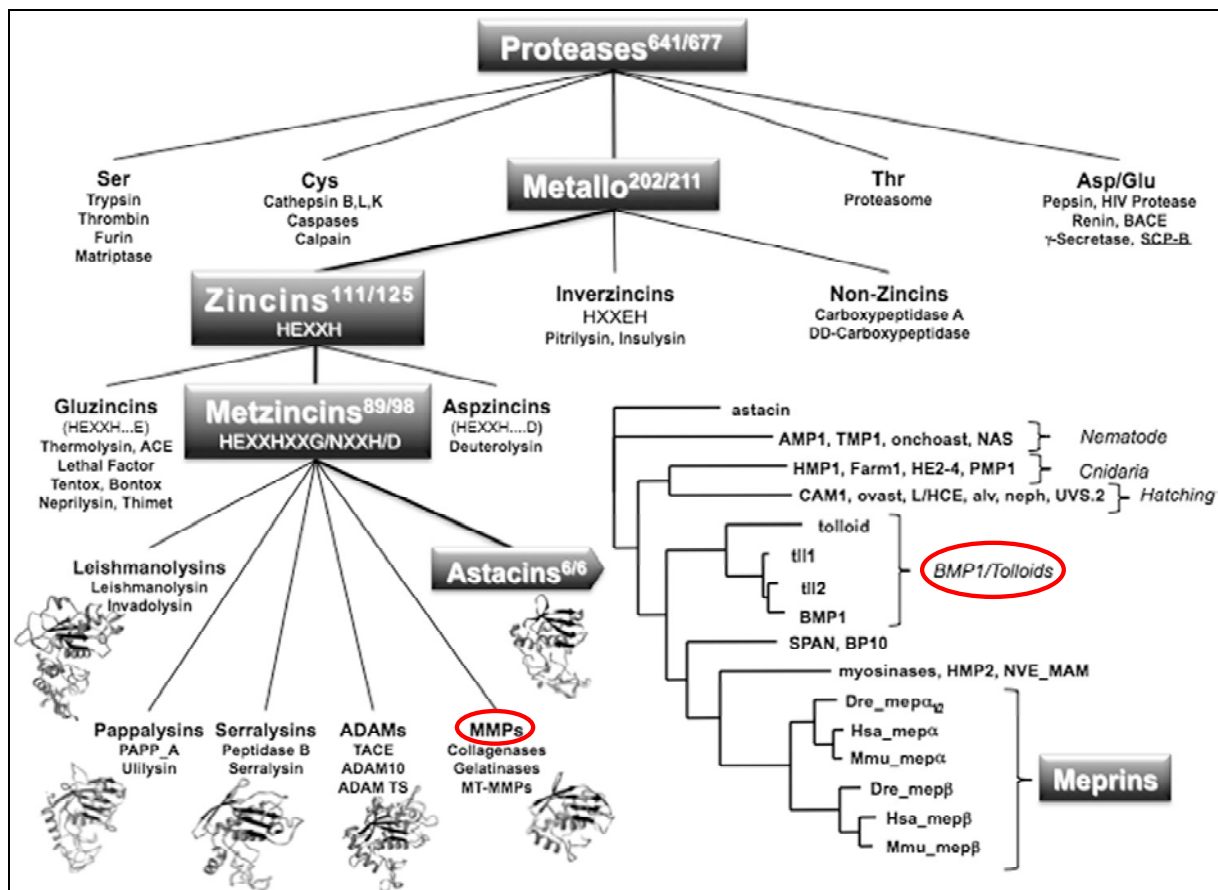


Figure 17 : Situation de la famille des metzincines, de la sous-famille des MMPs et de la sous-famille des Astacines parmi les protéinases. D'après (Sterchi et al., 2008). Les nombres indiqués correspondent au nombre de gènes dans chaque famille chez l'humain et la souris respectivement.

I.4.1. Les Astacines et la maturation du collagène

Dans la famille des metzincines ou « métalloprotéinases à zinc » sont classées les Leishmanolysines, les Pappalysines, les Serralysines, les Adamalysines (ADAMs), les métalloprotéinases matricielles (MMPs) et les Astacines (**Figure 17**). Cette dernière sous-famille remplit diverses fonctions au sein de la MEC qui varient de la simple dégradation de polypeptides à l'activation de facteurs de croissance. Les Astacines jouent un rôle important dans la régulation et la formation de la MEC en clivant par exemple des précurseurs protéiques inactifs en protéines matures fonctionnelles. Il existe parmi leurs fonctions, l'excision du propeptide C-terminal des procollagènes de type I, II, III et l'activation protéolytique de la prolusyl oxydase en lysyl oxydase, nécessaire à la formation de liaisons covalentes au sein des fibres de collagène (**Figure 18**). La sous-famille des Astacines regroupent les meprines et les protéinases Tolloïdes.

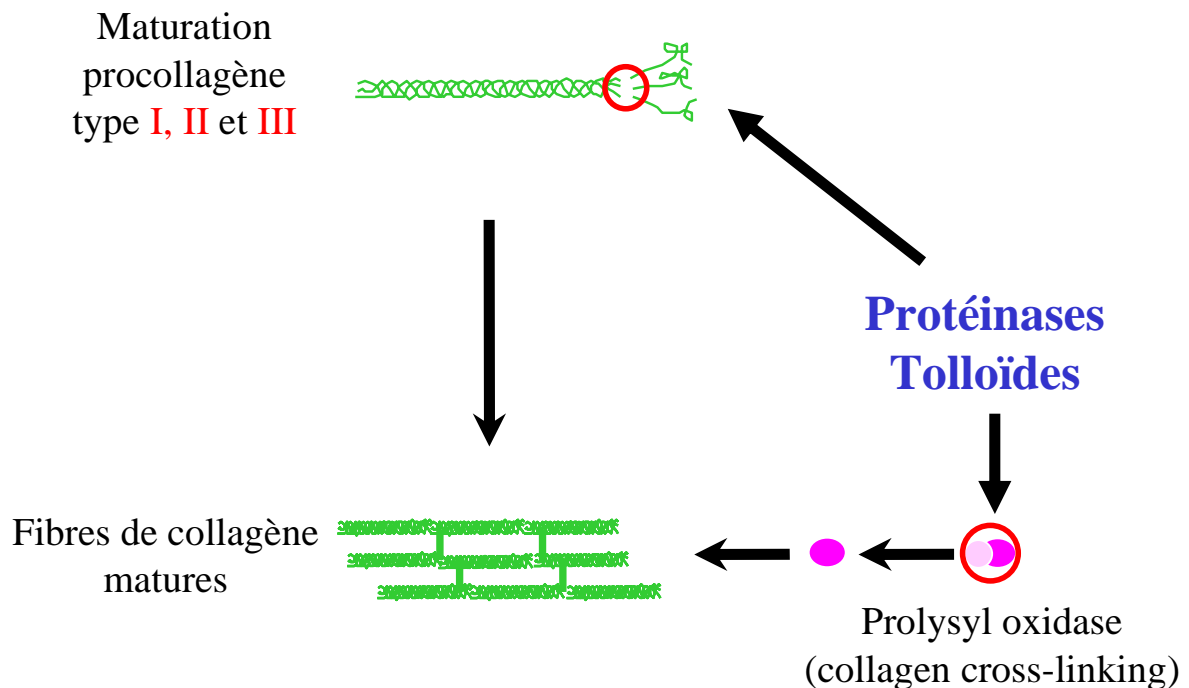


Figure 18. Mécanisme de maturation des fibres de collagène de type I, II et III. Les Tolloïdes et les Meprines sont des protéinases qui vont cliver le propeptide C-terminal du monomère de collagène. Ceci permet la formation de la triple hélice de collagène, essentielle à la maturation des fibres de collagène. La dernière étape de maturation consiste au pontage des fibres entre elles par la prolusyl oxydase, qui est elle-même activée par les Tolloïdes et les Meprines.

I.4.2. Les protéinases Tolloïdes

La protéinase fondatrice de la famille a été mise en évidence à la fin des années 1980 dans un extrait d'os déminéralisé (Wozney et al., 1988) avec plusieurs autres protéines capables d'induire la formation ectopique de l'os dans les tissus "mous". Elle s'appelle donc logiquement Bone morphogenetic protein-1 (BMP-1), un nom qui reste à l'origine de nombreuses confusions car cette protéine est la seule protéinase parmi les BMPs à ne pas faire partie de la famille du facteur de croissance TGF β (Transforming growth factor- β). Peu de temps après, un criblage génétique effectué chez la drosophile a permis de mettre en évidence que la protéine "Tolloid", produit du gène *tld* impliqué dans la formation de l'axe dorso-ventral au cours de l'embryogenèse précoce, avait une forte homologie de séquence avec BMP-1 (Shimell et al., 1991). Depuis, de nombreux orthologues ont été caractérisés chez différentes espèces telles que le poulet, le xénope, le poisson zèbre ou l'oursin. Actuellement chez les mammifères, ces protéinases sont présentes sous quatre formes principales : la forme courte BMP-1 et les formes longues mTLD (Mammalian Tolloid), mTLL-1 (Mammalian Tolloid-like 1) et mTLL-2 (Mammalian Tolloid-like 2) [(Figure 19), (Hopkins et al., 2007)].



Figure 19 : Structure en domaines des 4 isoformes principales de protéinases Tolloïdes de mammifères. P = propeptides; CUB = Complement Uegf BMP-1; EGF = Epidermal growth factor; SPC = Subtilisin-like proprotein convertase. La flèche indique le clivage possible du propeptide par les SPC (Subtilisin-like Pro-protein Convertases).

BMP-1 et mTLD sont des produits d'épissage alternatif du même gène (*Bmp1*) (Takahara et al., 1994b) alors que mTLL-1 et -2 sont codées par des gènes distincts [(Scott et al., 1999), (Takahara et al., 1996)]. En plus du domaine catalytique de type astacine, ces protéinases sont constituées d'un propeptide qui assure la latence de la protéinase avant son

clivage par des protéinases de la famille des subtilisin-like pro-protein convertases ou SPC (par exemple la furine) au niveau de l'appareil de Golgi, de plusieurs domaines CUB (entre 3 et 5 suivant les isoformes) et d'un ou deux domaines EGF. Après sécrétion, les protéinases Tolloïdes retrouvées dans le milieu extracellulaire sont donc majoritairement maturées et actives contrairement aux MMPs par exemple, qui peuvent être sécrétées sous forme latente et pour lesquelles la maturation joue un rôle essentiel dans le contrôle de l'activité protéolytique. Il semble toutefois que quelques types cellulaires comme les kératinocytes sécrètent majoritairement les protéinases Tolloïdes sous la forme entière et inactive [(Jasuja et al., 2007), (Lee et al., 1997)].

En 1996, deux équipes indépendantes montrent que BMP-1 est capable de cliver la partie C-terminale des procollagènes fibrillaires [(Kessler et al., 1996), (Li et al., 1996)] et est issue du même gène que la protéine appelée "Procollagen C-proteinase de type 1" (PCP-1) qui avait été identifiée dès la fin des années 1970 (Prockop et al., 1998). Ces protéinases déclenchent la fibrillogenèse des collagènes fibrillaires I, II et III en diminuant la solubilité des monomères de collagène, de concert avec les "Procollagen N-proteinases" (ADAMTS-2, 3 et 14) qui clivent la partie N-terminale des collagènes (Moali et al., 2005). Ainsi, actuellement, il est clair que la famille des protéinases Tolloïdes est importante pour remplir deux fonctions majeures : la synthèse de la MEC (activité PCP notamment) et l'activation des facteurs de croissance de la famille du TGF- β [activité chordinase notamment (Piccolo et al., 1997)].

I.4.2.1. Les substrats des protéinases Tolloïdes

A l'heure actuelle, 24 substrats sont mentionnés dans la littérature (**Tableau 1**) si l'on considère les hétérotrimères de collagène comme des substrats uniques et que l'on exclut l'inhibiteur à large spectre α_2 -macroglobuline qui se comporte comme un substrat suicide.

Les quatre protéinases Tolloïdes semblent avoir la même spécificité de substrat mais les efficacités catalytiques de chacune des isoformes diffèrent significativement. Ainsi, mTLL-2 semble avoir des activités PCP ou chordinase difficilement détectables mais devient capable de cliver le procollagène I à un niveau correct en présence de l'activateur Procollagen C-proteinase enhancer-1 ou PCPE-1 [cf. ci-dessous, (Petropoulou et al., 2005)]

ou de cliver la chordine en présence de l'activateur Twisted gastrulation (Scott et al., 2001)].

Les données de la littérature indiquent en revanche, que mTLL-2 peut cliver la prolyl oxydase (Uzel et al., 2001), l'ostéoglycine (Ge et al., 2004), la laminine 332 (Veitch et al., 2003), le procollagène VII (Rattenholl et al., 2002), la myostatine (Wolfman et al., 2003) et la "Dentin matrix protein-1" (Steiglitz et al., 2004). De la même façon, mTLD semble globalement moins active que mTLL-1 et BMP-1, la plus active des protéinases sur l'ensemble des substrats connus. Il est à noter que ces résultats sont basés uniquement sur l'observation de gels SDS-PAGE et de western-blots et que les quantités exactes de protéinase ne sont pas toujours connues. Les données quantitatives manquent cruellement à ce jour puisque même les constantes cinétiques pour le couple BMP-1/procollagène I sont remises en question car elles ont été déterminées avec des préparations de BMP-1 contaminées par du PCPE-1 [(Adar et al., 1986), (Hojima et al., 1985)].

Protéine humaine	Numéro d'accession (UnProtKB)	Séquence clivée (numérotation protéine humaine entière)	Référence
Procollagène I (1)	P02452	YYRA ¹²¹⁹ DDAN	(Dickson et al., 1981)
Procollagène I (2)	P02458	YMRA ¹²⁴² DQAA	(Dickson et al., 1981)
Procollagène II (1)	P02458	YMRA ¹²⁴² DQAA	(Ramirez et al., 1985)
Procollagène III (1)	P02461	PYYG ¹²²² DEPM	(Ramirez et al., 1985)
Procollagène V (1)	P20908	QLLD ¹⁵⁹⁵ DGNG	(Imamura et al., 1998)
Procollagène V (2)	P05997	TPQS ⁰²⁵⁵ QDPN	(Unsold et al., 2002)
Procollagène V (3)	P25940	EFTE ¹²⁵⁴ DQAA	(Gopalakrishnan et al., 2004)
Procollagène XI (1)	Q149N0	SFQQ ⁴⁶⁴ AQAQA	(Kessler et al., 2001)
Procollagène XI (2)	P13942	GMQA ¹⁴⁴⁸ DADD AAQA ⁰²⁵⁴ QEPQ LMQE ¹⁵²⁵ DEAI RPQN ⁰²³⁹ QQPH	Putatif Putatif Putatif putatif
Procollagène VII (1)	Q02388	SYAA ²⁸²² DTAG	(Rattenholl et al., 2002)
Lysyl oxydase (LOX)	P28300	RMVG ⁰¹⁶⁹ DDPY	(Panchenko et al., 1996)
"Lysyl oxidase like" (LOXL)	Q08397	VAVG ⁰¹³⁵ DSTG VRSS ⁰³³⁸ DAPP	(Borel et al., 2001)
Probiglycan	P21810	FMMN ⁰⁰³⁸ DEEA	(Scott et al., 2000)

Ostéoglycine (mimécan)	P20774	QLQK ⁰⁰⁷⁶ DEAI	(Ge et al., 2004)
Décorine	P07585	FMLE ⁰⁰³¹ DEAS	(von Marschall and Fisher, 2010a)
Perlécane	P98160	SGGN ⁴¹⁹⁶ DAPG	(Gonzalez et al., 2005)
Laminine 332(γ 2)	Q13753	CYSG ⁰⁴³⁵ DENP	(Amano et al., 2000)
Laminine 332(α 3)	Q13753	non déterminé	(Veitch et al., 2003), (Amano et al., 2000)
"Dentin Matrix Protein-1" (DMP1)	Q13316	EKQS ⁰²¹⁸ DDPE	(Steiglitz et al., 2004)
"Dentin sialophospho-protein" (DSPP)	Q9NZW4	SMQG ⁰⁴⁶³ DDPN	(Tsuchiya et al., 2011)
Chordine	Q9H2X0	RSYS ⁰¹⁵⁴ DRGE PMQA ⁰⁸⁶⁷ DGPR	(Scott et al., 1999)
Myostatine (GDF-8)	O14793	DVQR ⁰⁰⁹⁹ DDSS	(Wolfman et al., 2003)
GDF-11 (BMP-11)	O95390	DFQG ⁰¹²² DALQ	(Ge et al., 2005)
"Latent TGF-binding protein 1" (LTBP-1)	Q14766	IPSL ⁰⁴⁸⁶ DQEK YFIQ ¹²⁸⁵ DRFL	(Ge and Greenspan, 2006a)
Apolipoprotéine A1	P02647	FWQQ ⁰⁰²⁵ DEPP	(Chau et al., 2007)
Gliomédine	Q6ZMI3	AIPN ⁰²⁸¹ DDTL	(Maertens et al., 2007)
Prolactine	P01236	LQMA ⁰¹⁸⁸ DEES	(Ge et al., 2007)
Hormone de croissance (somatotropine)	P01241	NSHN ⁰¹⁷⁹ DDAL	(Ge et al., 2007)

Tableau 3 : Substrats des protéinases Tolloïdes qui sont connus et décrits dans la littérature ainsi que les séquences clivées.

Les substrats des protéinases Tolloïdes peuvent être classés en 3 grandes catégories selon le processus dans lequel ils interviennent :

I.4.2.1.1. Maturation des protéines de la MEC

Contrôle de la fibrillogenèse du collagène

Les Tolloïdes sont des protéinases qui jouent un rôle important dans la régulation de la formation de la MEC notamment dans la maturation du collagène. Parmi les différentes modifications extracellulaires que subissent les procollagènes fibrillaires, existent des étapes de clivage des propeptides en position N- et C-terminale. Ces dernières font intervenir diverses enzymes dont notamment les protéinases Tolloïdes qui sont responsables du clivage du propeptide de l'extrémité C-terminal des collagènes de type I, de type II et de type III. En effet, jusque dans les années 2000, BMP-1 et mTLD étaient décrites comme les "Procollagen C-proteinases" car elles peuvent cliver la partie C-terminale des collagènes fibrillaires majoritaires [collagène de type I, de type II et de type III, (**Figure 18**); (**Tableau 3**)]. Plus tard, il a été montré que mTLL-1 était aussi pourvue d'activité PCP alors que mTLL-2 clive très mal les procollagènes, du moins en l'absence d'activateurs ([Scott et al., 1999](#)). Ce clivage joue un rôle important car il entraîne une diminution de la solubilité des molécules de collagène et déclenche la formation des fibres. Les lysyl oxydases (LOX et LOXL), éléments intervenant dans l'établissement du réseau tridimensionnel de collagène sont également maturées par les protéinases Tolloïdes.

Formation des lames basales

Parmi les composants des lames basales, les protéinases Tolloïdes clivent la laminine 332. Du côté épithélial, cette laminine peut interagir à la fois avec les récepteurs exprimés par les cellules épithéliales (intégrines, les protéoglycannes à héparane sulfate ou HSPGs) et avec les autres composants des lames basales, assurant l'adhésion des cellules épithéliales à la lame basale. Cette laminine peut être clivée à plusieurs endroits par des protéinases, en particulier les protéinases Tolloïdes qui contrôlent son activité en clivant les chaînes $\alpha 3$ et $\gamma 2$ (**Figure 20**). La laminine 332 complètement mature sera insérée dans les membranes basales et stabilisera les interactions lame basale-épithélium alors que la rétention des domaines LG4 et 5 sur la chaîne $\alpha 3$ semble favoriser la migration des cellules épithéliales ([Bachy et al., 2008](#)). Cependant, alors que le clivage de la chaîne $\gamma 2$ semble être contrôlé exclusivement par les protéinases Tolloïdes (au moins pour la forme humaine), le clivage de la chaîne $\alpha 3$ peut aussi être réalisé par la plasmine et des protéinases de la famille des MMPs comme MMP-2 et MMP-14 [([Veitch et al., 2003](#)), ([Amano et al., 2000](#))]. Il est important de noter que le site de clivage sur la chaîne $\alpha 3$ n'a pas été déterminé.

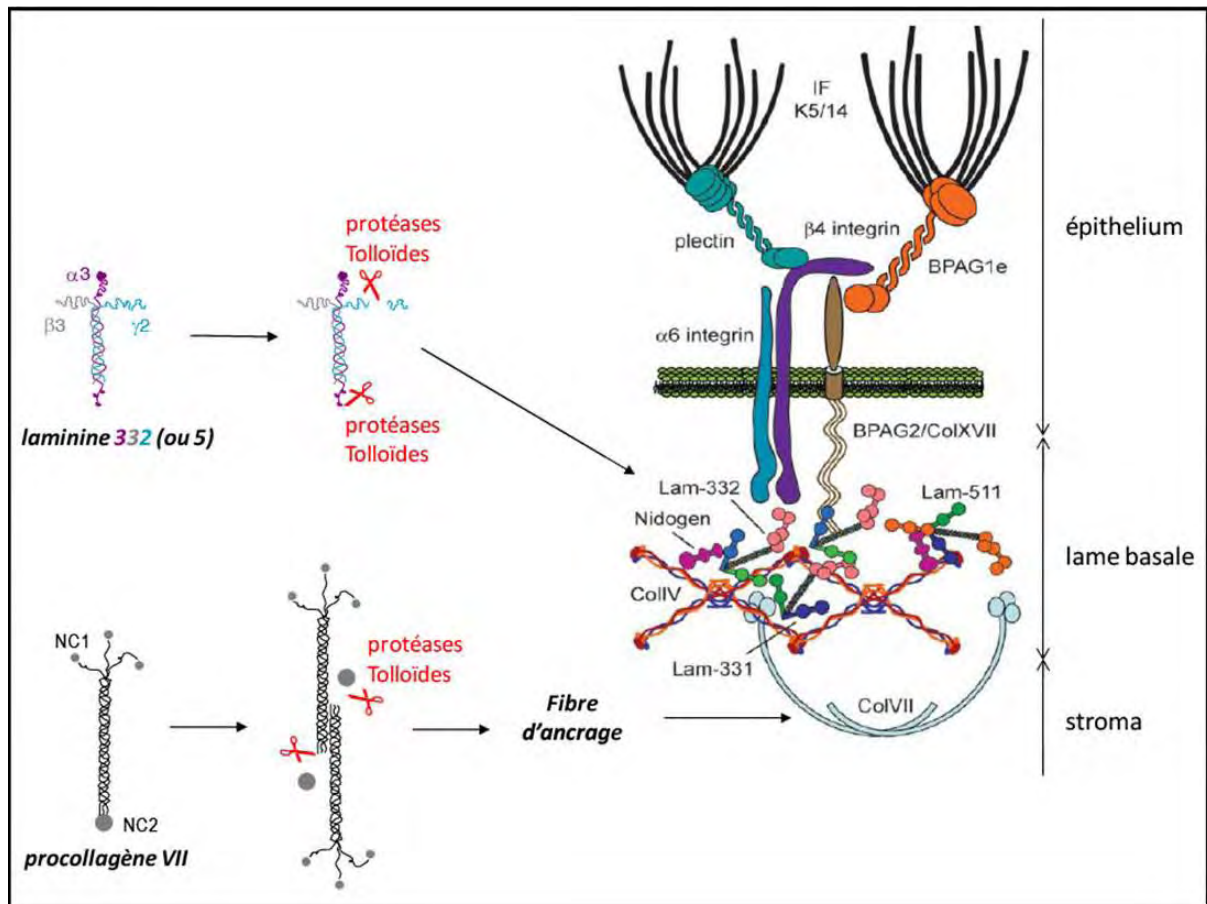


Figure 20 : Maturation de la laminine 332 et du procollagène VII par les protéinases Tolloïdes et association avec les autres protéines des lames basales. D'après (Moali and Hulmes, 2009) et (Wiradjaja et al., 2010).

Minéralisation

Le dernier rôle en relation avec la synthèse de la MEC décrit à l'heure actuelle pour les protéinases Tolloïdes concerne le clivage des protéines de la famille SIBLING (Small integrin-binding ligand, N-linked glycoprotein) trouvées principalement dans l'os et la dentine. La "Dentin matrix protein-1" (DMP-1) et la "Dentin sialophosphoprotein" (DSPP) sont les constituants majoritaires de la matrice de la dentine après les collagènes mais aucune de ces deux protéines n'est trouvée sous forme entière dans les tissus (Ge and Greenspan, 2006b). Les fragments commençant pour la plupart par des résidus aspartate, ces protéines ont été testées et confirmées comme étant des substrats des protéinases Tolloïdes, voire d'autres protéinases de la famille des astacines comme les Méprines pour DSPP [(Steiglitz et al., 2004), (Tsuchiya et al., 2011), (von Marschall and Fisher, 2010)].

Ces protéines pourraient jouer un rôle dans l'initiation de la minéralisation du tissu ostéoïde et de la prédentine grâce à la présence de domaines acides pouvant fixer le calcium.

I.4.2.1.2. Activation des facteurs de croissance

Les protéinases Tolloïdes peuvent activer un certain nombre de facteurs de croissance qui appartiennent tous à la famille du TGF- β mais les mécanismes mis en jeu sont très divers (**Figure 21**) : clivage d'un antagoniste pour BMP-2 et -4, clivage du propeptide conduisant à la dissociation du facteur de croissance actif pour GDF-8 et -11, clivage d'une protéine permettant la séquestration du facteur de croissance dans la matrice pour le TGF- β .

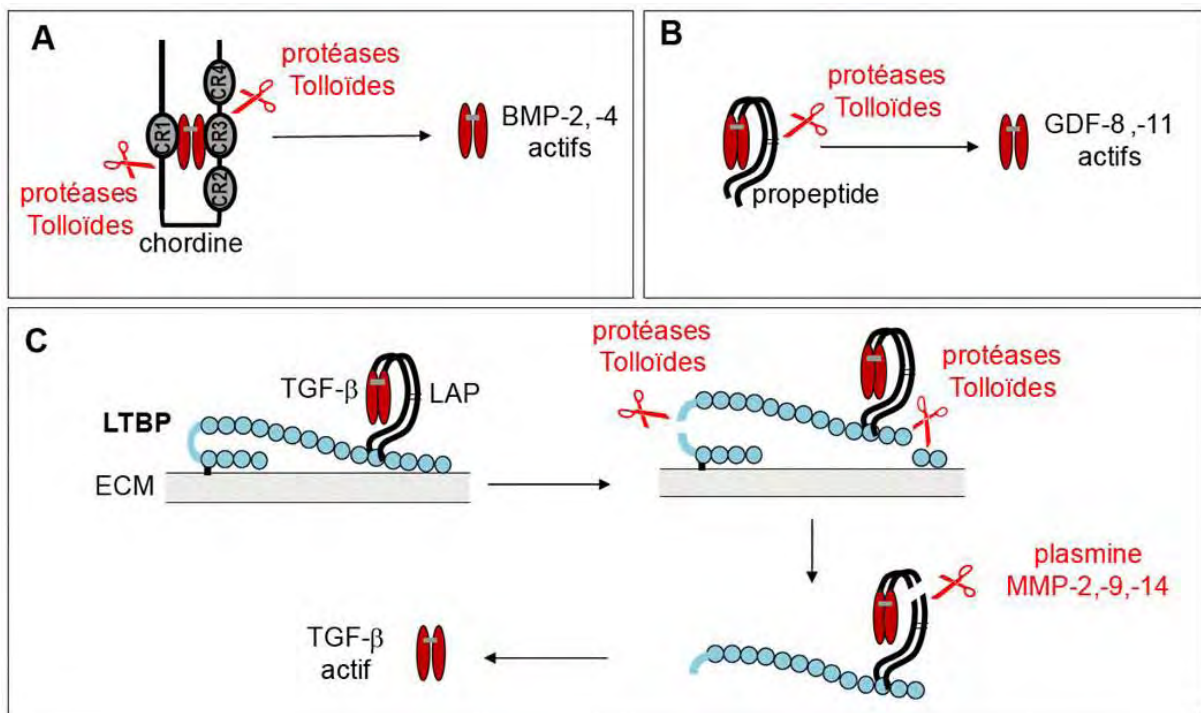


Figure 21 : Différents modes d'activation des facteurs de croissance de la famille du TGF- β par les protéinases Tolloïdes. (A) Activation de BMP-2 et -4 par clivage de leur antagoniste, la chordine (CR = cystein-rich), (B) activation de GDF-8 (myostatine) et GDF-11 (BMP-11) par clivage direct du propeptide et (C) activation du TGF- β par clivage des LTBPs puis de son propeptide avec intervention de plusieurs protéinases.

De façon intéressante, il n'a pas été décrit pour l'instant de mécanisme d'inactivation des facteurs de croissance par les protéinases Tolloïdes.

I.4.2.1.3. Contrôle de l'angiogenèse

Le perlécan est un composant structural des lames basales. Il joue aussi un rôle important dans le cartilage et de façon générale, il est sécrété dans l'espace pericellulaire de nombreux types cellulaires où il peut influencer la migration, la prolifération et la différenciation (Whitelock et al., 2008). Un rôle majeur de ce très grand protéoglycane à héparane sulfate concerne le contrôle de l'activité de certains facteurs de croissance susceptibles d'interagir avec les glycosaminoglycannes et impliqués dans l'angiogenèse (FGFs, VEGFs). L'effet de la molécule entière semble être pro-angiogénique mais les fragments de protéolyse issus de son extrémité C-terminale (endorépelline, LG3 ou Laminin type G-domain 3) ont une activité anti-angiogénique.

Les protéinases Tolloïdes sont responsables de la libération du domaine C-terminal LG3 (**Figure 22**) mais les protéinases impliquées dans la libération du fragment endorépelline ne sont pas connues (Gonzalez et al., 2005).

De la même façon, la prolactine est un substrat de BMP-1 (**Figure 22**) et des autres isoformes de Tolloïdes qui, parmi de multiples fonctions (lactation, reproduction, croissance, métabolisme...), possède également une activité pro-angiogénique. Après clivage, un fragment de 17 kDa possédant une activité anti-angiogénique est produit (Ge et al., 2007). Cette hormone appartient à la même famille que l'hormone de croissance qui est aussi substrat de BMP-1 (Ge et al., 2007) mais pour laquelle les conséquences du clivage sur les fonctions n'ont pas été décrites.

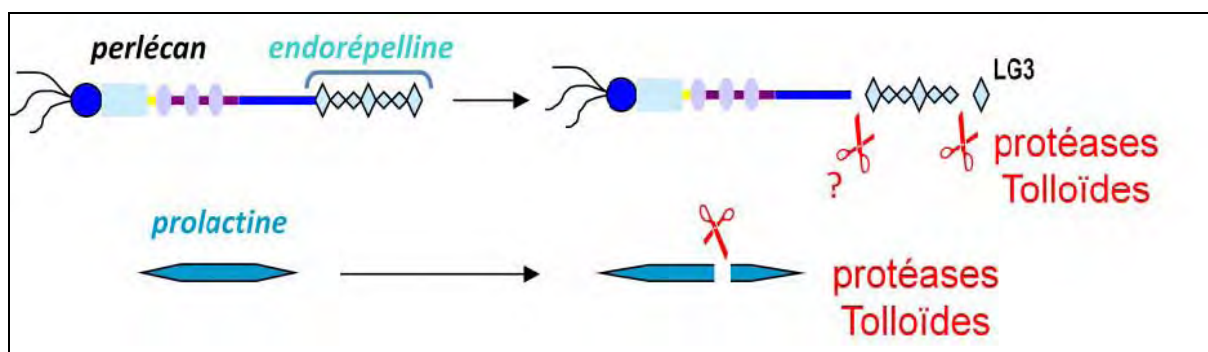


Figure 22 : Clivage du perlécan et de la prolactine par les protéinases Tolloïdes.

La thrombospondine-1, autre facteur anti-angiogénique important, est aussi un substrat de BMP-1 ce qui suggère que les protéinases Tolloïdes sont des régulateurs essentiels de l'angiogenèse normale et/ou tumorale. Cette fonction est à rapprocher du rôle de la lysyl oxydase et de son propeptide dans la tumorigenèse [(Min et al., 2007), (Pez et al., 2011)] et pourrait suggérer que les protéinases Tolloïdes jouent un rôle dans la formation de certains cancers. Cependant, à ce jour, il n'existe quasiment aucune donnée indiquant un rôle clair des protéinases Tolloïdes au cours de la progression ou de l'angiogenèse tumorales à l'exception d'une étude montrant une surexpression de BMP-1 d'un facteur 16 par les cellules endothéliales associées au cancer colorectal par rapport aux cellules endothéliales de tissu sain (St Croix et al., 2000).

1.4.2.1.4. Autres substrats

Deux autres substrats "atypiques" ont été décrits dans la littérature : la gliomédine et l'apolipoprotéine A1. La gliomédine est une protéine transmembranaire appartenant à la superfamille des collagènes avec dans sa partie extracellulaire une région collagénique suivie d'un domaine de type olfactomédine. Elle joue le rôle de ligand pour les molécules d'adhésion axonales neurofascine et NrCam, avec un rôle important dans la formation des nœuds de Ranvier au niveau du système nerveux périphérique. L'ectodomaine de la gliomédine peut être libéré par un processus de "shedding" contrôlé par les protéinases de type furine (SPC) tandis que le domaine olfactomédine peut aussi être libéré par une étape supplémentaire de protéolyse contrôlée par les protéinases Tolloïdes (Maertens et al., 2007). Le domaine olfactomédine ainsi libéré peut former des agrégats moléculaires insolubles à l'origine des propriétés structurantes de la molécule au niveau des nœuds de Ranvier.

L'apolipoprotéine A1 est la protéine majoritaire des HDL (High-density lipoprotein) présents dans le sérum. Cette protéine doit être maturée par retrait de six acides aminés à son extrémité N-terminale pour interagir avec un transporteur cellulaire (ATP-binding cassette transporter A1), changer de conformation et acquérir la capacité de fixer les phospholipides. Cette maturation semble pouvoir être effectuée par BMP-1 (Chau et al., 2007), ce qui confère à la famille des protéinases Tolloïdes un rôle inattendu dans le métabolisme des lipides.

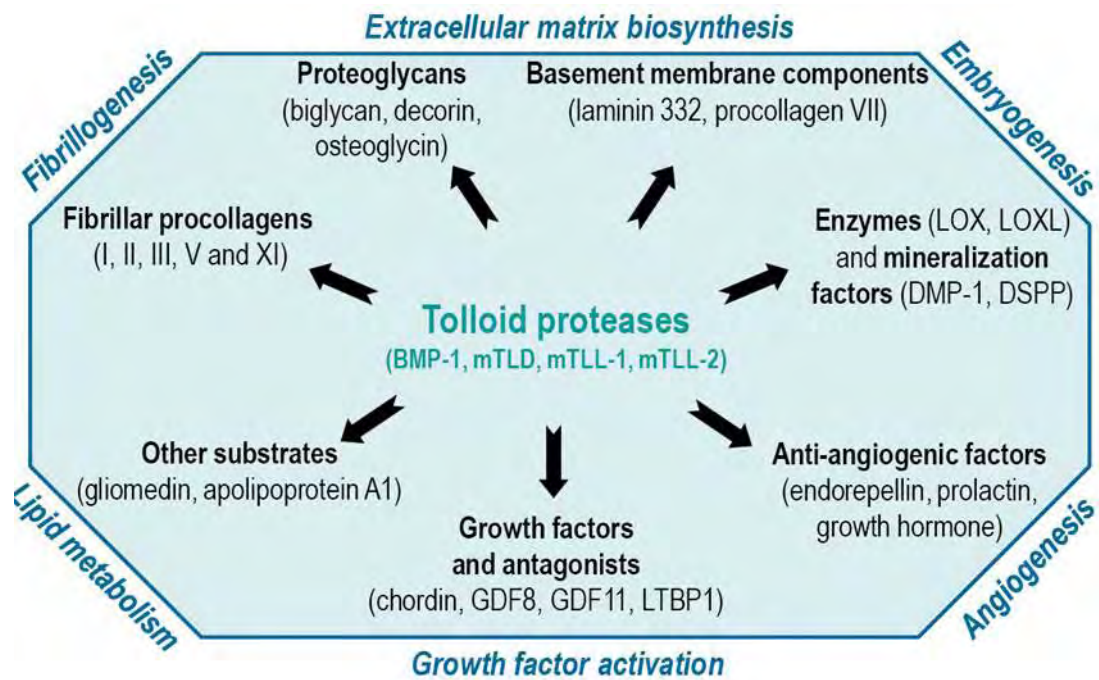


Figure 23 : Schéma récapitulatif décrivant les substrats connus des protéinases Tolloïdes et leurs fonctions associées.

I.4.2.2. Les régulateurs endogènes des protéinases Tolloïdes

Après leur activation protéolytique, les protéinases extracellulaires sont régulées de trois manières principales : par leur localisation extracellulaire (ancrage dans la membrane cellulaire, séquestration dans la matrice, "en solution"), par les mécanismes de dégradation (protéolyse et internalisation) ou par la présence d'inhibiteurs et d'activateurs endogènes. Ce dernier mécanisme est très important car quasiment toutes les protéinases extracellulaires possèdent une ou plusieurs molécules régulatrices, le plus souvent des inhibiteurs ($\alpha 2$ plasmin inhibitor pour la plasmine, cystatine C pour les cathepsines, Tissue inhibitors of metalloproteinases ou TIMPs pour les MMPs, quelques ADAMs et ADAMTSs...). Il permet normalement d'éviter la destruction des tissus qui est observée dans certaines pathologies comme l'arthrose ou les plaies chroniques.

I.4.2.2.1. Les inhibiteurs

Inhibition par BMP-4

En 2007, l'équipe de D. Greenspan a montré que BMP-2 et 4 pouvaient interagir avec le prodomaine de BMP-1 mais pas avec la forme mature de la protéinase (Jasuja et al., 2007). Le complexe prodomaine de BMP-1/BMP-4 peut être extrait de la peau et du milieu conditionné de cellules MG-63 et le prodomaine de BMP-1 inhibe la différenciation des ostéoblastes induite par BMP-4 aussi efficacement que la chordine. Le prodomaine de BMP-1 agirait donc comme un antagoniste de BMP-4.

Ce résultat n'a pas été confirmé par l'équipe d'E. De Robertis qui a montré en 2009 que BMP-4 interagit avec la partie mature du BMP-1 de xénope (xBMP-1), par ses domaines CUB1 et CUB2, résultat confirmé avec les protéinases BMP-1 humaine et Tld de drosophile (Lee et al., 2009). Cette interaction conduit à l'inhibition non compétitive de xBMP-1 par BMP-4 et à l'inhibition de la signalisation BMP-4 par BMP-1.

Inhibition par les sFRPs

Les mêmes équipes sont engagées dans une autre controverse intéressante concernant le rôle des sFRPs (secreted Frizzled related proteins) dans le contrôle de l'activité des protéinases Tolloïdes. En 2006, l'équipe de De Robertis (Lee et al., 2006b) montre que la protéine sizzled qui appartient à la famille des sFRPs est présente uniquement chez le xénope, le poisson-zèbre et le poulet. Cette protéine inhibe les protéinases Tolloïdes de xénope Xolloid-related (Xlr) et xBMP-1 de façon efficace et compétitive. Les domaines importants pour l'inhibition sont le domaine catalytique de BMP-1 et le domaine frizzled de sizzled (**Figure 24**).

Les auteurs assurent aussi que sFRP2, une des protéines humaines homologues à sizzled inhibe la protéinase Xlr.



Figure 24 : Structure en domaines des sFRPs. Fz = frizzled; NTR = netrin. D'après (Lee et al., 2006b).

Chez les mammifères, les résultats sont très divergents allant de la « simple » activation (Kobayashi et al., 2009) à l'activation ou inhibition selon la dose (He et al., 2010) en passant par une absence d'effet de sFRP2 sur le clivage du procollagène I par BMP-1 (von Marschall and Fisher, 2010).

I.4.2.2.2. Les activateurs

Si on considère que sFRP2 est un activateur des Tolloïdes, ce qui reste à confirmer, six types d'activateurs de ces protéinases ont été décrits à ce jour (**Figure 25**).

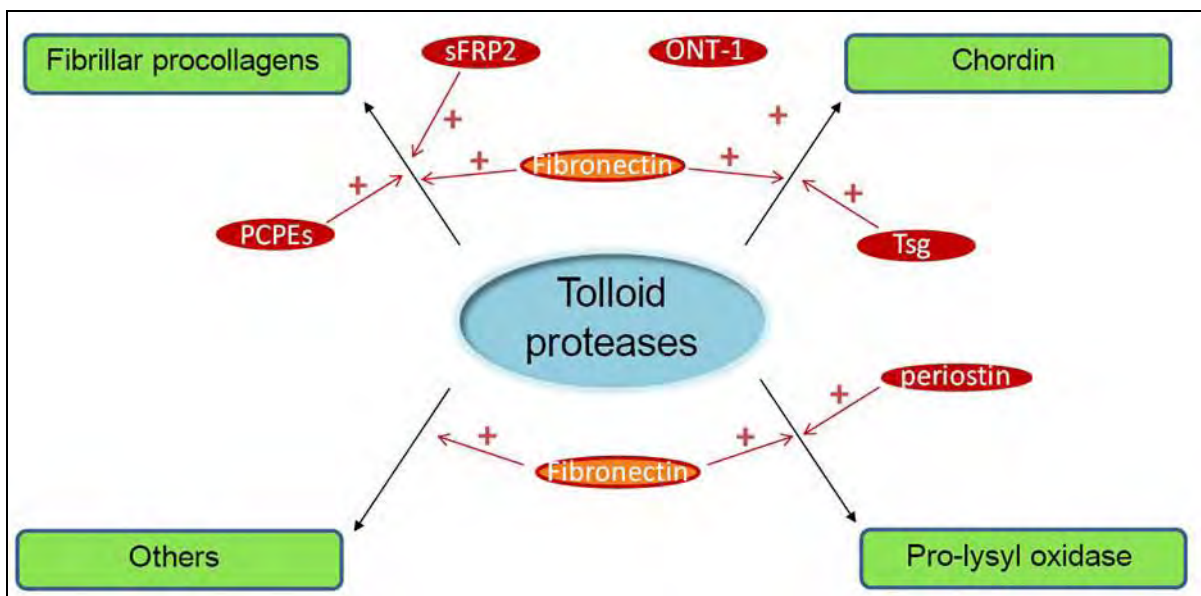


Figure 25 : Protéines décrites pour être capables d'augmenter l'activité des protéinases Tolloïdes sur au moins un de leurs substrats. A l'exception de la fibronectine qui peut activer au moins le clivage du procollagène I, de la chordine et du biglycan, tous les autres activateurs semblent spécifiques d'un seul type de substrats.

Ces protéines n'ont aucun lien entre elles si ce n'est leur spécificité car, à l'exception de la fibronectine qui semble activer le clivage de tous les substrats des Tolloïdes, ces activateurs sont "substrat-spécifiques", propriété que l'équipe de C. Moali a été la première à mettre clairement en évidence dans le cas des Procollagen C-proteinase enhancers ou PCPEs (Moali et al., 2005).

De façon intéressante, ces activateurs semblent être réservés pour deux fonctions principales : la fibrillogénèse du collagène (incluant l'étape de réticulation des fibres

contrôlée par les lysyl oxydases LOX et LOXL) et la formation de l'axe dorso-ventral au cours de l'embryogenèse (en relation avec le clivage de la chordine). Ceci est à mettre en relation avec l'existence probable de situations physiologiques nécessitant le dépôt accéléré de fibres de collagène (développement, réparation tissulaire) ou la libération locale de concentrations importantes de facteurs de croissance (formation de l'axe dorso-ventral, organogenèse).

Parmi ces six activateurs, nous nous sommes intéressés aux PCPEs qui sont les activateurs qui potentialisent le plus l'effet des protéinases Tolloïdes dans la maturation du collagène.

Procollagen C-proteinase enhancers (PCPEs)

La protéine PCPE-1 a été décrite dès 1986 comme activateur des protéinases Tolloïdes (appelées PCPs à l'époque) par l'équipe de R. Adar [(Adar et al., 1986), (Kessler and Adar, 1989)]. Cette glycoprotéine de 55 kDa ou son fragment protéolytique (CUB1 CUB2 ; **Figure 26**) a été co-purifiés avec BMP-1 dans des préparations issues de fibroblastes de souris 3T6 et l'optimisation du protocole pour éliminer la majeure partie des contaminants a conduit à une diminution importante de l'activité de BMP-1 vis-à-vis du procollagène I. Dès cette première étude, les paramètres cinétiques de la réaction de clivage du procollagène I ont été mesurés, en absence et en présence de PCPE-1, et indiquaient une augmentation du Km et du kcat en présence de PCPE-1. Par la suite, il est apparu que ces données n'étaient pas fiables à cause de la difficulté d'obtenir des préparations de protéinase non contaminées par PCPE-1. Malgré les données accumulées depuis cette époque concernant les PCPEs et la mise au point de systèmes permettant l'expression de protéinases Tolloïdes dépourvues de PCPE-1, l'effet réel de cette protéine sur les constantes cinétiques de la réaction de clivage des procollagènes reste inconnu à ce jour. Les observations expérimentales de l'équipe de C. Moali indiquent cependant que le taux d'activation peut atteindre un facteur 15-20.



Figure 26 : Structure en domaines de PCPE-1/PCPE-2, activateurs des protéinases Tolloïdes. CUB = Complement Uegf BMP-1 ; NTR = netrin.

Quelques années plus tard, le gène codant pour PCPE-1 a été cloné (Takahara et al., 1994a) et l'enchaînement des domaines de PCPE-1 a été mis en évidence (Figure 26), révélant que la protéine est composée de deux domaines CUB du même type que ceux trouvés dans les protéinases Tolloïdes elles-mêmes et d'un domaine NTR homologue au domaine N-terminal des TIMPs (Banyai and Patthy, 1999). De façon intéressante, le protocole de purification utilisé pour purifier PCPE-1 faisait appel à une colonne d'affinité pour le C-propeptide du procollagène I [(Adar et al., 1986), (Kessler and Adar, 1989)] et la fixation du PCPE-1 sur la colonne suggérait déjà une interaction forte entre les C-propeptides des collagènes fibrillaires et les PCPEs. Par ailleurs, il a été démontré que PCPE-1 n'affectait pas le clivage du N-propeptide des procollagènes fibrillaires contrôlé par ADAMTS-2 (Hulmes et al., 1997).

L'isoforme PCPE-2 a été mise en évidence au début des années 2000 (Xu et al., 2000) et caractérisée par BM Steiglitz et son équipe (Steiglitz et al., 2002). Son expression est limitée à un nombre plus restreint de tissus que celle de PCPE-1 mais on retrouve une forte expression au niveau du cœur pour les deux isoformes. PCPE-2, qui présente seulement 43% d'identité avec PCPE-1, active également la maturation des procollagènes fibrillaires mais semble se distinguer de PCPE-1 par une affinité encore plus marquée pour l'héparine. Ceci se traduit, en conditions de culture cellulaire, par une association préférentielle au tapis cellulaire alors que PCPE-1 est surtout retrouvé dans le surnageant.

L'activité de stimulation de la maturation des procollagènes fibrillaires observée pour les deux isoformes a suggéré très tôt que ces protéines pourraient aussi jouer un rôle dans les fibroses. Les exemples de leur implication dans la réparation tissulaire et les fibroses sont effectivement plus nombreux que pour les protéinases Tolloïdes [pour lesquelles une seule étude montre une surexpression de BMP-1 dans un modèle de fibrose cardiaque (Kobayashi et al., 2009)]. Ainsi, une première étude montre une surexpression de PCPE-1 dans un modèle de fibrose hépatique induite par CCl₄ (Ogata et al., 1997), une autre dans un modèle d'infarctus (Kessler-Icekson et al., 2006) et une dernière dans un modèle de formation de plaque d'athérome suite à une lésion artérielle (Kanaki et al., 2000).

Les souris où le gène de Pcpce-1 a été inactivé (Pcolce^{-/-}) sont viables et fertiles mais présentent des anomalies des os longs (géométrie, propriétés mécaniques...) et des tendons avec des fibres de collagène d'aspect anormal (Figure 27).

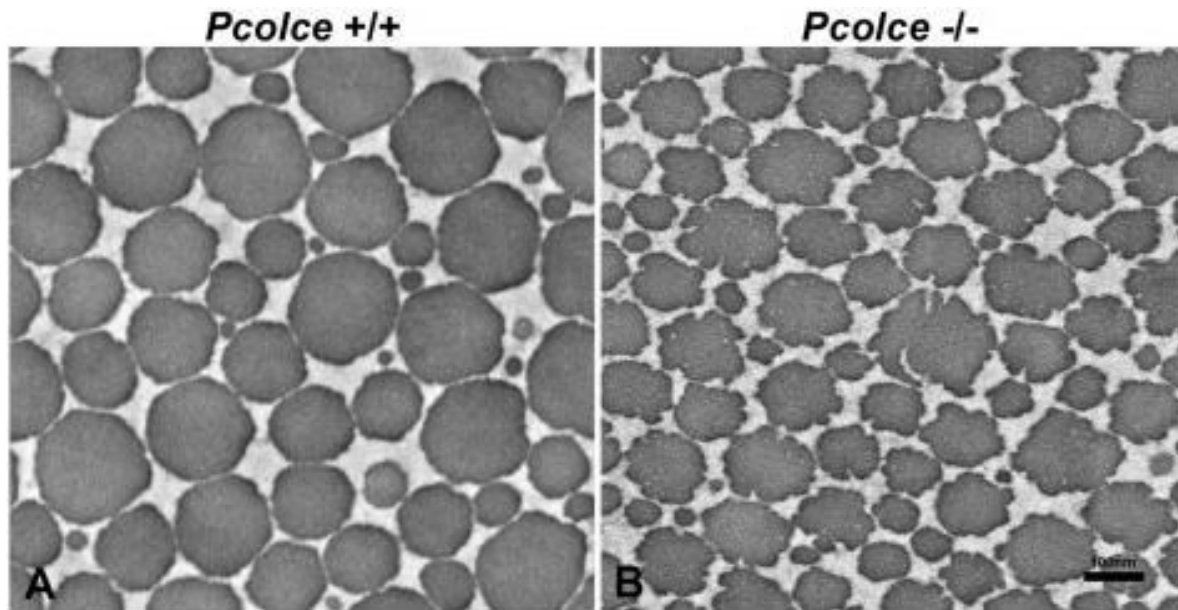


Figure 27 : Aspect des fibres de collagène dans les tendons de souris *Pcolce*^{-/-}. Microscopie électronique à transmission réalisée sur des souris âgées de 30 jours (Steiglitz et al., 2006).

I.4.3. Les métalloprotéinases de la matrice extracellulaire (MMPs) et le remodelage de la MEC

La MEC est un élément essentiel du microenvironnement cellulaire. Elle est généralement constituée de 3 grandes classes de protéines constitutives : les protéines fibreuses volumineuses comme les collagènes, les glycoprotéines comme la fibronectine et les protéoglycannes. La MEC remplit diverses fonctions en plus de son rôle de maintien de la structure des tissus. En effet, elle intervient par exemple, dans la régulation des interactions cellule-cellule dont notamment celles qui existent dans le cas de la cornée, entre les cellules épithéliales et les cellules stromales. Ce « dialogue » entre épithélium et stroma cornéen est déterminant pour différents processus physiologiques comme l'embryogenèse et la cicatrisation. Il l'est également pour des processus pathologiques comme la fibrose ou l'ulcération. Ces processus pathologiques résultent en général d'une dérégulation du remodelage matriciel mis en place après traumatisme. Le remodelage matriciel est caractérisé par des phénomènes de synthèse et de dégradation des composants de la MEC. Les différents éléments de la MEC sont synthétisés par les cellules qu'elle contient tandis que la dégradation est assurée par des protéinases dont les plus impliquées sont les

métalloprotéinases matricielles (« matrix metalloproteinases » ou MMPs) [(Woessner, 1962), (Brinckerhoff and Matrisian, 2002), (Puente et al., 2003), (Nagase et al., 2006), (Page-McCaw et al., 2007)].

La famille des MMPs est composée de plus de 25 endopeptidases, dénommées soit par un nom descriptif soit par un numéro (Woessner, 1962). Malgré une certaine spécificité des substrats, les spectres protéolytiques des différentes MMPs sont assez larges et se recouvrent, ce qui leur permet d'assurer la dégradation de l'ensemble des composants de la MEC [(Woessner, 1962), (Somerville et al., 2003), (Overall and Blobel, 2007)]. Toutes les MMPs sont constituées de trois domaines : le pré-domaine, nécessaire à leur acheminement intracellulaire jusqu'à la surface cellulaire, le pro-domaine et le domaine catalytique proprement dit. Le pré-domaine est rapidement éliminé après la sécrétion et est absent de la forme enzymatique mature. Le pro-domaine maintient l'activité enzymatique sous forme latente et est classiquement constitué d'une séquence peptidique comprenant un résidu cystéine qui interagit avec le site catalytique. Ce dernier contient un atome de zinc maintenu par trois résidus histidine au fond d'une structure peptidique tridimensionnelle en forme de poche. Le résidu cystéine du pro-domaine agit comme le quatrième ligand de cet ion métallique. Le clivage protéolytique du pro-domaine, libérant ainsi l'atome de zinc du résidu cystéine, entraîne l'activation du site catalytique qui peut alors se lier à son substrat par pénétration d'une molécule d'H₂O. La plupart des MMPs ont un quatrième domaine en position carboxy-terminale. Cette chaîne polypeptidique est homologue de la vitronectine ou de l'hémopexine et intervient dans la reconnaissance du substrat des MMPs. Elle est rattachée au domaine catalytique par une région charnière riche en résidus proline (**Figure 28**).

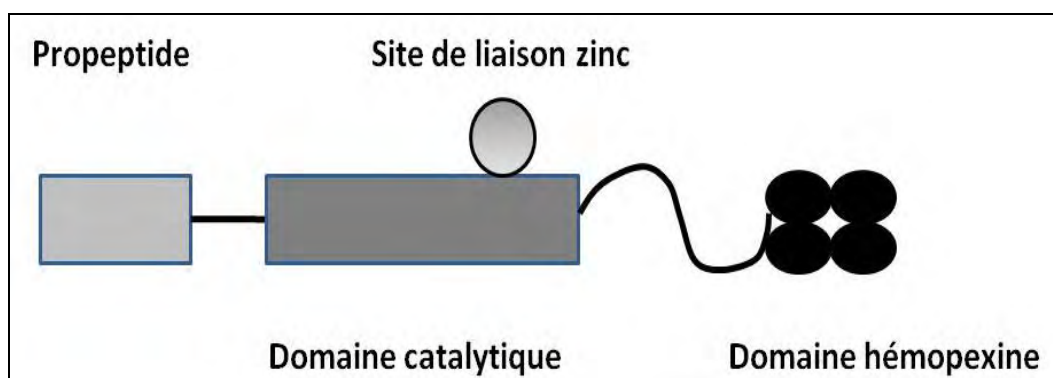


Figure 28. Les différents domaines fonctionnels des MMPs: un domaine propeptide clivé au moment de l'activation, un domaine catalytique comprenant le site actif catalytique, une région charnière liant le domaine catalytique aux domaines hémopexine et un domaine carboxy-terminal contenant des domaines homologues à l'hémopexine.

Les MMPs peuvent être classées en six groupes (**Tableau 4**) :

Groupes	Membres
Matrilysines	MMP-7 (matrilysine-1) et MMP-26 (matrilysine-2)
Collagénases interstitielles	MMP-1, MMP-8, MMP-13
Stromélysines	MMP-3 (stromélysine-1), MMP-10 (stromélysine-2) et la MMP-11 (stromélysine-3)
Gélatinases	MMP-2, MMP-9
Métalloprotéinases transmembranaires	MMP-14 , -15, -16, -17, -24, -25 aussi dénommées de MT1-MMP à MT6-MMP pour Membrane Type-MMP
Groupe hétérogène	MMP-12, MMP-18, MMP-19, MMP-20, MMP-21, MMP-22, MMP-23A/B, MMP-27, MMP -28

Tableau 4 : Les différents groupes de MMPs.

Cette étude s'est principalement intéressée à une des métalloprotéinases transmembranaires : la MMP-14 ou MT1-MMP. Cette MMP appartient à un groupe qui a la caractéristique essentielle de pouvoir se lier à la membrane cellulaire soit par l'intermédiaire d'un domaine transmembranaire, soit via une ancre Glycosylphosphatidylinositol [(GPI) (Sounni et al., 2011)]. Outre un rôle dans la dégradation directe de la MEC, ce groupe d'enzymes intervient dans l'activation protéolytique d'autres MMPs.

I.4.3.1. La MMP-14

La MMP-14 est constituée de sept domaines différents [(**Figure 29**), (Sato et al., 1994), (Seiki, 2003)] :

- un pré/propeptide (M1-R111)
- un domaine catalytique (Y112-G285) contenant un site consensus de liaison au Zn²⁺
- une région charnière (E286-I318)
- un domaine hémapexine (C319-C508)

- une portion « linker » (P509-S538)
- un domaine transmembranaire (A539-F562)
- et un domaine cytoplasmique en C-terminal (R563-V582).

Comme toutes les autres MMPs, la MMP-14 est exprimée sous forme de zymogène (proMMP-14). Elle contient un site de reconnaissance pour la furine (R108-R111) entre les domaines pro- et catalytique, et elle est clivée par des convertases de proprotéines telles que la furine dans les vésicules de sécrétion de l'appareil de Golgi [(Sato et al., 1996), (Yana and Weiss, 2000)]. La MMP-14 est ensuite acheminée vers la membrane plasmique sous une forme active de 55-60 kDa (Remacle et al., 2005). On retrouve également des formes membranaires de 44-45 kDa dans lesquelles le domaine catalytique a été enlevé, résultat d'un auto-clivage ou d'une protéolyse par la MMP-2 [(Figure 29), (Lehti et al., 1998), (Stanton et al., 1998), (Toth et al., 2002)].

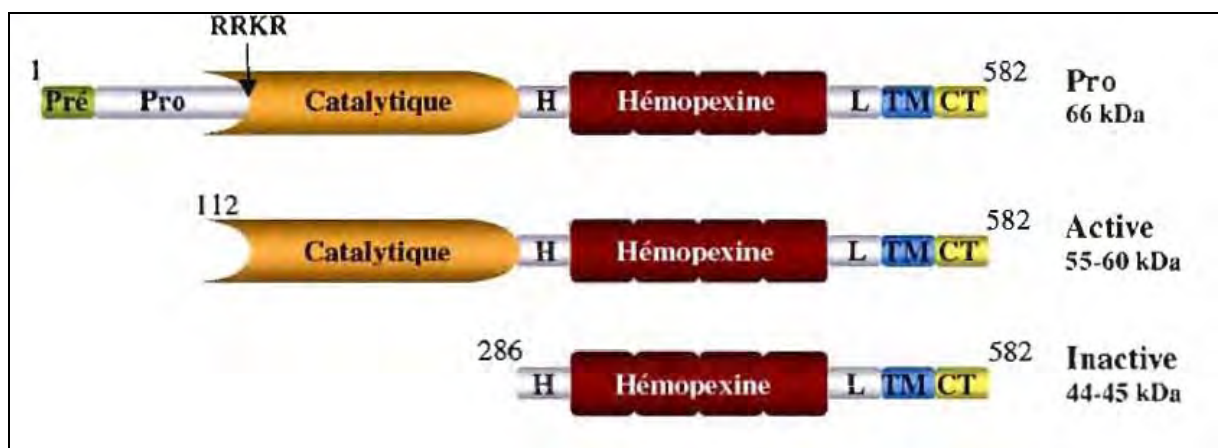


Figure 29. Domaines structuraux de la MMP-14. Pré/Pro: Pré/Propeptide ; domaine catalytique ; H : domaine charnière (hinge) ; domaine hémapexine ; L : domaine «linker» ; TM : domaine transmembranaire ; CT : domaine cytoplasmique. RRKR : site de reconnaissance de la furine. D'après (Sternlicht D and Werb Z, 2001).

La disponibilité de la MMP-14 à la surface cellulaire est finement contrôlée par l'endocytose, un processus complexe servant à rediriger les protéines membranaires d'une part, vers les lysosomes afin qu'elles y soient dégradées ; d'autre part, vers les vésicules de sécrétion afin qu'elles soient recyclées à la membrane plasmique (Conner and Schmid, 2003). La MMP-14 est internalisée via deux voies distinctes d'endocytose : l'une impliquant des vésicules recouvertes de clathrine et l'autre se produisant via les cavéoles. La portion cytoplasmique de la MMP-14 est très importante pour son internalisation. Des formes de

l'enzyme dont la portion cytoplasmique a été tronquée restent localisées à la surface cellulaire alors que la forme sauvage de l'enzyme est rapidement internalisée [(Jiang et al., 2001), (Uekita et al., 2001)]. L'endocytose de la MMP-14 via les vésicules tapissées de clathrine nécessite la présence du motif L571LY dans la portion cytoplasmique de l'enzyme (Lehti et al., 2000). De plus, il a été démontré que ce motif composé de leucine et de tyrosine interagit avec la sous-unité $\alpha 2$ de l'AP-2, un composant des vésicules tapissées de clathrine. Bien qu'il ait été démontré que la MMP-14 puisse également être internalisée via les cavéoles (Galvez et al., 2004), les mécanismes impliqués dans ce processus restent encore peu élucidés. Le recyclage de la MMP-14 à la surface de la cellule joue un rôle important dans la migration cellulaire. Il a été démontré que la MMP-14 est recyclée aux fronts de migration des cellules afin de contribuer à la protéolyse péricellulaire en direction du sens de la migration (Remacle et al., 2003).

Durant les dernières années, de nombreux substrats de la MMP-14 ont été découverts (Tableau 5).

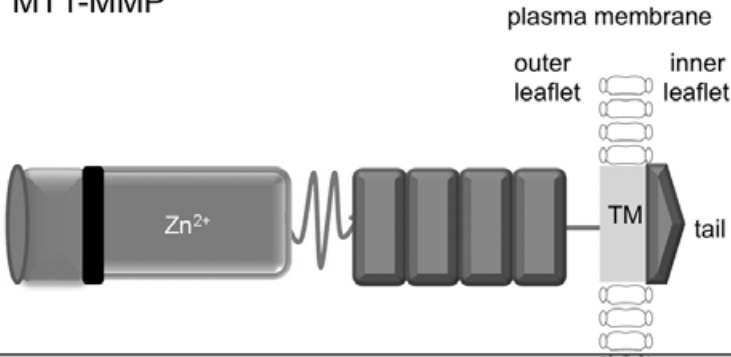
Structure	Substrates
<p>MT1-MMP</p>  <p>The diagram illustrates the structure of MT1-MMP. It features a catalytic domain containing a Zn²⁺ ion, followed by a propeptide region. The enzyme is anchored to the plasma membrane via a transmembrane domain (TM) that spans both the outer and inner leaflets. A tail region extends from the inner leaflet into the cytoplasm.</p>	<p><u>ECM molecules:</u> Pro-MMP2, collagen I, II, III, fibronectin, laminin-5, lumican, fibrin</p> <p><u>Non ECM molecules (non exhaustive list):</u> CD44, LRP, proTGFβ, pro-TNFα, syndecan-1, βglycan, integrin αv subunit, ICAM-1, tissue Transglutaminase (tTG), death receptor-6, IL8, CTGF, CXCL12 (SDF1), MCP3, RANKL</p>

Tableau 5 : Liste (non exhaustive) des substrats rapportés de la MMP-14. D'après (Soumi et al., 2011).

La MMP-14 agit en tant que collagénase interstitielle. Elle est capable de cliver *in vitro* les collagènes interstitiels de type I, II et III [(d'Ortho et al., 1997), (Ohuchi et al., 1997)]

La MMP-14 est également capable de cliver les glycoprotéines d'adhésion et les protéoglycannes. Parmi les glycoprotéines, on retrouve la fibronectine, la laminine 1, la

vitronectine, la tenascine C, le nidogène [(d'Ortho et al., 1997), (Ohuchi et al., 1997)], la fibrine et le fibrinogène [(Hiller et al., 2000), (Hotary et al., 2002)]. La gélatine, la caséine et l'élastine sont aussi des substrats de la MMP-14 (Imai et al., 1996). Elle clive également des protéoglycannes telles que l'aggrecan, le perlecan (d'Ortho et al., 1997) et le lumican (Li et al., 2004).

La MMP-14 est impliquée dans l'activation d'enzymes latentes comme la proMMP-2 (Sato et al., 1994), la proMMP-8 (Holopainen et al., 2003) et la proMMP-13 (Knauper et al., 2002), des enzymes qui participent également à la dégradation des collagènes interstitiels.

La MMP-14 n'est pas capable de cliver le collagène de type IV (Ohuchi et al., 1997). Toutefois, l'activation de la proMMP-2 par la MMP-14 élargit l'éventail de substrats de la MMP-14. L'activation de la proMMP-2 par la MMP-14 est un processus extrêmement complexe qui requiert au moins deux molécules de MMP-14, formant ainsi un homodimère via le domaine hémapexine de l'enzyme [(Itoh et al., 2001), (Lehti et al., 2002)]. L'une de ces molécules est inhibée par TIMP-2, en formant un complexe avec l'enzyme, via la liaison du domaine N-terminal de TIMP-2 au site actif dans le domaine catalytique de la MMP-14 (Oh et al., 2001). Le domaine C terminal libre de TIMP-2, ayant une affinité pour le domaine hémapexine de la proMMP-2, se lie à cette dernière, résultant ainsi en la formation d'un hétéro-tétramère à la surface cellulaire [(MMP-14)₂-TIMP-2-proMMP-2]. La seconde molécule MMP-14, qui elle n'est pas liée à TIMP-2, active alors la proMMP-2 à l'intérieur de ce complexe.

Les mécanismes d'activation de la proMMP-13 par la MMP-14 ne sont pas encore élucidés. Toutefois, elle ne requiert pas le concours de TIMP-2, mais implique le domaine hémapexine de la proMMP-13, suggérant ainsi le recrutement de la proMMP-13 à la surface cellulaire par une molécule réceptrice via son domaine hémapexine (Knauper et al., 2002).

Plusieurs cytokines sont également des substrats de la MMP-14, suggérant que l'enzyme joue un rôle dans l'inflammation et la réponse immunitaire. Parmi ces cytokines, figure le facteur dérivé des cellules stromales SDF-1 (McQuibban et al., 2001) et la protéine chimioattractante des monocytes MCP-3 (McQuibban et al., 2002). De même, une étude protéomique a montré que la MMP-14 pouvait cliver l'interleukine 8 et le TNF- α [(facteur de nécrose tissulaire alpha), (Tam et al., 2004)].

La MMP-14 est directement impliquée dans l'activation de certains précurseurs des intégrines, entre autres la sous unité pro- $\alpha 5$ (Baciu et al., 2003), ainsi que dans le clivage des cadhérines E et N (Covington et al., 2006). Des études ont démontré également que le clivage de CD44, le récepteur de l'hyaluronane par la MMP-14 augmente la motilité cellulaire (Kajita et al., 2001).

Les inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases (TIMP-1, -2, -3 et -4) sont des inhibiteurs endogènes des MMPs et inhibent leur activité enzymatique en se liant à leur site catalytique (Brew et al., 2000). Alors que l'activité enzymatique de la MMP-14 est inhibée par les inhibiteurs TIMP-2, -3 et -4, elle ne l'est pas par TIMP-1 [(Lohi et al., 2000), (Bigg et al., 2001)] Une attention particulière doit être accordée à TIMP-2, car non seulement il inhibe l'activité protéolytique de la MMP-14, mais intervient également dans l'activation de la proMMP-2 par la MMP-14 en interagissant avec cette dernière [(Butler et al., 1998); (Strongin et al., 1995)].

I.5. Les protéoglycannes : importance dans la structure et la fonction de la cornée

En plus des collagènes FACIT, d'autres molécules telles que les protéoglycannes riches en Leucine jouent un rôle important dans la modification structurale et fonctionnelle des fibres de collagène (Michelacci, 2003). Les protéoglycannes sont des macromolécules composées d'un corps protéique lié de manière covalente à une ou plusieurs chaîne(s) de glycosaminoglycannes (GAG) (Hassell et al., 1986).

Il existe 3 types de chaînes de GAG :

- Chondroïtin/dermatan sulfate (CS/DS),
- Kérotane sulfate (KS)
- Héparane sulfate (HS)

I.5.1. Les protéoglycannes cornéens

Parmi la diversité des protéoglycannes, quatre riches en Leucine, sont présents en majorité au niveau du stroma cornéen adulte : un dermatane sulfate [Décorine, (Li et al., 1992)] et trois kératane sulfates : lumican [(Blochberger et al., 1992), (Kao et al., 2006)], keratocan [(Corpuz et al., 1996), (Chakravarti, 2006)] et mimecan (Funderburgh et al., 1997), un produit de gène qui a été précédemment nommé Proteoglycan-LB (Shinomura and Kimata, 1992) et ostéoglycine [(Madisen et al., 1990), (Hassell and Birk, 2010), (Figure 30)].

Les protéoglycannes à héparane sulfate sont également des composants mineurs de la cornée et sont synthétisés essentiellement par les cellules épithéliales (Michelacci, 2003).

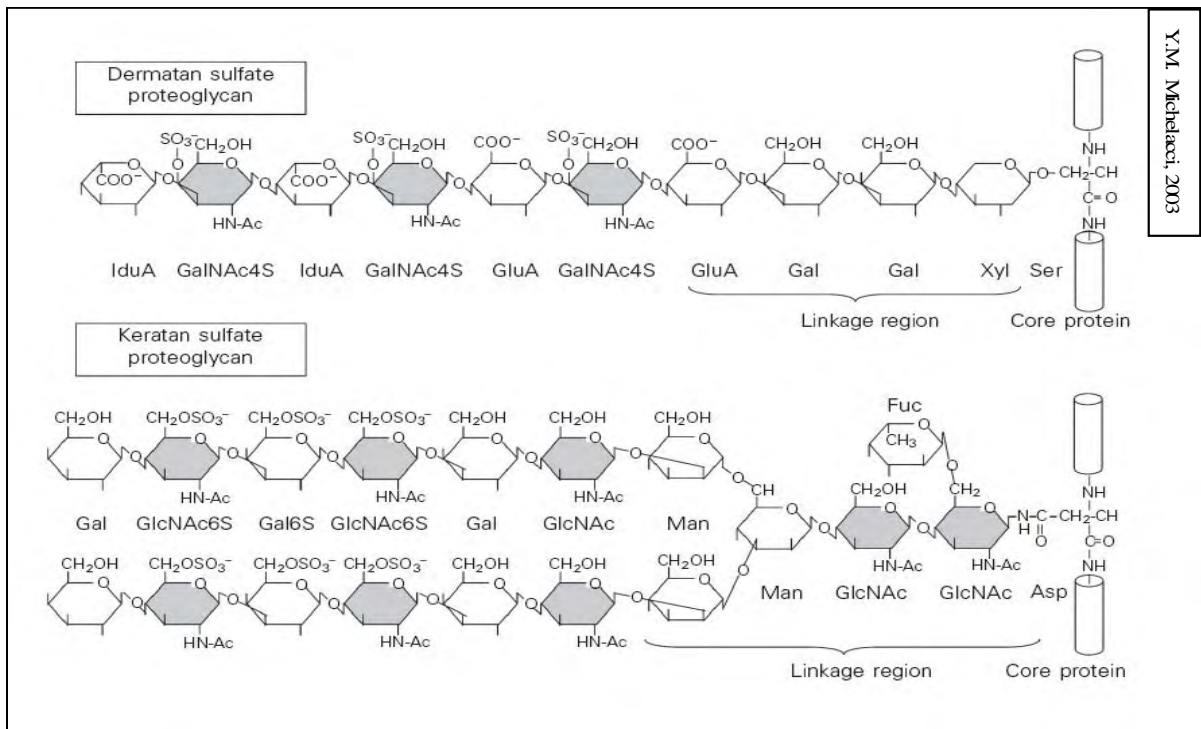


Figure 30: Structure des glycosaminoglycannes de la matrice du stroma cornéen. Elle montre la région de liaison polysaccharide-protéine et les principales unités polysaccharidiques. Gal, galactose; Fuc, fucose; Man, mannose; Xyl, xylose; GluA, acide β -D-glucuronique; IduA, acide α -L-iduronic; GalNAc, N-acetylgalactosamine; GalNAc4S, N-acetylgalactosamine 4-sulfate; GlcNAc, N-acetylglucosamine; GlcNAc6S, N-acetylglucosamine 6-sulfate; Asp, asparagine; Ser, serine.

I.5.2. Rôle des protéoglycannes dans la structure et la fonction de la cornée

Le lumican et la décorine donnent des produits recombinants qui interagissent sur les différentes régions de la molécule de collagène et stabilisent la fibre collagénique une fois formée (Neame et al., 2000). Le rôle crucial du lumican et de la décorine dans la régulation de la croissance et de l'assemblage des fibres de collagène du stroma cornéen a été confirmé par l'inactivation de ces gènes chez la souris [(Figure 31), (Hassell and Birk, 2010)]. Les animaux homozygotes pour une mutation nulle dans le lumican présentent une laxité accompagnée d'une fragilité de la peau et d'une opacité cornéenne bilatérale [(Chakravarti et al., 1998), (Michelacci, 2003)]. La déficience en mimecan provoque également chez les souris un épaissement des fibres de collagène cornéennes (Tasheva et al., 2002).

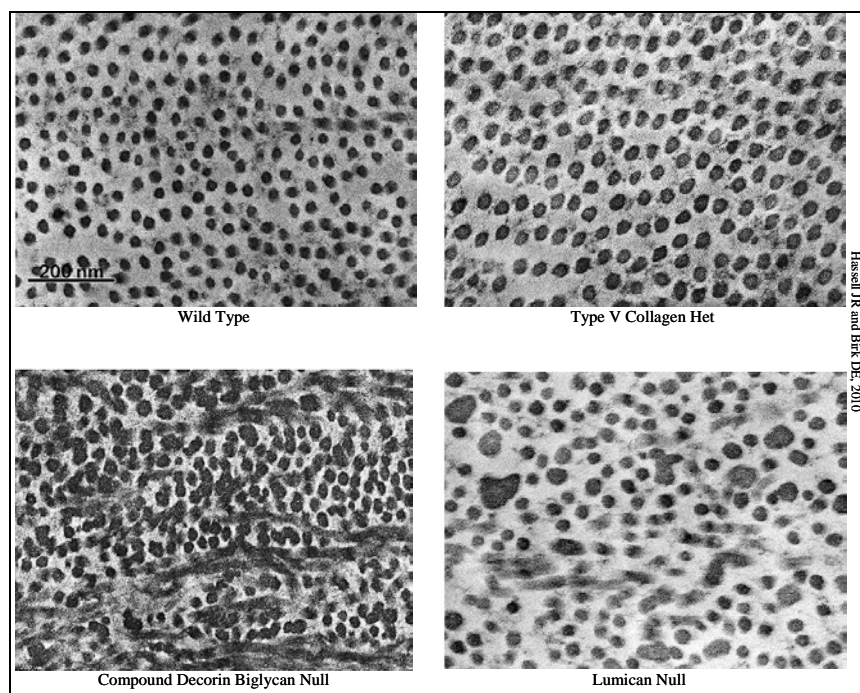


Figure 31: Structure des fibres stromales. La cornée des souris wild type a des fibres de collagène avec un petit diamètre et un assemblage régulier en harmonie avec la transparence cornéenne. La réduction dans la concentration du collagène de type V de moitié chez les souris hétérozygotes Col5a1 conduit à une augmentation du diamètre des fibres de collagènes dans ce modèle murin. Une délétion ciblée de la décorine et un blocage de sa compensation fonctionnelle par le biglycan (compound Decorin/Biglycan Null) chez la souris résulte en une perturbation sévère dans la régulation de l'assemblage fibrillaire. Une délétion ciblée du lumican altère la régulation de l'assemblage fibrillaire essentiellement dans le stroma postérieur (Hassell and Birk, 2010).

Chez l'homme, une dystrophie congénitale du stroma cornéen, où des opacités cornéennes se développent peu de temps après la naissance, est associée à une mutation dans le gène de la decorin [(Bredrup et al., 2005), (Rodahl et al., 2006)]. De plus, toujours chez l'homme, il existe aussi deux dystrophies cornéennes héréditaires causées par une production défectueuse de protéoglycannes de type kératane sulfate : la « cornea plana » [(anomalie congénitale, bilatérale et asymétrique, se caractérisant par une diminution du rayon de courbure de la cornée (Parc et al., 1998) qui conduit à une diminution de la réfraction (Pellegata et al., 2000) à cause d'une mutation dans le gène *KERA* qui code pour le corps protéique du keratocan] et une dystrophie cornéenne maculaire provoquée par des mutations sur le gène qui code pour une des sulfotransférases responsable du transfert des esters sulfatés sur le kératane sulfate [(Hassell et al., 1980), (Midura et al., 1990), (Hayashida et al., 2006), (Musselmann and Hassell, 2006)].

Le dermatane sulfate participe au contrôle de l'espace interfibrillaire et aux propriétés d'adhésions lamellaires des collagènes cornéens tandis que les kératanes sulfates sont impliqués dans la régulation du diamètre des fibres de collagène (Michelacci, 2003).

I.6. Synthèse des interactions supramoléculaires qui sont à l'origine de la formation de la fibre de collagène

Les différentes fibrilles de collagène fibrillaire nouvellement synthétisées peuvent ainsi s'associer entre elles et à d'autres protéines comme les collagènes FACIT et les protéoglycannes pour former une entité supramoléculaire appelée fibre de collagène (**Figure 32**). C'est ainsi que plusieurs types de collagène peuvent être représentés au sein d'une même fibre. La proportion des différents types de collagène au sein de la fibre est à l'origine de la spécificité de ses propriétés (bio)mécaniques (Kielty CM and Grant ME, 2002). La formation de la fibre de collagène n'est cependant pas issue d'une simple condensation des fibrilles. En effet, le processus d'agencement des fibrilles est relativement complexe. Par exemple, le diamètre de la fibre est finement contrôlé comme décrit plus haut par des protéoglycannes comme la décorine, qui entourent les fibrilles de collagène pour les associer ensuite aux autres molécules du tissu conjonctif. Le mécanisme n'est pas

totallement éclairci, car quelques aspects de la genèse de la fibre sont encore à définir, comme le mécanisme d'arrangement des fibrilles de différents types de collagène les unes par rapport aux autres, ainsi que le contrôle de leurs proportions respectives.

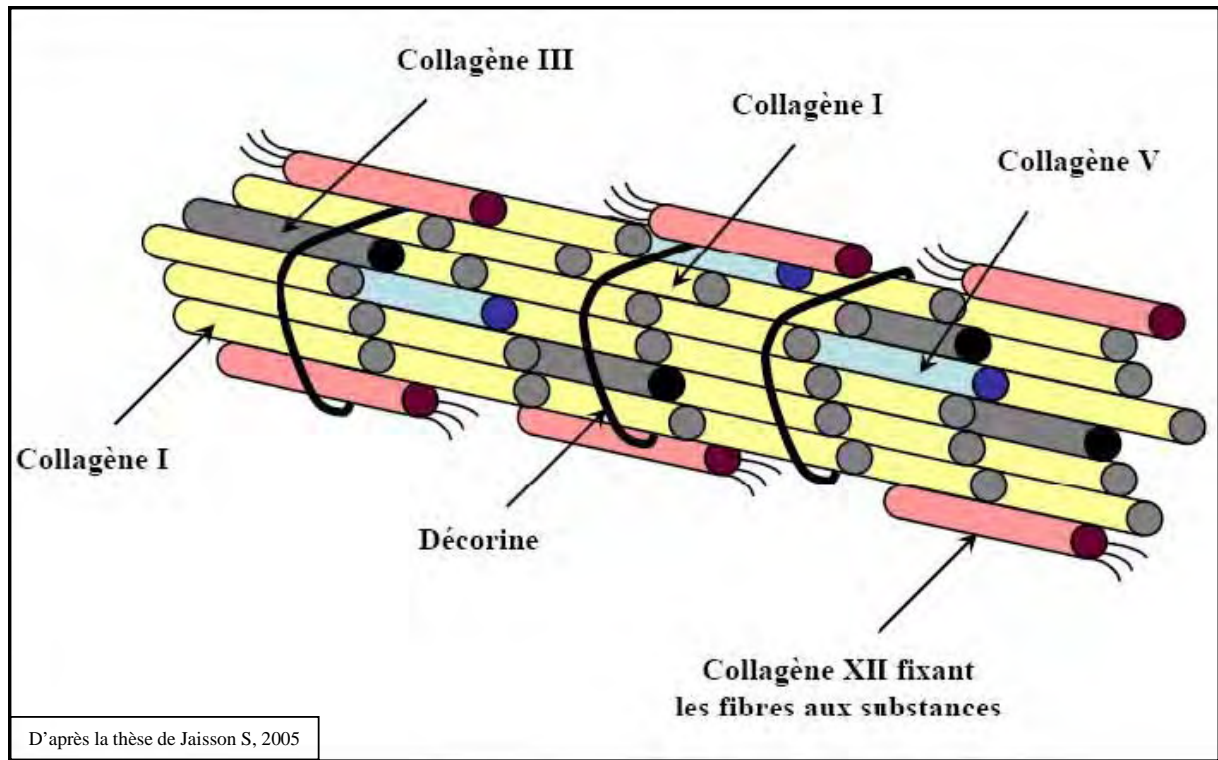


Figure 32 : Schéma d'une fibre de collagène [Reproduit d'après (BOREL JP et al., 1997)]. Une fibre de collagène est la résultante de l'association de fibrilles de divers types de collagène, étroitement liées à des protéoglycannes qui interviennent directement dans la régulation du diamètre de la fibre. La proportion des différents constituants matriciels représentés au sein de la fibre lui confère ses propriétés mécaniques spécifiques (D'après la thèse de Jaisson S, 2005).

En somme, la synthèse coordonnée de plusieurs différents types de collagène et de corps protéiques de plusieurs différents protéoglycannes riches en leucine autant que des modifications post-traductionnelles des collagènes et des protéoglycannes sont requises pour produire des fibres de collagène avec le diamètre et l'espacement nécessaires pour la transparence du stroma cornéen (Hassell and Birk, 2010).

I.7. La cicatrisation

La cicatrisation est un phénomène biologique qui intervient après une blessure pour réparer le(s) tissu(s) endommagé(s). Il s'agit d'un mécanisme qui fait intervenir un ensemble de phénomènes à la fois cellulaires et moléculaires permettant à l'organisme de colmater rapidement ses brèches dans un premier temps puis de les réparer de façon définitive dans un second lieu. Toute lésion tissulaire, qu'elle soit d'origine mécanique, chimique, thermique ou immunologique provoque une cascade de réponses qui conduit à la formation d'un tissu de réparation et à la cicatrisation de la blessure. Cette cicatrisation nécessite l'intégration de nombreux processus dynamiques impliquant à la fois la MEC du tissu lésé, des médiateurs solubles ainsi que des cellules sanguines et mésenchymateuses.

Actuellement la cicatrisation est divisée en trois grandes phases s'inspirant de la cicatrisation cutanée : phase inflammatoire, phase de formation du tissu caractérisée par une prolifération cellulaire importante et une phase de cicatrisation proprement dite définie par un remodelage matriciel important. Il existe cependant un chevauchement de ces différentes phases qui rend donc cette division un peu « arbitraire ».

I.7.1. Différence entre la cicatrisation cornéenne et la cicatrisation cutanée

Peau et cornée sont composées d'un stroma comportant des fibres de collagène et qui est surmonté d'un épithélium pluristratifié. Cependant, contrairement à la peau, le stroma cornéen comporte un agencement très particulier des fibres de collagène, à l'origine de la transparence cornéenne. Ceci explique probablement son remodelage homéostatique très lent par rapport à celui du derme ou d'autres tissus collagéniques de l'organisme. Une autre différence fondamentale entre ces deux structures réside sur le turn-over très lent du collagène du stroma cornéen et sur le renouvellement également à un rythme très lent des kératocytes « quiescents » (Davison and Galbavy, 1986). De plus, la cornée est résistante à certaines agressions qui entraîneraient une réponse fibrotique dans d'autres tissus, notamment la peau.

I.7.2. La cicatrisation cornéenne

Les phénomènes de cicatrisation normale mis en jeu lors d'une blessure au niveau de la cornée diffèrent, comme remarqué précédemment, de ceux rencontrés au niveau de la peau. En effet, la cicatrisation peut être spécifique selon le tissu concerné. Au niveau de la peau par exemple, l'étape intervenant après la phase inflammatoire met en jeu une prolifération cellulaire importante qui aboutit à la formation d'un bourgeon charnu hypervascularisé. Dans le cas de la cornée en revanche, tissu transparent et avasculaire, la cicatrisation normale intervenant après une lésion se déroule sans formation de nouveaux vaisseaux afin de maintenir la transparence cornéenne nécessaire pour la fonction visuelle.

Voici une approche simplifiée de la réponse cornéenne à une agression, décrite par Dupps WJ et Wilson SE en 2006 ([Dupps and Wilson, 2006](#)). Ces auteurs ont représenté sous forme d'une cascade linéaire (**Figure 33**) les différentes étapes de la cicatrisation cornéenne sachant qu'il existe des interactions complexes qui peuvent avoir lieu en même temps et qui sont influencées par de nombreux autres facteurs auxquels ces derniers ne font pas référence. En effet, leur approche met l'accent d'une part sur l'importance des interactions entre les cellules stromales, épithéliales et immunitaires, qui sont médiées par des cytokines, des facteurs de croissance, des chémokines et leurs récepteurs ([Wilson et al., 1999](#)) et d'autre part sur le rôle central de l'apoptose des kératocytes dans l'activation de la cascade de cicatrisation. A noter que l'innervation cornéenne, les glandes et le film lacrymaux sont également des éléments importants de la réponse cicatricielle cornéenne.

Le processus de cicatrisation cornéenne débute par une lésion, de nature mécanique, chimique, thermique ou encore immunologique, qui conduit à un contact épithélio-stromal suite à une rupture de la lame basale. Cette agression est suivie par une libération de cytokines (IL-1, TNF α , BMP2 et 4, EGF et PDGF) provenant de l'épithélium lésé et de la lame basale. Ces facteurs ainsi que de nombreux autres provenant des larmes, déclenchent une variété de réponses au niveau des kératocytes stromaux sous-jacents, incluant la synthèse de Fas ligand médiée par l'IL-1. Ce Fas-ligand une fois synthétisé va se fixer sur le récepteur Fas exprimé par la même cellule et par les kératocytes voisins et induire l'apoptose.

Après la première vague d'apoptose kératocytaire, le nombre de cellules qui subit le processus inflammatoire de nécrose augmente ([Wilson et al., 2001](#)). La prolifération et la migration des kératocytes restants débutent entre 12 et 24h après l'agression, donnant

naissance à des kératocytes activés, des fibroblastes et peut être à des myofibroblastes responsables de la repopulation de la zone stromale lésée (Fini, 1999). Dans les 24h après la blessure, des cytokines proinflammatoires (Figure 33) provenant de l'épithélium ou des kératocytes répondant à l'Il-1 et au TNF α déclenchent une infiltration stromale de monocytes/macrophages, de cellules T et de cellules polynucléaires.

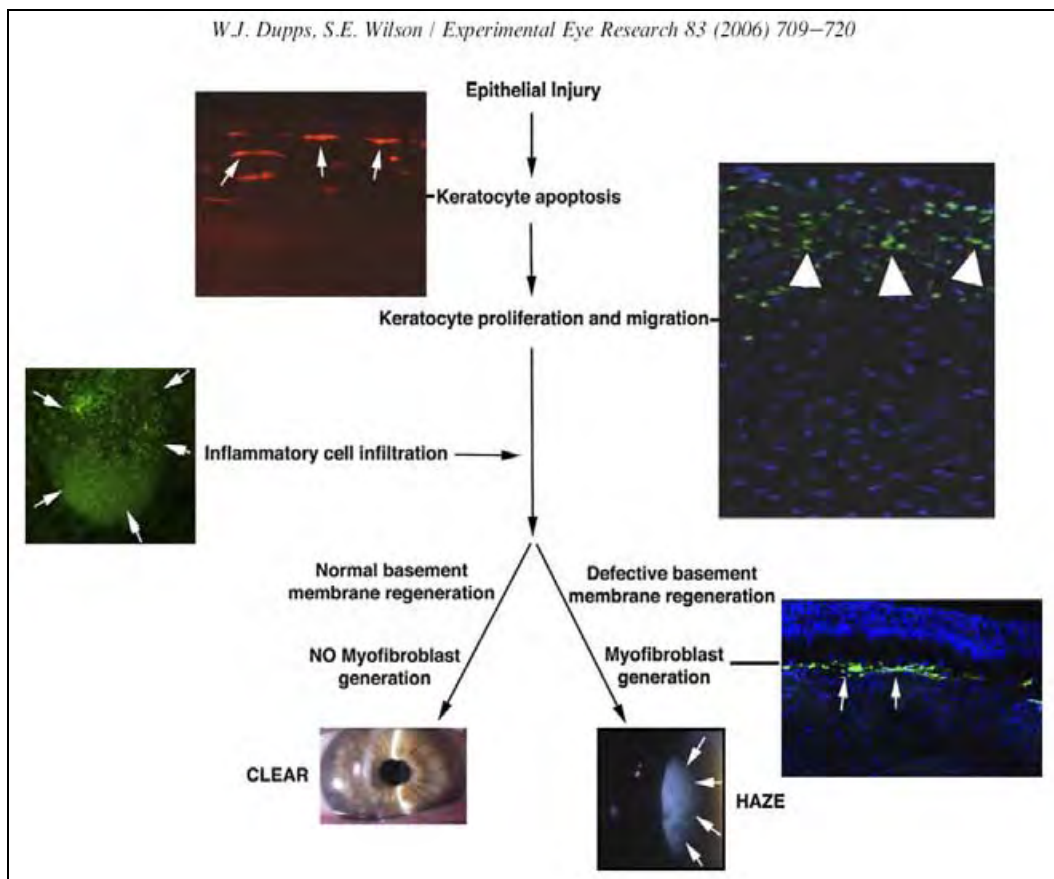


Figure 33 : Schéma simplifié de la cascade de cicatrisation cornéenne. Réponse cicatricielle représentée sous forme d'une cascade sachant que plusieurs des événements cités ici ont lieu simultanément ou se chevauchent. La blessure épithéliale est dans la plupart des cas l'élément déclencheur de la cascade de la réponse cicatricielle. Cette cascade peut aboutir soit à une restauration de la transparence cornéenne, soit à une installation d'une opacité lorsque surgissent des complications telles qu'une irrégularité de la surface cornéenne ou encore des anomalies de la lame basale qui favorisent l'apparition de myofibroblastes (Dupps and Wilson, 2006).

Ces cellules qui arrivent via le limbe et le film lacrymal (Helena et al., 1998) jouent un rôle important dans la phagocytose des débris issus de l'apoptose et de la nécrose.

Une à deux semaines après la blessure, des cellules α -SMA (α Smooth muscle Actin) positives peuvent être détectées dans le stroma antérieur directement en dessous de la zone où a eu lieu une destruction de la lame basale. Ces cellules, nommées myofibroblastes, sont des composants cruciaux de la cascade de cicatrisation. Supposés dériver des kératocytes sous l'action du TGF β (Transforming Growth Factor β), les myofibroblastes sont remarquables pour la contraction de leurs pseudopodes (la cible du marquage anti- α -SMA). Ils induisent également une réduction de la transparence due à l'altération de la production de cristallines (Jester et al., 1999) et jouent un rôle vaste dans le remodelage collagénique et matriciel à travers une production importante de collagènes, de glycosaminoglycannes et de MMPs. Les myofibroblastes sont des effecteurs très importants dans la formation d'un « haze » cornéen ainsi qu'à sa régression due à un remodelage stromal.

La balance délicate entre la régénération stromale et la fibrose dépend en grande partie de l'activité des myofibroblastes, et la restauration « rapide » de la lame basale semble favoriser le phénotype non fibrotique [(Stramer et al., 2003), (Netto et al., 2006)]. Après une rupture de la lame basale, l'EGF facilite la déposition d'un échafaudage de fibronectine au sommet duquel la réparation épithéliale peut procéder (Suzuki et al., 2003). Les myofibroblastes disparaissent en général, lentement durant les semaines qui suivent. Ce processus peut cependant continuer pendant des mois voir même des années [(Helena et al., 1998), (Netto et al., 2006)].

Hassell JR et Birk DE en 2010, ont quant à eux opté pour une approche plus « matricielle » pour expliquer le processus cicatriciel cornéen. En effet, ces auteurs ont décrit les modifications observées au niveau de la MEC du stroma cornéen ainsi que les changements phénotypiques des kératocytes qui surgissent après une agression de la cornée (Hassell and Birk, 2010). D'après ces auteurs, lorsqu'une agression touche l'épithélium et le stroma cornéens, les kératocytes de la zone lésée entrent en apoptose [(Helena et al., 1998), (Zieske et al., 2001)]. Les cellules épithéliales adjacentes du site de la blessure perdent leurs hémidesmosomes qui les rattachaient à la lame basale et migrent vers la partie du stroma qui est lésée. Certains des kératocytes du stroma encore vivants s'activent et prolifèrent [(Hanna et al., 1989), (Del Pero et al., 1990), (Zieske et al., 2001)]. Cependant, comme leur production en MEC est relativement pauvre, il en résulte des régions d'hypercellularité entre la récente migration épithéliale et le stroma [(Figure 34), (Lee et al., 1982), (Lance et al., 1988), (Sundarraaj et al., 1998)].

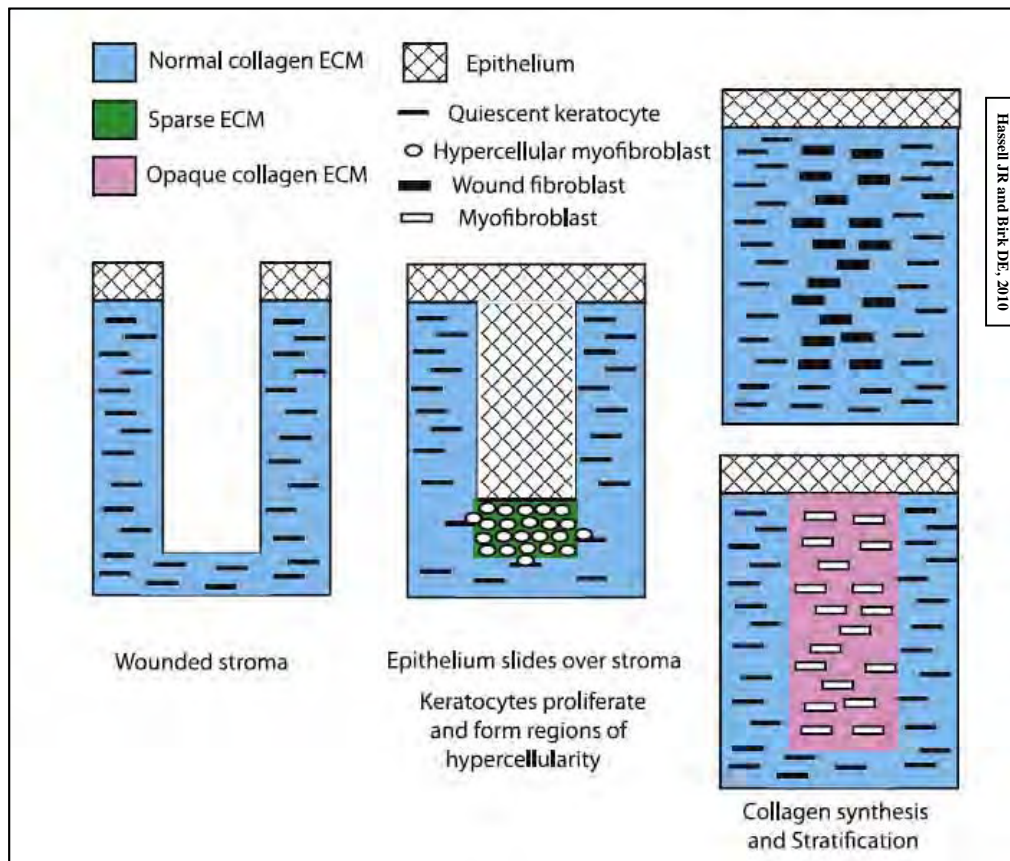


Figure 34: Cicatrisation d'une plaie du stroma cornéen induite par incision. Les cellules épithéliales cornéennes perdent leurs hémidesmosomes qui les attachaient à la lame basale et migrent au-dessus du foyer de la blessure. Les kératocytes quiescents sont activés pour proliférer et produire de l' α -SMA mais synthétisent peu de MEC. Les « hypercellular myofibroblasts » résultants s'accumulent dans les régions sous épithéliales. Ces « hypercellular myofibroblasts » deviennent alors soit des « wound fibroblasts » qui produisent des fibres de collagène normales contenues dans la MEC qui restaure la transparence, soit deviennent des myofibroblastes qui produisent des fibres de collagène désorganisées dans une MEC qui est opaque (Hassell and Birk, 2010).

La faible quantité de MEC produite par ces cellules contient cependant du keratocan et du lumican (Sundarraj et al., 1998). Le cytoplasme des « hypercellular cells » contient de l' α -SMA (Jester et al., 1995), protéine impliquée dans la contraction de la plaie et considérée comme un marqueur de myofibroblastes. Ceci laisse penser que les « hypercellular cells » observées précocement durant la cicatrisation, sont des « hypercellular myofibroblasts » (Tableau 1), une forme de myofibroblaste qui produit une faible quantité de MEC.

Les « hypercellular myofibroblasts » peuvent alors devenir des myofibroblastes (Tableau 1), lesquels contiennent toujours de l' α -SMA (Jester et al., 1995) et produisent de

grandes quantités de collagène, d'hyaluronane et de biglycan avec de faibles quantités de protéoglycane de type kératane sulfate pour former une MEC désorganisée et opaque. Ces « hypercellular myofibroblasts » peuvent également, alternativement, devenir des « wound fibroblasts » (**Tableau 1**) lesquels, comme les kératocytes dans le développement cornéen, produisent en grande quantité autant de collagène que de keratocan et de lumican avec des chaînes de kératane sulfate pour former la MEC normale hautement organisée qui restaure la transparence [(Cintron and Kublin, 1977), (Cintron et al., 1978), (Hassell et al., 1983), (Maguen et al., 1997), (Funderburgh et al., 1998), (Ljubimov et al., 1998), (Sundarraaj et al., 1998), (Dawson et al., 2005)]. Depuis que les « wound fibroblasts » et les myofibroblastes produisent du collagène et le stratifient, le collagène apparaît comme étant un composant nécessaire pour la stratification. La transparence peut être aussi restaurée dans la MEC opaque et désorganisée produite par les myofibroblastes par un « turnover » et par la production d'une MEC organisée [(Cintron et al., 1978), (Hassell et al., 1983)]. Dans ce cas, les myofibroblastes pourraient devenir ou être remplacés par des « wound fibroblasts ».

Ainsi, basée sur les niveaux de prolifération cellulaire et de production de MEC, la cicatrisation du stroma cornéen peut être divisée en une phase d'hypercellularité initiale, qui est marquée essentiellement par une prolifération cellulaire, suivie d'une phase de stratification qui consiste principalement en une synthèse de collagène et de protéoglycane. De plus, il semble exister trois phénotypes cellulaires de réparation au niveau du stroma cornéen : le « hypercellular myofibroblast », le « wound fibroblast » et le myofibroblaste (Hassell and Birk, 2010).

I.8. Problématique

Les deux approches décrites ci-dessus montrent que les processus de cicatrisation cornéenne visant à restaurer les caractéristiques structurales et fonctionnelles de l'organe peuvent être dans certains cas exacerbés et aboutir à des complications pathologiques de type fibrose pouvant aller jusqu'à la cécité. De telles complications résultent souvent (comme décrit précédemment) d'une dérégulation du remodelage tissulaire associée à la cicatrisation.

I.8.1. La cécité d'origine cornéenne : un problème de santé publique au niveau international

Les cécités causées par des pertes de transparence cornéenne d'origines diverses (traumatisme, infection cornéenne, désorganisation structurale des différentes couches cornéennes par hyperhydratation tissulaire ou par surcharge avec dépôts de substances dans le cadre des dystrophies) constituent des problèmes majeurs de société (**Figure 35**).



Figure 35: Opacité cornéenne post-infectieuse (Herpes).

Selon une étude réalisée en 2002 par l'OMS, les opacités cornéennes représentent la 3^{ème} cause (9 %) de cécité dans le monde après la cataracte (48%) et le glaucome (12%) [(Foster and Resnikoff, 2005), (**Figure 36**)]. L'OMS estime entre 1,5 et 2 millions de nouveaux cas de cécités unilatérales recensés dans le monde chaque année (Whitcher et al., 2001).

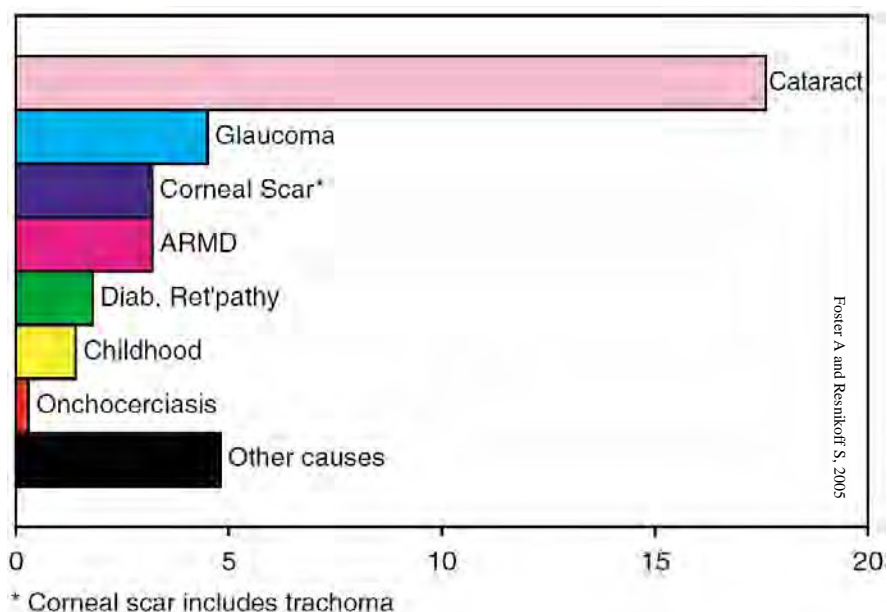


Figure 36: Les causes globales de cécité dans le monde. *Abbreviation:* ARMD=Age-related macular degeneration (Foster and Resnikoff, 2005).

A l'heure actuelle, aucun traitement définitif n'existe pour traiter les opacités cornéennes une fois installées. Un traitement par des collyres de corticoïde peut être mis en place selon l'état d'avancement et la gravité de l'atteinte de la cornée afin d'essayer de préserver sa transparence et/ou de ralentir la formation d'une opacité. Ce traitement peut être également prescrit en postopératoire dans le cadre de la prévention contre les rejets de greffe.

I.8.2. La greffe : seule solution alternative aux opacités cornéennes persistantes ?

La chirurgie par greffe de cornée constitue le seul traitement curatif (à long terme mais non définitif) des opacités cornéennes profondes actuellement disponible (**Figure 37**). Ce traitement se heurte cependant à certaines complications postopératoires ce qui fait que les techniques chirurgicales de greffes de cornées ne cessent d'évoluer afin d'améliorer leur performance.

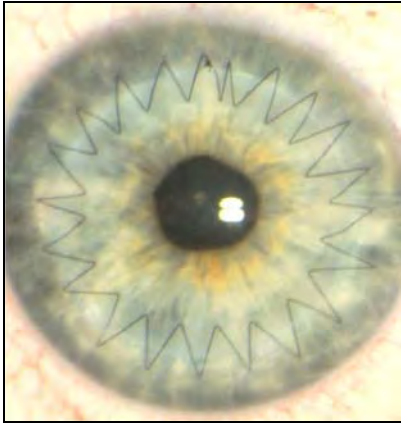


Figure 37. Une greffe de cornée permet de remplacer une cornée opacifiée par une cornée transparente d'un donneur.

I.8.2.1. La greffe de cornée transfixiante

Le principe de la greffe de cornée transfixiante consiste à enlever la cornée opaque du patient sur la totalité de son épaisseur et à la remplacer ensuite par une autre cornée (greffon) transparente provenant d'un donneur. Cette technique chirurgicale est bien codifiée avec des résultats anatomiques et fonctionnels satisfaisants ([Fournié and Malecaze, 2009](#)).

Il s'agit cependant d'un traitement imparfait avec un risque d'échec de greffe notamment par rejet immunologique (**Figure 38**) bien que ce risque ne soit pas très élevé en raison du diagnostic précoce et de la prise en charge « agressive » des épisodes de rejet. Chaque rejet entraîne en revanche une déperdition cellulaire endothéliale. Il existe également, même en l'absence de rejet, une déperdition cellulaire endothéliale accélérée évaluée à 4,2% par an contre 0,6% par an physiologiquement ([Fini et al., 1998](#)). De ce fait, la survie d'un greffon cornéen peut être compromise ([Coster and Williams, 2005](#)).

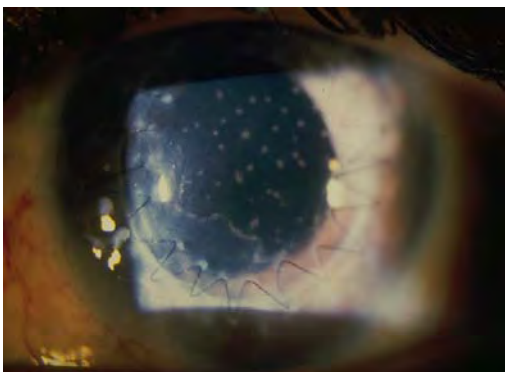


Figure 38. Rejet endothélial de greffe de cornée.

Ainsi du fait que la principale source de complications de la greffe de cornée transfixiante est l'endothélium, les nouvelles techniques de greffes cornéennes visent à préserver l'intégrité endothéliale du patient (si possible) en enlevant que la partie cornéenne « malade » afin d'éviter une déperdition endothéliale accélérée et limiter par conséquent les risques de rejet.

I.8.2.2. Les greffes de cornée lamellaires

L'objectif de la greffe de cornée lamellaire est, comme son nom l'indique, de ne remplacer qu'une lamelle de la cornée en fonction de la partie qui est atteinte, antérieure ou postérieure.

I.8.2.2.1. Les greffes de cornée lamellaires antérieures

Cette technique chirurgicale consiste à remplacer la partie antérieure de la cornée. En effet, ce type de greffe a pour but de préserver la partie saine de la cornée qui est dans ce cas l'endothélium principalement. La lamelle découpée peut être plus ou moins profonde selon l'ampleur de l'opacité stromale, qui à l'extrême ne laisse en place que les couches profondes endothélio-descémétiques de la cornée. On parle alors de kératoplastie lamellaire antérieure profonde (KLAP ou DALK pour deep anterior lamellar keratoplasty) (**Figure 39**). La totalité du stroma est dans ce cas remplacée et la dissection est manuelle. Cette méthode s'applique lors de greffes de cornée ayant une opacité ou une pathologie touchant l'ensemble du stroma cornéen comme dans le cas de kératocône.

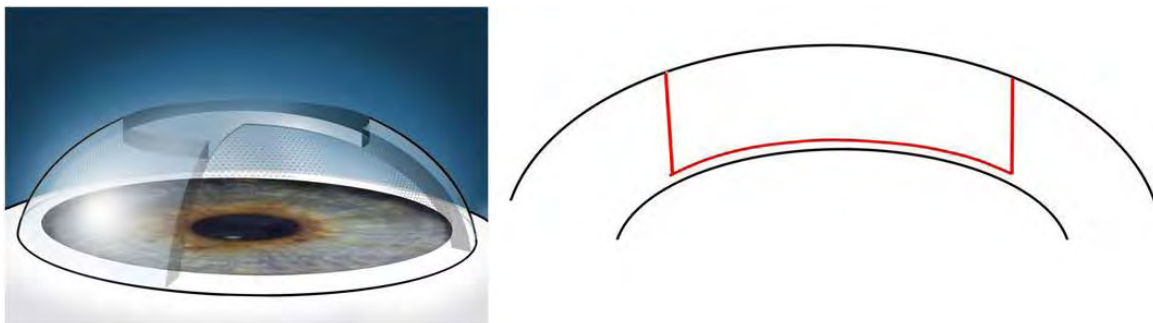


Figure 39. Dans la kératoplastie lamellaire antérieure profonde (KLAP), seules persistent les couches profondes de la cornée (membrane de Descemet et endothélium).

La découpe de la lamelle peut également être automatisée à l'aide d'un microkératome. On parle alors d'ALTK pour automated lamellar therapeutic keratoplasty (**Figure 40**). Avec cette méthode la découpe ne peut se faire au-delà de 400µm ce qui fait qu'elle s'adresse principalement à des opacités du stroma antérieur ou moyen. Cette technique s'applique dans des cas de greffes de cornée ayant une opacité ou une pathologie touchant principalement la partie antérieure du stroma cornéen : Dystrophies stromales antérieures, Abscès bactériens, certains cas d'infection à l'herpès...

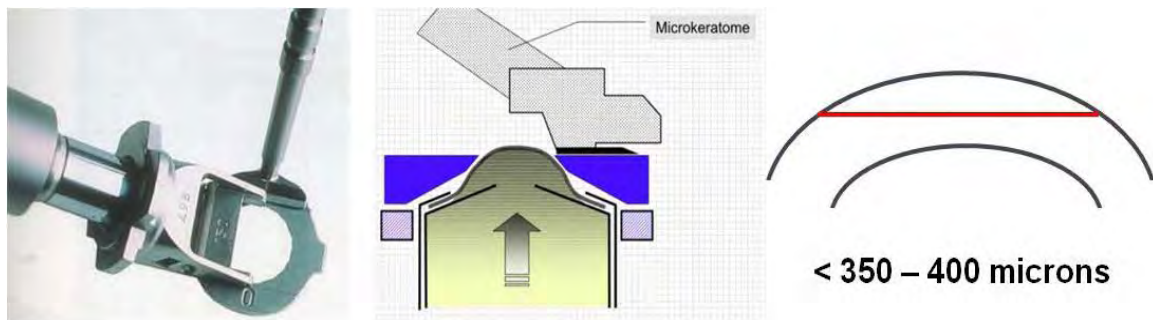


Figure 40. Dans l'ALTK, la découpe est automatisée à l'aide d'un microkératome qui permet de « couper » une tranche de cornée d'épaisseur « ajustable ».

1.8.2.2.2. Les greffes de cornée lamellaires postérieures

Ce type de greffe concerne la partie postérieure de la cornée à savoir l'endothélium. La greffe lamellaire endothéliale permet un remplacement sélectif de l'endothélium et de la membrane de Descemet pathologiques (**Figure 41**) et s'applique surtout à des cas de dystrophies endothélio-descémétiques et des décompensations endothéliales.

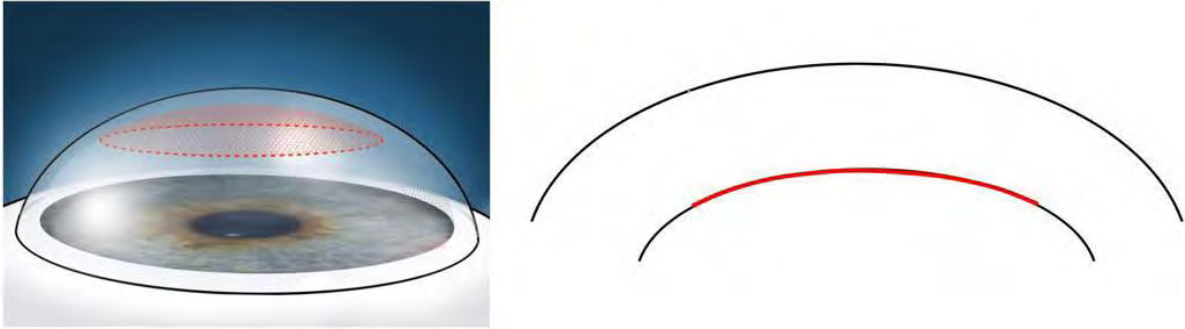


Figure 41. Le principal avantage de la greffe endothéliale cornéenne est le maintien de la cornée antérieure du patient. Les 2/3 de la puissance de convergence de l'œil sont dus à l'interface air-cornée. Le maintien de la surface antérieure de la cornée du patient permet de « conserver la réfraction » du patient avec pour conséquence une récupération visuelle rapide et l'absence de « surprise réfractive » parfois observée après une greffe transfixiante.

I.9. But

Les greffes de cornée constituent le seul traitement durable contre les opacités cornéennes persistantes. Cependant ce traitement est comme exposé plus haut, non définitif à cause de complications telles que les rejets. En plus de se heurter à des difficultés post-opératoires, le traitement des opacités par greffes de cornée se confronte également à des problèmes de disponibilités de greffons qui sont parfois liés à des comportements éthiques. Ainsi, une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires mis en jeu lors de la formation et du maintien d'une opacité cornéenne pourrait permettre l'émergence de nouvelles thérapies visant à prévenir efficacement la formation d'une opacité cornéenne après blessure ou à la résorber une fois installée. En effet le fait de s'affranchir des dons de greffons et de pouvoir traiter ces opacités par des molécules permettra de réduire les cécités dues à une perte de transparence cornéenne de façon très considérable.

De ce fait, ce travail de thèse a deux grandes finalités :

La première consiste en l'évaluation de l'efficacité thérapeutique de la modulation de l'activité de protéinases sur la dégradation du collagène de type III dans la mise en place et la persistance d'une opacité cornéenne après traumatisme.

Le second objectif a un aspect plus fondamental qui porte d'une part sur la caractérisation de l'expression des FACIT (collagène de type XII et de type XIV) au niveau de la cornée et d'autre part sur l'identification de leur rôle dans la formation et le maintien d'une opacité cornéenne, afin de déterminer si ces protéines peuvent représenter un intérêt thérapeutique.

MATERIELS ET METHODES

II.1. Expérimentation animale

II.1.1. Modèle animal

Les souris utilisées durant les expériences appartiennent à la lignée C57B/L6 et sont toutes des femelles âgées de plus de 4 mois. Elles sont fournies par Charles River Laboratories (Domaine des Oncins BP 0109, 69592 l'ARBRESLE, France) à l'âge de 8 semaines. Les actes chirurgicaux sont réalisés en accord avec les recommandations de l'ARVO (The Association for Research in Vision and Ophthalmology) pour l'utilisation d'animaux en recherche ophtalmologique et sont validés par le comité d'éthique du CPTP (Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan).

II.1.2. Les souris Knock Out pour Pcp1

Les souris Knock-Out (KO) pour Pcp1 utilisées au cours de cette étude sont la propriété du Pr Greenspan DS (Professor and Interim Chair, Department of Cell and Regenerative Biology, University of Wisconsin, Madison, Wisconsin 53706, USA). Les expériences ont été réalisées à Madison grâce à une collaboration entre notre équipe, celle de Greenspan DS et celle de David J. Hulmes (Institut de Biologie et Chimie des Protéines, CNRS UMR 5086, Lyon). Les actes chirurgicaux ont été effectués au niveau des yeux gauches des souris à l'âge de 18 semaines.

II.1.3. Choix du vecteur viral

Cette partie de l'étude est rendue possible grâce à une collaboration entre notre équipe et celle de Mme Fabienne Rolling (Inserm U649, Nantes). Le vecteur utilisé pour l'insertion de la MMP-14 est un Adeno-Associated Virus ou AAV de sérotype 2 ayant un promoteur fort de cytomégalovirus (ou CMV) et une queue polyA de Simian Virus 40 ou SV40 (**Figure 42**).

ITR AAV2	CMV promoter	Murine MMP14	SV40pA	ITR AAV2
----------	--------------	--------------	--------	----------

Figure 42 : Construction virale utilisée pour la surexpression de la MMP-14 au niveau de la cornée de souris.

Initialement, le choix du vecteur s'était porté sur un adénovirus afin d'avoir une quantité importante de matériel génique transférée. L'inflammation postopératoire par réaction immune contre les antigènes viraux a fait interrompre l'utilisation de ce vecteur. Par ailleurs, les essais avec les AAV ont montré une excellente tolérance cornéenne sans réaction inflammatoire. Le savoir-faire de Fabienne Rolling a permis d'avoir une construction virale stable avec la possibilité de titrer la quantité de virus utilisée et donc de matériel génique transféré. Ceci a permis de réaliser des travaux préliminaires de doses-réponses pour s'affranchir de complications d'abord observées après transduction comme une fonte cornéenne ou une néovascularisation.

II.1.4. Technique d'introduction du vecteur parvoviral au niveau de la cornée : Injection intra-stromale

Cette technique est utilisée pour l'injection du vecteur AAV contenant la MMP-14 dans le stroma cornéen en raison de 4×10^9 particules virales par injection. Ceci va permettre la transduction des fibroblastes par ce dernier. En pratique, une pré-incision cornéenne non perforante est d'abord réalisée à l'aide d'une lame microchirurgicale de type Beaver (BD sclerotome multi-sided blade 375700). Cet acte permet de « former un tunnel » à l'intérieur du stroma. Une aiguille de 33-gauge (type Hamilton, 1mm, biseau sur-mesure 30°) est ensuite insérée dans cette pré-incision. Une fois en occlusion contre les lamelles de collagène cornéens, l'injection est réalisée et génère un œdème cornéen central d'évolution centrifuge qui peut être visualisé à l'aide d'un colorant ajouté au liquide injecté (de la fluorescéine par exemple ; **Figure 43**).

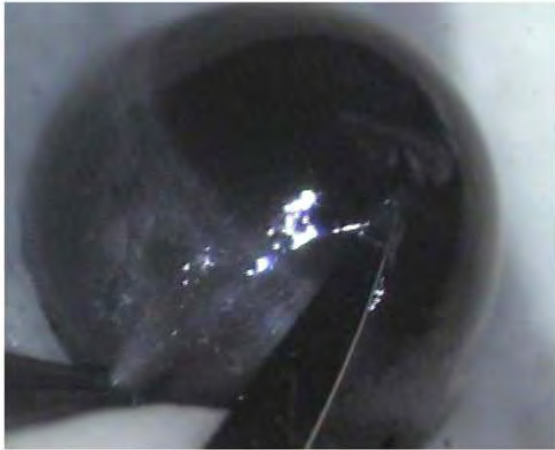


Figure 43 : Illustration de la technique d'injection intra-stromale dans une cornée de souris. L'injection effectuée à l'aide d'une aiguille de type Hamilton est précédée d'une « tunélisation » du stroma cornéen.

L'injection est réalisée avant la blessure cornéenne. En effet, pour des raisons techniques, il n'est pas possible d'effectuer une injection intra-stromale dans une cornée de souris ayant déjà subie une kératectomie perforante.

II.1.5. Modèle de cicatrisation : « trépanation » cornéenne de pleine épaisseur

Le modèle choisi met en jeu une technique de « trépanation » qui a pour but de réaliser une kératectomie transcornéenne perforante. En effet, ce modèle consiste en une démarcation d'un bouton tissulaire au centre de la cornée à l'aide d'un trépan de 0,75mm de diamètre et à le détacher ensuite sur toute son épaisseur en utilisant des ciseaux de microdissection sous microscopie (**Figure 44**). Cet acte chirurgical permet d'engendrer une réaction cicatricielle de grande ampleur responsable d'une opacité cornéenne persistante. Cette opération se déroule sous anesthésie générale (injection intrapéritonéale de 2, 78

mg/kg de Kétamine + 1, 67 ml/kg de Rompun 2% Xylazine) et locale (instillation oculaire de collyre de chlorhydrate d'Oxybuprocaine FAURE 1, 6 mg/0, 4 ml).



Figure 44 : Technique chirurgicale utilisée pour la réalisation du modèle de blessure cornéenne. Elle consiste à réaliser une démarcation d'un bouton tissulaire au centre de la cornée et à le détacher ensuite sur toute son épaisseur à l'aide de ciseaux de microdissection.

Du Gel ophtalmique (Fucithalamic 1 pour cent ; acide fusidique) est appliqué après l'opération pour prévenir les infections bactériennes. Durant les 5 jours qui suivent l'opération, les souris sont traitées quotidiennement avec d'une part, de l'atropine (ATROPINE FAURE 1 pour cent collyre) pour garder l'iris constamment dilaté afin d'éviter des complications de cicatrisation de type synéchie irido-cornéenne (adhérence de l'iris à la cornée, principalement au niveau de la zone en remaniement) et d'autre part avec du gel Fucithalamic pour continuer la prévention antibactérienne.

Les souris sont ensuite sacrifiées au bout de 7 (J7), 14 (J14), 21 (J21), et 28 jours (j28). Les yeux gauches sont soit prélevés et inclus dans du Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound (Sakura Finetek Europe B.V., Zoeterwoude, NL) pour les analyses en immunofluorescence au niveau de la cornée, soit disséqués et les cornées prélevées (récupération de manière séparée de l'épithélium et du stroma) afin de pouvoir dresser le profil d'expression des transcrits de nos gènes d'intérêts après l'extraction des ARNs. Tous les prélèvements sont stockés à une température de -80°C jusqu'à leur utilisation pour leurs analyses respectives.

II.2. Immunofluorescence

Les yeux congelés sont sectionnés en tranche de 7µm d'épaisseur à l'aide d'un cryostat (Leica, CM 1900). Les coupes ainsi obtenues sont soit fixées dans une solution à 4% de paraformaldéhyde (PFA) à 4°C pendant 20 minutes, soit mises à sécher directement à température ambiante avant d'être de nouveau stockées à une température de -80°C. Cette étape de fixation au PFA (ou non) est déterminée par la nature de l'anticorps primaire utilisé lors de l'expérience d'immunofluorescence.

Nature du fixateur utilisé	Antigènes	Anticorps	Fournisseurs	Dilution
PFA	α-SMA	Monoclonal de souris ; Clone 1A4	Sigma	1/5000
PFA	BMP-1 <i>humain</i>	Monoclonal de rat Clone 264822	R et D Systems	1/100
PFA	BMP-1 <i>murin</i>	Monoclonal de rat Clone 264822	R et D Systems	1/100
PFA	Collagène de type XII <i>humain</i>	Monoclonal de souris Clone 378D5	Kamiya Biomedical Company	1/200
Méthanol	Collagène de type XII <i>murin</i>	Polyclonal de lapin	Dr Manuel KOCH	1/5000
Méthanol	Collagène de type XIV <i>murin</i>	Polyclonal de lapin	Dr Manuel KOCH	1/5000
Echantillon inclus dans de la paraffine	MMP-14	Monoclonal de souris Clone VM13317	Abcys, Paris, France	1/100
PFA	PCPE-1 <i>humain</i>	Polyclonal de lapin	Sigma	1/200
PFA	PCPE-1 <i>murin</i>	Monoclonal de rat Clone 261845	R et D Systems	1/100

Tableau 6 : Liste des anticorps utilisés au cours de cette étude. Chaque anticorps est représenté avec la nature du fixateur employé, le fournisseur et le facteur de dilution.

Le jour de la réalisation de l'expérience d'immunomarquage, les lames sont sorties du congélateur et laissées à température ambiante pendant 5 minutes. Les échantillons fixés au PFA sont lavés 3 fois avec du phosphate buffered saline 1X (PBS 1X) avant d'être

trempés dans un bain de sodium borohydrure 1% pendant 30 minutes. Les échantillons congelés directement sont par contre fixés dans du méthanol à une température de -20°C durant 15 minutes. Après lavages (3 lavages de 5 minutes chacun avec du PBS 1X), une solution de blocage est déposée 1 heure sur chaque échantillon afin de saturer les sites non spécifiques. Il s'agit d'Image-it fx Signal enhancer (Invitrogen™, Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) pour les anticorps ayant comme antigènes les collagènes FACIT ou d'une solution de PBS 1X-5% BSA (Bovine Serum Albumin, Eurobio laboratoires, Courtaboeuf, France) pour les autres anticorps. Les anticorps sont dilués dans du PBS 1X-0,3% BSA, solution qui sert également pour les lavages des échantillons à partir de la première incubation d'anticorps. Du sérum de l'animal chez lequel l'anticorps primaire a été fabriqué est utilisé comme anticorps primaire sur les échantillons qui servent de contrôles négatifs (chaque lame comporte un échantillon contrôle négatif). Toutes les expériences appartenant à une même série ont été réalisées simultanément et dans les mêmes conditions (même dilution d'anticorps, même solution de lavage...).

Après l'étape de saturation, les échantillons sont ensuite mis à incuber avec le premier anticorps en chambre humide et à une température de +4°C durant toute une nuit. Trois lavages de 5 minutes chacun sont effectués. L'anticorps secondaire est ensuite déposé sur les échantillons. L'incubation a lieu en chambre humide, dans le noir et à température ambiante pendant 60 minutes. Une fois le temps d'incubation de l'anticorps secondaire écoulé, les échantillons sont de nouveau lavés 3 fois et montés entre lame et lamelle avec du Prolong® Gold antifade reagent with DAPI (Invitrogen™, Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA).

Les échantillons sont observés 24h après leur montage au microscope Leica DMR. Les images sont acquises grâce à l'utilisation d'une caméra Leica DFC 300 FX et d'un logiciel Leica IM50.

II.3. Préparation des échantillons utilisés pour l'analyse en PCR quantitative en temps réel

II.3.1. Extraction des ARNs

Les ARNs sont extraits à partir des épithéliums et des stromas prélevés et congelés précédemment. Cette extraction se fait à partir du Kit RNeasy Midi kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) et suivant les instructions préconisées par le fabricant. Comme suggéré dans le kit, la digestion de l'ADN génomique à la DNaseI (Qiagen, Valencia, CA, USA) est systématiquement réalisée. La concentration des ARNs extraits est évaluée par lecture de la densité optique (DO) à l'aide du kit Quant-iT RNA assay kit (Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA) sur un fluoromètre Qubit™ (Qubit Fluorometer, Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA). Ce kit utilise un intercalant spécifique des ARNs simples brins et la fluorescence est mesurée à 630/680nm grâce à un fluorimètre Qubit (Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA).

Voici une représentation schématique et simplifiée du protocole (**Figure 45**) :

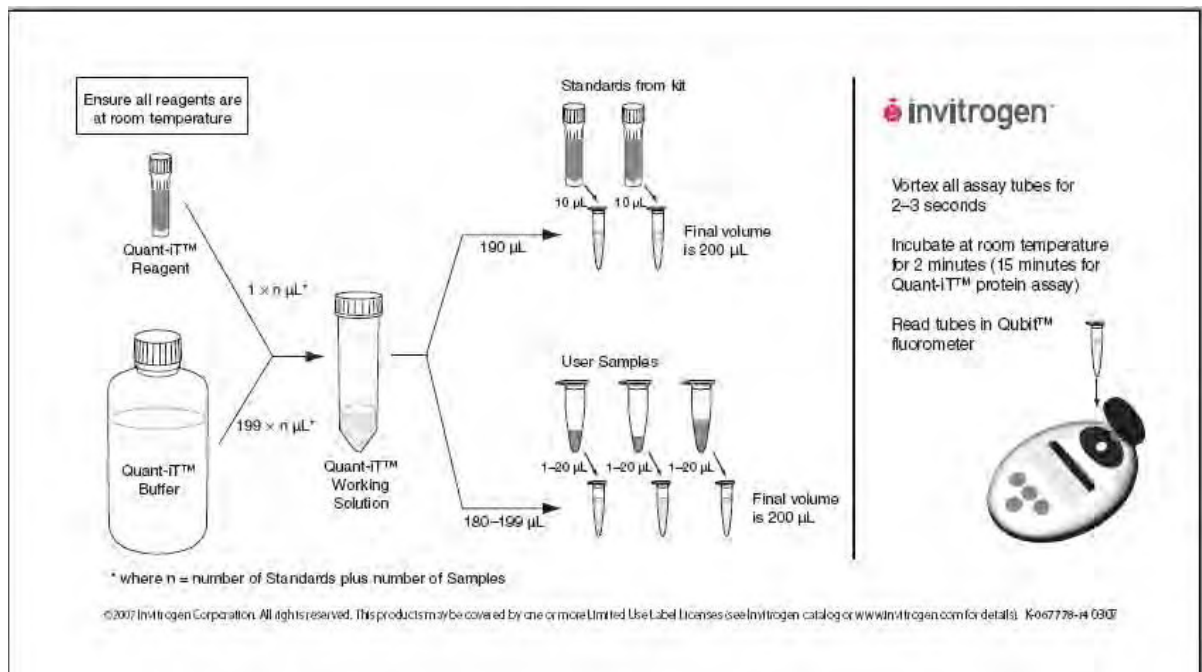


Figure 45 : Protocole simplifié de la mesure de la concentration des ARNs extraits des cornées (Invitrogen).

Une fois la concentration déterminée, un aliquot de 1,5 µl est mis à part pour le contrôle de la qualité des ARNs extraits avant leur utilisation. La solution d'ARN extraite est de nouveau conservée à une température de -80°C.

II.3.2. Contrôle de la qualité des ARNs

Avant l'utilisation des ARNs extraits, une étape de vérification de la qualité est nécessaire. Celle-ci est réalisée grâce à un kit Agilent RNA 6000 Pico Kit (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) selon les recommandations du producteur et sur une puce RNA Pico Chip (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) du fait de la faible quantité d'ARN récupérée à partir des échantillons cornéens.

II.3.2.1. Principe des puces Agilent

Cette technique est basée sur la migration des échantillons en micro réseaux à l'aide d'un gel d'agarose dénaturant, d'un tampon et d'un intercalant (dye) qui se fixe sur l'ARN. Les ARNs subissent ensuite une séparation rapide selon leur taille par voltage élevé. Plus les ARNs sont courts, plus ils migrent rapidement et leur temps de rétention est faible. En fin de migration un rayonnement UV excite l'intercalant qui réémet un rayonnement fluorescent. Plus l'intensité de fluorescence est importante, plus la quantité d'ARN est élevée.



Figure 46 : Instruments de « l'Agilent 2100 bioanalyzer ». Cette technologie est utilisée pour vérifier la qualité des ARN extraits à partir des échantillons cornéens. Cette vérification est effectuée sur des puces RNA Pico Chip (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) à cause de la faible quantité d'ARN récupérée à partir des échantillons cornéens.

II.3.2.2. Evaluation de l'intégrité des ARNs

La qualité de l'échantillon est déterminée par le rapport entre l'intégrité des ARN ribosomiaux 28s et 18s, le tracé complet de l'électrophorégramme incluant la présence ou l'absence de produits de dégradation et l'obtention d'une échelle de RIN (RNA Integrity Number) comprise entre **0** (dégradation totale de l'ARN) et **10** (ARN de grande qualité) (**Figure 47**).

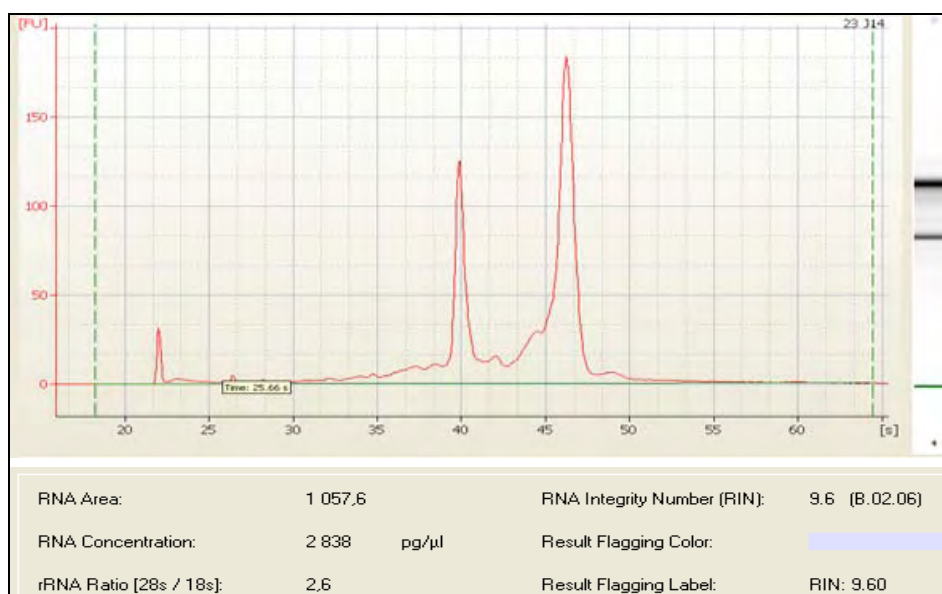


Figure 47 : Illustration d'un profil d'électrophorégramme d'un échantillon d'ARN obtenu à partir de la technologie Agilent 2100 bioanalyzer. Le ratio entre l'ARN ribosomal 28s et l'ARN ribosomal 18s (28s/18s), le profil de l'électrophorégramme ainsi que le RIN (RNA Integrity Number) permet de déterminer le degré d'intégrité des ARNs contenus dans l'échantillon.

II.3.3. Reverse transcription

Après l'étape de vérification de la qualité, une transcription inverse est réalisée sur les échantillons avec le kit SuperScript^R ViloTM cDNA Synthesis Kit, d'Invitrogen (InvitrogenTM, Carlsbad, CA, USA) suivant les instructions du fabricant dont voici le protocole simplifié (pour une réaction dont le volume total est de 20µl):

- 4µl de 5X VILOTM Reaction Mix
- 2µl de 10X SuperScript Enzyme Mix

- X μ l de RNA (la quantité d'ARN ne doit pas excéder 2,5 μ g)
- QSP 20 μ l avec de l'eau traitée RNAses-free

Le contenu du tube est mélangé délicatement puis mis à incuber à une température de 25°C durant 10 minutes, puis à une de 42°C pendant 60 minutes. La réaction se termine à une température de 85°C pendant 5 minutes.

La production d'ADN complémentaire (ADNc) ainsi obtenue servira ensuite pour l'analyse en PCR quantitative en temps réel.

II.4. La PCR quantitative en temps réel

II.4.1. Principe

La PCR quantitative en temps réel repose sur la possibilité de suivre au cours du temps (« en temps réel ») le processus de PCR à l'aide de la fluorescence. Les données de fluorescence sont collectées à chaque cycle de la PCR et représentent la quantité de produits amplifiés à cet instant. Plus l'échantillon est concentré en molécules cibles à l'origine, moins il faudra de cycles pour atteindre un point pour lequel le signal fluorescent est significativement supérieur au bruit de fond. Ce point est défini comme le Ct et apparaît en début de phase exponentielle. Cette quantification n'étudie donc pas la fin de la PCR et n'est donc pas affectée par les éléments limitants identifiés lors de la phase du plateau. Ce concept de Ct est à la base de la précision et de la reproductibilité de la technique. Si l'on suit la fluorescence au cours du temps d'une PCR en temps réel, on observe une augmentation de cette fluorescence et donc du nombre de fragments PCR en 3 phases distinctes :

Phase de bruit de fond : La quantité de fragment amplifié est insuffisante pour générer un signal fluorescent supérieur au bruit de fond.

Phase exponentielle : La quantité de fragment amplifié génère un signal fluorescent supérieur au seuil de détection de l'appareil, puis le nombre de produits amplifié double à chaque cycle. En coordonnées logarithmiques, cette phase est représentée par une droite.

Phase de plateau (ou de saturation): certains composants de la réaction (et en particulier le nombre de molécules de Taq disponibles) deviennent limitants. Le système ne permet plus une amplification exponentielle.

II.4.2. Principe mathématique de la PCR

On considère que le nombre de molécule d'ADN au cycle n (X_n) est égal au nombre de molécule au départ (X_0) multiplié par $(1+\text{efficacité})^n$ soit $X_n = X_0 \times (1+E)^n$. Si l'efficacité de la PCR est de 100%, la quantité d'ADN doit doubler à chaque cycle c'est-à-dire $X_n = X_0 \times 2^n$. On effectue ensuite pour chaque échantillon une correction de l'expression du gène cible à partir de gène(s) de référence. Un gène de référence est un gène dont l'expression ne varie pas entre les différentes conditions pour lesquelles la mesure de la variation d'expression du gène cible est réalisée. Ceci permet d'éliminer certaines fluctuations comme par exemple des variations au niveau de la synthèse d'ADNc.

La normalisation de l'expression du gène cible par rapport au(x) gène(s) de référence est donc égale à $2^{-(C_{\text{cible}} - C_{\text{référence}})}$ ou $2^{-\Delta C_t}$. Enfin, le rapport d'expression entre deux échantillons lorsque l'efficacité est de 100% correspond à $2^{-\Delta\Delta C_t}$ où $\Delta\Delta C_t$ est l'écart de cycle entre les deux échantillons après normalisation par le(s) gène(s) de référence.

II.4.3. La courbe de fusion

La spécificité de chaque amplification est contrôlée par une courbe de fusion à la fin de chaque PCR : l'ADN double brin est dénaturé très lentement jusqu'à ce que sa température de fusion caractéristique soit atteinte. Le SybrGreen est alors libéré dans le milieu réactionnel, ce qui se caractérise par une brusque chute de fluorescence. La dérivée première de la fluorescence permet d'obtenir un pic unique, garant de la spécificité d'amplification et de l'absence de contamination.

II.5. Procédure du choix des amorces pour l'étude de l'expression d'un gène par PCR quantitative en temps réel

II.5.1. « Conception » des amorces

La première étape d'analyse consiste à « concevoir » des amorces spécifiques aux transcrits cibles afin de pouvoir vérifier et valider leur présence dans notre modèle d'étude (cornée de souris C57B/L6). Pour cela, la base de données « **Ensembl** » ainsi que le site « **appliedbiosystems** » ont été utilisés pour obtenir la séquence en nucléotides des ARN messagers d'intérêts et pour vérifier les critères des amorces choisies, respectivement. Afin d'optimiser l'efficacité des amorces et donc de la réaction de PCR temps réel, certains paramètres doivent être respectés, notamment:

Taille de l'amplicon (nombre de paires de bases compris entre 75 et 150).

Pourcentage des acides nucléiques G et C de l'amorce (doit être compris entre 30 et 70%).

Température de fusion ou Tm du couple d'amorces (température à laquelle la sonde et la cible sont dissociées à 50%, doit être autour de 60°C et être le même pour tous les couples d'amorces qui sont contenus dans une même plaque si l'appareil n'est pas multizones).

Limitation des répétitions d'un même nucléotide (pas plus de 3).

Limitation de la complémentarité entre deux amorces appartenant à un même couple.

Nombre de C ou G dans les 5 dernières bases de l'amorce (pas plus de 2).

Positionnement de l'amorce (doit être entre deux exons successifs si possible).

La séquence des amorces peut être également établie à partir de publications existantes. Ces amorces doivent répondre également aux mêmes critères cités précédemment.

Une fois toutes les caractéristiques validées, les amorces sont « Blastés » dans le site de **NCBI** afin de s'assurer qu'elles ne reconnaissent aucun autre ARN ni chez la souris ni chez d'autres espèces.

Les amorces ainsi établies sont commandées chez Eurogentec S.A (Belgique).

II.5.2. Validation des amorces

L'étape de validation des amorces consiste à vérifier l'efficacité des amorces choisies grâce à la technique de PCR quantitative en temps réel. Pour cela elles doivent être testées sur au moins 3 échantillons différents et idéalement avoir une efficacité d'au moins 95%. Cette étape s'effectue tout d'abord sur des « contrôles positifs » qui constituent des échantillons dans lesquels l'expression du gène d'intérêt est connue.

Les réactions ont été faites sur le LightCycler 480 (Roche, Suisse) suivant ce protocole :

ETAPES	NOMBRE DE CYCLES		TEMPERATURE	TEMPS
Dénaturation initiale	1		95°C	5min
Amplification	40	Dénaturation	95°C	15sec
		Hybridation	60°C	10sec
		Elongation	72°C	45sec
Courbe de fusion (détermination de la température de fusion)	1			40 sec
Refroidissement final	1		40°C	30sec

Tableau 7 : protocole utilisé dans le LightCycler 480 pour les réactions de PCR quantitative en temps réel.

Les plaques de dépôt ainsi que le tampon de réaction 2X LightCycler480 SYBR Green I Master (contient la Taq ADN polymérase Faststart, un mélange de dNTP, du SYBR Green I et du MgCl₂) proviennent de Roche Diagnostics (Suisse). Chaque puits contient, 1µL de mélange d'ADN à la concentration souhaitée, 1µL de solution d'amorces (amorces sens et amorces antisens) à la concentration voulue, 3µL d'eau et 5 µL du tampon de réaction 2X LightCycler480 SYBR Green I Master.

Pour valider des amorces et pouvoir comparer des gènes entre eux, plusieurs étapes sont nécessaires :

II.5.2.1. Vérification de la spécificité des amorces

La première approche consiste à vérifier la sélectivité des amorces. Pour cela un test est réalisé sur un échantillon témoin (contrôle positif). Lorsque la réaction semble aboutir à une amplification, il est nécessaire de vérifier tout d'abord via la courbe de fusion (**Figure 48**) et ensuite via une étape de séquençage qu'il n'y a qu'un seul produit de PCR avant de passer à l'étape suivante.

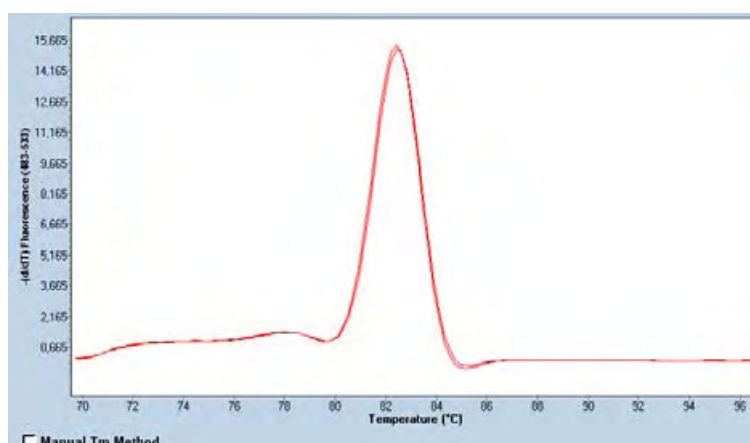


Figure 48 : Exemple d'un profil d'amplification (en triplicate) obtenu avec des amorces spécifiques à partir du LightCycler 480.

La vérification de la spécificité des amorces passe en effet par une phase de séquençage du produit obtenu. Ces produits issus de la réaction de PCR en temps réel sont mis à migrer dans un gel d'agarose (la concentration en agarose varie en fonction de la taille de l'amplicon) fait dans du TBE (Tris Borate EDTA) 1X. A la fin de la migration, les produits sont récupérés, purifiés et séquencés.

Cette phase de séquençage permet non seulement de vérifier que le produit de PCR ne contient qu'un élément amplifié mais également de confirmer la séquence en bases azotées de ce dernier.

II.5.2.2. Détermination de la concentration de travail efficace des amorces

Un test des amorces en triplicate est réalisé à différentes concentrations (0,1, 1 et 10 μM), pour une concentration fixe de cDNA (150pg/ μL). Du fait que la concentration en amorces ne doit pas être un facteur limitant, cette étape permet ainsi de définir une concentration optimale de travail des amorces d'intérêts.

II.5.2.3. Détermination du pourcentage d'efficacité des amorces

Cette étape consiste à tester les amorces à une concentration fixe sur une gamme de concentration de cDNA (600, 300, 150, 75, 37.5, 18.75 pg/ μL dans notre cas). Les résultats sont analysés selon la méthode proposée par Michael W. Pfaffl dans le livre « *Quantification strategies in real-time PCR* ». Cette méthode s'appuie sur une régression linéaire en exprimant les Ct de sortie des gènes en fonction du logarithme de 10 de la quantité de cDNA. La pente de la courbe permet de calculer E ($E = -1/\text{pente courbe}$). L'efficacité du gène correspond à 10^E . Cette valeur est comprise entre 1,0 (efficacité de 0%) et 2,0 (efficacité du gène de 100%).

Amorces	Pourcentage d'efficacité
Actin	95.5
β_2 μglobuline	86
Bmp-1	100
Collagène de type III	85.5
Collagène de type XII NC3	98
Long+Court	
Collagène de type XII NC3 Long	100
Collagène de type XII NC1 Long	97
Collagène de type XII NC1 Court	98
Pcpe-1	96
Pcpe-2	97
Tata box	95
Tyrosine 3 mono oxygénase	95.5

Ubiquitine	100
Vimentine	84

Tableau 8 : Pourcentage d'efficacité de l'ensemble des amorces utilisées lors de cette étude.

Une fois les amorces validées sur les échantillons embryonnaires, la même procédure s'applique à des échantillons de cornées normales et blessées. Cette étape permet non seulement de valider l'efficacité des amorces choisies sur notre modèle d'étude mais aussi et par conséquent, de valider la présence du gène d'intérêt au niveau de la cornée de souris adulte C57B/L6.

II.6. Analyse statistique des résultats obtenus par PCR quantitative en temps réel

Vandersompele et col. ont montré que plusieurs gènes rapporteurs sont nécessaires pour affiner les comparaisons (Vandesompele et al., 2002). Ils proposent de calculer le coefficient de stabilité du gène rapporteur potentiel, M. Plus la valeur de M est faible, plus le gène est stable. Pour qu'un gène soit considéré comme stable, M doit être inférieur à 0.15. Les gènes déterminés comme étant stables dans leur niveau d'expression seront utilisés comme gènes rapporteurs lors des comparaisons d'expression des ARNm. Les gènes rapporteurs candidats sont testés en PCR sur des échantillons de cDNA différents (cornée normale, différents temps après blessure) pour un nombre d'échantillons minimum de 15. La stabilité des gènes candidats est ensuite évaluée grâce au logiciel geNORM qui calcul la valeur M. Enfin ce logiciel permet de déterminer le nombre minimum de gènes rapporteurs à utiliser.

Ainsi, nous avons déterminé que pour l'épithélium cornéen trois gènes rapporteurs étaient nécessaires : β -actin, tatabox et l'ubiquitine. Pour le stroma, trois gènes rapporteurs sont aussi nécessaires : β 2-microglobuline, tyrosine 3 mono oxygénase et vimentine.

Toujours selon l'étude de Vandersompele et col. nous avons utilisé la technique du $2\Delta\Delta$ CT pour comparer les changements d'expression de nos gènes d'intérêts entre les cornées normales et les cornées blessées. Pour normaliser les résultats, l'efficacité de PCR de chaque couple d'amorce est prise en compte, et les gènes d'intérêt sont comparés à la moyenne géométrique des gènes rapporteurs. Puis la technique classique du $2\Delta\Delta$ CT est utilisée (Vandesompele et al., 2002).

RESULTATS

Approches thérapeutiques :
**ciblage de l'opacité
cornéenne par modulation
de l'activité de protéinases
matricielles**

III.1. Approche par thérapie génique : réduction de l'opacité cornéenne par surexpression de la MT1-MMP ou MMP-14

III.1.1. Objectifs

Plusieurs études réalisées sur des cornées cicatricielles ont montré qu'après une blessure, la cornée en remaniement s'enrichie en collagène de type III (Michelacci, 2003). Ce collagène fibrillaire, moins bien organisé est en majeure partie responsable de l'opacification de la cornée qui induit une perte de transparence à l'origine de la cécité cornéenne. La MEC « provisoire » mise en place après une blessure est très dynamique à cause de l'hyperactivité des myofibroblastes ; cellules responsables de cette synthèse. Les myofibroblastes caractérisés entre autre par une expression de l' α -SMA apparaissent uniquement après blessure et n'existent pas à l'état normal (Dupps and Wilson, 2006). Plusieurs auteurs ont essayé de mettre en place une stratégie de lutte contre les opacités cornéennes en ciblant directement les myofibroblastes. Une de ces techniques d'approche est par exemple la modulation du TGF β actif. Cette méthode s'avère cependant inefficace (Jester et al., 1999). Ainsi le premier objectif de cette étude est de réduire l'opacité observée au niveau de la cornée après blessure, en ciblant le dépôt de collagène responsable de la formation de cette matrice « provisoire opaque » grâce à la surexpression de la métalloprotéinase de type 14. L'action de cette enzyme peut permettre la réduction de l'opacité en dégradant le collagène. L'hypothèse émise ici est que la perturbation de cette production anarchique de collagène matriciel moins bien organisé peut également induire une apoptose des myofibroblastes [(Hinz, 2007), (Grinnell et al., 1999)] et permettre ainsi un retour à la situation normale à savoir à une activité de synthèse de collagène matriciel principalement de type I assurée par les kératocytes.

III.1.2. Résultats

Le travail effectué sur l'effet de la surexpression de la MMP-14 sur les opacités cornéennes a fait l'objet d'un article publié dans *Gene therapy* le 16 Décembre 2010.

Article I

ORIGINAL ARTICLE

Matrix metalloproteinase 14 overexpression reduces corneal scarring

SD Galiacy^{1,2,6}, P Fournié^{1,2,3,6}, D Massoudi^{1,2}, E Ancèle^{1,2,3}, J-C Quintyn^{1,2,3}, A Erraud^{1,2},
I Raymond-Letron^{1,4}, F Rolling⁵ and F Malecize^{1,2,3}

Once a corneal scar develops, surgical management remains the only option for visual rehabilitation. Corneal transplantation is the definitive treatment for a corneal scar. In addition to the challenges posed by graft rejections and other postoperative complications, the lack of high-quality donor corneas can limit the benefits possible with keratoplasty. The purpose of our study was to evaluate a new therapeutic strategy for treating corneal scarring by targeting collagen deposition. We overexpressed a fibril collagenase (matrix metalloproteinase 14 (MMP14)) to prevent collagen deposition in the scar tissue. We demonstrated that a single and simple direct injection of recombinant adeno-associated virus-based vector expressing murine MMP14 can modulate gene expression of murine stromal keratocytes. This tool opens new possibilities with regard to treatment. In a mouse model of corneal full-thickness incision, we observed that MMP14 overexpression reduced corneal opacity and expression of the major genes involved in corneal scarring, especially type III collagen and α -smooth muscle actin. These results represent proof of concept that gene transfer of MMP14 can reduce scar formation, which could have therapeutic applications after corneal trauma.

Gene Therapy advance online publication, 16 December 2010; doi:10.1038/gt.2010.159

Keywords: cornea; scar; matrix metalloproteinase 14; adeno-associated virus

INTRODUCTION

Understanding the mechanisms of corneal wound healing and why this process so often results in scarring remains a major challenge for clinicians and researchers. A worrying consequence of this situation is the lack of efficient therapies to treat the condition or prevent scarring, which in the most severe cases can lead to corneal blindness. Treatment of corneal blindness depends on the underlying disease or condition. Once a corneal scar develops, surgical management remains the only option for visual rehabilitation. Corneal transplantation is the definitive treatment for corneal scars. In addition to graft rejections and other postoperative complications, the lack of high-quality donor corneas can limit the benefits that should be possible with keratoplasty. Several treatments have been proposed to treat scarring in order to avoid corneal transplantation. These include topical application of steroids,¹ cell cycle inhibitors (mitomycin-C),² human amniotic membrane,³ urokinase plasminogen activator⁴ and interferon α 2b,⁵ as well as attempts to modulate the level of active growth factors, especially transforming growth factor- β , to reduce the number of activated cells in the corneal stroma (for example, myofibroblasts) producing an excess of extracellular matrix.⁶ To date, the results have been quite disappointing and the tested compounds are either ineffective or accompanied by various side effects. Another limitation is that none of these previous attempts have specifically targeted the major underlying biological phenomenon—the disorganization and excess accumulation of connective tissue. Consequently, the only effective treatment for corneal scarring is corneal transplantation, despite its limitations.

Corneal wound healing is a complex process that relies on the interplay of proteases and their inhibitors for proper extracellular matrix remodeling. Metalloproteinases have a major role in extracellular matrix remodeling during wound healing.⁷ Extracellular matrix proteases tightly coordinate the balance of extracellular matrix synthesis, degradation and remodeling. Disorders occur when there is an imbalance between proteases and protease inhibitors. When the balance is in favor of the proteases, it causes pathologic degradation of stromal collagen and proteoglycans in the cornea. This could in the end induce corneal ulcers.⁸ If the balance favors the inhibitors, extracellular matrix accumulates and fibrosis takes place. Such conditions result in permanent corneal opacity.⁹ The composition of this matrix is very different from that of the normal, uninjured stroma, and is mainly formed by fibrillar type III collagen. This difference in composition, as well as the disorganized manner of repair-related tissue deposition, contributes to corneal opacity.¹⁰

Matrix metalloproteinases (MMPs) are a group of zinc-binding proteolytic enzymes that participate in degrading and remodeling of the extracellular matrix in various physiological and pathologic conditions, including tumor progression and metastasis, inflammatory diseases and wound healing.^{11,12} These enzymes are classified in groups associated with their substrate specificity and structural biology. The collagenases, gelatinases, stromelysins, matrilysins, membrane-type MMP and others generally consist of a prodomain, a catalytic domain, a hinge region and a hemopexin domain. Notably, these enzymes can be secreted from the cell or anchored at the cell surface. MMP are specifically regulated at many levels.

¹INSERM U563, Toulouse, France; ²Université Toulouse III Paul Sabatier, Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan, Toulouse, France; ³CHU Toulouse, Hôpital Purpan, Service d'Ophtalmologie, Toulouse, France; ⁴Département de Pathologie, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, Toulouse, France and ⁵Laboratoire de Thérapie Génique, INSERM UMR U649, Institut de Recherche Thérapeutique 1, Université de Nantes, Nantes, France

Correspondence: Dr P Fournié, Service d'Ophtalmologie, CHU Toulouse, Hôpital Purpan, Place du Dr Baylac, Toulouse Cedex 31059, France.
E-mail: fournier.p@chu-toulouse.fr

⁶These authors contributed equally to this work.

Received 1 May 2010; revised 26 October 2010; accepted 28 October 2010

Previous works showed that several MMP are expressed during corneal wound healing.⁸ MMP 2, 3, 7, 9, 12 and 13 have been identified in migrating epithelial cells, stromal keratocytes and inflammatory cells.^{7,13–18} MMP14 expression was strongly induced in basal epithelial cells in the initial days after corneal wounding, appearing later in keratocytes.¹⁷ It has been suggested that MMP14 has a role in stromal extracellular matrix remodeling¹⁷ but no report thus far has attempted to modulate its expression *in vivo*. Our hypothesis is that overexpression of MMP14 by stromal cells will target type III collagen deposition in the scar tissue, and thus will lead the corneal cells to restore the extracellular matrix to a level that allows transparency.

RESULTS

Gene transfer in the unwounded corneal stroma

AAV2/8.gfp and AAV2/8.mmp14 vectors: dose-response experiments. We sought to determine the optimal dose of vector genome that would provide the best transgene expression with no side effects. For the first dose of $2.10e^{10}$ vector genome (vg) per cornea, green fluorescent protein (GFP) fluorescence was visible as early as D7 and as late as D56 (Figure 1). Moreover, we observed neither inflammation nor corneal opacity for the AAV2/8.gfp vector up to 56 days after injection. With regard to the AAV2/8.mmp14 vector, small-grade opacities and a few neovessels were observed at D7 (not shown). At day 21 (Table 1), all the mice presented light to severe opacities and almost half of them had neovessels inside the cornea. Slit-lamp observation depicted thin stroma, and three mice exhibited corneas that were dangerously close to perforation. As these observations were not consistent with our research goal, we decided not to pursue this line of experimentation.

We then decided to dilute the vector dose and injected ten and five times fewer viral particles (that is, $2.10e^9$ and $4.10e^9$ vg per cornea). We observed limited opacity in very few mice, but did not observe any

stromal thinning or neovessel formation. These mice were followed for up to 8 months; at this time all the corneas were totally clear (Table 2). Considering these preliminary results, AAV2/8.gfp was considered as a suitable control vector, and we decided to use a dose of $4.10e^9$ vg per cornea for the next steps of our study.

In the next step, we ensured that our transgene was properly expressed in normal corneas. We showed that recombinant MMP14 (rMMP14) mRNA was detectable as early as D7 post injection. The mRNA expression increased from D7 to D14 (Figure 2a) post injection, which correlated with an increase in levels of MMP14 mRNA and protein in AAV2/8.mmp14-transduced corneas as compared with those from AAV2/8.gfp-treated mice or non-transduced mice (Figures 2a, b, c and d).

Effect of MMP14 overexpression on corneal repair

Clinical and histological evaluation. In this study, $4.10e^9$ vg per cornea of AAV2/8.gfp or AAV2/8.mmp14 was injected 10h before the wound-healing assay. Corneal opacities were scored 14 days later. We observed a significant difference in opacity scoring between the AAV2/8.mmp14-treated mice and the AAV2/8.gfp-treated mice. Clinically, this treatment reduced the extent of scarring in the AAV2/8.mmp14-treated mice. As shown in Table 3, there were significantly fewer cases of severe scarring and more cases of transparent corneas in the AAV2/8.mmp14-treated group. The results in the grade 1 and grade 2 columns confirm this tendency. This difference was statistically significant ($P < 0.01$).

We presented the different types of opacities visualized by bio-microscopy in this wound-healing assay (Figure 3a). As pictured in

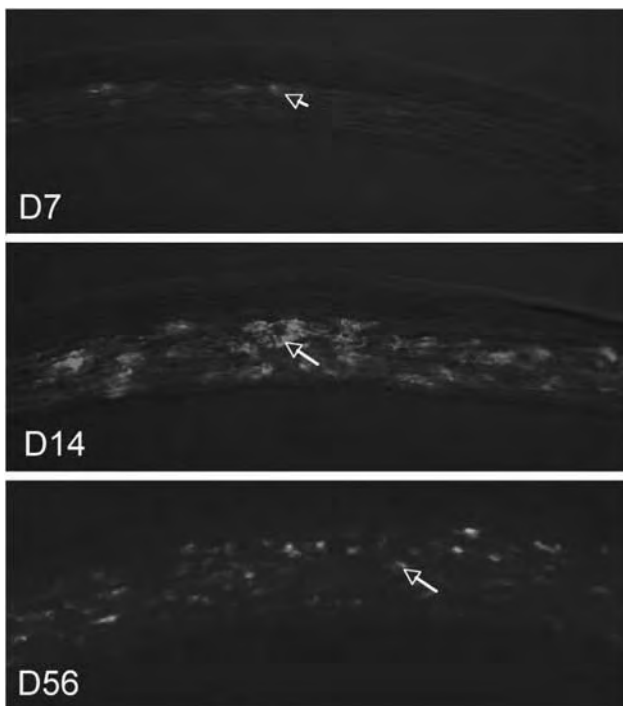


Figure 1 AAV2/8.gfp expression in the unwounded murine cornea 7, 14 and 56 days after intrastromal injection of $2.10e^{10}$ vg ($n=6$ mice, two per time point). Epithelium and endothelium show no fluorescence. Only the stromal keratocytes (white arrows) express green fluorescence ($\times 200$ magnification).

Table 1 Opacity score measured 21 days after injection of viral genome ($2.10e^{10}$ vg (D21)) or control solution in unwounded corneas

Group	Opacity grade (% of mice (% of neovascularized corneas))			
	Grade 0	Grade 1	Grade 2	Grade 3
Control	100	0	0	0
PBS	100	0	0	0
AAV2/8.gfp	90	10	0	0
AAV2/8.mmp14	0	58 (36)	29 (71)	13 (100)

Abbreviations: PBS, phosphate-buffered saline, vg, vector genome. Results are expressed as percentage of total mice. Results in brackets are expressed as percentage of the grading group ($n=10$ mice per group). Opacity score gradation: grade 0, clear cornea; grade 1, light opacity; grade 2, moderate opacity; grade 3, complete opacity.

Table 2 Opacity score measured after injection of AAV2/8.mmp14 in unwounded corneas (D28–D224)

	Opacity grade (% of mice)			
	Grade 0	Grade 1	Grade 2	Grade 3
$4.10e^9$ vg (D28)	100	0	0	0
$4.10e^9$ vg (D56)	67	11	11	11
$4.10e^9$ vg (D224)	100	0	0	0
$2.10e^9$ vg (D28)	100	0	0	0
$2.10e^9$ vg (D56)	86	14	0	0
$2.10e^9$ vg (D224)	100	0	0	0

Abbreviation: vg, vector genome. Results are expressed as percentage of total mice ($n=10$ mice per dose). Two doses ($4.10e^9$ and $2.10e^9$ vg) were used and corneas were observed at D28, D56 and D224 after injection. Opacity score gradation: grade 0, clear cornea; grade 1, light opacity; grade 2, moderate opacity; grade 3, complete opacity.

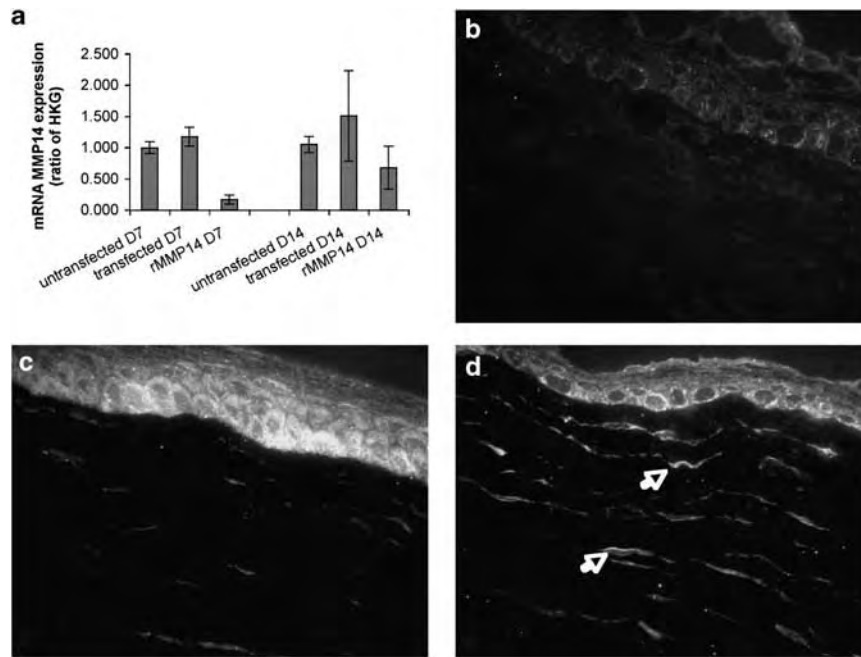


Figure 2 MMP14 and recombinant MMP14 (rMMP14) expression in unwounded cornea after injection of $4.10e^9$ vg of AAV2/8.mmp14. (a) The mRNA expression of MMP14 and rMMP14 revealed by reverse transcriptase PCR. Expression levels were normalized as a ratio of the expression level of housekeeping genes (HKG) ($n=4$ mice per time point). MMP14 protein expression was revealed by immunofluorescence in non-injected cornea (b), in unwounded murine cornea 14 days after intrastromal injection of AAV2/8.gfp (c) or AAV2/8.mmp14 (d) ($n=3$ mice per group). MMP14 was expressed in basal epithelial cell layers (b, c, d). It was weakly expressed in keratocytes in non-injected cornea (b) and in AAV2/8.gfp-injected cornea (c) and strongly expressed in AAV2/8.mmp14-injected cornea (d, white arrows) ($\times 400$ magnification).

Table 3 Effect of AAV2/8.mmp14 on corneal repair: clinical corneal opacity evaluation ($4.10e^9$ vg)

Group	Opacity grade (% of mice)			
	Grade 0	Grade 1	Grade 2	Grade 3
AAV2/8.gfp	2	20	45	33
AAV2/8.mmp14	13	55	21	11

Abbreviation: vg, vector genome. Mice were injected with $4.10e^9$ vg per cornea of AAV2/8.gfp (control group $n=49$ mice) or AAV2/8.mmp14 ($n=53$ mice), 10 h before corneal incision. Grading was performed 14 days later. Results are expressed as percentage of total mice. Opacity scores are lower in the AAV2/8.mmp14 group and statistically different from those in the AAV2/8.gfp group ($P<0.01$). Opacity score gradation: grade 0, clear cornea; grade 1, light opacity; grade 2, moderate opacity; grade 3, complete opacity.

Figures 3b and c, histological differences were linked to the overall severity of the opacity. Histopathological analysis did not show significant differences between the two groups when each parameter (neovascularization, edema, corneal thickness, neutrophil infiltration, fibroplasia and α -smooth muscle actin (α -SMA) expression) was analyzed separately. Principal component analysis showed that unlike the AAV2/8.gfp group, corneal thickness and edema were independent phenomena in AAV2/8.mmp14-treated mice (Figure 4, correlation factor -0.14). All the other parameters (edema, α -SMA, neovascularization, neutrophils and fibroplasia) were linked. This highlights the putative effect of MMP14 activity.

Moreover, we observed elevated mRNA expression of gene markers associated with scarring. However, the magnitude of this increase was reduced in the AAV2/8.mmp14-treated mice as compared with the AAV2/8.gfp group, with significant differences for type III collagen, α -SMA and MMP2 (Table 4). However, MMP14 mRNA expression

was greater in the AAV2/8.mmp14-treated group ($P<0.05$). For type I collagen, we only noticed a non-significant difference in its expression between the control and the AAV2/8.mmp14-treated groups.

DISCUSSION

The purpose of our study was to evaluate a new therapeutic strategy approach to treating corneal scarring that targets collagen deposition. We overexpressed a fibril collagenase (that is MMP14) to prevent collagen deposition. We showed that a single and simple direct injection of recombinant adeno-associated virus-based vector expressing the murine MMP14 can modulate gene expression of stromal keratocytes. Thus, this tool suggests potential avenues to explore novel therapeutic treatments. In a mouse model of corneal full-thickness incision, we observed that MMP14 overexpression reduced corneal opacity and the level of expression of the major genes involved in corneal scarring, especially type III collagen and α -SMA.

Up to now, few studies have reported efficient transduction of keratocytes. Saika *et al.*¹⁹ used an adenovirus encoding peroxisome proliferator-activated receptor- γ , which was applied on the ocular surface of alkali-burned mouse cornea. They obtained interesting results in the context of a chemical burn, observing transient expression of their transgene in both the epithelium and the stroma. Bemelmans *et al.* demonstrated efficient lentiviral gene transfer in the corneal stroma cells using a femtosecond laser.²⁰ They obtained promising results, but the use of both lentivirus and femtosecond laser could limit the clinical applications of this technique.²¹

Overexpression of rMMP14 was achieved using an adeno-associated viral vector carrying MMP14 complementary DNA under the control of the cytomegalovirus (CMV) promoter. The preliminary experiments using AAV2/8.CMV.gfp demonstrated a high rate of keratocyte transfection in unwounded cornea. GFP expression was

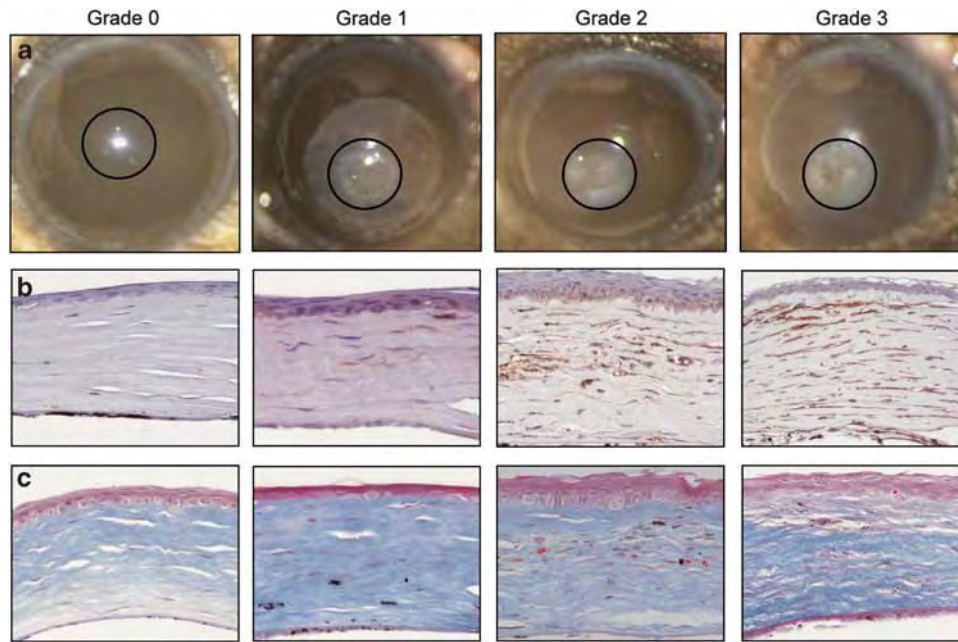


Figure 3 Histopathology. We present one example of each grade, with corresponding histological observations. (a) Microscope observation, circled area is centered on the wounded area (magnification $\times 40$). (b) The α -SMA expression (brown staining; magnification $\times 400$). (c) Masson trichrome (magnification $\times 400$). We observed increased expression of α -SMA and increased collagen remodeling with higher opacity grade.

observed at 7 days after transfection. The timeline was similar for rMMP14 mRNA expression in mice with unwounded corneas, and the level of rMMP14 mRNA expression was similar to that observed in other cell types.²² Because of this delayed expression and because injecting a previously incised mouse cornea is technically impossible, we decided to administer the vector and then perform cornea full-thickness incision 10 h later. This approach allowed us to specifically transfect keratocytes, as demonstrated by the specificity obtained with GFP transfection: there was no epithelial diffusion while the basement membrane was intact. Because of the small delay between transfection and effective expression of the transgene, our clinical target is the early phase of corneal wounding, before an opaque corneal scar forms (in conditions wherein such scars are expected).

The biological effects of MMP14 are multiple and complex. MMP14 is a fibrillar collagenase^{23,24} and as such is able to degrade the type III collagen present in scar tissue. Our initial strategy involved removal of the scar tissue rich in type III collagen, by proteolysis via MMP14. Preliminary experiments with high doses of AAV2/8.mmp14 vector demonstrated the collagenase ability of our construct, as we observed stromal melting and perforation. At the working dose, we did not observe such phenomena. Histopathology was relatively similar between the control group and the AAV2/8.mmp14-treated mice with regard to several parameters (edema, corneal thickness, neovascularization, neutrophils, fibroplasia and myofibroblast detection). However, statistical analysis highlighted the gene transfer effect: in the AAV2/8.mmp14 group, corneal thickness was not linked to edema as it was in the AAV2/8.gfp group, suggesting collagenase activity.

There is no direct link between MMP14 overexpression and the level of expression of the proteins we investigated. Although MMP14 overexpression can reduce corneal opacity, its role in major genes involved in corneal scarring was surprising. Our hypothesis is that a feedback loop is activated. MMP14-induced extracellular matrix remodeling may affect myofibroblasts. This hypothesis is in accordance with a recent paper by Hinz *et al.*²⁵ in a review dedicated to

myofibroblast. Grinnell *et al.* reported that, *in vitro*, decreased stiffness of the extracellular matrix due to collagen relaxation inhibited myofibroblasts.²⁶ A similar mechanism could occur *in vivo*, with decreased extracellular matrix tension induced by the degradation of type III collagen by MMP14. Although the outcome of the myofibroblasts (that is, apoptosis or undifferentiation to a less active state) was unclear, remodeling of the extracellular matrix might have reduced internal stiffness resulting in a decrease of myofibroblasts. This hypothesis might explain the decreases in α -SMA and type III collagen mRNA. We observed no upregulation of type I collagen mRNA, which implied the absence of adverse effects on this collagen, which is the main component of the normal corneal stromal extracellular matrix.

MMP14 has been described as a mediator of angiogenesis with contrasting effects.^{27–29} MMP14 can act in a proangiogenic capacity by degrading extracellular matrix components and favoring endothelial cell migration. However, it can also release antiangiogenic peptides from extracellular matrix proteins, such as endostatin. Azar and co-workers^{27,30} reported that corneal injection of complementary DNA plasmid encoding MMP14 induced angiogenesis and that MMP14 colocalized with VEGF. They also demonstrated that the angiogenic effect of MMP14 could be mediated by proteolysis of decorin and collagen XVIII.³⁰ During preliminary experiments, we observed that high quantities of vector particles of AAV2/8.mmp14 induced angiogenesis, as well as stromal perforation, in unwounded cornea. However, using a lower titer of vector did not induce angiogenesis or stromal melting. As stated in a recent paper and review,^{30,31} these results are not contradictory and reflect the complexity of angiogenesis, whether in physiological or pathological conditions. In our wound-healing model, the degree of neovascularization depends on the general state of the cornea, but no difference between the control group and the AAV2/8.mmp14 group was observed. Those results indicate that potential detrimental effects of corneal neovascularization were not induced by MMP14 expression in our model, and the results highlight the benefit of working with a low level of MMP14 expression.

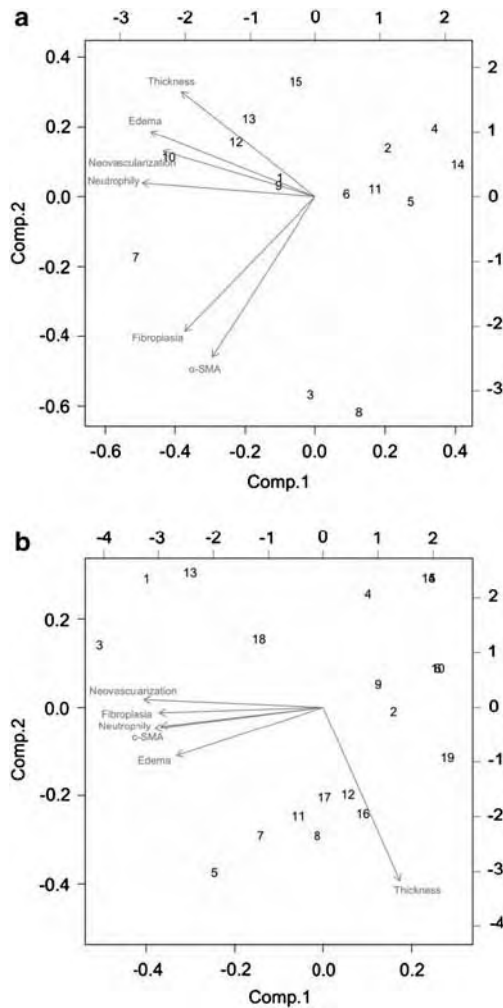


Figure 4 Principal component analysis (PCA) of six histological variables (edema, corneal thickness, neovascularization, fibroplasia, neutrophils, α -SMA expression) was performed. The first two factors arising from the PCA account for 77% (AAV2/8.gfp) and 79% (AAV2/8.mmp14) of the explained variance. (a) AAV2/8.gfp-injected mice ($n=15$ mice). Two groups of independent variables were visualized: (1) fibroplasia and α -SMA expression; (2) edema, corneal thickness, neovascularization and neutrophils. (b) AAV2/8.mmp14-injected mice ($n=19$ mice). Two groups of variables were visualized: (1) edema, neovascularization, neutrophils; (2) fibroplasia and α -SMA. Corneal thickness is presented alone and independent from edema and all the other variables.

Prevention of scar tissue formation is an important clinical consideration after corneal injury. The targeted modulation of corneal wound healing, before a stationary scar appears, could have considerable clinical relevance. In the present study, using a full-thickness punched cornea murine wound-healing model, we present the proof of concept that gene transfer of MMP14 can reduce scar formation, which could have therapeutic applications after corneal trauma. In future investigations, we will use the same strategy in established scars, in an attempt to eliminate corneal opacity. This could provide a new therapeutic alternative for the treatment of corneal blindness that avoids corneal grafting and its potential complications. Finally, due to the broad similarity of the wound-healing response in different tissues, such an approach could be of interest in the treatment of several other fibrotic disorders.

Table 4 The mRNA expression for genes involved in corneal wound repair 14 days after corneal incision

Gene	mRNA fold-change (s.d.)	
	AAV2/8gfp	AAV2/8.mmp14
Type I collagen	1.4 (0.7–2.8)	0.8 (0.4–1.6)
Type III collagen ^a	38.0 (13.0–113.8)	13.9 (3.3–65.5)
α -SMA ^a	3.9 (2.0–8.0)	2.3 (0.9–6.2)
MMP-2 ^a	3.6 (1.9–6.4)	1.9 (0.9–5.4)
TIMP-2	2.1 (1.3–3.2)	1.3 (0.5–2.9)
MMP-14 ^a	1.7 (0.8–3.4)	3.2 (2.1–4.8)

Abbreviations: MMP, matrix metalloproteinase; α -SMA, α -smooth muscle actin. Fold-changes in gene expression were calculated in comparison with levels observed in unwounded corneas ($n=15$ mice per group; for unwounded corneas, $n=20$ corneas from 10 mice). Type III collagen, α -SMA and MMP2 increased expression was significantly weaker in the AAV2/8.mmp14 mice compared with the AAV2/8.gfp mice. MMP14 expression was significantly higher in the AAV2/8.mmp14-treated mice compared with the AAV2/8.gfp-treated mice. ^a $P<0.05$ AAV2/8gfp vs AAV2/8.mmp14.

MATERIALS AND METHODS

Animals and the corneal scarring model

C57BL/6 female mice aged from 12 to 16 weeks were used in this study. All procedures in animals were performed in accordance with the tenets of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) Statement for the Use of Animals and approved by the Research Unit Animal Care Ethics Committee.

Anesthesia was performed by intraperitoneal injection of 20 mg kg⁻¹ ketamine hydrochloride (Panpharma, Fougères, France) and 8.8 mg kg⁻¹ xylazine hydrochloride (Bayer Healthcare, Loos, France). Before surgery, atropine sulfate 1% ophthalmic solution (Alcon Laboratories Inc., Fort Worth, TX, USA) as well as 0.4% oxybuprocaine (Novartis Pharma Schweiz AG, Bern, Switzerland) were applied topically. Euthanasia was performed after inhalation of isoflurane, followed by dislocation of cervical vertebrae. All corneal surgeries were performed by the same surgeon to ensure consistency across specimens.

The murine full-thickness incision model was adapted from the penetrating keratectomy model described by Stramer *et al.*¹⁰ Briefly, a 0.75 mm full-thickness button of central cornea tissue including all three corneal tissue layers (epithelium, stroma and endothelium) was ablated. A 26-gauge needle was used to mark the area that was then removed with microdissecting scissors. This model allows fibrotic repair with differentiation of keratocytes into myofibroblasts (expression of α -SMA).

In preliminary experiments, we investigated several time points after wounding (D7, D14, D21 and D28). We finally focused on D14, as at this stage, corneal opacity was maximal.

Clinical grading of corneal opacity

The level of opacity in the cornea was measured with a slit-lamp every week after wounding, using a method previously described.³² Grade 0 was used to describe a completely clear cornea or one with trace opacity obliquely illuminated with slit-lamp biomicroscopy; grade 1 denoted more prominent opacity that did not interfere with the visualization of fine iris details; grade 2 denoted moderate obscuration of the iris and lens; and grade 3 denoted complete opacification of the stroma in the area of the ablation. Opacity grading was performed in a masked manner by two independent ophthalmologists trained in corneal examination.

Sample collection

For histology, eyes were collected and fixed with buffered 4% formaldehyde (LaboNord, Templemars, France) for 24 h, then rinsed with ethanol 70%, dehydrated and paraffin-embedded.

For immunohistochemistry, we used the periodate-lysine-paraformaldehyde technique described by Brenes *et al.*³³ Briefly, eyes were collected and fixed in periodate-lysine-paraformaldehyde solution for 3 h, then rinsed with physiological serum, dehydrated and paraffin-embedded.

For RNA analysis, corneas were excised from the eyes. Careful dissection of the stromal tissue was performed with microsurgery scissors. The entire corneal epithelium was then mechanically removed by gentle scraping with a scalpel. Samples were then flash-frozen into liquid nitrogen until further use.

Histopathology

Histopathology was performed on samples collected 14 days after wounding. Corneal cross sections that were 3 μ m thick were cut, deparaffinized and rehydrated in phosphate-buffered saline. Histological analysis (hematoxylin and eosin staining, Masson trichrome staining) was then conducted to evaluate neovascularization, edema, corneal thickness, neutrophil infiltration, fibroplasia and myofibroblast infiltration. Each parameter was scored from 0 to 3 using the following evaluation criterion. Neovascularization: microscopic observation of vascular spaces lined by flattened endothelial cells (neo-vessels) often containing red blood cells, in the corneal stroma, which was best evidenced by Masson trichrome staining. The number (density) and size of the vascular spaces were evaluated: grade 1, absence of neovessels; grade 2, some neovessels; and grade 3, numerous or large sized vessels. Edema: the histological appearance of stromal edema was characterized by a 'washed out' appearance of the corneal lamellae, which was best evidenced by Masson trichrome staining. The severity and extension of edema were graded using a three-step scale: grade 1, absent; grade 2, slight to moderate; and grade 3, severe. Corneal thickness: evaluated by comparison with controls in which grade 1, thinned cornea; grade 2, normal corneal thickness; and grade 3, increased corneal thickness. Neutrophils infiltration: observation of neutrophilic granulocytes in the corneal stroma in and around the lesions: grade 1, absence of neutrophils; grade 2, some neutrophils; and grade 3, numerous neutrophils. Fibroplasia: evaluation of the activation and proliferation of keratocytes (and myofibroblasts) in stromal healing: grade 1, slight and focal; grade 2, moderate; and grade 3, severe. Myofibroblasts: number and extension of the α -SMA-labeled (brown staining) cells in the corneal stroma. Group to group statistical analysis was then performed for each parameter (see statistical analysis section).

Production of AAV2/8.mmp14 vector

Plasmid SSV9.CMV.mmp14, used for the production of AAV2/8.mmp14, consists of the AAV2 inverted terminal repeats, between which lies the coding sequence for the murine recombinant MMP14 (rMMP14) complementary DNA flanked by the CMV promoter and the simian virus 40 polyadenylation signal. The AAV2/8.mmp14 vector was produced as described earlier³⁴ in the Vector Core at the University Hospital of Nantes (<http://www.vectors.nantes.inserm.fr>). The titer was determined using dot blot and is expressed as vg per ml.³⁵ The vector titer was 1×10^{13} vg per ml. The vector batch was characterized using a modified replication center assay.³⁵ No infectious adenovirus or rep-positive AAV was detected.

The efficacy of gene transfer in mouse cornea was first assessed using AAV-CMV-GFP (AAV2/8.gfp).³⁶ Corneal expression of AAV2/8.mmp14 was assessed using two methods: reverse transcriptase PCR with primers specifically recognizing rMMP14 (F: 5'-CGGGCGGATCCACCAT-3', R: 5'-GCCAGGCTTCG GGGCT-3') and primers recognizing both rMMP14 and MMP14 (MMP14 see reverse transcriptase-real time PCR section) to evaluate the overall change in MMP14 expression. An evaluation was performed at D7 and D14 after the injection for rMMP14. Non-injected corneas were used as a control for MMP14 mRNA. Expression levels were normalized as a ratio of the expression level of housekeeping genes.

Immunofluorescence was performed with anti-MMP14 mouse monoclonal antibody (clone VMA3317, AbCys S.A, Paris, France) as described in the immunochemistry section.

Stromal cornea delivery

Before the intracorneal injection, a single drop of 0.4% oxybuprocaine (Novartis Pharma Schweiz AG) was administered to the eye. The eye was fixed with a fine-toothed forceps and the 10 μ l vector solution (vector, fluorescein 0.005%, PBS) was injected using a sterile gas-tight microliter syringe (Hamilton Company, Reno, NV, USA) and a 33-gauge needle (Hamilton Company), after a Beaver blade (BD sclerotome multi-sided blade, Franklin Lakes, NJ, USA) was used to enter the superficial stroma. The injection was made at the superior

side, one-third off center, and was considered successful if a circular opacity centered on the corneal apex was formed during the injection. When this bleb extended across 3/4 of the surface of the cornea, no additional solution was injected and the needle was carefully removed. The bleb was visible for only a few hours. Perforation occurred occasionally; these eyes were excluded from evaluation. The inoculated animals were examined regularly by slit-lamp biomicroscopy. Mice were euthanized at various time points.

For the murine full-thickness incision assay, AAV was injected 10 h before the full-thickness incision.

Immunohistochemistry

The α -SMA expression was visualized using a Dako ARK peroxidase kit (K3954, Dako, Glostrup, Denmark). Corneal cross-sections of 3 μ m thick were cut, deparaffinized and rehydrated in PBS.

MMP14 staining was performed with a mouse monoclonal anti-MMP14 antibody (clone VM13317, Abcys, Paris, France). Corneal cross-sections of 3 μ m thick were cut, deparaffinized and rehydrated in PBS. Image-it Fx signal enhancer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) was applied for 30 min. The sections were then rinsed twice with PBS, 0.3% bovine serum albumin and incubated with primary mouse monoclonal anti-MMP14 antibody (1:100) for 1 h. Following washing, the sections were incubated for 1 h with Alexa fluor 488 antibody goat antimouse (1:200, Invitrogen), washed twice and incubated with Prolong Gold anti-fade reagent (Invitrogen).

Reverse transcriptase-real time PCR

Total RNA was extracted using the Qiagen MicroRNA extraction kit according to the manufacturer's recommendations (Qiagen, Valencia, CA, USA). RNA integrity was assessed with an Agilent 2000 nano-chip kit (Agilent, Santa Clara, CA, USA). The RNA integrity number was determined, and each sample used had an RNA integrity number of at least seven.

Reverse transcriptase-PCR was performed using the Invitrogen Superscript III VILO kit according to the manufacturer's recommendations (Invitrogen). Real-time PCR was performed on 50 pg complementary DNA in a Roche LightCycler 480 using Roche supermix for PCR (Roche, Meylan, France). PCR efficiency was determined for each primer set to calculate the expression ratio. Normalization was performed using three housekeeping genes (vimentine, tyrosine 3 monooxygenase, β -2 microglobulin). Primer sequences were as follows: α SMA (F: 5'-CCCAGCACCATGAAGATCAA-3', R: 5'-GCTGATCCA CATCTGCTGGA-3'), type I collagen (chain α 1: F: 5'-CGGCTCTGCTCC TCTTAG-3', R: 5'-CTGTCCAGGGATGCCATCT-3'), type III collagen (F: 5'-G GCCCTCCTGGTATTCCTG-3', R: 5'-GCCAATTCCTCCTATGCCAG-3'), MMP2 (F: 5'-CTGGAATGCCATCCCTGATAA-3', R: 5'-CAAACCTCACGCTCTTGA GACTTT-3'), TIMP2 (F: 5'-GACTGAGAAGGGAGGCTGGAG-3', R: 5'-GCA GACGTAGTGATCAGAGC-3'), MMP14 (F: 5'-TATGTGAAGACTTCATCACT-3', R: 5'-CCACTGCCCTCCTCATCC-3'), vimentine (F: 5'-CAAGTCCAAGTT TGCTGACC-3', R: 5'-CTCCGGTACTCGTTTGACTC-3'), tyrosine 3 monooxygenase (F: 5'-TGGATAAGAGTGAGCTGGTACA-3', R: 5'-CGTGTCC CTGCTCTGTTACG-3'), β -2 microglobulin (F: 5'-TTCTGGTCTGTCTCAC TGA-3', R: 5'-CAGTATGTTCCGGCTTCCCATTC-3'). The fold-change in gene expression was calculated using REST 2009 software (Qiagen).

Statistical analysis

For all experiments except principal component analysis, group-to-group comparisons were performed using a non-parametric Wilcoxon test. Significance was reached for $P < 0.05$. For principal component analysis, we computed the correlation matrix between the six histological variables (neovascularization, edema, corneal thickness, neutrophil infiltration, fibroplasia and myofibroblast infiltration) as Pearson's correlation coefficient by using the generic function in R statistical software (R language, <http://www.r-project.org/index.html>).^{37,38}

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank M Allouche and B Couderc for helpful comments and critical reading. This work was supported by the Fondation de l'Avenir (study ET7-474), la Fondation de France (grants 'Berthe Fouassier': 2008002176, 2009002318 and 2009002320), the Laboratoires Pierre Fabre and the INSERM. We also thank MA Dausson and J Bernaud from the Centre de Recherche de Chirurgie Expérimentale Claude Bernard (CHU Purpan, Toulouse, France) for animal care and experiments.

- O'Brart DP, Lohmann CP, Klonos G, Corbett MC, Pollock WS, Kerr-Muir MG *et al*. The effects of topical corticosteroids and plasmin inhibitors on refractive outcome, haze, and visual performance after photorefractive keratectomy. A prospective, randomized, observer-masked study. *Ophthalmology* 1994; **101**: 1565–1574.
- Vigo L, Scandola E, Carones F. Scraping and mitomycin C to treat haze and regression after photorefractive keratectomy for myopia. *J Refract Surg* 2003; **19**: 449–454.
- Muller M, Meltendorf C, Mirshahi A, Kohnen T. Use of multilayer amniotic membrane as first therapy for penetrating corneal ulcers. *Klin Monbl Augenheilkd* 2009; **226**: 640–644.
- Csutak A, Silver DM, Tozser J, Hassan Z, Berta A. Urokinase-type plasminogen activator to prevent haze after photorefractive keratectomy, and pregnancy as a risk factor for haze in rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; **45**: 1329–1333.
- Gillies MC, Garrett SK, Shina SM, Morlet N, Taylor HR. Topical interferon alpha 2b for corneal haze after excimer laser photorefractive keratectomy. The Melbourne Excimer Laser Group. *J Cataract Refract Surg* 1996; **22**: 891–900.
- Moller-Pedersen T, Cavanagh HD, Petroll WM, Jester JV. Neutralizing antibody to TGFbeta modulates stromal fibrosis but not regression of photoablative effect following PRK. *Curr Eye Res* 1998; **17**: 736–747.
- Sivak JM, Fini ME. MMPs in the eye: emerging roles for matrix metalloproteinases in ocular physiology. *Prog Retin Eye Res* 2002; **21**: 1–14.
- Fini ME, Cook JR, Mohan R. Proteolytic mechanisms in corneal ulceration and repair. *Arch Dermatol Res* 1998; **290** (Suppl): S12–S23.
- Saika S, Yamanaka O, Sumioka T, Miyamoto T, Miyazaki K, Okada Y *et al*. Fibrotic disorders in the eye: targets of gene therapy. *Prog Retin Eye Res* 2008; **27**: 177–196.
- Stramer BM, Zieske JD, Jung JC, Austin JS, Fini ME. Molecular mechanisms controlling the fibrotic repair phenotype in cornea: implications for surgical outcomes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; **44**: 4237–4246.
- Murphy G, Nagase H. Progress in matrix metalloproteinase research. *Mol Aspects Med* 2008; **29**: 290–308.
- Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res* 2006; **69**: 562–573.
- Mohan R, Chintala SK, Jung JC, Villar WV, McCabe F, Russo LA *et al*. Matrix metalloproteinase gelatinase B (MMP-9) coordinates and effects epithelial regeneration. *J Biol Chem* 2002; **277**: 2065–2072.
- Jung JC, Huh MI, Fini ME. Constitutive collagenase-1 synthesis through MAPK pathways is mediated, in part, by endogenous IL-1alpha during fibrotic repair in corneal stroma. *J Cell Biochem* 2007; **102**: 453–462.
- Gordon GM, Ledee DR, Feuer WJ, Fini ME. Cytokines and signaling pathways regulating matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) expression in corneal epithelial cells. *J Cell Physiol* 2009; **221**: 402–411.
- Lin M, Jackson P, Tester AM, Diaconu E, Overall CM, Blalock JE *et al*. Matrix metalloproteinase-8 facilitates neutrophil migration through the corneal stromal matrix by collagen degradation and production of the chemotactic peptide Pro-Gly-Pro. *Am J Pathol* 2008; **173**: 144–153.
- Ye HQ, Maeda M, Yu FS, Azar DT. Differential expression of MT1-MMP (MMP-14) and collagenase III (MMP-13) genes in normal and wounded rat corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; **41**: 2894–2899.
- Li DQ, Shang TY, Kim HS, Solomon A, Lokeshwar BL, Pflugfelder SC. Regulated expression of collagenases MMP-1, -8, and -13 and stromelysins MMP-3, -10, and -11 by human corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; **44**: 2928–2936.
- Saika S, Yamanaka O, Okada Y, Miyamoto T, Kitano A, Flanders KC *et al*. Effect of overexpression of PPARgamma on the healing process of corneal alkali burn in mice. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007; **293**: C75–C86.
- Bemelms AP, Arsenijevic Y, Majo F. Efficient lentiviral gene transfer into corneal stroma cells using a femtosecond laser. *Gene Ther* 2009; **16**: 933–938.
- Holzer MP, Rabsilber TM, Auffarth GU. Femtosecond laser-assisted corneal flap cuts: morphology, accuracy, and histopathology. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; **47**: 2828–2831.
- Bitto A, Minutoli L, Galeano MR, Altavilla D, Polito F, Fiumara T *et al*. Angiotensin-1 gene transfer improves impaired wound healing in genetically diabetic mice without increasing VEGF expression. *Clin Sci (Lond)* 2008; **114**: 707–718.
- d'Ortho MP, Will H, Atkinson S, Butler G, Messent A, Gavrilovic J *et al*. Membrane-type matrix metalloproteinases 1 and 2 exhibit broad-spectrum proteolytic capacities comparable to many matrix metalloproteinases. *Eur J Biochem* 1997; **250**: 751–757.
- Itoh Y, Ito N, Nagase H, Evans RD, Bird SA, Seiki M. Cell surface collagenolysis requires homodimerization of the membrane-bound collagenase MT1-MMP. *Mol Biol Cell* 2006; **17**: 5390–5399.
- Hinz B. Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. *J Invest Dermatol* 2007; **127**: 526–537.
- Grinnell F, Zhu M, Carlson MA, Abrams JM. Release of mechanical tension triggers apoptosis of human fibroblasts in a model of regressing granulation tissue. *Exp Cell Res* 1999; **248**: 608–619.
- Azar DT. Corneal angiogenic privilege: angiogenic and antiangiogenic factors in corneal avascularity, vasculogenesis, and wound healing (an American Ophthalmological Society thesis). *Trans Am Ophthalmol Soc* 2006; **104**: 264–302.
- Azar DT, Casanova FH, Mimura T, Jain S, Chang JH. Effect of MT1-MMP deficiency and overexpression in corneal keratocytes on vascular endothelial cell migration and proliferation. *Curr Eye Res* 2008; **33**: 954–962.
- Onguchi T, Han KY, Chang JH, Azar DT. Membrane type-1 matrix metalloproteinase potentiates basic fibroblast growth factor-induced corneal neovascularization. *Am J Pathol* 2009; **174**: 1564–1571.
- Mimura T, Han KY, Onguchi T, Chang JH, Kim TI, Kojima T *et al*. MT1-MMP-mediated cleavage of decorin in corneal angiogenesis. *J Vasc Res* 2009; **46**: 541–550.
- Ellenberg D, Azar DT, Hallak JA, Tobaigy F, Han KY, Jain S *et al*. Novel Aspects of corneal angiogenic and lymphangiogenic privilege. *Prog Retin Eye Res* 2010; **29**: 208–248.
- Fantes FE, Hanna KD, Waring III GO, Pouliquen Y, Thompson KP, Savoldelli M. Wound healing after excimer laser keratomileusis (photorefractive keratectomy) in monkeys. *Arch Ophthalmol* 1990; **108**: 665–675.
- Brenes F, Harris S, Paz MO, Petrovic LM, Scheuer PJ. PLP fixation for combined routine histology and immunocytochemistry of liver biopsies. *J Clin Pathol* 1986; **39**: 459–463.
- Rabinowitz JE, Rolling F, Li C, Conrath H, Xiao W, Xiao X *et al*. Cross-packaging of a single adeno-associated virus (AAV) type 2 vector genome into multiple AAV serotypes enables transduction with broad specificity. *J Virol* 2002; **76**: 791–801.
- Salvetti A, Orevi S, Chadeuf G, Favre D, Cherel Y, Champion-Arnaud P *et al*. Factors influencing recombinant adeno-associated virus production. *Hum Gene Ther* 1998; **9**: 695–706.
- Stieger K, Colle MA, Dubreil L, Mendes-Madeira A, Weber M, Le Meur G *et al*. Subretinal delivery of recombinant AAV serotype 8 vector in dogs results in gene transfer to neurons in the brain. *Mol Ther* 2008; **16**: 916–923.
- Pearson K. Mathematical contributions to the theory of evolution. III. Regression, heredity and panmixia. *Philos Trans Royal Soc London A* 1896; **187**: 253–318.
- Pearson K. On lines and planes of closest fit to systems of points in space. *Philos Mag* 1901; **2**: 559–572.

III.1.3. Conclusion

Ce travail a permis de montrer que la surexpression d'une métalloprotéinase par l'utilisation de vecteur viral pourrait induire une réduction de la sévérité de l'opacité observée après un traumatisme cornéen. Cette réduction s'accompagne d'une diminution de l'expression de l' α -SMA et du collagène de type III, principaux marqueurs de fibrose. De ce fait, ces résultats montrent que la surexpression de MMPs par l'utilisation d'AAV en thérapie génique pourrait constituer une stratégie nouvelle dans le traitement des opacités cornéennes. Par ailleurs, en plus du fait que la cornée soit un tissu privilégié d'un point de vue immunitaire, cette stratégie comporte deux avantages principaux : l'utilisation d'AAV et celle d'une métalloprotéinase membranaire. En effet, comparé à d'autres vecteurs viraux, les AAV ont l'avantage d'être peu immunogènes pour l'homme. Ainsi leur utilisation est mieux tolérée par l'organisme que d'autres vecteurs viraux comme les adénovirus. De plus, l'utilisation d'une métalloprotéinase transmembranaire permet d'avoir une action péricellulaire et donc « locale » du fait de sa situation à la surface des cellules.

III.2. Deuxième approche thérapeutique: réduction de l'opacité cornéenne par inhibition de la maturation du collagène : les protéinases Tolloïdes

III.2.1. Objectifs

Le second aspect thérapeutique porte sur un travail qui a pour but d'empêcher le dépôt de collagène de type III en inhibant des protéinases responsables de sa maturation. Notre choix s'est porté sur la famille des protéinases Tolloïdes, qui possèdent un large spectre d'action au niveau MEC. Elles interviennent notamment dans la maturation des collagènes interstitiels. Notre hypothèse est que l'inhibition de l'activité de ces enzymes dans le tissu cicatriciel va entraîner un défaut de maturation du collagène nouvellement synthétisé qui va être ensuite dégradé par d'autres enzymes de la MEC.

La première étape consiste d'abord à identifier les protéinases Tolloïdes et leurs activateurs (PCPEs) présents au niveau de la cornée normale. Cette expérience est suivie ensuite par la caractérisation de l'évolution de l'expression de ces mêmes protéines au cours de la cicatrisation cornéenne. Ceci a pour but de sélectionner parmi les protéinases Tolloïdes et/ou leurs activateurs, les meilleures cibles à inhiber afin de réduire le dépôt de collagène observé lors de la cicatrisation de la cornée.

III.2.2. Résultats

L'étude portant sur la description de l'expression des protéinases Tolloïdes et de leurs activateurs au cours de la cicatrisation cornéenne va faire l'objet d'une soumission dans la revue *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. Les résultats sont présentés ci-dessous.

Article II

Up-regulation of bone morphogenetic protein-1/mammalian tolloid and procollagen C-proteinase enhancer-1 in corneal scarring

D. Massoudi^{1,2}, P. Fournié^{1,2,3}, A. Erraud^{1,2}, M. Malbouyres⁴, C. Moali⁴, D.J.S. Hulmes⁴, F. Malecaze^{1,2,3} and S. Galiacy^{1,2}

¹INSERM U563, CHU Purpan, Toulouse, France;

²EA4555, Université Toulouse III Paul Sabatier, Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan, Toulouse, France;

³CHU Toulouse, Hôpital Purpan, Service d'Ophtalmologie, Toulouse, France ;

⁴Institut de Biologie et Chimie des Protéines, CNRS/Université de Lyon FRE3310, Lyon, France.

Supported by the Agence Nationale de la Recherche, the Région Rhône-Alpes, the Centre National de la Recherche Scientifique and the Université Claude Bernard Lyon 1

Corresponding author: Stéphane Galiacy, EA 4555, INSERM / Université Paul Sabatier UMR 1043, BP 3028, 31024 Toulouse Cedex 3, France; stephane.galiacy@inserm.fr.

Abstract

Purpose:

Methods:

Results:

Conclusions:

Introduction

Corneal scarring, or haze, is the major complication of refractive surgery and has become an important concern in ophthalmology¹⁻⁵. Such scarring results from improper wound healing following surgery but also from other forms of trauma or infections. Corneal scars are associated with a loss of visual acuity and with blindness in the most severe cases. Due to the difficulties in anticipating and treating corneal haze, corneal transplantation remains the most efficient treatment available so far but also suffers from major drawbacks (lack of donors, graft rejection).

Corneal wound healing is a complex process orchestrated mainly by growth factors, cytokines and extracellular proteases. Among growth factors, IL-1 α , TGF- β 2 and PDGF have been assigned important roles and can diffuse from their site of production in the epithelial layer towards the stroma in the case of epithelial injury and basement membrane disruption⁶. However, persistent epithelial-stromal interactions are known to have deleterious effects on the healing process and are often responsible for the observed failures of photorefractive keratectomy (PRK). The surgical procedure known as laser-assisted in situ keratomileusis (LASIK) has been developed to avoid the development of central haze and is now the most frequently performed procedure in the world. In LASIK, basement membrane disruption and epithelial-stromal interactions are limited to the flap margin at the periphery of the cornea with no or little occurrence of central haze².

Extracellular proteases have also been implicated in wound healing, where they can play various roles, ranging from synthesis/degradation of extracellular matrix proteins, activation/inactivation of cytokines and growth factors to the modulation of cell-matrix interactions and of cell phenotype⁷. These proteases are provided by the tear fluid, sparse inflammatory cells invading the cornea from the surrounding limbus, injured epithelial cells and stromal cells which, depending on their state of activation, are called keratocytes,

fibroblasts or myofibroblasts. While MMPs and serine proteases from the plasmin system have attracted most of the attention^{2, 8, 9}, the proteases involved in the reconstitution of the basement membrane, in the synthesis of the provisional extracellular matrix allowing cell migration and, at later stages, in the synthesis of the mature scar tissue, have been studied to a much lesser extent. The main proteases involved in matrix protein maturation are the bone morphogenetic protein-1 (BMP-1)/tolloid-like proteinases, a small family of four metalloproteinases¹⁰: BMP-1, mammalian tolloid (mTLD), mammalian tolloid like 1 (mTLL-1) and mammalian tolloid like 2 (mTLL-2). (It should be noted that BMP-1 and mTLD are alternatively spliced products of the same gene.) In particular, these proteinases are involved in the proteolytic maturation of the fibrillar procollagens. In cornea, these include procollagens I and V, the most abundant components of corneal stroma, as well as procollagen III, a transient marker of the fibrotic evolution of corneal healing. More specialized roles in procollagen processing are played by the procollagen N-proteinases (ADAMTS-2, 3 and 14¹¹) and by the meprin proteinases which have recently shown to be able to be involved in propeptide processing of procollagen III¹².

Noteworthy, the BMP-1/tolloid-like proteinases are assisted during collagen maturation by two enhancing proteins, the procollagen C-proteinase enhancers (PCPE-1, PCPE-2), which lack intrinsic catalytic activity but can activate C-propeptide removal by tolloid-like proteinases by up to 20-fold^{13, 14}. Despite the prominent roles played by tolloid-like proteinases in collagen fiber formation, their direct implication in wound healing and scarring has never been studied. However, there is some evidence that BMP-1/tolloid-like proteinases could be involved in the excessive accumulation/disorganization of collagen fibers that is the hallmark of fibrotic processes. For example, these enzymes have been found to be up-regulated in a model of cardiac fibrosis¹⁵ and recombinant mTLD seems to promote

renal fibrosis in rats with chronic kidney disease¹⁶. In addition, PCPE-1 has also been found to be up-regulated in a model of cardiac fibrosis¹⁷ as well in CCl₄ induced liver fibrosis¹⁸.

Beside their role in collagen maturation, BMP-1/tolloid-like proteinases cleave a number of other proteins potentially important for collagen deposition, especially the pro-forms of lysyl oxidases involved in the formation of cross-links in collagen fibers, and also several small leucine-rich proteoglycans (including decorin, biglycan and mimecan/osteoglycin)^{7, 10, 19} which associate with collagen fibrils and regulate their diameter and spacing. In addition, these proteinases are involved in basement membrane and anchoring filament assembly through the cleavage of laminin 332²⁰ and of procollagen VII²¹, respectively. More recently, BMP-1/tolloid like proteinases were demonstrated to play a major role in the activation of TGF- β ²² and in the control of the angiogenic properties of perlecan²³, two important processes during corneal wound healing.

Due to these multiple substrates, it can be predicted that BMP-1/tolloid-like proteinases are absolutely required to synchronize multiple aspects of wound healing. This however has never been experimentally demonstrated. In the present study, we monitored the expression of the various isoforms of these proteinases and of their enhancers (PCPE-1 and 2) in normal and wounded mouse corneas. For the first time, the most important isoforms involved in corneal wound healing and scarring could be identified. Their expression was monitored up to 28 days post injury and was found to be very specific to the remodeling zone. We also demonstrated strong immuno-staining for BMP-1/mTLD and PCPE-1 in the injured areas of corneas from human patients, thereby confirming that BMP-1/tolloid like proteinases and PCPEs are important players during corneal wound healing and potentially participate in the development of stable corneal scars.

Materials and Methods

Animals and corneal scarring model

C57BL/6 female mice aged from 12 to 16 weeks were used in this study. All procedures in animals were performed in accordance with the tenets of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) Statement for the Use of Animals and approved by the Research Unit Animal Care Ethics Committee.

Anesthesia was performed by intraperitoneal injection of 20 mg/kg ketamine hydrochloride (Panpharma, France) and 8.8 mg/kg xylazine hydrochloride (Bayer Healthcare, France). Before surgery, atropine sulfate ophthalmic solution 1% (Alcon Laboratories, Inc, Fort Worth, TX) as well as 0.4% oxybuprocaine (Novartis Pharma Schweiz AG, Switzerland) were applied topically. Euthanasia was performed after inhalation of isoflurane, followed by dislocation of cervical vertebrae. All corneal surgeries were performed by the same surgeon to ensure consistency across specimens.

The murine full-thickness incision model was adapted from the penetrating keratectomy model described by Stramer et al.²⁴. Surgery was performed on the left eyes. Briefly, a 0.75 mm full-thickness button of central cornea tissue including all three corneal tissue layers (epithelium, stroma, and endothelium) was ablated. A 26-gauge needle was used to mark the area that was then removed with microdissecting scissors.

The animals were then euthanized at specific intervals of healing (Days 7, 14, 21 or 28). Each left eye was removed, embedded in Tissue-Tek® O.C.T.TM compound (Sakura Finetek Europe B.V., Zoeterwoude, NL) for histology procedures. Alternatively, the left eyes were dissected to collect the corneal epithelium and corneal stroma for mRNA extraction and subsequent RT-qPCR analysis.

The level of opacity in the cornea was measured with a slit-lamp every week after wounding, using a method previously described²⁵. Grade 0 was used to

describe a completely clear cornea or one with trace opacity when obliquely illuminated; grade 1 denoted more prominent opacity that did not interfere with the visualization of fine iris details; grade 2 denoted moderate obscuration of the iris and lens; and grade 3 denoted complete opacification of the stroma in the area of the ablation. Opacity grading was performed in a masked manner by two independent ophthalmologists trained in corneal examination.

Human samples

Two human corneas presenting permanent stromal scars were collected after transplantation. The first subject was a 40 year old male who had suffered from a mechanical (barbed wire) trauma. The subject was treated with antibiotics after initial trauma, then dexamethasone before cataract surgery. He was not anymore under treatment at the time of corneal transplantation 18 months after the initial trauma. The second subject was a woman, who had contracted a first corneal herpes virus infection at the age of 17. She underwent corneal transplantation 5 years after and was treated for several months before surgery with valaciclovir and dexamethasone. Corneas were embedded in Tissue-Tek® O.C.T.™ compound (Sakura Finetek Europe B.V., Zoeterwoude, NL) just after surgery.

Electronic microscopy

For transmission electron microscopy, corneas were fixed overnight at room temperature in 2.5% glutaraldehyde, 2% paraformaldehyde in 0.1 M sodium cacodylate pH7.4. After a few washes in 0.1M sodium cacodylate pH7.4, specimens were post-fixed in 1% osmium tetroxide 0.1M cacodylate pH7.4 for 45 min and then embedded in epoxy resin. To locate areas of interest, semi-thin sections stained with methylene blue/Azur II were first observed histologically using a Leica light microscope equipped with a digital camera

(Nikon). Ultra thin sections were treated with uranyl acetate and lead citrate and then examined in a Philips CM120 electron microscope equipped with a GATAN Orius 200 2Kx2K digital camera (Centre Technique des Microstructures, Université Claude Bernard Lyon I, Villeurbanne, France). Collagen fibril diameters were measured using ImagJ software, selecting fibrils in (near) transverse section using the ellipse function with the minimum dimension was used as a measure of fibril diameter.

Immunohistochemistry

The following antibodies and dilutions were used. Mouse samples: rat monoclonal IgG1 anti-mouse PCPE-1 (R&D MAB2239) 1:100; AlexaFluor 555 goat anti-rat IgG 1:400 (Invitrogen™, Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA); rat monoclonal IgG2b anti-human BMP-1 (R&D MAB 1927) 1:100; rat IgG1 isotype control (R&D MAB005), rat IgG2b isotype control (R&D MAB0061), rabbit serum (Sigma R9133). Human samples: rat monoclonal IgG2b anti-human BMP-1 (R&D MAB 1927) 1:100, rabbit polyclonal IgG anti-human PCPE-1 (Sigma P6243) 1:200, AlexaFluor 546 goat anti-rabbit IgG (Invitrogen™, Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) 1:400.

Briefly, corneal cryostat sections (7 to 10µm thick) were used. Samples were fixed with paraformaldehyde 4% at 4°C, then permeabilized with Triton X-100. First and second antibodies were incubated for 2 and 1 hours, respectively, at room temperature in a humidified dark chamber. All immunolabeling was done under the same conditions, together with two simultaneous controls (no first antibody or using an appropriate isotype control). Final mounting of tissue sections was done with Prolong® Gold antifade reagent with DAPI (Invitrogen™, Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA). Sections were observed 24 hours later, using the 10x or 40x objective of a Leica DMR microscope. Images were acquired using a Leica DFC 300 FX camera and IM50 software (Leica), at 400 ms for the 10X objective and

260 ms for the 40x objective. These exposure times were determined from the control conditions (non-wounded) and applied to the other samples.

Reverse transcriptase-real time polymerase chain reaction

Total RNA was extracted using the Qiagen MicroRNA extraction kit according to the manufacturer's recommendations (Qiagen, USA). RNA integrity was assessed with an Agilent 2000 nano-chip kit (Agilent, USA). The RNA Integrity number (RIN) was determined, and each sample used had an RIN of at least 7.

Reverse transcriptase-PCR was performed using the Invitrogen Superscript III VILO kit according to the manufacturer's recommendations (Invitrogen, USA). Real-time PCR was performed on 50 pg cDNA in a Roche LightCycler 480 using Roche supermix for PCR (Roche, France). PCR efficiency was determined for each primer set to calculate the expression ratio. Normalization was performed using three housekeeping genes (vimentin, tyrosine 3 monooxygenase, beta 2 microglobulin). Primer sequences were: BMP-1/mTLD (F: GTCTATGAAGCCATTTGCGG, R: GACGCTCAATCTCAAAGGAC), PCPE-1 (F: CTCAAACCAGGTGATCATGC, R: AGAGATGGGGCTAGGGGCCT), PCPE-2 (F: CGCCAGAGAGACCTGTTTTTC, R: CCTCAGGAAGTGTGATTTTC), TLL-1 (F: GGCTGGAGTTCTTACATCTACG, R: CTTATCTCCCCTCCACAAATCG), TLL-2 (F: GTATATGAAGCCATGTGTGG, R: GCCTTTCGATCTCGAAGGAC), COL1A1 (F: CGGCTCCTGCTCCTCTTAG, R: CTGTCCAGGGATGCCATCT), COL3A1 (F: GGCCCTCCTGGTATTCCTG, R: GCCAATTCCTCCTATGCCAG) vimentin (F: CAAGTCCAAGTTTGCTGACC, R: CTCCGGTACTCGTTTGACTC), tyrosine 3 monooxygenase (F: TGGATAAGAGTGAGCTGGTACA, R: CGTGTCCCTGCTCTGTTACG), beta-2 microglobulin (F: TTCTGGTGCTTGTCTCACTGA, R: CAGTATGTTTCGGCTTCCCATTC). Concerning the epithelium, we used three other

housekeeping genes: ubiquitin C (F: AACCCACAGTATATCTTTGGCG, R: CCCTCACTAGGTTCGATGACTTC), tatabox (F: TGCCGAAAGATGCACAGATGA, R: TGTTGTCACATATCGGAAGGC) and beta actin (F: CGGTCCACCCGCCACCAGTTCGCCA, R: TCCCACCATCACACCCTGGTGCCTA). The fold-change in gene expression was calculated using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ ratio. All PCR products were checked by sequencing (Millegen, Toulouse, France).

Statistical analysis

For all experiments group-to-group comparisons were performed using a non-parametric Wilcoxon test.

Results

Wound healing was followed in mouse corneas after full-thickness incision, using the model described by Stramer et al (2003)²⁴. As we have previously described²⁶, by microscopic examination, histology and immunolabeling for α -smooth muscle actin, this model allows fibrotic repair with differentiation of keratocytes into myofibroblasts, with maximum corneal opacity occurring 14 days post-surgery.

We also examined control and wounded corneas (day 14) by transmission electron microscopy (Fig. 1). In control corneas, the epithelial basement membrane was well defined and was associated with numerous hemi-desmosomes on the underlying epithelium (Fig. 1A). The stroma showed the typical multi-layer organization (Fig. 1C) with collagen fibrils, of 27.4 \pm 3.9 nm (n=288) uniform diameter (Fig. 1E), interspersed by extended quiescent keratocytes. In the wounded corneas, both the epithelium and endothelium had reformed well (not shown). There was also an almost continuous basement membrane, which in some areas seemed somewhat diffuse compared to control corneas (Fig. 1B). The collagen fibrils in the stroma of the wounded corneas were relatively disorganized, and there was widespread cellular infiltration and keratocyte activation (Fig. 1D). In contrast, there were no significant differences, compared to control corneas, in the appearance or diameter of the collagen fibrils (diameter 28.1 \pm 3.9 nm, n=245); Fig. 1F).

In initial studies by Q-PCR on control corneas, expression of BMP-1/mTLD and mTLL-1 was detected in both epithelium and stroma (Table 1). Expression of mTLL-1 was relatively weak however, while mTLL-2 was not detected at all. In addition, both PCPE-1 and PCPE-2 were detected in both epithelium and stroma. In control stroma, PCPE-1 mRNA levels were 4-fold higher than PCPE-2 mRNA, and about 5-fold higher than BMP-1/mTLD. In control epithelium, PCPE-1 was still the most expressed mRNA, where levels were about 2-fold higher than PCPE-2 and about 3-fold higher than BMP-1/mTLD.

In a previous study (Ref Galiacy 2010), we showed that following surgery after 14 days, there was no change in COL1A1 mRNA expression, while COL3A1 mRNA expression was increased. We analyzed again this data set to investigate relative level of expression of both COL1A1 and COL3A1 mRNA. Thus, we demonstrated that in control mice, COL1A1 mRNA represent 8386 ± 1051 % of HKG expression level, while COL3A1 mRNA represent 7.69 ± 2.13 % of HKG expression level. Thus in control stroma, COL1A1 mRNA expression levels were approximately 1000-fold greater than for COL3A1 mRNA. In contrast, 14 days after surgery, the COL1A1:COL3A1 expression ratio fell to about 30-fold (10838 ± 2080 and 275.11 ± 106 % of HKG expression level for COL1A1 and COL3A1 mRNA respectively).

In this study, we showed that collagen III expression remained high throughout the follow-up period after surgery, falling only slightly at 28 days (Fig. 2A). Similarly, expression of BMP-1/mTLD was also elevated in the stroma, though to a much smaller extent (Fig. 2B). These increases persisted throughout the follow-up period, and were statistically significant at days 7, 14 and 28 ($p < 0.006$; 0.005 and 0.009 respectively). Expression of PCPE-1 in the stroma was also consistently increased (statistically significant at days 14, 21 and 28; $p < 0.0007$, 0.007 and 0.001 respectively) though surprisingly expression of PCPE-2 (albeit starting from a relatively low level; Table 1) was markedly reduced ($p < 7.542e-09$; 0.0015 ; $9.97e-05$ and 0.00017 for D7 to D28 respectively; Fig. 2B). Similar changes in expression were seen in the corneal epithelium, though the increase in BMP-1 expression was much greater than in the stroma (Fig. 2C).

By immunohistochemistry, relatively high levels of BMP-1/mTLD protein were detected in the epithelium of control corneas, with only weak labeling in the stroma (Fig. 3A). For PCPE-1 (Fig. 3E), there was weak labeling in both the epithelium and the stroma. Seven days after surgery, there was a strong increase in BMP-1 expression in the stroma that was localized to the wound area (Fig. 3B). Such labeling was also seen at day 21 (Fig. 3C),

though was somewhat less intense. By day 28, increased expression of BMP-1 in the wound area persisted, but was relatively weak (Fig. 3D). Throughout the follow-up period, expression of BMP-1 in the epithelium remained strong. With regard to PCPE-1, again there was a strong increase in protein expression, confined to the wound area of the stroma, at day 7 (Fig. 3F). This persisted at days 21 and 28, though unlike BMP-1, expression of PCPE-1 remained high throughout (Figs 3G, H). Also unlike BMP-1, by immunohistochemistry there was no expression of PCPE-1 protein in the epithelium; In contrast PCPE-1 mRNA expression in the epithelium was detected by Q-PCR (Table 2C).

Finally, we asked whether BMP-1/tolloid-like proteinases were also up-regulated in corneal scarring in human pathologies. Two types of lesion were investigated. First cornea suffered from a central mechanical trauma (Fig. 4A). 18 months after unsuccessful treatment, cornea was removed for corneal transplantation. Second cornea was affected by herpetic keratitis (Fig. B). As in the mouse model, increased expression of both BMP-1 and PCPE-1 were seen in the scar area, in both cases (Fig. 4 C-F). However, unlike in mouse corneas, in human corneas PCPE-1 immunostaining was also seen in the epithelium.

Discussion

Here we show, for the first time, that corneal repair following full-depth incision is associated with an up-regulation, in the wound region, in the expression of both BMP-1/mTLD proteinase and its enhancer PCPE-1. While such up-regulation would be expected based on the need to synthesize a new extracellular matrix following such an injury, the extent to which it contributes to the observed corneal scarring is unclear. Various phenomena are thought to contribute to the appearance of corneal scarring²⁷⁻³⁰. One factor is the increased light scattering due to the presence of inflammatory cells and activated keratocytes, involving changes in cell crystallins that alter their refractive properties²⁹. In the mouse model described here, keratocyte differentiation into myofibroblasts was previously demonstrated as shown by the expression of α -smooth muscle actin²⁶ and the electron microscopy analysis carried out here shown here shows clear evidence of cellular infiltration into the wound zone. Since BMP-1 is known to be involved in the activation of TGF- β ²², and since differentiation of corneal keratocytes into myofibroblasts, which is triggered by TGF- β , is associated with reduced expression of corneal crystallins²⁹, this is one way in which overexpression of BMP-1/mTLD could contribute to corneal haze. Another factor contributing to scarring is the increased disorganization of the normally highly organized stromal collagen network that results in increased destructive interference of scattered light, and hence reduced transparency^{27, 31, 32}. This might involve increases in collagen fibril diameter and in the interfibrillar spacing, both of which are regulated by the small leucine rich proteoglycans (including lumican, keratocan, mimecan/osteoglycin, decorin and biglycan in the cornea³³). Changes in the relative proportions of these proteoglycans during corneal wound healing in a rabbit model have been observed³⁴. Increases in corneal thickness and total amount of extracellular matrix deposition, including collagen, could also increase scattering, though again in the rabbit model there is no evidence of excessive collagen deposition^{35, 36}. In the observations

reported here using the mouse model, there were no differences in fibril diameter compared to controls. There was however increased disorganization of the collagen fibrils. Since BMP-1 is known to intervene at several levels in collagen fibril assembly^{7, 10} (procollagen processing, proteoglycan activation, lysyl oxidase induced cross-linking), there are a number of ways by which increased BMP-1 and PCPE-1 expression might lead to corneal scarring. Further studies are required (currently in progress) using specific inhibitors and gene inactivation to study the effects of reducing proteolytic activity by this proteinase/enhancer system.

Tissue repair is dependent on controlling the balance between synthesis and degradation of the extracellular matrix. In the past, much attention has been paid to degradation, most notably involving different members of the matrix metalloproteinase family. MMP-9 expression, for example, involved in basement membrane remodeling, is up-regulated in rabbit corneal epithelial cells during migration and closure of the wound³⁷. It is also present during epithelial ingrowth in human corneas after laser-assisted in situ keratomileusis³⁸. In the stroma, both MMP-2 and MMP-14 are expressed, both of which are up-regulated using the same mouse wound healing model as used here²⁶. Thus the increased expression of BMP-1/mTLD and PCPE-1 reported here must be seen in the context of an overall increase in extracellular protease activity.

The relatively strong expression of BMP-1 in the corneal epithelium is intriguing. Since control corneas also display strong BMP-1/mTLD immunostaining, it seems likely that BMP-1/mTLD plays a role in corneal epithelial homeostasis. Somewhat different observations have been made in fetal skin, where BMP-1/mTLD expression is found in the basal layer of the epidermis²⁰. To our knowledge, the status of BMP-1/mTLD expression in adult skin is not known. Such epithelial localization would be consistent with the known roles of BMP-1 in cleavage of the basement membrane proteins perlecan²³ and laminin 332^{20, 39}, as well as in processing of procollagen VII leading to the formation of anchoring fibrils

linking the basement membrane to the underlying dermis²¹. The extent to which BMP-1/mTLD of corneal epithelial origin might be involved in processing of fibrillar procollagens is unknown. Since skin fibroblasts are known to synthesize BMP-1/tolloid-like proteinases in cell culture conditions²¹, it is likely that corneal keratocytes also synthesize BMP-1 in situ. It is interesting to note that BMP-1/mTLD is secreted in active form by fibrogenic cells in culture, while the form secreted by keratinocytes in culture retains the propeptide region and is therefore inactive^{21, 40}. This suggests that a further step of activation would be necessary for BMP-1/mTLD of epithelial origin. In addition, previous studies⁴⁰ have shown that skin keratinocytes do not express PCPE-1, consistent with the immunohistochemical observations reported here for cornea, albeit that low levels of mRNA expression were detected by Q-PCR.

While expression of PCPE-1 in the cornea was found to increase during wound healing, that of PCPE-2, albeit present at much lower levels than PCPE-1, was found to decrease. Previous studies suggested that PCPE1 and 2 could have tissue-specificity expression (Ref Greenspan 2002 et thymus Heinzel K 2007), which could avoid substrate-binding site competition of both proteins. Our data confirm these observations and suggest that PCPE1 and PCPE2 should have different roles, which still need to be elucidated.

Finally, BMP-1 and PCPE-1 were also found to be up-regulated in two different pathological conditions affecting human corneas. BMP1/mTLD is expressed in normal parts of the cornea both in human and mouse corneal epithelium, suggesting a role in epithelial homeostasis. Its strong overexpression during corneal wound healing indicates that this protease might be a key regulator of several biological pathways (ref different actions). It still needs to be demonstrated if its association with PCPE1 in the stroma could control collagen deposition in the scar tissue and as such could represent a potential therapeutic target to cure corneal scars.

Figure Legends

Figure 1. Transmission electron microscopy of control (A,C,E) and wounded corneas (B,D,F), the latter 14 days after surgery. (A,B) epithelial basement membrane region, scale bars 200 nm; (C,D) stroma, scale bars 2 μ m; (E,F) stroma, high magnification, scale bars 200 nm.

Figure 2. Q-PCR analysis of fold change in gene expression in the stroma (A,B) and (C) epithelium during mouse corneal wound repair. (A) Collagen III, (B, C) BMP-1/mTLD, PCPE-1 and PCPE-2.

Figure 3. Immunohistochemistry of BMP-1/mTLD (A-D) and PCPE-1 (E-H) expression in control (A-E) and wounded corneas, the latter at days 7 (B and F), 21 (C and G) and 28 (D and H) respectively. Scale bar 25 μ m. DAPI-staining nuclei in blue.

Figure 4. Expression of BMP-1/mTLD and PCPE-1 in human corneal lesions. (A-C) 18 months after mechanical trauma, (B-F) 5 years of herpetic keratitis. BMP1/mTLD expression in B and E; PCPE1 expression in C and F. Scale bar 100 μ m. DAPI-staining nuclei in blue.

Table 1. mRNA expression levels in mouse corneal epithelium and stroma, normalized to a set of housekeeping genes, for control (non-wounded) and wounded corneas up to 28 days post-surgery.

EPITHELIUM	mRNA expression levels (% HKG \pm s.e.m)				
<i>Name</i>	<i>Control</i>	<i>D7</i>	<i>D14</i>	<i>D21</i>	<i>D28</i>
BMP-1/mTLD	3.07 (0.1)	8.78 (1.26)	11.58 (2.89)	7.86 (1.32)	3.98 (0.62)
TLL-1	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03
TLL-2	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
PCPE-1	8.47 (0.32)	9.06 (1.96)	13.18 (1.47)	17.24 (2.49)	13.61 (1.59)
PCPE-2	4.39 (0.21)	1.25 (0.48)	0.72 (0.15)	0.90 (0.23)	1.41 (0.34)

STROMA	mRNA expression levels (%o HKG \pm s.e.m.)				
<i>Name</i>	<i>Control</i>	<i>D7</i>	<i>D14</i>	<i>D21</i>	<i>D28</i>
BMP-1/mTLD	4.05 (0.32)	6.25 (0.66)	5.87 (0.56)	4.61 (0.53)	5.12 (0.24)
TLL-1	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03
TLL-2	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
PCPE-1	19.88 (1.11)	25.88 (2.62)	27.96 (1.88)	27.17 (2.93)	30.84 (2.59)
PCPE-2	5.76 (0.67)	1.09 (0.13)	2.57 (0.41)	1.94 (0.46)	1.95 (0.44)

References

1. Jester JV, Petroll WM, Cavanagh HD. Corneal stromal wound healing in refractive surgery: the role of myofibroblasts. *Prog Retin Eye Res.* 1999;18:311-356.
2. Fini ME, Stramer BM. How the cornea heals: cornea-specific repair mechanisms affecting surgical outcomes. *Cornea.* 2005;24:S2-S11.
3. Dawson DG, Edelhauser HF, Grossniklaus HE. Long-term histopathologic findings in human corneal wounds after refractive surgical procedures. *Am J Ophthalmol.* 2005;139:168-178.
4. Foster A, Resnikoff S. The impact of Vision 2020 on global blindness. *Eye (Lond).* 2005;19:1133-1135.
5. Saika S, Yamanaka O, Sumioka T, et al. Fibrotic disorders in the eye: targets of gene therapy. *Prog Retin Eye Res.* 2008;27:177-196.
6. Gabison EE, Huet E, Baudouin C, Menashi S. Direct epithelial-stromal interaction in corneal wound healing: Role of EMMPRIN/CD147 in MMPs induction and beyond. *Prog Retin Eye Res.* 2009;28:19-33.
7. Moali C, Hulmes DJ. Extracellular and cell surface proteases in wound healing: new players are still emerging. *Eur J Dermatol.* 2009;19:552-564.
8. Watanabe M, Yano W, Kondo S, et al. Up-regulation of urokinase-type plasminogen activator in corneal epithelial cells induced by wounding. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003;44:3332-3338.
9. Twining SS, Wilson PM, Ngamkitidechakul C. Extrahepatic synthesis of plasminogen in the human cornea is up-regulated by interleukins-1alpha and -1beta. *Biochem J.* 1999;339 (Pt 3):705-712.
10. Hopkins DR, Keles S, Greenspan DS. The bone morphogenetic protein-1/tolloid-like metalloproteinases. *Matrix Biol.* 2007;26:508-523.
11. Porter S, Clark IM, Kevorkian L, Edwards DR. The ADAMTS metalloproteinases. *Biochem J.* 2005;386:15-27.
12. Kronenberg D, Bruns BC, Moali C, et al. Processing of Procollagen III by Meprins: New Players in Extracellular Matrix Assembly? *J Invest Dermatol.* 2010.
13. Adar R, Kessler E, Goldberg B. Evidence for a protein that enhances the activity of type I procollagen C-proteinase. *Collagen Rel Res.* 1986;6:267-277.
14. Steiglitz BM, Keene DR, Greenspan DS. PCOLCE2 encodes a functional procollagen C-proteinase enhancer (PCPE2) that is a collagen-binding protein differing in distribution of expression and post-translational modification from the previously described PCPE1. *J Biol Chem.* 2002;277:49820-49830.
15. Kobayashi K, Luo M, Zhang Y, et al. Secreted Frizzled-related protein 2 is a procollagen C proteinase enhancer with a role in fibrosis associated with myocardial infarction. *Nat Cell Biol.* 2009;11:46-55.
16. Grgurevic L, Macek B, Healy DR, et al. Circulating bone morphogenetic protein 1-3 isoform increases renal fibrosis. *J Am Soc Nephrol.* 2011;22:681-692.

17. Kessler-Icekson G, Schlesinger H, Freimann S, Kessler E. Expression of procollagen C-proteinase enhancer-1 in the remodeling rat heart is stimulated by aldosterone. *Int J Biochem Cell Biol.* 2006;38:358-365.
18. Ogata I, Auster AS, Matsui A, et al. Up-regulation of type I procollagen C-proteinase enhancer protein messenger RNA in rats with CCl4-induced liver fibrosis. *Hepatology.* 1997;26:611-617.
19. von Marschall Z, Fisher LW. Decorin is processed by three isoforms of bone morphogenetic protein-1 (BMP1). *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;391:1374-1378.
20. Amano S, Scott IC, Takahara K, et al. Bone morphogenetic protein 1 is an extracellular processing enzyme of the laminin 5 gamma2 chain. *J Biol Chem.* 2000;275:22728-22735.
21. Rattenholl A, Pappano WN, Koch M, et al. Proteinases of the bone morphogenetic protein-1 family convert procollagen VII to mature anchoring fibril collagen. *J Biol Chem.* 2002;277:26372-26378.
22. Ge G, Greenspan DS. BMP1 controls TGFbeta1 activation via cleavage of latent TGFbeta-binding protein. *J Cell Biol.* 2006;175:111-120.
23. Gonzalez EM, Reed CC, Bix G, et al. BMP-1/Tolloid-like metalloproteases process endorepellin, the angiostatic C-terminal fragment of perlecan. *J Biol Chem.* 2005;280:7080-7087.
24. Stramer BM, Zieske JD, Jung JC, Austin JS, Fini ME. Molecular mechanisms controlling the fibrotic repair phenotype in cornea: implications for surgical outcomes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003;44:4237-4246.
25. Fantes FE, Hanna KD, Waring GO, III, Pouliquen Y, Thompson KP, Savoldelli M. Wound healing after excimer laser keratomileusis (photorefractive keratectomy) in monkeys. *Arch Ophthalmol.* 1990;108:665-675.
26. Galiacy SD, Fournie P, Massoudi D, et al. Matrix metalloproteinase 14 overexpression reduces corneal scarring. *Gene Ther.* 2011;18:462-468.
27. Meek KM, Leonard DW, Cannon CJ, Dennis S, Khan S. Transparency, swelling and scarring in the corneal stroma. *Eye (Lond).* 2003;17:927-936.
28. McCally RL, Freund DE, Zorn A, et al. Light-scattering and ultrastructure of healed penetrating corneal wounds. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007;48:157-165.
29. Jester JV. Corneal crystallins and the development of cellular transparency. *Sem Cell Dev Biol.* 2008;19:82-93.
30. Hassell JR, Birk DE. The molecular basis of corneal transparency. *Exp Eye Res.* 2010;91:326-335.
31. Rawe IM, Meek KM, Leonard DW, Takahashi T, Cintron C. Structure of corneal scar tissue: an X-ray diffraction study. *Biophys J.* 1994;67:1743-1748.
32. Cannon CJ, Marshall J, Patmore AL, Brahma A, Meek KM. Persistent haze and disorganization of anterior stromal collagen appear unrelated following phototherapeutic keratectomy. *J Refract Surg.* 2003;19:323-332.
33. Knupp C, Pinali C, Lewis PN, et al. The architecture of the cornea and structural basis of its transparency. *Adv Protein Chem Struct Biol.* 2009;78:25-49.

34. Cintron C, Gregory JD, Damle SP, Kublin CL. Biochemical analyses of proteoglycans in rabbit corneal scars. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1990;31:1975-1981.
35. Cintron C, Schneider H, Kublin C. Corneal scar formation. *Exp Eye Res.* 1973;17:251-259.
36. Cintron C, Hong BS, Kublin CL. Quantitative analysis of collagen from normal developing corneas and corneal scars. *Curr Eye Res.* 1981;1:1-8.
37. Sivak JM, Fini ME. MMPs in the eye: emerging roles for matrix metalloproteinases in ocular physiology. *Prog Retin Eye Res.* 2002;21:1-14.
38. Fournie PR, Gordon GM, Dawson DG, Malecaze FJ, Edelhauser HF, Fini ME. Correlation between epithelial ingrowth and basement membrane remodeling in human corneas after laser-assisted in situ keratomileusis. *Arch Ophthalmol.* 2010;128:426-436.
39. Veitch DP, Nokelainen P, McGowan KA, et al. Mammalian tolloid metalloproteinase, and not matrix metalloprotease 2 or membrane type 1 metalloprotease, processes laminin-5 in keratinocytes and skin. *J Biol Chem.* 2003;278:15661-15668.
40. Lee SB, Solow-Cordero DE, Kessler E, Takahara K, Greenspan DS. Transforming growth factor-beta regulation of bone morphogenetic protein-1 procollagen C-proteinase and related proteins in fibrogenic cells and keratinocytes. *J Biol Chem.* 1997;272:19059-19066.

Figure 1

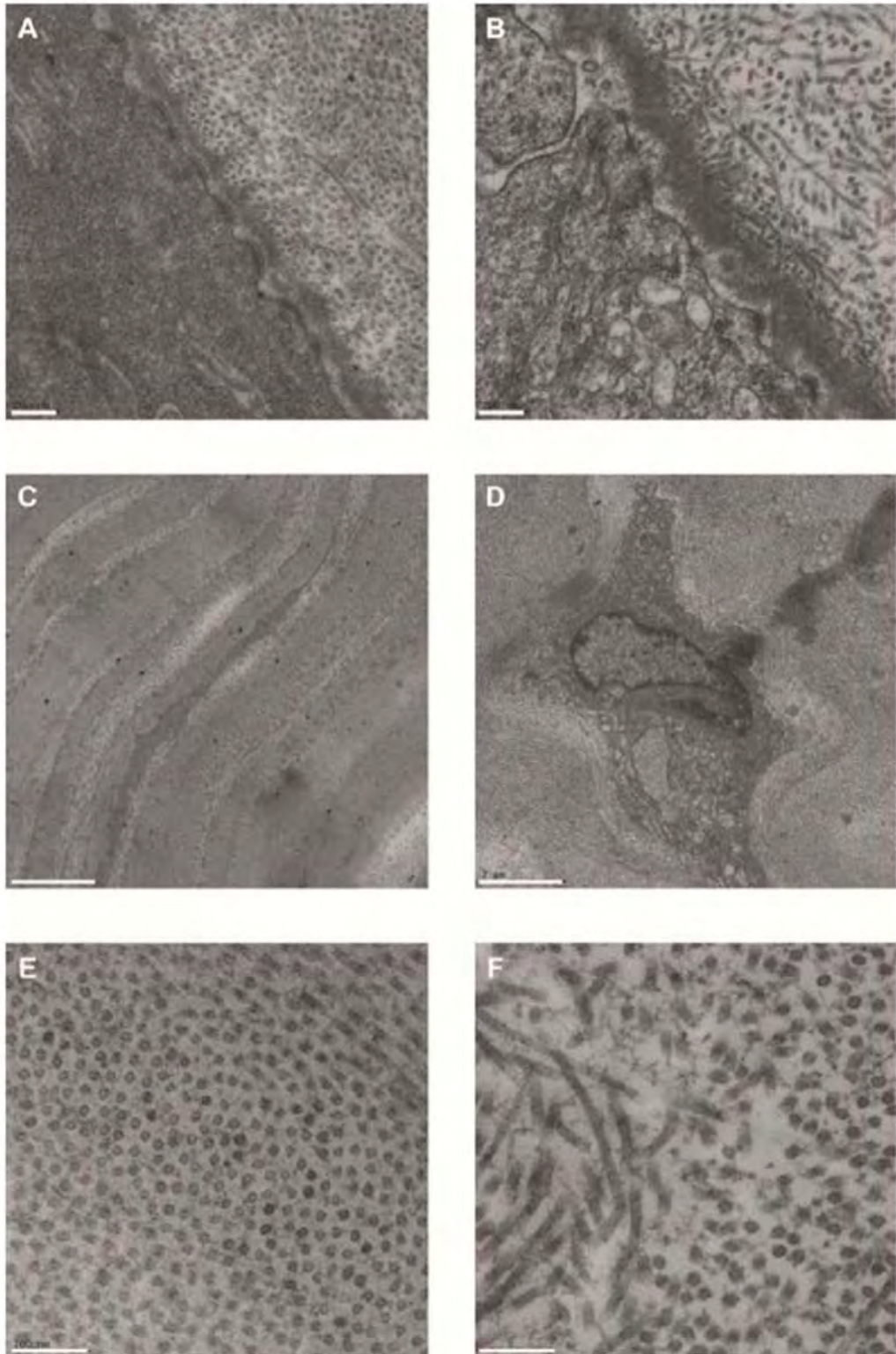


Figure 2

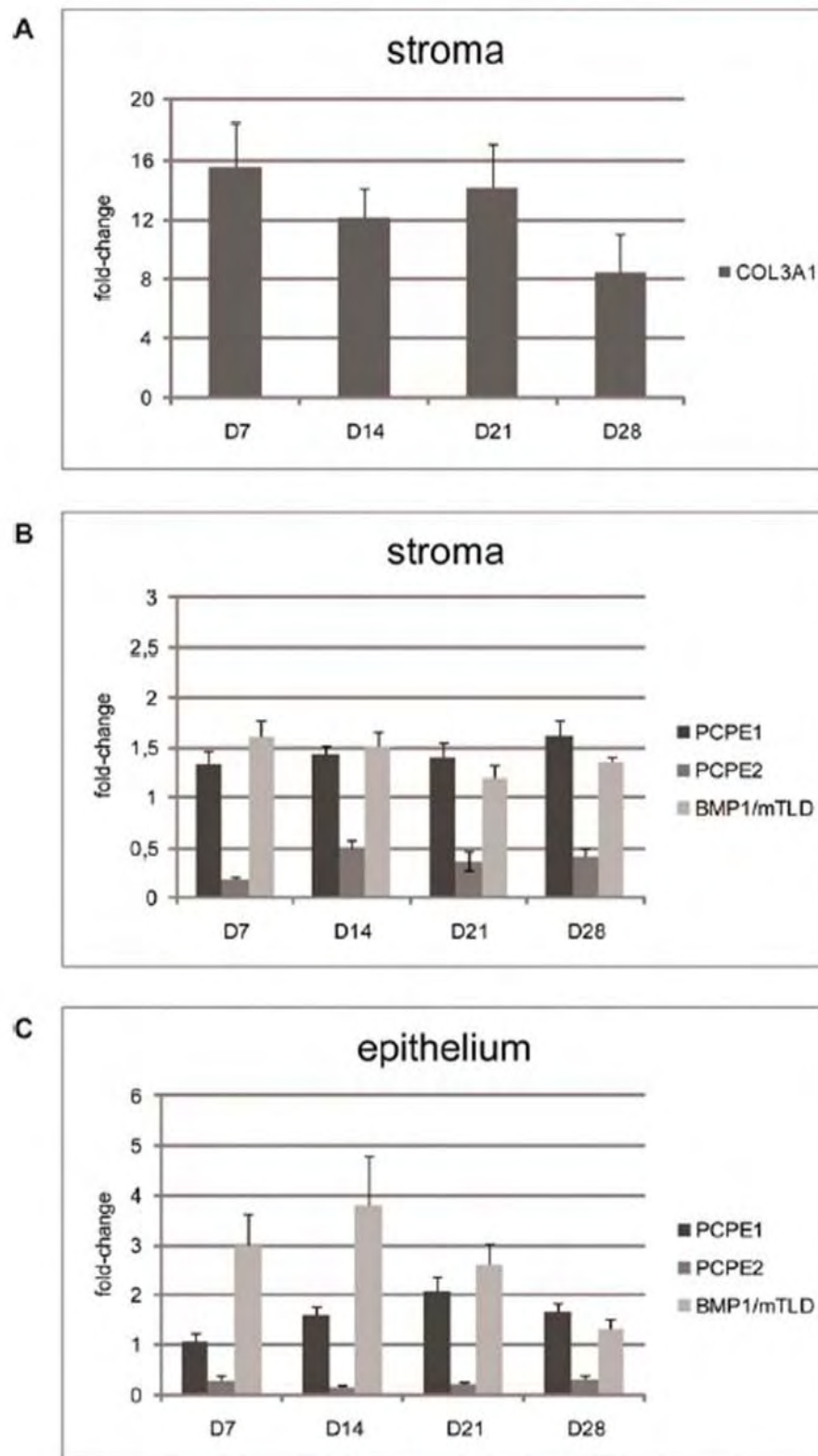


Figure 3

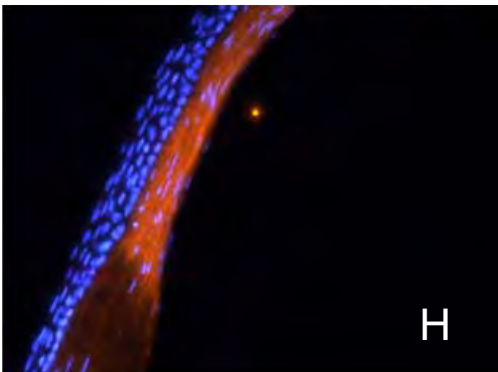
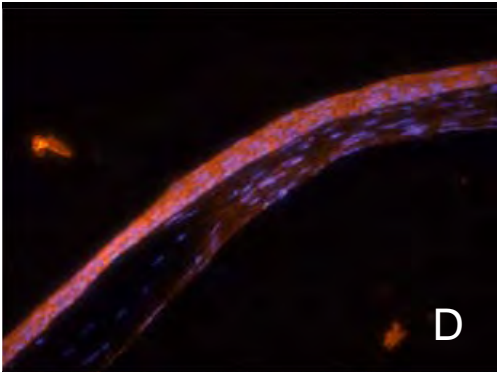
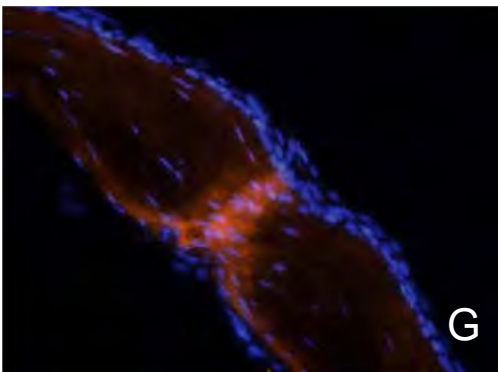
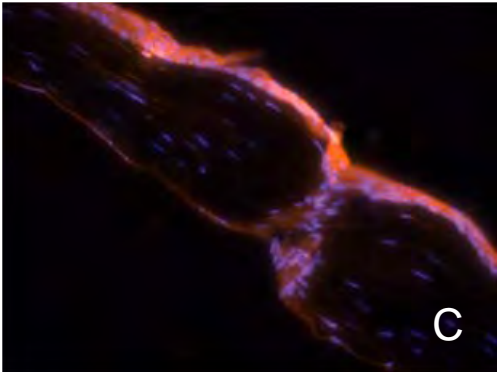
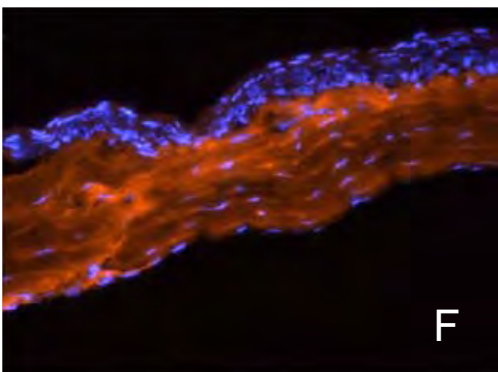
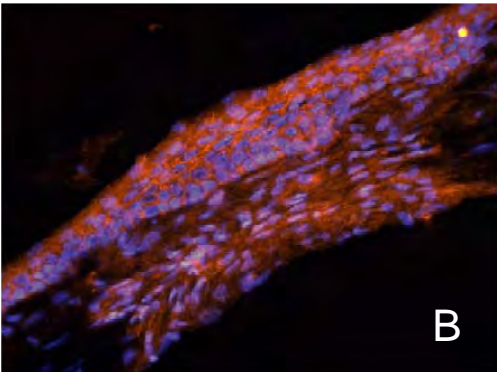
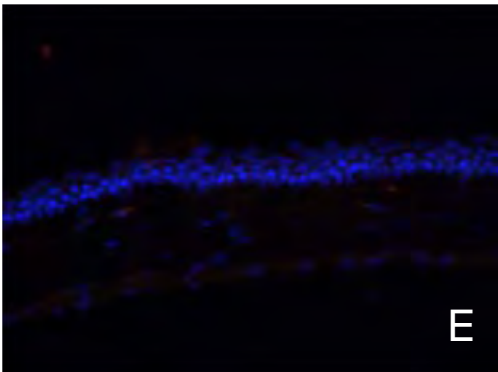
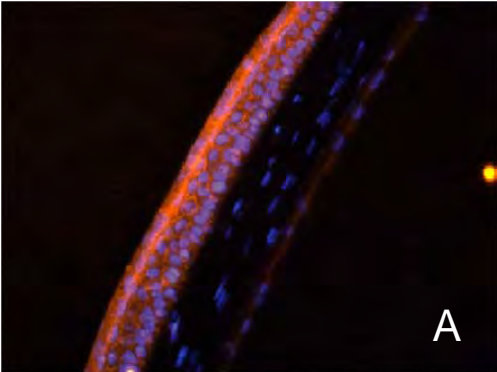
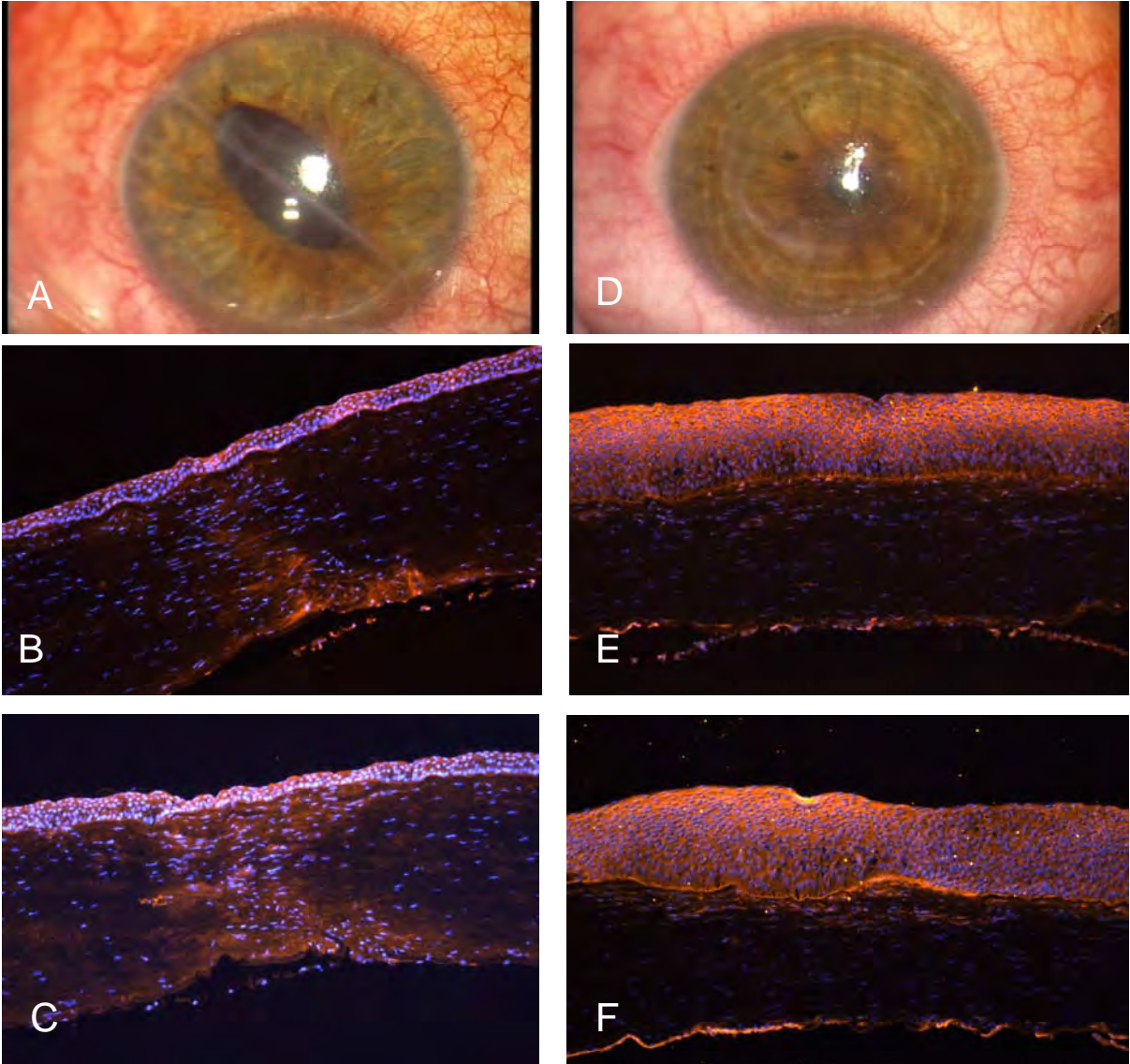


Figure 4



III.2.3. Conclusion

Ce travail a permis de décrire pour la première fois l'expression des protéinases Tolloïdes et de leurs activateurs dans une cornée normale et au cours de la cicatrisation cornéenne. Les résultats montrent que parmi les 4 protéinases Tolloïdes décrites à l'heure actuelle chez les mammifères, seules BMP-1/mTLD sont présentes dans la cornée et leur expression est augmentée de manière significative au cours de la cicatrisation cornéenne ; plus principalement au niveau de la zone lésée. L'analyse de l'expression de deux de leurs activateurs montre que PCPE-1 augmente significativement tandis que PCPE-2 décroît. L'augmentation synchronisée de PCPE-1 avec BMP-1/mTLD laisse penser que PCPE-1 constitue l'activateur principal impliqué dans la potentialisation de l'effet de ces protéinases Tolloïdes lors de la cicatrisation cornéenne.

Ainsi l'étape suivante de cette étude consistera en l'évaluation de l'effet de l'inhibition de l'activité de BMP-1 et de son activateur PCPE-1 sur les remaniements matriciels lors de la cicatrisation cornéenne.

*Résultats supplémentaires
sur les protéinases Tolloïdes*

III.2.4. Effet de l'inhibition de BMP-1 sur la cicatrisation cornéenne

III.2.4.1. Evaluation clinique de la cicatrisation cornéenne après traitement des cornées par un inhibiteur de BMP-1 (33A)

L'inhibiteur de BMP-1 utilisé lors de cette étude a été synthétisé par l'équipe de David J. Hulmes avec laquelle nous collaborons. Cette molécule de la famille des hydroxamate (que nous nommerons A33) a une $IC_{50}=100nM$ pour BMP-1 (concentration de l'A33 nécessaire pour inhiber 50% de l'activité de BMP-1 *in vitro*). L'expérience consiste à appliquer après l'incision cornéenne l'inhibiteur de BMP-1 sous forme de collyre trois fois par jour pendant 14 jours à une concentration de $10\mu M$ diluée dans du DMSO (Diméthylsulfoxyde) à 0,1%. Une évaluation clinique de l'évolution de la cicatrisation cornéenne fût réalisée au 14^{ème} jour (**Figure 49**).

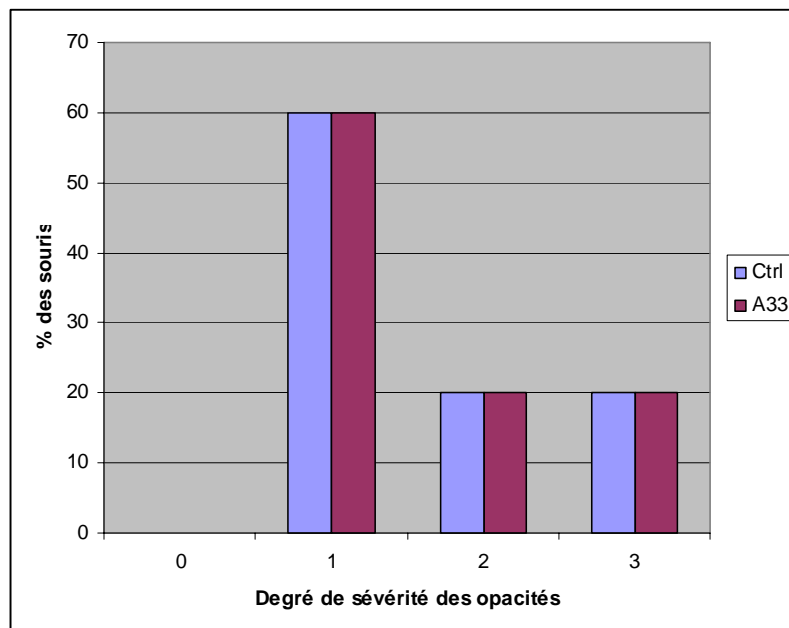


Figure 49 : Evaluation clinique des opacités cornéennes des souris ayant été traitées avec un inhibiteur de BMP-1 (A33). Les souris ont subi une kératectomie transcornéenne perforante. L'inhibiteur est ensuite appliqué 3 fois par jour pendant 2 semaines. L'observation clinique a lieu le 14^{ème} jour. Grade 0 : cornée transparente, grade 1 : opacité légère, grade 2 : opacité modérée, grade 3 : opacité complète (cf méthodes Article 1).

Ces résultats préliminaires ne montrent aucune différence sur la gravité des opacités cornéennes entre les souris ayant reçu la solution contrôle et celles ayant reçu

l'inhibiteur de BMP-1. L'examen clinique a révélé cependant chez l'ensemble des souris traitées avec l'inhibiteur de BMP-1 la présence d'œdème cornéen accompagné d'un aspect cotonneux et d'un épithélium moins imperméable.

III.2.4.2. Evaluation de l'expression protéique de BMP-1, 14 jours après le traitement avec l'A33

Afin d'évaluer le niveau d'expression de BMP-1 et l'état général de la cornée après le traitement avec l'inhibiteur de BMP-1, les souris sont sacrifiées au 14^{ème} jour et les yeux prélevés. Des analyses histologiques furent ensuite réalisées.

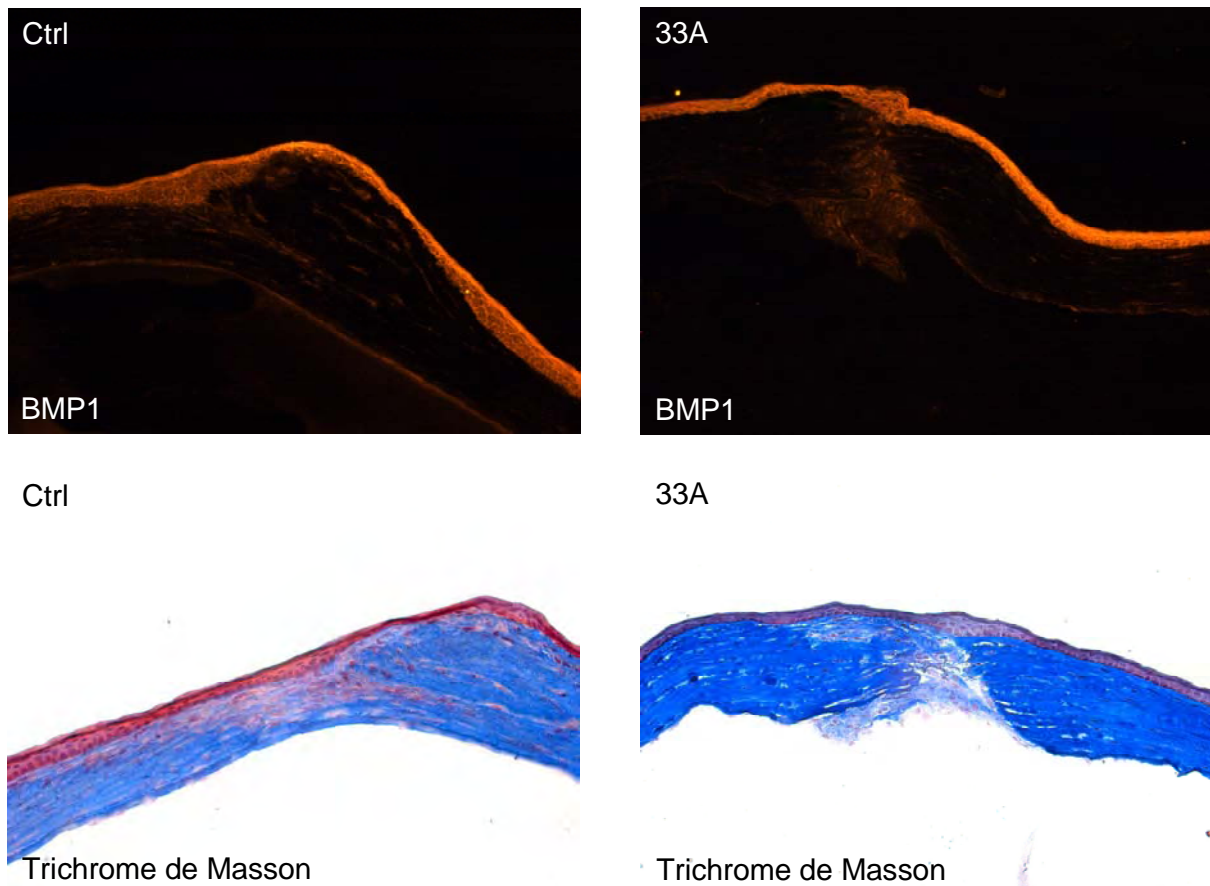


Figure 50 : Analyse histologique des cornées traitées avec l'inhibiteur de BMP-1 (A33) en comparaison avec les cornées contrôles, 14 jours après l'incision. En immunohistochimie, l'expression de BMP-1 au niveau de la cornée ne semble pas différente entre les souris contrôles (en haut à gauche) et les souris ayant été traitées avec l'A33 (en haut à droite). La coloration au trichrome de Masson n'a pas révélée de changements structuraux dans les cornées traitées avec l'inhibiteur de BMP-1 (en bas à droite) en comparaison avec les cornées contrôles (en bas à gauche).

L'analyse immunohistochimique de l'expression de la protéine BMP-1 ne montre pas de différence « apparente » entre les souris traitées avec l'inhibiteur de BMP-1 (33A) et celles ayant reçues la solution contrôle. De manière similaire, l'observation de l'aspect des différentes couches cornéennes effectuée après coloration au Trichrome de Masson ne semble pas révéler de différences entre ces deux groupes (**Figure 50**).

III.2.4.3. Analyse de l'aspect des cornées traitées avec l'inhibiteur de BMP-1 en microscopie électronique

Les deux techniques d'analyse histologique utilisées précédemment n'ont révélé aucune différence significative malgré les résultats d'observations cliniques ayant détectés la présence d'œdèmes et d'un épithélium moins imperméable chez les souris traitées avec l'inhibiteur de BMP-1. Ainsi, nous avons donc opté pour une technique plus sensible pour analyser l'aspect de la structure des cornées traitées avec l'inhibiteur de BMP-1 en comparaison avec les souris contrôles.

L'analyse des résultats obtenus en microscopie électronique n'a pas révélé de désorganisation collagénique ni de différences structurales particulières au niveau du stroma des cornées des souris trépanées et traitées avec l'inhibiteur de BMP-1 en comparaison avec les souris trépanées et ayant reçues la solution contrôle (**Figure 51C** et **D**). Les observations effectuées au niveau du stroma de la cornée en présence de la solution contrôle sont similaires à celles effectuées dans une cornée normale (**Figure 51A**) et une cornée blessée, sans traitement (**Figure 51B**).

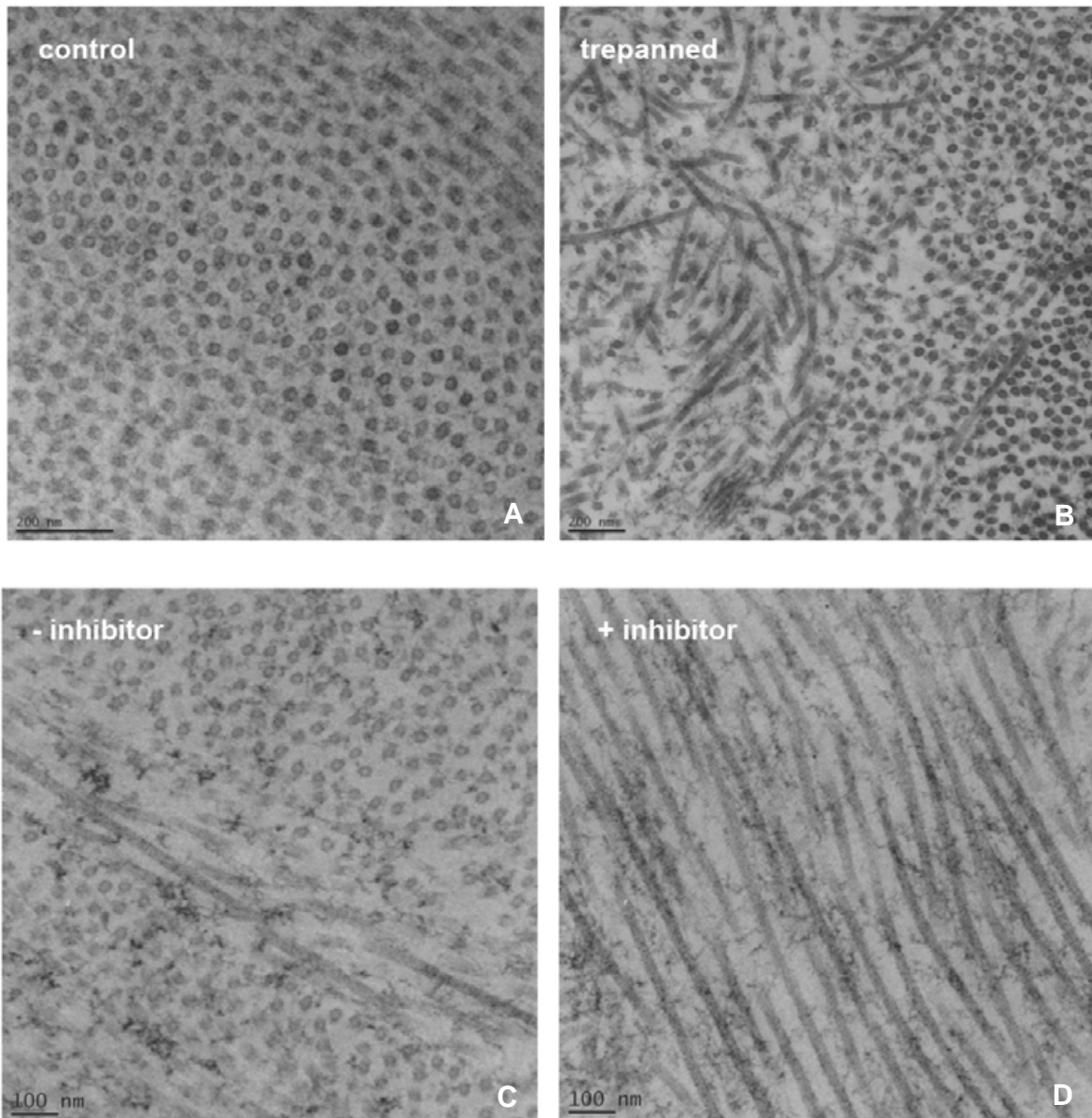


Figure 51 : Aspect du stroma cornéen en réparation, vu au microscope électronique après 14 jours de traitement avec un inhibiteur de BMP-1. L'image (A) correspond à une cornée normale, non blessée et non traitée avec l'inhibiteur de BMP-1. (B) correspond à une cornée blessée mais non traitée avec l'inhibiteur de BMP-1 ; (C) correspond à une cornée blessée et ayant reçue la solution contrôle et (D) correspond à une cornée ayant été blessée et traitée avec l'inhibiteur de BMP-1. L'observation n'a pas révélée de différence dans l'organisation de la matrice du stroma cornéen. Les fibres de collagènes semblent avoir aussi le même diamètre (~25 nm) dans les deux conditions.

L'observation de la lame basale au microscope électronique a révélée en revanche une structure qui est différente entre les deux groupes de souris. En effet, 14 jours après l'incision les souris ayant reçues la solution contrôle semblent avoir une cornée avec une

lame basale bien régénérée (**Figure 52C**) tandis que les souris traitées avec l'inhibiteur de BMP-1 ont une lame basale cornéenne avec un aspect de « bulles » (**Figure 52 D**). Les observations effectuées au niveau de la lame basale de la cornée blessée et traitée avec la solution contrôle sont similaires à celles effectuées dans une cornée blessée et sans traitement (**Figure 51B**).

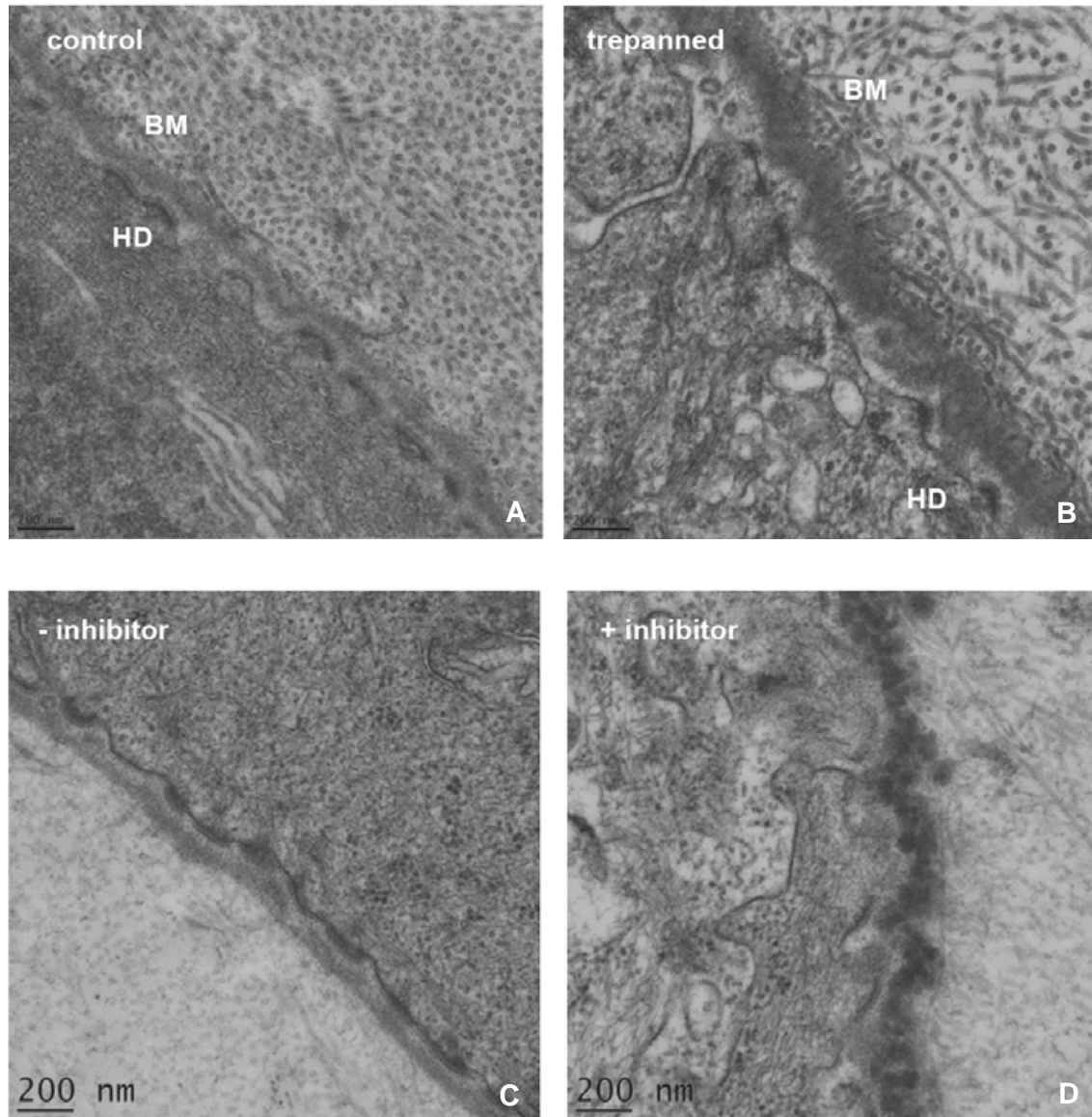


Figure 52 : Aspect de la lame basale cornéenne en réparation, vu au microscope électronique après deux semaines d'inhibition de BMP-1. L'image (A) correspond à une cornée normale, non blessée et non traitée avec l'inhibiteur de BMP-1. (B) correspond à une cornée blessée mais non traitée avec l'inhibiteur de BMP-1 ; (C) correspond à une cornée blessée et ayant reçu la solution contrôle et (D) correspond à une cornée ayant été blessée et traitée avec l'inhibiteur de BMP-1. Le traitement des cornées avec l'inhibiteur de BMP-1 semble altérer la reconstruction de la lame basale après incision. Cette structure apparaît au microscope électronique sous forme de « bulles » (D). *Abréviations* : BM=basement membrane ; HD= hemidesmosomes.

Ces résultats préliminaires montrent donc que l'application de l'inhibiteur de BMP-1 sous forme de collyre ne semble pas affecter l'organisation fibrillaire du stroma cornéen mais pourrait en revanche avoir un effet sur la reconstruction de la lame basale cornéenne après incision. Néanmoins, il est important de noter qu'à ce stade, nous ne disposons pas de technique nous permettant d'évaluer la diffusion de l'inhibiteur de BMP-1 dans le compartiment stromal. D'autres travaux utilisant des inhibiteurs traçables sont en préparation.

III.2.5. Effet de l'invalidation de Pcpe-1 sur la cicatrisation cornéenne

Les observations effectuées précédemment laissent prétendre à un rôle de BMP-1 dans la reformation de la lame basale après traumatisme cornéen. En parallèle de ces expériences, des incisions cornéennes ont été réalisées chez des souris KO pour Pcpe-1, [PCPE-1 est un activateur de BMP-1 dont l'expression augmente dans une cornée en remaniement (**cf. Article 2**)]. Cette expérience a donc pour but de déterminer si PCPE-1 est bien l'activateur de BMP-1 dans la cornée et d'évaluer son rôle dans la cicatrisation cornéenne.

III.2.5.1. Evaluation clinique des opacités cornéennes des souris KO pour Pcpe-1, 14 jours après incision

La première étape de cette nouvelle expérience consistait en un examen clinique des cornées de souris 14 jours après incision. Cette analyse s'appuie sur deux critères : l'opacité cornéenne et perméabilité de l'épithélium.

L'évaluation des opacités cornéennes montre que deux semaines après l'incision, les souris KO pour Pcpe-1 ont des cornées moins opaques que les souris sauvages (**Figure 53**). Cette différence n'est cependant pas statistiquement significative malgré sa forte tendance ($p=0,055$).

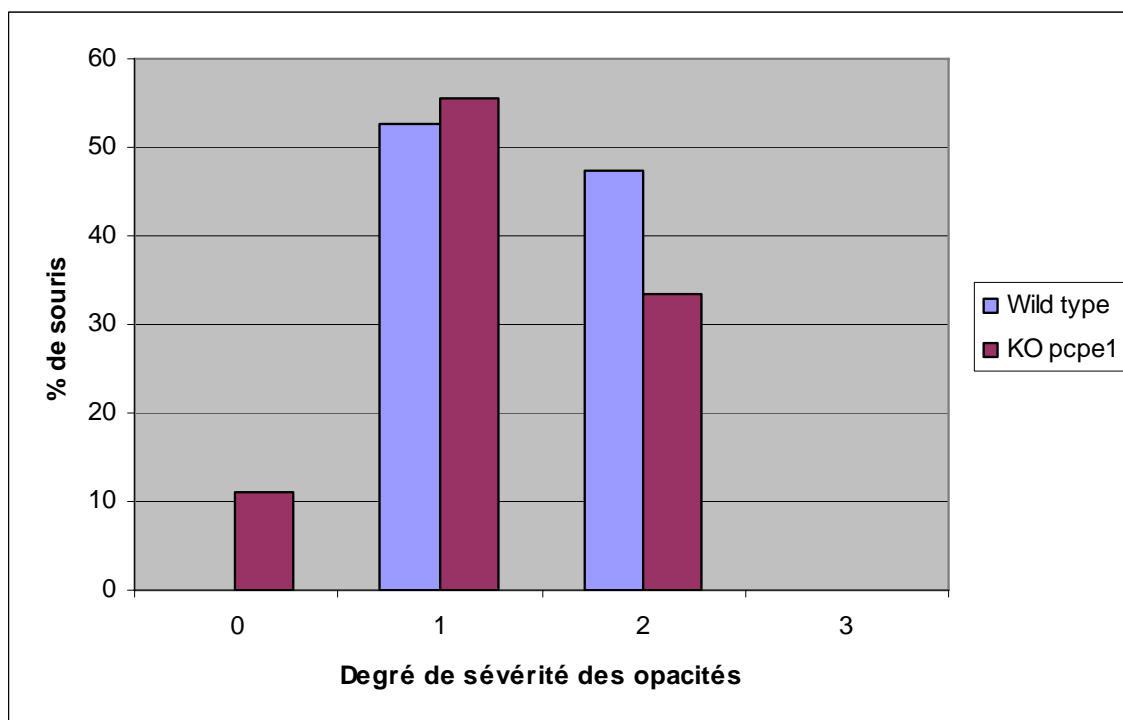


Figure 53 : Evaluation clinique des opacités cornéennes des souris KO pour Pcpe-1 14 jours après incision. Les souris KO pour Pcpe-1 ont tendance à développer des opacités moins sévères que les souris WT. Grade 0 : cornée transparente, grade 1 : opacité légère, grade 2 : opacité modérée, grade 3 : opacité complète (cf méthodes Article 1).

III.2.5.2. Evaluation de l'intégrité structurale des cornées des souris KO pour Pcpe-1, 14 jours après la blessure

L'examen de l'intégrité épithéliale de la cornée fut réalisé grâce à l'utilisation d'un collyre à la fluorescéine. Cette substance permet de détecter des anomalies structurales au niveau de l'épithélium en marquant le stroma sous jacent lorsque l'épithélium est perméable à la fluorescéine. Cet examen a révélé chez les souris KO pour Pcpe-1 un retard de cicatrisation 14 jours après l'incision (en comparaison avec les souris sauvages) bien qu'une fois encore cette différence ne fut pas significative (**Figure 54**). Ce défaut de cicatrisation pourrait être attribué à un retard de régénération de la lame basale après traumatisme.

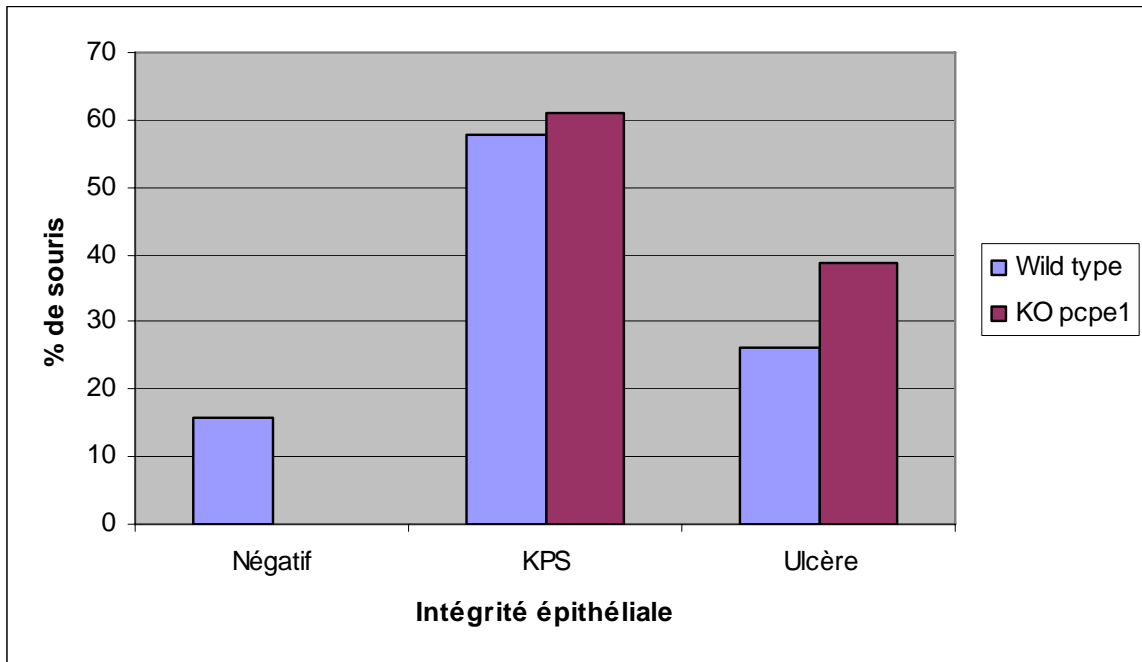


Figure 54 : Evaluation de la restauration structurale de la cornée des souris KO pour Pcpe-1 14 jours après incision : Le test à la fluorescéine permet de mettre en évidence une « imperméabilité » de la cornée. Négatif : restauration de l'intégrité épithéliale. KPS (kératite ponctuée superficielle) : Défauts épithéliaux disséminés. Ulcère : Défaut épithélial complet.

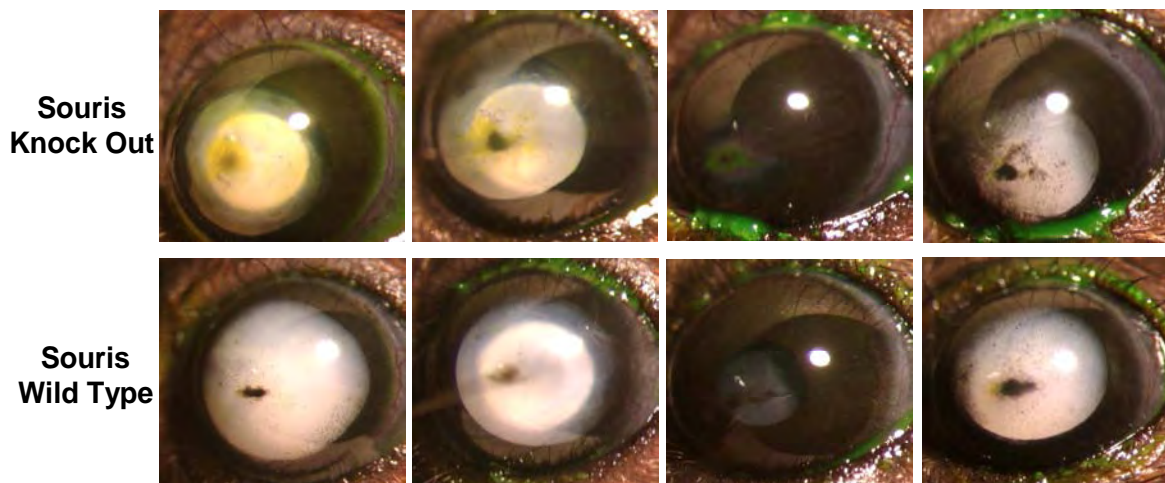


Figure 55 : Illustrations de l'intégrité structurale épithéliale des cornées des souris KO pour Pcpe-1 14 jours après l'incision, grâce à l'utilisation d'un collyre à la fluorescéine. Les cornées des souris KO pour Pcpe-1 semblent avoir une rétention de la fluorescéine qui est supérieure à celle observée chez les souris WT.

III.2.5.3. Analyse de l'aspect des cornées des souris KO pour Pcpe-1 au microscope électronique 14 jours après l'incision

Après l'examen clinique, les souris furent sacrifiées, les yeux prélevés et fixés. Ces échantillons sont ensuite préparés pour une observation au microscope électronique. Une analyse comparative fût effectuée au niveau des différentes structures cornéennes afin de décerner des éventuelles différences entre les souris KO pour Pcpe-1 et les WT.

De manière surprenante, les observations réalisées au niveau des stromas cornéens appartenant aux souris KO Pcpe-1 non blessées n'ont révélées aucune anomalie particulière qui touche l'organisation des fibres de collagène [(**Figure 56B**) à comparer avec la structure du stroma des souris WT non blessées (**Figure 56A**)]. L'analyse de la structure du stroma cornéen après lésion n'a pas montré non plus de différence de cicatrisation entre les souris KO pour Pcpe-1 (**Figure 56D**) et les souris WT (**Figure 56C**).

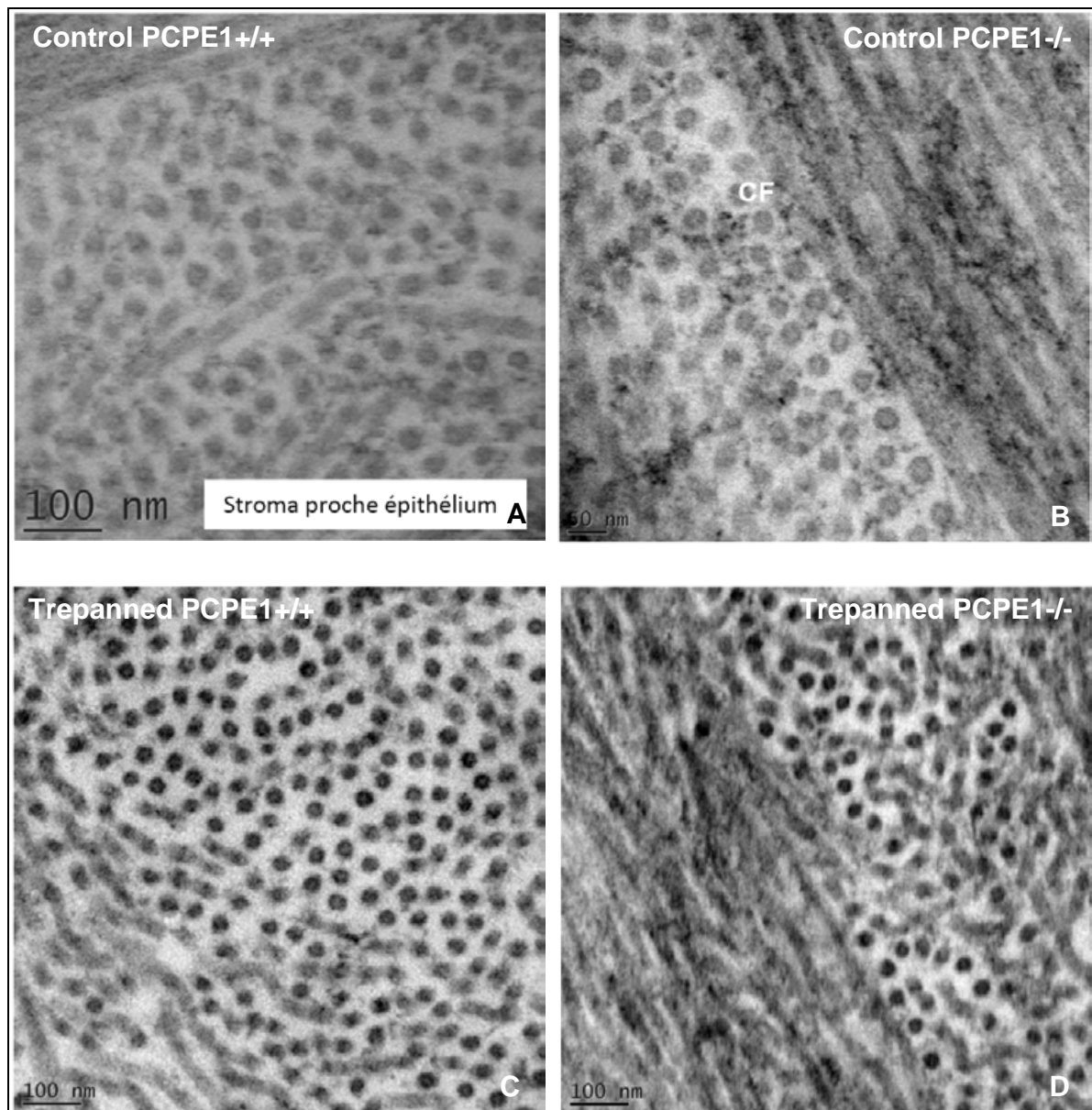


Figure 56 : Aspect du stroma cornéen des souris KO pour Pcp-1 14 jours après incision vu au microscope électronique. L'image (A) correspond à une cornée de souris WT non blessée. (B) correspond à une cornée de souris KO pour Pcp-1 non blessée ; (C) correspond à une cornée de souris WT blessée et (D) correspond à une cornée de souris KO pour Pcp-1 blessée. L'observation n'a pas révélée de différence entre les souris KO et les souris WT dans la structure et l'organisation de la matrice collagénique du stroma cornéen. Abréviations : CF=Collagen fibril.

Ce résultat est surprenant étant donné les différences mises en évidence dans un travail précédent de DS Greenspan (Steiglitz et al., 2006). En effet, leur étude avait montré que les souris KO pour Pcp-1 présentaient des défauts d'organisation des fibres de collagènes au niveau des tendons.

Les analyses effectuées au niveau de la lame basale cornéenne des souris KO pour Pcpe-1, non blessées (**Figure 57B**) ont révélées une structure qui est similaire à celle des cornées des souris WT (**Figure 57A**). En effet, aucune anomalie structurale n'a été observée au niveau de la lame basale des souris KO pour Pcpe-1.

L'observation de la structure de la lame basale des souris KO pour Pcpe-1 14 jours après l'incision a révélée en revanche, un aspect anormal. En effet, les cornées des souris KO pour Pcpe-1 en réparation semblent avoir une lame basale en forme de « gouttes » [(**Figure 57D**), à comparer avec la (**Figure 57C**) qui correspond à la cornée d'une souris WT en réparation]. De façon intéressante, l'aspect de cette structure ressemble à celui de la lame basale des souris traitées avec l'inhibiteur de BMP-1 (**Figure 52D**). Ceci suggère que contrairement à ce que nous observons dans le stroma cornéen, BMP-1 et PCPE-1 pourraient être impliqués dans l'organisation de la lame basale cornéenne en cours de cicatrisation.

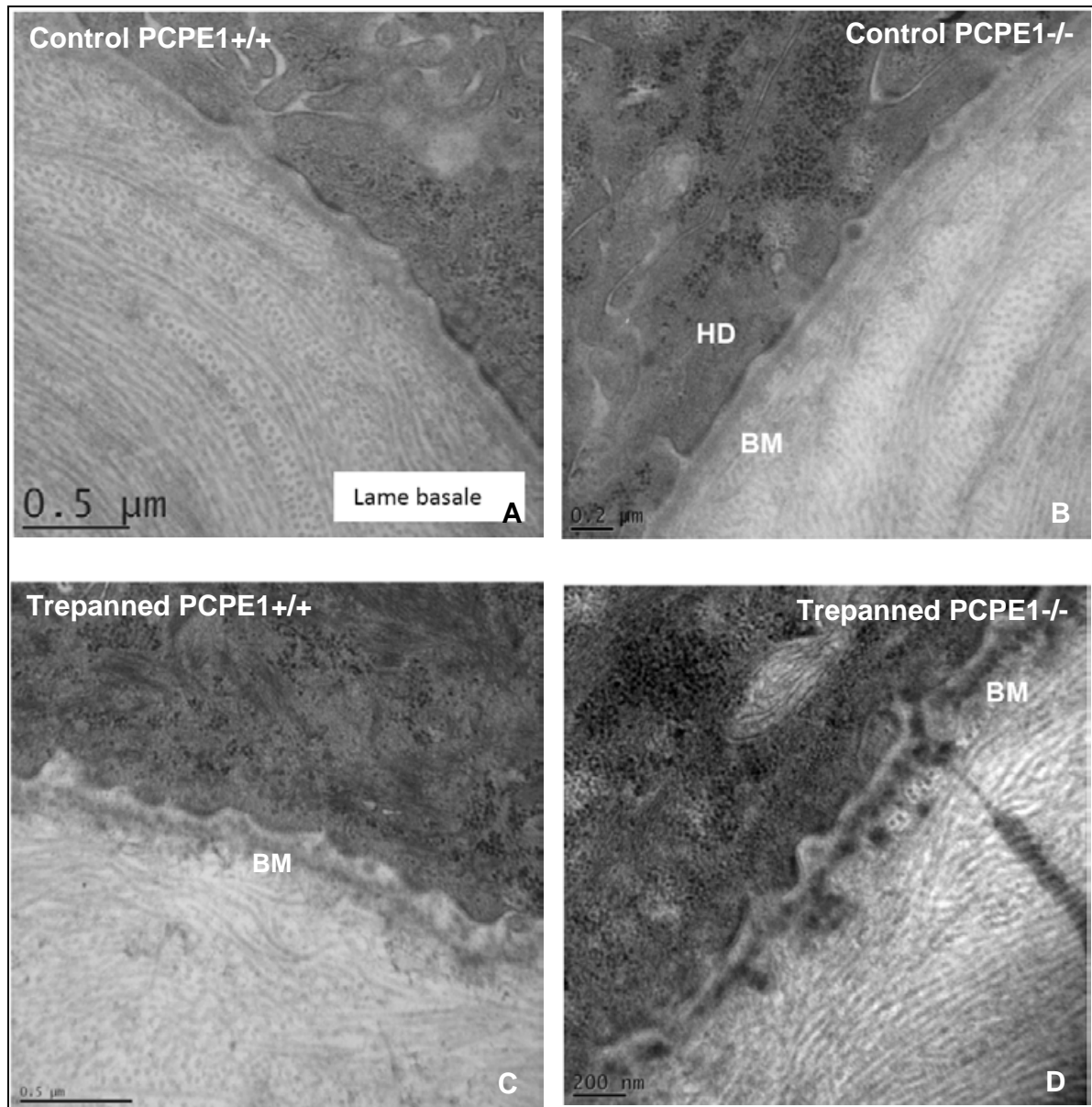


Figure 57 : Structure de la lame basale cornéenne de souris KO pour *Pcpe-1*, 14 jours après blessure observée au microscope électronique. L'image (A) correspond à une cornée de souris WT non blessée. (B) correspond à une cornée de souris KO pour *Pcpe-1* non blessée ; (C) correspond à une cornée de souris WT blessée et (D) correspond à une cornée de souris KO pour *Pcpe-1* blessée. Les analyses révèlent une lame basale désorganisée, en forme de « gouttes » chez les souris KO pour *Pcpe-1* (D).
Abréviations : BM=basement membrane ; HD= hemidesmosomes.

Approches fondamentales :
**les collagènes FACIT dans
l'organisation spatiale et les
propriétés biomécaniques de
la matrice extracellulaire au
cours de la cicatrisation
cornéenne**

III.3. Etude de l'expression du collagène FACIT de type XII dans le remodelage matriciel mis en place après blessure cornéenne

III.3.1. Objectifs

Cette première partie de l'étude fondamentale s'intéresse au collagène FACIT de type XII. Ce collagène comme la plupart des collagènes FACIT intervient dans le maintien des structures des collagènes fibrillaires en réalisant des « ponts » entre les fibres de collagène et/ou entre les fibres de collagène et d'autres éléments de la matrice [(Veit et al., 2006a), (Gordon and Hahn, 2010)]. L'étude a pour but de déterminer le rôle de ce collagène dans la formation et la persistance d'une opacité cornéenne après un traumatisme. Pour cela, son expression fut d'abord évaluée dans des cornées humaines possédant une opacification d'origine diverse (traumatisme physique et infection à l'herpès). Cette investigation sur l'expression du collagène de type XII s'est poursuivie chez la souris dans un modèle de fibrose cornéenne persistante.

Par ailleurs, l'analyse des études menées sur l'expression du collagène de type XII au niveau de la cornée adulte chez différentes espèces, poulet (Akimoto et al., 2002), lapin (Anderson et al., 2000), bœuf (Kato et al., 2000), souris [(Oh et al., 1993), (Bohme et al., 1995)], homme (Wessel et al., 1997) a révélé une expression du collagène de type XII au niveau de la cornée qui semble afficher une variabilité inter-espèces. En effet, une hétérogénéité existerait dans la localisation et le degré d'expression du collagène de type XII au niveau de la cornée en fonction de l'espèce. De ce fait, la première approche de l'étude chez la souris consistait en la validation de la présence du collagène de type XII et du lieu de localisation de son expression au niveau de la cornée normale. L'analyse s'est poursuivie par la mise en évidence, la validation ainsi que le suivi de l'évolution de l'expression des variants connus de ce collagène au niveau de l'épithélium et du stroma cornéens après incision.

III.3.2. Résultats

Ce travail effectué sur l'évolution de l'expression du collagène de type XII et de ses variants connus au niveau de la cornée cicatricielle va faire l'objet d'une soumission dans la revue *Investigative Ophthalmology and Visual Science*.

Article III

Type XII collagen over expression in human and murine corneal stromal scar

Dawiyat Massoudi^{1,2}, Jacqueline Butterworth^{1,2}, Angélique Erraud^{1,2}, Pierre Fournié^{1,2,3}, François Malecaze^{1,2,3} and Stéphane D. Galiacy^{1,2}

1 INSERM U563, Toulouse, F-31300 France;

2 EA 4555, Université Toulouse III Paul Sabatier, Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan, Toulouse, F-31300 France;

3 CHU Toulouse, Hôpital Purpan, Service d'Ophtalmologie, Toulouse, F-31300 France

Correspondence: Dr Stéphane Galiacy, Inserm U563, Toulouse, France,
stephane.galiacy@inserm.fr

Tel: 00 33 5 62 74 45 09; Fax 00 33 5 62 74 45 58

Source of funding

DM was funded by a grant from University Paul Sabatier and Région Midi-Pyrénées (08008578).

Keywords: FACIT, type XII collagen, corneal scarring

Abstract

Purpose: To decipher type XII collagen expression in corneal scar *in vivo*

Methods: Type XII collagen protein expression was evaluated by immunocytochemistry in i) two human corneal scar, ii) a mouse model of corneal full-thickness incision at several time point (from day 7 to day 210) after incision. Alternative splice variants of the NC3 and NC1 domains of type XII collagen was then investigated in the mouse wound healing model.

Results: Type XII collagen was over expressed in human corneal scar in area, which were positive for alpha-smooth muscle actin staining. In a mouse model of corneal wound healing we found that at 7 and 14 days post-incision type XII collagen was largely concentrated in the sub-epithelial and sub-endothelial regions of the cornea, especially near the wound bed. Type XII collagen expression still increased at 21 days post-incision at the epithelial and endothelial interface, as well as in the stroma. 28 days post-incision, expression of type XII collagen continued to increase and appeared to be widely distributed throughout the stroma. mRNA splice variant analysis demonstrated that all NC1 and NC3 variants were expressed in the stroma and the epithelium. After incision, the NC1 long form was the most over expressed variant in the cornea and especially in the epithelium (x2.7, 3.72 and 5.57 at day 7, 14 and 21 respectively, $p < 0.01$ to 0.001). 7 months old mouse corneal scar revealed an over expression of type XII collagen in the wound area equivalent to what we observed in human corneal scar.

Conclusions: Type XII collagen is over expressed in permanent corneal scar both in human and mouse and could represent a new target to treat corneal scarring.

Introduction

Corneal scarring represents the 3th cause of blindness in the world (5.1%)¹. Corneal visual impairment encompasses a variety of factors such as infectious, inflammatory, trauma and chemical injury. The only available long-term curative treatment is corneal transplantation. However, while it represents a viable treatment, several side effects rise the necessity to research new molecular targets.

Corneal wound healing is a complex process involving many cell types, signaling pathways and proteins. To date, precise molecular mechanisms and key effectors which determine the success of the wound healing process are still unknown. When corneal wound healing fail to repair the tissue and restore transparency, a permanent corneal scar is formed. Late strategies targeting activated stromal cells, such as myofibroblasts, have been disappointing and were either ineffective or accompanied by several side effects²⁻⁷. Recently, our group⁸ and others such as Mohan et al.⁹ have demonstrated that modulation of the extracellular environment could target the disorganization and excessive accumulation of connective tissue which are common traits of corneal scar. We hypothesized that both approaches activated a feedback loop which by remodeling extracellular matrix (ECM) had an impact on myofibroblast transformation and thus reduced corneal scar severity. Greater knowledge of corneal scar ECM composition is still needed to identify potential ECM targets.

Corneal transparency mostly depends on the architecture of the stromal extracellular matrix, which includes collagen fibril diameter, packing and lamellar organization. Collagens are the most abundant proteins of the stroma and appear mainly in the form of heterotypic fibrils that consist of collagen types I and V. The stroma also contains a lesser amount of type VI collagen, the non-fibrillar collagen

types XIII, XVIII¹⁰ and type XII collagen, a member of the FACIT (fibril associated collagens with interrupted triple helices) subfamily. Noteworthy, type XII collagen expression has been found to be increase during bleomycin-induced lung fibrosis¹¹. Thus we hypothesized a potential involvement of this collagen during corneal scar formation.

Type XII collagen is a homotrimeric molecule composed of two collagenous domains (COL1-COL2) and three non-collagenous domains (NC1 to NC3)¹² (**Fig. 1**). This collagen is found to associate with type I collagen fibrils^{11, 13} via its COL1 domain. Its large N-terminal non-collagenous domain (NC3) then interacts with other matrix components¹⁴ or cell surfaces¹⁵. This domain may have an attached glycosaminoglycan chain, and functions by interacting with molecules such as decorin, fibromodulin^{16, 17} or tenascin X¹⁸. Both the NC1 and NC3 domains of type XII collagen are subject to alternative splicing, which allows for up to 4 different isoforms of type XII collagen¹⁹ (**Fig. 1**). These isoforms differ from each other in terms of length and the presence of a glycosaminoglycan amino acid linker or ECM interaction domains. Thus, type XII collagen could modulate the interaction properties and organization of the collagen fibril network²⁰. Collagen type XII could also help to stabilize fibril organization by forming interfibrillar bridges¹³ along with other ECM components. In the cornea, previous studies have indicated that the distribution of type XII collagen is restricted to the interfaces between the Bowman's membrane and the stroma and between the Descemet's membrane and the stroma in the embryo^{20, 21}. In contrast, other studies have shown that type XII collagen (notably with the long form of the NC3 domain) is uniformly distributed along the surface of the collagen fibrils in adult corneal stroma of different species²⁰⁻²⁴ and is thus associated with type I collagen in normal cornea. During corneal wound healing, a provisional matrix

made of type I/III collagen is deposited ^{8, 25, 26}. This temporary matrix is mostly responsible for corneal opacity during this stage ²⁷. When the cornea does not heal properly, the extracellular matrix associated with the scar still contain a high amount of type I/III collagen ^{8, 26}. Type XII collagen association with this specific ECM is unknown. Thus, we firstly investigated two human permanent corneal scars and showed that type XII collagen protein was over expressed in stromal area containing myofibroblasts. We further deciphered type XII collagen protein expression and mRNA splice variants regulation in a mouse model of corneal wound healing and discussed its putative role in corneal wound healing and scarring.

Materials and methods

Biological samples

Two human corneas presenting permanent stromal scars were collected after transplantation. The first subject was a 40 year old male who had suffered from a mechanical (barbed wire) trauma. The subject was treated with antibiotics after initial trauma, then dexamethasone before cataract surgery. He was not anymore under treatment at the time of corneal transplantation 18 months after the initial trauma. The second subject was a woman, who had contracted a first corneal herpes virus infection at the age of 17. She underwent corneal transplantation 5 years after and was treated for several months before surgery with valaciclovir and dexamethasone. Corneas were embedded in Tissue-Tek® O.C.T.TM compound (Sakura Finetek Europe B.V., Zoeterwoude, NL) just after surgery. This study respect the tenets of the declaration of Helsinki.

Female C57BL/6 mice at 10 to 12 weeks of age, obtained from Charles River Laboratory (Arbresle, France), were used in these experiments. All experimental procedures were approved by the Ethical Committee of the CPTP (*Centre of Physiopathology Toulouse Purpan*) and conducted in accordance with the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research.

Surgical Technique

Surgery was performed on the left eyes of mice by the same surgeon (P.F.) under general (2.78 mg/kg of Ketamine + 1.67 ml/kg of Rompun 2% Xylazine by intraperitoneal injection) and topical (drop administration of 1.6 mg Oxybuprocaine

Faure/0.4 ml Collyre) anesthesia. The central cornea (1 mm in diameter) was demarcated with a trephine and subsequently removed throughout the entire thickness by using ophthalmologic microsurgical scissors under a stereomicroscope, as previously described⁸. After surgery, Fucithalamic ointment was topically applied to prevent bacterial infection.

The animals were then euthanized at specific intervals of healing (Days 7, 14, 21, 28 and 210). Each left eye was removed, embedded in Tissue-Tek® O.C.T.™ compound (Sakura Finetek Europe B.V., Zoeterwoude, NL) for histology procedures. Alternatively, the left eyes were dissected to collect separately the corneal epithelium and stroma for RNA extraction and subsequent RT-qPCR analysis.

Immunocytochemistry

Rabbit anti-mouse type XII collagen antibody used in these experiments was kindly provided by Dr. Manuel Koch (KÖLN University, Germany). Cryostat sections (7 µm thick) of mouse left eyes were immunoreacted using an indirect immunofluorescence technique. Briefly, samples were fixed in methanol at -20°C for 20 minutes. The first antibody (1:10,000) was incubated in a moistened chamber at room temperature for 60 minutes. Goat anti-rabbit IgG (AlexaFluor 546, Invitrogen™, Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA), used as secondary antibody at 1:200 dilution, was then incubated at room temperature in a moistened dark chamber for 60 minutes. Antibodies were diluted using phosphate buffered saline, 0.03% bovine serum albumin (1x PBS, 0.03% BSA). Rabbit non-immune serum was used as the first antibody in control samples. All experiments were carried out under the same conditions, given antibody control and wounded cornea stainings were

carried out at the same times. Final mounting of tissue sections was done with Prolong® Gold antifade reagent with DAPI (Invitrogen™, Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA). Sections were observed 24 hours later, using 10X or 40X objective of Leica DMR microscope and images were acquired using Leica DFC 300 FX camera and IM50 software (Leica, Germany) at 600ms for 10X objective and 150 ms for 40X objective. These exposure times were determined from the control conditions (non-wounded) and applied to the others samples. Negative control condition was performed on each slide.

Human cornea immunostaining were performed with the same adapted protocol on 7µm thick cryostat section. Antibodies used were mouse monoclonal antibody against alpha smooth muscle actin isotype IgG2a at dilution 1:5000 (clone 1A4, Saint Louis, Missouri, USA) revealed with secondary antibody Alexa Fluor 555 goat anti mouse IgG2a at dilution 1:400 (Invitrogen™, Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA); mouse monoclonal antibody against type XII collagen at dilution 1:200 (clone 378D5, Kamiya Biomedical Company, Seattle, Washington, USA,) revealed with secondary antibody Alexa Fluor 555 goat anti mouse IgG1 at dilution 1:200 (Invitrogen™, Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA).

Reverse transcription and quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR)

Total RNA from mouse corneal epithelium and corneal stroma samples were extracted using the RNeasy Micro Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) according to the manufacturer's protocol. The quantity and quality of extracted RNA was verified using an Agilent RNA 6000 Pico Kit (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). Purified RNA was stored at -80°C until analysis. Reverse transcription was performed

with the Super Script® VILO™ cDNA Synthesis Kit (Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's recommendations. The resulting cDNA was stored at -20°C until analysis. *qPCR* was performed using the LightCycler 480 Real-Time System (Roche Diagnostics, Belgium) with the following protocol: 5 minutes at 95°C (initial denaturation), followed by 40 amplification cycles consisting of 15 seconds at 95°C (denaturation), 10 seconds at 60°C (hybridization) and 45 seconds at 72°C (elongation), then 40 seconds for melting temperature determination and 30 seconds at 40°C for cooling down. Primers used are listed in Table 1 and were designed on the basis of previous publications ^{19, 28} using the Primers Express software (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The long NC1 domain was flanked by NC1-L primers and the short NC1 domain by NC1-S primers. NC3-L primers target the long NC3 domain while NC3-S+L target both the long and the short forms of the NC3 domain of type XII collagen. PCR efficiency was determined for each primer set to calculate the expression ratio. Normalization was performed using three housekeeping genes, as previously described for the stroma ⁸. Concerning the epithelium, we used three other housekeeping genes: ubiquitin C (F: AACCCACAGTATATCTTTGGCG, R: CCCTCACTAGGTTTCGATGACTTC), tatabox (F: TGCCGAAAGATGCACAGATGA, R: TGTTGTCACATATCGGAAGGC) and beta actin (F: CGGTCCACCCGCCACCAGTTCGCCA, R: TCCCACCATCACACCCTGGTGCCTA). The fold-change in gene expression was calculated using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ ratio using previously described method ²⁹. All PCR products were checked by sequencing (Millegen, Toulouse, France).

Statistical analysis

For all experiments, group-to-group comparisons were performed using a non-parametric Wilcoxon test. Significance was set at $p < 0.05$.

Results

Expression of type XII collagen protein in human corneal scar

We investigated type XII collagen expression in two human corneas with different etiology of permanent stromal scars. First cornea suffered from a central mechanical trauma (**Fig. 2A**). 18 months after unsuccessful treatment, patient underwent corneal transplantation. We observed a slight type XII collagen staining all over the unwounded stroma. Type XII collagen was over expressed in the upper part of the stroma and all other the scar area (**Fig.2 B and D**), which was positive for alpha smooth muscle actin (α -SMA, **Fig. 2C**). Second cornea was affected by herpetic keratitis (**Fig. 3A**). Biomicroscopy depicted peripheric scar and central corneal thickness associated with epithelium hyperplasia. Corneal transplantation occurred 5 years after initial infection Type XII collagen was expressed in all the stroma, and was over expressed in the scar area (**Fig. 3B and D**), which was positive for α -SMA (**Fig. 3C**).

Spatio-temporal variation of expression of FACIT type XII collagen protein in adult mouse cornea after incision

We assessed the localization of type XII collagen protein in normal adult mouse cornea and investigated its variation during corneal wound healing by immunocytochemistry analysis.

Unwounded cornea expressed a low level of type XII collagen (**Fig. 4A and Supl. Fig. 1A**). Goat serum was used as a negative control (**Fig. 4B and Supl. Fig. 1B**). At 7 and 14 days post-corneal wound healing, we observed that type XII collagen was largely concentrated in the sub-epithelial and sub-endothelial regions of the cornea, especially near the wound bed (**Fig. 4C, D and Supl. Fig. 1C, D**). Type

XII collagen expression increased at 21 days post-injury at the epithelial and endothelial interface, as well as in the stroma (**Fig. 4E and Supl. Fig. 1E**). At 28 days post-surgery, expression of type XII collagen continued to increase and appeared to be widely distributed throughout the stroma (**Fig. 4F and Supl. Fig. 1F**).

Expression of the four type XII collagen mRNA splice variants in mouse cornea during wound healing

Four splice variants of type XII collagen were previously described. Thus, during this study we looked for the presence of corresponding mRNAs to these splice variants in adult mouse corneal epithelium and corneal stroma. We also assessed how their expression levels changed in these regions during corneal wound healing. Total mRNA was isolated from corneal epithelium and stroma on days 7, 14, 21 and 28 after injury and the mRNA expression of the four type XII collagen splice variants was examined by *RT-qPCR*. The results revealed that all of these collagen XII mRNAs splice variants were detected in normal mouse corneal epithelium and corneal stroma samples (**Figs. 5-8**).

Expression of type XII collagen NC1 splice variants (NC1-L and NC1-S) in mouse corneal epithelium and stroma after incision

NC1-L (black) expression was significantly increased in the epithelium by a factor of $2,68 \pm 0,77$, $3,72 \pm 1,23$ and $5,57 \pm 2,06$ respectively for D7, D14 and D21 after incision ($p < 0.01$, **Fig. 5**).

In the stroma, NC1-L was significantly increased by a factor of 1.68 ± 0.21 and 1.68 ± 0.25 respectively for D21 and 28 ($p < 0.05$, **Fig. 6**).

Concerning expression of the NC1-S variant (white) in the epithelium, we only found it increased by a factor of 2.53 ± 2.06 at D21 post-incision ($p < 0.05$, **Fig. 5**).

In the stroma, we did not observe any change in expression of the NC1-S mRNA variant (**Fig. 6**).

Expression of type XII collagen NC3 splice variants (NC3-L and NC3L+S) in mouse corneal epithelium and stroma after incision

We observed no difference in the expression of the NC3-L variant (black) neither in the epithelium, nor in the stroma during corneal wound healing (**Fig. 7 and 8**). In contrast, the NC3-S+L variant (white) expression demonstrated a significant increase in the epithelium on day 14 and 21 respectively by a factor of 2.35 ± 0.76 and 2.29 ± 0.62 ($p < 0.05$, **Fig. 7**). In the stroma, we observed a significant decrease in its expression on days 21 and 28 respectively by a factor of 0.81 ± 0.09 and 0.83 ± 0.09 ($p < 0.05$, **Fig. 8**).

Expression of type XII collagen protein in permanent murine corneal scar

We collected mice corneas 7 months after incision. These mice presented permanent scar. Except for corneal opacity, these mice did not present any other clinical signs (no synechia, no cataract). We evaluated mice presenting grade 1 and 3 opacities as previously described⁸. To avoid potential artifact staining due to aging, we also investigated two corneas from mice of the same group, which were not wounded. Non-wounded corneas expressed a low level of type XII collagen (**Fig. 9A**). In grade 1 opacity, type XII collagen staining was over expressed in the upper part of the stroma. Sub-epithelial and endothelial areas were also positive (**Fig. 9B**). In the

grade 3 opacity, we observed a stronger staining than in the grade 1 in the stroma. Sub-epithelial and endothelial areas were also positive (**Fig 9C**).

Discussion

The purpose of our study was to investigate the expression of a new class of collagen protein, which could be involved in corneal scar formation and stabilization. We demonstrated that FACIT type XII collagen protein was over expressed in human corneal scar.

Besides their association with fibrillar collagens and their putative role in stabilization of these fibers during embryogenesis^{20, 21}, little is known about the function of type XII collagen in adult tissue, especially in the context of wound healing. In the cornea, only one paper from El-Shabrawi et al. describes changes in type XII collagen mRNA expression, which are increased following an incision wound in the rabbit¹⁴. Unfortunately, they used whole cornea mRNA, and did not investigate the different mRNA splice variants, nor did they perform protein staining. Interestingly it has been reported that type XII collagen was expressed during embryogenesis in part of the stroma where collagen fibers presented thermal and collagenase resistance³⁰⁻³². These observations suggest different ECM properties where the type XII collagen is abundant. Moreover, type XII collagen expression has also been reported in bleomycin-induced lung fibrosis first steps. We extrapolated these observations to permanent corneal scar and hypothesized that type XII collagen could contribute to the formation and maintenance of the scar extracellular matrix. We investigated its expression in two different types of scars, traumatic and infectious. Scar area was identified by expression of α -SMA, revealing presence of myofibroblastic cells, which was then associated with a strong expression of type XII collagen. In contrast, normal part of the cornea revealed a slight staining throughout the stroma, similarly to what has been previously described for human and other species²⁰⁻²⁴.

To go further, we analyzed type XII collagen expression in a mouse model of corneal wound healing, in order to decipher its expression during the normal step of repair. In the unwounded mouse cornea, we observed a weak expression of type XII collagen in the stroma, and no expression in the epithelium or the endothelium. This observation is in agreement with the work of Oh et al.²³. Following corneal incision, type XII collagen expression was increased, with a different spatial organization over time. Thus, on day 7, we observed type XII collagen in all the stromal layers, with a stronger staining in the sub-epithelial and sub-endothelial area adjacent to the wound bed. Interestingly, the staining intensity in these interface areas increased over time between days 14 and 21. We can hypothesize that these areas support an increased mechanical load to compensate for the central incision. It is known that type XII collagen may bind to decorin in order to interact with fibrillar collagen. Zhan et al. showed in a similar rabbit model of corneal incision that decorin mRNA was overexpressed 14 days after wounding, especially near the wound bed³³. These results confirm the potential co-expression of both proteins during corneal wound healing. On day 28, we observed that corneal thickness had returned to that of the unwounded cornea (Supl. Fig. 1A and F) and that there was strong type XII collagen staining throughout the stroma. As it has been suggested by several authors during corneal development studies^{21, 31, 34}, a similar process also occurs in the embryo during the corneal collagen compaction step²². All of these observations lead us to hypothesize that during corneal wound healing, there is a reactivation of embryonic molecular processes such that developmental stromal build up can be compared to adult stromal repair.

Increased expression of type XII collagen protein during corneal wound healing was confirmed at the mRNA level. More precisely, we demonstrated that the

type XII collagen splice variants are differentially expressed in the mouse corneal epithelium and stroma after injury.

Regarding changes in the NC3 domain, primers targeting both the short and long NC3 variants showed significantly increased expression in the epithelium on days 14 and 21. In contrast, the expression of these variants in the stroma decreased on days 21 and 28. Primers targeting only the long NC3 variant demonstrated a tendency to increase in the epithelium on days 14 and 21, but this did not reach statistical significance. In the stroma, expression of this variant was unchanged. We can deduce that expression of the short NC3 variant was increased in the epithelium while it was decreased in the stroma. Thus, there should be a gradient in the composition of the NC3 domain from the front to the rear of the cornea. These results reveal another correlation between corneal wound healing and embryonic corneal development. In support of this hypothesis, Gordon et al. showed that during avian corneal embryonic development there was a dramatic increase in the short NC3 isoform in the epithelium around day 15²¹. Furthermore, these authors and others^{30, 35} have suggested that type XII collagen may play a role in the stabilization of fibrillar collagens localized in the matrix adjacent to the corneal epithelium. Thus, this study brings additional information about a potential role for type XII collagen isoforms in the different parts of the cornea during wound healing.

Regarding the NC1 splice variants, we observed increased expression of the long form in both the epithelium and the stroma, while expression of the short NC1 variant was mostly unchanged. To date, this study is the first to report a differential expression of this variant *in vivo*, which is of special interest because this variant contains a potential site of interaction with glycosaminoglycans¹⁹. Thus, it will now

be interesting to investigate with which other extracellular matrix molecule this domain is interacting.

Last but not least, this study reveals i) that corneal epithelium could contribute to stromal ECM synthesis. Precise role in the basal lamina or in sub-epithelial area still need to be investigated; ii) that after mouse corneal incision, there is differential expression of type XII collagen variants between the epithelium and the stroma. Because type XII collagen isoforms differ in their amino and carboxy terminal domains, we can infer from these observations that each type XII collagen splice variant may have a specific function in the interactions and the assembly of different types of fibrillar collagens. As such, the observed differential expression could play a role in ECM organization. For instance, type XII collagen variants could vary in their ability to bind to different collagen fibrils or to interact with other matrix components and could therefore have a different impact in corneal remodeling during wound healing.

Finally, we investigated type XII collagen expression in long term corneal scar in mouse. In our model, most of the mice did not heal from the wound. Several weeks after incision, we still observed a strong staining which seems to correlate with the intensity of the opacity. Thus, we demonstrated that type XII collagen is over expressed in both mouse and human permanent scar. During acute phase of corneal wound repair, links and hypothesis could be done with regards to corneal embryogenesis, especially concerning collagen mechanical stability and ECM maturation. However, its role in late scar stabilization need to be investigates.

This study brings new evidence on the complexity of the role of type XII collagen in modifications to ECM organization in the context of tissue repair and scar

formation. Next steps will concern type XII collagen role in ECM scar persistence to evaluate if it could represent a new target to treat permanent corneal scar.

Acknowledgements

The authors thank Dr David Hulmes for helpful comments on the manuscript. We also thank MA Daussion and J Bernard from the Centre de Recherche de Chirurgie Expérimentale Claude Bernard (CHU Purpan, Toulouse, France) for animal care and experiments.

References

1. Foster A, Resnikoff S. The impact of Vision 2020 on global blindness. *Eye (Lond)* 2005;19:1133-1135.
2. O'Brart DP, Lohmann CP, Klonos G, et al. The effects of topical corticosteroids and plasmin inhibitors on refractive outcome, haze, and visual performance after photorefractive keratectomy. A prospective, randomized, observer-masked study. *Ophthalmology* 1994;101:1565-1574.
3. Gillies MC, Garrett SK, Shina SM, Morlet N, Taylor HR. Topical interferon alpha 2b for corneal haze after excimer laser photorefractive keratectomy. The Melbourne Excimer Laser Group. *J Cataract Refract Surg* 1996;22:891-900.
4. Moller-Pedersen T, Cavanagh HD, Petroll WM, Jester JV. Neutralizing antibody to TGFbeta modulates stromal fibrosis but not regression of photoablative effect following PRK. *Curr Eye Res* 1998;17:736-747.
5. Vigo L, Scandola E, Carones F. Scraping and mitomycin C to treat haze and regression after photorefractive keratectomy for myopia. *J Refract Surg* 2003;19:449-454.
6. Csutak A, Silver DM, Tozser J, Hassan Z, Berta A. Urokinase-type plasminogen activator to prevent haze after photorefractive keratectomy, and pregnancy as a risk factor for haze in rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:1329-1333.
7. Muller M, Meltendorf C, Mirshahi A, Kohnen T. [Use of multilayer amniotic membrane as first therapy for penetrating corneal ulcers]. *Klin Monbl Augenheilkd* 2009;226:640-644.
8. Galiacy SD, Fournie P, Massoudi D, et al. Matrix metalloproteinase 14 overexpression reduces corneal scarring. *Gene Ther* 2011;18:462-468.
9. Mohan RR, Tandon A, Sharma A, Cowden JW, Tovey JC. Significant Inhibition of Corneal Scarring In Vivo With Tissue-Selective Targeted AAV5 Decorin Gene Therapy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*.
10. Michelacci YM. Collagens and proteoglycans of the corneal extracellular matrix. *Braz J Med Biol Res* 2003;36:1037-1046.
11. Tzortzaki EG, Tischfield JA, Sahota A, Siafakas NM, Gordon MK, Gerecke DR. Expression of FACIT collagens XII and XIV during bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 2003;275:1073-1080.
12. Shaw LM, Olsen BR. FACIT collagens: diverse molecular bridges in extracellular matrices. *Trends Biochem Sci* 1991;16:191-194.
13. Keene DR, Lunstrum GP, Morris NP, Stoddard DW, Burgeson RE. Two type XII-like collagens localize to the surface of banded collagen fibrils. *J Cell Biol* 1991;113:971-978.
14. El-Shabrawi Y, Kublin CL, Cintron C. mRNA levels of alpha1(VI) collagen, alpha1(XII) collagen, and beta ig in rabbit cornea during normal development and healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39:36-44.
15. Koch M, Bernasconi C, Chiquet M. A major oligomeric fibroblast proteoglycan identified as a novel large form of type-XII collagen. *Eur J Biochem* 1992;207:847-856.
16. Font B, Eichenberger D, Goldschmidt D, Boutillon MM, Hulmes DJ. Structural requirements for fibromodulin binding to collagen and the control of type I collagen fibrillogenesis--critical roles for disulphide bonding and the C-terminal region. *Eur J Biochem* 1998;254:580-587.

17. Font B, Eichenberger D, Rosenberg LM, van der Rest M. Characterization of the interactions of type XII collagen with two small proteoglycans from fetal bovine tendon, decorin and fibromodulin. *Matrix Biol* 1996;15:341-348.
18. Veit G, Hansen U, Keene DR, et al. Collagen XII interacts with avian tenascin-X through its NC3 domain. *J Biol Chem* 2006;281:27461-27470.
19. Kania AM, Reichenberger E, Baur ST, et al. Structural variation of type XII collagen at its carboxyl-terminal NC1 domain generated by tissue-specific alternative splicing. *J Biol Chem* 1999;274:22053-22059.
20. Young BB, Zhang G, Koch M, Birk DE. The roles of types XII and XIV collagen in fibrillogenesis and matrix assembly in the developing cornea. *J Cell Biochem* 2002;87:208-220.
21. Gordon MK, Foley JW, Linsenmayer TF, Fitch JM. Temporal expression of types XII and XIV collagen mRNA and protein during avian corneal development. *Dev Dyn* 1996;206:49-58.
22. Anderson S, SundarRaj S, Fite D, Wessel H, SundarRaj N. Developmentally regulated appearance of spliced variants of type XII collagen in the cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:55-63.
23. Oh SP, Griffith CM, Hay ED, Olsen BR. Tissue-specific expression of type XII collagen during mouse embryonic development. *Dev Dyn* 1993;196:37-46.
24. Wessel H, Anderson S, Fite D, Halvas E, Hempel J, SundarRaj N. Type XII collagen contributes to diversities in human corneal and limbal extracellular matrices. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997;38:2408-2422.
25. Saika S, Ooshima A, Shima K, Tanaka S, Ohnishi Y. Collagen types in healing alkali-burned corneal stroma in rabbits. *Jpn J Ophthalmol* 1996;40:303-309.
26. Stramer BM, Zieske JD, Jung JC, Austin JS, Fini ME. Molecular mechanisms controlling the fibrotic repair phenotype in cornea: implications for surgical outcomes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:4237-4246.
27. Saika S, Yamanaka O, Sumioka T, et al. Fibrotic disorders in the eye: targets of gene therapy. *Prog Retin Eye Res* 2008;27:177-196.
28. Linsenmayer TF, Gibney E, Fitch JM. Embryonic avian cornea contains layers of collagen with greater than average stability. *J Cell Biol* 1986;103:1587-1593.
29. Marchant JK, Zhang G, Birk DE. Association of type XII collagen with regions of increased stability and keratocyte density in the cornea. *Exp Eye Res* 2002;75:683-694.
30. Yamauchi M, Kuboki Y, Sasaki S, Mechanic GL. New pepsin-solubilized low molecular weight collagenous component possibly unique to periodontal ligament. *Biochemistry* 1986;25:1997-2002.
31. Zhan Q, Burrows R, Cintron C. Cloning and in situ hybridization of rabbit decorin in corneal tissues. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995;36:206-215.
32. Akimoto Y, Yamakawa N, Furukawa K, Kimata K, Kawakami H, Hirano H. Changes in distribution of the long form of type XII collagen during chicken corneal development. *J Histochem Cytochem* 2002;50:851-862.
33. Fitch JM, Birk DE, Mentzer A, Hasty KA, Mainardi C, Linsenmayer TF. Corneal collagen fibrils: dissection with specific collagenases and monoclonal antibodies. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1988;29:1125-1136.
34. Bohme K, Li Y, Oh PS, Olsen BR. Primary structure of the long and short splice variants of mouse collagen XII and their tissue-specific expression during embryonic development. *Dev Dyn* 1995;204:432-445.

35. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 2002;3:RESEARCH0034.

LEGENDS

Fig. 1: Schematic representation of the modular structure of type XII collagen and the different NC3 and NC1 alternatively spliced transcripts.

Fig.2: Type XII collagen expression in human traumatic cornea. Subject was male, presenting corneal scarring for 18 months after a perforating mechanical wound. A: Biomicroscopy picture. Black arrows point toward corneal scar. Type XII collagen was expressed (B) and (D) in all the stromal depth. Area of type XII collagen over expression was also positive for alpha-smooth muscle actin (myofibroblast) (C). Scale bar denotes 100 μ m. Type XII collagen and alpha-smooth muscle actin staining is shown in red. DAPI-staining nuclei are shown in blue.

Fig.3: Type XII collagen expression in human herpetic cornea. Subject was a female, presenting herpes virus and corneal scarring complication for 5 years. A: Biomicroscopy picture. Black arrows point toward corneal scar areas. Type XII collagen was expressed (B) and (D) in all the stromal depth. Area of type XII collagen over expression was also positive for alpha-smooth muscle actin (myofibroblast) (C). Scale bar denotes 100 μ m. Type XII collagen and alpha-smooth actin staining is shown in red. DAPI-staining nuclei are shown in blue.

Fig. 4: Type XII collagen expression near the wound bed during murine corneal wound repair (n=3 to 5 mice per time point). A: unwounded cornea, B: negative control (goat serum), C: Day 7 post-incision, D: Day 14 post-incision, E: Day 21 post-

incision, F: Day 28 post-incision. Type XII collagen staining is shown in red. DAPI-staining nuclei are shown in blue. Scale bar: 25 μ m.

Fig. 5: Epithelial fold-change in expression of type XII collagen NC1 splice variants during murine corneal wound repair. Black: NC1-Long variant, White: NC1-Short variant. Fold-changes in gene expression were calculated in comparison with levels observed in unwounded corneal epithelia (n=6 to 11 mice per time point, for unwounded epithelia n=36). NC1-L variant expression was increased at days 7, 14 and 21 post-incision, while NC1-S variant expression was only increased at day 21 post-incision. *= P<0.05.

Fig. 6: Stromal fold-change in expression of type XII collagen NC1 splice variants during murine corneal wound repair. Black: NC1-Long variant, White: NC1-Short variant. Fold-changes in gene expression were calculated in comparison with levels observed in unwounded corneal stroma (n=9 to 21 mice per time point, for unwounded stroma n=42). NC1-L variant expression was increased at day 21 and day 28. *= P<0.05.

Fig. 7: Epithelial fold-change in expression of type XII collagen NC3 splice variants during murine corneal wound repair. Black: NC3-Long variant, White: NC3-Short+Long variants. Fold-changes in gene expression were calculated in comparison with levels observed in unwounded corneal epithelia (n=6 to 11 mice per time point, for unwounded epithelia n=36). NC3-S+L variants expression was increased at day 14 and day 21 post-incision. *= P<0.05.

Fig. 8: Stromal fold-change in expression of type XII collagen NC3 splice during murine corneal wound repair. Black: NC3-Long variant, White: NC3-Short+Long variants. Fold-changes in gene expression were calculated in comparison with levels observed in unwounded corneal stroma (n=9 to 21 mice per time point, for unwounded stroma n=42). NC3-S+L variants expression was decreased at day 21 and day 28. *= P<0.05.

Fig. 9: Type XII collagen expression in murine corneal scar. Corneas were investigated 7 months after incision. A: unwounded cornea. B: Grade 1 opacity (slight opacity that did not interfere with the visualization of fine iris detail). C: Grade 3 opacity (complete opacification of the stroma in the area of the ablation). Type XII collagen expression was stronger in grade 3 opacity compare to grade 1. Type XII collagen is shown in red. DAPI-staining nuclei are shown in blue. Scale bar: 25 μm .

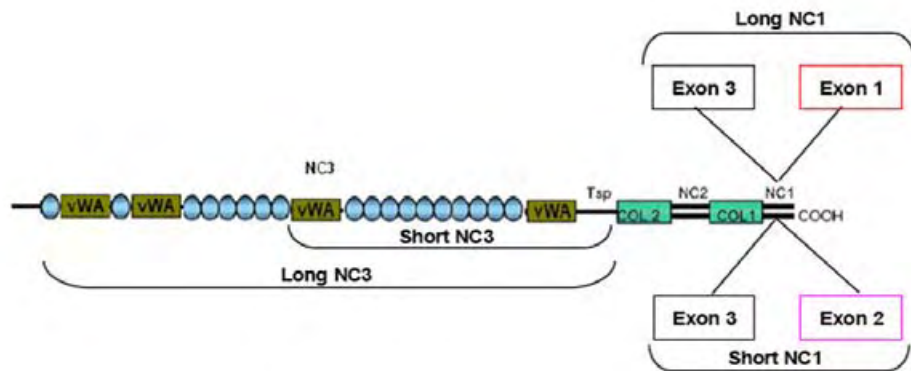
Supl. Fig. 1: Type XII collagen expression during murine corneal wound repair (n=3 to 5 mice per time point). A: unwounded cornea, B: negative control (goat serum), C: Day 7 post-incision, D: Day 14 post-incision, E: Day 21 post-incision, F: Day 28 post-incision. Type XII collagen staining is shown in red. DAPI-staining nuclei are shown in blue. Scale bar: 100 μm .

TABLES

Table 1. Primer sequences used for the detection of type XII collagen splice variant mRNA. Protein domain positions of these primers are indicated.

Name (Ensembl name)	Transcript ID ENSMUST	Forward primer	Position Domain (exon)	Reverse primer	Position Domain (exon)
NC1-L (Col12a1-003)	00000135009	GGTCCACCAGG GTCTACAGG	COL1 (Exon 65)	GGCACATAAGG CTCTGGATAGC	NC1 (Exon 65-66)
NC1-S (Col12a1-001)	00000071750	GGTCCACCAGG GTCTACAGG	COL1 (Exon 65)	TTAGCCGGAACC TGGATAGC	NC1 (Exon 65-66)
NC3-L (Col12a1-001)	00000071750	AAGTTTACCACT CGTTGGGCA	FN8 (Exon 17)	GAGAAATGAAG CTTCGCACAGT	vWA ₃ (Exon 18)
NC3-S+L (Col12a1-001)	00000071750	AGACATTGTGTT GCTGGTGGA	vWA ₃ (Exon 18)	GAGAAATGAAG CTTCGCACAGT	vWA ₃ (Exon 18)

Figure 1






-  = collagen fibrillar domains
-  = fibronectin type III repeat-like domains
-  = von Willebrand factor A-like domains
- Tsp** = thrombospondin-like domains

Figure 2

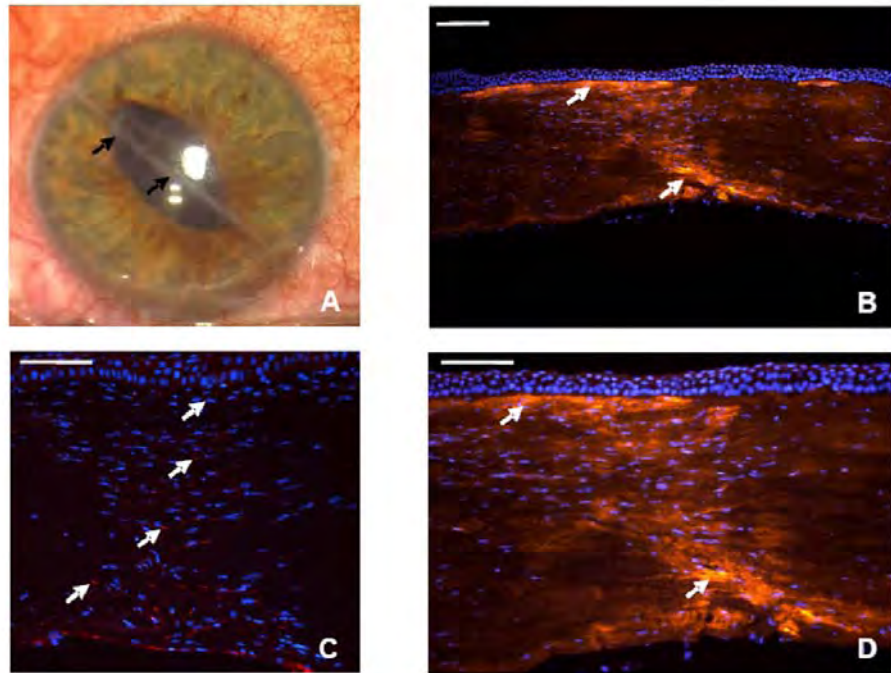


Figure 3

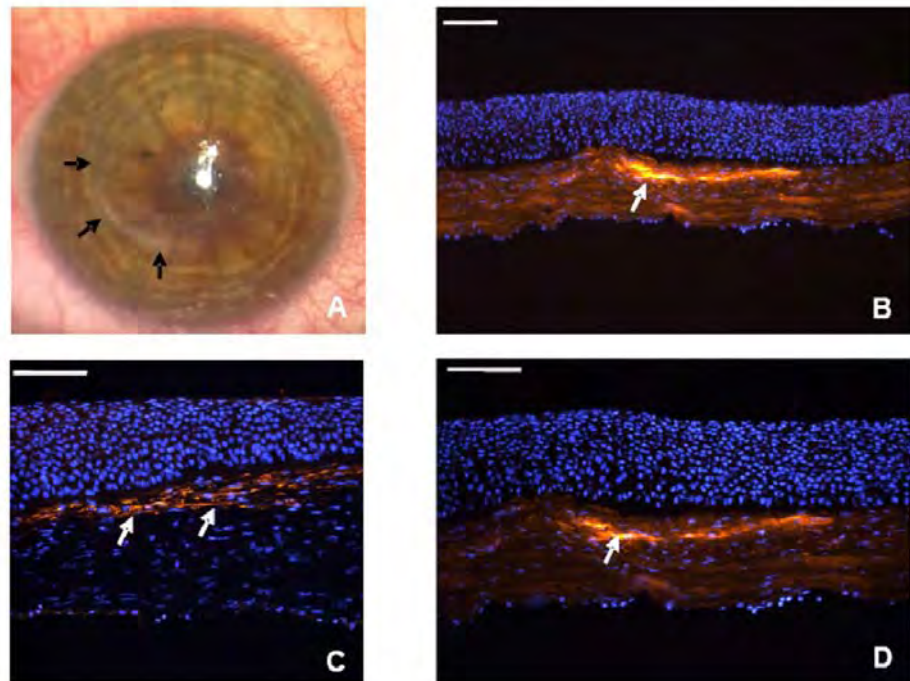


Figure 4

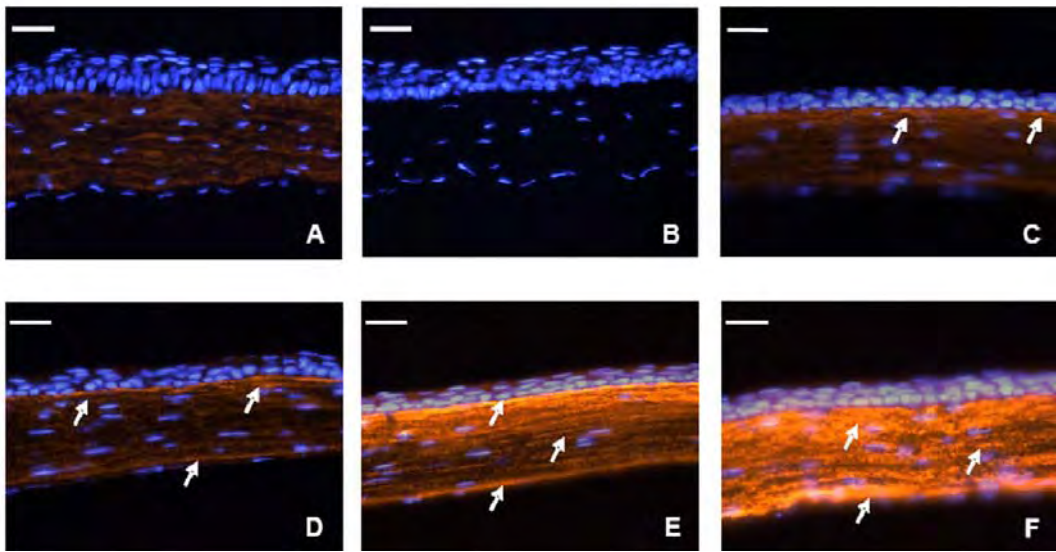


Figure 5

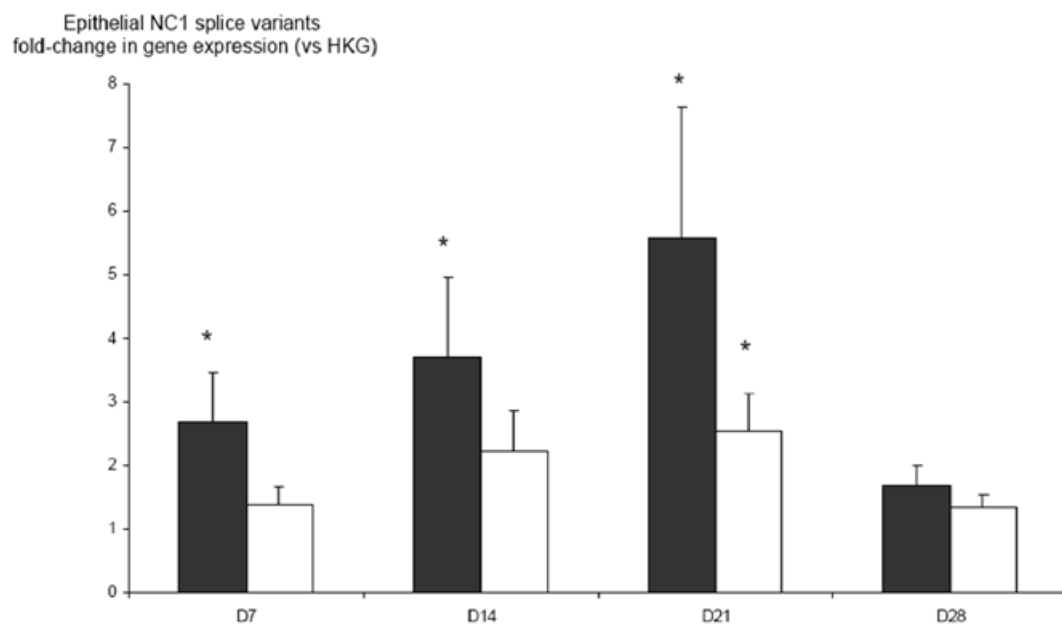


Figure 6

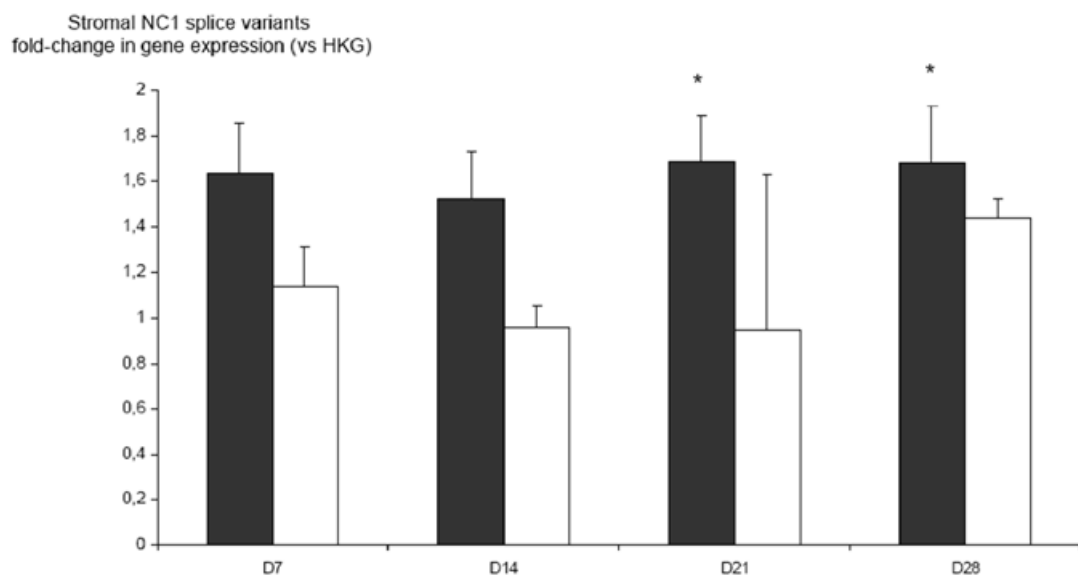


Figure 7

Epithelial NC3 splice variants
fold-change in gene expression (vs HKG)

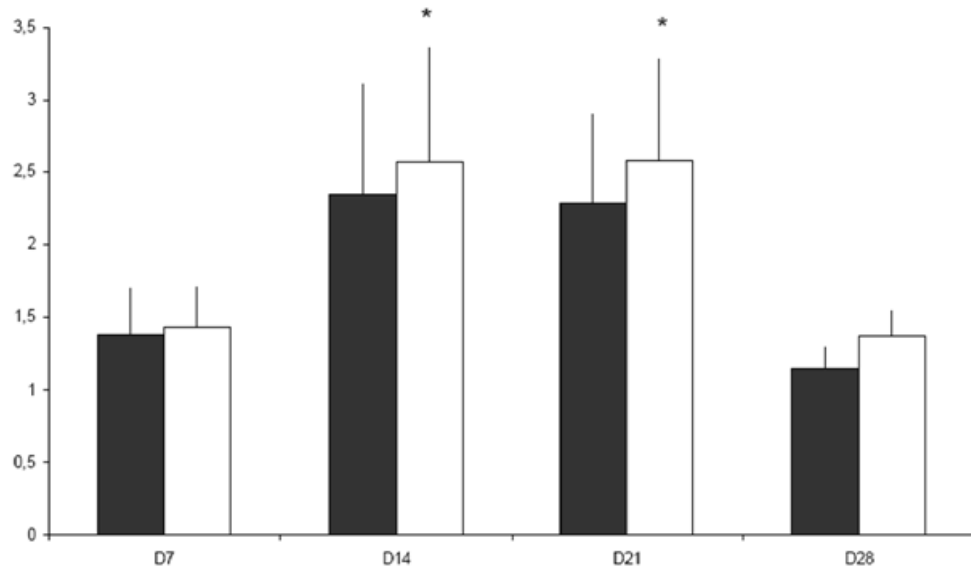


Figure 8

Stromal NC3 splice variants
fold-change in gene expression (vs HKG)

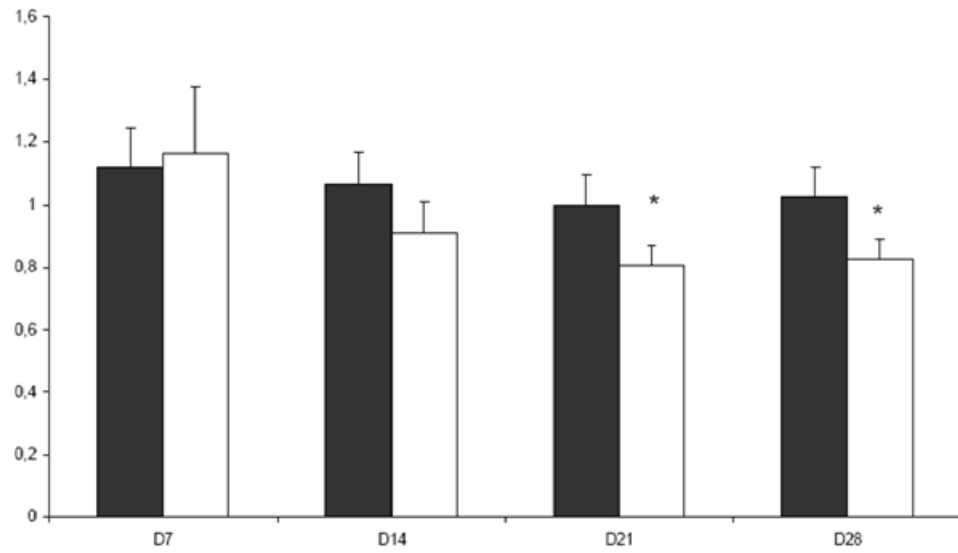
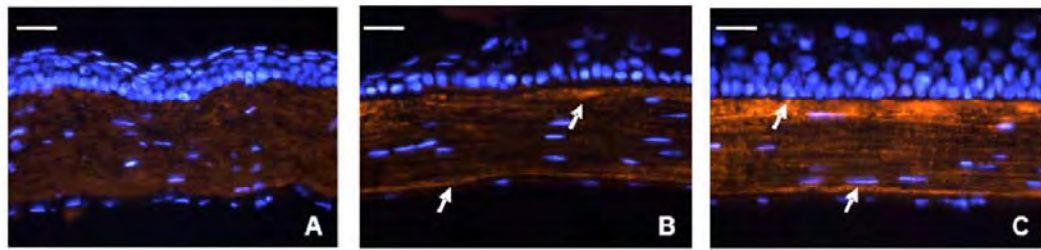
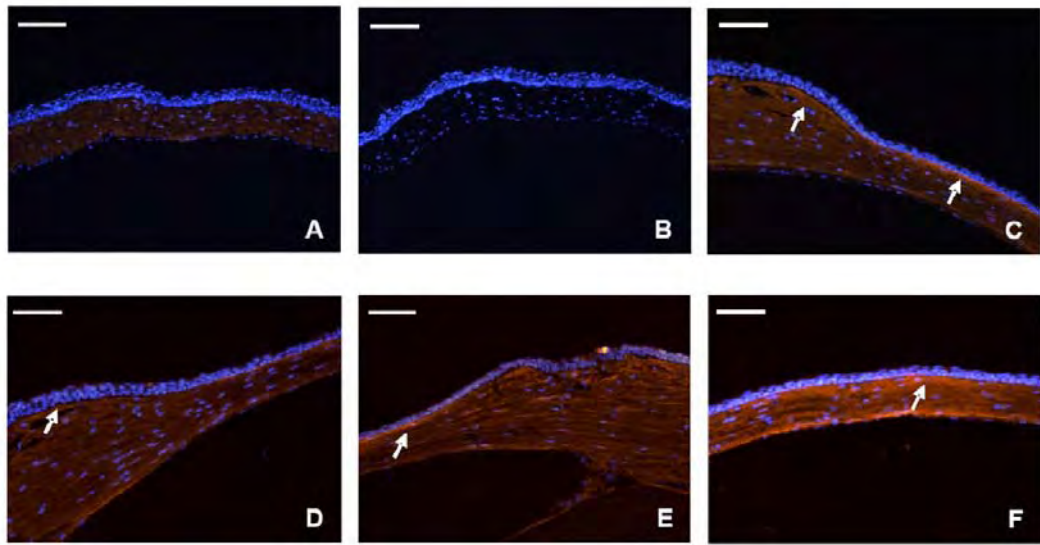


Figure 9



Supplemental Figure 1



III.3.3. Conclusion

Ce travail a permis de mettre en évidence pour la première fois une corrélation entre la persistance d'une opacité cornéenne après un traumatisme et une augmentation l'expression du collagène de type XII. Cette remarque d'abord effectuée chez l'homme s'avère également valable chez d'autres espèces telle que la souris. De plus, l'intensité de l'expression du collagène de type XII semble varier en fonction de la gravité de l'opacité. Les expériences effectuées chez la souris ont montré que plus l'opacité cornéenne est sévère plus l'expression du collagène de type XII est importante. Ce travail apporte donc une nouvelle information sur les molécules qui peuvent jouer un rôle important dans la modulation et le maintien des opacités cornéennes. Par ailleurs, le collagène de type XII fait parti des collagènes FACIT, qui sont connus et décrits comme étant des molécules qui sont situées à la surface des collagènes fibrillaires. Cette localisation leur permettrait de contrôler le degré de compaction et l'organisation spatiale des fibres de collagène. Ainsi, le fait que l'expression de ce collagène se trouve augmentée dans les endroits de la cornée où de l'opacité s'est installée, laisse suggérer que cette molécule pourrait jouer un rôle important dans le maintien et peut être même dans la mise en place de cette opacité après un traumatisme cornéen.

III.4. Analyse de l'expression du collagène de type XIV au niveau de la cornée murine

III.4.1. Objectifs

Le collagène de type XIV comme le type XII est un FACIT qui est étudié principalement au cours du développement embryonnaire notamment celui de la cornée. Différentes études ont montré que ce collagène subit une évolution spatiotemporelle au cours du développement de la cornée. L'expression de l'ARN messager du collagène de type XIV augmente fortement au niveau du stroma cornéen durant la période de compaction de la cornée secondaire, événement nécessaire à la transparence cornéenne (Gordon et al., 1996). Ce qui laisse penser que le collagène de type XIV pourrait jouer un rôle dans cette événement (Gordon et al., 1996) plus précisément dans la régulation de la fibrillogenèse (Young et al., 2002). De surcroît, chez le poulet, l'expression de ce collagène diminue durant les phases tardives du développement jusqu'à devenir indétectable à l'éclosion et à l'état adulte (Young et al., 2002). Le collagène de type XIV semble également absent au sein de cornées adultes normales d'autres espèces y compris l'homme. Le collagène de type XIV est réexprimé au niveau de la cornée adulte lors d'un dysfonctionnement au point que certaines personnes l'utilisent comme marqueur de « *mauvaise cicatrisation cornéenne* » [(Maguen et al., 2007), (Maguen et al., 2008)]. Toutes ces observations laissent penser que le collagène de type XIV pourrait avoir un rôle important dans le remodelage matriciel mis en place après blessure cornéenne.

Ainsi, le but de cette étude est de dresser le profil d'expression du collagène de type XIV au cours de la cicatrisation cornéenne murine. Ceci pourrait permettre par la suite de déterminer l'implication de ce collagène dans la cicatrisation et plus précisément dans la mise en place et le maintien d'une opacité cornéenne après traumatisme.

III.4.2. Résultats

III.4.2.1. Expression protéique du collagène de type XIV au niveau d'une cornée normale

L'expression du collagène de type XIV a principalement été étudié au niveau de la cornée des aviaires lors du développement embryonnaire. Très peu d'études ont été faites chez la souris et aucune n'a porté sur la cornée. Ainsi la première étape de notre étude sur le collagène de type XIV est de caractériser son expression au niveau d'une cornée adulte de souris normale.

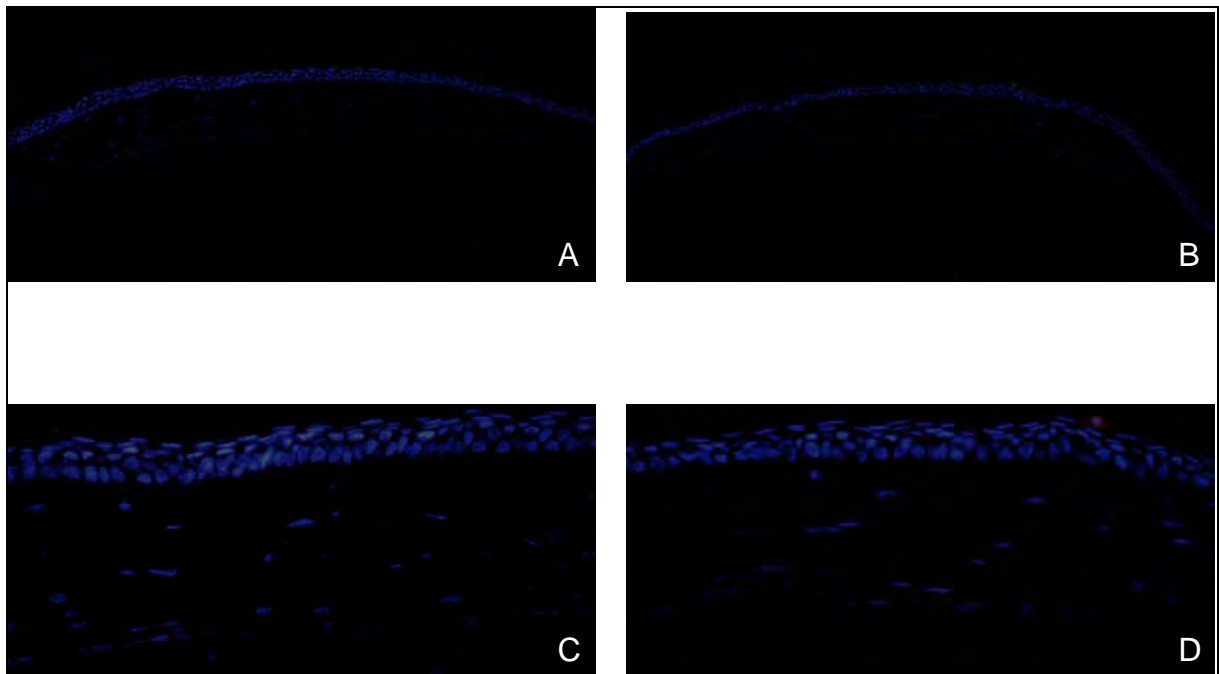


Figure 58 : Absence de l'expression du collagène de type XIV au niveau de la cornée de souris. Les souris furent sacrifiées, les yeux pélevés et congelés. L'expression du collagène de type XIV a été suivie par immunohistochimie dans les cornées. Les images B et D ont été prises dans les échantillons ayant été traités avec l'anticorps anti collagène de type XIV tandis que celles en A et C correspondent au témoin négatif.

L'analyse des résultats obtenus en immunofluorescence avec l'anticorps dirigé contre le collagène de type XIV montre une absence d'expression protéique du collagène de type XIV au niveau de la cornée normale de souris C57/BL6 adulte.

La reproductibilité des résultats réalisés sur 4 souris différentes permet de confirmer l'absence du collagène de type XIV au sein d'une cornée normale de souris C57/BL6 avec la technique utilisée (**Figure 57**).

III.4.2.2. Evolution de l'expression protéique du collagène de type XIV au cours de la cicatrisation cornéenne

Certains auteurs se servent de l'apparition de l'expression du collagène de type XIV dans des organes où elle n'est pas exprimée à l'état normal, comme marqueur de disfonctionnement. D'autres auteurs ont montré que le collagène de type XIV semble jouer un rôle dans la fibrillogenèse et la compaction du collagène du stroma cornéen lors du développement de la cornée chez les aviaires. Le remodelage matriciel mis en place après une incision cornéenne chez la souris fait intervenir des phénomènes de synthèse et de compaction du collagène au niveau de la zone en remaniement. De ce fait, le second aspect de l'analyse du collagène de type XIV s'est porté d'une part sur sa localisation au niveau de la cornée de souris après incision et d'autre part sur le suivi de son expression au cours de l'évolution de la cicatrisation cornéenne. Pour cela, des souris sur lesquelles une incision a été réalisée sur l'œil gauche, ont été sacrifiées à différents temps post-opératoires (J7, J14, J21 et J28), les yeux prélevés et congelés. L'expression protéique du collagène de type XIV a été ensuite évaluée en immunofluorescence sur des coupes de 7 μ m d'épaisseur réalisées sur les yeux précédemment congelés.

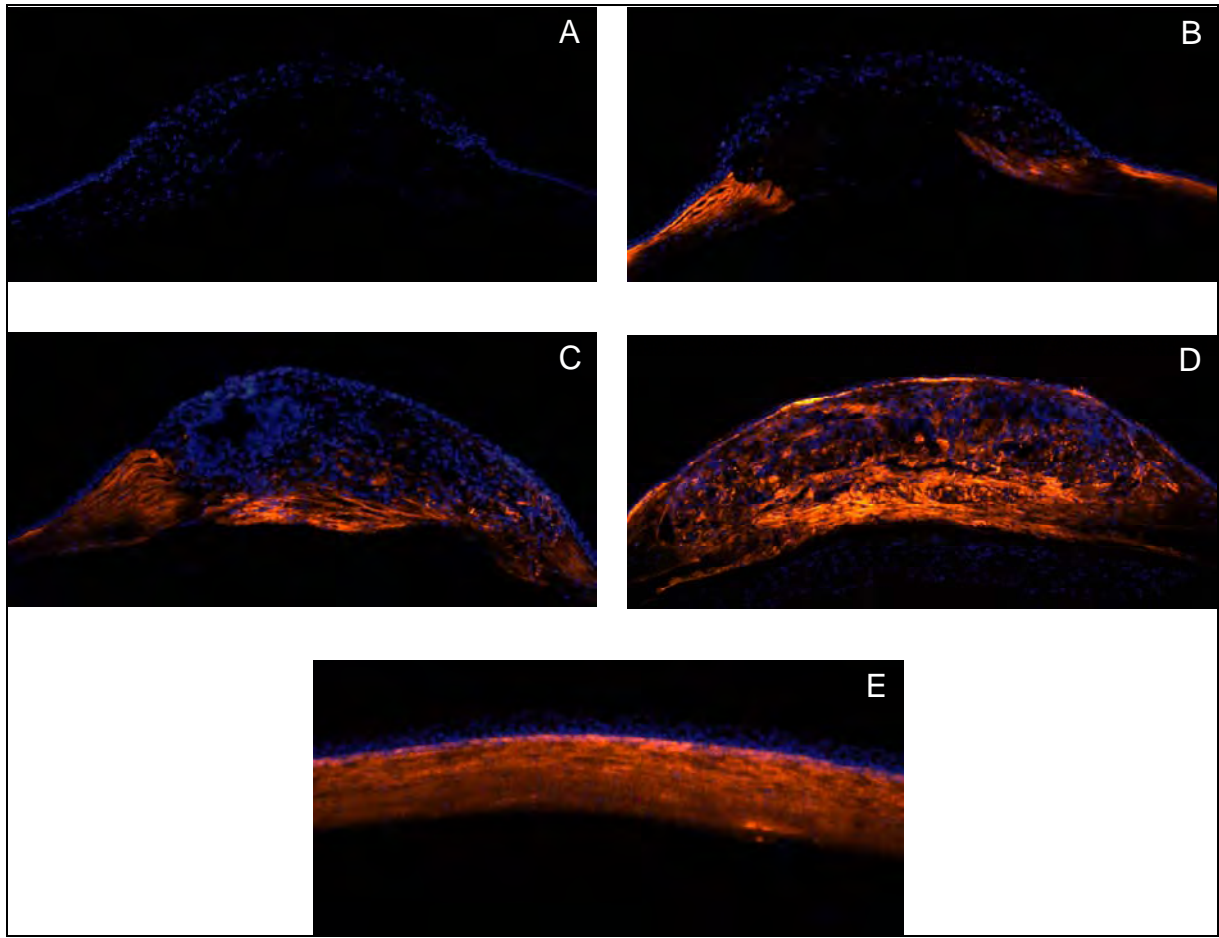


Figure 59 : Evolution de l'expression du collagène de type XIV au niveau d'une cornée de souris (zone blessée) après incision.

L'analyse immunohistochimique du collagène de type XIV au niveau de l'incision 7 jours après, montre une expression protéique localisée autour des berges de la zone blessée (**Figure 58B**). En effet, le collagène de type XIV semble absent au sein de la zone en remaniement 7 jours après la lésion. Cependant, 14 jours après la blessure, le profil du collagène de type XIV dans la zone blessée montre une expression localisée dans la moitié postérieure de la cornée (**Figure 58C**). Cette protéine devient fortement exprimée dans l'ensemble de la matrice du stroma cornéen en remaniement avec une absence d'expression épithéliale, 21 jours après l'ablation (**Figure 58D**). Le collagène de type XIV semble être exprimé dans l'ensemble du stroma cornéen mais également par la partie basale de l'épithélium, 4 semaines après l'opération (**Figure 58E**).

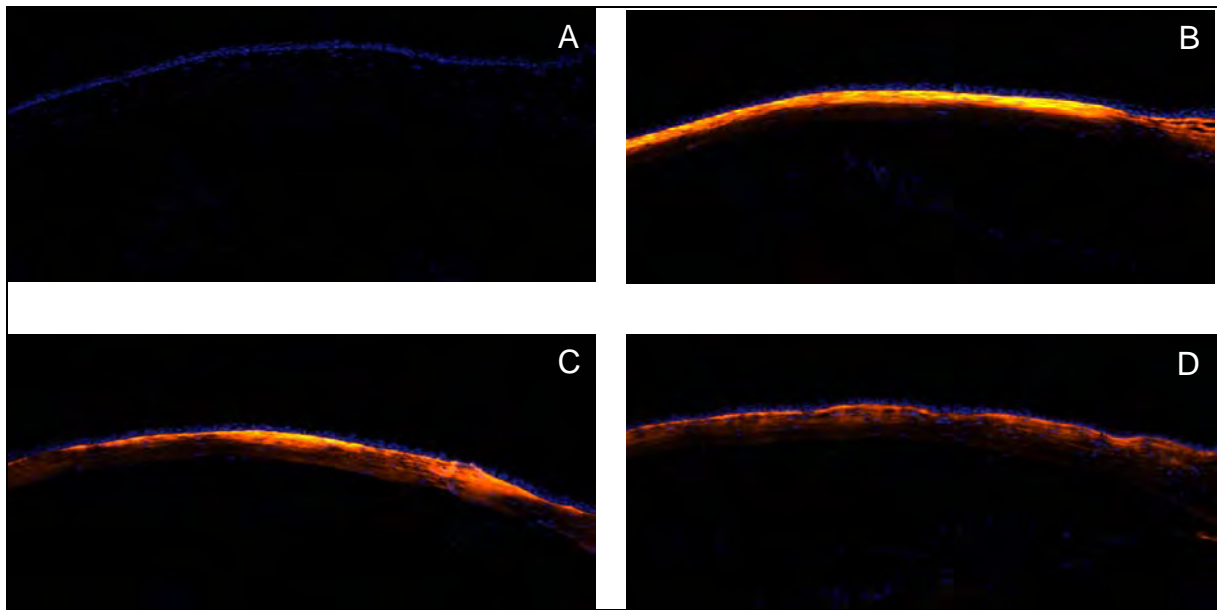


Figure 60 : Profil d'expression du collagène de type XIV au niveau de la cornée après incision : Evolution de l'expression protéique du collagène de type XIV à côté de la zone lésée. Les souris sont blessées, sacrifiées à intervalle régulier : J7 (A), J14 (B), J21 (C) et J28, (D), les cornées prélevées et une immunofluorescence réalisée avec un anticorps dirigé contre le collagène de type XIV.

L'observation des parties de la cornée non blessée montre que ces régions environnantes semblent participer activement au remaniement matriciel. L'évolution de l'expression protéique du collagène de type XIV semble cependant différente de celle de la zone lésée analysée précédemment. En effet, 7 jours après incision, le collagène de type XIV montre une forte expression localisée au niveau de la basale et de la partie antérieure du stroma. Cette expression stromale semble former un gradient décroissant qui va de la partie la plus antérieure vers le milieu du stroma cornéen (**Figures 59B ; 60B**). Deux semaines après la blessure le collagène de type XIV semble être présent dans l'ensemble du stroma de la cornée avec une expression qui semble plus forte dans la partie antérieure (**Figures 59C ; 60C**). La même tendance s'observe également à J21 post-blessure avec cependant une expression antérieure stromale qui semble moins importante. En effet, l'expression protéique du collagène de type XIV au niveau du stroma semble uniforme. La surexpression de cette protéine semble persister uniquement au niveau de l'interface entre l'épithélium et le stroma, à savoir la lame basale (**Figures 59 D ; 60D**). Le collagène de type XIV semble avoir, 28 jours après l'incision, une expression plus diffuse au niveau de

l'ensemble du stroma cornéen avec une apparition au niveau des cellules basales de l'épithélium (Figures 58E, 60E).

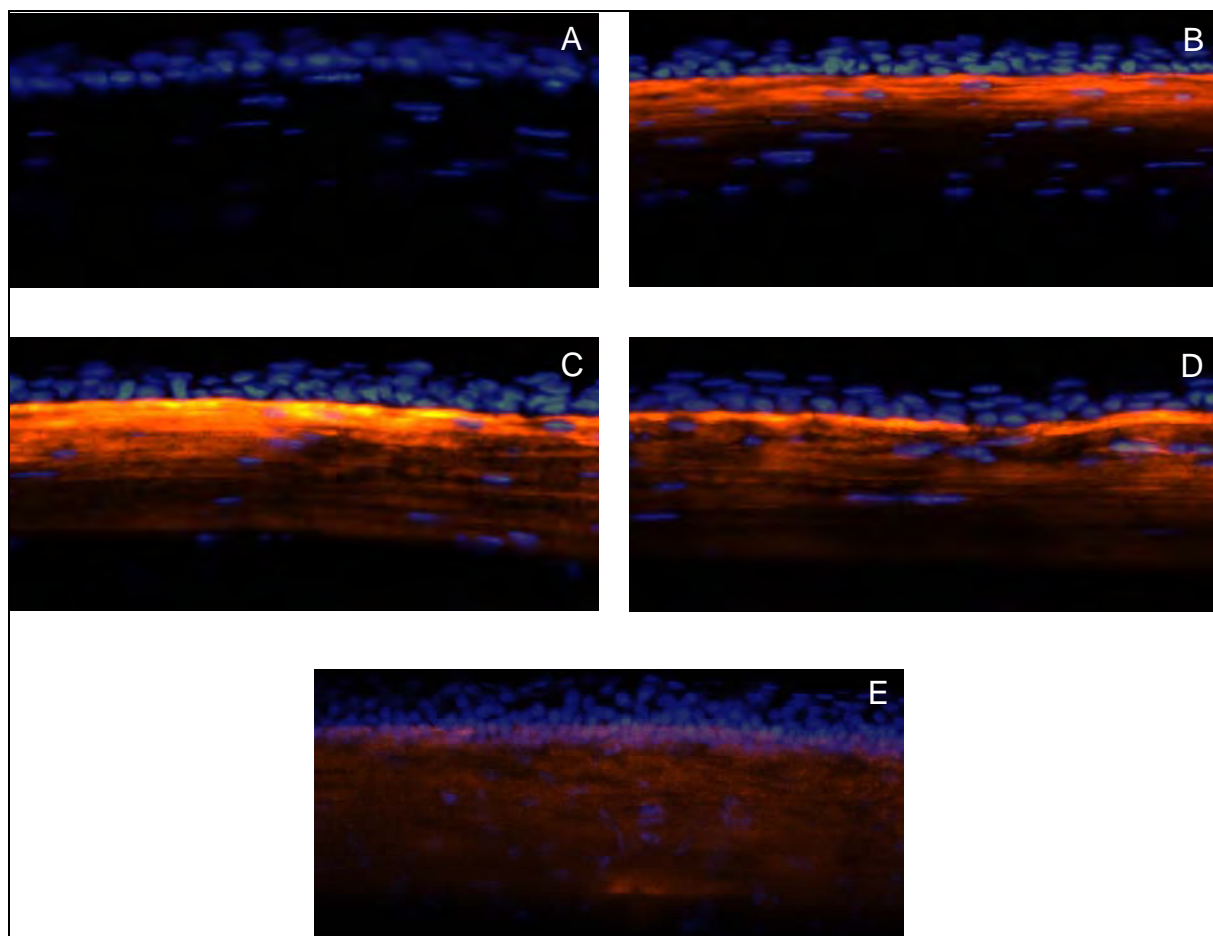


Figure 61 : Expression protéique du collagène de type XIV en périphérie de la zone blessée au cours de différentes étapes de la cicatrisation coréenne. Les souris sont blessées, sacrifiées à intervalle régulier : J7 (B), J14 (C), J21 (D) et J28 (E), les cornées prélevées et une immunofluorescence réalisée avec un anticorps dirigé contre le collagène de type XIV. L'image (A) correspond au contrôle négatif.

III.4.3. Conclusion

Les résultats de ce travail ont permis de confirmer l'absence d'expression de la protéine du collagène de type XIV au niveau d'une cornée normale de souris adulte C57/BL6. L'analyse en immunohistochimie de l'expression de cette protéine après blessure a permis de dresser le profil d'expression spatiotemporel du collagène de type XIV au cours de la cicatrisation coréenne. Ces résultats ont permis de montrer pour la première fois la manière dont l'expression protéique du collagène de type XIV varie au cours de la réparation de la cornée.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Approches thérapeutiques :
**ciblage de l'opacité
cornéenne par modulation
de l'activité de protéinases
matricielles**

IV.1. Approche par thérapie génique : réduction de l'opacité cornéenne par surexpression de la MT1-MMP ou MMP-14

Cette étude a permis de mettre en évidence l'efficacité de la surexpression de MMPs dans la réduction des opacités cornéennes. Ce travail a utilisé un vecteur viral de type AAV pour transduire les kératocytes et permettre la surexpression de la métalloprotéinase de type 14. Ces résultats sont très prometteurs puisqu'ils montrent bien une réduction de l'opacité cornéenne accompagnée d'une diminution des principaux marqueurs de fibrose que sont l' α -SMA et le collagène de type III.

Il reste cependant à élucider le mécanisme mis en jeu par la MMP-14 pour aboutir à ce résultat. En effet, la MMP-14 possède en plus de son activité protéase directe, une activité protéolytique indirecte qui passe par l'activation de la MMP2 (après interaction avec le TIMP-2). De plus, il a également été montré que cette métalloprotéinase participe à la migration cellulaire via l'activation de la voie intracellulaire ERK1/2.

Les résultats obtenus en PCR temps réel montrent de « manière contradictoire », une diminution de l'expression de l'ARN messager de la MMP-2 (**Table 4, article 1**). Une analyse de l'activité de la MMP-2 active s'est avérée être indispensable pour déterminer si l'effet de la MMP-14 observé était médié en partie par cette protéinase. Les résultats préliminaires obtenus par la technique de zymographie en gel de gélatine n'ont montré cependant aucune différence significative dans l'activité de la MMP-2 entre les cornées transduites avec l'AAV-MMP-14 et celle transduites avec l'AAV-GFP (résultats préliminaires non montré). Ces résultats laissent penser par conséquent que l'effet de la surexpression de la MMP-14 observé sur l'opacité cornéenne ne passerait pas par une suractivation de la MMP-2.

Ainsi pour poursuivre cette étude et déterminer le mécanisme mis en jeu par la MMP-14 pour induire une diminution de l'opacité cornéenne, différents mutants permettant de différencier les différentes fonctions de la MMP-14 pourraient être construits. Ces constructions permettraient de tester une à une et de manière séparée les différentes fonctions de la MMP-14 et d'identifier celle(s) qui est (sont) responsable(s) de l'effet de la surexpression de la MMP-14 au niveau de la cornée après un traumatisme. Cette identification permettrait de mettre en évidence par la suite les voies de signalisation extra et/ou intracytoplasmique mises en jeu durant l'action de la MMP-14 sur la cornée en

remaniement. Cette approche aurait en plus comme avantage, le fait de pouvoir moduler qu'une seule ou tout du moins une partie de l'activité de la MMP-14, ce qui rendrait le traitement plus « spécifique ».

Il est important de noter que ces résultats sont obtenus en « prévention » des opacités chez les souris. Ce qui veut dire que les virus ont été administrés quelques heures avant l'incision. La surexpression de la MMP-14 a donc débuté durant les stades précoces du remaniement matriciel cornéen. Sachant que la technique de kératectomie transcornéenne perforante utilisée au cours de cette étude permet de générer une réaction fibrotique de grande ampleur qui persiste sur plusieurs mois, il serait intéressant de tester par la suite, l'efficacité de la transduction des (myo)fibroblastes par l'AAV-MMP-14 sur des opacités cornéennes déjà installées. En vue de la confirmation de l'action de la MMP-14 sur des opacités cornéennes persistantes, un autre modèle non rongeur, le lapin par exemple peut également être utilisé. Notre équipe a déjà mis en place chez cet animal une technique de photoablation cornéenne de 100 µm de profondeur au laser excimer. Cette méthode permet d'étudier les phénomènes de cicatrisation cornéenne en créant une interaction épithélio-stromale identique à celle réalisée en pratique humaine « courante » au cours de la chirurgie réfractive cornéenne. Les résultats dans ce domaine attestent de la stabilité de la cicatrice sur plus de 6 mois. Des expériences préliminaires de validation de l'expression du même AAV-GFP ont déjà été effectuées dans la cornée de lapin avec un résultat de transduction des kératocytes similaire à celui obtenu chez les souris.

IV.2. Deuxième approche thérapeutique: réduction de l'opacité cornéenne par inhibition de la maturation du collagène : les protéinases Tolloïdes

L'ensemble de ces expériences a permis de montrer que BMP-1/mTLD sont les protéinases Tolloïdes majoritairement exprimées au niveau de la cornée. De plus, leur activateur PCPE-1 est également exprimé dans cette structure. Les analyses effectuées sur des cornées après blessure ont montré une augmentation de l'expression de ces protéines de façon significative principalement dans la zone en remaniement. Nous pouvons donc faire l'hypothèse que ces protéines pourraient jouer un rôle important dans le remaniement matriciel mis en jeu après blessure au niveau de la cornée.

L'inhibition de l'activité de BMP-1 par l'application d'un collyre contenant un inhibiteur spécifique de BMP-1 3 fois par jour pendant deux semaines ne semble pas affecter la réorganisation matricielle du stroma cornéen après traumatisme. Cette expérience d'inhibition de BMP-1 dans des cornées en réparation a révélé en revanche une altération de la régénération de la lame basale. Il est important de noter que ces résultats ne démontrent pas clairement une absence d'effet de l'inhibition de BMP-1 sur le collagène du stroma cornéen. En effet, le traitement ayant été appliqué en collyre, nous n'avons aucune certitude sur la pénétration de l'inhibiteur au niveau du stroma. Pour lever cette ambiguïté, la prochaine étape consistera en l'injection d'un inhibiteur peptidique de BMP-1 directement au niveau du stroma cornéen (actuellement en cours de développement dans l'équipe de C. Moali). Nous envisageons aussi d'injecter un lentivirus codant pour des shRNA ciblant l'ARNm de BMP-1. Ceci permettra de transduire les kératocytes et d'avoir une expression stable des shRNA inhibant l'expression de BMP-1 durant plusieurs semaines dans le stroma. Un autre avantage d'inhiber l'expression de BMP-1 uniquement dans les kératocytes est ainsi de ne pas affecter la régénération de lame basale. Il est important de rappeler que la lame basale joue un rôle essentiel dans la refermeture épithéliale mise en place après lésion. Cette structure sert de « tapis » aux cellules épithéliales en leur permettant de s'attacher et de se détacher durant leur processus de migration grâce à des interactions intégrines $\alpha3\beta1$ et laminine 332 (Virtanen et al., 1992). Un défaut de régénération de la lame basale après traumatisme peut induire un défaut et/ou un retard de

migration épithéliale qui peut causer un retard de cicatrisation et induire des complications telles que des ulcères (Gabison et al., 2009).

Par ailleurs, les souris où le gène de *Pcpe-1* a été inactivé semblent réagir au traumatisme cornéen de façon similaire à celles traitées avec l'inhibiteur de BMP-1 : nous observons une lame basale en forme de « bulles » et une organisation collagénique stromale à apparence normale. Cet aspect de la lame basale peut expliquer en grande partie les résultats cliniques obtenus avec le test à la fluorescéine sur les cornées des souris KO pour *Pcpe-1*, 14 jours après l'incision (**Figure 55**). Cet état reflète l'importance de la lame basale sur la refermeture épithéliale et peut se traduire par un retard de cicatrisation des cornées des souris KO pour *Pcpe-1* (**Figure 57**). Cette expérience n'exclut pas une fois de plus un rôle de PCPE-1 dans le remaniement matriciel du stroma cornéen après blessure bien que l'analyse des cornées en microscopie électronique n'a révélée aucune différence majeure entre les souris KO *Pcpe-1* et les souris sauvages. En effet, notons que cette expérience a été réalisée chez des souris KO pour *Pcpe-1*. De ce fait, il se pourrait que chez ces souris des mécanismes de compensation furent mis en place au cours de la vie de ces animaux pour palier au manque de PCPE-1. Un phénomène similaire a déjà été observé chez des souris KO pour le collagène FACIT de type XIV. Ce collagène joue un rôle important dans la fibrillogenèse. Les jeunes souriceaux dont le gène du collagène de type XIV a été invalidé présentent une croissance fibrillaire précoce avec des fibres de collagène ayant un diamètre supérieur à la normale, au niveau du tendon. De manière contradictoire, les adultes de la même lignée affichent une croissance et un agencement fibrillaire semblables à ceux observés chez les animaux sauvages (Ansoerge et al., 2009).

Ainsi, dans notre cas, il est nécessaire de déterminer si les résultats obtenus avec les souris KO pour *Pcpe-1* sont dus à un effet de compensation de PCPE-1 par une autre molécule ou si au contraire PCPE-1 n'a pas de rôle majeur sur la synthèse et l'organisation fibrillaire. Pour cela, une procédure similaire à celle mise en place pour déterminer le rôle de BMP-1 dans le remodelage matriciel peut être appliquée. En effet, le fait d'inhiber PCPE-1 par transduction des kératocytes par des lentivirus à l'état adulte permettrait probablement de s'affranchir du phénomène de compensation qui pourrait être mis en jeu chez les souris KO au cours de leur vieillissement.

Les protéinases Tolloïdes BMP-1/mTLD ainsi que leur activateur PCPE-1 jouent un rôle important dans la maturation du collagène. L'ensemble des expériences à venir permettront de valider leur importance dans la synthèse et le réarrangement du collagène au

niveau du stroma cornéen après une blessure. A terme, ces protéinases Tolloïdes et leur activateur PCPE-1 pourraient devenir des cibles thérapeutiques de choix. En effet, l'inhibition sélective ou simultanée de ces protéinases et de leur activateur pourrait constituer une stratégie de lutte contre le dépôt de matrice de collagène à l'origine des opacités observées après un traumatisme cornéen. Cette thérapie pourrait être également envisagée dans des cas de pathologies où un excès de synthèse de collagène est à l'origine de la formation d'une fibrose : Cicatrice chéloïde, fibrose hépatique, pulmonaire, rénale...

Approches fondamentales :
**les collagènes FACIT dans
l'organisation spatiale et les
propriétés biomécaniques de
la matrice extracellulaire au
cours de la cicatrisation
cornéenne**

IV.3. Etude de l'expression du collagène FACIT de type XII dans le remodelage matriciel mis en place après blessure cornéenne

Afin d'évaluer la contribution du collagène de type XII dans la formation et le maintien des opacités cornéennes, son expression fut évaluée dans différents cas de pathologies cliniques présentant tous des opacifications de la cornée. Les analyses immunohistochimiques effectuées sur ces cornées humaines ont révélées la présence du collagène de type XII. De manière intéressante, l'expression de ce collagène se trouve augmentée dans les endroits où de l'opacité s'est installée. Par conséquent, elle se trouve colocalisée avec l'expression de marqueur de fibrose qui est ici l' α -SMA. Ces observations intéressantes ont conduits à une analyse de l'expression du collagène de type XII dans un modèle murin d'opacité cornéenne persistante. Les résultats ont montré une augmentation de l'expression de la protéine du collagène de type XII durant la phase de cicatrisation cornéenne. De plus, l'intensité de l'expression du collagène de type XII semble être corrélée avec la gravité de l'opacité de la cornée. Ce travail a permis ainsi de mettre en évidence une corrélation directe entre l'augmentation de l'expression du collagène de type XII et l'opacification de la cornée. Ceci pourrait amener à considérer ce collagène comme un nouveau marqueur d'opacité cornéenne.

Le suivi de l'expression de cette protéine au cours de la cicatrisation cornéenne a révélé une évolution spatio-temporelle « particulière ». En effet, ce collagène débute son accroissement dans les matrices situées sous l'épithélium et sous l'endothélium avant d'afficher une expression uniforme vers le 28^{ème} jour post-incision. Cette évolution est similaire à celle observée sur une cornée en développement. Ceci pourrait laisser prétendre à une intervention de cette protéine dans la stabilisation et la cohésion mécanique de la matrice sous épithéliale et de celle située sous le stroma, du fait de sa localisation à ces endroits durant les phases critiques de la cicatrisation cornéenne. En effet, le comportement du collagène de type XII au niveau d'une cornée en remaniement est comparable à celui observé dans une cornée en développement, où plusieurs auteurs soupçonnaient un rôle du collagène de type XII dans la stabilisation des fibres de collagène auxquelles il est associé [(Gordon et al., 1996), (Marchant et al., 2002)]. Ces auteurs laissaient supposer un rôle du collagène de type XII dans l'intégration des éléments de la MEC en développement ce qui

procurerait plus tard, une stabilité au stroma mature. Il s'agirait donc d'un rôle de maintien de l'architecture stromale qui passerait par une stabilisation et un maintien de l'organisation fibrillaire (Young et al., 2002). Dans notre cas, du fait des fortes contraintes mécaniques que subissent ces régions après un traumatisme physique qui touche l'ensemble des structures cornéennes, l'augmentation de l'expression du collagène de type XII peut être perçue comme un moyen de pallier à ces contraintes en augmentant la stabilité des structures cornéennes. De plus, l'augmentation de la stabilité de la matrice sous jacente à l'épithélium pourrait être également propice à la migration épithéliale qui est mise en jeu très rapidement après incision. Ces observations laissent prétendre que des processus similaires peuvent exister entre le développement embryonnaire de la cornée et la cicatrisation cornéenne chez l'adulte. Une telle hypothèse a déjà été émise par Cintron C et son équipe en 1998, lors d'une étude comparative de l'expression de l'ARNm du collagène de type XII entre une cornée embryonnaire et une cornée en remaniement après blessure chez le lapin (El-Shabrawi et al., 1998).

Le collagène de type XII est connu actuellement sous 4 isoformes qui semblent avoir des propriétés biochimiques différentes à cause de leur divergence structurale. Une analyse de la localisation de ces isoformes dans une cornée en remaniement semblait intéressante à réaliser. Celle-ci pourrait permettre de savoir d'une part, si une ou plusieurs de ces isoformes sont responsables de l'augmentation de l'expression du collagène de type XII observée au cours de la cicatrisation de la cornée et d'autre part, si ces isoformes sont localisées au même endroit ou si chacun est exprimé préférentiellement dans un compartiment donné de la cornée. Cette expérience pourrait permettre de corréler la présence d'une ou plusieurs isoformes dans les matrices sous-jacente l'épithélium et le stroma au rôle potentiel que peut jouer le collagène de type XII dans la stabilisation des éléments de la cornée. La première analyse montre une évolution différente des isoformes du collagène de type XII entre l'épithélium et le stroma. Concernant les variants d'épissage du domaine NC1, nous montrons que le variant court NC1-C est le plus abondant dans la cornée normale. En revanche, en réponse à la lésion, son expression augmente dans l'épithélium et ne change pas dans le stroma. Les changements les plus importants sont ceux concernant l'expression du variant long NC1-L qui augmente considérablement dans l'épithélium et légèrement dans le stroma. Sachant que ce variant possède un site de liaison putatif supplémentaire aux protéoglycans, il sera intéressant d'étudier son rôle dans la fibrillogenèse du collagène. Les variants NC3 sont eux aussi concernés par des changements d'expression suite à la lésion. En effet, nous observons que suite à la blessure,

l'expression du variant court NC3-C augmente dans l'épithélium et diminue dans le stroma. Nous en déduisons donc que la composition du collagène de type XII est différente entre le côté épithélial et la profondeur du stroma. La pertinence biologique de ces différences reste à démontrer. Néanmoins, ces résultats révèlent une autre corrélation entre le développement embryonnaire et la cicatrisation cornéenne. Ainsi, il a été montré que chez le poulet, une augmentation importante du NC3-C est observée au niveau de l'épithélium cornéen vers le 15^{ème} jour de développement (Gordon et al., 1996). Ces auteurs et bien d'autres (Marchant et al., 2002) soupçonnaient un rôle de ce collagène dans la stabilisation des fibres de collagène localisées en dessous de l'épithélium de la cornée. Ainsi ces résultats apportent une information sur le rôle potentiel que peut jouer les isoformes du collagène de type XII lors de la cicatrisation cornéenne. Le fait que ces isoformes diffèrent du point de vue structural et qu'elles évoluent différemment au niveau d'une cornée en remaniement, laisse présumer à des fonctions spécifiques de chacune dans les interactions et l'assemblage des fibres de collagène au sein de la cornée en réparation. Ces isoformes peuvent avoir des variabilités dans leur habilité et/ou leur affinité à lier les différents collagènes fibrillaires et, par conséquent, avoir des impacts différents dans le remodelage matriciel mis en place durant la cicatrisation.

Ces hypothèses sur le rôle des isoformes du collagène de type XII dans la cicatrisation cornéenne pourront être vérifiées en inhibant leur synthèse dans des cornées en remaniement par exemple via des injections de siRNA dirigés contre leurs transcrits respectifs. Des modèles *in vitro* pourraient également être mis en place afin d'évaluer l'effet de l'inhibition de ces différentes isoformes sur la vitesse de migration et/ou sur la capacité d'adhérence des cellules en culture.

IV.4. Analyse de l'expression du collagène de type XIV au niveau de la cornée murine

Cette expérience a permis de montrer l'induction de l'expression du collagène de type XIV en réponse à la lésion. Ces observations corroborent les résultats obtenus dans un modèle de fibrose pulmonaire. Ainsi Tzortzaki et col. ont montré une expression séquentielle de ce collagène lors du processus fibrotique. Néanmoins, contrairement à l'augmentation progressive observée au niveau de la cornée en réparation, le collagène de type XIV, ne montre une augmentation au niveau du poumon que 3 semaines après l'agression. De manière intéressante, cet accroissement du collagène de type XIV est corrélé avec celui du collagène de type I qui augmente aussi en présence de fibrose pulmonaire (Tzortzaki et al., 2003). Dans notre cas, l'augmentation du collagène de type XIV peut être corrélée avec l'accroissement du collagène de type III ; élément potentiellement responsable de la fibrose cornéenne mise en place après blessure. Ces observations laissent prétendre que le collagène de type XIV peut être impliqué dans la formation de la fibrose puisqu'il augmente en même temps que les molécules qui sont responsables de la formation de cette dernière aussi bien au niveau de la cornée qu'au niveau du poumon.

Par ailleurs, nos résultats montrent qu'après une blessure le collagène de type XIV apparaît en majorité dans la matrice sous épithéliale, et forme un gradient qui part de la zone sous épithéliale et s'estompe au fur et à mesure qu'on avance vers la région la plus postérieure. Cette observation montre un comportement de l'expression protéique du collagène de type XIV qui est comparable à celui observé durant les stades précoces du développement embryonnaire de la cornée. En effet, Fitch JM et son équipe ont montré que lors de la mise en place du stroma secondaire cornéen au cours du développement embryonnaire, le collagène de type XIV est d'abord localisé dans la région située sous l'épithélium et dans la moitié du stroma. Dans ce dernier le collagène de type XIV affiche une expression protéique qui est plus importante dans la région antérieure et qui diminue au fur et à mesure qu'on se rapproche de la partie postérieure (Gordon et al., 1996). L'évolution de la cicatrisation cornéenne montre que le stroma continue à être positif pour le collagène de type XIV et le gradient d'expression protéique qui part du côté antérieur vers le côté postérieur s'estompe au fil du temps jusqu'à devenir uniforme (**Figure 61**).

Cette remarque est à rapprocher de l'analyse de l'expression de cette même protéine au niveau du stroma cornéen à un stade plus avancé du développement embryonnaire qui montre une expression également homogène (Gordon et al., 1996). Ces observations montrent ainsi, qu'après une blessure cornéenne, l'évolution de l'expression protéique du collagène de type XIV est semblable à celle observée lors du développement embryonnaire. Cette corrélation laisserait prétendre que le processus de cicatrisation mis en place après une blessure cornéenne entraînerait une réactivation de voies embryonnaires au niveau de la cornée. Parmi les mécanismes qui pourraient être mis en jeu, certains aboutiraient à l'expression de gènes qui ne sont plus exprimés à l'état adulte comme dans notre cas, celui du collagène de type XIV.

Par ailleurs, les études effectuées sur le collagène de type XIV lors du développement embryonnaire de la cornée soupçonnaient un rôle de cette protéine dans la régulation de la fibrillogenèse. En effet, la présence du collagène de type XIV au niveau du stroma est corrélée à la fibrillogenèse qui a eu lieu juste avant la compaction de la cornée au cours du développement embryonnaire. Ceci a emmené les auteurs à supposer un rôle de ce collagène dans la régulation de la fibrillogenèse (Young et al., 2002) et dans la compaction de la cornée (Gordon et al., 1996). De plus, l'expression du collagène de type XIV diminue progressivement après la compaction de la cornée jusqu'à devenir quasi-indétectable à l'éclosion et à l'état adulte, ce qui conforte donc l'hypothèse, de son intervention dans la fibrillogenèse et la compaction du stroma cornéen, événements nécessaires à l'acquisition de la transparence cornéenne.

De plus, des études récentes réalisées chez des souris KO pour ce gène [*coll4a1* (-/-)] ont mis en évidence l'importance du collagène de type XIV dans la fibrillogenèse et plus précisément dans la régulation de la croissance et du diamètre des fibres durant le développement (Ansorge et al., 2009).

Ainsi, le fait que nos résultats montrent une expression protéique du collagène de type XIV au niveau d'une cornée adulte en réparation comparable à celui observé dans une cornée au cours du développement embryonnaire, pourrait laisser prétendre également à un rôle de cette protéine dans la fibrillogenèse et la compaction du collagène lors du processus cicatriciel.

IV.5. Perspectives générales sur les collagènes FACIT et la cicatrisation cornéenne

Les analyses effectuées au cours de cette étude ont montrés que les collagènes FACIT pourraient jouer un rôle important dans la mise en place et le maintien de la MEC opaque observés après blessure cornéenne.

Bien que cette étude a permis d'évaluer le comportement de l'expression protéique de ces molécules au niveau d'une cornée en réparation, plusieurs questions restent cependant à élucider quant à leur fonctionnement et à leur rôle exact. Des études fonctionnelles sont donc nécessaires pour une meilleure compréhension de l'implication de ces FACIT dans le remodelage matriciel mis en jeu après blessure cornéenne. En effet, des études d'inhibition sélective de ces molécules dans une cornée en réparation pourraient permettre de confirmer nos hypothèses. Ces molécules étant localisées à la surface des collagènes fibrillaires, leur inhibition lors d'une cicatrisation cornéenne opaque pourraient conduire à un défaut de maturation des composants matriciels fibrillaires nouvellement synthétisés et donc à leur dégradation. Sachant qu'après traumatisme, la MEC provisoire synthétisée a une composante collagénique mal agencée, sa dégradation pourrait donc participer à l'amélioration de la réponse cicatricielle en empêchant le dépôt et/ou l'accumulation de cette MEC « anarchique ». Une étude plus avancée pourrait s'avérer également être intéressante à réaliser sur les mécanismes d'interactions entre ces collagènes FACIT et les composants matriciels (entre les collagènes FACIT et les fibres de collagène). Plusieurs études ont montré que les collagènes FACIT pourraient interagir avec des éléments matriciels autres que les collagènes fibrillaires. En effet, Kielty et Grant ont montré en 2002 ([Kielty CM and Grant ME, 2002](#)) que la formation de la fibre de collagène requiert l'association de plusieurs molécules en plus des fibrilles de collagènes. Ce sont notamment les FACIT et les protéoglycannes comme la décorine. Cette molécule joue un rôle important dans l'agencement des fibrilles de collagène et dans leur association aux autres molécules du tissu conjonctif [[Kielty CM and Grant ME, 2002](#)], ([Hassell and Birk, 2010](#))]. Par ailleurs, des interactions directes entre le collagène de type XII et la décorine ont déjà été mises en évidence ([Veit et al., 2006a](#)). Le rôle exact de ces interactions dans l'organisation ultra-structurale des fibres de collagène au niveau de la cornée reste cependant à élucider. Ainsi une étude du rôle des collagènes FACIT dans l'organisation

collagénique du stroma cornéen peut également se focaliser sur les interactions entre ces protéines et la décorine. En effet, on peut supposer que le rôle joué par les collagènes FACIT dans la mise en place et/ou le maintien d'une opacité cornéenne est indirect et passe par des interactions avec des protéoglycannes comme la décorine. De plus, la décorine est connue pour inhiber les effets du TGF β , médiateur clé de la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes (Mohan et al., 2011). Tovey JC et son équipe corroborent cette hypothèse en démontrant que la surexpression de la décorine induit chez le lapin, une diminution significative de l'opacité cornéenne provoquée par l'utilisation de laser eximer (Mohan et al., 2011b).

Ainsi, toutes ces informations montrent qu'il existe des interactions complexes indispensables à l'organisation et au respect du diamètre inter et intra des fibres du stroma cornéen, nécessaires à la fonction visuelle. Aussi le rôle joué par une molécule dans cette fonction peut également passer par l'interaction avec une autre au sein de la MEC.

A terme, ces expériences pourraient permettre de déterminer le rôle exact de ces collagènes FACIT dans la cicatrisation cornéenne. Ceci permettrait une meilleure compréhension du processus cicatriciel mis en place au niveau de la cornée après une blessure et qui fait intervenir les collagènes FACIT. A terme il pourrait en découler que les collagènes FACIT sont des éléments nécessaires à la formation d'une structure fibrillaire « normale ». Ces résultats feraient de ces molécules des cibles thérapeutiques de choix dans la lutte contre les opacités cornéennes où le dépôt et la persistance d'une matrice collagénique à base de collagène de type III, sont responsables de la perte de transparence de la cornée observées après une blessure.

Pour conclure, ces travaux sur les collagènes FACIT nous ont aussi montré que lors du processus cicatriciel, les cellules du stroma semblaient être capables de remettre en place des voies de signalisation issues du développement embryonnaire. Ces travaux confirment d'autres résultats similaires obtenus dans l'équipe qui font l'objet d'une publication soumise à *Stem Cells* (cf. annexes).

CONCLUSION GENERALE

Ces travaux de thèse montrent l'intérêt potentiel à cibler le micro-environnement matriciel des cellules stromales afin de traiter les opacités d'origine cornéenne. Nous proposons deux approches thérapeutiques parallèles pour y parvenir. La première consiste à moduler l'activité protéolytique de protéinases de la MEC. Nos travaux sur la surexpression de la MMP14 sont les premiers à montrer l'effet bénéfique potentiel d'un gain d'activité protéolytique dans un modèle de cicatrisation cornéenne. Les travaux sur la modulation de l'activité des protéinases Tolloïdes, bien que plus préliminaires, semblent eux aussi porteurs d'espoir.

Une seconde approche consisterait à agir directement sur l'expression de certains constituants de la matrice extracellulaire. Mohan et col. ont montré la faisabilité d'une telle approche en transduisant la décorine dans des cicatrices cornéennes de lapins (Mohan et al., 2011b). Nous concernant, nous avons montré qu'une classe peu étudiée de collagène, les FACIT, était associée aux opacités cornéennes et pouvait ainsi présenter un intérêt thérapeutique. Ces travaux sur les collagènes FACIT ont aussi montré que lors du processus cicatriciel, les cellules du stroma semblaient être capables de remettre en place des voies de signalisation embryonnaires.

Ces travaux et les outils développés notamment dans le transfert de gènes dans un contexte cicatriciel pathologique permettent d'améliorer nos connaissances du processus cicatriciel. Nous espérons que ces résultats encourageants sur l'amélioration de la transparence cornéenne nous permettront dans un futur proche de proposer des cibles thérapeutiques extrapolables en clinique humaine.

ANNEXES

Running head:

Stem cell markers in wounded adult corneal stroma

Title:

In vivo reexpression of stem cell markers in adult stromal cells during murine corneal wound repair.

Jacqueline Butterworth ^{a,b,*}, Dawiyat Massoudi ^{a,b,*}, François Malecaze ^{a,b,c}, Angélique Erraud ^{a,b}, Pierre Fournié ^{a,b,c}, Christine Peres ^{a,b}, Emilie Ancele ^{b,c}, Matthias Macé ^a, Michèle Allouche ^{a,b}, Patrick Calvas ^{a,b,d} and Stéphane D. Galiacy ^{a,b,#}

^a INSERM, U563, Toulouse, F-31300 France

^b EA 4555, Université Toulouse III Paul-Sabatier, Toulouse, F-31300 France

^c CHU Toulouse, Hôpital Purpan, Service d'Ophtalmologie, Toulouse, F-31300 France

^d CHU Toulouse, Hôpital Purpan, Service de Génétique Médicale, Toulouse, F-31300, France

* JB and DM contributed equally to this work

Author contributions:

Jacqueline Butterworth: Conception and design, collection/assembly of data, data analysis and interpretation, manuscript writing.

Dawiyat Massoudi: Provision of study material, data analysis and interpretation.

Angélique Erraud: Provision of study material.

Pierre Fournié: Provision of study material.

Christine Peres: Collection/assembly of data.

Emilie Ancele: Provision of study material.

Matthias Macé: Data analysis and interpretation.

François Malecaze: Data analysis and interpretation, financial support, final approval of manuscript.

Michèle Allouche: Data analysis and interpretation, manuscript writing, final approval of manuscript.

Patrick Calvas: Data analysis and interpretation, financial support, manuscript writing, final approval of manuscript.

Stéphane Galiacy: Conception and design, financial support, provision of study material, data analysis and interpretation, manuscript writing, final approval of manuscript.

Corresponding author. Tel: 00 33 5 62 74 45 09; fax: 00 33 5 62 74 45 58

E-mail address: stephane.galiacy@inserm.fr

This work received funding from the European Commission's Sixth Framework Programme through the Marie Curie Research Training Network 'MY EUROPIA' (MRTN-CT-2006-034021).

Keywords:

Adult stem cells, Progenitor cells, Tissue regeneration, Tissue-specific stem cells, Cornea, Keratocyte

Abstract

Corneal scarring following trauma, inflammation or surgery, impairs vision for many affected individuals and can lead to corneal blindness. The normal corneal repair process involves successive phases of inflammation, apoptosis, cell proliferation and extracellular matrix synthesis and remodelling. Several *in vitro* studies have tried to identify an adult corneal stroma progenitor cell able to differentiate into keratocyte-like cells. However the localisation and tissue lineage of this putative stroma progenitor is elusive. Understanding the role played by adult corneal stroma cells in tissue regeneration is important to improve prevention or treatment of corneal opacities. In this study, we used an *in vivo* mouse model of full thickness corneal incision wounding to study the phenotype of cells involved in stroma wound repair. We characterised the localisation and dynamic changes in expression of a range of stem cell markers between control and wounded corneal stromas at various time periods after corneal incision by means of immunohistochemical, immunoblotting and RT-qPCR analyses. We report increased expression of restricted adult tissue stem cell (ABCG2), ocular /nervous system development (PAX6, NESTIN) markers and increased telomerase activity in the wounded stroma. These *in vivo* results strongly suggest the existence of a normal adult stroma progenitor cell pool able to expand during corneal wound healing. Moreover we observe that the majority of adult keratocytes can reexpress stem cell markers (SOX2, POU5F1 (OCT3/4), NANOG) throughout stroma remodelling, implying a relatively plastic phenotype of these cells.

Introduction

Impairment of vision leading eventually to corneal blindness is often due to abnormal corneal scarring following trauma, inflammation or surgery. It is therefore important to understand the normal process of corneal repair/ regeneration, which normally restores the tissue transparency. This process involves successive phases of inflammation, apoptosis, cell proliferation and extracellular matrix (ECM) synthesis and remodelling. The cornea is a complex tissue of multiple embryonic origins, composed of an outer epithelium, an intermediate stroma and an inner endothelium. The epithelium has a high capacity to regenerate throughout life, for example after a corneal injury. The adult endothelium is thought to lack this capacity [1, 2]. Until recently, the search for tissue stem cells in the adult cornea has mostly focused on corneal epithelial stem cells localised in the limbal region (reviewed by Takacs, 2009 [3]). It is not clear at present whether the corneal stroma harbours progenitor cells with a tissue regenerative potential [4].

The corneal stroma accounts for approximately 90% of total corneal thickness. It consists of neural crest-derived mesenchymal cells embedded between collagenous lamellae. These cells, named keratocytes, are responsible for the secretion of a unique ECM of glycoproteins and proteoglycans that is required for maintaining stroma integrity and transparency necessary for clear vision [5]. Adult keratocytes are largely quiescent. However, in response to acute injury, keratocytes neighbouring the wound become mitotically active, proliferate, adopt a fibroblast phenotype and migrate into the injured area [6]. Within the stroma, myofibroblast cells characterised by alpha-smooth muscle actin (α -SMA) expression can also be observed depending on the time following injury and the extent of the wound. In some cases, myofibroblast persistence and defects in the ECM remodelling can lead to loss of transparency of the stromal layer and to permanent corneal opacity . Understanding the roles played by adult corneal stromal cells in tissue regeneration is important to improve the prevention or treatment of corneal opacities.

The existence of tissue stem cells in the stromal layer of the cornea is still a matter of

debate. Since 2005, *in vitro* cell studies in a range of species (bovine, mouse, rabbit, human) selected a subpopulation of corneal stromal cells capable of growing clonally and expressing a variety of known stem cell markers [7-12]. These cells have multipotent characteristics and are capable of switching to a keratocyte-like phenotype [9, 10, 12]. This subpopulation could represent putative adult corneal stromal cell progenitors. Among the different stem cell markers identified in the aforementioned studies are *Abcg2* (also known as BCRP) and *Pax6* [7-10, 12]. *Abcg2*, is an ATP-binding cassette transporter G family member, expressed by adult hematopoietic [13-15], mesenchymal [15], muscular [15], neural [16, 17], cardiac [18], pancreatic islet [19], skin [20, 21] and corneal limbal epithelial stem cells [22]. *Pax6* is the product of a developmental homeobox gene expressed by ocular precursor cells in early development [23]. Only recently has *Pax6* expression been identified in regenerating adult tissues, for example, in neural and retinal progenitor cells [24-26]. Together with PAX6, ABCG2 has been found expressed in around 4% of adult stromal cells in human and bovine corneas [7, 8].

An important issue is to determine whether a subpopulation of corneal stromal cell progenitors can be demonstrated *in vivo*. In this study we used an *in vivo* mouse corneal wound healing model developed upon full thickness incision of the central cornea [27]. We aimed to characterise the dynamic changes in expression of stem cell markers throughout the corneal stromal wound healing response. We selected stem cell markers known to be expressed in multi/pluripotent adult and/or embryonic stem cells.

Looking at various times after corneal incision, our *in vivo* study demonstrates an increased expression of restricted adult tissue stem cell (*ABCG2*), ocular development/nervous system (*PAX6*, *NESTIN*) markers and increased telomerase activity in the wounded stroma. These results strongly suggest the existence of a normal adult stromal progenitor cell pool able to expand during corneal wound healing. Moreover, we observe that the majority of adult keratocytes can reexpress stem cell markers (*SOX2*, *POU5F1* also known as *OCT3/4*, *NANOG*) throughout stroma remodelling, suggesting a relatively plastic phenotype of these cells.

Materials and methods

Animals and surgery

Female C57BL/6 mice 12-16 weeks old were purchased from Charles River France (Arbresle, France, <http://www.criver.com>). Animals were treated in accordance with the Ethical Committee of the Centre de Physiopathologie, Purpan, Toulouse, France, and guidelines provided in the ARVO Statement for the use of Animals in Ophthalmic and Vision research. One drop of 1% fucithalamic acid (LEO Laboratoires, St Quentin en Yvelines, France, <http://www.leo-pharma.fr>) and atropine to dilate the iris (atropine sulphate 1% Faure; Laboratoires EUROPHTA, Monaco, <http://www.pharmaxie.com>) were applied topically to the left (incised) eyes of mice before surgery. General injection anaesthesia (Ketamine/Xylazine) was injected intraperitoneally and a local anaesthesia was applied (oxybuprocaine chlorhydrate, Laboratoires Théa 1.6 mg/0.4 ml, Clermont-Ferrand, France, <http://www.laboratoires-thea.com>). The full thickness of the centres of the left eye corneas were perforated with a trephine 0.75 mm in diameter using a Zeiss® OPMI® CS operating microscope (Germany). All surgeries were performed by the same surgeon. The right eyes of incised mice did not undergo surgery. Mice with no surgery in either left or right eyes served as controls. One drop/day of atropine and fucithalamic acid were applied to incised eyes for 5 days after incision. Both eyes of control mice underwent identical treatment. After 7 (D7), 14 (D14), 21 (D21) and 28 (D28) days following incision mice were euthanised using isoflurane and cervical dislocation. Right and left eyes were either enucleated for cryo-embedding (Tissue-Tek® OCT Compound, USA, <http://www.sakuraeu.com>), or the stroma was collected by removal of the epithelial and endothelial layers by gentle scraping with sterile surgical tweezers, then snap frozen in liquid nitrogen.

Quantitative RT-PCR

Total RNA was extracted from corneal stromas using a commercial RNeasy® Mini Kit 50 (Qiagen, USA, <http://www.qiagen.com>) and quantified using Agilent 2100 bioanalyser with RNA 6000 nano chips (Agilent Technologies, USA, <http://www.home.agilent.com>). Total

cDNA was synthesised using a SuperScript VILO Kit (11754-250, Invitrogen, USA, <http://www.invitrogen.com>). Primers for *Nestin* and two housekeeping control genes, Beta-2 microglobulin (*B2m*) and Tyrosine 3-monooxygenase (*Th*) [27]; were designed using Primer Express 3 (Applied Biosystems, USA, <http://www.appliedbiosystems.com>) and purchased from Eurogentec (Belgium, <http://www.eurogentec.com>) Primers sequences are: Nestin (F: CTCTCGCTTGCAGACACCTG, R: GATGGGAGTGCTGGCCAA; NM_016701); B2m (F: TTCTGGTGCTTGTCTCACTGA, R: CAGTATGTTCCGGCTTCCCATTTC, NM_009735); Th (F: TGGATAAGAGTGAGCTGGTACA, R: CGTGTCCCTGCTCTGTTACG, NM_00937).

A Quanti[®]Tect Primer Assay for *Sox2* and *Pax6* (Genbank accession numbers NM_011443, NM_013627.4 respectively) was purchased from Qiagen (Cat. No. QT01539055, QT01052786 respectively). All primers were first tested on cDNA from embryonic mouse tissue, and efficiency calculations were calculated using three wounded stroma cDNA samples. For *Nestin* assays complete 2X SYBR[®] Green ER[®] qPCR SuperMix Universal buffer (Invitrogen) was mixed with 1µl cDNA (50 pg/µl) and 1µl forward and reverse primer mix (10µM). The total reaction volume was 10µl. *Nestin* mRNA expression was analysed in 17 control, and in 13 D7 and D14, 14 D21 and 11 D28 wounded stroma cDNA samples, respectively. *Sox2* mRNA expression was assayed in 4 control and 4 D14 wounded stroma cDNA samples. Five µl of cDNA template (600 pg/µl) was mixed with complete 2X LightCycler[®] 480 Green I master mix (Roche, UK, <http://www.roche.co.uk>) and 1.25 µl of forward and reverse primer mix (10-fold dilution). The total reaction volume was 12.5 µl. For *Pax6* assays, complete 2X LightCycler[®] 480 Green I master mix (Roche) was mixed with 2µl cDNA (optimal (75 pg/µl) and 2 µl forward and reverse primer mix (10-fold dilution). The total reaction volume was 10 µl. *Pax6* mRNA was analysed in 36 control and in 7 wounded stroma cDNA samples from D7, D14, D21 and D28 respectively. Triplicate samples were used for all assays. All reactions were performed in the LightCycler 480 machine (Roche). PCR conditions for *Nestin* assays were as follows: 50°C for 2 minutes, denaturation at 95°C for 10 minutes, and amplification for 40 cycles of 95°C for 15 seconds and 60°C for 1 minute. PCR conditions for *Sox2* assays were according to the primer manufacturer's guidelines. The

relative mRNA expression was calculated using REST 2009 software (Qiagen, Munich, Germany, <http://www.gene-quantification.de/rest-2009.html>) using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [28]. Non-parametric Mann-Whitney tests were used for group-to-group comparisons. A value of $p \leq 0.05$ was considered statistically significant. Melting curves were checked for Sox2 primer specific amplification before analysis of gene products by 2% agarose gel electrophoresis.

Quantitative Telomerase activity analysis

Detection of telomerase activity was performed using the MT3011 Quantitative Telomerase Detection Kit (Biomax, USA, <http://www.biomax.us>). Six D14 wounded stromas and six control stromas were pooled separately and lysed. The human KG1 myeloblastic cell line was used as a positive internal Tert activity control (a gift from V. Mansat-De Mas, INSERM U563, Toulouse, France [29]). A total of 1×10^5 cells were lysed and centrifuged. A two-fold serial dilution of KG1 cells was made in lysate buffer. Either 12.5 μ l of D14 wounded stromal or KG1 cell lysate was added to 12.5 μ l of QTD premix in Thermo-Fast[®] 96 PCR detection plates (Thermo Fisher Scientific, UK, <http://www.fisher.co.uk>). Telomerase activity was determined by the ability of telomeric repeat synthesis onto an oligonucleotide substrate and subsequent PCR amplification and detection of SYBR Green dye binding to the double-strand DNA product during the log-linear phase (Ct data) using the ABI PRISM[®] 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems). PCR conditions were according to the manufacturer's instructions. Experiments were repeated three times using triplicate stroma and KG1 cell lysate samples, and a negative control (lysate buffer). Relative telomerase activity was determined using REST 2009 software. A non-parametric Mann-Whitney test was used for group-to-group comparisons. A value of $p \leq 0.05$ was considered statistically significant.

Immunohistochemistry

Cornea cryosections of 7 μ m thickness were immediately fixed in 4% paraformaldehyde. The anti-Nestin antibody required that sections were fixed prior to immunostaining in acetone

at -20°C. For each eye, a hematoxylin and eosin staining was carried out on a sample of slides to verify the state of the cornea. A minimum of three different controls and three different D7, D14, and D28 wounded mouse eyes were tested with each antibody for consistency. Sections fixed in paraformaldehyde were incubated for 30 minutes in 0.1% NaBH₄ in PBS for antigen retrieval, and all sections were permeabilised in 0.5% Triton X-100 in PBS. Non-specific binding was blocked by incubation in 10% fetal bovine serum (Invitrogen) followed by blocking with Image-iT™ FX Signal Enhancer (Invitrogen). Incubation of sections with primary antibodies was carried out using monoclonal rat anti-Abcg2, polyclonal rabbit anti-Nanog (Abcam, England, <http://www.abcam.com>), polyclonal goat anti-Tert, polyclonal goat anti-Sox2, monoclonal rat anti-Nestin (Santa Cruz Biotechnology, USA, <http://www.scbt.com/>), polyclonal rabbit anti-Pou5f1 (Chemicon International Inc, USA, <http://www.millipore.com>) or polyclonal rabbit anti-Pax6 (Covance, USA, <http://www.covance.com>). Labelling was performed by incubation with corresponding species secondary antibodies (Alexa Fluor®, Invitrogen): 555 (Abcg2, Tert, Sox2, Nestin) or 546 (Pou5f1, Nanog, Pax6). Negative controls were performed on sections of wounded eyes using 0.5% Triton X-100 in PBS, rat isotype IgG antibody (R&D Systems, England, <http://www.rndsystems.com>), rabbit or goat sera (Sigma, France, <http://www.sigma-photo.fr>). Nuclei were counterstained and mounted using ProLong® Gold antifade reagent with DAPI (Invitrogen). All experiments were carried out under the same conditions, and antibody controls and wounded cornea stainings were performed concurrently. Slides were observed using a 20X objective (Leica DMR microscope), and a 20X objective and 63X oil objective (confocal Zeiss 710 microscope). For confocal microscopy a series of z-section images were acquired using Zen 2008 Software (Carl Zeiss GmbH SP1.1 Version 5.0). Fields were averaged four times to increase signal to noise ratio, and amplifier gain and offsets of each photomultiplier were kept constant for a given antibody for the sake of comparison between control and wounded corneas. Individual channels were devoid of fluorescence from other emission sources to eliminate bleed-through. Pou5f1/Tert colocalisation experiments were carried out. Free online ImageJ Plugin software (National Institutes of Health, USA,

<http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html>) was used to quantify overlapping red (Pou5f1 staining) and green colour (Tert staining) pixels by means of manual intensity threshold settings in 25,000 pixel D14 stroma wound zone and D14 wounded peripheral stroma tissue areas. The degree of colocalisation for the proteins is positively related to the Mander's coefficient (M1), known commonly as the 'overlap coefficient' (OC), and is expressed as a percentage [30]. M1 was calculated 10 independent times for D14 stroma wound zones and for D14 wounded peripheral stroma tissue areas from 5 independent Pou5f1/Tert colocalisation experiments. Significant differences between M1 in these two stromal areas were calculated by two sample *t*-tests ($p \leq 0.05$).

Immunoblotting

Protein was extracted from control, D14 and D28 wounded stroma tissue samples using a 1ml micro tissue grinder (Wheaton, USA, <http://www.wheatonsci.com>) in PBS with a protease inhibitor cocktail (Roche). The supernatant was collected following a 10 minute 10,000 g centrifugation and protein concentration was determined using the Bradford-based Dc protein assay kit (BioRad, France, <http://www3.bio-rad.com>). 10 μ g lysates were run on 7.5-10% SDS-PAGE gels, transferred to Hybond-C extra nitrocellulose membranes (GE Healthcare, Canada, <http://www.gehealthcare.com>) and blocked in 5% non-fat milk or bovine serum albumin (Euromedex, France, <http://www.euromedex.com>). Proteins were then labelled overnight using as primary antibodies monoclonal rat anti-Abcg2 (Abcam), monoclonal rabbit anti-Pax6 (Aviva Systems Biology, USA, <http://www.avivasysbio.com>) or monoclonal rat anti-Nestin (Chemicon, France, <http://www.millipore.com>). Primary antibody monoclonal rabbit anti-Th (Abcam) labeling was assayed as a loading control [27]. Dilutions were 1/500, 1/4000, 1/400 and 1/500 corresponding to respective primary antibody order above. Labeling was performed by incubation with anti-rat and anti-rabbit IgG conjugated with horseradish peroxidase (Sigma) and visualised using an ECL-based detection system (Chemiluminescent Peroxidase Substrate-3 kit, Sigma). Prestained protein ladders were used for molecular weight determination (Cat. No. SM0671, SM1811, Fermentas).

Results

The present study examined the spatial expression pattern of stem cell markers in the mouse corneal stroma at various times after *in vivo* full thickness incision of the central cornea compared to control animals.

Increased expression of progenitor cell markers *in vivo* during corneal wound repair

Immunostaining showed that ABCG2 is slightly expressed in control corneas in the epithelial basal and endothelial cell layers [31] and by a small number of stromal cells (Fig.1.A, C). At D7 (data not shown) and D14 post-wounding, ABCG2 expression was more intense in the epithelium, endothelium and was particularly increased in the stromal wound zone, but not beyond it (Fig.1.B, D). In the D28 wounded stroma, ABCG2 expression decreased but remained higher than in the control cornea, and approximately half of stromal cells were ABCG2-positive (Fig.1.E). Immunoblot results for ABCG2 expression were consistent with the immunostaining data, showing a peak in expression at D14 post-wounding (Fig.1.F). The *Th* gene product (tyrosine 3-monooxygenase) was used as a loading control.

Control corneal stroma showed low PAX6 expression by at least half of the stromal cells (Fig.2.A). In D7 (data not shown) and D14 wounded stromas PAX6 protein expression was more intense, and still approximately half of the stromal cells were Pax6-positive (Fig.2.B). Stromal PAX6 expression at D28 post-wounding decreased yet was still more intense than in the control stroma (Fig.2.C). Finally, we also observed that PAX6 protein expression increased in wounded corneal epithelia and endothelia (Fig.2.A-C). Immunoblotting results were consistent with immunostaining data for PAX6 protein expression (Fig.2.D). In addition, we detected *Pax6* mRNA in control corneal stromas (Ct = 24.64 (SEM 0.38)). No significant variation of *Pax6* mRNA was observed between control and wounded stromas examined at D7, D14, D21 and D28 (data not shown)

Increased TERT expression and Telomerase activity in wounded stromas

Control cornea immunostaining with anti-Tert showed no reaction in the stroma, nor the epithelial or endothelial cell layers (Fig.3.A). We observed an increase in TERT expression in all three layers of wounded cornea (Fig.3.B-D). In the stromal wound zone, approximately half of the cells were TERT-positive at D7 (Fig.3.B) with all stromal cells becoming positive at D14 (Fig.3.C) and then TERT expression decreased by D28 of the wound healing process (Fig.3.D). In addition, the measure of telomerase activity showed a 2.4-fold increase at D14 in wounded stromas compared to unwounded stromas, a significant level comparable to a leukemic cell line taken as a positive control (KG1, Fig.3.E).

Corneal Stromal cells reexpress stem cells markers

Immunostaining showed SOX2 protein expression in the normal corneal epithelium and endothelium (Fig.4.A). A small number of stroma cells were also SOX2-positive (arrowhead). In the D7 (data not shown) and D14 wounded stroma, SOX2 protein staining was more intense in the epithelium and the stromal wound zone, and the majority of the stromal cells were SOX2-positive (Fig.4.B). SOX2 protein expression in proximal and peripheral stromal wound zone tissues followed the same SOX2 expression pattern as in the stroma wound zone. Briefly, SOX2 protein in D14 wounded proximal and peripheral stromal tissue increased compared to equivalent control stromal tissues (Fig.4.C-D). In the D28 wounded zone, SOX2 protein expression remained higher than in the control and most of the cells were SOX2-positive (Fig.4.F). Only a few cells in the D28 proximal and peripheral wounded stromal tissues were SOX2-positive, but expression was still higher than in the control stroma (Fig.4.G-H).

The same expression pattern for SOX2 protein expression shown in Fig.4 was observed for POU5F1 and NANOG proteins in D7, D14 and D28 wounded stromal tissue (data not shown).

Sox2 gene expression (mRNA) was assayed by RT-PCR and agarose gel

electrophoresis in control and D14 wounded stromas (Fig.4.E). Control stromal tissue showed low *Sox2* mRNA expression. *Sox2* mRNA expression was upregulated in D14 wounded stromal tissue compared to control stromal tissue, concordant with immunostaining results. The housekeeping gene *Th* was used as control.

Colocalisation of POU5F1 with TERT in wounded stromas

As shown in Fig.3.A, control corneas showed no TERT expression, whereas POU5F1 was expressed by the epithelial layer [32], the endothelium, and by a small number of stromal cells (Fig.5.A). Computation performed from the coimmunostaining revealed the colocalisation of POU5F1 and TERT in D14 wounded stroma, both within and proximal to the wound zone (Fig.5.B), with $95\% \pm 0.02$ POU5F1-positive cells also expressing TERT. In contrast, only $26\% \pm 0.03$ POU5F1-positive cells were also TERT-positive in the periphery of D14 wounded cornea (Fig.5.C-G). This increased colocalisation of POU5F1 with TERT in the wound zone versus the periphery was statistically significant with a p value < 0.0001 .

Increased Nestin mRNA and protein expression in wounded stromas

Nestin mRNA was upregulated 1.5-fold at D7 and D14, and approximately 3.7-fold at D21 and D28 post-wounding, relative to control stroma (Fig.6.A). Nestin protein expression was very low or undetected in control stromal tissue, as shown by immunoblotting or immunostaining, respectively (Fig.6.B and Fig.6.C). It increased in D7 (data not shown), D14, (Fig. 6.B and Fig.6D) and increased further in D28 wounded stroma tissue (Fig.6.E-F). Nestin protein expression in the stromal wound zone, but not at the periphery of the cornea, coincided with the recovery of a normal corneal structure at D28 post-wounding. Indeed, NESTIN-positive cells were arranged in a linear, grouped organisation and showed an elongated morphology (Fig.6.E-F).

Discussion

This study aimed to demonstrate *in vivo* the existence of keratocyte progenitor cells in the corneal stroma in response to corneal injury. Using a mouse model of corneal full-thickness incision, we report for the first time an *in vivo* transient upregulation of adult (ABCG2, PAX6) and embryonic (SOX2, POU5F1, NANOG) stem cell markers in the corneal stroma. In general, we found that the expression of these markers increased by D7 post-wounding, and then gradually declined after D14 post-wounding. The expression kinetics of these markers is summarised in figure 7.

We found that ABCG2 and PAX6 were expressed by stromal cells in unwounded mouse stromal tissue. ABCG2 was expressed by a small number of stromal cells, consistent with reports made on bovine and human stromal cells [7, 8], but differently we found PAX6 was expressed by a relatively high number of normal murine stromal cells. This is likely to be due to species differences. Given that progenitor cells in the normal corneal stroma should represent a cell population minority, we suggest that PAX6 expression could correspond in majority to adult keratocyte cells, and in minority to progenitor cells. The expression of ABCG2 and PAX6 then increased in the stromal wound zone, implying that the normal corneal stroma harbours an ABCG2- and PAX6-positive cell subpopulation that expands and is recruited to the direct wound zone for a repair function throughout the stroma remodelling process. Recently Pax6 expression has been identified in regenerating adult ocular tissues [24-26], thus we can suggest that a high proportion of the cells present in the wound area are adult keratocyte and progenitor cells of ocular origin.

These *in vivo* results strongly suggest the existence of a normal adult stromal progenitor cell pool. In order to determine whether these cells are able to expand during corneal wound healing, we investigated Tert expression and activity in the normal and wounded stroma. Tert is considered to be a stem/progenitor cell marker upregulated in regenerative tissue. Tert

preserves telomere length during cell division-dependent DNA replication and is considered a necessary enzyme to maintain the possibility of unlimited cell divisions [33, 34]. Accordingly, together with expression of ABCG2 and PAX6, Tert expression and activity increased as of D14 post-wounding. Our observation suggests that some stromal cells express an active telomerase in response to corneal injury, implying the presence of mitotically active progenitor cells in the wounded stroma.

Previous studies showed that the *in vitro* isolated stromal cells, which expressed adult stem cell markers, also equally expressed embryonic stem cell markers that are usually expressed throughout the development of neural crest-derived tissues and/or ocular tissues [7, 8, 10, 12]. SOX2 (also known as SRY-related HMG-box gene 2), POU5F1 and NANOG are transcription factors that can maintain the pluripotency of embryonic stem cells individually and cooperatively in humans and mice [35-42]. However, loss of expression of one of these factors ultimately leads to the extinction of the others [36]. Of particular interest to us is that late human embryonic neural crest-derived stem cells, which participate in corneal stroma formation, express SOX2, POU5F1 and NANOG [43]. We report here for the first time that SOX2, POU5F1 and NANOG expression was upregulated throughout the *in vivo* stromal wound healing response. Increased expression was observed not only in the stromal wound zone, but also throughout the whole wounded cornea, including in the peripheral uninjured corneal stromal tissue. We additionally demonstrated that POU5F1/TERT colocalisation was higher within cells in the stromal wound zone, whereas the majority of POU5F1-positive cells in the wounded stromal peripheries were TERT-negative. These observations indicate the possibility that the expression of embryonic stem cell markers could correspond to both progenitor cells in the wound zone, and non-progenitor cells, some of these cells potentially being adult keratocytes. Reports have already demonstrated that Sox2, Pou5f1 and Nanog function in somatic cells and multipotent somatic progenitor cells in a manner that mirrors their roles in embryonic stem cells [44-48]. These studies indicate that transcription factors involved in early stem cell self-renewal can be contextually activated in more mature tissues

to foster proliferation and susceptibility to environmental differentiation signals. Moreover, Lwigale et al. [49] recently showed in an elegant model of quail/chick graft that some late embryonic keratocyte cells could maintain a more plastic phenotype than previously considered. Late quail embryonic stromal cells were injected into the chick embryo before corneal development was complete. A proportion of quail cells showed the ability to contribute to chick corneal development, but also showed the ability to migrate away from their injection site. These cells then differentiated into for example functional smooth muscle cells, shown by their contribution to the formation of blood vessels and expression of α -SMA in chick mesectoderm head tissue development [49]. Likewise, we could thus suggest that the adult keratocyte retains a similar relative plasticity and is able after an injury to express embryonic stem cell markers. The theory that somatic cells in blastema tissues involved in adult tissue regeneration can retain embryonic features from their tissue of origin has been observed [50, 51], one group naming this “the half way state” [50]. With regards to adult keratocyte cells, in the wounded stroma the adoption of a half way state could refer to the transient reexpression of embryonic precursor markers by keratocytes. The precise role of this phenotype remains to be determined, but we cannot exclude a migration into the wounded area, followed by a differentiation from this half way state in order to participate in the remodelling area.

In human, late embryonic neural crest-derived stem cells that showed the expression of SOX2, POU5F1 and NANOG equally showed the expression of NESTIN [43]. Nestin is a type VI intermediate filament protein originally found expressed in several mitotically active adult stem cells, especially progenitor cells of the central nervous system [52] and also in the skin [53]. It is worth noting that Nestin expression is also transiently reinduced in response to injury in several adult tissues [54, 55]. Differently to the expression of all the other markers we analysed, NESTIN expression was more significantly upregulated as of D21 post-wounding. D21 corresponds to later stroma remodelling stages. A striking feature is also that NESTIN-positive cells were localised exclusively in the D28 wound zone. At D28 post-

wounding, we can observe NESTIN-positive stromal cells presenting a linear network orientation with inter-cell intermediate filaments that appeared to overlap, implying a stromal cell-cell network. This structural organisation is characteristic of normal stromal keratocytes embedded in stromal ECM [56]. The cells also exhibited an elongated and compact morphology, characteristic of the normal keratocyte cell phenotype [5]. On the other hand, Nestin is not expressed by adult keratocytes [57]. We could expect Nestin expression to be incompatible with specific cytoskeleton organisation required to maintain corneal transparency. More recently it has been found that some fibrosing human tissues (chronic pancreatitis, organising pneumonia, hydronephrosis) harbour repair stromal myofibroblast-like cells that coexpress α -SMA and NESTIN [58]. NESTIN-positive cells could thus correspond to progenitor cells of neural crest origin and/or adult keratocyte cells that will differentiate/dedifferentiate respectively to regenerate keratocyte-like cells. NESTIN could be required for a transient stage in these regeneration pathways, notably a cytoskeletal reorganisation step required for restoring cell transparency [59]. Moreover, the Nestin promoter contains a POU-domain enhancer [59], hinting that Pou5f1 differentiation signals could regulate such Nestin regeneration pathways.

We still cannot exclude that other cell types than adult keratocytes and local progenitors could be involved in stromal wound repair. A handful of studies have raised the possibility of the recruitment of external bone marrow-derived progenitor cells into the corneal stroma via the blood circulation. These cells have demonstrated their integration into the stromal structure and even suggested that they differentiate in keratocyte-like cells, shown by their expression of markers expressed by keratocytes [60-62]. We equally cannot exclude a role of a limbal stromal-cell niche that migrate directly into the stroma following corneal wounding [26-28]. In addition, epithelial stem cells are well documented to express a wide variety of known stem cell and progenitor cell fate markers [3]. In some cornea-opacity forming diseases, such as limbal basal stem cell deficiency and ocular pterygium, the underlying mechanism of intra-stromal invasion by epithelial stem cells, followed by migration,

proliferation and epithelial-mesenchymal transition into fibroblast-like cells has been proposed [60-62]. We cannot at this stage exclude invasion into the stroma by epithelial stem cells, or determine to what extent epithelial stem cells could fill in the stromal gap and replenish keratocyte cells. Likewise, we cannot exclude migration, proliferation and endothelial-mesenchymal transition of corneal endothelial progenitor cells into the stroma wound zone [63, 64], and to what extent in keratocyte replenishment this could bear.

Comprehension of the corneal stromal repair process is fundamental to the understanding of how permanent corneal opacities develop. Here, we demonstrated that in response to an injury, the corneal stromal keratocyte cells reexpress stem cells markers. Moreover, our results strongly suggest the existence of a normal adult stromal progenitor cell pool able to expand during corneal wound healing. Further investigations are required to determine the precise role of these cells in the stroma regeneration, and their potential clinical implications.

Acknowledgements

The authors would like to thank Florence Capilla and Delphine Lestrade at IFR 150 for assistance with histology work and Claude Bernard animal experimentation centre, CHU de Toulouse, Hôpital Purpan, France. We thank Sophie Allart for technical assistance at the cellular imaging facility of INSERM 1043, Dr. Hélène Coppin for her RT-qPCR expertise and Dr. Heather Etchevers for help with the manuscript. The authors also thank Pr. Gérard Bouche, Stéphane Roga, Dr. Nathalie Ortega and Dr. Christine Moussion for help with the figures. The authors declare no conflict of interests.

References

1. Hoppenreijns VP, Pels E, Vrensen GF et al. Effects of human epidermal growth factor on endothelial wound healing of human corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1992; **33**: (6): 1946-1957
2. Matsubara M, Tanishima T. Wound-healing of corneal endothelium in monkey: an autoradiographic study. *Jpn J Ophthalmol* 1983; **27**: (3): 444-450
3. Takacs L, Toth E, Berta A et al. Stem cells of the adult cornea: from cytometric markers to therapeutic applications. *Cytometry A* 2009; **75**: (1): 54-66
4. West-Mays JA, Dwivedi DJ. The keratocyte: corneal stromal cell with variable repair phenotypes. *Int J Biochem Cell Biol* 2006; **38**: (10): 1625-1631
5. Hay ED. Development of the vertebrate cornea. *Int Rev Cytol* 1979; **63**: 263-322
6. Fini ME. Keratocyte and fibroblast phenotypes in the repairing cornea. *Prog Retin Eye Res* 1999; **18**: (4): 529-551
7. Du Y, Funderburgh ML, Mann MM et al. Multipotent stem cells in human corneal stroma. *Stem Cells* 2005; **23**: (9): 1266-1275
8. Funderburgh ML, Du Y, Mann MM et al. PAX6 expression identifies progenitor cells for corneal keratocytes. *Faseb J* 2005; **19**: (10): 1371-1373
9. Thill M, Schlagner K, Altenahr S et al. A novel population of repair cells identified in the stroma of the human cornea. *Stem Cells Dev* 2007; **16**: (5): 733-745
10. Yoshida S, Shimmura S, Nagoshi N et al. Isolation of multipotent neural crest-derived stem cells from the adult mouse cornea. *Stem Cells* 2006; **24**: (12): 2714-2722
11. Yoshida S, Shimmura S, Shimazaki J et al. Serum-free spheroid culture of mouse corneal keratocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005; **46**: (5): 1653-1658
12. Du Y, Sundarraj N, Funderburgh ML et al. Secretion and organization of a cornea-like tissue in vitro by stem cells from human corneal stroma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007; **48**: (11): 5038-5045
13. Abbott BL. ABCG2 (BCRP) expression in normal and malignant hematopoietic cells. *Hematol Oncol* 2003; **21**: (3): 115-130
14. Scharenberg CW, Harkey MA, Torok-Storb B. The ABCG2 transporter is an efficient Hoechst 33342 efflux pump and is preferentially expressed by immature human hematopoietic progenitors. *Blood* 2002; **99**: (2): 507-512
15. Zhou S, Schuetz JD, Bunting KD et al. The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nat Med* 2001; **7**: (9): 1028-1034
16. Cai J, Cheng A, Luo Y et al. Membrane properties of rat embryonic multipotent neural stem cells. *J Neurochem* 2004; **88**: (1): 212-226
17. Jang YK, Park JJ, Lee MC et al. Retinoic acid-mediated induction of neurons and glial cells from human umbilical cord-derived hematopoietic stem cells. *J Neurosci Res* 2004; **75**: (4): 573-584
18. Martin CM, Meeson AP, Robertson SM et al. Persistent expression of the ATP-binding cassette transporter, ABCG2, identifies cardiac SP cells in the developing and adult heart. *Dev Biol* 2004; **265**: (1): 262-275
19. Lechner A, Leech CA, Abraham EJ et al. Nestin-positive progenitor cells derived from adult human pancreatic islets of Langerhans contain side population (SP) cells defined by expression of the ABCG2 (BCRP1) ATP-binding cassette transporter. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; **293**: (2): 670-674
20. Terunuma A, Jackson KL, Kapoor V et al. Side population keratinocytes resembling bone marrow side population stem cells are distinct from label-retaining keratinocyte stem cells. *J Invest Dermatol* 2003; **121**: (5): 1095-1103
21. Triel C, Vestergaard ME, Bolund L et al. Side population cells in human and mouse epidermis lack stem cell characteristics. *Exp Cell Res* 2004; **295**: (1): 79-90
22. Dua HS, Shanmuganathan VA, Powell-Richards AO et al. Limbal epithelial crypts: a novel anatomical structure and a putative limbal stem cell niche. *Br J Ophthalmol* 2005; **89**: (5): 529-532

23. Cvekl A, Tamm ER. Anterior eye development and ocular mesenchyme: new insights from mouse models and human diseases. *Bioessays* 2004; **26**: (4): 374-386
24. Osumi N, Shinohara H, Numayama-Tsuruta K et al. Concise review: Pax6 transcription factor contributes to both embryonic and adult neurogenesis as a multifunctional regulator. *Stem Cells* 2008; **26**: (7): 1663-1672
25. Thummel R, Enright JM, Kassen SC et al. Pax6a and Pax6b are required at different points in neuronal progenitor cell proliferation during zebrafish photoreceptor regeneration. *Exp Eye Res* 2010; **90**: (5): 572-582
26. Thummel R, Kassen SC, Enright JM et al. Characterization of Muller glia and neuronal progenitors during adult zebrafish retinal regeneration. *Exp Eye Res* 2008; **87**: (5): 433-444
27. Galiacy SD, Fournie P, Massoudi D et al. Matrix metalloproteinase 14 overexpression reduces corneal scarring. *Gene Ther* 2010;
28. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; **25**: (4): 402-408
29. Beyne-Rauzy O, Recher C, Dastugue N et al. Tumor necrosis factor alpha induces senescence and chromosomal instability in human leukemic cells. *Oncogene* 2004; **23**: (45): 7507-7516
30. Manders EM, Stap J, Brakenhoff GJ et al. Dynamics of three-dimensional replication patterns during the S-phase, analysed by double labelling of DNA and confocal microscopy. *J Cell Sci* 1992; **103 (Pt 3)**: 857-862
31. Dua HS, Joseph A, Shanmuganathan VA et al. Stem cell differentiation and the effects of deficiency. *Eye (Lond)* 2003; **17**: (8): 877-885
32. Zhou SY, Zhang C, Baradaran E et al. Human corneal basal epithelial cells express an embryonic stem cell marker OCT4. *Curr Eye Res* 2010; **35**: (11): 978-985
33. Amit M, Carpenter MK, Inokuma MS et al. Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Dev Biol* 2000; **227**: (2): 271-278
34. Hiyama E, Hiyama K. Telomere and telomerase in stem cells. *Br J Cancer* 2007; **96**: (7): 1020-1024
35. Avilion AA, Nicolis SK, Pevny LH et al. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev* 2003; **17**: (1): 126-140
36. Babaie Y, Herwig R, Greber B et al. Analysis of Oct4-dependent transcriptional networks regulating self-renewal and pluripotency in human embryonic stem cells. *Stem Cells* 2007; **25**: (2): 500-510
37. Boyer LA, Lee TI, Cole MF et al. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* 2005; **122**: (6): 947-956
38. Chambers I, Colby D, Robertson M et al. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* 2003; **113**: (5): 643-655
39. Loh YH, Wu Q, Chew JL et al. The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nat Genet* 2006; **38**: (4): 431-440
40. Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H et al. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* 2003; **113**: (5): 631-642
41. Muller T, Fleischmann G, Eildermann K et al. A novel embryonic stem cell line derived from the common marmoset monkey (*Callithrix jacchus*) exhibiting germ cell-like characteristics. *Hum Reprod* 2009; **24**: (6): 1359-1372
42. Niwa H, Miyazaki J, Smith AG. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet* 2000; **24**: (4): 372-376
43. Thomas S, Thomas M, Wincker P et al. Human neural crest cells display molecular and phenotypic hallmarks of stem cells. *Hum Mol Genet* 2008; **17**: (21): 3411-3425

44. Millimaki BB, Sweet EM, Riley BB. Sox2 is required for maintenance and regeneration, but not initial development, of hair cells in the zebrafish inner ear. *Dev Biol* 2010; **338**: (2): 262-269
45. Nayernia K, Lee JH, Drusenheimer N et al. Derivation of male germ cells from bone marrow stem cells. *Lab Invest* 2006; **86**: (7): 654-663
46. Pallante BA, Duignan I, Okin D et al. Bone marrow Oct3/4+ cells differentiate into cardiac myocytes via age-dependent paracrine mechanisms. *Circ Res* 2007; **100**: (1): e1-11
47. Zhang S, Jia Z, Ge J et al. Purified human bone marrow multipotent mesenchymal stem cells regenerate infarcted myocardium in experimental rats. *Cell Transplant* 2005; **14**: (10): 787-798
48. Racila D, Winter M, Said M et al. Transient expression of OCT4 is sufficient to allow human keratinocytes to change their differentiation pathway. *Gene Ther* 2010;
49. Lwigale PY, Cressy PA, Bronner-Fraser M. Corneal keratocytes retain neural crest progenitor cell properties. *Dev Biol* 2005; **288**: (1): 284-293
50. Christen B, Robles V, Raya M et al. Regeneration and reprogramming compared. *BMC Biol* 2010; **8**: 5
51. Kragl M, Knapp D, Nacu E et al. Cells keep a memory of their tissue origin during axolotl limb regeneration. *Nature* 2009; **460**: (7251): 60-65
52. Johansson CB, Lothian C, Molin M et al. Nestin enhancer requirements for expression in normal and injured adult CNS. *J Neurosci Res* 2002; **69**: (6): 784-794
53. Li H, Liu H, Heller S. Pluripotent stem cells from the adult mouse inner ear. *Nat Med* 2003; **9**: (10): 1293-1299
54. Namiki J, Tator CH. Cell proliferation and nestin expression in the ependyma of the adult rat spinal cord after injury. *J Neuropathol Exp Neurol* 1999; **58**: (5): 489-498
55. Vaittinen S, Lukka R, Sahlgren C et al. The expression of intermediate filament protein nestin as related to vimentin and desmin in regenerating skeletal muscle. *J Neuropathol Exp Neurol* 2001; **60**: (6): 588-597
56. Muller LJ, Pels L, Vrensen GF. Novel aspects of the ultrastructural organization of human corneal keratocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995; **36**: (13): 2557-2567
57. Espana EM, Kawakita T, Di Pascuale MA et al. The heterogeneous murine corneal stromal cell populations in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005; **46**: (12): 4528-4535
58. Kishaba Y, Matsubara D, Niki T. Heterogeneous expression of nestin in myofibroblasts of various human tissues. *Pathol Int* **60**: (5): 378-385
59. Michalczyk K, Ziman M. Nestin structure and predicted function in cellular cytoskeletal organisation. *Histol Histopathol* 2005; **20**: (2): 665-671
60. Barbosa FL, Chaurasia SS, Cutler A et al. Corneal myofibroblast generation from bone marrow-derived cells. *Exp Eye Res* 2010; **91**: (1): 92-96
61. Nakamura T, Ishikawa F, Sonoda KH et al. Characterization and distribution of bone marrow-derived cells in mouse cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005; **46**: (2): 497-503
62. Sosnova M, Bradl M, Forrester JV. CD34+ corneal stromal cells are bone marrow-derived and express hemopoietic stem cell markers. *Stem Cells* 2005; **23**: (4): 507-515
63. McGowan SL, Edelhauser HF, Pfister RR et al. Stem cell markers in the human posterior limbus and corneal endothelium of unwounded and wounded corneas. *Mol Vis* 2007; **13**: 1984-2000
64. Reneker LW, Bloch A, Xie L et al. Induction of corneal myofibroblasts by lens-derived transforming growth factor beta1 (TGFbeta1): a transgenic mouse model. *Brain Res Bull* 2010; **81**: (2-3): 287-296

Titles and legends to figures

Figure 1. ABCG2 expression during corneal wound repair

(A-E) ABCG2 immunostaining (red) with DAPI nuclei counterstaining (blue). (A, C) Control cornea. Arrowheads in C indicate ABCG2-positive stromal cells. (B, D) D14 and (E) D28 wounded cornea. Magnification: X200 (A-B; scale bars: 50 μm) or X630 (C-E, scale bars: 20 μm). (F) Western blot analysis of ABCG2 expression in control (C), D14 and D28 wounded stromas. *Th* was used as loading control.

Figure 2. PAX6 expression during corneal wound repair

(A-C) PAX6 immunostaining (red) with DAPI nuclei counterstaining (blue). Magnification X630; scale bars represent 20 μm (A) Control cornea. (B, C) D14 and D28 wound zone. (D) Western blot analysis of Pax6 expression in control (C), D14 and D28 wounded stromas. *Th* was used as loading control.

Figure 3. TERT protein expression and activity during corneal wound repair.

(A-D) TERT immunostaining (red) with DAPI nuclei counterstaining (blue). Magnification X630; scale bars: 20 μm . (A) Control cornea. (B, C, D) D7, D14 and D28 wound zones respectively. (E) Telomerase activity revealed by a PCR assay. Data obtained from pools of six stromas represent the mean \pm SEM from three independent experiments. KG1 cells (500, 250: equivalent cell number extracts) were used as a positive control. * $p\leq 0.05$.

Figure 4. Sox2 expression during corneal wound repair.

SOX2 immunostaining (red) with DAPI nuclei counterstaining (blue). (A) Control cornea. Arrowhead: SOX2-positive stromal cell. D14 (B-D) and D28 (E-G) wounded corneas; wounded zone (B, F), proximal (C, G) or distal to (D, H) the wound zone. Magnification: X630; scale bars represent 20 μm . (E) Sox2 mRNA quantification by RT-qPCR in control (C) and D14 wounded stromas. *Th* was used as housekeeping gene. (-) no DNA (M) DNA 50bp

ladder.

Figure 5. Colocalisation of POU5F1 and TERT during corneal wound repair.

(A-G) POU5F1 (red) and TERT (green) coimmunostaining of control with DAPI nuclei counterstaining (blue). (A) or D14 wounded cornea, in the wound zone (B) or in the periphery (C). Arrowhead in (A) indicates POU5F1-positive cell. Magnification X630; scale bar: 20 μ m. (D-G) Zoom (X2500) of stromal cell arrowed in (C). Scale bar: 5 μ m.

Figure 6. Nestin expression during corneal wound repair.

(A) RT-qPCR quantification of *Nestin* mRNA in control and D7-D28 wounded stromas. * $p \leq 0.05$. Bars represent the mean \pm SEM from 11-17 stroma samples. (B) Western blot analysis of NESTIN expression in control (C), D14 and D28 wounded stromas. Th was used as housekeeping gene. (C-F) NESTIN immunostaining (red) in control with DAPI nuclei counterstaining (blue). (C), D14 (D) and D28 (E, F) wounded corneas. (C-E) wound zone. X630; scale bars: 20 μ m. (F) D28 whole cornea. X200; scale bars: 70 μ m. Arrowhead corresponds to wound zone.

Figure 7. Kinetics of “stem” cell marker expression by stromal cells during corneal wound repair from D7 to D28 compared to in control stromas (D0: Day zero, non-wounded).

Figure 1

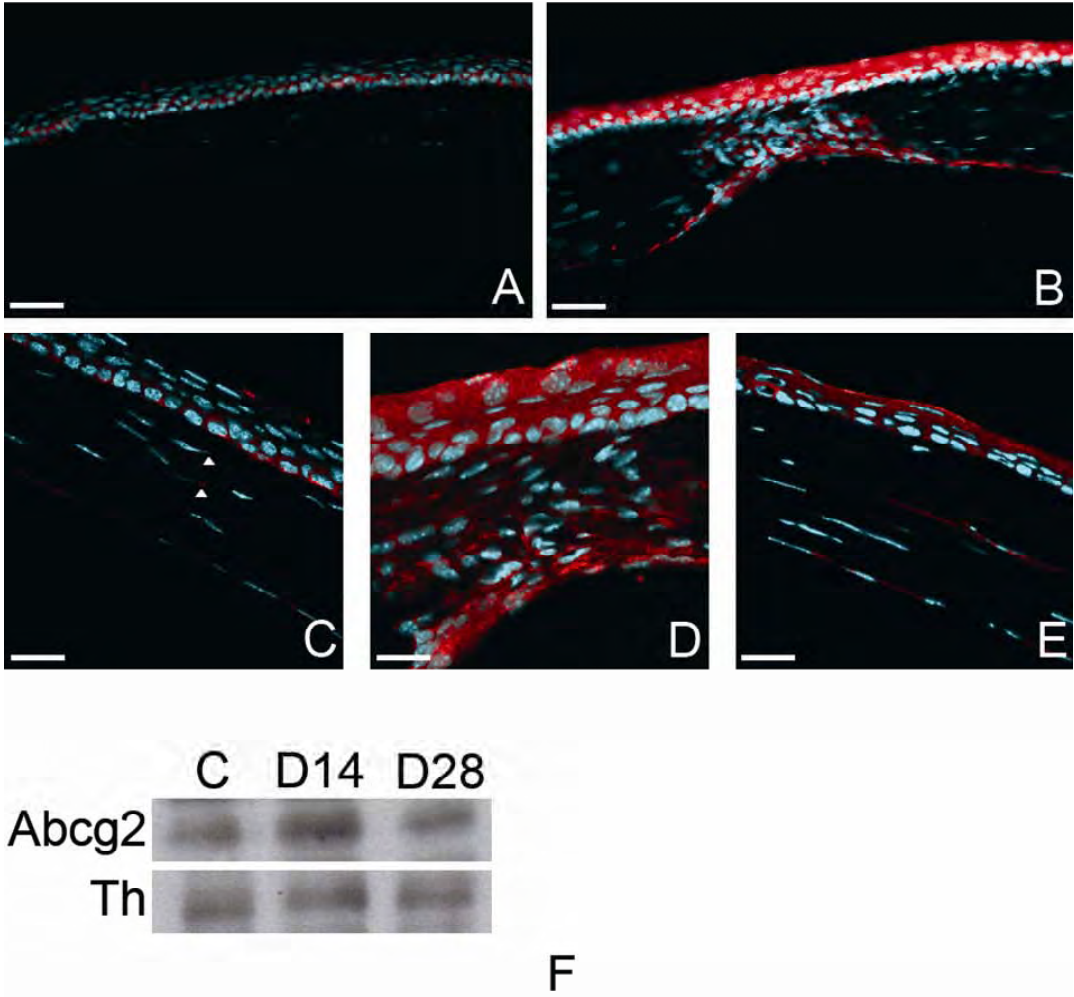


Figure 2

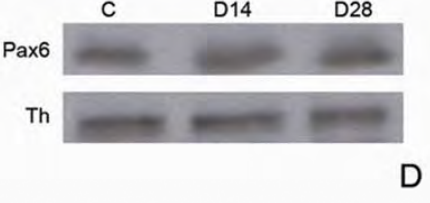
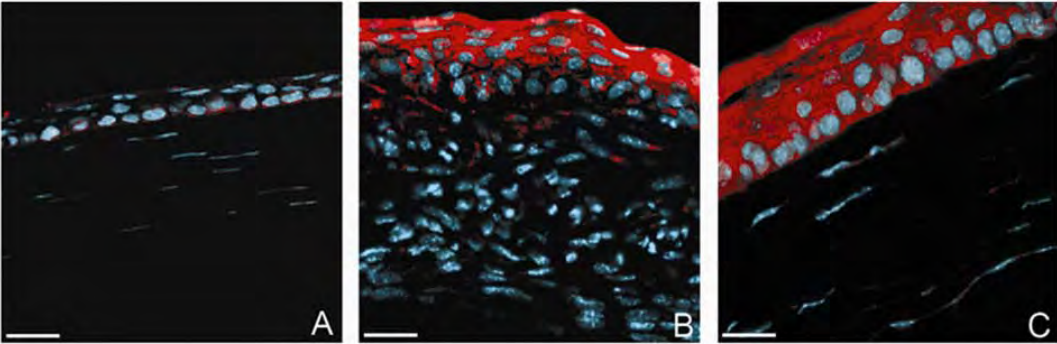


Figure 3

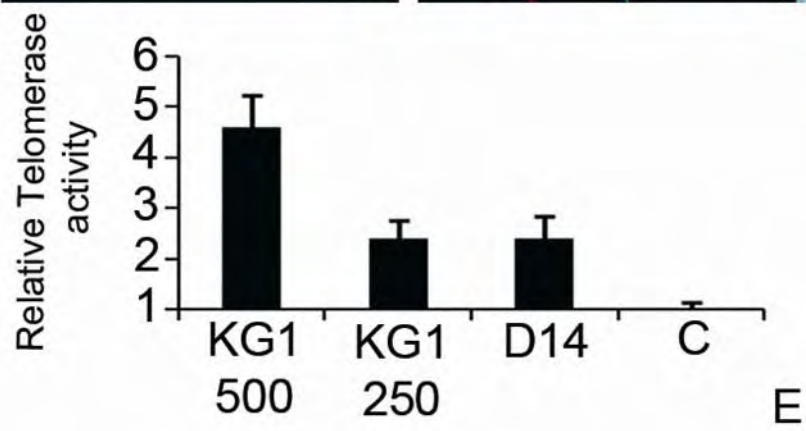
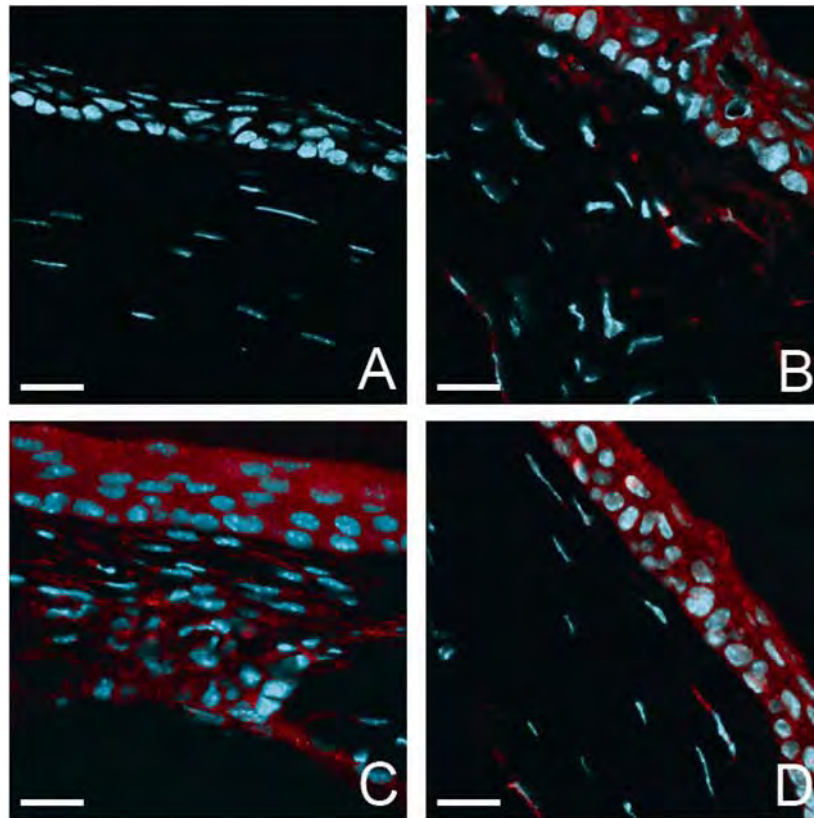


Figure 4

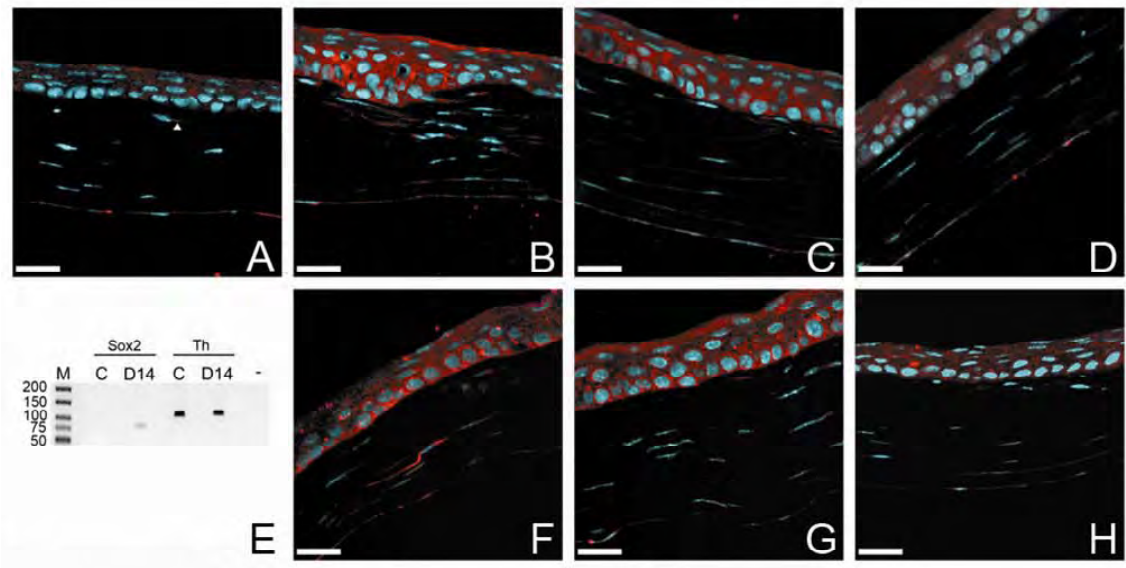


Figure 5

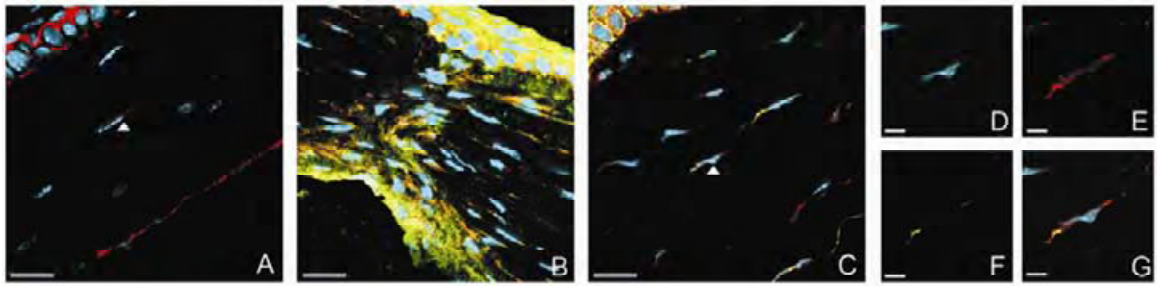


Figure 6

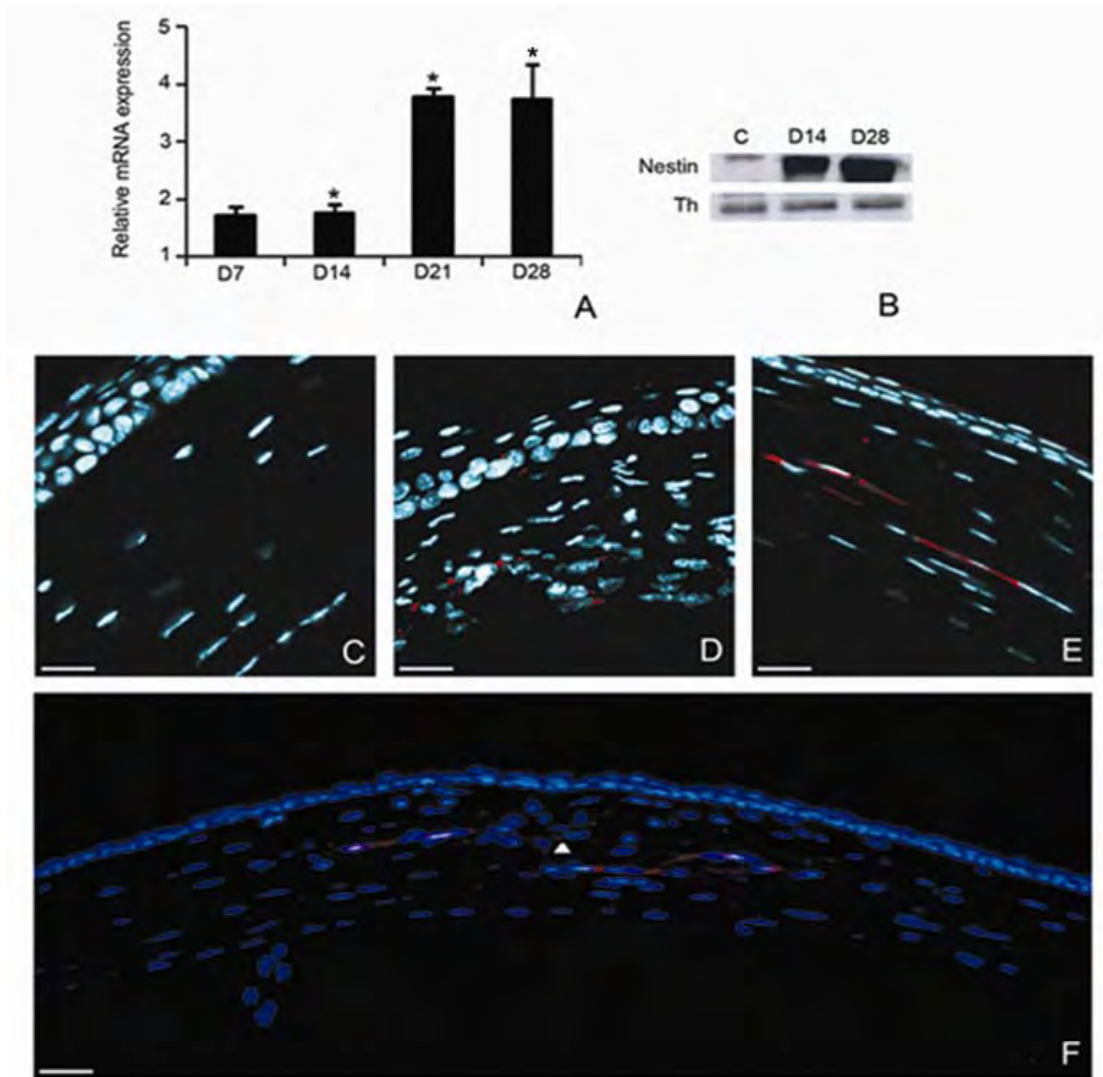
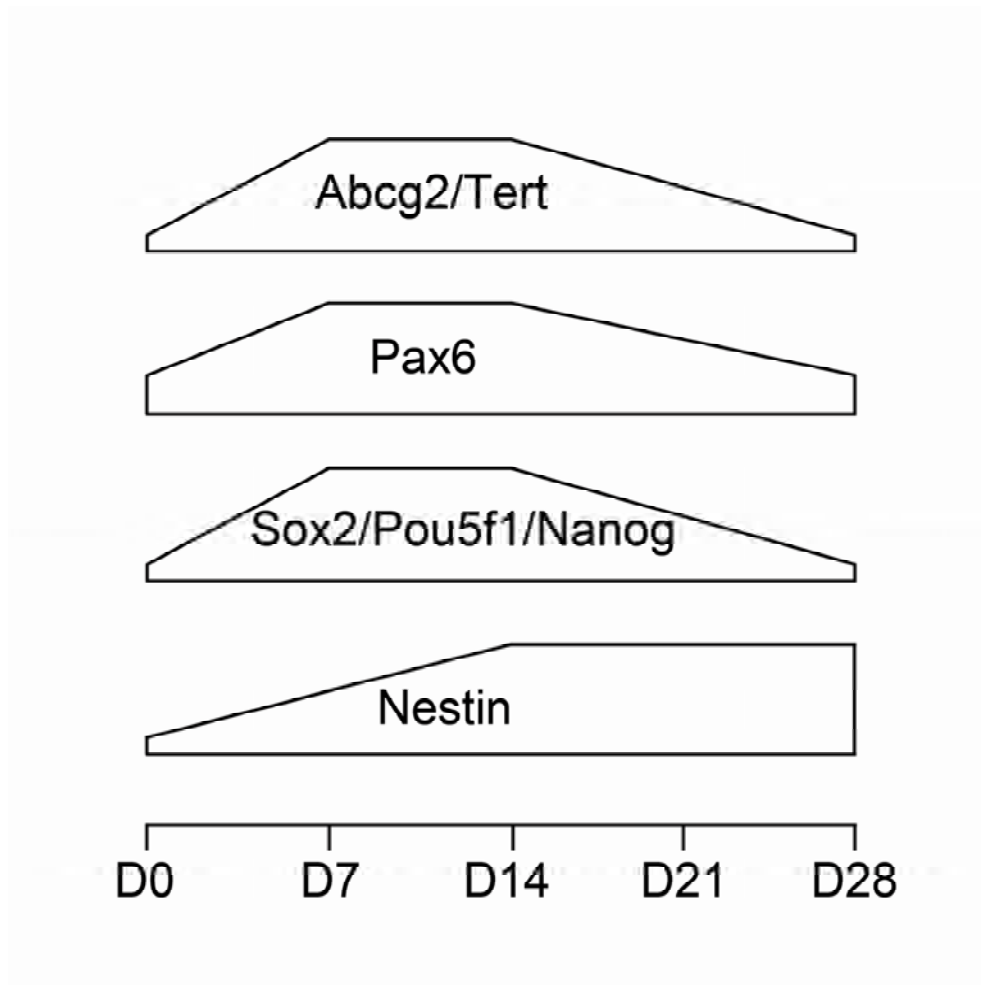


Figure 7



BIBLIOGRAPHIE

- Adachi, E., and T. Hayashi. 1986. In vitro formation of hybrid fibrils of type V collagen and type I collagen. Limited growth of type I collagen into thick fibrils by type V collagen. *Connect Tissue Res.* 14:257-66.
- Adar, R., E. Kessler, and B. Goldberg. 1986. Evidence for a protein that enhances the activity of type I procollagen C-proteinase. *Coll Relat Res.* 6:267-77.
- Akhtar, S., B.C. Kerr, A.J. Hayes, C.E. Hughes, K.M. Meek, and B. Caterson. 2008. Immunochemical localization of keratan sulfate proteoglycans in cornea, sclera, and limbus using a keratanase-generated neopeptide monoclonal antibody. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 49:2424-31.
- Akimoto, Y., N. Yamakawa, K. Furukawa, K. Kimata, H. Kawakami, and H. Hirano. 2002. Changes in distribution of the long form of type XII collagen during chicken corneal development. *J Histochem Cytochem.* 50:851-62.
- Amano, S., I.C. Scott, K. Takahara, M. Koch, M.F. Champlaud, D.R. Gerecke, D.R. Keene, D.L. Hudson, T. Nishiyama, S. Lee, D.S. Greenspan, and R.E. Burgeson. 2000. Bone morphogenetic protein 1 is an extracellular processing enzyme of the laminin 5 gamma 2 chain. *J Biol Chem.* 275:22728-35.
- Anderson, S., S. SundarRaj, D. Fite, H. Wessel, and N. SundarRaj. 2000. Developmentally regulated appearance of spliced variants of type XII collagen in the cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 41:55-63.
- Ansorge, H.L., X. Meng, G. Zhang, G. Veit, M. Sun, J.F. Klement, D.P. Beason, L.J. Soslowsky, M. Koch, and D.E. Birk. 2009. Type XIV Collagen Regulates Fibrillogenesis: PREMATURE COLLAGEN FIBRIL GROWTH AND TISSUE DYSFUNCTION IN NULL MICE. *J Biol Chem.* 284:8427-38.
- Bachy, S., F. Letourneur, and P. Rousselle. 2008. Syndecan-1 interaction with the LG4/5 domain in laminin-332 is essential for keratinocyte migration. *J Cell Physiol.* 214:238-49.
- Baciu, P.C., E.A. Suleiman, E.I. Deryugina, and A.Y. Strongin. 2003. Membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) processing of pro-alpha_v integrin regulates cross-talk between alpha_vbeta₃ and alpha₂beta₁ integrins in breast carcinoma cells. *Exp Cell Res.* 291:167-75.
- Banyai, L., and L. Patthy. 1999. The NTR module: domains of netrins, secreted frizzled related proteins, and type I procollagen C-proteinase enhancer protein are homologous with tissue inhibitors of metalloproteases. *Protein Sci.* 8:1636-42.
- Banyard, J., L. Bao, and B.R. Zetter. 2003. Type XXIII collagen, a new transmembrane collagen identified in metastatic tumor cells. *J Biol Chem.* 278:20989-94.
- Bateman, J.F., D. Chan, T. Mascara, J.G. Rogers, and W.G. Cole. 1986. Collagen defects in lethal perinatal osteogenesis imperfecta. *Biochem J.* 240:699-708.
- Bauer, M., W. Dieterich, T. Ehnis, and D. Schuppan. 1997. Complete primary structure of human collagen type XIV (undulin). *Biochim Biophys Acta.* 1354:183-8.
- Bigg, H.F., C.J. Morrison, G.S. Butler, M.A. Bogoyevitch, Z. Wang, P.D. Soloway, and C.M. Overall. 2001. Tissue inhibitor of metalloproteinases-4 inhibits but does not support the activation of gelatinase A via efficient inhibition of membrane type 1-matrix metalloproteinase. *Cancer Res.* 61:3610-8.
- Birk, D.E. 2001. Type V collagen: heterotypic type I/V collagen interactions in the regulation of fibril assembly. *Micron.* 32:223-37.
- Birk, D.E., J.M. Fitch, J.P. Babiartz, K.J. Doane, and T.F. Linsenmayer. 1990. Collagen fibrillogenesis in vitro: interaction of types I and V collagen regulates fibril diameter. *J Cell Sci.* 95 (Pt 4):649-57.

- Birk, D.E., J.M. Fitch, J.P. Babiarz, and T.F. Linsenmayer. 1988. Collagen type I and type V are present in the same fibril in the avian corneal stroma. *J Cell Biol.* 106:999-1008.
- Blochberger, T.C., J.P. Vergnes, J. Hempel, and J.R. Hassell. 1992. cDNA to chick lumican (corneal keratan sulfate proteoglycan) reveals homology to the small interstitial proteoglycan gene family and expression in muscle and intestine. *J Biol Chem.* 267:347-52.
- Bohme, K., Y. Li, P.S. Oh, and B.R. Olsen. 1995. Primary structure of the long and short splice variants of mouse collagen XII and their tissue-specific expression during embryonic development. *Dev Dyn.* 204:432-45.
- Boot-Handford, R.P., D.S. Tuckwell, D.A. Plumb, C.F. Rock, and R. Poulsom. 2003. A novel and highly conserved collagen (pro(alpha)1(XXVII)) with a unique expression pattern and unusual molecular characteristics establishes a new clade within the vertebrate fibrillar collagen family. *J Biol Chem.* 278:31067-77.
- Borel, A., D. Eichenberger, J. Farjanel, E. Kessler, C. Gleyzal, D.J. Hulmes, P. Sommer, and B. Font. 2001. Lysyl oxidase-like protein from bovine aorta. Isolation and maturation to an active form by bone morphogenetic protein-1. *J Biol Chem.* 276:48944-9.
- BOREL JP, MAQUART FX, LE PEUCH C, RANDOUX A, GILLERY P, BELLON G, and MONBOISSE JC. 1997. Biochimie dynamique. Bruxelles : De Boeck & Larcier, Bruxelles.
- Borel, J.P., and G. Bellon. 1985. [Vascular collagens. General review]. *Pathol Biol (Paris).* 33:254-60.
- Bredrup, C., P.M. Knappskog, J. Majewski, E. Rodahl, and H. Boman. 2005. Congenital stromal dystrophy of the cornea caused by a mutation in the decorin gene. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 46:420-6.
- Brew, K., D. Dinakarpanian, and H. Nagase. 2000. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta.* 1477:267-83.
- Brinckerhoff, C.E., and L.M. Matrisian. 2002. Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3:207-14.
- Butler, G.S., M.J. Butler, S.J. Atkinson, H. Will, T. Tamura, S. Schade van Westrum, T. Crabbe, J. Clements, M.P. d'Ortho, and G. Murphy. 1998. The TIMP2 membrane type 1 metalloproteinase "receptor" regulates the concentration and efficient activation of progelatinase A. A kinetic study. *J Biol Chem.* 273:871-80.
- Bystrom, B., I. Virtanen, P. Rousselle, K. Miyazaki, C. Linden, and F. Pedrosa Domellof. 2007. Laminins in normal, keratoconus, bullous keratopathy and scarred human corneas. *Histochem Cell Biol.* 127:657-67.
- Cameron, G.J., I.L. Alberts, J.H. Laing, and T.J. Wess. 2002. Structure of type I and type III heterotypic collagen fibrils: an X-ray diffraction study. *J Struct Biol.* 137:15-22.
- Canty, E.G., and K.E. Kadler. 2005. Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis. *J Cell Sci.* 118:1341-53.
- Chakravarti, S. 2006. Focus on molecules: keratocan (KERA). *Exp Eye Res.* 82:183-4.
- Chakravarti, S., T. Magnuson, J.H. Lass, K.J. Jepsen, C. LaMantia, and H. Carroll. 1998. Lumican regulates collagen fibril assembly: skin fragility and corneal opacity in the absence of lumican. *J Cell Biol.* 141:1277-86.
- Chau, P., P.E. Fielding, and C.J. Fielding. 2007. Bone morphogenetic protein-1 (BMP-1) cleaves human proapolipoprotein A1 and regulates its activation for lipid binding. *Biochemistry.* 46:8445-50.

- Chen, L., T. Kato, H. Toshida, S. Nakamura, and A. Murakami. 2005. Immunohistochemical characterization of epithelial cells implanted in the flap-stroma interface of the cornea. *Jpn J Ophthalmol.* 49:79-83.
- Chu, M.L., J.C. Myers, M.P. Bernard, J.F. Ding, and F. Ramirez. 1982. Cloning and characterization of five overlapping cDNAs specific for the human pro alpha 1(I) collagen chain. *Nucleic Acids Res.* 10:5925-34.
- Cintron, C., L.C. Hassinger, C.L. Kublin, and D.J. Cannon. 1978. Biochemical and ultrastructural changes in collagen during corneal wound healing. *J Ultrastruct Res.* 65:13-22.
- Cintron, C., and C.L. Kublin. 1977. Regeneration of corneal tissue. *Dev Biol.* 61:346-57.
- Conner, S.D., and S.L. Schmid. 2003. Regulated portals of entry into the cell. *Nature.* 422:37-44.
- Cornuet, P.K., T.C. Blochberger, and J.R. Hassell. 1994. Molecular polymorphism of lumican during corneal development. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 35:870-7.
- Corpuz, L.M., J.L. Funderburgh, M.L. Funderburgh, G.S. Bottomley, S. Prakash, and G.W. Conrad. 1996. Molecular cloning and tissue distribution of keratocan. Bovine corneal keratan sulfate proteoglycan 37A. *J Biol Chem.* 271:9759-63.
- Coster, D.J., and K.A. Williams. 2005. The impact of corneal allograft rejection on the long-term outcome of corneal transplantation. *Am J Ophthalmol.* 140:1112-22.
- Coulombre, A.J., and J.L. Coulombre. 1958. Corneal development. I. Corneal transparency. *J Cell Physiol.* 51:1-11.
- Covington, M.D., R.C. Burghardt, and A.R. Parrish. 2006. Ischemia-induced cleavage of cadherins in NRK cells requires MT1-MMP (MMP-14). *Am J Physiol Renal Physiol.* 290:F43-51.
- d'Ortho, M.P., H. Will, S. Atkinson, G. Butler, A. Messent, J. Gavrilovic, B. Smith, R. Timpl, L. Zardi, and G. Murphy. 1997. Membrane-type matrix metalloproteinases 1 and 2 exhibit broad-spectrum proteolytic capacities comparable to many matrix metalloproteinases. *Eur J Biochem.* 250:751-7.
- Davison, P.F., and E.J. Galbavy. 1986. Connective tissue remodeling in corneal and scleral wounds. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 27:1478-84.
- Dawson, D.G., T.R. Kramer, H.E. Grossniklaus, G.O. Waring, 3rd, and H.F. Edelhauser. 2005. Histologic, ultrastructural, and immunofluorescent evaluation of human laser-assisted in situ keratomileusis corneal wounds. *Arch Ophthalmol.* 123:741-56.
- Del Pero, R.A., J.E. Gigstad, A.D. Roberts, G.K. Klintworth, C.A. Martin, F.A. L'Esperance, Jr., and D.M. Taylor. 1990. A refractive and histopathologic study of excimer laser keratectomy in primates. *Am J Ophthalmol.* 109:419-29.
- Dickson, L.A., Y. Ninomiya, M.P. Bernard, D.M. Pesciotta, J. Parsons, G. Green, E.F. Eikenberry, B. de Crombrughe, G. Vogeli, I. Pastan, P.P. Fietzek, and B.R. Olsen. 1981. The exon/intron structure of the 3'-region of the pro alpha 2(I) collagen gene. *J Biol Chem.* 256:8407-15.
- Dublet, B., S. Oh, S.P. Sugrue, M.K. Gordon, D.R. Gerecke, B.R. Olsen, and M. van der Rest. 1989. The structure of avian type XII collagen. Alpha 1 (XII) chains contain 190-kDa non-triple helical amino-terminal domains and form homotrimeric molecules. *J Biol Chem.* 264:13150-6.
- Dublet, B., and M. van der Rest. 1991. Type XIV collagen, a new homotrimeric molecule extracted from fetal bovine skin and tendon, with a triple helical disulfide-bonded domain homologous to type IX and type XII collagens. *J Biol Chem.* 266:6853-8.
- Dupps, W.J., Jr., and S.E. Wilson. 2006. Biomechanics and wound healing in the cornea. *Exp Eye Res.* 83:709-20.

- Ebihara, N., H. Mizushima, K. Miyazaki, Y. Watanabe, S. Ikawa, K. Nakayasu, and A. Kanai. 2000. The functions of exogenous and endogenous laminin-5 on corneal epithelial cells. *Exp Eye Res.* 71:69-79.
- El-Shabrawi, Y., C.L. Kublin, and C. Cintron. 1998. mRNA levels of alpha1(VI) collagen, alpha1(XII) collagen, and beta ig in rabbit cornea during normal development and healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 39:36-44.
- Fichard, A., J.P. Kleman, and F. Ruggiero. 1995. Another look at collagen V and XI molecules. *Matrix Biol.* 14:515-31.
- Fini, M.E. 1999. Keratocyte and fibroblast phenotypes in the repairing cornea. *Prog Retin Eye Res.* 18:529-51.
- Fini, M.E., J.R. Cook, and R. Mohan. 1998. Proteolytic mechanisms in corneal ulceration and repair. *Arch Dermatol Res.* 290 Suppl:S12-23.
- Fitch, J.M., C.M. Linsenmayer, and T.F. Linsenmayer. 1994. Collagen fibril assembly in the developing avian primary corneal stroma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 35:862-9.
- Fitzgerald, J., and J.F. Bateman. 2001. A new FACIT of the collagen family: COL21A1. *FEBS Lett.* 505:275-80.
- Font, B., D. Eichenberger, D. Goldschmidt, M.M. Boutillon, and D.J. Hulmes. 1998. Structural requirements for fibromodulin binding to collagen and the control of type I collagen fibrillogenesis--critical roles for disulphide bonding and the C-terminal region. *Eur J Biochem.* 254:580-7.
- Foster, A., and S. Resnikoff. 2005. The impact of Vision 2020 on global blindness. *Eye (Lond).* 19:1133-5.
- Fournié, P., and F. Malecaze. 2009. Chapter 13 Penetrating keratoplasty for keratoconus. In: « Keratoconus Surgery and Cross-Linking ». Pinelli R, Leccisotti A, Jaypee B, . New Dehli. 129-150 pp.
- Funderburgh, J.L., B. Catterson, and G.W. Conrad. 1986. Keratan sulfate proteoglycan during embryonic development of the chicken cornea. *Dev Biol.* 116:267-77.
- Funderburgh, J.L., L.M. Corpuz, M.R. Roth, M.L. Funderburgh, E.S. Tasheva, and G.W. Conrad. 1997. Mimecan, the 25-kDa corneal keratan sulfate proteoglycan, is a product of the gene producing osteoglycin. *J Biol Chem.* 272:28089-95.
- Funderburgh, J.L., N.D. Hevelone, M.R. Roth, M.L. Funderburgh, M.R. Rodrigues, V.S. Nirankari, and G.W. Conrad. 1998. Decorin and biglycan of normal and pathologic human corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 39:1957-64.
- Gabison, E.E., E. Huet, C. Baudouin, and S. Menashi. 2009. Direct epithelial-stromal interaction in corneal wound healing: Role of EMMPRIN/CD147 in MMPs induction and beyond. *Prog Retin Eye Res.* 28:19-33.
- Galvez, B.G., S. Matias-Roman, M. Yanez-Mo, M. Vicente-Manzanares, F. Sanchez-Madrid, and A.G. Arroyo. 2004. Caveolae are a novel pathway for membrane-type 1 matrix metalloproteinase traffic in human endothelial cells. *Mol Biol Cell.* 15:678-87.
- Ge, G., C.A. Fernandez, M.A. Moses, and D.S. Greenspan. 2007. Bone morphogenetic protein 1 processes prolactin to a 17-kDa antiangiogenic factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:10010-5.
- Ge, G., and D.S. Greenspan. 2006a. BMP1 controls TGFbeta1 activation via cleavage of latent TGFbeta-binding protein. *J Cell Biol.* 175:111-20.
- Ge, G., and D.S. Greenspan. 2006b. Developmental roles of the BMP1/TLD metalloproteinases. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 78:47-68.
- Ge, G., D.R. Hopkins, W.B. Ho, and D.S. Greenspan. 2005. GDF11 forms a bone morphogenetic protein 1-activated latent complex that can modulate nerve growth factor-induced differentiation of PC12 cells. *Mol Cell Biol.* 25:5846-58.

- Ge, G., N.S. Seo, X. Liang, D.R. Hopkins, M. Hook, and D.S. Greenspan. 2004. Bone morphogenetic protein-1/tolloid-related metalloproteinases process osteoglycin and enhance its ability to regulate collagen fibrillogenesis. *J Biol Chem.* 279:41626-33.
- Gelse, K., E. Poschl, and T. Aigner. 2003. Collagens--structure, function, and biosynthesis. *Adv Drug Deliv Rev.* 55:1531-46.
- Gerecke, D.R., J.W. Foley, P. Castagnola, M. Gennari, B. Dublet, R. Cancedda, T.F. Linsenmayer, M. van der Rest, B.R. Olsen, and M.K. Gordon. 1993. Type XIV collagen is encoded by alternative transcripts with distinct 5' regions and is a multidomain protein with homologies to von Willebrand's factor, fibronectin, and other matrix proteins. *J Biol Chem.* 268:12177-84.
- Gerecke, D.R., X. Meng, B. Liu, and D.E. Birk. 2003. Complete primary structure and genomic organization of the mouse Col14a1 gene. *Matrix Biol.* 22:209-16.
- Gerecke, D.R., P.F. Olson, M. Koch, J.H. Knoll, R. Taylor, D.L. Hudson, M.F. Champlaud, B.R. Olsen, and R.E. Burgeson. 1997. Complete primary structure of two splice variants of collagen XII, and assignment of alpha 1(XII) collagen (COL12A1), alpha 1(IX) collagen (COL9A1), and alpha 1(XIX) collagen (COL19A1) to human chromosome 6q12-q13. *Genomics.* 41:236-42.
- Gonzalez, E.M., C.C. Reed, G. Bix, J. Fu, Y. Zhang, B. Gopalakrishnan, D.S. Greenspan, and R.V. Iozzo. 2005. BMP-1/Tolloid-like metalloproteases process endorepellin, the angiostatic C-terminal fragment of perlecan. *J Biol Chem.* 280:7080-7.
- Gopalakrishnan, B., W.M. Wang, and D.S. Greenspan. 2004. Biosynthetic processing of the Pro-alpha1(V)Pro-alpha2(V)Pro-alpha3(V) procollagen heterotrimer. *J Biol Chem.* 279:30904-12.
- Gordon, M.K., J.W. Foley, D.E. Birk, J.M. Fitch, and T.F. Linsenmayer. 1994. Type V collagen and Bowman's membrane. Quantitation of mRNA in corneal epithelium and stroma. *J Biol Chem.* 269:24959-66.
- Gordon, M.K., J.W. Foley, T.F. Linsenmayer, and J.M. Fitch. 1996. Temporal expression of types XII and XIV collagen mRNA and protein during avian corneal development. *Dev Dyn.* 206:49-58.
- Gordon, M.K., D.R. Gerecke, and B.R. Olsen. 1987. Type XII collagen: distinct extracellular matrix component discovered by cDNA cloning. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 84:6040-4.
- Gordon, M.K., and R.A. Hahn. 2010. Collagens. *Cell Tissue Res.* 339:247-57.
- Grimal, S., S. Puech, R. Wagener, S. Venteo, P. Carroll, and A. Fichard-Carroll. 2010. Collagen XXVIII is a distinctive component of the peripheral nervous system nodes of ranvier and surrounds nonmyelinating glial cells. *Glia.* 58:1977-87.
- Grinnell, F., M. Zhu, M.A. Carlson, and J.M. Abrams. 1999. Release of mechanical tension triggers apoptosis of human fibroblasts in a model of regressing granulation tissue. *Exp Cell Res.* 248:608-19.
- Hanna, K.D., Y. Pouliquen, G.O. Waring, 3rd, M. Savoldelli, J. Cotter, K. Morton, and M. Menasche. 1989. Corneal stromal wound healing in rabbits after 193-nm excimer laser surface ablation. *Arch Ophthalmol.* 107:895-901.
- Hashimoto, T., T. Wakabayashi, A. Watanabe, H. Kowa, R. Hosoda, A. Nakamura, I. Kanazawa, T. Arai, K. Takio, D.M. Mann, and T. Iwatsubo. 2002. CLAC: a novel Alzheimer amyloid plaque component derived from a transmembrane precursor, CLAC-P/collagen type XXV. *Embo J.* 21:1524-34.
- Hassell, J.R., and D.E. Birk. 2010. The molecular basis of corneal transparency. *Exp Eye Res.* 91:326-35.

- Hassell, J.R., C. Cintron, C. Kublin, and D.A. Newsome. 1983. Proteoglycan changes during restoration of transparency in corneal scars. *Arch Biochem Biophys.* 222:362-9.
- Hassell, J.R., J.H. Kimura, and V.C. Hascall. 1986. Proteoglycan core protein families. *Annu Rev Biochem.* 55:539-67.
- Hassell, J.R., D.A. Newsome, J.H. Krachmer, and M.M. Rodrigues. 1980. Macular corneal dystrophy: failure to synthesize a mature keratan sulfate proteoglycan. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 77:3705-9.
- Hayashida, Y., T.O. Akama, N. Beecher, P. Lewis, R.D. Young, K.M. Meek, B. Kerr, C.E. Hughes, B. Caterson, A. Tanigami, J. Nakayama, M.N. Fukada, Y. Tano, K. Nishida, and A.J. Quantock. 2006. Matrix morphogenesis in cornea is mediated by the modification of keratan sulfate by GlcNAc 6-O-sulfotransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:13333-8.
- He, W., L. Zhang, A. Ni, Z. Zhang, M. Mirotsoy, L. Mao, R.E. Pratt, and V.J. Dzau. 2010. Exogenously administered secreted frizzled related protein 2 (Sfrp2) reduces fibrosis and improves cardiac function in a rat model of myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107:21110-5.
- Helena, M.C., F. Baerveldt, W.J. Kim, and S.E. Wilson. 1998. Keratocyte apoptosis after corneal surgery. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 39:276-83.
- Hiller, O., A. Lichte, A. Oberpichler, A. Kocourek, and H. Tschesche. 2000. Matrix metalloproteinases collagenase-2, macrophage elastase, collagenase-3, and membrane type 1-matrix metalloproteinase impair clotting by degradation of fibrinogen and factor XII. *J Biol Chem.* 275:33008-13.
- Hinz, B. 2007. Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. *J Invest Dermatol.* 127:526-37.
- Hojima, Y., M. van der Rest, and D.J. Prockop. 1985. Type I procollagen carboxyl-terminal proteinase from chick embryo tendons. Purification and characterization. *J Biol Chem.* 260:15996-6003.
- Holopainen, J.M., J.A. Moilanen, T. Sorsa, M. Kivela-Rajamaki, T. Tervahartiala, M.H. Vesaluoma, and T.M. Tervo. 2003. Activation of matrix metalloproteinase-8 by membrane type 1-MMP and their expression in human tears after photorefractive keratectomy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 44:2550-6.
- Hopkins, D.R., S. Keles, and D.S. Greenspan. 2007. The bone morphogenetic protein 1/Tolloid-like metalloproteinases. *Matrix Biol.* 26:508-23.
- Hopkinson, S.B., K. Findlay, G.W. deHart, and J.C. Jones. 1998. Interaction of BP180 (type XVII collagen) and alpha6 integrin is necessary for stabilization of hemidesmosome structure. *J Invest Dermatol.* 111:1015-22.
- Hotary, K.B., I. Yana, F. Sabeh, X.Y. Li, K. Holmbeck, H. Birkedal-Hansen, E.D. Allen, N. Hiraoka, and S.J. Weiss. 2002. Matrix metalloproteinases (MMPs) regulate fibrin-invasive activity via MT1-MMP-dependent and -independent processes. *J Exp Med.* 195:295-308.
- Hulmes, D.J., A.P. Mould, and E. Kessler. 1997. The CUB domains of procollagen C-proteinase enhancer control collagen assembly solely by their effect on procollagen C-proteinase/bone morphogenetic protein-1. *Matrix Biol.* 16:41-5.
- Imai, K., E. Ohuchi, T. Aoki, H. Nomura, Y. Fujii, H. Sato, M. Seiki, and Y. Okada. 1996. Membrane-type matrix metalloproteinase 1 is a gelatinolytic enzyme and is secreted in a complex with tissue inhibitor of metalloproteinases 2. *Cancer Res.* 56:2707-10.
- Imamura, Y., B.M. Steiglit, and D.S. Greenspan. 1998. Bone morphogenetic protein-1 processes the NH2-terminal propeptide, and a furin-like proprotein convertase

- processes the COOH-terminal propeptide of pro-alpha1(V) collagen. *J Biol Chem.* 273:27511-7.
- Itoh, Y., A. Takamura, N. Ito, Y. Maru, H. Sato, N. Suenaga, T. Aoki, and M. Seiki. 2001. Homophilic complex formation of MT1-MMP facilitates proMMP-2 activation on the cell surface and promotes tumor cell invasion. *Embo J.* 20:4782-93.
- Jasuja, R., G. Ge, N.G. Voss, J. Lyman-Gingerich, A.M. Branam, F.J. Pelegri, and D.S. Greenspan. 2007. Bone morphogenetic protein 1 prodomain specifically binds and regulates signaling by bone morphogenetic proteins 2 and 4. *J Biol Chem.* 282:9053-62.
- Jester, J.V., T. Moller-Pedersen, J. Huang, C.M. Sax, W.T. Kays, H.D. Cavanagh, W.M. Petroll, and J. Piatigorsky. 1999. The cellular basis of corneal transparency: evidence for 'corneal crystallins'. *J Cell Sci.* 112 (Pt 5):613-22.
- Jester, J.V., W.M. Petroll, P.A. Barry, and H.D. Cavanagh. 1995. Expression of alpha-smooth muscle (alpha-SM) actin during corneal stromal wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 36:809-19.
- Jiang, A., K. Lehti, X. Wang, S.J. Weiss, J. Keski-Oja, and D. Pei. 2001. Regulation of membrane-type matrix metalloproteinase 1 activity by dynamin-mediated endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:13693-8.
- Kabosova, A., D.T. Azar, G.A. Bannikov, K.P. Campbell, M. Durbeej, R.F. Ghohestani, J.C. Jones, M.C. Kenney, M. Koch, Y. Ninomiya, B.L. Patton, M. Paulsson, Y. Sado, E.H. Sage, T. Sasaki, L.M. Sorokin, M.F. Steiner-Champlaud, T.T. Sun, N. Sundarraj, R. Timpl, I. Virtanen, and A.V. Ljubimov. 2007. Compositional differences between infant and adult human corneal basement membranes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 48:4989-99.
- Kajita, M., Y. Itoh, T. Chiba, H. Mori, A. Okada, H. Kinoh, and M. Seiki. 2001. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase cleaves CD44 and promotes cell migration. *J Cell Biol.* 153:893-904.
- Kanaki, T., N. Morisaki, H. Bujo, K. Takahashi, I. Ishii, and Y. Saito. 2000. The regulatory expression of procollagen COOH-terminal proteinase enhancer in the proliferation of vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 270:1049-54.
- Kania, A.M., E. Reichenberger, S.T. Baur, N.Y. Karimbux, R.W. Taylor, B.R. Olsen, and I. Nishimura. 1999. Structural variation of type XII collagen at its carboxyl-terminal NC1 domain generated by tissue-specific alternative splicing. *J Biol Chem.* 274:22053-9.
- Kao, W.W., J.L. Funderburgh, Y. Xia, C.Y. Liu, and G.W. Conrad. 2006. Focus on molecules: lumican. *Exp Eye Res.* 82:3-4.
- Kapoor, R., P. Bornstein, and E.H. Sage. 1986. Type VIII collagen from bovine Descemet's membrane: structural characterization of a triple-helical domain. *Biochemistry.* 25:3930-7.
- Kapoor, R., L.Y. Sakai, S. Funk, E. Roux, P. Bornstein, and E.H. Sage. 1988. Type VIII collagen has a restricted distribution in specialized extracellular matrices. *J Cell Biol.* 107:721-30.
- Kassner, A., U. Hansen, N. Miosge, D.P. Reinhardt, T. Aigner, L. Bruckner-Tuderman, P. Bruckner, and S. Grassel. 2003. Discrete integration of collagen XVI into tissue-specific collagen fibrils or beaded microfibrils. *Matrix Biol.* 22:131-43.
- Kato, T., K. Nakayasu, A. Kanai, T. Nishiyama, Y. Imamura, and T. Hayashi. 2000. Distribution and isoform characterization of type XII collagen in bovine cornea. *Ophthalmic Res.* 32:215-21.

- Keene, D.R., G.P. Lunstrum, N.P. Morris, D.W. Stoddard, and R.E. Burgeson. 1991. Two type XII-like collagens localize to the surface of banded collagen fibrils. *J Cell Biol.* 113:971-8.
- Keene, D.R., L.Y. Sakai, G.P. Lunstrum, N.P. Morris, and R.E. Burgeson. 1987. Type VII collagen forms an extended network of anchoring fibrils. *J Cell Biol.* 104:611-21.
- Kessler-Icekson, G., H. Schlesinger, S. Freimann, and E. Kessler. 2006. Expression of procollagen C-proteinase enhancer-1 in the remodeling rat heart is stimulated by aldosterone. *Int J Biochem Cell Biol.* 38:358-65.
- Kessler, E., and R. Adar. 1989. Type I procollagen C-proteinase from mouse fibroblasts. Purification and demonstration of a 55-kDa enhancer glycoprotein. *Eur J Biochem.* 186:115-21.
- Kessler, E., A. Fichard, H. Chanut-Delalande, M. Brusel, and F. Ruggiero. 2001. Bone morphogenetic protein-1 (BMP-1) mediates C-terminal processing of procollagen V homotrimer. *J Biol Chem.* 276:27051-7.
- Kessler, E., K. Takahara, L. Biniaminov, M. Brusel, and D.S. Greenspan. 1996. Bone morphogenetic protein-1: the type I procollagen C-proteinase. *Science.* 271:360-2.
- Kielty CM, and Grant ME. 2002. The collagen family : structure, assembly, and organization in the extracellular matrix. Wiley-Liss Eds, New York.
- Kielty, C.M., S.P. Whittaker, M.E. Grant, and C.A. Shuttleworth. 1992. Type VI collagen microfibrils: evidence for a structural association with hyaluronan. *J Cell Biol.* 118:979-90.
- Knauper, V., L. Bailey, J.R. Worley, P. Soloway, M.L. Patterson, and G. Murphy. 2002. Cellular activation of proMMP-13 by MT1-MMP depends on the C-terminal domain of MMP-13. *FEBS Lett.* 532:127-30.
- Kobayashi, K., M. Luo, Y. Zhang, D.C. Wilkes, G. Ge, T. Grieskamp, C. Yamada, T.C. Liu, G. Huang, C.T. Basson, A. Kispert, D.S. Greenspan, and T.N. Sato. 2009. Secreted Frizzled-related protein 2 is a procollagen C proteinase enhancer with a role in fibrosis associated with myocardial infarction. *Nat Cell Biol.* 11:46-55.
- Koch, M., C. Bernasconi, and M. Chiquet. 1992. A major oligomeric fibroblast proteoglycan identified as a novel large form of type-XII collagen. *Eur J Biochem.* 207:847-56.
- Koch, M., B. Bohrmann, M. Matthison, C. Hagios, B. Trueb, and M. Chiquet. 1995. Large and small splice variants of collagen XII: differential expression and ligand binding. *J Cell Biol.* 130:1005-14.
- Koch, M., J.E. Foley, R. Hahn, P. Zhou, R.E. Burgeson, D.R. Gerecke, and M.K. Gordon. 2001. alpha 1(Xx) collagen, a new member of the collagen subfamily, fibril-associated collagens with interrupted triple helices. *J Biol Chem.* 276:23120-6.
- Koch, M., F. Laub, P. Zhou, R.A. Hahn, S. Tanaka, R.E. Burgeson, D.R. Gerecke, F. Ramirez, and M.K. Gordon. 2003. Collagen XXIV, a vertebrate fibrillar collagen with structural features of invertebrate collagens: selective expression in developing cornea and bone. *J Biol Chem.* 278:43236-44.
- Koch, M., J. Schulze, U. Hansen, T. Ashwodt, D.R. Keene, W.J. Brunken, R.E. Burgeson, P. Bruckner, and L. Bruckner-Tuderman. 2004. A novel marker of tissue junctions, collagen XXII. *J Biol Chem.* 279:22514-21.
- Kwan, A.P., C.E. Cummings, J.A. Chapman, and M.E. Grant. 1991. Macromolecular organization of chicken type X collagen in vitro. *J Cell Biol.* 114:597-604.
- Lance, S.E., A. Capone, Jr., N. SundarRaj, M.I. Roat, and R.A. Thoft. 1988. Diamond burring and surgical keratectomy. Morphologic comparison in the rabbit. *Arch Ophthalmol.* 106:830-4.

- Latvanlehto, A., A. Snellman, H. Tu, and T. Pihlajaniemi. 2003. Type XIII collagen and some other transmembrane collagens contain two separate coiled-coil motifs, which may function as independent oligomerization domains. *J Biol Chem.* 278:37590-9.
- Lee, H.K., J.H. Lee, M. Kim, Y. Kariya, K. Miyazaki, and E.K. Kim. 2006a. Insulin-like growth factor-1 induces migration and expression of laminin-5 in cultured human corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 47:873-82.
- Lee, H.X., A.L. Ambrosio, B. Reversade, and E.M. De Robertis. 2006b. Embryonic dorsal-ventral signaling: secreted frizzled-related proteins as inhibitors of tollid proteinases. *Cell.* 124:147-59.
- Lee, H.X., F.A. Mendes, J.L. Plouhinec, and E.M. De Robertis. 2009. Enzymatic regulation of pattern: BMP4 binds CUB domains of Tollids and inhibits proteinase activity. *Genes Dev.* 23:2551-62.
- Lee, R.E., P.F. Davison, and C. Cintron. 1982. The healing of linear nonperforating wounds in rabbit corneas of different ages. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 23:660-5.
- Lee, S., D.E. Solow-Cordero, E. Kessler, K. Takahara, and D.S. Greenspan. 1997. Transforming growth factor-beta regulation of bone morphogenetic protein-1/procollagen C-proteinase and related proteins in fibrogenic cells and keratinocytes. *J Biol Chem.* 272:19059-66.
- Lehti, K., J. Lohi, M.M. Juntunen, D. Pei, and J. Keski-Oja. 2002. Oligomerization through hemopexin and cytoplasmic domains regulates the activity and turnover of membrane-type 1 matrix metalloproteinase. *J Biol Chem.* 277:8440-8.
- Lehti, K., J. Lohi, H. Valtanen, and J. Keski-Oja. 1998. Proteolytic processing of membrane-type-1 matrix metalloproteinase is associated with gelatinase A activation at the cell surface. *Biochem J.* 334 (Pt 2):345-53.
- Lehti, K., H. Valtanen, S.A. Wickstrom, J. Lohi, and J. Keski-Oja. 2000. Regulation of membrane-type-1 matrix metalloproteinase activity by its cytoplasmic domain. *J Biol Chem.* 275:15006-13.
- Lethias, C., Y. Descollonges, R. Garrone, and M. van der Rest. 1993. Expression of type XIV collagen during the differentiation of fetal bovine skin: immunolabeling with monoclonal antibody is prominent in morphogenetic areas. *J Invest Dermatol.* 101:92-9.
- Li, S.W., A.L. Sieron, A. Fertala, Y. Hojima, W.V. Arnold, and D.J. Prockop. 1996. The C-proteinase that processes procollagens to fibrillar collagens is identical to the protein previously identified as bone morphogenetic protein-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:5127-30.
- Li, W., J.P. Vergnes, P.K. Cornuet, and J.R. Hassell. 1992. cDNA clone to chick corneal chondroitin/dermatan sulfate proteoglycan reveals identity to decorin. *Arch Biochem Biophys.* 296:190-7.
- Li, Y., T. Aoki, Y. Mori, M. Ahmad, H. Miyamori, T. Takino, and H. Sato. 2004. Cleavage of lumican by membrane-type matrix metalloproteinase-1 abrogates this proteoglycan-mediated suppression of tumor cell colony formation in soft agar. *Cancer Res.* 64:7058-64.
- Ljubimov, A.V., S.A. Alba, R.E. Burgeson, Y. Ninomiya, Y. Sado, T.T. Sun, A.B. Nesburn, M.C. Kenney, and E. Maguen. 1998. Extracellular matrix changes in human corneas after radial keratotomy. *Exp Eye Res.* 67:265-72.
- Lohi, J., K. Lehti, H. Valtanen, W.C. Parks, and J. Keski-Oja. 2000. Structural analysis and promoter characterization of the human membrane-type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) gene. *Gene.* 242:75-86.

- Lunstrum, G.P., N.P. Morris, A.M. McDonough, D.R. Keene, and R.E. Burgeson. 1991. Identification and partial characterization of two type XII-like collagen molecules. *J Cell Biol.* 113:963-9.
- Madisen, L., M. Neubauer, G. Plowman, D. Rosen, P. Segarini, J. Dasch, A. Thompson, J. Ziman, H. Bentz, and A.F. Purchio. 1990. Molecular cloning of a novel bone-forming compound: osteoinductive factor. *DNA Cell Biol.* 9:303-9.
- Maertens, B., D. Hopkins, C.W. Franzke, D.R. Keene, L. Bruckner-Tuderman, D.S. Greenspan, and M. Koch. 2007. Cleavage and oligomerization of gliomedin, a transmembrane collagen required for node of ranvier formation. *J Biol Chem.* 282:10647-59.
- Maguen, E., S.A. Alba, R.E. Burgeson, R.J. Butkowski, A.F. Michael, M.C. Kenney, A.B. Nesburn, and A.V. Ljubimov. 1997. Alterations of corneal extracellular matrix after multiple refractive procedures: a clinical and immunohistochemical study. *Cornea.* 16:675-82.
- Maguen, E., B. Maguen, L. Regev, and A.V. Ljubimov. 2007. Immunohistochemical evaluation of two corneal buttons with post-LASIK keratectasia. *Cornea.* 26:983-91.
- Maguen, E., Y.S. Rabinowitz, L. Regev, M. Saghizadeh, T. Sasaki, and A.V. Ljubimov. 2008. Alterations of extracellular matrix components and proteinases in human corneal buttons with INTACS for post-laser in situ keratomileusis keratectasia and keratoconus. *Cornea.* 27:565-73.
- Marchant, J.K., G. Zhang, and D.E. Birk. 2002. Association of type XII collagen with regions of increased stability and keratocyte density in the cornea. *Exp Eye Res.* 75:683-94.
- McQuibban, G.A., G.S. Butler, J.H. Gong, L. Bendall, C. Power, I. Clark-Lewis, and C.M. Overall. 2001. Matrix metalloproteinase activity inactivates the CXC chemokine stromal cell-derived factor-1. *J Biol Chem.* 276:43503-8.
- McQuibban, G.A., J.H. Gong, J.P. Wong, J.L. Wallace, I. Clark-Lewis, and C.M. Overall. 2002. Matrix metalloproteinase processing of monocyte chemoattractant proteins generates CC chemokine receptor antagonists with anti-inflammatory properties in vivo. *Blood.* 100:1160-7.
- Meirowitz, N.B., J.C. Smulian, R.A. Hahn, P. Zhou, S. Shen-Schwarz, G.H. Lambert, D.R. Gerecke, and M.K. Gordon. 2002. Collagen messenger RNA expression in the human amniochorion in premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol.* 187:1679-85.
- Mendler, M., S.G. Eich-Bender, L. Vaughan, K.H. Winterhalter, and P. Bruckner. 1989. Cartilage contains mixed fibrils of collagen types II, IX, and XI. *J Cell Biol.* 108:191-7.
- Michelacci, Y.M. 2003. Collagens and proteoglycans of the corneal extracellular matrix. *Braz J Med Biol Res.* 36:1037-46.
- Midura, R.J., V.C. Hascall, D.K. MacCallum, R.F. Meyer, E.J. Thonar, J.R. Hassell, C.F. Smith, and G.K. Klintworth. 1990. Proteoglycan biosynthesis by human corneas from patients with types 1 and 2 macular corneal dystrophy. *J Biol Chem.* 265:15947-55.
- Miller, E.J., and V.J. Matukas. 1969. Chick cartilage collagen: a new type of alpha 1 chain not present in bone or skin of the species. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 64:1264-8.
- Min, C., K.H. Kirsch, Y. Zhao, S. Jeay, A.H. Palamakumbura, P.C. Trackman, and G.E. Sonenshein. 2007. The tumor suppressor activity of the lysyl oxidase propeptide reverses the invasive phenotype of Her-2/neu-driven breast cancer. *Cancer Res.* 67:1105-12.

- Moali, C., B. Font, F. Ruggiero, D. Eichenberger, P. Rousselle, V. Francois, A. Oldberg, L. Bruckner-Tuderman, and D.J. Hulmes. 2005. Substrate-specific modulation of a multisubstrate proteinase. C-terminal processing of fibrillar procollagens is the only BMP-1-dependent activity to be enhanced by PCPE-1. *J Biol Chem.* 280:24188-94.
- Moali, C., and D.J. Hulmes. 2009. Extracellular and cell surface proteases in wound healing: new players are still emerging. *Eur J Dermatol.* 19:552-64.
- Modesti, A., T. Kalebic, S. Scarpa, S. Togo, G. Grotendorst, L.A. Liotta, and T.J. Triche. 1984. Type V collagen in human amnion is a 12 nm fibrillar component of the pericellular interstitium. *Eur J Cell Biol.* 35:246-55.
- Mohan, R.R., A. Tandon, A. Sharma, J.W. Cowden, and J.C. Tovey. 2011b. Significant Inhibition of Corneal Scarring In Vivo With Tissue-Selective Targeted AAV5 Decorin Gene Therapy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*
- Mohan, R.R., J.C. Tovey, R. Gupta, A. Sharma, and A. Tandon. 2011. Decorin biology, expression, function and therapy in the cornea. *Curr Mol Med.* 11:110-28.
- Moore, J.E., S. Shah, V. Kumar, J.R. Ainsworth, A.B. Page, and W.H. McLean. 2005. Follow up of patients with ocular scarring secondary to LOC syndrome treated by amniotic membrane transplantation. *Br J Ophthalmol.* 89:939-41.
- Murphy, C., J. Alvarado, and R. Juster. 1984. Prenatal and postnatal growth of the human Descemet's membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 25:1402-15.
- Musselmann, K., and J.R. Hassell. 2006. Focus on molecules: CHST6 (carbohydrate sulfotransferase 6; corneal N-acetylglucosamine-6-sulfotransferase). *Exp Eye Res.* 83:707-8.
- Myers, J.C., M.L. Chu, S.H. Faro, W.J. Clark, D.J. Prockop, and F. Ramirez. 1981. Cloning a cDNA for the pro-alpha 2 chain of human type I collagen. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 78:3516-20.
- Myers, J.C., A.S. Dion, V. Abraham, and P.S. Amenta. 1996. Type XV collagen exhibits a widespread distribution in human tissues but a distinct localization in basement membrane zones. *Cell Tissue Res.* 286:493-505.
- Myers, J.C., D. Li, P.S. Amenta, C.C. Clark, C. Nagaswami, and J.W. Weisel. 2003. Type XIX collagen purified from human umbilical cord is characterized by multiple sharp kinks delineating collagenous subdomains and by intermolecular aggregates via globular, disulfide-linked, and heparin-binding amino termini. *J Biol Chem.* 278:32047-57.
- Nagase, H., R. Visse, and G. Murphy. 2006. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res.* 69:562-73.
- Neame, P.J., C.J. Kay, D.J. McQuillan, M.P. Beales, and J.R. Hassell. 2000. Independent modulation of collagen fibrillogenesis by decorin and lumican. *Cell Mol Life Sci.* 57:859-63.
- Netto, M.V., R.R. Mohan, S. Sinha, A. Sharma, W. Dupps, and S.E. Wilson. 2006. Stromal haze, myofibroblasts, and surface irregularity after PRK. *Exp Eye Res.* 82:788-97.
- Nishiyama, T., A.M. McDonough, R.R. Bruns, and R.E. Burgeson. 1994. Type XII and XIV collagens mediate interactions between banded collagen fibers in vitro and may modulate extracellular matrix deformability. *J Biol Chem.* 269:28193-9.
- Ogata, I., A.S. Auster, A. Matsui, P. Greenwel, A. Geerts, T. D'Amico, K. Fujiwara, E. Kessler, and M. Rojkind. 1997. Up-regulation of type I procollagen C-proteinase enhancer protein messenger RNA in rats with CCl4-induced liver fibrosis. *Hepatology.* 26:611-7.
- Oh, J., R. Takahashi, S. Kondo, A. Mizoguchi, E. Adachi, R.M. Sasahara, S. Nishimura, Y. Imamura, H. Kitayama, D.B. Alexander, C. Ide, T.P. Horan, T. Arakawa, H. Yoshida, S. Nishikawa, Y. Itoh, M. Seiki, S. Itohara, C. Takahashi, and M. Noda.

2001. The membrane-anchored MMP inhibitor RECK is a key regulator of extracellular matrix integrity and angiogenesis. *Cell*. 107:789-800.
- Oh, S.P., C.M. Griffith, E.D. Hay, and B.R. Olsen. 1993. Tissue-specific expression of type XII collagen during mouse embryonic development. *Dev Dyn*. 196:37-46.
- Ohuchi, E., K. Imai, Y. Fujii, H. Sato, M. Seiki, and Y. Okada. 1997. Membrane type 1 matrix metalloproteinase digests interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules. *J Biol Chem*. 272:2446-51.
- Olsen, B.R. 1997. Collagen IX. *Int J Biochem Cell Biol*. 29:555-8.
- Overall, C.M., and C.P. Blobel. 2007. In search of partners: linking extracellular proteases to substrates. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 8:245-57.
- Pace, J.M., M. Corrado, C. Missero, and P.H. Byers. 2003. Identification, characterization and expression analysis of a new fibrillar collagen gene, COL27A1. *Matrix Biol*. 22:3-14.
- Page-McCaw, A., A.J. Ewald, and Z. Werb. 2007. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 8:221-33.
- Panchenko, M.V., W.G. Stetler-Stevenson, O.V. Trubetskoy, S.N. Gacheru, and H.M. Kagan. 1996. Metalloproteinase activity secreted by fibrogenic cells in the processing of prolyl oxidase. Potential role of procollagen C-proteinase. *J Biol Chem*. 271:7113-9.
- Parc, C., J.M. Legeais, S. Salvanet-Bouccara, Y. Pouliquen, and G. Renard. 1998. [Cornea plana and severe ametropia]. *J Fr Ophthalmol*. 21:451-3.
- Pellegata, N.S., J.L. Dieguez-Lucena, T. Joensuu, S. Lau, K.T. Montgomery, R. Krahe, T. Kivela, R. Kucherlapati, H. Forsius, and A. de la Chapelle. 2000. Mutations in KERA, encoding keratocan, cause cornea plana. *Nat Genet*. 25:91-5.
- Petropoulou, V., L. Garrigue-Antar, and K.E. Kadler. 2005. Identification of the minimal domain structure of bone morphogenetic protein-1 (BMP-1) for chordinase activity: chordinase activity is not enhanced by procollagen C-proteinase enhancer-1 (PCPE-1). *J Biol Chem*. 280:22616-23.
- Pez, F., F. Dayan, J. Durivault, B. Kaniewski, G. Aimond, G.S. Le Provost, B. Deux, P. Clezardin, P. Sommer, J. Pouyssegur, and C. Reynaud. 2011. The HIF-1-inducible lysyl oxidase activates HIF-1 via the Akt pathway in a positive regulation loop and synergizes with HIF-1 in promoting tumor cell growth. *Cancer Res*. 71:1647-57.
- Piccolo, S., E. Agius, B. Lu, S. Goodman, L. Dale, and E.M. De Robertis. 1997. Cleavage of Chordin by Xolloid metalloprotease suggests a role for proteolytic processing in the regulation of Spemann organizer activity. *Cell*. 91:407-16.
- Prockop, D.J., A.L. Sieron, and S.W. Li. 1998. Procollagen N-proteinase and procollagen C-proteinase. Two unusual metalloproteinases that are essential for procollagen processing probably have important roles in development and cell signaling. *Matrix Biol*. 16:399-408.
- Puente, X.S., L.M. Sanchez, C.M. Overall, and C. Lopez-Otin. 2003. Human and mouse proteases: a comparative genomic approach. *Nat Rev Genet*. 4:544-58.
- Qazi, Y., G. Wong, B. Monson, J. Stringham, and B.K. Ambati. 2010. Corneal transparency: genesis, maintenance and dysfunction. *Brain Res Bull*. 81:198-210.
- Ramchandran, R., M. Dhanabal, R. Volk, M.J. Waterman, M. Segal, H. Lu, B. Knebelmann, and V.P. Sukhatme. 1999. Antiangiogenic activity of restin, NC10 domain of human collagen XV: comparison to endostatin. *Biochem Biophys Res Commun*. 255:735-9.
- Ramirez, F., M. Bernard, M.L. Chu, L. Dickson, F. Sangiorgi, D. Weil, W. De Wet, C. Junien, and M. Sobel. 1985. Isolation and characterization of the human fibrillar collagen genes. *Ann N Y Acad Sci*. 460:117-29.

- Rattenholl, A., W.N. Pappano, M. Koch, D.R. Keene, K.E. Kadler, T. Sasaki, R. Timpl, R.E. Burgeson, D.S. Greenspan, and L. Bruckner-Tuderman. 2002. Proteinases of the bone morphogenetic protein-1 family convert procollagen VII to mature anchoring fibril collagen. *J Biol Chem.* 277:26372-8.
- Remacle, A., G. Murphy, and C. Roghi. 2003. Membrane type I-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) is internalised by two different pathways and is recycled to the cell surface. *J Cell Sci.* 116:3905-16.
- Remacle, A.G., D.V. Rozanov, P.C. Baciuc, A.V. Chekanov, V.S. Golubkov, and A.Y. Strongin. 2005. The transmembrane domain is essential for the microtubular trafficking of membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP). *J Cell Sci.* 118:4975-84.
- Ricard-Blum, S., and F. Ruggiero. 2005. The collagen superfamily: from the extracellular matrix to the cell membrane. *Pathol Biol (Paris).* 53:430-42.
- Rodahl, E., R. Van Ginderdeuren, P.M. Knappskog, C. Bredrup, and H. Boman. 2006. A second decorin frame shift mutation in a family with congenital stromal corneal dystrophy. *Am J Ophthalmol.* 142:520-1.
- Saika, S., A. Ooshima, K. Shima, S. Tanaka, and Y. Ohnishi. 1996. Collagen types in healing alkali-burned corneal stroma in rabbits. *Jpn J Ophthalmol.* 40:303-9.
- Sasaki, T., N. Fukai, K. Mann, W. Gohring, B.R. Olsen, and R. Timpl. 1998. Structure, function and tissue forms of the C-terminal globular domain of collagen XVIII containing the angiogenesis inhibitor endostatin. *Embo J.* 17:4249-56.
- Sato, H., T. Kinoshita, T. Takino, K. Nakayama, and M. Seiki. 1996. Activation of a recombinant membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) by furin and its interaction with tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-2. *FEBS Lett.* 393:101-4.
- Sato, H., T. Takino, Y. Okada, J. Cao, A. Shinagawa, E. Yamamoto, and M. Seiki. 1994. A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells. *Nature.* 370:61-5.
- Sato, K., K. Yomogida, T. Wada, T. Yorihuzi, Y. Nishimune, N. Hosokawa, and K. Nagata. 2002. Type XXVI collagen, a new member of the collagen family, is specifically expressed in the testis and ovary. *J Biol Chem.* 277:37678-84.
- Schuppan, D., M.C. Cantaluppi, J. Becker, A. Veit, T. Bunte, D. Troyer, F. Schuppan, M. Schmid, R. Ackermann, and E.G. Hahn. 1990. Undulin, an extracellular matrix glycoprotein associated with collagen fibrils. *J Biol Chem.* 265:8823-32.
- Scott, I.C., I.L. Blitz, W.N. Pappano, Y. Imamura, T.G. Clark, B.M. Steiglit, C.L. Thomas, S.A. Maas, K. Takahara, K.W. Cho, and D.S. Greenspan. 1999. Mammalian BMP-1/Tolloid-related metalloproteinases, including novel family member mammalian Tolloid-like 2, have differential enzymatic activities and distributions of expression relevant to patterning and skeletogenesis. *Dev Biol.* 213:283-300.
- Scott, I.C., I.L. Blitz, W.N. Pappano, S.A. Maas, K.W. Cho, and D.S. Greenspan. 2001. Homologues of Twisted gastrulation are extracellular cofactors in antagonism of BMP signalling. *Nature.* 410:475-8.
- Scott, I.C., Y. Imamura, W.N. Pappano, J.M. Troedel, A.D. Recklies, P.J. Roughley, and D.S. Greenspan. 2000. Bone morphogenetic protein-1 processes perlecan. *J Biol Chem.* 275:30504-11.
- Seiki, M. 2003. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase: a key enzyme for tumor invasion. *Cancer Lett.* 194:1-11.
- Shaw, L.M., and B.R. Olsen. 1991. FACIT collagens: diverse molecular bridges in extracellular matrices. *Trends Biochem Sci.* 16:191-4.

- Shimell, M.J., E.L. Ferguson, S.R. Childs, and M.B. O'Connor. 1991. The *Drosophila* dorsal-ventral patterning gene *tolloid* is related to human bone morphogenetic protein 1. *Cell*. 67:469-81.
- Shimokomaki, M., D.W. Wright, M.H. Irwin, M. van der Rest, and R. Mayne. 1990. The structure and macromolecular organization of type IX collagen in cartilage. *Ann N Y Acad Sci*. 580:1-7.
- Shinomura, T., and K. Kimata. 1992. Proteoglycan-Lb, a small dermatan sulfate proteoglycan expressed in embryonic chick epiphyseal cartilage, is structurally related to osteoinductive factor. *J Biol Chem*. 267:1265-70.
- Smith, L.T., K.A. Holbrook, and J.A. Madri. 1986. Collagen types I, III, and V in human embryonic and fetal skin. *Am J Anat*. 175:507-21.
- Somerville, R.P., S.A. Oblander, and S.S. Apte. 2003. Matrix metalloproteinases: old dogs with new tricks. *Genome Biol*. 4:216.
- Sounni, N.E., A. Paye, L. Host, and A. Noel. 2011. MT-MMPS as Regulators of Vessel Stability Associated with Angiogenesis. *Front Pharmacol*. 2:111.
- St Croix, B., C. Rago, V. Velculescu, G. Traverso, K.E. Romans, E. Montgomery, A. Lal, G.J. Riggins, C. Lengauer, B. Vogelstein, and K.W. Kinzler. 2000. Genes expressed in human tumor endothelium. *Science*. 289:1197-202.
- Stanton, H., J. Gavrilovic, S.J. Atkinson, M.P. d'Ortho, K.M. Yamada, L. Zardi, and G. Murphy. 1998. The activation of ProMMP-2 (gelatinase A) by HT1080 fibrosarcoma cells is promoted by culture on a fibronectin substrate and is concomitant with an increase in processing of MT1-MMP (MMP-14) to a 45 kDa form. *J Cell Sci*. 111 (Pt 18):2789-98.
- Steiglitz, B.M., M. Ayala, K. Narayanan, A. George, and D.S. Greenspan. 2004. Bone morphogenetic protein-1/Tolloid-like proteinases process dentin matrix protein-1. *J Biol Chem*. 279:980-6.
- Steiglitz, B.M., D.R. Keene, and D.S. Greenspan. 2002. PCOLCE2 encodes a functional procollagen C-proteinase enhancer (PCPE2) that is a collagen-binding protein differing in distribution of expression and post-translational modification from the previously described PCPE1. *J Biol Chem*. 277:49820-30.
- Steiglitz, B.M., J.M. Kreider, E.P. Frankenburg, W.N. Pappano, G.G. Hoffman, J.A. Meganck, X. Liang, M. Hook, D.E. Birk, S.A. Goldstein, and D.S. Greenspan. 2006. Procollagen C proteinase enhancer 1 genes are important determinants of the mechanical properties and geometry of bone and the ultrastructure of connective tissues. *Mol Cell Biol*. 26:238-49.
- Stephan, S., M.J. Sherratt, N. Hodson, C.A. Shuttleworth, and C.M. Kielty. 2004. Expression and supramolecular assembly of recombinant alpha1(viii) and alpha2(viii) collagen homotrimers. *J Biol Chem*. 279:21469-77.
- Sterchi, E.E., W. Stocker, and J.S. Bond. 2008. Meprins, membrane-bound and secreted astacin metalloproteinases. *Mol Aspects Med*. 29:309-28.
- Sternlicht D, and Werb Z. 2001. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. 463-516 pp.
- Stramer, B.M., J.D. Zieske, J.C. Jung, J.S. Austin, and M.E. Fini. 2003. Molecular mechanisms controlling the fibrotic repair phenotype in cornea: implications for surgical outcomes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 44:4237-46.
- Strongin, A.Y., I. Collier, G. Bannikov, B.L. Marmar, G.A. Grant, and G.I. Goldberg. 1995. Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease. *J Biol Chem*. 270:5331-8.

- Sugrue, S.P., M.K. Gordon, J. Seyer, B. Dublet, M. van der Rest, and B.R. Olsen. 1989. Immunoidentification of type XII collagen in embryonic tissues. *J Cell Biol.* 109:939-45.
- Sundarraaj, N., D. Fite, R. Belak, S. Sundarraaj, J. Rada, S. Okamoto, and J. Hassell. 1998. Proteoglycan distribution during healing of corneal stromal wounds in chick. *Exp Eye Res.* 67:433-42.
- Suzuki, K., J. Saito, R. Yanai, N. Yamada, T. Chikama, K. Seki, and T. Nishida. 2003. Cell-matrix and cell-cell interactions during corneal epithelial wound healing. *Prog Retin Eye Res.* 22:113-33.
- Takahara, K., R. Brevard, G.G. Hoffman, N. Suzuki, and D.S. Greenspan. 1996. Characterization of a novel gene product (mammalian tolloid-like) with high sequence similarity to mammalian tolloid/bone morphogenetic protein-1. *Genomics.* 34:157-65.
- Takahara, K., E. Kessler, L. Biniaminov, M. Brusel, R.L. Eddy, S. Jani-Sait, T.B. Shows, and D.S. Greenspan. 1994a. Type I procollagen COOH-terminal proteinase enhancer protein: identification, primary structure, and chromosomal localization of the cognate human gene (PCOLCE). *J Biol Chem.* 269:26280-5.
- Takahara, K., G.E. Lyons, and D.S. Greenspan. 1994b. Bone morphogenetic protein-1 and a mammalian tolloid homologue (mTld) are encoded by alternatively spliced transcripts which are differentially expressed in some tissues. *J Biol Chem.* 269:32572-8.
- Tam, E.M., C.J. Morrison, Y.I. Wu, M.S. Stack, and C.M. Overall. 2004. Membrane protease proteomics: Isotope-coded affinity tag MS identification of undescribed MT1-matrix metalloproteinase substrates. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:6917-22.
- Tasheva, E.S., A. Koester, A.Q. Paulsen, A.S. Garrett, D.L. Boyle, H.J. Davidson, M. Song, N. Fox, and G.W. Conrad. 2002. Mimecan/osteoglycin-deficient mice have collagen fibril abnormalities. *Mol Vis.* 8:407-15.
- Timpl, R., and J.C. Brown. 1996. Supramolecular assembly of basement membranes. *Bioessays.* 18:123-32.
- Timpl, R., H. Wiedemann, V. van Delden, H. Furthmayr, and K. Kuhn. 1981. A network model for the organization of type IV collagen molecules in basement membranes. *Eur J Biochem.* 120:203-11.
- Toole, B.P., and R.L. Trelstad. 1971. Hyaluronate production and removal during corneal development in the chick. *Dev Biol.* 26:28-35.
- Toth, M., S. Hernandez-Barrantes, P. Osenkowski, M.M. Bernardo, D.C. Gervasi, Y. Shimura, O. Meroueh, L.P. Kotra, B.G. Galvez, A.G. Arroyo, S. Mobashery, and R. Fridman. 2002. Complex pattern of membrane type 1 matrix metalloproteinase shedding. Regulation by autocatalytic cells surface inactivation of active enzyme. *J Biol Chem.* 277:26340-50.
- Trelstad, R.L., and A.J. Coulombre. 1971. Morphogenesis of the collagenous stroma in the chick cornea. *J Cell Biol.* 50:840-58.
- Tsuchiya, S., J.P. Simmer, J.C. Hu, A.S. Richardson, F. Yamakoshi, and Y. Yamakoshi. 2011. Astacin proteases cleave dentin sialophosphoprotein (Dsp) to generate dentin phosphoprotein (Dpp). *J Bone Miner Res.* 26:220-8.
- Tsuzaki, M., M. Yamauchi, and A.J. Banes. 1993. Tendon collagens: extracellular matrix composition in shear stress and tensile components of flexor tendons. *Connect Tissue Res.* 29:141-52.
- Tzortzaki, E.G., J.A. Tischfield, A. Sahota, N.M. Siafakas, M.K. Gordon, and D.R. Gerecke. 2003. Expression of FACIT collagens XII and XIV during bleomycin-

- induced pulmonary fibrosis in mice. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.* 275:1073-80.
- Uekita, T., Y. Itoh, I. Yana, H. Ohno, and M. Seiki. 2001. Cytoplasmic tail-dependent internalization of membrane-type 1 matrix metalloproteinase is important for its invasion-promoting activity. *J Cell Biol.* 155:1345-56.
- Uitto, J. 1979. Collagen polymorphism: isolation and partial characterization of alpha 1(I)-trimer molecules in normal human skin. *Arch Biochem Biophys.* 192:371-9.
- Unsold, C., W.N. Pappano, Y. Imamura, B.M. Steiglit, and D.S. Greenspan. 2002. Biosynthetic processing of the pro-alpha 1(V)2pro-alpha 2(V) collagen heterotrimer by bone morphogenetic protein-1 and furin-like proprotein convertases. *J Biol Chem.* 277:5596-602.
- Uzel, M.I., I.C. Scott, H. Babakhanlou-Chase, A.H. Palamakumbura, W.N. Pappano, H.H. Hong, D.S. Greenspan, and P.C. Trackman. 2001. Multiple bone morphogenetic protein 1-related mammalian metalloproteinases process pro-lysyl oxidase at the correct physiological site and control lysyl oxidase activation in mouse embryo fibroblast cultures. *J Biol Chem.* 276:22537-43.
- van der Rest, M., B. Dublet, and M.F. Champliand. 1990. Fibril-associated collagens. *Biomaterials.* 11:28-31.
- Vandesompele, J., K. De Preter, F. Pattyn, B. Poppe, N. Van Roy, A. De Paepe, and F. Speleman. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3:RESEARCH0034.
- Veit, G., U. Hansen, D.R. Keene, P. Bruckner, R. Chiquet-Ehrismann, M. Chiquet, and M. Koch. 2006a. Collagen XII interacts with avian tenascin-X through its NC3 domain. *J Biol Chem.* 281:27461-70.
- Veit, G., B. Kobbe, D.R. Keene, M. Paulsson, M. Koch, and R. Wagener. 2006b. Collagen XXVIII, a novel von Willebrand factor A domain-containing protein with many imperfections in the collagenous domain. *J Biol Chem.* 281:3494-504.
- Veitch, D.P., P. Nokelainen, K.A. McGowan, T.T. Nguyen, N.E. Nguyen, R. Stephenson, W.N. Pappano, D.R. Keene, S.M. Spong, D.S. Greenspan, P.R. Findell, and M.P. Marinkovich. 2003. Mammalian tolloid metalloproteinase, and not matrix metalloprotease 2 or membrane type 1 metalloprotease, processes laminin-5 in keratinocytes and skin. *J Biol Chem.* 278:15661-8.
- Virtanen, I., K. Tervo, M. Korhonen, T. Paallysaho, and T. Tervo. 1992. Integrins as receptors for extracellular matrix proteins in human cornea. *Acta Ophthalmol Suppl:*18-21.
- von Marschall, Z., and L.W. Fisher. 2010. Dentin sialophosphoprotein (DSPP) is cleaved into its two natural dentin matrix products by three isoforms of bone morphogenetic protein-1 (BMP1). *Matrix Biol.* 29:295-303.
- von Marschall, Z., and L.W. Fisher. 2010a. Decorin is processed by three isoforms of bone morphogenetic protein-1 (BMP1). *Biochem Biophys Res Commun.* 391:1374-8.
- Walchli, C., M. Koch, M. Chiquet, B.F. Odermatt, and B. Trueb. 1994. Tissue-specific expression of the fibril-associated collagens XII and XIV. *J Cell Sci.* 107 (Pt 2):669-81.
- Walchli, C., J. Trueb, B. Kessler, K.H. Winterhalter, and B. Trueb. 1993. Complete primary structure of chicken collagen XIV. *Eur J Biochem.* 212:483-90.
- Watt, S.L., G.P. Lunstrum, A.M. McDonough, D.R. Keene, R.E. Burgeson, and N.P. Morris. 1992. Characterization of collagen types XII and XIV from fetal bovine cartilage. *J Biol Chem.* 267:20093-9.

- Wessel, H., S. Anderson, D. Fite, E. Halvas, J. Hempel, and N. SundarRaj. 1997. Type XII collagen contributes to diversities in human corneal and limbal extracellular matrices. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 38:2408-22.
- Whitcher, J.P., M. Srinivasan, and M.P. Upadhyay. 2001. Corneal blindness: a global perspective. *Bull World Health Organ.* 79:214-21.
- Whitelock, J.M., J. Melrose, and R.V. Iozzo. 2008. Diverse cell signaling events modulated by perlecan. *Biochemistry.* 47:11174-83.
- Wilson, S.E., J.J. Liu, and R.R. Mohan. 1999. Stromal-epithelial interactions in the cornea. *Prog Retin Eye Res.* 18:293-309.
- Wilson, S.E., R.R. Mohan, R.R. Mohan, R. Ambrosio, Jr., J. Hong, and J. Lee. 2001. The corneal wound healing response: cytokine-mediated interaction of the epithelium, stroma, and inflammatory cells. *Prog Retin Eye Res.* 20:625-37.
- Wiradajaja, F., T. DiTommaso, and I. Smyth. 2010. Basement membranes in development and disease. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 90:8-31.
- Woessner, J.F., Jr. 1962. Catabolism of collagen and non-collagen protein in the rat uterus during post-partum involution. *Biochem J.* 83:304-14.
- Wolfman, N.M., A.C. McPherron, W.N. Pappano, M.V. Davies, K. Song, K.N. Tomkinson, J.F. Wright, L. Zhao, S.M. Sebald, D.S. Greenspan, and S.J. Lee. 2003. Activation of latent myostatin by the BMP-1/tolloid family of metalloproteinases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:15842-6.
- Wozney, J.M., V. Rosen, A.J. Celeste, L.M. Mitsock, M.J. Whitters, R.W. Kriz, R.M. Hewick, and E.A. Wang. 1988. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science.* 242:1528-34.
- Wulle, K.G. 1972. Electron microscopy of the fetal development of the corneal endothelium and Descemet's membrane of the human eye. *Invest Ophthalmol.* 11:897-904.
- Xu, H., T.S. Acott, and M.K. Wirtz. 2000. Identification and expression of a novel type I procollagen C-proteinase enhancer protein gene from the glaucoma candidate region on 3q21-q24. *Genomics.* 66:264-73.
- Yamagata, M., K.M. Yamada, S.S. Yamada, T. Shinomura, H. Tanaka, Y. Nishida, M. Obara, and K. Kimata. 1991. The complete primary structure of type XII collagen shows a chimeric molecule with reiterated fibronectin type III motifs, von Willebrand factor A motifs, a domain homologous to a noncollagenous region of type IX collagen, and short collagenous domains with an Arg-Gly-Asp site. *J Cell Biol.* 115:209-21.
- Yamauchi, M., Y. Kuboki, S. Sasaki, and G.L. Mechanic. 1986. New pepsin-solubilized low molecular weight collagenous component possibly unique to periodontal ligament. *Biochemistry.* 25:1997-2002.
- Yana, I., and S.J. Weiss. 2000. Regulation of membrane type-1 matrix metalloproteinase activation by proprotein convertases. *Mol Biol Cell.* 11:2387-401.
- Young, B.B., M.K. Gordon, and D.E. Birk. 2000. Expression of type XIV collagen in developing chicken tendons: association with assembly and growth of collagen fibrils. *Dev Dyn.* 217:430-9.
- Young, B.B., G. Zhang, M. Koch, and D.E. Birk. 2002. The roles of types XII and XIV collagen in fibrillogenesis and matrix assembly in the developing cornea. *J Cell Biochem.* 87:208-20.
- Young, R.D., E.C. Gealy, M. Liles, B. Caterson, J.R. Ralphs, and A.J. Quantock. 2007. Keratan sulfate glycosaminoglycan and the association with collagen fibrils in rudimentary lamellae in the developing avian cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 48:3083-8.

- Zhang, G., S. Chen, S. Goldoni, B.W. Calder, H.C. Simpson, R.T. Owens, D.J. McQuillan, M.F. Young, R.V. Iozzo, and D.E. Birk. 2009. Genetic evidence for the coordinated regulation of collagen fibrillogenesis in the cornea by decorin and biglycan. *J Biol Chem.* 284:8888-97.
- Zhang, G., B.B. Young, and D.E. Birk. 2003. Differential expression of type XII collagen in developing chicken metatarsal tendons. *J Anat.* 202:411-20.
- Zieske, J.D., S.R. Guimaraes, and A.E. Hutcheon. 2001. Kinetics of keratocyte proliferation in response to epithelial debridement. *Exp Eye Res.* 72:33-9.

Vision constitutes an important element for our perception of the environment. Visual quality can be altered by loss of corneal transparency that can lead to corneal blindness. Loss of corneal transparency represents the 3rd cause of blindness worldwide according to World Health Organization. The only current curative treatment for this type of blindness is corneal transplantation. However, this treatment although satisfactory, faces many complications such as graft rejection. Thus, the purpose of this work was to study alternatives to corneal transplantation in the treatment of corneal opacities. The work consists of two major goals:

A therapeutic axis: This first aim concerns the evaluation of the effectiveness of the modulation of metalloproteinase activity in the resorption of corneal opacity. This project included the examination of the overexpression of the matrix metalloproteinase (MMP) 14 in *in vivo* mouse corneal scarring. The results showed a decrease of corneal opacity following over expression of MMP14 in the corneal stroma. This project also assessed the variation in the expression of Tolloid proteinases and their enhancers PCPEs (Procollagen C-Proteinase Enhancers) during *in vivo* corneal wound healing. We observed a significant increase in these proteinases following corneal incision. These observations suggest that these proteinases could play an important role in corneal matrix remodeling observed during wound healing.

A more fundamental axis: The purpose of this project was to investigate the implication of FACIT (Fibril Associated Collagens with Interrupted Triple helices) type XII and type XIV collagens in the establishment and maintenance of corneal opacity after injury. We observed an increase in expression of type XII collagen in the cornea after injury, more precisely where opacities persisted. This was demonstrated not only in human corneas, but also in a mouse corneal scarring model. Furthermore, the expression of type XII collagen changed according to the degree of corneal opacity. These results suggest that the type XII collagen molecule could be important in the development and the maintenance of corneal opacity after injury.

In conclusion, these projects have demonstrated a novel significance in the modulation of metalloproteinase activity in the resorption of corneal opacity and the implication of the FACIT type XII collagen in the maintenance of opacity after corneal trauma.

Key words: cornea, opacity, metalloproteinases, MMP, Tolloid, PCPE, FACIT

Auteur : Dawiyat MASSOUDI

Titre : *Approches thérapeutiques des opacités cornéennes par modulation de l'activité de protéinases de la matrice extracellulaire*

Directeurs de thèse : Pr François MALECAZE & Dr Stéphane GALIACY

Lieu et date de soutenance : Toulouse, le 09 septembre 2011

Résumé

Pour l'être vivant, la vision constitue un élément important pour la perception de l'environnement. Cette fonction peut être altérée par une perte de transparence de la cornée pouvant conduire à une cécité. Les cécités causées par une perte de transparence cornéenne constituent selon l'Organisation Mondiale de la Santé la 3^{ème} cause de cécité dans le monde après la cataracte et le glaucome. Le seul traitement curatif qui existe à l'heure actuelle pour ce type de cécité est la greffe de cornée. Ce traitement bien que satisfaisant demeure imparfait car il se heurte à de nombreuses complications telles que le rejet de greffe. De ce fait, ce travail vise à étudier des solutions alternatives aux greffes de cornée dans le cadre du traitement des opacités cornéennes et comporte deux axes :

Un axe thérapeutique qui évalue l'efficacité de protéinases dans la résorption de l'opacité cornéenne. Les études menées au cours de cette thèse ont montré que la surexpression de la MMP-14 par les kératocytes via un vecteur parvoviral induisait une diminution de la sévérité de l'opacité cornéenne installée après traumatisme. Une autre partie de ses travaux a également montré que les protéinases Tolloïdes et leurs activateurs PCPEs (Procollagen C-proteinase enhancer), protéines qui interviennent dans la maturation du collagène joueraient un rôle important dans la cicatrisation cornéenne notamment dans la régénération de la lame basale et pourraient ainsi constituer une cible thérapeutique pertinente.

Un axe plus fondamental qui porte sur l'étude de l'implication des collagènes de type XII et de type XIV dans la mise en place et le maintien de l'opacité cornéenne après blessure. Ces molécules font partie des collagènes FACIT (Fibril Associated Collagens with Interrupted Triple helices). Les investigations entreprises lors de cette étude ont montré que l'expression du collagène de type XII augmente au niveau de la cornée après un traumatisme. De manière intéressante, cet accroissement ne s'observe que dans les zones de la cornée où de l'opacité s'est installée. Cette remarque, d'abord effectuée chez l'homme s'avère également valable chez la souris. De plus, des analyses plus poussées de cette protéine réalisées chez la souris ont montré une expression qui varie en fonction du degré d'opacification de la cornée. En d'autres termes, plus l'opacité de la cornée est sévère, plus l'expression du collagène de type XII est importante. Ceci laisse donc supposer que cette molécule jouerait un rôle important dans le maintien de l'opacité au niveau de la cornée.

En conclusion, ce travail de thèse a permis de démontrer d'une part, l'intérêt de la modulation de métalloprotéinases dans la résorption de l'opacité cornéenne et d'autre part, l'implication du collagène FACIT de type XII dans le maintien de l'opacité mise en place après un traumatisme cornéen.

Mots clés : Cornée, opacité, métalloprotéinases, MMP, Tolloïdes, PCPE, FACIT

Discipline administrative : Physiopathologie

Intitulé et adresse du laboratoire : INSERM U1043 CHU Purpan, Place Baylac, Etage 5, Département génétique, équipe FM/PC, BP 3028, 31024 Toulouse cedex 03