

CAROLINE AUDET

**OPTIMISATION DES CONDITIONS DE CULTURE
DES CELLULES ENDOTHÉLIALES CORNÉENNES
FÉLINES POUR LA RECONSTRUCTION D'UN
ENDOTHÉLIUM CORNÉEN AUTOLOGUE**

Mémoire présenté
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval
dans le cadre du programme de maîtrise en Biologie cellulaire et moléculaire
pour l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

FACULTÉ DE MÉDECINE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

2010

RÉSUMÉ

Les cellules endothéliales cornéennes constituent un tissu à la fois extrêmement particulier et d'une importance singulière. En effet, celui-ci est pourvu d'une capacité régénératrice pratiquement nulle, mais son intégrité est essentielle à la transparence cornéenne et donc à la vision. Par contre, l'endothélium cornéen fait défaut dans diverses pathologies telles que la dystrophie de Fuch et la kératopathie bulleuse du pseudophaque. La méthode traditionnelle pour le remplacement d'un endothélium cornéen pathologique est la greffe de cornée pleine épaisseur. Par contre, la greffe lamellaire postérieure est une alternative chirurgicale en plein essor, très intéressante, puisqu'elle permet de remplacer seulement la portion malade de la cornée. Cette technique chirurgicale a ouvert la porte à une nouvelle possibilité au niveau du génie tissulaire. En effet, il est maintenant envisageable de greffer un endothélium produit en laboratoire. Un défi supplémentaire, que s'est imposé notre équipe, est de reconstruire non seulement un endothélium complet, mais d'en reconstruire un qui serait également autologue, l'immunogénicité jouant un rôle non négligeable lors d'échec de greffes.

Mon rôle dans ce projet était donc d'évaluer la faisabilité de reconstruire par génie tissulaire un endothélium cornéen autologue pour notre modèle animal, et ce, à des fins de greffes. D'abord en optimisant les conditions de culture afin de permettre la croissance des cellules endothéliales cornéennes animales. Puis en reconstruisant *in vitro* un endothélium à partir d'une biopsie cornéenne de taille minimale. Un endothélium sain similaire au tissu natif a ainsi été reconstruit.

AVANT-PROPOS

Parce que plusieurs cerveaux valent mieux qu'un seul, voici toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, au succès de mes études graduées.

Je tiens tout d'abord à remercier ma directrice de recherche, Dre Lucie Germain. Ce fût une réelle fierté de faire partie de votre équipe et de travailler sous votre supervision. Merci à vous et au Dr François A. Auger pour m'avoir ouvert les portes du Laboratoire d'Organogénèse Expérimentale (LOEX) du Centre de recherche FRSQ du CHA universitaire de Québec.

Je veux également remercier mes coéquipiers : Stéphanie Proulx, Patrick Carrier, Alexandre Deschambeault et Jeanne D'Arc Uwamaliya. Merci pour votre transfert de connaissances, votre expertise et vos bons mots d'encouragements. Merci de m'avoir laissé une liberté de penser et d'agir essentielle à mon épanouissement professionnel, tout en m'ayant offert un encadrement adéquat.

Un merci tout spécial pour l'appui et le soutien que j'ai eu de toute part-durant ces deux années, que ce soit de ma famille, mes amis ou collègues de travail. Je vous dois une fière chandelle.

Je tiens aussi à souligner la part des organismes subventionnaires pour leur soutien financier tout au long de mes études graduées, soit le Réseau de Recherche en Santé de la Vision du Fond de Recherche en Santé du Québec (FRSQ) et les Instituts de la Recherche en Santé du Canada (IRSC).

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	ii
AVANT-PROPOS	iii
TABLE DES MATIÈRES	iv
LISTE DES FIGURES	v
LISTE DES UNITÉS ET DES ABRÉVIATIONS	vii
CHAPITRE 1- Introduction	1
1.1. La cornée	1
1.1.1. Histologie de la cornée	3
1.1.1.1. L'épithélium	4
1.1.1.2. La membrane de Bowman	5
1.1.1.3. Le stroma	5
1.1.1.4. La membrane de Descemet	7
1.1.1.5. L'endothélium	8
1.1.1.5.1. La transparence cornéenne	10
1.1.1.5.2. Capacité régénératrice et activité cellulaire	12
1.1.1.5.3. Isolement et culture des cellules endothéliales cornéennes	13
1.1.1.5.3.1. Isolement	13
1.1.1.5.3.2. Agents promoteurs de la croissance des cellules endothéliales cornéennes	13
1.1.1.5.3.2.1. Sérum	14
1.1.1.5.3.2.2. Facteur de croissance fibroblastique	14
1.1.1.5.3.2.3. Facteur de croissance épithéliale	15
1.1.1.5.3.2.4. Sulfate de chondroïtine	15
1.1.1.5.3.2.5. Extrait pituitaire bovin	15
1.1.1.5.3.2.6. Facteur de croissance nerveuse	16
1.1.1.5.3.2.7. Acide ascorbique	16
1.1.1.5.3.2.8. Matrice extracellulaire	16
1.1.1.5.3.2.9. Transformation oncogène virale	17
1.1.1.5.4. Marqueurs de l'endothélium cornéen	18
1.1.1.5.4.1. ZO-1	18
1.1.1.5.4.2. Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	20
1.2. Causes de dommages à l'endothélium cornéen	21
1.2.1. La dystrophie endothéliale cornéenne de Fuch	22
1.2.2. La kératopathie bulleuse du pseudophaque	23
1.3. Traitements des pathologies de l'endothélium cornéen	25
1.3.1. Méthode traditionnelle: la kératoplastie pénétrante	26
1.3.2. Technologies en développement	27
1.3.2.1. En chirurgie: la kératoplastie endothéliale	27
1.3.2.1.1. Kératoplastie lamellaire postérieure	27
1.3.2.1.2. Kératoplastie endothéliale lamellaire profonde	28

1.3.2.1.3. Kératoplastie endothéliale avec détachement de la membrane de Descemet	28
1.3.2.1.4. Kératoplastie endothéliale avec détachement automatisée de la membrane de Descemet	29
1.3.2.2. En génie tissulaire et biomatériaux	29
1.3.2.2.1. Génie tissulaire	30
1.3.2.2.1.1. Sur stroma natif vivant	30
1.3.2.2.1.2. Sur membrane de gélatine	30
1.3.2.2.1.3. Sur stroma natif dévitalisé	31
1.3.2.2.1.4. Sur membrane de collagène	31
1.3.2.2.1.5. Sur membrane amniotique	32
1.3.2.2.1.6. Sur une surface de culture thermo-dépendante	32
1.3.2.2.2. Biomatériaux	32
1.4. Problématique	34
1.5. Objectifs de recherche	34
CHAPITRE 2- Optimisation des Conditions pour la culture in vitro de cellules endothéliales cornéennes félines	35
CHAPITRE 3- Discussion	65
3.1. Optimisation des conditions de culture	63
3.2. Culture d'un endothélium autologue	65
3.3. Retombées potentielles	67
3.4. Perspectives futures	68
CHAPITRE 4- Références	70

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1. Anatomie de l'œil	2
Figure 1.2. Histologie de la cornée	4
Figure 1.3. Organisation des kératocytes et des fibrilles de collagène dans le stroma cornéen	6

Figure 1.4. Aspect morphologique des cellules endothéliales cornéennes.....	8
Figure 1.6. Dystrophie endothéliale cornéenne de Fuch (FECD)	23
Figure 1.7. Kératopathie bulleuse du pseudophaque (PBK)	24
Figure 1.8. Étapes d'une greffe transfixiante	26
Figure 1.9. Procédure d'une greffe lamellaire postérieure	28
Figure 2.1. Effects of different additives on mean cell size, number and morphology of feline corneal endothelial cells (FCECs).	57
Figure 2.2. Effects of different concentration of serum and gelatin-coating on cell size, number and morphology of feline corneal endothelial cells (FCECs)..	58
Figure 2.3. Effects of combined additives in DMEM 10% FBS on cell size, number and morphology of feline corneal endothelial cells (FCECs)..	59
Figure 2.4. Effects of gelatin-coating and combined additives in DMEM 10% FBS on cell size, number and morphology of feline corneal endothelial cells (FCECs).....	60
Figure 2.5. Immunofluorescence staining with antibody anti-ZO-1 on feline corneal endothelial cells (FCECs).....	61
Figure 2.6. Culture of feline corneal endothelial cells (FCECs) isolated from a biopsy of 4.9mm ²	62

LISTE DES UNITÉS ET DES ABRÉVIATIONS

AA	Acide ascorbique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATPase	Adénosine triphosphatase
BPE	Extrait pituitaire bovin, [<i>bovine pituitary extract</i>]
CDK	Protéine kinase dépendante de la cycline, [<i>cyclin dependent kinase</i>]
CDKI	Inhibiteur de protéine kinase dépendante de la cycline, [<i>cyclin dependent kinase inhibitor</i>]
CDS	Chondroïtine sulfate
CEC	Cellules endothéliales cornéennes
DLEK	Kératoplastie endothéliale lamellaire profonde, [<i>deep lamellar endothelial keratoplasty</i>]
DSEAK	Kératoplastie endothéliale automatisée avec détachement de la membrane de Descemet, [<i>Descemet's stripping endothelial automated keratoplasty</i>]
DSEK	Kératoplastie endothéliale avec détachement de la membrane de Descemet, [<i>Descemet's stripping endothelial keratoplasty</i>]
ECM	Matrice extracellulaire, [<i>extracellular matrix</i>]
EDTA	Acide éthylène diamine-tétra-acétique, [<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>]
EGF	Facteur de croissance épithéliale, [<i>epithelial growth factor</i>]
EK	Kératoplastie endothéliale, [<i>endothelial keratoplasty</i>]
FECD	Dystrophie endothéliale cornéenne de Fuch, [<i>Fuchs' endothelial corneal dystrophy</i>]
FGF	Facteur de croissance fibroblastique, [<i>fibroblastic growth factor</i>]
GAGs	Glycosaminoglycanes
HCO ₃ ⁻	Ions bicarbonate
kDa	Kilo Daltons

LOEX	Laboratoire d'Organogénèse Expérimentale
mm	Millimètre
NGF	Facteur de croissance nerveuse, [<i>nerve growth factor</i>]
Na ⁺ /K ⁺	Sodium/potassium
PBK	Kératopathie bulleuse du pseudophake, [<i>pseudophakic bullous keratopathy</i>]
PK	Kératoplastie pénétrante, [<i>penetrating keratoplasty</i>]
PLK	Kératoplastie lamellaire postérieure, [<i>posterior lamellar keratoplasty</i>]
SV40	Virus simien 40, [<i>simian virus 40</i>]
ZO-1	<i>Zonulae occludens-1</i>
%	Pourcentage
°C	Degré Celsius
µm	Micromètre

CHAPITRE 1- Introduction

La première preuve directe des origines d'un œil primitif provient de fossiles découverts en Colombie-Britannique et datant d'environ 530 millions d'années [1]. L'œil a évolué afin de permettre la protection des constituants du globe oculaire, de même que les propriétés optiques adéquates nécessaires. Cette évolution oculaire semble être survenue à plus d'une reprise et indépendamment selon les espèces [2]. L'œil s'étant évidemment principalement développé dans un monde de lumière, les yeux sont associés au mouvement, à l'action. En effet, il est plus utile de courir, ramper, nager ou voler lorsque l'on voit où on va et plus facile lorsque l'on voit les obstacles qui s'y trouvent. De ce fait, les buts évolutifs de la vision sont tous liés aux faits de se nourrir, se reproduire et s'abriter [1].

Malheureusement, la vision n'est pas une richesse offerte à tous les humains. Globalement, on dénombre 314 millions de personnes souffrant d'un trouble de la vue, dont 45 millions d'entre eux sont aveugles. Pourtant 75 à 85% de ces troubles oculaires pourraient être traités [3]. Les troubles de l'opacité de la cornée comptent pour 9% des 45 millions de cas de non-voyance à travers le monde [4].

1.1. La cornée

La cornée est la partie la plus antérieure de l'œil (Figure 1.1), formant un sixième de sa tunique externe. La cornée est la barrière anatomique séparant l'œil interne de l'environnement extérieur. Grâce à cette position, la cornée est soumise à plusieurs types d'agressions, que ce soit mécaniques ou chimiques. Ainsi, au cours de l'évolution, la cornée a acquis des particularités telles qu'une composition matricielle singulière et une grande sensibilité nerveuse afin de résister aux dangers de l'environnement extérieur auxquels elle est constamment exposée [2, 5].

Contribuant à au moins 40 des 60 dioptries du pouvoir réfractif de l'œil, la principale fonction de la cornée demeure la réfraction de la lumière et sa focalisation sur la rétine [1, 2]. Néanmoins, d'autres particularités sont indispensables à l'accomplissement de cette fonction, telles que sa composition singulière qui en fait un tissu transparent d'une rigidité surprenante, et ce, malgré sa faible épaisseur [2, 5].

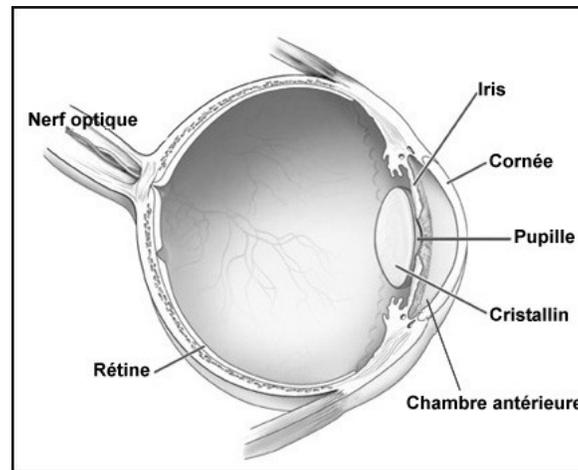


Figure 1.1. Anatomie de l'œil

La cornée est située à la face antérieure de l'œil. Sa face externe est en contact avec l'air environnant, et sa face interne, avec l'humeur aqueuse de la chambre antérieure.

(Modifiée du *National Eye Institute, National Institutes of Health*, 2009 [6])

Sa forme, plus ovale qu'arrondie, est déterminée par un diamètre moyen de 12 mm sensiblement plus long à l'horizontale qu'à la verticale; les valeurs moyennes étant respectivement de 12,6 mm par 11,7 mm. La cornée est aussi plus mince en son centre ($\approx 0,5$ mm) qu'en sa périphérie ($\approx 1,0$ mm) [2, 5, 7].

Tandis que le globe oculaire triple son volume de la naissance à l'âge adulte, la cornée, tant qu'à elle, n'augmente que très peu de taille. De fait, la cornée atteint sa taille définitive au cours des deux premières années de vie, avec un diamètre externe en moyenne à peine 2 mm plus large qu'à la naissance [2].

Puisque la cornée est un tissu avasculaire, l'humeur aqueuse contenue dans la chambre antérieure (Figure 1.1) représente la principale source de glucose, d'acides aminés, de vitamines et autres éléments nécessaires au métabolisme des cellules cornéennes. L'oxygène est le seul constituant métabolique à ne pas provenir de l'humeur aqueuse puisqu'il pénètre les différentes couches par diffusion à partir du film lacrymal qui recouvre l'épithélium. L'oxygène des larmes est en équilibre avec l'oxygène atmosphérique dont le contenu dans l'air s'élève à près de 21% [2].

1.1.1. Histologie de la cornée

La cornée peut être divisée en cinq différentes structures distinctes. De l'extérieur vers l'intérieur, on retrouve : l'épithélium, la membrane de Bowman, le stroma, la membrane de Descemet et l'endothélium (Figure 1.2).

Une deuxième zone peut être ajoutée à la cornée proprement dite; le limbe. Le limbe est la zone de transition d'environ 1 mm de large se situant entre la cornée et la sclère (portion blanche et opaque de la surface oculaire) et s'étendant sur tout le pourtour de la cornée. Cette partie diffère de la cornée par la présence de vaisseaux sanguins, lymphatiques et de cellules souches épithéliales [8, 9].

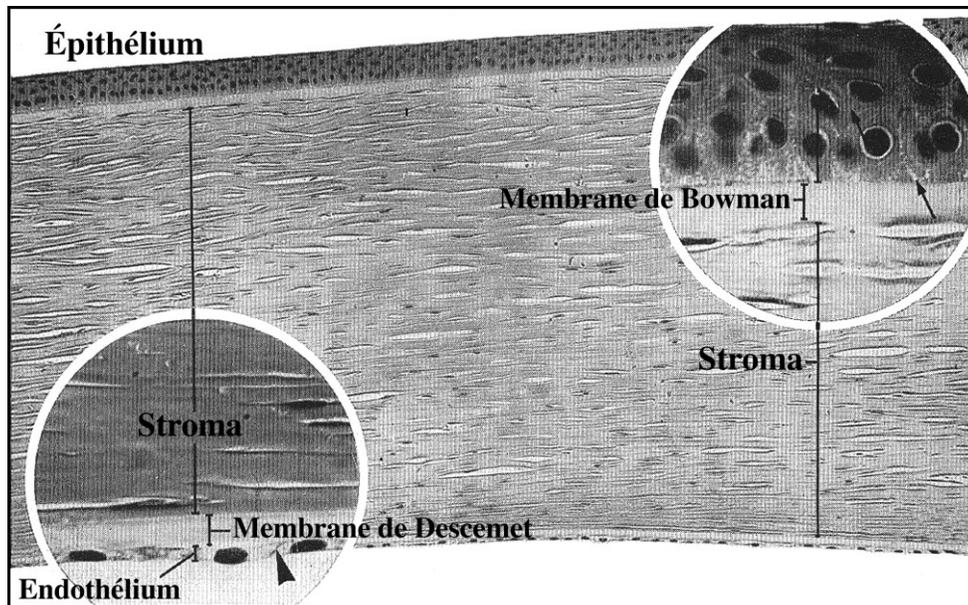


Figure 1.2. Histologie de la cornée

La cornée compte cinq parties distinctes. De l'extérieur vers l'intérieur : l'épithélium, la membrane de Bowman, le stroma, la membrane de Descemet et l'endothélium.

(Adaptée de Hogan, 1971 [5])

1.1.1.1. L'épithélium

Séparé de l'air environnant par le film lacrymal, l'épithélium cornéen est la couche cellulaire la plus externe de la cornée (Figure 1.2). Celui-ci occupe près de 10% de l'épaisseur cornéenne, puisqu'il mesure environ 50 μm [2, 5]. Il s'agit d'un épithélium pavimenteux stratifié non-kératinisé contenant de 4 à 6 couches cellulaires [2, 5, 7]. L'épithélium est particulièrement lisse et uniforme, tant à son épaisseur qu'à son arrangement [5]. Il est probablement le plus uniforme de tous les épithélia puisqu'il se doit, tout comme les autres couches cellulaires cornéennes, de permettre la réfraction adéquate des rayons lumineux; toute irrégularité épithéliale étant corrigée par le film lacrymal présent à sa surface [1, 5, 10].

Les cellules de l'épithélium se différencient de la base vers la superficie, les cellules basales sont donc les seules à entrer en mitose. Ces mêmes cellules sont fixées à la lame basale sous-jacente via des hémidesmosomes [2, 7]. Le réflexe de clignement et

le film lacrymal permettent une desquamation superficielle constante. L'épithélium cornéen doit donc se renouveler continuellement, et ce, aux sept jours [2, 5, 10]. Les cellules superficielles sont maintenues entre elles par des desmosomes et des jonctions serrées, ce qui procure à la fois une bonne stabilité mécanique et une résistance au flux intra-épithélial [2].

Les cellules épithéliales cornéennes se renouvellent grâce aux cellules souches retrouvées au niveau du limbe, *i.e.* à la jonction des épithélia de la cornée et de la conjonctive. Ces cellules semblent se loger dans un microenvironnement bien particulier, appelé niche, leur permettant de conserver leur état indifférencié [9, 11-13].

1.1.1.2. La membrane de Bowman

La membrane de Bowman sépare l'épithélium du stroma cornéen (Figure 1.2). Cette membrane acellulaire mesure de 8 à 14 μm et est principalement composée de collagènes – types I, III, V, VI et XII – distribués de façon aléatoire [1, 2, 5, 7, 14]. La membrane de Bowman a tendance à être bien développée chez les grands mammifères, moins chez les petits et à être pratiquement absente chez d'autres espèces tels les amphibiens [15]. Malgré qu'elle varie d'épaisseur d'une espèce à l'autre, cette membrane disparaît toujours au niveau du limbe [2, 5]. La membrane de Bowman est attachée au stroma sous-jacent par des fibrilles de collagène qui traversent perpendiculairement la membrane jusqu'au stroma antérieur [2, 16].

1.1.1.3. Le stroma

Le stroma cornéen se retrouve entre l'épithélium et l'endothélium de la cornée (Figure 1.2). Avec ses 500 μm d'épaisseur, le stroma représente la majeure partie de la cornée, soit 90% [1, 2, 5]. Il est principalement constitué de collagène, mais on y retrouve également des cellules, nommées kératocytes, qui occupent de 2 à 5% du volume du stroma [1, 2, 5].

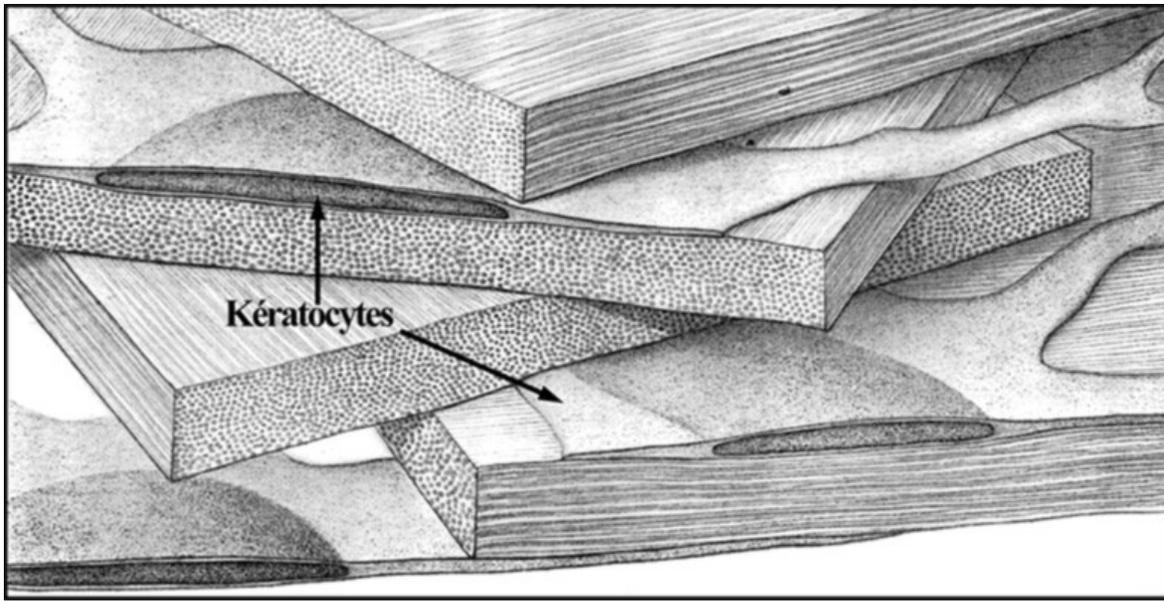


Figure 1.3. Organisation des kératocytes et des fibrilles de collagène dans le stroma cornéen

Sur toute l'épaisseur du stroma, les fibrilles de collagène sont arrangées en lamelles toutes orientées à un angle régulier entre elles. Les kératocytes se retrouvent entre les lamelles de collagène. (Adaptée de Hogan, 1971 [5])

Le collagène représente 71% du poids sec de la cornée; c'est la protéine structurale cornéenne responsable de la transparence (voir section 1.1.1.5.1) et de la résistance mécanique [2]. Les fibrilles de collagène sont organisées en lamelles (200 à 500) d'environ 2 μm d'épaisseur chacune et superposées à angles réguliers (Figure 1.3). À l'intérieur d'une même lamelle, les fibrilles sont parallèles, d'épaisseur uniforme, également espacées et traversent toute la surface cornéenne. Les fibrilles présentes à l'intérieur du stroma diffèrent du collagène habituellement retrouvé par l'uniformité de son diamètre et de son espacement [1, 2, 5, 16, 17]. Le collagène de type I est prédominant, mais on y retrouve également du type V et VI, XII et XIII [1, 2, 17-20]. Le collagène de la cornée est associé à des glycosaminoglycanes (GAGs); de façon prépondérante on retrouve le dermatane sulfate et le kératane sulfate. Ces GAGs, de même que la matrice extracellulaire dans laquelle le collagène baigne, sont étroitement associés au maintien de l'espacement régulier des fibrilles du stroma [1, 2, 17, 21-23].

Les kératocytes sont les cellules mésenchymateuses quiescentes du stroma cornéen. Ce sont des cellules larges et aplaties possédant de nombreux prolongements et retrouvées entre deux lamelles de collagènes (Figure 1.3) [1, 5, 16]. Durant le développement fœtal, les kératocytes produisent à la fois les fibrilles de collagène et la matrice extracellulaire. Par contre, une fois rendue à maturité, la quantité de matrice a largement dépassé le nombre de kératocytes par unité de volume [1, 5]. Leur rôle est alors de maintenir une activité synthétique constante afin de conserver l'intégrité de la matrice extracellulaire et des fibrilles de collagène, de même que leur alignement particulier [1, 2, 16]. Ces cellules peuvent également servir à la cicatrisation du stroma lors de blessures; à ce moment les kératocytes deviennent des fibroblastes possédant une activité mitotique permettant le recouvrement de la plaie [1, 2, 24-26]. Ce changement de phénotype permet la sécrétion d'un type de matrice extracellulaire différent de celui des kératocytes, et ce, tant en composition qu'en propriété de diffusion lumineuse [20, 27].

1.1.1.4. La membrane de Descemet

La membrane de Descemet se situe entre le stroma et l'endothélium cornéen (Figure 1.2). C'est une épaisse membrane acellulaire sécrétée par les cellules endothéliales depuis l'état fœtal et durant tout l'âge adulte. À la naissance, elle mesure de 3 à 4 μm d'épaisseur et augmente de taille tout au long de la vie à un rythme irrégulier pour atteindre environ 10-15 μm [1, 2, 5, 28, 29]. Sa fonction étant davantage structurale, elle agit comme une barrière résistante aux bris mécaniques [1, 30, 31].

La membrane de Descemet est faiblement attachée au stroma cornéen. En effet, aucun type d'attachement mécanique n'a pu être observé par microscopie électronique [2]. Tout comme la membrane de Bowman, la membrane de Descemet disparaît au niveau du limbe [5, 16]. Elle est constituée de plusieurs protéines incluant la fibronectine, des laminines, du collagène, de même que des protéoglycanes (sulfate d'héparane, sulfate de dermatane et sulfate de kératane) [1, 2, 32, 33]. Les principaux types de collagène retrouvés sont les types IV et VIII [2, 32, 33].

1.1.1.5. L'endothélium

À la face postérieure de la cornée et longeant la face de la chambre antérieure se trouve une couche de cellules aplaties; l'endothélium cornéen (Figure 1.2). Il s'agit d'une monocouche de cellules polygonales ($\approx 500\ 000$) mesurant environ $5\ \mu\text{m}$ d'épaisseur et de $18\ \text{à}\ 20\ \mu\text{m}$ de large (Figure 1.4). Une prédominance de cellules hexagonales est normalement observée [1, 2, 5, 34].

L'endothélium cornéen est particulier en ce sens où il est essentiellement amitotique après la naissance, il subit donc une diminution de densité avec l'âge [2, 35, 36]. L'endothélium cornéen possède de $3500\text{-}4000$ cellules/ mm^2 à la naissance, cette densité cellulaire diminue à un rythme de $0,3\ \text{à}\ 0,6\%$ par année pour atteindre, à l'âge adulte, une densité moyenne de 2000 cellules/ mm^2 [2, 32, 36, 37]. Heureusement, les cellules endothéliales cornéennes (CEC) ont la remarquable capacité de s'élargir, tout en maintenant leur attachement les unes aux autres, prévenant ainsi l'infiltration excessive d'humeur aqueuse dans le stroma. Un endothélium cornéen normal possède assez de cellules pour pallier cette perte endothéliale [2, 5]. Par contre, certaines situations pathologiques ou traumatiques peuvent engendrer une diminution critique du nombre de cellules endothéliales cornéennes.

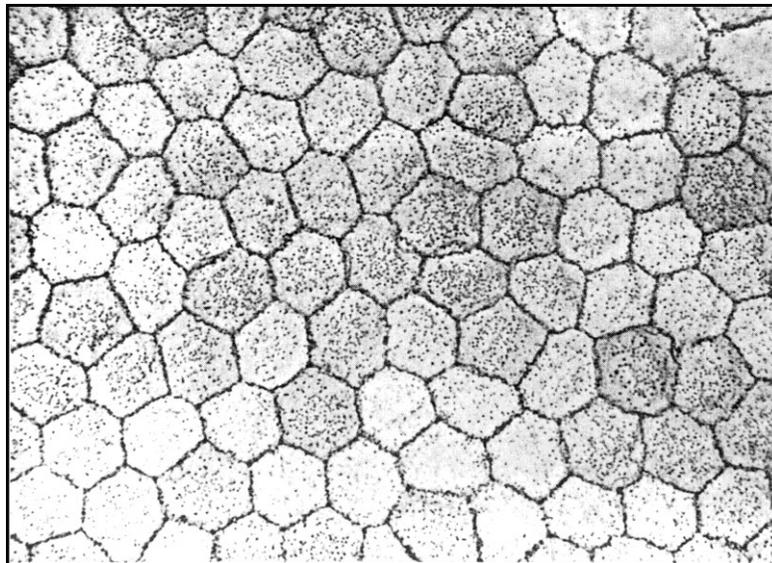


Figure 1.4. Aspect morphologique des cellules endothéliales cornéennes

(Modifiée de Hogan, 1971 [5])

Lorsque la densité cellulaire descend en deçà de 400-700 cellules/mm², les cellules restantes ont tendance à perdre leur aspect hexagonal caractéristique et à adopter une morphologie plus irrégulière tant en forme (pléomorphisme : diminution du pourcentage des cellules hexagonales) qu'en grosseur (polymégathisme : augmentation du coefficient de variation de la surface cellulaire moyenne) [1, 2]. Mais puisque la taille des cellules endothéliales est inversement proportionnelle à la densité cellulaire, la taille des cellules tend à augmenter avec l'âge, et davantage lors de pathologies ou de traumatismes [1, 2, 37]. La signification du pléomorphisme et du polymégathisme est inconnue, mais semble affecter la capacité d'adaptation de l'endothélium à un stress additionnel [1, 2].

De plus, il est important de mettre l'emphase sur le fait que l'endothélium cornéen est essentiel pour la fonction de la cornée. Puisque l'endothélium est en contact direct et constant avec l'humeur aqueuse, les cellules endothéliales ont été dotées de jonctions serrées à leur face apicale, formant ainsi une barrière semi-perméable [1, 5, 38]. Quelques jonctions adhérentes sont également présentes, par contre aucun desmosome n'y a été remarqué [5, 7]. Les jonctions serrées sont présentes mais de façon discontinue, de manière à permettre le passage de liquide et de molécules plus imposantes pour alimenter les cellules de la cornée en nutriments. Cela ne signifie pas qu'il n'y ait pas de mécanismes actifs de transport de certains de ces nutriments comme le glucose par exemple [2, 39, 40]. De plus, les membranes latérales des CEC sont pourvues d'un réseau complexe et tortueux d'interdigitations [1, 5, 7]. Ce réseau assez élaboré fait en sorte que la voie paracellulaire est environ dix fois plus grande que l'épaisseur de l'endothélium lui-même [2]. Ces particularités ont pour fonction d'assurer l'intégrité de la barrière semi-perméable qu'est l'endothélium cornéen en offrant une résistance accrue au flux paracellulaire, et prévenant ainsi une infiltration excessive de liquide à l'intérieur de la cornée qui entraînerait une modification de l'espacement des fibrilles de collagène essentiel à la transparence de la cornée [1, 23, 40].

Un réticulum endoplasmique rugueux bien développé et un grand nombre de mitochondries retrouvées à l'intérieur des CEC indiquent qu'elles sont métaboliquement très actives [1, 5, 40, 41]. La majorité de cette activité sert au pompage ionique transmembranaire. Ce mouvement d'ions de l'humeur aqueuse vers le stroma cornéen entraîne un mouvement liquidien consécutif en sens inverse. L'importance de ces pompes est visible lors d'une dysfonction ou d'une décompensation endothéliale. L'entrée passive de fluide par les espaces intercellulaires (fuite) n'est plus compensée alors par le mécanisme actif lors de la décompensation endothéliale. À ce moment, la cornée se gorge d'eau, épaisse et perd sa transparence caractéristique. L'activité intense de pompage ionique est donc essentielle pour compenser la semi-perméabilité de l'endothélium. Ce mécanisme de pompage du liquide hors du stroma s'effectue principalement via des pompes Na⁺/K⁺-ATPase situées sur la face basolatérale des CEC [23, 42-48].

La présence de cellules souches permettant à l'endothélium cornéen de se régénérer demeure un sujet de controverse [49-51]. Néanmoins, il semble qu'il y ait des cellules possédant un pouvoir de prolifération *in vitro* plus élevé que les autres. Selon plusieurs études effectuées chez l'humain, les CEC de la périphérie cornéenne possèdent, en culture, une activité mitotique supérieure aux cellules du centre et expriment différents marqueurs associés aux cellules souches ou aux cellules amplificatrices transitoires [52, 53].

1.1.1.5.1. La transparence cornéenne

Parce que la propriété de transparence de la cornée est essentielle au système optique et est directement liée à l'intégrité fonctionnelle de l'endothélium, cette particularité sera expliquée plus en détails.

L'endothélium cornéen est une monocouche de cellules fragiles, dont l'intégrité et la viabilité sont mises en péril lors de pathologies, procédures chirurgicales intraoculaires ou lors de traumatismes [1, 2]. Tant que les cellules peuvent s'élargir et maintenir

l'intégrité de la monocouche, la fonction cornéenne est assurée. En revanche, lorsque les CEC atteignent la densité minimale critique, celles-ci ne peuvent plus remplir leur fonction, entraînant un œdème cornéen et une éventuelle perte de vision (voir section 1.1.1.5).

L'uniformité du diamètre et de l'espacement entre les fibrilles de collagène est un élément crucial à la transparence et donc à la fonctionnalité de la cornée. La transparence de la cornée est directement reliée à la quantité de liquide qui s'y trouve. En effet, pour permettre une réfraction optique impeccable, l'espacement entre les fibrilles de collagène doit être régulier. Une augmentation de liquide à l'intérieur du stroma engendre une augmentation de l'espacement entre les fibrilles et change l'angle de réfraction de la lumière [1, 2, 5, 22, 40, 45].

Le collagène du stroma cornéen est associé à des GAGs. De façon prédominante, on retrouve le kératane sulfate et le dermatane sulfate [1, 21, 22]. Ces GAGs possèdent une charge nette fortement négative, ce qui a pour effet d'attirer les cations, principalement le Na^+ . La présence d'ions sodiques entraîne une entrée d'eau dans la matrice extracellulaire du stroma, augmentant ainsi l'espace entre les fibrilles de collagène. La quantité d'eau présente à l'intérieur du stroma doit être maintenue à un certain niveau pour que l'espacement demeure régulier et constant. Cependant, à cause de la quantité élevée de GAGs, le stroma cornéen a davantage tendance à accumuler un surplus de liquide, ce qui compromet sa transparence [1, 18, 47, 48]. Cette attraction qu'exerce à l'égard de l'eau le stroma cornéen combinée à la discontinuité des jonctions serrées de l'endothélium constitue la fuite. C'est à ce moment que l'endothélium intervient avec la forte activité de ses pompes Na^+/K^+ -ATPase permettant l'état de détumescence cornéenne indispensable à la transparence. Un déséquilibre entre les deux quantités vectorielles d'eau transportée entraîne un changement d'épaisseur et d'hydratation de la cornée qui peut alors perdre sa transparence.

D'autres particularités participent également à la transparence cornéenne. À l'état normal, la cornée est complètement dépourvue de vaisseaux sanguins. En conditions

pathologiques, la cornée peut devenir vascularisée, ce qui résulte en une diminution de sa transparence. Malgré son avascularité, il est surprenant de constater que la cornée est un des tissus les plus innervés de tout le corps humain [5, 54-56]. Cette innervation étendue et essentielle est rendue possible sans compromettre la transparence cornéenne grâce à la non-myélinisation des fibres nerveuses sensibles. En effet, les axones en provenance de la sclère perdent leur myélinisation juste à leur entrée dans le stroma cornéen où ils y sont exclusifs [5, 56].

1.1.1.5.2. Capacité régénératrice et activité cellulaire

L'intégrité structurale des CEC, pourtant essentielle à la transparence cornéenne, est confrontée à une problématique majeure tout au long de la vie: la perte endothéliale constante. Néanmoins, le fait que les CEC aient ou non une activité proliférative *in vivo* demeure, encore aujourd'hui, sujet de controverse.

Plusieurs ont prouvé que les CEC *in vivo* sont arrêtées en phase G₁ du cycle cellulaire [57-63]. La progression à travers le cycle cellulaire s'effectue sous le contrôle de protéines kinases dépendantes de cyclines (CDK). Leurs inhibiteurs, les CDKI (familles Ink4 et Cip/Kip), jouent un rôle *essentiel* dans l'arrêt du cycle cellulaire en phase G₁ [64]. En effet, de récentes études ont confirmé l'implication des CDKI telles que p16^{INK4a}, p21^{WAF1/CIP1} et p27^{KIP1} dans l'arrêt du cycle en G₁ par leur expression dans les CEC humaines [57, 61-63]. De plus, il a été rapporté qu'une guérison de blessure endothéliale s'effectue par migration et élargissement des cellules restantes [65-68].

Bref, cette activité proliférative *in vivo*, aussi négligeable qu'elle puisse être, résulte tout de même en une diminution de densité cellulaire avec l'âge [2, 32, 36] et ne suffit pas à maintenir l'intégrité structurale de la monocouche dans diverses situations pathologiques ou traumatiques [1, 2]. Il est donc davantage accepté de dire que les CEC ont une capacité proliférative grandement limitée *in vivo*. Toutefois, il est clairement possible de faire proliférer ces cellules *in vitro*, d'une manière dépassant largement leur état natif normal.

1.1.1.5.3. Isolement et culture des cellules endothéliales cornéennes

La difficulté de culture des CEC, qu'elles soient humaines ou animales, réside dans le fait que ce sont des cellules fragiles de nature amitotique. D'abord, l'isolement de cette monocouche doit se faire de manière minutieuse, une simple perturbation mécanique ou chimique peut entraîner le décollement et la mort des cellules. Dans un deuxième temps, la culture des CEC *in vitro* doit permettre leur réintégration dans le cycle cellulaire, sans pour autant modifier leur phénotype. Voilà un défi de taille que plusieurs ont tenté de relever, et ce, depuis plusieurs décennies. La culture des CEC *in vitro* demeure difficile, mais est désormais réalisable grâce au travail substantiel de nombreuses personnes à travers le monde.

1.1.1.5.3.1. Isolement

La culture des CEC a débuté à la fin des années vingt [69]. Néanmoins, la première culture pure de CEC remonte à 1958, lorsque Stocker [70] a découvert qu'il était possible de séparer par microdissection la membrane de Descemet, et l'endothélium qui y est adhérent, du stroma cornéen sous-jacent. Par contre, une fois la membrane de Descemet séparée, elle a tendance à s'enrouler sur elle-même, ce qui complique l'isolement des CEC. Les cellules sont d'abord isolées par explants [69, 71-75]. Puis, des méthodes de séparation enzymatique plus efficaces sont utilisées telles que la collagénase [76-79], la dispase [80, 81] ou les deux enzymes combinées [82]. Plus récemment, la technique la plus employée est la rupture des jonctions intercellulaires des CEC via un chélateur d'ions calcium, l'acide éthylène diamine-tétra-acétique (EDTA) [83-90]. Toutefois, aucune étude comparative entre ces différentes méthodes d'isolement cellulaire n'a été effectuée.

1.1.1.5.3.2. Agents promoteurs de la croissance des cellules endothéliales cornéennes

En plus de leur faible pouvoir mitotique exercé *in vitro*, il a été démontré qu'il se produisait un changement de phénotype des CEC lorsque les conditions de culture étaient sous-optimales. En effet, les CEC adoptent alors une morphologie de type fibroblastique et perdent leur inhibition de contact [77, 91, 92]. Avec les années, il a été démontré qu'il était possible, mais non moins ardu, de cultiver les CEC en laboratoire, tout en maintenant leur phénotype. Plusieurs méthodes ont été utilisées pour déterminer l'effet de divers promoteurs de croissance cellulaire sur les CEC que ce soit *in vitro*, *ex vivo*, sur une monocouche normale ou lors de cicatrisation endothéliale. Voici un bref résumé des principaux facteurs de croissance utilisés dans le présent et dans le passé de la culture des CEC.

1.1.1.5.3.2.1. Sérum

Le sérum est composé d'une variété de facteurs et éléments nutritifs nécessaires à l'adhésion, à la survie, mais aussi à la croissance des cellules en culture. Différentes études ont montré que le pourcentage de sérum utilisé dans le milieu de culture avait un effet dépendant de la dose sur la capacité proliférative des CEC. Le sérum à lui seul stimule plus la croissance des CEC que l'ajout de différents suppléments en absence de sérum [73, 76, 93].

1.1.1.5.3.2.2. Facteur de croissance fibroblastique

Le facteur de croissance fibroblastique (FGF) a été utilisé très tôt dans la croissance des CEC en culture, mais son utilisation est de moins en moins répandue. D'abord, le FGF et son récepteur ont tous deux été détectés dans la monocouche endothéliale et ailleurs dans la cornée [94]. Le FGF a un effet mitogène sur les CEC animales [81, 95, 96] et humaines [72, 91]. De plus, il pourrait aider à maintenir une morphologie endothéliale normale [95]. De façon contradictoire, d'autres études ont montré que le FGF n'aurait aucun effet positif autant sur la prolifération, la morphologie ou l'intégrité structurale de l'endothélium. En effet, selon certaines études, ce facteur

empêche la formation de jonctions intercellulaires avec une tendance à modifier le phénotype des CEC vers un état différencié (voir section 1.1.1.5.4.1) [75, 79, 92, 96-98].

1.1.1.5.3.2.3. Facteur de croissance épithéliale

Le facteur de croissance épithéliale (EGF) est probablement l'agent promoteur le plus utilisé pour la culture de CEC, et ce, peu importe qu'elles soient de nature humaine ou animale. L'EGF aurait un effet mitogène sur les CEC, lequel serait même plus puissant que celui du FGF [65, 81, 99]. La présence de récepteurs à l'EGF à la surface de l'endothélium humain (près de 40 000 récepteurs par cellule), de même que ses ARNm ont été décelés [94, 100, 101]. L'ajout d'EGF au milieu de culture des CEC semble stimuler la mitose des CEC en facilitant l'entrée en phase M du cycle cellulaire [72, 73, 93, 95, 98, 100, 102-105]. À faible concentration, l'EGF semble influencer le pouvoir de migration des CEC tout en leur permettant de conserver une morphologie endothéliale normale [104, 106]. L'EGF semble donc jouer un rôle non négligeable dans la croissance des CEC *in vitro*.

1.1.1.5.3.2.4. Sulfate de chondroïtine

Davantage utilisée pour la conservation, le sulfate de chondroïtine (CDS) est le seul protéoglycane ayant démontré certains effets positifs sur la culture des CEC. En effet, le CDS peut aider à promouvoir la prolifération, de même qu'à maintenir une morphologie normale des CEC en prévenant leur grossissement [75, 88, 91].

1.1.1.5.3.2.5. Extrait pituitaire bovin

L'extrait pituitaire (ou hypophysaire) bovin (BPE) est utilisé dans plusieurs milieux de culture sans sérum à cause de son effet fortement mitogène. Malgré que sa composition exacte soit variable et demeure inconnue, on sait qu'il contient une grande variété d'hormones, de facteurs de croissance tels que l'hormone de croissance et le FGF. En culture, certaines des protéines contenues dans le BPE auraient un effet de protection

contre le stress oxydatif [107]. Cet extrait glandulaire aurait également un effet prolifératif dépendant de la dose sur les CEC en culture. Par contre, à trop forte concentration, le BPE aurait plutôt un effet néfaste sur la culture des CEC en empêchant la formation de jonctions et en entraînant un changement de phénotype cellulaire [79, 93].

1.1.1.5.3.2.6. Facteur de croissance nerveuse

Le facteur de croissance nerveuse (NGF) est une neurotrophine essentielle au développement nerveux [108-110]. Puisque les CEC dérivent de cellules de la crête neurale [111, 112], le NGF aurait un effet potentiel sur ces cellules. De plus, le NGF et son récepteur de forte affinité, le TrkA, sont tous deux retrouvés dans les trois couches cellulaires cornéennes, principalement dans l'endothélium et l'épithélium [113, 114]. Quoique les études tendent à montrer que le NGF n'aurait aucun effet sur la prolifération des CEC, un effet positif sur la morphologie endothéliale est cependant remarqué [79, 88, 93, 115]. De plus, le NGF a été utilisé en thérapie génique et a montré des effets considérables sur la conservation des CEC *in vivo*. Lors de greffes cornéennes allogéniques animales, le NGF administré a grandement diminué la perte de CEC, de même que leur taux apoptotique [116].

1.1.1.5.3.2.7. Acide ascorbique

L'acide ascorbique (AA) est un facteur hydrosoluble retrouvé dans l'humeur aqueuse de l'œil. L'AA peut agir à titre d'antioxydant majeur de la chambre antérieure, protégeant les CEC contre les radicaux libres [117, 118]. En outre, des études ont démontré l'effet protecteur de l'AA lors d'exposition de l'endothélium cornéen à une solution ozonée ou lors de chirurgie intraoculaire [119-121]. En culture, une augmentation de la prolifération des CEC a également été observée en présence d'AA [78, 88].

1.1.1.5.3.2.8. Matrice extracellulaire

Depuis près de 30 ans, divers types de substrats d'adhérence (gélatine, collagène, fibronectine, sulfate de chondroïtine, matrice extracellulaire sécrétée) ont été utilisés pour promouvoir la croissance des CEC *in vitro* [72, 91, 122-127]. Ces substrats protéiques tentent de reproduire la membrane basale sur laquelle repose l'endothélium, et qui leur permet migration et étalement *in vivo*.

Le fait de cultiver les CEC sur une matrice extracellulaire (*ECM*) entraîne une prolifération cellulaire plus rapide [91, 95]. Ainsi, les CEC répondent mieux aux facteurs de croissance lorsqu'elles sont cultivées sur une matrice extracellulaire [95, 123, 124]. Cela dit, l'*ECM* peut réguler ou amplifier l'effet de facteurs de croissance en permettant leur séquestration ou leur libération contrôlée. L'*ECM* facilite également les interactions protéiques et la migration cellulaire [128-130]. La culture des CEC sur un substrat protéique leur permet de croître en monocouche, tout en conservant leur morphologie endothéliale typique [77, 95]. De plus, le type d'*ECM* sur laquelle les CEC croissent peut influencer leur morphologie. Il a été rapporté que les CEC cultivées sur une *ECM* de fibroblastes adoptent une forme plus allongée que les mêmes cellules cultivées sur une matrice sécrétée par des CEC, lesquelles sont davantage polygonales [131]. Bref, le fait d'ensemencer des CEC sur un revêtement protéique plutôt que sur du plastique influence grandement et positivement leur expansion et leur morphologie cellulaire.

1.1.1.5.3.2.9. Transformation oncogène virale

Puisque les CEC possèdent une faible capacité proliférative, il n'est possible de les cultiver *in vitro* que pendant quelques divisions cellulaires. Une façon d'obtenir suffisamment de CEC et de diminuer la variabilité entre les expériences est d'utiliser des CEC ayant été transformées par un oncogène viral. Plusieurs études ont su démontrer qu'il était possible d'induire la prolifération des CEC en culture en les transfectant avec un plasmide codant pour l'antigène T du virus simien 40 (SV40). Cet antigène perturbe les protéines du rétinoblastome et de p53, permettant la réintégration du cycle cellulaire [132-136]. Bien sûr, ces cellules immortalisées ne peuvent pas servir en clinique, mais elles peuvent s'avérer utile pour la construction et l'étude de modèles cornéens *in vitro* [122, 137].

1.1.1.5.4. Marqueurs de l'endothélium cornéen

Jusqu'à maintenant, aucun marqueur spécifique à l'endothélium cornéen n'a été découvert. Il est par contre possible de visualiser l'intégrité structurale de la monocouche, de même que sa fonctionnalité relative par immunodétection. Voici les principaux marqueurs utilisés.

1.1.1.5.4.1. ZO-1

À confluence et en monocouche, les CEC forment des jonctions serrées (aussi nommées *zonulae occludens*) avec les cellules adjacentes. Retrouvées à la face apicale des CEC, les jonctions serrées établissent la barrière entre l'humeur aqueuse et le stroma cornéen en restreignant les flux paracellulaires ionique et liquidien [38, 138]. Contrairement à celle des épithélia, cette barrière est discontinue et donc semi-perméable, ce qui permet le passage d'éléments nutritifs en provenance de l'humeur aqueuse [39, 43, 139-142].

La protéine majeure de la jonction serrée est la protéine transmembranaire occludine dont la portion cytosolique se lie aux trois protéines associées nommées *zonulae occludens* 1, 2 et 3 (ZO-1, ZO-2, ZO-3). Ces dernières sont situées sous la membrane plasmique, aux points de contacts cellule-cellule (Figure 1.5). ZO-1 est un composant essentiel à la formation de jonctions serrées [138, 143, 144]. D'un côté, il se lie à l'occludine et à ZO-2, tandis que de l'autre, il se lie aux filaments d'actine (Figure 1.5) [39, 43, 145-147]. L'apparition de ZO-1 à la membrane plasmique ne se fait qu'au moment de la formation d'une de ces jonctions [148]. L'occludine, tant qu'à elle, ne semble jouer le rôle que de stabilisateur [144, 149]. De plus, la présence d'occludine dans les jonctions serrées de l'endothélium cornéen n'a pas pu être confirmée jusqu'à présent [43].

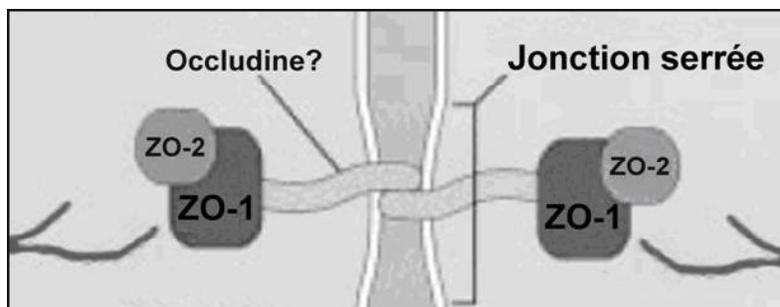


Figure 1.5. Schéma simplifié de l'organisation d'une jonction serrée dans l'endothélium cornéen (Modifiée de Petroll 1999 [43])

ZO-1 est une protéine de jonction dépendante du calcium [148]. Il a été démontré que l'utilisation d'un milieu faible en calcium ou d'un chélateur de ces ions tel que l'EDTA entraînait la relâche des jonctions serrées des CEC, créant ainsi un œdème [98, 141, 148, 150, 151]. ZO-1 semble être un élément ubiquitaire des jonctions serrées chez tous les mammifères. Son organisation spatiale dans le complexe de cette jonction semble également conservée à travers les espèces [43, 138]. Cette phosphoprotéine de 220 kDa semble donc jouer un rôle unique dans l'organisation et la régulation de jonctions serrées via le cytosquelette d'actine [138, 145, 149].

En plus de leur rôle de barrière, les jonctions serrées sont importantes pour créer et maintenir la polarité cellulaire. En effet, la dissociation de ces jonctions entraîne une modification du cytosquelette et une perte de la polarité basale/apicale [140, 142, 152]. De plus, ses caractéristiques fonctionnelles étant corrélées avec son aspect morphologique, l'absence de jonction serrée est associée à un changement de phénotype fibroblastique des CEC entraînant une perte de fonctionnalité de l'endothélium cornéen. [152, 153].

La barrière semi-perméable qu'est l'endothélium cornéen est donc rendue possible grâce aux nombreuses jonctions serrées retrouvées sur la face apicale des CEC. Par conséquent, une altération de ces jonctions affecterait la capacité des CEC à maintenir la cornée transparente [38, 138, 145, 149]. Par son caractère indispensable, ZO-1 est une protéine de choix pour confirmer ou infirmer l'intégrité des jonctions serrées.

C'est pour cette raison que la protéine ZO-1 est devenue un marqueur très répandu de l'intégrité structurale de l'endothélium cornéen.

1.1.1.5.4.2. Na⁺/K⁺-ATPase

Pour maintenir la cornée dans un état continu de détumescence, il est essentiel que la semi-perméabilité de l'endothélium soit compensée par une forte activité de pompage ionique. Ces pompes endothéliales permettent le transport actif des ions hors du stroma et, conséquemment, la sortie du liquide en excès. Ce pompage ionique des CEC permet une relâche moyenne de $6 \mu\text{l cm}^{-2} \text{h}^{-1}$, une quantité de liquide équivalente à ce qui traverse la barrière semi-perméable de l'endothélium [154]. C'est ainsi que la cornée peut conserver sa transparence.

Le mécanisme exact par lequel s'effectue ce transport fluide demeure sujet de controverse [42, 155-157]. Par contre, il est généralement accepté que les principaux intervenants soient les pompes sodium/potassium adénosine triphosphatase (Na⁺/K⁺-ATPase) retrouvés sur la face basolatérale de l'endothélium cornéen [45-48, 158-163]. La pompe Na⁺/K⁺-ATPase est un complexe protéique retrouvé principalement à la membrane plasmique et responsable de la régulation de la fonction de pompage ionique des CEC [164].

Dans une cornée normale, les concentrations de Na⁺ et de K⁺ sont plus élevées dans la matrice du stroma que dans l'humeur aqueuse. De ce fait, une cornée œdémateuse est une cornée dont les ions compris dans ces deux types de fluides sont en équilibre. Cela est dû à la charge négative des GAGs contenus dans le stroma. De plus, l'activité du sodium semble plus grande dans l'humeur aqueuse que dans le stroma de la cornée normale. Ainsi, le mécanisme de pompage de l'endothélium contribuerait à augmenter l'activité du sodium dans l'humeur aqueuse qui entraînerait un déplacement net d'eau vers l'humeur aqueuse [165].

Plusieurs études démontrent que le transport fluïdique est aboli en présence d'un inhibiteur spécifique, la ouabaïne, ou en absence des ions Na^+ ou K^+ dans le milieu de culture [45, 46, 161, 162]. Certains travaux ont également montré que ce transport était aboli en absence de bicarbonate (HCO_3^-) indiquant que les pompes sodium-potassium seraient dépendantes du bicarbonate [46, 162]. De plus, l'expression génique de plusieurs types de pompes sodium-potassium a été retrouvé dans les CEC humaines [44].

Les CEC animales peuvent posséder entre 1,0 à 4,0 X 10^6 pompes Na^+/K^+ -ATPase par cellule [147, 166, 167]. Une telle densité est comparable à celle retrouvée au niveau du tubule rénal, un tissu reconnu pour avoir un transport actif particulièrement développé [167]. De plus, lorsque la densité de CEC diminue, la quantité de pompes/ mm^2 diminue elle-aussi, tandis que la quantité de pompes/cellule augmente [127, 166]. D'ailleurs, une étude chez le lapin a démontré qu'après la naissance, l'apparition de la transparence de la cornée est associée à une densité accrue de pompes Na^+/K^+ -ATPase [147]. Il est également connu que les caractéristiques fonctionnelles de l'endothélium sont corrélées avec la morphologie des CEC. En effet, l'aspect polygonal de CEC *in vitro* est associé à une densité de pompes ioniques plus élevée [153].

Puisque la pompe Na^+/K^+ -ATPase est un élément critique au rôle physiologique de l'endothélium cornéen, la présence de cette enzyme est devenu un critère représentatif de la fonctionnalité des CEC.

1.2. Causes de dommages à l'endothélium cornéen

L'endothélium cornéen est une monocouche de cellules particulièrement fragiles. Celles-ci peuvent être endommagées à la suite d'une variété de phénomènes. Des traumatismes, des médicaments, des chirurgies intraoculaires (chirurgie de la cataracte), des maladies d'ordre oculaire (glaucome) ou d'ordre général (diabète) ou lors de dystrophies de l'endothélium cornéen (dystrophie de Fuch) [2, 40, 168-170].

1.2.1. La dystrophie endothéliale cornéenne de Fuch

Le premier cas reporté de dystrophie endothéliale cornéenne de Fuch (*FECD*) remonte au début du XX^e siècle. Cela est décrit comme un œdème épithélial et une opacité du stroma (Figure 1.6). Par contre, à ce moment, aucun moyen technologique ne pouvait permettre de voir les dommages de l'endothélium cornéen à l'origine de ces manifestations [2]. La *FECD* est la dystrophie endothéliale la plus commune [171, 172]. C'est une maladie familiale bilatérale dans laquelle la dégénérescence est graduelle, s'étalant sur 10 à 20 ans [40, 168, 172, 173].

Les manifestations cliniques de la *FECD* débutent plus souvent qu'autrement autour de 50-60 ans, par des excroissances de la membrane de Descemet nommées *guttae* (du latin; gouttes) qui sont sécrétées par les CEC et saillant dans la chambre antérieure. La dégénérescence cornéenne débute de façon centrale, mais s'étale peu à peu jusqu'au limbe. L'endothélium anormal étant alors incapable de maintenir la cornée en état de détumescence, cette dernière devient progressivement œdémateuse et une perte de l'acuité visuelle s'en résulte (Figure 1.6) [2, 40, 168, 172, 173].

Plus précisément, la *FECD* est caractérisée par des CEC anormalement élargies sécrétant une quantité anormale de constituants de la membrane de Descemet. On note également une diminution de la densité endothéliale, des jonctions intercellulaires dilatées entraînant une augmentation de la perméabilité endothéliale [40, 168, 172-174]. La visualisation de l'endothélium cornéen lors d'une *FECD* en microscopie électronique de même qu'en immunofluorescence a montré que les CEC subissaient des changements dystrophiques, telle qu'une forme de type fibroblastique, pour finalement devenir apoptotique [172-175]. La densité de pompes Na^+/K^+ -ATPase est également inférieure à la normale chez les endothélia souffrant d'une *FECD* [168, 172]. Dans les cas les plus graves, la dégénérescence atteint également l'épithélium [172].

La *FECD* est d'étiologie inconnue, mais il semble qu'elle soit causée par l'interaction de gènes et de facteurs environnementaux. Des mutations géniques ont été détectées chez les patients souffrant de *FECD*, par contre ces mutations s'avèrent être un des facteurs prédisposants plutôt que le facteur causal de la maladie [172].

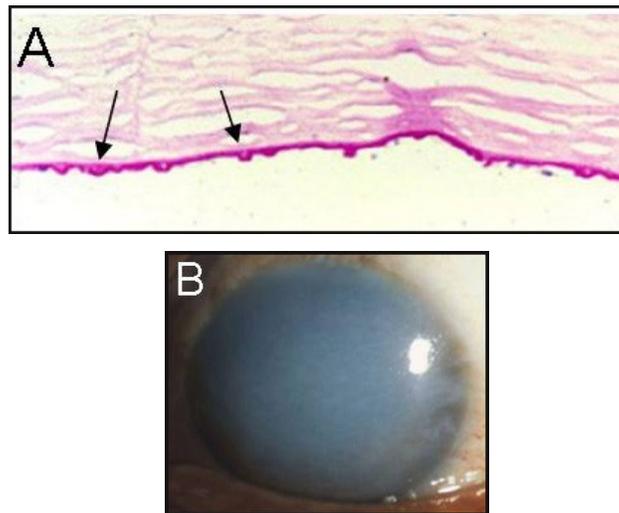


Figure 1.6. Dystrophie endothéliale cornéenne de Fuch (*FECD*)

Excroissances de la membrane de Descemet (A; flèches) et aspect macroscopique d'une cornée atteinte de *FECD*; perte de transparence causée par un œdème cornéen(B).

(Adaptée de Klintworth 2009 [172])

Pour les patients souffrant de *FECD*, le seul traitement possible est une greffe cornéenne, soit pleine épaisseur soit partielle, afin de remplacer la face postérieure pathologique [40]. Selon des études effectuées au Canada et aux États-Unis, la *FECD* compte respectivement pour 12,0% et 12,9% des kératoplasties pénétrantes effectuées entre 1996 et 2006 [171, 176].

1.2.2. La kératopathie bulleuse du pseudophaque

L'endothélium cornéen est composé de cellules très fragiles et une simple perturbation de leur état physiologique peut entraîner une perte massive de CEC, c'est ce que l'on appelle la décompensation endothéliale. Celle-ci est consécutive à un

traumatisme chirurgical tel que la déformation cornéenne, le contact direct avec l'endothélium ou la relâche de radicaux libres [177-180].

Une décompensation endothéliale peut se produire après une chirurgie de la cataracte avec insertion de lentille intraoculaire. La complication résultante est nommée la kératopathie bulleuse du pseudophaque (*PBK*) [181-184]. Celle-ci est caractérisée par un œdème cornéen chronique et une perte de transparence (Figure 1.7). L'œdème peut causer la formation de bulles à la surface oculaire, d'où le nom de la pathologie [181, 185]. La chirurgie de la cataracte avec insertion de lentille intraoculaire causerait des dommages sévères à l'endothélium cornéen, résultant en une décompensation cellulaire à long terme. La fonctionnalité de l'endothélium est alors réduite [181, 184, 185]. Il est également connu que les CEC lors d'une *PBK* ont une densité de pompes Na^+/K^+ -ATPase réduite par rapport à la normale [186].

L'étiologie de la *PBK* est multifactorielle, contenant des facteurs prédisposants préopératoires (dysfonction endothéliale), des facteurs opératoires (traumatisme endothélial, toxicité) de même que des facteurs post-opératoires (uvéïte, glaucome). L'instrumentalisation, le contact avec la lentille intraoculaire, les solutions de rinçage, le détachement de la membrane de Descemet et l'utilisation prolongée d'ultrasons lors de la phacoémulsification (destruction du cristallin lors de la chirurgie de la cataracte) peuvent également être en cause lors de décompensation endothéliale. Mais essentiellement, c'est le contact direct avec l'endothélium cornéen qui perturbe les CEC et mène à la décompensation. Les mécanismes exacts par laquelle cette décompensation survient demeurent incertains [183, 184, 187].

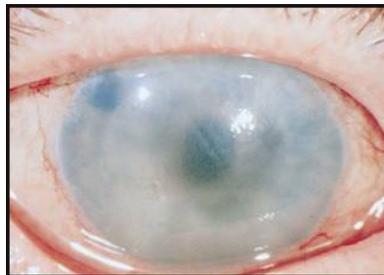


Figure 1.7. Kératopathie bulleuse du pseudophaque (*PBK*)

(Modifiée de Carlson 1998 [185])

Le seul traitement possible pour les patients souffrant de *PBK* est de remplacer l'endothélium cornéen pathologique. En effet, ceux-ci ne pourront retrouver la vision qu'après une kératoplastie, soit pénétrante soit partielle [40]. La modification de la technique chirurgicale, de la lentille intraoculaire et l'incorporation de solution viscoélastique a permis de réduire l'incidence de *PBK*.

Par contre, celle-ci demeure une complication de la greffe pleine épaisseur dans 19,4% des cas [183, 188, 189].

Depuis les années 70, la *PBK* demeure la principale cause de greffes cornéennes pénétrantes [171, 189-191]. Selon des études effectuées au Canada et aux États-Unis entre 1996 et 2004, la *PBK* compte respectivement pour 24,8% et 19,8% de toutes les kératoplasties effectuées [171, 190].

1.3. Traitements des pathologies de l'endothélium cornéen

Le nombre de transplantations cornéennes ne cesse d'augmenter avec les années. Aux États-Unis seulement, ce nombre est passé de 36 000 en 2000 à plus de 50 000 en 2008 [192, 193], les pathologies de la cornée postérieure comptant pour 33 à 50% de ces transplantations [194-196].

Il faut remonter à la fin du XIX^e siècle pour trouver les premières greffes de cornée répertoriées [197]. Avec les années, la méthode se perfectionne et, dans les années 50, on publie les succès courants de greffes visant notamment à rétablir la vision de patients souffrant de *FECD* [198]. La kératoplastie pénétrante est, depuis ce temps, la technique «*gold standard*» utilisée lors de transplantations cornéennes [178, 189, 191, 195, 196].

Lors de pathologies de l'endothélium cornéen, le seul traitement actuel possible est une greffe cornéenne afin de remplacer en totalité la partie postérieure de la cornée. Cette kératoplastie peut être pleine épaisseur (pénétrante) ou partielle (lamellaire postérieure), mais dans tous les cas, l'endothélium est remplacé par un tissu donneur allogénique [40].

1.3.1. Méthode traditionnelle: la kératoplastie pénétrante

La greffe de cornée pleine épaisseur (kératoplastie pénétrante; PK) est un remplacement complet de la cornée sur toute son épaisseur. La découpe de la cornée se fait en périphérie, celle-ci est retirée puis remplacée par une cornée provenant d'un donneur (Figure 1.8).

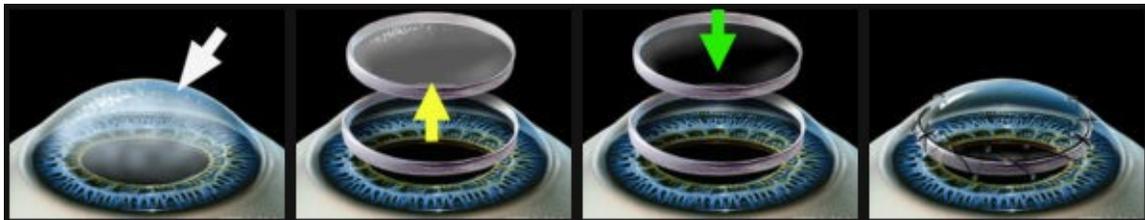


Figure 1.8. Étapes d'une greffe transfixiante

(Modifiée de Missouri Eye Institute [199])

Les désavantages de cette procédure incluent un temps de réhabilitation prolongé, un fort astigmatisme et des complications liées aux sutures [200-202]. De plus, la ré-innervation du stroma donneur est limitée et la stabilité de la plaie verticale demeure précaire, et ce, même des années après la chirurgie [203]. Les cornées ayant subi une perte de sensibilité sont plus sujettes aux traumatismes et la perte d'innervation cornéenne peut affecter les mécanismes de protection de la cornée [2]. Plus important encore, le traumatisme chirurgical engendré lors de PK peut entraîner une perte endothéliale à long terme pouvant atteindre 67% [178, 204].

1.3.2. Technologies en développement

Une PK implique évidemment une cornée donneuse saine dans toute son épaisseur, de l'épithélium à l'endothélium. La PK est donc complètement dépendante de la disponibilité ainsi que de la qualité des dons cornéens. D'ailleurs, ce nombre subit une forte chute en raison de la population vieillissante, mais également à cause du nombre accru de chirurgie réfractive [205, 206]. Une partie de la solution se trouve en la chirurgie restreinte à la partie pathologique, *i.e.* l'endothélium cornéen: la kératoplastie endothéliale (EK). Une alternative prometteuse à la greffe issue de dons de cornée est l'utilisation de substituts, fabriqués par bio-ingénierie ou à l'aide de biomatériaux.

1.3.2.1. En chirurgie: la kératoplastie endothéliale

L'EK est le remplacement de l'endothélium cornéen pathologique, de la membrane de Descemet adjacente et d'une partie du stroma profond. Cette procédure fut développée pour diminuer l'ampleur de la chirurgie dans les cas où la pathologie ne se limite qu'à la partie postérieure de la cornée.

1.3.2.1.1. Kératoplastie lamellaire postérieure

La première transplantation cornéenne partielle visant à remplacer l'endothélium pathologique fut d'abord nommé kératoplastie lamellaire postérieure (PLK) et a été introduite par Melles il y a un peu plus de dix ans. Cette technique permet de greffer une lamelle de la cornée postérieure, obtenue par dissection manuelle, comprenant le quart postérieur du stroma, la membrane de Descemet et son endothélium qui y est adhérent. Ce greffon est inséré dans la chambre antérieure receveuse par une petite incision cornéo-sclérale de quelques millimètres de large et maintenu en place par une bulle d'air permettant l'adhérence des tissus. De ce fait, aucune suture n'est nécessaire pour fixer le greffon (Figure 1.9) [207, 208].

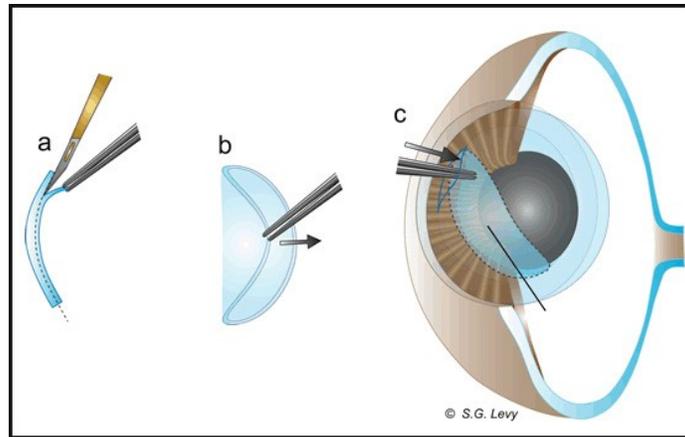


Figure 1.9. Procédure d'une greffe lamellaire postérieure

Dissection de la partie postérieure de la cornée donneuse (a), pliage du greffon (b) et insertion par incision cornéo-sclérale dans la chambre antérieure du receveur (c).

(Modifiée de la Société Canadienne d'Ophthalmologie [209])

1.3.2.1.2. Kératoplastie endothéliale lamellaire profonde

Par la suite, la technique de PLK a été modifiée par Terry et renommée kératoplastie endothéliale lamellaire profonde (DLEK) [203, 210]. En principe très semblable, la DLEK est une amélioration de la PLK principalement par des modifications apportées à la technique chirurgicale [203].

Cette technologie est intéressante puisqu'elle permet la préservation de la partie antérieure de la cornée du patient. La réhabilitation visuelle est donc plus rapide et le risque de complications post-opératoires est réduit (astigmatisme, cicatrisation, rejet) [210-215]. Par contre, cette technique ne permet pas l'amélioration de la perte endothéliale du greffon à long terme [180, 204]. Néanmoins, plus la technique chirurgicale se perfectionne, plus les chirurgiens prennent de l'expérience et plus la perte endothéliale post-opératoire est réduite [216, 217].

1.3.2.1.3. Kératoplastie endothéliale avec détachement de la membrane de Descemet

Encore plus récemment, la DLEK s'est raffinée pour devenir la kératoplastie endothéliale avec détachement de la membrane de Descemet (DSEK). Lors de la DSEK, il n'y a pas de dissection lamellaire de la cornée receveuse; seule la membrane de Descemet est retirée [218]. La DSEK est plus facile à exécuter que la DLEK, de plus la DSEK donne un greffon et une surface receveuse beaucoup plus lisse. Cela peut mener à une réhabilitation plus rapide, mais aussi à un déplacement du greffon [204, 210, 214].

1.3.2.1.4. Kératoplastie endothéliale avec détachement automatisée de la membrane de Descemet

La version la plus actuelle de la PLK est la kératopathie endothéliale automatisée avec détachement de la membrane de Descemet (DSEAK). Dans ce cas-ci, la dissection est automatisée par un instrument nommé microkératome. La coupe du greffon est donc franche et se fait en profondeur à l'intérieur du stroma cornéen à la limite de la membrane de Descemet.

Les avantages de la DSEAK reposent sur la coupe franche et lisse du greffon permettant une meilleure récupération post-opératoire comparée à la DSEK [219, 220]. De plus, l'acuité visuelle résultante est meilleure lors d'une DSEAK que lors d'une DLEK ou d'une PK et similaire à la DSEK. Par contre, la perte endothéliale est semblable peu importe la technique utilisée [204, 210, 221]. La DSEAK est ainsi devenue la procédure chirurgicale de choix lors de greffe de l'endothélium cornéen [201, 204, 214].

1.3.2.2. En génie tissulaire et biomatériaux

La plupart des maladies de la cornée sont traitées par des kératoplasties utilisant des tissus provenant de donneurs cadavériques. La production de substituts cornéens a

donc débuté afin de pallier la diminution de tissus humains donneurs aux complications telles le rejet immunitaire [222], ces substituts pouvant remplacer une cornée pathologique en partie ou en totalité.

1.3.2.2.1. Génie tissulaire

L'idée de transplanter un endothélium cornéen pathologique par un autre reconstruit *in vitro* remonte aux années 70 [223-225]. C'est Maurice qui a été le premier à proposer l'idée que des CEC cultivées en laboratoire pouvaient être utilisées pour remplacer un endothélium pathologique. La première tentative fut la transplantation de CEC par injection dans la chambre antérieure. Par contre, cette méthode a connu peu de succès, les cellules adhérant un peu partout [226, 227]. Un support pour l'endothélium reconstruit s'est alors révélé nécessaire. Depuis ce temps, plusieurs méthodes, plus ou moins fructueuses, ont été expérimentées chez les animaux. En voici quelques-unes.

1.3.2.2.1.1. Sur stroma natif vivant

Différentes équipes ont travaillé à l'ensemencement de CEC cultivées *in vitro* à la face postérieure de cornées fraîches dont l'endothélium natif avait été préalablement retiré de façon mécanique [223, 224, 228, 229]. Toutefois, ces cornées contenaient toujours les cellules natives des autres couches cellulaires (épithélium, stroma) et, parfois même quelques-unes de l'endothélium natif.

1.3.2.2.1.2. Sur membrane de gélatine

Le second support endothélial utilisé est la membrane de gélatine réticulée. Celle-ci mesurant entre 1 et 6 μm d'épaisseur, elle a les avantages chirurgicaux d'être flexible et résistante, mais possède également les avantages physiologiques de perméabilité et de transparence. Cette membrane permet donc la croissance des CEC *in vitro* et facilite la procédure de transplantation. *In vivo*, ces cornées sont demeurées claires et d'épaisseur

normale jusqu'au 7^e mois post-chirurgical et obtiennent un taux de succès avoisinant les 80% [224, 226].

L'analyse de ces endothélia reconstruits révèle une monocouche de cellules polygonales fortement active à en juger par le grand nombre de mitochondries et l'ampleur du réticulum endoplasmique rugueux intracellulaires. Par contre, on note une absence d'interdigitations des CEC, de même que la présence de cellules très allongées et en superposition. Néanmoins, ces dissimilitudes disparaissent après la transplantation; la monocouche devenant alors très semblable au tissu natif sain [230].

1.3.2.2.1.3. Sur stroma natif dévitalisé

Pour conserver les qualités d'un stroma natif tout en diminuant l'immunogénicité de celui-ci, différentes équipes ont utilisé des stromas natifs dévitalisés. En effet, il est possible de dévitaliser une cornée par un ou plusieurs cycles de gel-dégel [86, 92, 97]. De plus, cela permet la conservation de la membrane de Descemet. Les CEC adhèrent aisément et rapidement *in vitro* à leur substrat naturel, et ce, même en absence de sérum. Dans un deuxième temps, les cellules s'organisent en monocouche de façon similaire à ce qui est retrouvé *in vivo* [123, 229, 231]. La transplantation de ce tissu reconstruit permet une diminution de l'épaisseur cornéenne et une amélioration de la transparence [83, 87, 229].

1.3.2.2.1.4. Sur membrane de collagène

Des CEC animales et humaines ont été cultivées sur une membrane de collagène de type I, réticulé ou non, puis transplantées directement sur la membrane de Descemet. Ces membranes ont facilement adhéré l'une à l'autre et la cornée, initialement oedémateuse et opaque, s'est amincie et est peu à peu devenue translucide. L'endothélium transplanté était de forte densité cellulaire et a maintenu la cornée claire jusqu'au 6^e mois post-opératoire [232, 233].

1.3.2.2.1.5. Sur membrane amniotique

Déjà très utilisée en chirurgie, la membrane amniotique est un choix intéressant de support pour la greffe de CEC [234, 235]. Des CEC, humaines ou animales, peuvent être cultivées sur une membrane amniotique, puis transplantées à la surface postérieure d'une cornée dénudée de sa membrane de Descemet. Les feuillets de CEC ainsi transplantés se retrouvent, au 7^e jour post-opératoire, formés d'une monocouche de cellules, de morphologie typique, possédant de nombreuses organelles et présentant un réseau complexe de jonctions intercellulaires. L'œdème commence à diminuer 6 à 12 heures après la transplantation et les cornées greffées demeurent transparentes durant au moins 4 à 6 semaines. Par contre, la transparence peut être altérée comparativement au tissu natif sain, puisque la membrane amniotique ne semble pas se dégrader en cornée postérieure [80, 236].

1.3.2.2.1.6. Sur une surface de culture thermo-sensible

Il est possible de produire des feuillets de CEC humaines *in vitro* sur une surface de culture dont les propriétés d'adhésion varient selon la température. Ce composé permet l'adhérence et la croissance des CEC à une température de 37°C, mais les CEC se détachent en un feuillet unique lorsque la température descend au-dessous de 32°C. Cette technologie permet de contourner la culture des CEC sur un support pour des fins de greffes. En effet, les jonctions intercellulaires, de même que l'accumulation d'une membrane basale sécrétée par les CEC *in vitro*, permettent le maintien intact de la monocouche [237, 238]. Le feuillet ainsi recueilli peut être transplanté à la face postérieure d'un bouton stromal dont la membrane de Descemet a été préalablement retirée. Le tissu reconstruit adhère en quelques minutes seulement à la face postérieure de la cornée. L'endothélium résultant est semblable au tissu natif sain tant en morphologie qu'en fonctionnalité [127, 239]. En revanche, ce feuillet reconstruit est très mince et fragile, ce qui le rend difficilement manipulable.

1.3.2.2.2. Biomatériaux

Les substituts cornéens reconstruits par génie tissulaire sont conçus pour remplacer entièrement une cornée devenue opaque et constituent une alternative intéressante au tissu cornéen naturel [240]. Les principaux biomatériaux utilisés pour la formation de substituts cornéens sont les hydrogels. Ceux-ci sont des polymères hydrophiliques réticulés pouvant incorporer de grande quantité de liquide et avoir des caractéristiques physiques semblables aux tissus mous. Ils sont également fortement biocompatibles et perméables [241].

Malgré que plusieurs équipes [242-244] travaillent sur la fabrication d'hydrogels en tant que substituts cornéens, les progrès les plus significatifs ont été effectués par l'équipe de Griffith. En effet, d'impressionnants résultats *in vivo* ont été obtenus à l'aide d'un hydrogel copolymérique à base de collagène. La matrice bioartificielle est conçue pour être éventuellement remplacée par le stroma naturel subséquent à l'invasion des kératocytes. Chez le modèle porcin, ce biomatériau permet la régénération épithéliale, stromale et nerveuse [245-247]. Par contre, une importante réaction inflammatoire a lieu une dizaine de jours après l'implantation et semble perdurer durant les deux premiers mois, affectant ainsi la transparence [248]. Ce projet est présentement rendu en essais cliniques pour l'utilisation humaine.

1.4. Problématique

À l'heure actuelle, la kératoplastie (d'épaisseur complète ou partielle) est le seul traitement pouvant permettre le rétablissement de la vision lors de trouble de l'endothélium cornéen [26]. Le pouvoir de redonner la vue aux 4 à 5 millions de personnes non-voyantes en raison d'une opacification cornéenne repose donc sur le don d'organes [249]. Dans un futur assez rapproché, plusieurs facteurs pourraient rendre la situation actuellement précaire encore plus problématique. Il n'y a qu'à penser au vieillissement de la population et à la diminution du nombre de donneurs potentiels de cornées, notamment causée par la hausse de chirurgies oculaires réfractives rendant les cornées impropres au don [205, 206]. De plus, le rejet immunitaire est une complication importante pouvant entraîner jusqu'à 28% des échecs de greffes à long terme [178, 211, 250]. Toutes ces raisons renvoient à un besoin urgent de trouver une alternative pour les millions de personnes en attente d'une greffe de cornées.

1.5. Objectifs de recherche

La présente étude porte sur la reconstruction d'un endothélium cornéen autologue. Afin de supporter la perte endothéliale due à la chirurgie, le tissu reconstruit devrait être de forte densité cellulaire tout en maintenant les caractéristiques structurelles et fonctionnelles de l'endothélium cornéen natif. Le modèle animal félin a été choisi pour cette étude.

Les objectifs spécifiques sont, en premier lieu, de déterminer les conditions de culture optimales permettant une forte croissance cellulaire, une morphologie cellulaire typique et une intégrité structurelle de l'endothélium félin reconstruit et, en deuxième lieu, de déterminer la taille minimale d'une biopsie pouvant permettre la reconstruction d'un endothélium cornéen complet et sain.

CHAPITRE 2- Optimisation des Conditions pour la culture *in vitro* de cellules endothéliales cornéennes félines

Contributions:

J'ai participé à la conception et à la réalisation de toutes les expériences sur l'optimisation des conditions de culture des cellules endothéliales cornéennes félines, de même que celles portant sur la détermination de la taille minimale d'une biopsie pour la culture d'un endothélium cornéen autologue. J'ai également rédigé l'entièreté de ce mémoire sous la supervision de Stéphanie Proulx et de ma directrice de recherche, Dre Lucie Germain. Stéphanie Proulx et Patrick Carrier ont participé à la conception des expériences, de même qu'à la révision de l'article. Le travail d'Alexandre Deschambeault et de Jeanne d'Arc Uwamaliya a également contribué au succès de ces expériences. Cette étude a été rendue possible grâce à notre collaboration avec Dre Isabelle Brunette.

Résumé:

But: Optimiser les conditions de culture des cellules endothéliales cornéennes félines (CECFs) et déterminer la taille minimale d'une biopsie cornéenne postérieure afin d'initier une culture *in vitro*.

Méthodes: Le nombre, la taille et la morphologie cellulaires ont été évalués sur des CECFs en utilisant différentes conditions de culture. Les CECFs ont été cultivées à un faible pourcentage de sérum, seul ou en combinaison avec le facteur de croissance épithéliale (EGF), le facteur de croissance nerveuse (NGF), l'extrait pituitaire bovin (BPE), le sulfate de chondroïtine (CDS) ou l'acide ascorbique (AA). Les CECFs ont été cultivées dans 10 ou 20% de sérum sur un support de plastique ou de gélatine. Puis, les conditions optimales ont été combinées. Finalement, différentes tailles de biopsies (1,8 à 12,6 mm²) ont été utilisées pour isoler et cultiver les CECFs dans des conditions de

croissance optimale, et ce, sur trois passages afin d'évaluer la plus petite taille de biopsie adéquate.

Résultats: La culture des CECFs dans 10% de sérum a induit la croissance de petites cellules endothéliales. L'augmentation du pourcentage de sérum à 20% a provoqué une prolifération plus soutenue, mais a été associée à une perte de morphologie typique vers un état fibroblastique. Le milieu de culture additionné de faibles concentrations d'EGF a permis la préservation de la morphologie endothéliale typique. L'addition de BPE entraîne l'augmentation de la prolifération de ces cellules. Aucun changement n'a été observé au niveau de la morphologie ou du dénombrement cellulaire lorsque cultivées en présence de NGF, CDS, ou AA. Comparativement au plastique, les CECFs ont maintenu un aspect polygonal et ont proliféré davantage lorsque cultivées sur gélatine. Les CECFs isolées à partir d'une biopsie supérieure ou égale à 4,9 mm² et cultivées dans les conditions de culture optimales ont permis la formation d'un endothélium de forte densité cellulaire tout en maintenant les caractéristiques morphologiques retrouvées *in vivo*.

Conclusions: Les conditions de culture optimales des CECFs ont permis la croissance d'une monocouche de petites cellules polygonales. Nos résultats montrent que le nombre de cellules endothéliales isolées d'une biopsie de 4,9 mm² est suffisant pour la reconstruction d'un endothélium *in vitro*. Les résultats sont présentés dans le contexte de la reconstruction d'un endothélium autologue par génie tissulaire.

Title: Optimization of the conditions for culturing feline corneal endothelial cells in vitro

Authors: Caroline Audet¹, Stéphanie Proulx¹, Jeanne D'Arc Uwamaliya¹, Alexandre Deschambeault¹, Patrick Carrier¹, Isabelle Brunette², François A. Auger¹, Lucie Germain¹

Affiliations: ¹Laboratoire d'Organogénèse Expérimentale (LOEX), Centre de recherche FRSQ du CHA universitaire de Québec, Québec, Québec, Canada and Départements de Chirurgie et d'Oto-Rhino-Laryngologie, Université Laval, Québec, Québec, Canada; ²Unité de Recherche Ophtalmologique, Département d'Ophtalmologie, Hôpital Maisonneuve-Rosemont, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

Correspondence: Dr. Lucie Germain, LOEX, Centre de recherche FRSQ du CHA universitaire de Québec, Hôpital du Saint-Sacrement, 1050 chemin Sainte-Foy, Québec (Québec), Canada, G1S 4L8; Phone: (418) 682-7696; FAX: (418) 682-8000; email: lucie.germain@chg.ulaval.ca

Short title : Feline endothelial cell culture

Keywords : corneal endothelium, feline, culture, cat

Word count : 5,920

Abstract:

Purpose: To optimize the culture conditions for optimal growth of feline corneal endothelial cells (FCECs) and to determine the minimal size of a posterior feline corneal biopsy to initiate a culture in vitro.

Methods: Cell number, size and morphology were assessed on FCECs cultured using various culture conditions and growth supplements. FCECs were cultured in low serum in the presence of (alone or in combination) epidermal growth factor (EGF), nerve growth factor (NGF), bovine pituitary extract (BPE), chondroitin sulfate (CDS), ascorbic acid (AA). FCECs were also cultured in 10 or 20% serum either on plastic or on gelatin-coated plates. Then, the optimal conditions were combined. Finally, different sizes of biopsy punches (1.8 to 12.6 mm²) were used to isolate and culture FCECs in optimal growth conditions over three passages in order to evaluate the smallest biopsy size.

Results: The culture of FCECs in 10% serum induced the growth of small-sized cells. The increase in up to 20% serum provoked a more sustained proliferation, but was associated with the loss of typical morphology, the cells becoming fibroblastic-like. The culture medium supplemented with low concentrations of EGF helped preserve typical morphology of corneal endothelial cells. The addition of BPE increased proliferation of FCECs. No change was observed on cell morphology or cell number when cultured in the presence of NGF, CDS or AA. Compared to plastic, FCECs maintained a small polygonal cell shape and increased their growth rate when cultured on gelatin-coated wells. The FCECs isolated from a 4.9 mm² biopsy or larger and cultured in optimal conditions resulted in a high density endothelium at passage two, while maintaining the characteristic cell morphology.

Conclusions: The optimized FCECs culture conditions allow the sustained growth of a monolayer of polygonal-shaped cells. Our results show that the number of endothelial cells harvested from a 4.9 mm² biopsy is sufficient for the eventual production of reconstructed endothelium in vitro. The results are discussed in the context of the production of an autologous tissue-engineered endothelium.

INTRODUCTION

Corneal endothelial cells (CECs) form a monolayer of small and polygonal-shaped cells at the posterior face of the cornea. The semi-permeable barrier they are forming plays an essential role in the maintenance of vision. The structural integrity of this barrier necessitates tight junctions [1]. These junctions are located at the apical side of the cells and usually characterized by the presence of their associated protein ZO-1 [2]. The functionality of the endothelial barrier is principally due to intense activity of Na^+/K^+ -ATPase ionic pumps. Therefore, CECs pump the excess liquid out of the stroma, allowing the cornea to be thin and transparent. Human CECs are peculiar in the way they normally have no proliferative capacity *in vivo* because they are arrested in G_1 phase of the cell cycle [3, 4]. This becomes dramatic in some situations, like in corneal endothelial dystrophies [5, 6], diseases [5, 7] or surgical intervention [5, 8], where the CEC loss is so important that the remaining cells cannot maintain corneal deturgescence, provoking a stromal edema and a loss of visual acuity. In this case, the only possible treatment for restoring vision is corneal transplantation.

For many years, researchers have worked on the replacement of a diseased or damaged endothelium by an healthy one cultured *in vitro* [9]. The ideal point being to reconstruct and to transplant a functional tissue-engineered autologous endothelium, resolving the problems of the increasing need of corneas for endothelial keratoplasty procedures [10] and the rejection of corneal allografts [11-13].

Even though the corneal endothelium is non-regenerative *in vivo*, CECs retain growth capacity and can proliferate *in vitro* [14]. However culture conditions must be optimized to prevent the loss of CECs typical morphology occurring when CECs proliferate under suboptimal culture conditions [15]. Previous studies have described the optimization of culture conditions for CECs from human [16-19] and several animal species that, in contrast with humans, do not have a limited proliferative capacity [20, 21]. It has been shown that supplementing the media with various growth factors helps the growth of CECs while maintaining their normal morphology [18]. Some effects on human and/or animal CECs were reported for epithelial growth factor (EGF), nerve

growth factor (NGF), bovine pituitary extract (BPE), ascorbic acid and chondroitin sulfate [9, 18, 22-25].

Our laboratory already reconstructed corneas by tissue engineering using feline corneal endothelium, which have been transplanted in short-term study [26, 27]. Since autologous cells are preferable for long-term studies, an optimization of the culture conditions was necessary for the maximal amplification of CEC from a minimal biopsy size of feline corneal endothelium. The feline model was chosen because, like humans, their corneal endothelium present a limited regenerative capacity. For example, in ex-vivo studies, feline corneal endothelial wound repair has been shown to occur by migration and cell enlargement rather than proliferation [28, 29]. Organ cultured feline corneal endothelium has been previously reported using specific chemically-defined media such as T8 and MAB87/3 [30] or MEM supplemented with glutamine, ascorbic acid, sodium pyruvate, nonessential amino acids and vitamins [2]. In vitro cultured FCECs has also been reported, using DMEM supplemented with serum and bFGF [31]. To our knowledge, the present study is the first detailed study for the optimization of FCECs culture conditions. In this paper, culture conditions were first optimized by evaluating the effects of serum (10 or 20% FBS), additives (EGF, 0.5 and 5 ng/ml; NGF, 20 ng/ml; BPE, 25 and 100 µg/ml; ascorbic acid, 20 µg/ml and chondroitin sulfate, 0.08%) and adherence support (plastic or gelatin-coated wells) on both proliferation and morphology of FCECs. Conditions leading to the best growth and morphological aspect were thus combined and used for the determination of the minimal size biopsy needed to harvest in order to establish a culture.

METHODS

Isolation of feline corneal endothelial cells (FCECs): All experiments described in this article were conducted according to the ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research and the Declaration of Helsinki. All procedures were approved by the Laval University Animal Care and Use Committee. Feline eyes were obtained within 24 hours after death. The isolation method was adapted from the method previously described for human cornea by Zhu and Joyce [18]. In a sterile environment, the cornea was dissected from the globe using a curved scissor. Descemet's membrane was peeled off from the cornea with surgical forceps under a dissection microscope. Strips of Descemet's membrane were incubated overnight at 37°C in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Invitrogen, Burlington, ON, Canada) supplemented with serum (FBS; Hyclone, Logan, UT), 100 UI/ml penicillin (Sigma, Oakville, ON, Canada) and 25 µg/ml gentamicin (Schering Canada, Pointe-Claire, QC, Canada). Cells were then centrifuged, resuspended in DMEM, counted and plated on extracellular matrix (FNC coating mix; Athena Enzyme Systems, Baltimore, MD) at a density of 5,000 – 10,000 cells/mm². After 5 to 7 days, cells were trypsinized and used to test culture conditions. FCECs were tested through passage one to three in various conditions.

Effect of serum: FCECs were seeded at 10,000 cells/cm² in DMEM 10 or 20% FBS in six-well plastic plates. The experiment was done three times in triplicates using FCECs populations isolated from three different subjects.

Effect of various additives: FCECs were seeded at 5,000 cells/cm² in DMEM 2% FBS in six-well plastic plates (BD Biosciences, Mississauga, ON, Canada) in the presence of the following additives (used alone or in combination): epidermal growth factor (EGF; 0.5, 5, 25 and 100 ng/ml; Austral Biologicals, San Ramon, CA), nerve growth factor from mouse submaxillaries (NGF; 20 ng/ml; Biomedical Technologies, Stoughton, MA), bovine pituitary extract (BPE; 25 and 100 µg/ml; Biomedical technologies), ascorbic acid (AA; 20 µg/ml; Sigma) and chondroitin sulfate A from bovine trachea (CDS 0.08%; Sigma). The experiment was done once in triplicates.

Effect of plastic-coating with gelatin: FCECs were seeded at 5,000 cells/cm² in DMEM 10 or 20% FBS in six-well plastic or gelatin-coated (0.2%; Laboratory Grade Gelatin, Fisher Chem Alert) plates. For precoating, a solution of 0.2% gelatin was added to the wells during 24 hours at 4°C. Then the remaining solution was decanted and removed. Experiments were done at least three times in triplicates using three different populations of FCECs.

Determination of cell number, mean size, morphology and statistical analysis: Cell number and mean size were determined using a cell counter and particle size analyzer (Beckman Coulter Z2, Mississauga, ON, Canada). Three different counts were made for each sample. For each condition tested, one well was maintained in culture one week after confluence to evaluate the morphology at post-confluence. For figure 1, 3 and 5, a Student's t-test was performed to analyze statistical significance with $p < 0.001$ or $p < 0.05$ considered to be significant. For figure 2 and 4, a factorial (2 X 2) analysis of variance (ANOVA) test was performed with $p < 0.01$ considered to be significant.

Immunofluorescence staining: FCECs were cultured on gelatin-coated glass slides for 28 days in DMEM 10% FBS supplemented with 5 ng/ml EGF, 25 µg/ml BPE and antibiotics or in DMEM 20% FBS, then fixed in 90% acetone (10 minutes at -20°C) and rinsed in PBS. An indirect immunofluorescence assay was performed. Cells were incubated for 45 minutes with a rabbit polyclonal anti-human *zonula occludens-1* antibody (ZO-1; clone ZMD436; Invitrogen, Burlington, ON, Canada) diluted in PBS containing 1% bovine serum albumin (Sigma). The secondary antibody, Alexa 594-conjugated chicken anti-rabbit IgG (Molecular Probes, Eugene, OR), was incubated for 30 minutes. Cell nuclei were counterstained with reagent (Hoechst 33258; Sigma). Cells were observed under an epifluorescence microscope (Eclipse E600; Nikon; Montréal, QC, Canada) and photographed using a numeric charge-coupled device camera (Sensys; Roper Scientific, Trenton, NJ). Negligible background was observed for controls (primary antibodies omitted). Experiments were done three times in triplicates using three different cell populations of FCECs.

Determination of the minimal size for the corneal biopsy: Punch biopsies were harvested from freshly dissected corneas. Three punch sizes were used: 1.5 mm diameter (corresponding to a surface of 1.8 mm²), 2.5 mm diameter (4.9 mm²) and 4.0 mm diameter (12.6 mm²) (Acu-Punch, Acuderm, Dormer, ON, Canada). For each cornea, one to five full-thickness biopsy was performed for each punch size. Each biopsy was treated separately. Descemet's membrane and endothelium were detached from the small piece of stroma. FCECs were isolated by incubation at 37°C in 2.5 mg/ml dispase II [25, 32] (Roche Diagnostics, Laval, QC, Canada) for 45 minutes. The detached cells were then seeded on gelatin-coated wells and cultured in DMEM supplemented with 10% FBS, 5 ng/ml EGF, 25 µg/ml BPE and antibiotics. Cell number, size and morphology were assessed as described above on three populations in replicates for up to three passages. Cell cultures were also maintained at confluence to observe the post-confluence changes in cell morphology at every passage. In vitro evaluation of corneal endothelial cell density was done by examination of cultured endothelium by phase contrast microscopy (Eclipse TS100, Nikon) and photographs were taken with digital camera (Coolpix 995, Nikon). Using one representative picture by condition, the number of cells/mm² was determined by counting three separate frames per photograph. Experiments were done one to five times using three different cellular populations of FCECs.

RESULTS

Effect of various additives alone: The following growth-promoting agents (EGF, NGF, BPE, AA and CDS) were tested separately in a media containing 2% FBS. EGF used at concentrations of 0.5 and 5 ng/ml showed both a reduction of 6% in cell size (Figure 1A). A significant increase in proliferation of 17 and 38% was also observed with these concentrations of EGF (Figure 1B, D-F). Also, EGF induced a change in morphology. FCECs grown in the presence of 5 ng/ml EGF (Figure 1F) were smaller and rounder than those in 2% FBS control (Figure 1D). EGF at 0.5 ng/ml induced rounder cells than EGF 5 ng/ml (Figure 1E). Higher concentrations of EGF (25 and 100 ng/ml) induced FCECs elongation (data not shown). Reduction of cell size, increase in proliferation and change in morphology were also present with the use of BPE at 25 and 100 µg/ml (Figure 1H-I). Indeed, the reduction of the mean cell size was respectively of 12 and 16% (Figure 1A), whereas the proliferation was increased two and three folds compared to the 2% FBS control (Figure 1B). BPE at 100 µg/ml allowed the maximal number of cells/cm² (Figure 1B) and an inferior mean cell size than others additives (Figure 1A), but the cells had a slightly elongated shape (Figure 1I). However, adding BPE 25 µg/ml resulted in a rounder cell shape compared to 100 µg/ml while maintaining a good proliferation rate (Figure 1B,H). No beneficial effect was observed using 20 ng/ml NGF, AA or CDS (Figure 1A,B,G,J,K).

Effect of Serum: The mean cell size of FCECs cultured in DMEM 20% FBS were 8% larger compared to the 10% FBS condition (Figure 2A). However, a lower cell number was obtained when FCECs were cultured with 10% FBS compared to 20% FBS (Figure 2B). Total cell number was smaller when FCECs were cultured in 10% FBS compared to the 20% FBS medium (Figure 2B). Indeed, FCECs morphology was better in 10% FBS and cells did not overlay, in contrast to the 20% FBS condition (Figure 2C-E). FCECs were smaller and rounder with 10% FBS than with 20% FBS which resulted in thin and elongated cells (Figure 2C-E).

Effect of gelatin-coating:

Because CECs are difficult to grow *in vitro*, we next wanted to assess the affect of culturing them on a protein substrate, gelatin. The mean cell size was always inferior when the cells were cultured on gelatin, in contrast with the plastic results (Figure 2A). A higher cell density of 20% was also observed using gelatin-coated plates compared to the cells seeded on plastic (Figure 2B). The FCECs cultured on gelatin in DMEM 10% FBS had a very similar morphology to the *in vivo* FCECs (Figure 2D). FCECs cultured in DMEM 20% FBS on plastic were elongated and overlaid (Figure 2E), whereas growth on gelatin-coated plates using the same medium resulted in a smaller mean cell size and no overlaying cells (Figure 2A,F).

Effects of Combined Additives and Quantity of Serum: The effects of diverse conditions tested separately may be very different when they are combined. We thus tested the culture of FCECs in presence of both 10% FBS and growth promoting agents (5 ng/ml EGF and 25 µg/ml BPE) determined previously. In this specific condition, the cells maintained a smaller cell diameter through passages than in DMEM 10% FBS media alone (Figure 3A). Also, cell proliferation increased of 45% in media supplemented with both additives (Figure 3B). The morphological aspect of the FCECs was also modified by the supplementation with EGF and BPE compared to the 10% FBS used alone (Figure 3C-D). FCECs were smaller and rounder in the condition containing serum and both additives (Figure 3D).

Effect of Combined Additives, Quantity of Serum and gelatin-coating: When grown on plastic or gelatin, the addition of growth promoting agents (EGF, BPE) to DMEM 10% FBS media provided smaller mean cell size (Figure 4A) and higher cell number (Figure 4B). Cell size increased from passage two to three. However, cell size was improved since the optimized conditions yielded a size of third-passaged cells that was comparable to second-passaged cells grown on plastic without additive. Cell morphology was also improved in both cases (Figure 4C-F). However, most noteworthy effects were observed when the FCECs were cultured in this media using gelatin-coated plates. Indeed, in the complete media (10% FBS with additives), cells had a reduced cell size up to 5% and the total number of cells increased of 50% when seeded on gelatin compared

to plastic (Figure 4A-B). The combined condition of 10% FBS with additives on gelatin had also a 4 to 8% reduction mean cell size and a 2 to 3.5 fold increased proliferation rate in comparison with 10% FBS without additive on plastic (Figure 4A-B). The combination of gelatin and additives helped to preserve the in vivo like small polygonal-shaped morphology of FCECs. As seen in this final condition, cells were rounder, smaller and arranged in a closely packed monolayer of cells (Figure 4F).

Immunodetection of the tight junction-associated protein ZO-1: In the corneal endothelium, tight junctions prevent excessive incoming liquid from the aqueous humor by forming a semi-permeable barrier. The tight junction-associated protein ZO-1, is routinely used to prove to presence of these junctions on CEC [2, 33]. The immunodetection of ZO-1 was performed on gelatin-coated slides of FCECs cultured in DMEM 20% FBS, or in media optimized in this study, DMEM 10% FBS with EGF and BPE at respectively 5 ng/ml and 25 µg/ml. Both conditions were cultured during 28 days and were at confluence at the moment of fixation. The immunofluorescence against ZO-1 showed the presence of this protein at the inter-cellular junctions of FCECs cultured in DMEM 10% FBS supplemented with additives (Figure 5A). In contrast, the FCECs cultured in 20% FBS did not express the protein ZO-1 (Figure 5B).

Determination of the Minimal Size Biopsy: The cultures obtained with 1.8 mm² punches achieved replicative senescence in primary culture (data not shown). Punches of 4.9 mm² allowed the growth of $2,1 \times 10^5 \pm 0,1 \times 10^5$ in primary cultures (P0) and $5,7 \times 10^5 \pm 0,2 \times 10^5$ cells at passage one (Figure 6A). These cultures can easily be grown until passage two while maintaining their typical cell morphology; round and small FCEC laid down in monolayer (Figure 6B). The cell density of second-passaged cultured reconstructed endothelium was evaluated at $1,280 \pm 30$ cells/mm² (Figure 6B).

DISCUSSION

In this paper, we have shown that culturing FCECs in media made of DMEM 10% FBS supplemented with EGF 0.5 ng/ml and BPE 25 µg/ml and seeded on gelatin-coated plates greatly improve the culture of these cells in terms of proliferation and morphological aspect. FCECs can now be easily cultured from a 4.9 mm² biopsy of corneal endothelium for the reconstruction of a complete autologous tissue.

In the present study, EGF 5 ng/ml enhanced cell growth and helped preserve small rounded-shaped cells. However, at higher concentrations, EGF had the opposite effect on morphological aspect of FCECs (data not shown). EGF is a well-known mitogenic agent; its addition to culture medium promotes cell proliferation of both human and animals CEC [18, 21, 34]. EGF is also known to induce morphological changes [21] of CEC in vitro. The same proliferative and morphologic observations were made on FCECs in this study.

In our study, 25 µg/ml BPE considerably increased the number of FCECs in culture while maintaining a small-shaped morphology. BPE is often used as mitogenic agent, although its exact composition is unknown. In previous studies on human or porcine CEC, BPE was found to induce a significant dose-dependent response to the number of cells in culture [18, 25]. However, recent observations have shown that high concentration of BPE (0.1 mg/ml) can generate the loss of cell-cell junctions [19]. Even though we used four times less BPE than that study, we still wanted to evaluate if BPE would also disrupt cell-cell junctions. This is the reason why the immunodetection to the tight junction-associated protein ZO-1 was tested. Results show a normal ZO-1 staining at cell-cell junctions even when FCECs are cultured in the presence of 25 µg/ml BPE.

No beneficial effect of NGF was observed on FCECs at the tested concentration in the present study. In contrast, cells cultured in the presence of NGF were less proliferative than in 2% FBS alone. CDS was tested since it is an important component of corneal storage media [35]. This proteoglycan was found to allow survival of CEC [36], to improve CEC growth [17, 37] and to preserve morphological aspect of CEC [25, 38] in culture or on corneal tissue preserved in vitro. Nevertheless, none of these effects were

reproduced by CDS on FCECs at tested concentration. In this study, AA showed an inhibitory effect on proliferation of FCECs like it did on rabbit CEC in a previous report [39]. AA is found in high concentration in aqueous humor of mammals [40]. It is added to rat CEC in vitro to protect the corneal endothelium from oxidative stress [41]. Moreover, AA has been used in human and porcine CEC culture medium where it was shown to have growth beneficial effects [18, 25, 42].

The culture of FCECs in DMEM 20% FBS media often allowed the growth of fibroblastic-like cells. A lower percentage of serum was thus experimented to evaluate whether cell morphology would be more alike to the native tissue rather than fibroblastic-like. The augmentation of cell density in 20% FBS even if cells were larger can be explained by the tendency of cells to overlay when grown in this percentage of serum. This overlaying tendency is almost nonexistent when cultured in 10% FBS. One explanation could be that FCECs are over stimulated when they grow in a medium containing 20% FBS.

In vivo, CECs are attached to the Descemet's membrane, which is made of different protein such as type IV collagen and laminin [43]. Trying to reproduce this adherence substratum to promote growth of CECs is not a new idea [16, 20, 44]. In these experiments, gelatin-coating of the culture flasks successfully enhanced corneal endothelial cell adhesion and proliferation while maintaining the normal characteristic morphology of CECs. This is consistent with previous study which found that the morphology of rabbit CECs was dependent on the structure of the extracellular matrix that fibroblasts or CECs, laid down [20]. In addition, in our study, the growth of FCECs on gelatin-coated plates seemed to prevent the cells to overlay.

Tight junctions' complexes are responsible for the paracellular permeability of the corneal endothelium, thus of the integrity of the corneal endothelial barrier [33, 45]. In the same manner, an alteration of these tight junctions affects the role of the corneal endothelium on transparency. ZO-1 is a component of tight junction complex [46]. Normally, anti-ZO-1 staining is shown as a discontinuous apical and pericellular pattern

[47, 48]. This pattern was seen on FCECs cultured in DMEM 10% FBS supplemented with 5 ng/ml EGF and 25 µg/ml BPE on gelatin-coated flasks, whereas it was not observed in the FCECs cultured in 20% FBS. The fibroblastic-like FCECs cultured in 20% FBS lost their normal endothelial phenotype; shape, organization and connectivity. This result is consistent with previous observations showing the loss of normal ZO-1 organization in fibroblastic endothelium [49]. Indeed, CECs morphology is directly related to endothelium functionality that results in tissue integrity.

Many research projects have been made for the transplantation of a reconstructed corneal endothelium. Nevertheless, the final aim is to reconstruct a healthy endothelium for patients suffering from corneal endothelial dysfunction. To solve this problem, an ideal solution will be to tissue-engineer an autologous corneal endothelium. The availability of corneal endothelium produced from cultured autologous cells would prevent the eventual rejection problems related to allograft corneal transplantation which is responsible for 11.2% of all corneal transplantation performed in USA in 2004 [12] and 6.0% in Canada [13].

The main advantage of this study is to show the feasibility of culturing an autologous corneal endothelium coming from a minimal size biopsy. Indeed, taking only a small part of the patient's corneal endothelium for reconstruction of a monolayer (or even to thaw excess CEC for an eventual graft) while maintaining in place the majority of native corneal endothelium. To our knowledge, this is the first paper which reported a cultured corneal endothelium from a small biopsy size. For this animal model, a biopsy as small as 4.9 mm² is sufficient to produce by tissue engineering an endothelium of an average cell density of 1,279 cells/mm², and presenting a normal corneal endothelial morphology. This cell density has to be improved before clinical studies.

In summary, the culture of FCECs has made great improvements. These cells can now be easily grown through passages, facilitating research on this animal model. The optimal growth culture conditions of FCECs is made of combination of DMEM 10% FBS supplemented with 5 ng/ml EGF and 25 µg/ml BPE and seeded on 0.2% gelatin-

coated plates. This combination resulted in a reduction in mean cell size, an higher proliferation rate and also improved considerably the morphological aspect and relative integrity. In this manner, the growth of FCECs from a biopsy size of 4.9 mm² can be performed. The resulting tissue was a well-organized monolayer with a phenotype and cell density similar to in vivo CEC. Further studies will be required to evaluate these methods for FCECs isolation and culture combined with the production of autologous tissue for grafting before developing clinical applications.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR; MOP #53170 and #67098) and the 'Réseau de Recherche en Santé de la Vision' from the 'Fonds de la Recherche en Santé du Québec' (FRSQ). L.G. is the recipient of a Canadian Research Chair from the CIHR in Stem Cell and Tissue Engineering. I.B. is the recipient of the Charles-Albert Poissant Research Chair in Corneal Transplantation. C.A. holds a studentship from the CIHR and S.P. held a fellowship from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC).

REFERENCES

1. Farquhar MG, Palade GE. Junctional complexes in various epithelia. *J Cell Biol*1963 May;17:375-412.
2. Petroll WM, Jester JV, Bean JJ, Cavanagh HD. Myofibroblast transformation of cat corneal endothelium by transforming growth factor-beta1, -beta2, and -beta3. *Invest Ophthalmol Vis Sci*1998 Oct;39(11):2018-32.
3. Joyce NC, Meklir B, Joyce SJ, Zieske JD. Cell cycle protein expression and proliferative status in human corneal cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*1996 Mar;37(4):645-55.
4. Joyce NC. Cell cycle status in human corneal endothelium. *Exp Eye Res*2005 Dec;81(6):629-38.
5. Bourne WM, McLaren JW. Clinical responses of the corneal endothelium. *Exp Eye Res*2004 Mar;78(3):561-72.
6. Seitzman GD. Cataract surgery in Fuchs' dystrophy. *Curr Opin Ophthalmol*2005 Aug;16(4):241-5.
7. Gagnon MM, Boisjoly HM, Brunette I, Charest M, Amyot M. Corneal endothelial cell density in glaucoma. *Cornea*1997 May;16(3):314-8.
8. Bourne WM. Cellular changes in transplanted human corneas. *Cornea*2001 Aug;20(6):560-9.
9. Stéphanie Proulx, Maxime Guillemette, Manon Gaudreault, Patrick Carrier, François A. Auger, Sylvain L. Guérin and Lucie Germain. Tissue engineering of human cornea (Chapter 6). In: Chirila PTV, editor. *Biomaterials and regenerative medicine in ophthalmology* Queensland Eye Institute: Australia; 2010 (in press).
10. America EB Ao. *Statistical Report on Eye Banking Activity for 2007*. Washington, DC2008.
11. Birnbaum F, Reinhard T, Bohringer D, Sundmacher R. Endothelial cell loss after autologous rotational keratoplasty. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*2005 Jan;243(1):57-9.
12. Darlington JK, Adrean SD, Schwab IR. Trends of penetrating keratoplasty in the United States from 1980 to 2004. *Ophthalmology*2006 Dec;113(12):2171-5.

13. Dorrepaal SJ, Cao KY, Slomovic AR. Indications for penetrating keratoplasty in a tertiary referral centre in Canada, 1996-2004. *Can J Ophthalmol* 2007 Apr;42(2):244-50.
14. Senoo T, Joyce NC. Cell cycle kinetics in corneal endothelium from old and young donors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000 Mar;41(3):660-7.
15. Engelmann K, Drexler D, Bohnke M. Transplantation of adult human or porcine corneal endothelial cells onto human recipients in vitro. Part I: Cell culturing and transplantation procedure. *Cornea* 1999 Mar;18(2):199-206.
16. Engelmann K, Friedl P. Optimization of culture conditions for human corneal endothelial cells. *In Vitro Cell Dev Biol* 1989 Nov;25(11):1065-72.
17. Yue BY, Sugar J, Gilboy JE, Elvart JL. Growth of human corneal endothelial cells in culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1989 Feb;30(2):248-53.
18. Zhu C, Joyce NC. Proliferative response of corneal endothelial cells from young and older donors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004 Jun;45(6):1743-51.
19. Li W, Sabater AL, Chen YT, Hayashida Y, Chen SY, He H, et al. A novel method of isolation, preservation, and expansion of human corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007 Feb;48(2):614-20.
20. Hsieh P, Baum J. Effects of fibroblastic and endothelial extracellular matrices on corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1985 Apr;26(4):457-63.
21. Raymond GM, Jumblatt MM, Bartels SP, Neufeld AH. Rabbit corneal endothelial cells in vitro: effects of EGF. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1986 Apr;27(4):474-9.
22. Chen CH, Chen VN, Chen SC. Effect of chondroitin sulfate on the endothelium in corneal storage. *Cornea* 1996 Jan;15(1):35-40.
23. Engelmann K, Bohnke M, Friedl P. Isolation and long-term cultivation of human corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1988 Nov;29(11):1656-62.
24. Hoppenreijns VP, Pels E, Vrensen GF, Treffers WF. Corneal endothelium and growth factors. *Surv Ophthalmol* 1996 Sep-Oct;41(2):155-64.
25. Proulx S, Bourget JM, Gagnon N, Martel S, Deschambeault A, Carrier P, et al. Optimization of culture conditions for porcine corneal endothelial cells. *Mol Vis* 2007;13:524-33.

26. Proulx S, Audet C, Uwamaliya JA, Deschambeault A, Carrier P, Giasson CJ, et al. Tissue Engineering of Feline Corneal Endothelium Using a Devitalized Human Cornea as Carrier. *Tissue Eng Part A*2009 Jan 6.
27. Proulx S, Bensaoula T, Nada O, Audet C, Uwamaliya JA, Devaux A, et al. Transplantation of a tissue-engineered corneal endothelium reconstructed on a devitalized carrier in the feline model. *Invest Ophthalmol Vis Sci*2009 Jun;50(6):2686-94.
28. Van Horn DL, Sendele DD, Seideman S, Bucu PJ. Regenerative capacity of the corneal endothelium in rabbit and cat. *Invest Ophthalmol Vis Sci*1977 Jul;16(7):597-613.
29. Landshman N, Solomon A, Belkin M. Cell division in the healing of the corneal endothelium of cats. *Arch Ophthalmol*1989 Dec;107(12):1804-8.
30. Adams S, Lucas DR. The behaviour of cat and human corneas in organ culture in various media. *Curr Eye Res*1981;1(5):291-9.
31. Wencan W, Mao Y, Wentao Y, Fan L, Jia Q, Qinmei W, et al. Using basement membrane of human amniotic membrane as a cell carrier for cultivated cat corneal endothelial cell transplantation. *Curr Eye Res*2007 Mar;32(3):199-215.
32. Ishino Y, Sano Y, Nakamura T, Connon CJ, Rigby H, Fullwood NJ, et al. Amniotic membrane as a carrier for cultivated human corneal endothelial cell transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*2004 Mar;45(3):800-6.
33. Mandell KJ, Holley GP, Parkos CA, Edelhauser HF. Antibody blockade of junctional adhesion molecule-A in rabbit corneal endothelial tight junctions produces corneal swelling. *Invest Ophthalmol Vis Sci*2006 Jun;47(6):2408-16.
34. Raphael B, Kerr NC, Shimizu RW, Lass JH, Crouthamel KC, Glaser SR, et al. Enhanced healing of cat corneal endothelial wounds by epidermal growth factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci*1993 Jun;34(7):2305-12.
35. Stein RM, Laibson PR. Comparison of chondroitin sulfate to McCarey-Kaufman medium for corneal storage. *Am J Ophthalmol*1987 Nov 15;104(5):490-3.
36. Bourne WM, Lindstrom RL, Doughman DJ. Endothelial cell survival on transplanted human corneas preserved by organ culture with 1.35% chondroitin sulfate. *Am J Ophthalmol*1985 Dec 15;100(6):789-93.

37. Lin CP, Bohnke M, Draeger J. Effects of fibroblast growth factor and chondroitin sulfate on predamaged corneal endothelium. An organ culture study. *Ophthalmic Res*1990;22(3):173-7.
38. Stein RM, Bourne WM, Campbell RJ. Chondroitin sulfate for corneal preservation at 4 degrees C. Evaluation by electron microscopy. *Arch Ophthalmol*1986 Sep;104(9):1358-61.
39. Yue BY, Niedra R, Baum JL. Effects of ascorbic acid on cultured rabbit corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*1980 Dec;19(12):1471-6.
40. Richer SP, Rose RC. Water soluble antioxidants in mammalian aqueous humor: interaction with UV B and hydrogen peroxide. *Vision Res*1998 Oct;38(19):2881-8.
41. Suzuki H, Sato S, Murano N, Matsui H, Oharazawa H, Takahashi H. Morphological observations of rat corneal endothelial cells after exposure to ozonated solution. *Jpn J Ophthalmol*2009 Mar;53(2):151-8.
42. Engelmann K, Friedl P. Growth of human corneal endothelial cells in a serum-reduced medium. *Cornea*1995 Jan;14(1):62-70.
43. Kabosova A, Azar DT, Bannikov GA, Campbell KP, Durbeej M, Ghohestani RF, et al. Compositional differences between infant and adult human corneal basement membranes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*2007 Nov;48(11):4989-99.
44. Pistsov MY, Sadovnikova E, Danilov SM. Human corneal endothelial cells: isolation, characterization and long-term cultivation. *Exp Eye Res*1988 Sep;47(3):403-14.
45. Stiemke MM, McCartney MD, Cantu-Crouch D, Edelhauser HF. Maturation of the corneal endothelial tight junction. *Invest Ophthalmol Vis Sci*1991 Sep;32(10):2757-65.
46. Stevenson BR, Siliciano JD, Mooseker MS, Goodenough DA. Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. *J Cell Biol*1986 Sep;103(3):755-66.
47. Barry PA, Petroll WM, Andrews PM, Cavanagh HD, Jester JV. The spatial organization of corneal endothelial cytoskeletal proteins and their relationship to the apical junctional complex. *Invest Ophthalmol Vis Sci*1995 May;36(6):1115-24.

48. Petroll WM, Hsu JK, Bean J, Cavanagh HD, Jester JV. The spatial organization of apical junctional complex-associated proteins in feline and human corneal endothelium. *Curr Eye Res*1999 Jan;18(1):10-9.
49. Petroll WM, Barry-Lane PA, Cavanagh HD, Jester JV. ZO-1 reorganization and myofibroblast transformation of corneal endothelial cells after freeze injury in the cat. *Exp Eye Res*1997 Feb;64(2):257-67.

FIGURE LEGENDS

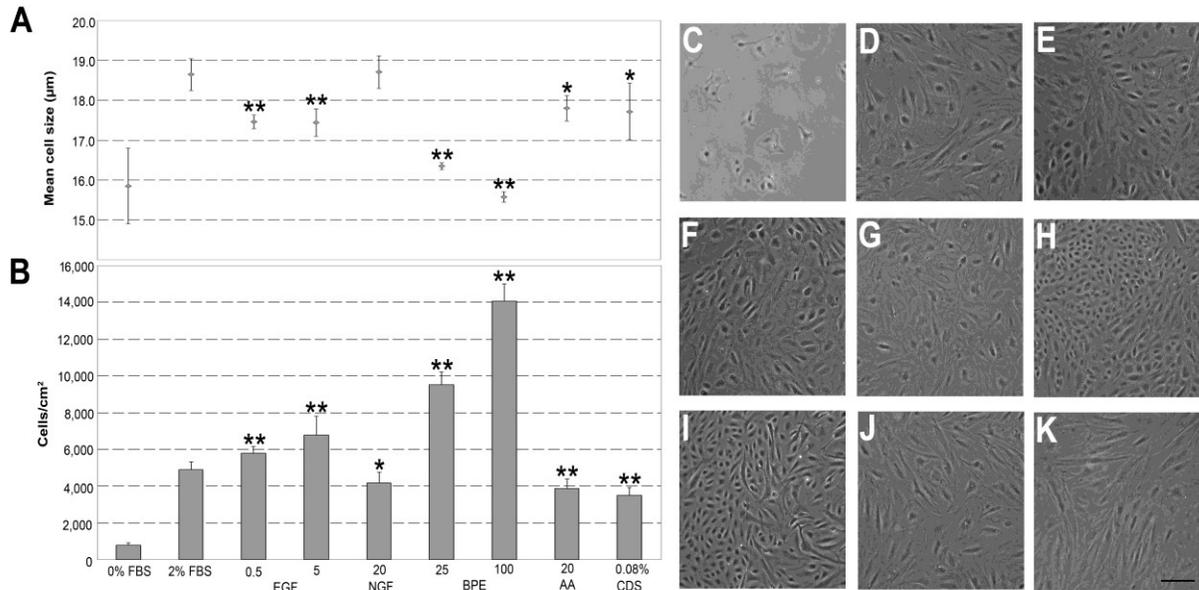


Figure 1. Effects of different additives on mean cell size, number and morphology of feline corneal endothelial cells (FCECs). FCECs were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 2% fetal bovine serum (FBS) and one of the following factors: epidermal growth factor (EGF; 0.5 or 5 ng/ml), nerve growth factor (NGF; 20 ng/ml), bovine pituitary extract (BPE; 25 or 100 µg/ml), ascorbic acid (AA; 20 µg/ml) or chondroitin sulfate (CDS; 0.08%). (A) Cell size. (B) Number of cells/cm². Results are expressed as Mean ± SD. *p<0.05 or **p<0.001 compared to 2% FBS. (C-K) Phase contrast micrographs showing the morphology at day 12 of second-passaged FCECs grown in (C) 0% FBS, (D) 2% FBS alone or in combination with (E) EGF 0.5 ng/ml, (F) EGF 5 ng/ml, (G) NGF 20 ng/ml, (H) BPE 25 µg/ml, (I) BPE 100 µg/ml, (J) AA 20 µg/ml, (K) CDS 0.08%. Scale bar, 200 µm. Experiments were done in triplicates on one cell population.

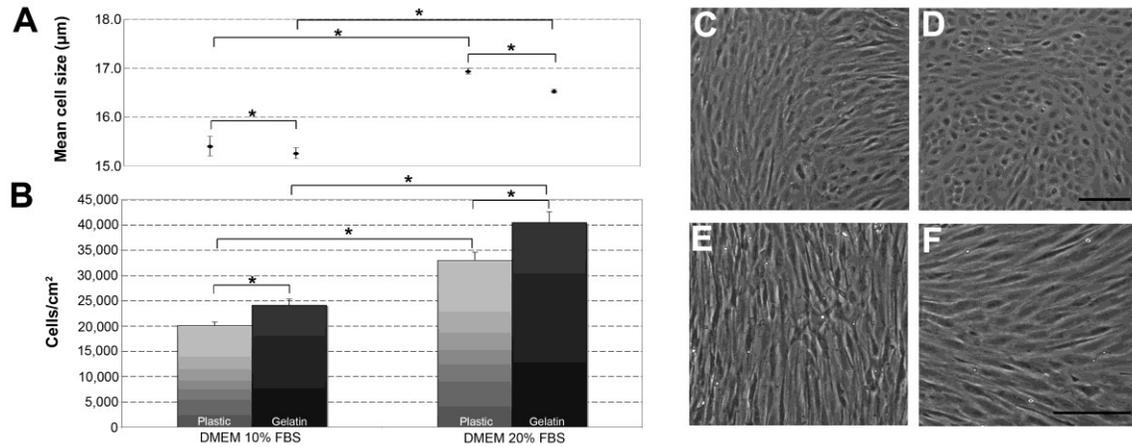


Figure 2. Effects of different concentration of serum and gelatin-coating on cell size, number and morphology of feline corneal endothelial cells (FCECs). FCECs were cultured in DMEM 10 or 20% FBS on plastic (grey bars) or on gelatin-coated (black bars) plates. (A) Cell size. (B) Number of cells/cm². Bars indicate mean ±SD. *p<0.01 (mean size and cell number). Morphology at day 12 of second-passaged FCECs grown in (C) DMEM 10% FBS on plastic, (D) DMEM 10% FBS on gelatin, (E) DMEM 20% FBS on plastic, (F) DMEM 20% FBS on gelatin. Scale bar, 200 µm. Representative results are shown (n=3).

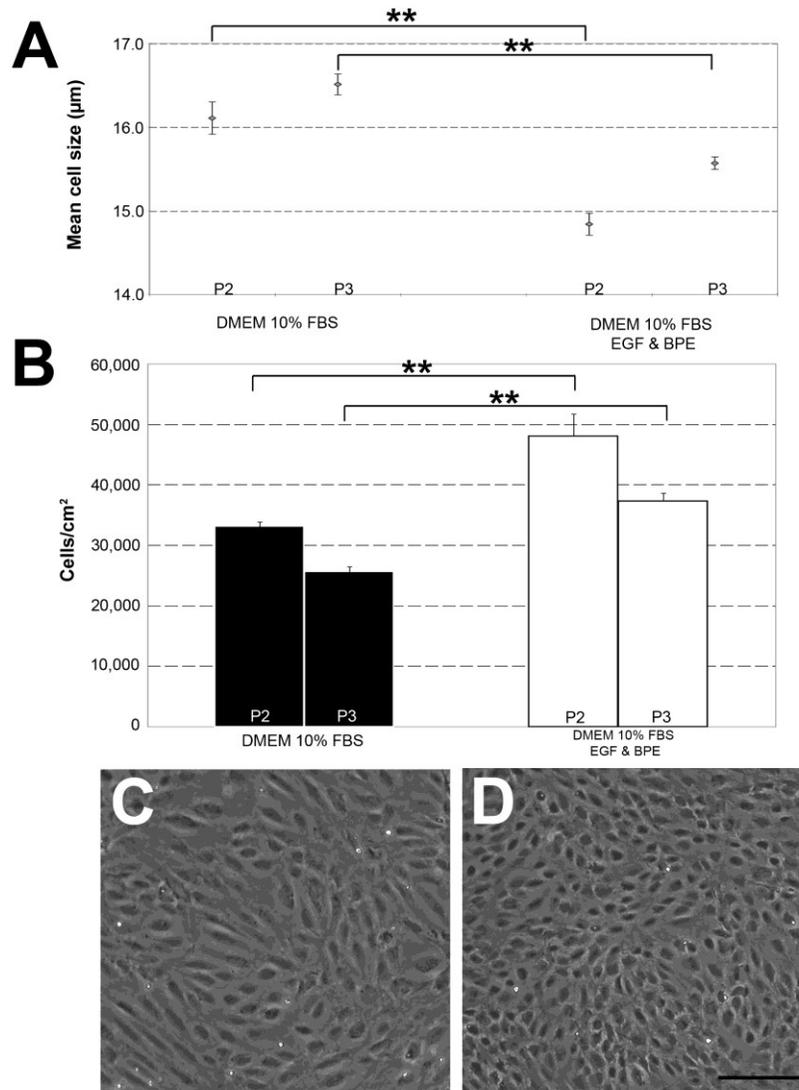


Figure 3. Effects of combined additives in DMEM 10% FBS on cell size, number and morphology of feline corneal endothelial cells (FCECs). FCECs were cultured in DMEM 10% FBS alone (black) or in combination with EGF 0.5 ng/ml and BPE 25 µg/ml (white). (A) Cell size. (B) Number of cells/cm². Bars indicate mean±SD. **p<0.001 (mean size and cell number). Morphology at day 13 of second-passaged FCECs grown in (C) DMEM 10% FBS alone, (D) DMEM 10% FBS supplemented with EGF 0.5 ng/ml and BPE 25 µg/ml. Scale bar, 200 µm. Representative results are shown (n=3).

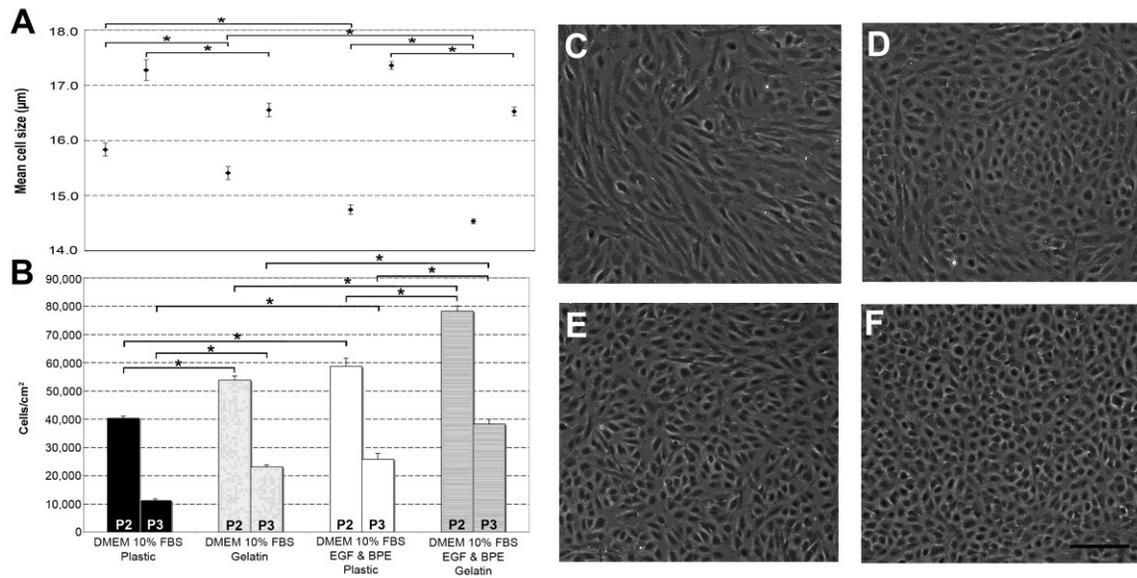


Figure 4. Effects of gelatin-coating and combined additives in DMEM 10% FBS on cell size, number and morphology of feline corneal endothelial cells (FCECs). (A) Cell size. (B) Number of cells/cm². Bars indicate mean \pm SD. * $p < 0.01$ (mean size and cell number). (C-F) Morphology at day 11 of second-passaged FCECs plated on plastic (C, E) or on gelatin-coated plates (D, F) and cultured in DMEM 10% FBS alone (C,D) or in combination with 0.5 ng/ml EGF and 25 μ g/ml BPE (E,F). Scale bar, 200 μ m. Representative results are shown (n=3)

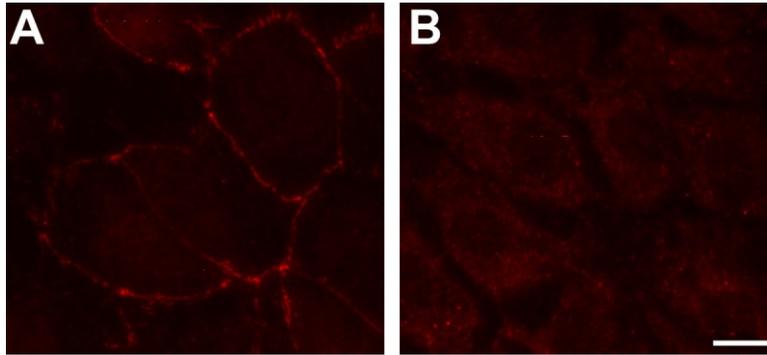


Figure 5. Immunofluorescence staining with antibody anti-ZO-1 on feline corneal endothelial cells (FCECs). Micrographs at day 28 of second-passaged FCECs plated on gelatin-coated coverslips glass grown in (A) DMEM 10% FBS with EGF 0.5 ng/ml and BPE 25 µg/ml (B) DMEM 20% FBS alone. Scale bar, 15 µm. Representative results are shown (n=3).

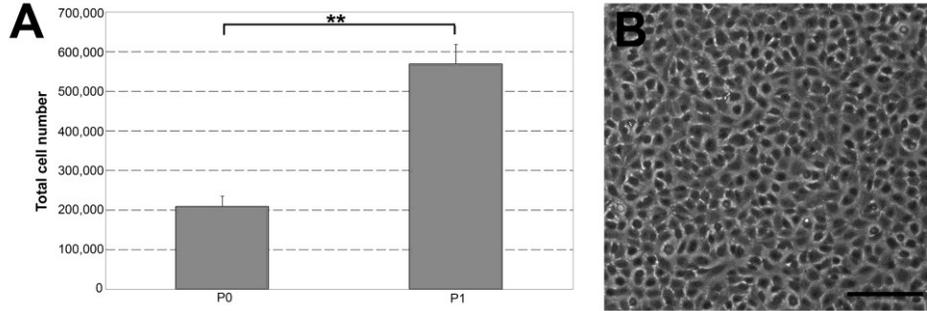


Figure 6. Culture of feline corneal endothelial cells (FCECs) isolated from a biopsy of 4.9mm². FCECs were cultured in DMEM 10% FBS supplemented of EGF 0.5 ng/ml and BPE 25 µg/ml on gelatin-coated plates. (A) Total cell number through passages. Bars indicate mean ±SD. **p<0.001. Morphology at day 8 of second-passaged FCECs grown in (B) DMEM 10% FBS supplemented of EGF 0.5 ng/ml and BPE 25 µg/ml on gelatin-coated plates. Scale bar, 200 µm. Representative results are shown (n=3).

CHAPITRE 3- Discussion et Conclusion

Après des dizaines d'années de vision impeccable, il est possible que celle-ci diminue considérablement pour éventuellement s'estomper entièrement. C'est malheureusement ce qui se produit lors du développement d'une pathologie de l'endothélium cornéen. À l'heure actuelle, le seul traitement possible est une greffe de cornée, parfois lamellaire mais plus souvent pénétrante, provenant toujours d'un donneur cadavérique. Divers facteurs peuvent grandement affecter le délai de traitement de ces patients. D'une part, il y a une diminution de la disponibilité de cornées provenant de donneurs et, d'autre part, une réduction du nombre de cornées correspondant aux critères de sélection de plus en plus restrictifs. C'est ce qui incite les chercheurs à développer des alternatives. Une d'entre elles, et ce que préconise le Laboratoire d'Organogénèse Expérimentale (LOEX), est le remplacement de la partie pathologique seulement, et ce, par un endothélium autologue reconstruit par génie tissulaire. C'est la solution idéale puisqu'il y a un contournement à la fois des problèmes liés à l'accessibilité de cornée allogénique saine de même que ceux liés au rejet immunitaire. Les travaux présentés dans le chapitre deux ont fait avancer nos connaissances nécessaires à la reconstruction d'un endothélium autologue *in vitro*.

3.1. Optimisation des conditions de culture

Les objectifs visés étaient de réussir la culture *in vitro* des CEC dans ce modèle d'endothélium autologue reconstruit par génie tissulaire. Pour le moment, il est difficile de cultiver les CEC humaines, cependant davantage de succès a été obtenu avec les CEC animales [69, 73, 74, 81, 90, 95, 131]. Le principal inconvénient de plusieurs de ces études est l'utilisation d'animaux - lapin, bœuf, singe - dont l'activité mitotique des CEC n'est pas limitée comme chez leurs homologues humains, mais prolifèrent chez l'adulte. La présente étude a été effectuée chez le modèle félin dont les CEC possèdent une capacité proliférative similaire à l'humain, c'est-à-dire pratiquement nulle après la naissance [228, 260, 261].

Pour le succès d'une culture de CEC, il est primordial de déterminer d'abord les conditions de culture permettant l'obtention d'une monocouche cellulaire semblable à l'endothélium natif [97]. Précédemment à l'étude de l'optimisation des conditions de culture, les CEC félines adoptaient, plus souvent qu'autrement, une morphologie de type fibroblastique *i.e.* que les cellules étaient très allongées, possédaient peu ou pas de jonctions intercellulaires et allaient même jusqu'à se superposer. Cela est en accord avec de précédentes observations montrant que, dans un endothélium de type fibroblastique, il y a une perte de connectivité cellulaire et de polarité basale/apicale, de même qu'un changement phénotypique vers un état différencié [77, 91, 92, 152]. Dans ce type d'endothélium, une perte de l'activité de pompage et de l'intégrité de la barrière endothéliale a également été remarquée [153]. Ce phénotype fibroblastique pourrait servir au recouvrement de la section mise à nue lors d'une plaie afin de maintenir la barrière endothéliale [131, 153]. Cette transformation des CEC a été observée lors de bris endothélial ou lors de culture des CEC sur une matrice stromale et semble être modulée par des facteurs tels que la matrice extracellulaire et les facteurs de croissance [152]. Il est intéressant de constater que, durant le développement embryonnaire, les CEC et les kératocytes stromaux ont tous deux pour origine les cellules de la crête neurale [112, 269].

Dans la présente étude, l'optimisation des conditions de culture des CEC félines a été réalisée pour permettre à la fois une forte croissance cellulaire et le maintien du phénotype endothélial. Les conditions de culture testées dans cette étude proviennent de plusieurs études précédentes effectuées avec des cellules endothéliales provenant d'autres espèces (voir section 1.1.1.5.3.2). Ces conditions ont permis d'évaluer la quantité de sérum, les agents promoteurs de croissance et la surface de contact cellulaire permettant l'obtention de caractéristiques prolifératives et morphologiques optimales. Il a ainsi été déterminé que le sérum est nécessaire à l'adhérence et à la croissance des CEC d'une façon dépendante de la dose. Toutefois, le pourcentage de sérum ne doit pas dépasser 10% afin de conserver le phénotype endothélial typique; une augmentation de sérum entraînant un changement de morphologie des CEC félines vers un état fibroblastique. Les caractéristiques endothéliales cornéennes sont alors perdues. Les résultats sur les

agents promoteurs utilisés seuls indiquent que, à faible concentration, l'EGF et le BPE favorisent la croissance des CEC. Par contre, cette expérience devra être répétée puisqu'elle n'a été réalisée qu'une seule fois en triplicata. La présence combinée de ces additifs a permis une croissance cellulaire accrue, tout en contribuant à l'aspect morphologique des CEC. Tel que vu dans la littérature, le BPE utilisé à forte concentration a entraîné un changement morphologique et a empêché la formation de jonctions intercellulaires [79, 93]. De plus, le fait de cultiver les CEC sur un support de gélatine a considérablement favorisé la croissance de ces cellules. Ce substrat protéique a rendu possible une forte prolifération cellulaire des CEC tout en conservant leur morphologie endothéliale typique. Les CEC félines cultivées à confluence adoptent une forme polygonale de petite taille, disposées en monocouche lorsque les conditions de culture optimales déterminées dans cette étude sont utilisées. Ces cellules peuvent désormais être cultivées jusqu'à quatre passages, ce qui était impossible avec les précédentes conditions de culture. Ainsi, un endothélium cornéen similaire au tissu natif a pu être obtenu.

3.2. Culture d'un endothélium autologue

Un des objectifs était de reconstruire un endothélium autologue *in vitro* à partir d'une petite biopsie. Pour ce faire, la taille minimale d'une biopsie endothéliale a été déterminée. La faible quantité de CEC prélevée devait alors reformer la dimension réelle de la face postérieure cornéenne. Différentes tailles de biopsies endothéliales ont alors été prélevées, puis mises en culture afin d'identifier celle permettant la reconstitution d'un endothélium à la fois de forte densité cellulaire et fonctionnelle. Étonnamment, un prélèvement aussi petit que $4,9 \text{ mm}^2$ comprenant des cellules de faible potentiel prolifératif a permis la reconstruction d'un endothélium, de morphologie similaire à ce qui est retrouvé *in vivo*, d'une superficie de $3,8 \text{ cm}^2$. Évidemment, pour obtenir un tel résultat, il est impératif que la culture de ces CEC soit réalisée dans les conditions optimales à leur croissance, celles-ci ayant été précédemment déterminées.

L'évaluation morphologique et structurelle de l'endothélium reconstruit sur un substrat de gélatine à partir d'une petite biopsie permet d'affirmer qu'il est similaire à un endothélium natif. En effet, tout comme lors de l'optimisation des conditions de culture, la monocouche est formée de CEC de petites tailles, de forme polygonale bien accolées les unes aux autres. Dans la littérature, des variations morphologiques et de densités cellulaires chez les endothéliums cornéens ont été observées. Ces études montrent que l'aspect morphologique des CEC est directement relié à leur fonctionnalité. En effet, une perte des jonctions apicales des CEC a été associée à une altération de l'activité des pompes ioniques et de la barrière endothéliale [153]. Également, l'aspect morphologique typique des CEC, de même que la présence de la protéine ZO-1 est associée à une monocouche polarisée possiblement fonctionnelle au niveau du pompage et de la barrière endothéliale [152]. Selon les analyses morphologiques et immunohistologiques effectuées, l'endothélium félin reconstruit dans cette étude comporte des caractéristiques structurelles similaires au tissu natif. Cela indique un potentiel de fonctionnalité qui devra être éventuellement vérifié, soit par des études *in vitro* plus poussées, soit par des études *in vivo*. Il a été montré que la densité cellulaire préopératoire était, quant à elle, corrélée au succès ou à l'échec des greffes conséquemment à la décompensation endothéliale post-chirurgicale [254]. Avec une densité cellulaire évaluée à environ 1300 cellules/mm², la décompensation causée par la chirurgie ne risque pas d'altérer sa fonctionnalité qui nécessite une densité minimale de 700 cellules/mm² (voir section 1.1.1.5). L'endothélium autologue reconstruit possède donc toutes les caractéristiques d'un endothélium sain puisque les propriétés évaluées sont très similaires à celles rapportées pour un tissu natif normal [43].

Même si la kératoplastie pénétrante (PK) possède un haut taux de succès chirurgical, il n'en demeure pas moins qu'un rejet ou une décompensation endothéliale excessive peut survenir. Dans tous les cas, la perturbation de la fonctionnalité de l'endothélium nécessitera une nouvelle transplantation cornéenne. Le rejet allogénique est une des principales causes d'échec de greffe à court et à long terme, celui-ci pouvant survenir à tout moment dans les années suivant la kératoplastie [212, 270]. Avec l'avènement de la kératoplastie endothéliale (EK), il est désormais possible de greffer

uniquement la partie postérieure de la cornée, se limitant pratiquement à l'endothélium. Cela représente un énorme avantage pour le remplacement d'un endothélium pathologique puisque l'on diminue grandement les complications reliées à la PK (voir section 1.3.1). Néanmoins, les manipulations chirurgicales effectuées lors de kératoplasties (PK ou EK) peuvent entraîner une perte endothéliale excessive pouvant atteindre 67% [178, 204, 210, 219]. Il est donc essentiel de reconstruire un greffon de forte densité cellulaire pouvant résister à cette diminution draconienne [254]. Heureusement, le perfectionnement de la technique d'EK continue, entraînant une diminution constante du niveau de perte endothéliale [271].

3.3. Retombées potentielles

La présente recherche représente un attrait majeur pour l'avancée des travaux sur l'humain permettant le traitement des troubles de l'endothélium cornéen. Des cécités reliées à cette partie de la cornée pourront ainsi éventuellement être évitées à la suite d'une greffe d'un endothélium sain cultivé *in vitro* grâce aux avancées fournies par ce projet de recherche. La *FECD* est une pathologie graduelle s'étalant sur quelques dizaines d'années et atteignant d'abord le centre cornéen (voir section 1.2.1). Dans ce cas-ci, le prélèvement endothélial pourrait être effectué en périphérie cornéenne dans les premières années du diagnostic. D'ailleurs, les CEC situées en périphérie cornéenne possèdent un potentiel de croissance plus grand que celles retrouvées au centre [52, 53, 82, 272]. Pour ce qui est de la *PBK*, le prélèvement endothélial pourrait être réalisé précédemment à la chirurgie oculaire, devançant ainsi le traumatisme. Cependant, le principal facteur limitant de cette approche se situe au niveau de l'âge de l'apparition de ces maladies. Les pathologies de *FECD* et de la *PBK* survenant effectivement chez des personnes d'âge moyen à avancé (voir section 1.2). Cela pourrait compliquer la réussite de la reconstruction d'équivalents endothéliaux cornéens autologues humains, puisqu'il est bien connu que la capacité proliférative des CEC humaines diminue avec l'âge [57, 62, 93, 98]. L'établissement de conditions de culture optimales par un processus semblable à celui utilisé pour les CEC félines, pourrait aider à surmonter cette problématique.

3.4. Perspectives futures

Pour déterminer la fonctionnalité de cet endothélium autologue reconstruit, des études *in vitro* plus poussées de même que des études *in vivo* devront être effectuées et sont prévues prochainement. Des expérimentations fonctionnelles pourront déterminer la capacité de pompage des CEC, responsables de la transparence cornéenne. À la suite de la culture des CEC félines dans le milieu optimal pour leur croissance, différentes analyses devront être réalisées sur le tissu autologue reconstruit. Les évaluations morphologique, histologique et de microscopie électronique seront effectuées afin de vérifier la structure de la monocouche endothéliale [83, 86, 232, 273]. De plus, des études immunohistologiques pourront être faites afin de montrer la présence des protéines ZO-1 et Na⁺/K⁺-ATPase [83, 127, 137, 232, 238]. La fonctionnalité de l'endothélium reconstruit peut également être évaluée en réponse à la ouabaine, un bloqueur des pompes Na⁺/K⁺ qui affecte le pompage ionique entraînant un œdème et une perte de transparence cornéenne [137]. Une évaluation plus quantitative de cette activité peut être obtenue à l'aide d'une chambre d'Ussing [274, 275]. De plus, la qualité de la barrière endothéliale, constituée par les jonctions intercellulaires, peut être évaluée par la mesure de la perméabilité à certaines molécules chimiques [276-278]. D'ailleurs certaines de ces études ont déjà débuté sur l'endothélium cornéen autologue reconstruit au LOEX et montrent des résultats très encourageants. À plus long terme, des études *in vivo* devront être effectuées afin d'évaluer, d'une part, la fonctionnalité de ce tissu reconstruit autogénique, mais également de déterminer, d'autre part, d'éventuelles complications chirurgicales.

Les résultats de cette étude ont permis, dans un premier temps, la culture des CEC félines par la détermination des conditions favorisant une croissance optimale. Ces CEC, possédant un faible potentiel prolifératif, ont pu être cultivées avec succès sur plusieurs passages en maintenant la morphologie endothéliale typique. Dans un deuxième temps, il a été mis en évidence la faisabilité de reconstruire un endothélium cornéen autologue à partir d'un prélèvement endothélial de quelques millimètres carrés. Les CEC obtenues

sont petites, de tailles polygonales, disposées en monocouche et parfaitement accolées les unes aux autres, tel que retrouvées dans le tissu natif. La présence de la protéine des jonctions serrées, ZO-1, a été identifiée par immunofluorescence, suggérant l'intégrité structurelle de la barrière endothéliale du tissu reconstruit. La fonctionnalité réelle de celle-ci demeure cependant à établir. Bref, le remplacement d'un endothélium cornéen pathologique par un tissu autologue reconstruit en laboratoire s'avère être une alternative prometteuse et réalisable visant le traitement des maladies affectant la partie postérieure de la cornée.

CHAPITRE 4- Références

1. Oyster CW. The human eye : structure and function. Sunderland, Mass.: Sinauer Associates; 1999.
2. Kaufman HE, Barron BA, McDonald MB. The cornea. 2nd ed. Boston: Butterworth-Heinemann; 1998.
3. Vision 2020 Global Facts. [cited 2009]; Available from: <http://www.v2020.org>.
4. Foster A, Resnikoff S. The impact of Vision 2020 on global blindness. Eye2005 Oct;19(10):1133-5.
5. Hogan MJ, Alvarado JA, Weddell JE. Histology of the human eye; an atlas and textbook. Philadelphia,: Saunders; 1971.
6. National Eye Institute. [cited 2009]; Available from: <http://www.nei.nih.gov/>.
7. Fine BS, Yanoff M. Ocular histology : a text and atlas. 2d ed. Hagerstown, Md.: Medical Dept., Harper & Row; 1979.
8. Schermer A, Galvin S, Sun TT. Differentiation-related expression of a major 64K corneal keratin in vivo and in culture suggests limbal location of corneal epithelial stem cells. J Cell Biol1986 Jul;103(1):49-62.
9. Schlotzer-Schrehardt U, Kruse FE. Identification and characterization of limbal stem cells. Exp Eye Res2005 Sep;81(3):247-64.
10. Mathers W. Evaporation from the ocular surface. Exp Eye Res2004 Mar;78(3):389-94.
11. Li W, Hayashida Y, Chen YT, Tseng SC. Niche regulation of corneal epithelial stem cells at the limbus. Cell Res2007 Jan;17(1):26-36.
12. Notara M, Daniels JT. Biological principals and clinical potentials of limbal epithelial stem cells. Cell Tissue Res2008 Jan;331(1):135-43.
13. Revoltella RP, Papini S, Rosellini A, Michelini M. Epithelial stem cells of the eye surface. Cell Prolif2007 Aug;40(4):445-61.
14. Nakayasu K, Tanaka M, Konomi H, Hayashi T. Distribution of types I, II, III, IV and V collagen in normal and keratoconus corneas. Ophthalmic Res1986;18(1):1-10.

15. Hayashi S, Osawa T, Tohyama K. Comparative observations on corneas, with special reference to Bowman's layer and Descemet's membrane in mammals and amphibians. *J Morphol*2002 Dec;254(3):247-58.
16. Binder PS, Rock ME, Schmidt KC, Anderson JA. High-voltage electron microscopy of normal human cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci*1991 Jul;32(8):2234-43.
17. Meek KM, Boote C. The organization of collagen in the corneal stroma. *Exp Eye Res*2004 Mar;78(3):503-12.
18. Robert L, Legeais JM, Robert AM, Renard G. Corneal collagens. *Pathol Biol (Paris)*2001 May;49(4):353-63.
19. Michelacci YM. Collagens and proteoglycans of the corneal extracellular matrix. *Braz J Med Biol Res*2003 Aug;36(8):1037-46.
20. Zieske JD. Extracellular matrix and wound healing. *Curr Opin Ophthalmol*2001 Aug;12(4):237-41.
21. Gregory JD, Coster L, Damle SP. Proteoglycans of rabbit corneal stroma. Isolation and partial characterization. *J Biol Chem*1982 Jun 25;257(12):6965-70.
22. Scott JE, Haigh M. 'Small'-proteoglycan:collagen interactions: keratan sulphate proteoglycan associates with rabbit corneal collagen fibrils at the 'a' and 'c' bands. *Biosci Rep*1985 Sep;5(9):765-74.
23. Fischbarg J, Maurice DM. An update on corneal hydration control. *Exp Eye Res*2004 Mar;78(3):537-41.
24. Jester JV, Petroll WM, Cavanagh HD. Corneal stromal wound healing in refractive surgery: the role of myofibroblasts. *Prog Retin Eye Res*1999 May;18(3):311-56.
25. Carlson EC, Wang IJ, Liu CY, Brannan P, Kao CW, Kao WW. Altered KSPG expression by keratocytes following corneal injury. *Mol Vis*2003 Nov 21;9:615-23.
26. Du Y, Funderburgh ML, Mann MM, SundarRaj N, Funderburgh JL. Multipotent stem cells in human corneal stroma. *Stem Cells*2005 Oct;23(9):1266-75.
27. Fini ME. Keratocyte and fibroblast phenotypes in the repairing cornea. *Prog Retin Eye Res*1999 Jul;18(4):529-51.

28. Johnson DH, Bourne WM, Campbell RJ. The ultrastructure of Descemet's membrane. I. Changes with age in normal corneas. *Arch Ophthalmol*1982 Dec;100(12):1942-7.
29. Murphy C, Alvarado J, Juster R. Prenatal and postnatal growth of the human Descemet's membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci*1984 Dec;25(12):1402-15.
30. Danielsen CC. Tensile mechanical and creep properties of Descemet's membrane and lens capsule. *Exp Eye Res*2004 Sep;79(3):343-50.
31. Shuttleworth CA. Type VIII collagen. *Int J Biochem Cell Biol*1997 Oct;29(10):1145-8.
32. Joyce NC. Proliferative capacity of the corneal endothelium. *Prog Retin Eye Res*2003 May;22(3):359-89.
33. Kabosova A, Azar DT, Bannikov GA, Campbell KP, Durbeej M, Ghohestani RF, et al. Compositional differences between infant and adult human corneal basement membranes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*2007 Nov;48(11):4989-99.
34. Lydataki S, Lesniewska E, Tsilimbaris MK, Le Grimellec C, Rochette L, Goudonnet JP, et al. Observation of the posterior endothelial surface of the rabbit cornea using atomic force microscopy. *Cornea*2003 Oct;22(7):651-64.
35. Joyce NC. Cell cycle status in human corneal endothelium. *Exp Eye Res*2005 Dec;81(6):629-38.
36. Murphy C, Alvarado J, Juster R, Maglio M. Prenatal and postnatal cellularity of the human corneal endothelium. A quantitative histologic study. *Invest Ophthalmol Vis Sci*1984 Mar;25(3):312-22.
37. Bourne WM, Nelson LR, Hodge DO. Central corneal endothelial cell changes over a ten-year period. *Invest Ophthalmol Vis Sci*1997 Mar;38(3):779-82.
38. Farquhar MG, Palade GE. Junctional complexes in various epithelia. *J Cell Biol*1963 May;17:375-412.
39. Barry PA, Petroll WM, Andrews PM, Cavanagh HD, Jester JV. The spatial organization of corneal endothelial cytoskeletal proteins and their relationship to the apical junctional complex. *Invest Ophthalmol Vis Sci*1995 May;36(6):1115-24.
40. Bourne WM. Biology of the corneal endothelium in health and disease. *Eye*2003 Nov;17(8):912-8.

41. Wulle KG. Electron microscopy of the fetal development of the corneal endothelium and Descemet's membrane of the human eye. *Invest Ophthalmol*1972 Nov;11(11):897-904.
42. Diecke FP, Ma L, Iserovich P, Fischbarg J. Corneal endothelium transports fluid in the absence of net solute transport. *Biochim Biophys Acta*2007 Sep;1768(9):2043-8.
43. Petroll WM, Hsu JK, Bean J, Cavanagh HD, Jester JV. The spatial organization of apical junctional complex-associated proteins in feline and human corneal endothelium. *Curr Eye Res*1999 Jan;18(1):10-9.
44. Gottsch JD, Seitzman GD, Margulies EH, Bowers AL, Michels AJ, Saha S, et al. Gene expression in donor corneal endothelium. *Arch Ophthalmol*2003 Feb;121(2):252-8.
45. Dikstein S, Maurice DM. The metabolic basis to the fluid pump in the cornea. *J Physiol*1972 Feb;221(1):29-41.
46. Hodson S, Miller F. The bicarbonate ion pump in the endothelium which regulates the hydration of rabbit cornea. *J Physiol*1976 Dec;263(3):563-77.
47. Leuenberger PM, Novikoff AB. Localization of transport adenosine triphosphatase in rat cornea. *J Cell Biol*1974 Mar;60(3):721-31.
48. Tervo T, Palva M, Arto P. Transport adenosine triphosphatase activity in the rat cornea. *Cell Tissue Res*1977 Jan 24;176(4):431-43.
49. McGowan SL, Edelhauser HF, Pfister RR, Whikehart DR. Stem cell markers in the human posterior limbus and corneal endothelium of unwounded and wounded corneas. *Mol Vis*2007;13:1984-2000.
50. Yamagami S, Yokoo S, Mimura T, Takato T, Araie M, Amano S. Distribution of precursors in human corneal stromal cells and endothelial cells. *Ophthalmology*2007 Mar;114(3):433-9.
51. Yokoo S, Yamagami S, Yanagi Y, Uchida S, Mimura T, Usui T, et al. Human corneal endothelial cell precursors isolated by sphere-forming assay. *Invest Ophthalmol Vis Sci*2005 May;46(5):1626-31.
52. Mimura T, Joyce NC. Replication competence and senescence in central and peripheral human corneal endothelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*2006 Apr;47(4):1387-96.

53. Paull AC, Whikehart DR. Expression of the p53 family of proteins in central and peripheral human corneal endothelial cells. *Mol Vis*2005;11:328-34.
54. Carmeliet P, Tessier-Lavigne M. Common mechanisms of nerve and blood vessel wiring. *Nature*2005 Jul 14;436(7048):193-200.
55. Weinstein BM. Vessels and nerves: marching to the same tune. *Cell*2005 Feb 11;120(3):299-302.
56. Muller LJ, Marfurt CF, Kruse F, Tervo TM. Corneal nerves: structure, contents and function. *Exp Eye Res*2003 May;76(5):521-42.
57. Enomoto K, Mimura T, Harris DL, Joyce NC. Age differences in cyclin-dependent kinase inhibitor expression and rb hyperphosphorylation in human corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*2006 Oct;47(10):4330-40.
58. Joyce NC, Harris DL, Zieske JD. Mitotic inhibition of corneal endothelium in neonatal rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci*1998 Dec;39(13):2572-83.
59. Joyce NC, Meklir B, Joyce SJ, Zieske JD. Cell cycle protein expression and proliferative status in human corneal cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*1996 Mar;37(4):645-55.
60. Joyce NC, Navon SE, Roy S, Zieske JD. Expression of cell cycle-associated proteins in human and rabbit corneal endothelium in situ. *Invest Ophthalmol Vis Sci*1996 Jul;37(8):1566-75.
61. Kikuchi M, Zhu C, Senoo T, Obara Y, Joyce NC. p27kip1 siRNA induces proliferation in corneal endothelial cells from young but not older donors. *Invest Ophthalmol Vis Sci*2006 Nov;47(11):4803-9.
62. Song Z, Wang Y, Xie L, Zang X, Yin H. Expression of senescence-related genes in human corneal endothelial cells. *Mol Vis*2008;14:161-70.
63. Xiao X, Wang Y, Gong H, Chen P, Xie L. Molecular evidence of senescence in corneal endothelial cells of senescence-accelerated mice. *Mol Vis*2009;15:747-61.
64. Besson A, Dowdy SF, Roberts JM. CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond. *Dev Cell*2008 Feb;14(2):159-69.
65. Hoppenreijns VP, Pels E, Vrensen GF, Oosting J, Treffers WF. Effects of human epidermal growth factor on endothelial wound healing of human corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci*1992 May;33(6):1946-57.

66. Hoppenreijns VP, Pels E, Vrensen GF, Treffers WF. Basic fibroblast growth factor stimulates corneal endothelial cell growth and endothelial wound healing of human corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci*1994 Mar;35(3):931-44.
67. Hoppenreijns VP, Pels E, Vrensen GF, Treffers WF. Effects of platelet-derived growth factor on endothelial wound healing of human corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci*1994 Jan;35(1):150-61.
68. Van Horn DL, Hyndiuk RA. Endothelial wound repair in primate cornea. *Exp Eye Res*1975 Aug;21(2):113-24.
69. Lowry GM. Corneal endothelium in vitro: characterization by ultrastructure and histochemistry. *Invest Ophthalmol*1966 Aug;5(4):355-66.
70. Stocker FW, Eiring A, Georgiade R, Georgiade N. A tissue culture technique for growing corneal epithelial, stromal, and endothelial tissues separately. *Am J Ophthalmol*1958 Nov;46(5 Part 2):294-8.
71. Baum JL, Niedra R, Davis C, Yue BY. Mass culture of human corneal endothelial cells. *Arch Ophthalmol*1979 Jun;97(6):1136-40.
72. Nayak SK, Binder PS. The growth of endothelium from human corneal rims in tissue culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci*1984 Oct;25(10):1213-6.
73. Nayak SK, Samples JR, Deg JK, Binder PS. Growth characteristics of primate (baboon) corneal endothelium in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci*1986 Apr;27(4):607-11.
74. Perlman M, Baum JL. The mass culture of rabbit corneal endothelial cells. *Arch Ophthalmol*1974 Sep;92(3):235-7.
75. Yue BY, Sugar J, Gilboy JE, Elvart JL. Growth of human corneal endothelial cells in culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci*1989 Feb;30(2):248-53.
76. Bednarz J, Doubilei V, Wollnik PC, Engelmann K. Effect of three different media on serum free culture of donor corneas and isolated human corneal endothelial cells. *Br J Ophthalmol*2001 Dec;85(12):1416-20.
77. Engelmann K, Friedl P. Optimization of culture conditions for human corneal endothelial cells. *In Vitro Cell Dev Biol*1989 Nov;25(11):1065-72.
78. Engelmann K, Friedl P. Growth of human corneal endothelial cells in a serum-reduced medium. *Cornea*1995 Jan;14(1):62-70.

79. Li W, Sabater AL, Chen YT, Hayashida Y, Chen SY, He H, et al. A novel method of isolation, preservation, and expansion of human corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*2007 Feb;48(2):614-20.
80. Ishino Y, Sano Y, Nakamura T, Connon CJ, Rigby H, Fullwood NJ, et al. Amniotic membrane as a carrier for cultivated human corneal endothelial cell transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*2004 Mar;45(3):800-6.
81. Raymond GM, Jumblatt MM, Bartels SP, Neufeld AH. Rabbit corneal endothelial cells in vitro: effects of EGF. *Invest Ophthalmol Vis Sci*1986 Apr;27(4):474-9.
82. Bednarz J, Rodokanaki-von Schrenck A, Engelmann K. Different characteristics of endothelial cells from central and peripheral human cornea in primary culture and after subculture. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*1998 Feb;34(2):149-53.
83. Chen KH, Azar D, Joyce NC. Transplantation of adult human corneal endothelium ex vivo: a morphologic study. *Cornea*2001 Oct;20(7):731-7.
84. Joyce NC, Zhu CC. Human corneal endothelial cell proliferation: potential for use in regenerative medicine. *Cornea*2004 Nov;23(8 Suppl):S8-S19.
85. Patel SP, Bourne WM. Corneal endothelial cell proliferation: a function of cell density. *Invest Ophthalmol Vis Sci*2009 Jun;50(6):2742-6.
86. Proulx S, Audet C, d'Arc Uwamaliya J, Deschambeault A, Carrier P, Giasson CJ, et al. Tissue Engineering of Feline Corneal Endothelium Using a Devitalized Human Cornea as Carrier. *Tissue Eng Part A*2009 Jan 6.
87. Proulx S, Bensaoula T, Nada O, Audet C, d'Arc Uwamaliya J, Devaux A, et al. Transplantation of a tissue-engineered corneal endothelium reconstructed on a devitalized carrier in the feline model. *Invest Ophthalmol Vis Sci*2009 Jun;50(6):2686-94.
88. Proulx S, Bourget JM, Gagnon N, Martel S, Deschambeault A, Carrier P, et al. Optimization of culture conditions for porcine corneal endothelial cells. *Mol Vis*2007;13:524-33.
89. Senoo T, Obara Y, Joyce NC. EDTA: a promoter of proliferation in human corneal endothelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*2000 Sep;41(10):2930-5.
90. Xie L, Gebhardt BM. A simplified technique for the short-term tissue culture of rabbit corneal cells. *In Vitro Cell Dev Biol*1989 Jan;25(1):20-2.

91. Engelmann K, Bohnke M, Friedl P. Isolation and long-term cultivation of human corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*1988 Nov;29(11):1656-62.
92. Engelmann K, Drexler D, Bohnke M. Transplantation of adult human or porcine corneal endothelial cells onto human recipients in vitro. Part I: Cell culturing and transplantation procedure. *Cornea*1999 Mar;18(2):199-206.
93. Zhu C, Joyce NC. Proliferative response of corneal endothelial cells from young and older donors. *Invest Ophthalmol Vis Sci*2004 Jun;45(6):1743-51.
94. Wilson SE, Schultz GS, Chegini N, Weng J, He YG. Epidermal growth factor, transforming growth factor alpha, transforming growth factor beta, acidic fibroblast growth factor, basic fibroblast growth factor, and interleukin-1 proteins in the cornea. *Exp Eye Res*1994 Jul;59(1):63-71.
95. Gospodarowicz D, Vlodavsky I, Savion N. The role of fibroblast growth factor and the extracellular matrix in the control of proliferation and differentiation of corneal endothelial cells. *Vision Res*1981;21(1):87-103.
96. Kay EP, Gu X, Ninomiya Y, Smith RE. Corneal endothelial modulation: a factor released by leukocytes induces basic fibroblast growth factor that modulates cell shape and collagen. *Invest Ophthalmol Vis Sci*1993 Mar;34(3):663-72.
97. Bohnke M, Egli P, Engelmann K. Transplantation of cultured adult human or porcine corneal endothelial cells onto human recipients in vitro. Part II: Evaluation in the scanning electron microscope. *Cornea*1999 Mar;18(2):207-13.
98. Senoo T, Joyce NC. Cell cycle kinetics in corneal endothelium from old and young donors. *Invest Ophthalmol Vis Sci*2000 Mar;41(3):660-7.
99. Couch JM, Cullen P, Casey TA, Fabre JW. Mitotic activity of corneal endothelial cells in organ culture with recombinant human epidermal growth factor. *Ophthalmology*1987 Jan;94(1):1-6.
100. Fabricant RN, Alpar AJ, Centifanto YM, Kaufman HE. Epidermal growth factor receptors on corneal endothelium. *Arch Ophthalmol*1981 Feb;99(2):305-8.
101. Wilson SE, Lloyd SA. Epidermal growth factor and its receptor, basic fibroblast growth factor, transforming growth factor beta-1, and interleukin-1 alpha messenger RNA production in human corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*1991 Sep;32(10):2747-56.

102. Hyldahl L. Control of cell proliferation in the human embryonic cornea: an autoradiographic analysis of the effect of growth factors on DNA synthesis in endothelial and stromal cells in organ culture and after explantation in vitro. *J Cell Sci*1986 Jul;83:1-21.
103. Imanishi J, Kamiyama K, Iguchi I, Kita M, Sotozono C, Kinoshita S. Growth factors: importance in wound healing and maintenance of transparency of the cornea. *Prog Retin Eye Res*2000 Jan;19(1):113-29.
104. Raphael B, Kerr NC, Shimizu RW, Lass JH, Crouthamel KC, Glaser SR, et al. Enhanced healing of cat corneal endothelial wounds by epidermal growth factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci*1993 Jun;34(7):2305-12.
105. Samples JR, Binder PS, Nayak SK. Propagation of human corneal endothelium in vitro effect of growth factors. *Exp Eye Res*1991 Feb;52(2):121-8.
106. Grant MB, Khaw PT, Schultz GS, Adams JL, Shimizu RW. Effects of epidermal growth factor, fibroblast growth factor, and transforming growth factor-beta on corneal cell chemotaxis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*1992 Nov;33(12):3292-301.
107. Kent KD, Bomser JA. Bovine pituitary extract provides remarkable protection against oxidative stress in human prostate epithelial cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*2003 Sep-Oct;39(8-9):388-94.
108. Blesch A. Neurotrophic factors in neurodegeneration. *Brain Pathol*2006 Oct;16(4):295-303.
109. Chao MV, Rajagopal R, Lee FS. Neurotrophin signalling in health and disease. *Clin Sci (Lond)*2006 Feb;110(2):167-73.
110. Chen KS, Nishimura MC, Armanini MP, Crowley C, Spencer SD, Phillips HS. Disruption of a single allele of the nerve growth factor gene results in atrophy of basal forebrain cholinergic neurons and memory deficits. *J Neurosci*1997 Oct 1;17(19):7288-96.
111. Bard JB, Bansal MK, Ross AS. The extracellular matrix of the developing cornea: diversity, deposition and function. *Development*1988;103 Suppl:195-205.
112. Creuzet S, Vincent C, Couly G. Neural crest derivatives in ocular and periocular structures. *Int J Dev Biol*2005;49(2-3):161-71.

113. Lambiase A, Bonini S, Micera A, Rama P, Aloe L. Expression of nerve growth factor receptors on the ocular surface in healthy subjects and during manifestation of inflammatory diseases. *Invest Ophthalmol Vis Sci*1998 Jun;39(7):1272-5.
114. Lambiase A, Manni L, Bonini S, Rama P, Micera A, Aloe L. Nerve growth factor promotes corneal healing: structural, biochemical, and molecular analyses of rat and human corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci*2000 Apr;41(5):1063-9.
115. Woost PG, Jumblatt MM, Eiferman RA, Schultz GS. Growth factors and corneal endothelial cells: I. Stimulation of bovine corneal endothelial cell DNA synthesis by defined growth factors. *Cornea*1992 Jan;11(1):1-10.
116. Gong N, Pleyer U, Vogt K, Anegon I, Flugel A, Volk HD, et al. Local overexpression of nerve growth factor in rat corneal transplants improves allograft survival. *Invest Ophthalmol Vis Sci*2007 Mar;48(3):1043-52.
117. Birch TW, Dann WJ. Ascorbic acid in the eye-lens and aqueous humour of the ox. *Biochem J*1934;28(2):638-41.
118. Richer SP, Rose RC. Water soluble antioxidants in mammalian aqueous humor: interaction with UV B and hydrogen peroxide. *Vision Res*1998 Oct;38(19):2881-8.
119. Nemet AY, Assia EI, Meyerstein D, Meyerstein N, Gedanken A, Topaz M. Protective effect of free-radical scavengers on corneal endothelial damage in phacoemulsification. *J Cataract Refract Surg*2007 Feb;33(2):310-5.
120. Rubowitz A, Assia EI, Rosner M, Topaz M. Antioxidant protection against corneal damage by free radicals during phacoemulsification. *Invest Ophthalmol Vis Sci*2003 May;44(5):1866-70.
121. Suzuki H, Sato S, Murano N, Matsui H, Oharazawa H, Takahashi H. Morphological observations of rat corneal endothelial cells after exposure to ozonated solution. *Jpn J Ophthalmol*2009 Mar;53(2):151-8.
122. Aboalchamat B, Engelmann K, Bohnke M, Eggli P, Bednarz J. Morphological and functional analysis of immortalized human corneal endothelial cells after transplantation. *Exp Eye Res*1999 Nov;69(5):547-53.
123. Gospodarowicz D, Greenburg G. The coating of bovine and rabbit corneas denuded of their endothelium with bovine corneal endothelial cells. *Exp Eye Res*1979 Mar;28(3):249-65.

124. Blake DA, Yu H, Young DL, Caldwell DR. Matrix stimulates the proliferation of human corneal endothelial cells in culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci*1997 May;38(6):1119-29.
125. Miyata K, Drake J, Osakabe Y, Hosokawa Y, Hwang D, Soya K, et al. Effect of donor age on morphologic variation of cultured human corneal endothelial cells. *Cornea*2001 Jan;20(1):59-63.
126. Pistsov MY, Sadovnikova E, Danilov SM. Human corneal endothelial cells: isolation, characterization and long-term cultivation. *Exp Eye Res*1988 Sep;47(3):403-14.
127. Sumide T, Nishida K, Yamato M, Ide T, Hayashida Y, Watanabe K, et al. Functional human corneal endothelial cell sheets harvested from temperature-responsive culture surfaces. *FASEB J*2006 Feb;20(2):392-4.
128. Dinbergs ID, Brown L, Edelman ER. Cellular response to transforming growth factor-beta1 and basic fibroblast growth factor depends on release kinetics and extracellular matrix interactions. *J Biol Chem*1996 Nov 22;271(47):29822-9.
129. Jorissen RN, Walker F, Pouliot N, Garrett TP, Ward CW, Burgess AW. Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Exp Cell Res*2003 Mar 10;284(1):31-53.
130. Maldonado BA, Furcht LT. Epidermal growth factor stimulates integrin-mediated cell migration of cultured human corneal epithelial cells on fibronectin and arginine-glycine-aspartic acid peptide. *Invest Ophthalmol Vis Sci*1995 Sep;36(10):2120-6.
131. Hsieh P, Baum J. Effects of fibroblastic and endothelial extracellular matrices on corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*1985 Apr;26(4):457-63.
132. Bednarz J, Teifel M, Friedl P, Engelmann K. Immortalization of human corneal endothelial cells using electroporation protocol optimized for human corneal endothelial and human retinal pigment epithelial cells. *Acta Ophthalmol Scand*2000 Apr;78(2):130-6.
133. Cho KS, Joo CK, Williams JS, Ambroziak BS, Bassnett SS, Pepose JS, et al. Stimulation of quiescent corneal endothelial cells by direct delivery of the SV40 large T-antigen protein. *Curr Eye Res*2000 Jan;20(1):58-63.

134. Feldman ST, Gjerset R, Gately D, Chien KR, Feramisco JR. Expression of SV40 virus large T antigen by recombinant adenoviruses activates proliferation of corneal endothelium in vitro. *J Clin Invest*1993 Apr;91(4):1713-20.
135. Hsiao CH, Sah WJ, Soya K, Ma DH, Im YW, Zhang F, et al. Effects of SV40 T antigen transduction on human corneal endothelial cell wound healing in vitro. *J Ocul Pharmacol Ther*2005 Oct;21(5):353-66.
136. Wilson SE, Lloyd SA, He YG, McCash CS. Extended life of human corneal endothelial cells transfected with the SV40 large T antigen. *Invest Ophthalmol Vis Sci*1993 May;34(6):2112-23.
137. Griffith M, Osborne R, Munger R, Xiong X, Doillon CJ, Laycock NL, et al. Functional human corneal equivalents constructed from cell lines. *Science*1999 Dec 10;286(5447):2169-72.
138. Stevenson BR, Siliciano JD, Mooseker MS, Goodenough DA. Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. *J Cell Biol*1986 Sep;103(3):755-66.
139. Chen WL, Lin CT, Lo HF, Lee JW, Tu IH, Hu FR. The role of protein tyrosine phosphorylation in the cell-cell interactions, junctional permeability and cell cycle control in post-confluent bovine corneal endothelial cells. *Exp Eye Res*2007 Aug;85(2):259-69.
140. Gumbiner B. Structure, biochemistry, and assembly of epithelial tight junctions. *Am J Physiol*1987 Dec;253(6 Pt 1):C749-58.
141. Gumbiner B, Lowenkopf T, Apatira D. Identification of a 160-kDa polypeptide that binds to the tight junction protein ZO-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*1991 Apr 15;88(8):3460-4.
142. Schneeberger EE, Lynch RD. Structure, function, and regulation of cellular tight junctions. *Am J Physiol*1992 Jun;262(6 Pt 1):L647-61.
143. Anderson JM, Van Itallie CM, Peterson MD, Stevenson BR, Carew EA, Mooseker MS. ZO-1 mRNA and protein expression during tight junction assembly in Caco-2 cells. *J Cell Biol*1989 Sep;109(3):1047-56.

144. Furuse M, Itoh M, Hirase T, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S. Direct association of occludin with ZO-1 and its possible involvement in the localization of occludin at tight junctions. *J Cell Biol*1994 Dec;127(6 Pt 1):1617-26.
145. Fanning AS, Jameson BJ, Jesaitis LA, Anderson JM. The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton. *J Biol Chem*1998 Nov 6;273(45):29745-53.
146. Schmidt A, Utepbergenov DI, Mueller SL, Beyermann M, Schneider-Mergener J, Krause G, et al. Occludin binds to the SH3-hinge-GuK unit of zonula occludens protein 1: potential mechanism of tight junction regulation. *Cell Mol Life Sci*2004 Jun;61(11):1354-65.
147. Stiemke MM, McCartney MD, Cantu-Crouch D, Edelhauser HF. Maturation of the corneal endothelial tight junction. *Invest Ophthalmol Vis Sci*1991 Sep;32(10):2757-65.
148. Siliciano JD, Goodenough DA. Localization of the tight junction protein, ZO-1, is modulated by extracellular calcium and cell-cell contact in Madin-Darby canine kidney epithelial cells. *J Cell Biol*1988 Dec;107(6 Pt 1):2389-99.
149. Mitic LL, Anderson JM. Molecular architecture of tight junctions. *Annu Rev Physiol*1998;60:121-42.
150. Kaye GI, Mishima S, Cole JD, Kaye NW. Studies on the cornea. VII. Effects of perfusion with a Ca⁺⁺-free medium on the corneal endothelium. *Invest Ophthalmol*1968 Feb;7(1):53-66.
151. Stern ME, Edelhauser HF, Pederson HJ, Staatz WD. Effects of ionophores X537a and A23187 and calcium-free medium on corneal endothelial morphology. *Invest Ophthalmol Vis Sci*1981 Apr;20(4):497-508.
152. Petroll WM, Barry-Lane PA, Cavanagh HD, Jester JV. ZO-1 reorganization and myofibroblast transformation of corneal endothelial cells after freeze injury in the cat. *Exp Eye Res*1997 Feb;64(2):257-67.
153. Yee RW, Geroski DH, Matsuda M, Champeau EJ, Meyer LA, Edelhauser HF. Correlation of corneal endothelial pump site density, barrier function, and morphology in wound repair. *Invest Ophthalmol Vis Sci*1985 Sep;26(9):1191-201.

154. Maurice DM. The location of the fluid pump in the cornea. *J Physiol*1972 Feb;221(1):43-54.
155. Bonanno JA. Identity and regulation of ion transport mechanisms in the corneal endothelium. *Prog Retin Eye Res*2003 Jan;22(1):69-94.
156. Fischbarg J. On the mechanism of fluid transport across corneal endothelium and epithelia in general. *J Exp Zool A Comp Exp Biol*2003 Nov 1;300(1):30-40.
157. Kuang K, Li Y, Yiming M, Sanchez JM, Iserovich P, Cragoe EJ, et al. Intracellular [Na⁺], Na⁺ pathways, and fluid transport in cultured bovine corneal endothelial cells. *Exp Eye Res*2004 Jul;79(1):93-103.
158. Li J, Sun XC, Bonanno JA. Role of NBC1 in apical and basolateral HCO₃⁻-permeabilities and transendothelial HCO₃⁻ fluxes in bovine corneal endothelium. *Am J Physiol Cell Physiol*2005 Mar;288(3):C739-46.
159. Sun XC, Bonanno JA, Jelamskii S, Xie Q. Expression and localization of Na⁽⁺⁾-HCO₃⁽⁻⁾ cotransporter in bovine corneal endothelium. *Am J Physiol Cell Physiol*2000 Nov;279(5):C1648-55.
160. Bonanno JA, Giasson C. Intracellular pH regulation in fresh and cultured bovine corneal endothelium. II. Na⁺:HCO₃⁻ cotransport and Cl⁻/HCO₃⁻ exchange. *Invest Ophthalmol Vis Sci*1992 Oct;33(11):3068-79.
161. Fischbarg J, Lim JJ. Role of cations, anions and carbonic anhydrase in fluid transport across rabbit corneal endothelium. *J Physiol*1974 Sep;241(3):647-75.
162. Hodson S. The regulation of corneal hydration by a salt pump requiring the presence of sodium and bicarbonate ions. *J Physiol*1974 Jan;236(2):271-302.
163. Wigham CG, Guggenheim JA, Hodson SA. Sodium movement into and out of corneal endothelium. *Pflugers Arch*1994 Oct;428(5-6):577-82.
164. Riley MV, Winkler BS, Peters MI, Czajkowski CA. Relationship between fluid transport and in situ inhibition of Na⁽⁺⁾-K⁺ adenosine triphosphatase in corneal endothelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*1994 Feb;35(2):560-7.
165. Stiemke MM, Roman RJ, Palmer ML, Edelhauser HF. Sodium activity in the aqueous humor and corneal stroma of the rabbit. *Exp Eye Res*1992 Sep;55(3):425-33.

166. Crawford KM, Ernst SA, Meyer RF, MacCallum DK. NaK-ATPase pump sites in cultured bovine corneal endothelium of varying cell density at confluence. *Invest Ophthalmol Vis Sci*1995 Jun;36(7):1317-26.
167. Geroski DH, Edelhauser HF. Quantitation of Na/K ATPase pump sites in the rabbit corneal endothelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*1984 Sep;25(9):1056-60.
168. Bourne RR, Minassian DC, Dart JK, Rosen P, Kaushal S, Wingate N. Effect of cataract surgery on the corneal endothelium: modern phacoemulsification compared with extracapsular cataract surgery. *Ophthalmology*2004 Apr;111(4):679-85.
169. Gagnon MM, Boisjoly HM, Brunette I, Charest M, Amyot M. Corneal endothelial cell density in glaucoma. *Cornea*1997 May;16(3):314-8.
170. Larsson LI, Bourne WM, Pach JM, Brubaker RF. Structure and function of the corneal endothelium in diabetes mellitus type I and type II. *Arch Ophthalmol*1996 Jan;114(1):9-14.
171. Dorrepaal SJ, Cao KY, Slomovic AR. Indications for penetrating keratoplasty in a tertiary referral centre in Canada, 1996-2004. *Can J Ophthalmol*2007 Apr;42(2):244-50.
172. Klintworth GK. Corneal dystrophies. *Orphanet J Rare Dis*2009;4:7.
173. Laing RA, Leibowitz HM, Oak SS, Chang R, Berrospi AR, Theodore J. Endothelial mosaic in Fuchs' dystrophy. A qualitative evaluation with the specular microscope. *Arch Ophthalmol*1981 Jan;99(1):80-3.
174. Wilson SE, Bourne WM, Brubaker RF. Effect of dexamethasone on corneal endothelial function in Fuchs' dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*1988 Mar;29(3):357-61.
175. Borderie VM, Baudrimont M, Vallee A, Ereau TL, Gray F, Laroche L. Corneal endothelial cell apoptosis in patients with Fuchs' dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*2000 Aug;41(9):2501-5.
176. . Washington, DC2008.
177. Cameron MD, Poyer JF, Aust SD. Identification of free radicals produced during phacoemulsification. *J Cataract Refract Surg*2001 Mar;27(3):463-70.
178. Ing JJ, Ing HH, Nelson LR, Hodge DO, Bourne WM. Ten-year postoperative results of penetrating keratoplasty. *Ophthalmology*1998 Oct;105(10):1855-65.

179. Mencucci R, Ponchietti C, Virgili G, Giansanti F, Menchini U. Corneal endothelial damage after cataract surgery: Microincision versus standard technique. *J Cataract Refract Surg*2006 Aug;32(8):1351-4.
180. Van Dooren B, Mulder PG, Nieuwendaal CP, Beekhuis WH, Melles GR. Endothelial cell density after posterior lamellar keratoplasty (Melles techniques): 3 years follow-up. *Am J Ophthalmol*2004 Aug;138(2):211-7.
181. Ljubimov AV, Burgeson RE, Butkowski RJ, Couchman JR, Wu RR, Ninomiya Y, et al. Extracellular matrix alterations in human corneas with bullous keratopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*1996 May;37(6):997-1007.
182. Mamalis N. Explantation of intraocular lenses. *Curr Opin Ophthalmol*2000 Aug;11(4):289-95.
183. Narayanan R, Gaster RN, Kenney MC. Pseudophakic corneal edema: A review of mechanisms and treatments. *Cornea*2006 Oct;25(9):993-1004.
184. Sugar A. An analysis of corneal endothelial and graft survival in pseudophakic bullous keratopathy. *Trans Am Ophthalmol Soc*1989;87:762-801.
185. Carlson AN, Stewart WC, Tso PC. Intraocular lens complications requiring removal or exchange. *Surv Ophthalmol*1998 Mar-Apr;42(5):417-40.
186. McCartney MD, Robertson DP, Wood TO, McLaughlin BJ. ATPase pump site density in human dysfunctional corneal endothelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*1987 Dec;28(12):1955-62.
187. Claesson M, Armitage WJ, Stenevi U. Corneal oedema after cataract surgery: predisposing factors and corneal graft outcome. *Acta Ophthalmol*2009 Mar;87(2):154-9.
188. Kang PC, Klintworth GK, Kim T, Carlson AN, Adelman R, Stinnett S, et al. Trends in the indications for penetrating keratoplasty, 1980-2001. *Cornea*2005 Oct;24(7):801-3.
189. Dobbins KR, Price FW, Jr., Whitson WE. Trends in the indications for penetrating keratoplasty in the midwestern United States. *Cornea*2000 Nov;19(6):813-6.
190. Darlington JK, Adrean SD, Schwab IR. Trends of penetrating keratoplasty in the United States from 1980 to 2004. *Ophthalmology*2006 Dec;113(12):2171-5.
191. Smith RE, McDonald HR, Nesburn AB, Minckler DS. Penetrating keratoplasty: changing indications, 1947 to 1978. *Arch Ophthalmol*1980 Jul;98(7):1226-9.

192. Cornea Donation & Transplantation Statistics. [cited 2009]; Available from: <http://www.restoresight.org/donation/statistics.htm>.
193. Chu W. The past twenty-five years in eye banking. *Cornea*2000 Sep;19(5):754-65.
194. Maeno A, Naor J, Lee HM, Hunter WS, Rootman DS. Three decades of corneal transplantation: indications and patient characteristics. *Cornea*2000 Jan;19(1):7-11.
195. Mamalis N, Anderson CW, Kreisler KR, Lundergan MK, Olson RJ. Changing trends in the indications for penetrating keratoplasty. *Arch Ophthalmol*1992 Oct;110(10):1409-11.
196. Sugar A, Sugar J. Techniques in penetrating keratoplasty: a quarter century of development. *Cornea*2000 Sep;19(5):603-10.
197. Castroviejo R. Keratoplasty-Microscopic Study of the Corneal Grafts. *Trans Am Ophthalmol Soc*1937;35:355-85.
198. Castroviejo R. Total Penetrating Keratoplasty: Preliminary Report. *Trans Am Ophthalmol Soc*1950;48:297-312.
199. Keratoconus Cornea Transplant. [cited 2009]; Available from: <http://www.keratoconustreatmentcenters.com>
200. Pineros O, Cohen EJ, Rapuano CJ, Laibson PR. Long-term results after penetrating keratoplasty for Fuchs' endothelial dystrophy. *Arch Ophthalmol*1996 Jan;114(1):15-8.
201. Tan DT, Anshu A, Mehta JS. Paradigm shifts in corneal transplantation. *Ann Acad Med Singapore*2009 Apr;38(4):332-8.
202. Terry MA, Ousley PJ. Deep lamellar endothelial keratoplasty: early complications and their management. *Cornea*2006 Jan;25(1):37-43.
203. Terry MA. Deep lamellar endothelial keratoplasty (DLEK): pursuing the ideal goals of endothelial replacement. *Eye*2003 Nov;17(8):982-8.
204. Bahar I, Kaiserman I, McAllum P, Slomovic A, Rootman D. Comparison of posterior lamellar keratoplasty techniques to penetrating keratoplasty. *Ophthalmology*2008 Sep;115(9):1525-33.
205. Maloney RK. Misleading tonometry after LASIK. *J Cataract Refract Surg*2001 May;27(5):650.

206. O'Doherty M, O'Keefe M, Kelleher C. Five year follow up of laser in situ keratomileusis for all levels of myopia. *Br J Ophthalmol*2006 Jan;90(1):20-3.
207. Melles GR, Lander F, Beekhuis WH, Remeijer L, Binder PS. Posterior lamellar keratoplasty for a case of pseudophakic bullous keratopathy. *Am J Ophthalmol*1999 Mar;127(3):340-1.
208. Melles GR, Remeijer L, Geerards AJ, Beekhuis WH. The future of lamellar keratoplasty. *Curr Opin Ophthalmol*1999 Aug;10(4):253-9.
209. Corneal Transplantation. [cited 2008]; Available from: www.eyesite.ca.
210. Terry MA, Ousley PJ. Deep lamellar endothelial keratoplasty visual acuity, astigmatism, and endothelial survival in a large prospective series. *Ophthalmology*2005 Sep;112(9):1541-8.
211. Allan BD, Terry MA, Price FW, Jr., Price MO, Griffin NB, Claesson M. Corneal transplant rejection rate and severity after endothelial keratoplasty. *Cornea*2007 Oct;26(9):1039-42.
212. Jonas JB, Rank RM, Budde WM. Immunologic graft reactions after allogenic penetrating keratoplasty. *Am J Ophthalmol*2002 Apr;133(4):437-43.
213. Melles GR, Lander F, van Dooren BT, Pels E, Beekhuis WH. Preliminary clinical results of posterior lamellar keratoplasty through a sclerocorneal pocket incision. *Ophthalmology*2000 Oct;107(10):1850-6; discussion 7.
214. Price FW, Jr., Price MO. Descemet's stripping with endothelial keratoplasty in 200 eyes: Early challenges and techniques to enhance donor adherence. *J Cataract Refract Surg*2006 Mar;32(3):411-8.
215. Thompson RW, Jr., Price MO, Bowers PJ, Price FW, Jr. Long-term graft survival after penetrating keratoplasty. *Ophthalmology*2003 Jul;110(7):1396-402.
216. Price FW, Jr., Price MO. Does endothelial cell survival differ between DSEK and standard PK? *Ophthalmology*2009 Mar;116(3):367-8.
217. Terry MA. The evolution of lamellar grafting techniques over twenty-five years. *Cornea*2000 Sep;19(5):611-6.
218. Melles GR, Wijdh RH, Nieuwendaal CP. A technique to excise the descemet membrane from a recipient cornea (descemetorhexis). *Cornea*2004 Apr;23(3):286-8.

219. Koenig SB, Covert DJ, Dupps WJ, Jr., Meisler DM. Visual acuity, refractive error, and endothelial cell density six months after Descemet stripping and automated endothelial keratoplasty (DSAEK). *Cornea*2007 Jul;26(6):670-4.
220. Price MO, Price FW, Jr. Descemet's stripping with endothelial keratoplasty: comparative outcomes with microkeratome-dissected and manually dissected donor tissue. *Ophthalmology*2006 Nov;113(11):1936-42.
221. Gorovoy MS. Descemet-stripping automated endothelial keratoplasty. *Cornea*2006 Sep;25(8):886-9.
222. Griffith M, Jackson WB, Lagali N, Merrett K, Li F, Fagerholm P. Artificial corneas: a regenerative medicine approach. *Eye*2009 Jan 16.
223. Gospodarowicz D, Greenburg G, Alvarado J. Transplantation of cultured bovine corneal endothelial cells to rabbit cornea: clinical implications for human studies. *Proc Natl Acad Sci U S A*1979 Jan;76(1):464-8.
224. Jumblatt MM, Maurice DM, McCulley JP. Transplantation of tissue-cultured corneal endothelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*1978 Dec;17(12):1135-41.
225. Maurice DM, McCulley JP, Schwartz BD. The use of cultured endothelium in keratoplasty. *Vision Res*1981;21(1):173-4.
226. McCulley JP, Maurice DM, Schwartz BD. Corneal endothelial transplantation. *Ophthalmology*1980 Mar;87(3):194-201.
227. Morris JM. National Eye Institute: summary report of the cornea task force. *Invest Ophthalmol*1973 Jun;12(6):391-7.
228. Gospodarowicz D, Greenburg G, Alvarado J. Transplantation of cultured bovine corneal endothelial cells to species with nonregenerative endothelium. The cat as an experimental model. *Arch Ophthalmol*1979 Nov;97(11):2163-9.
229. Inslar MS, Lopez JG. Extended incubation times improve corneal endothelial cell transplantation success. *Invest Ophthalmol Vis Sci*1991 May;32(6):1828-36.
230. Schwartz BD, McCulley JP. Morphology of transplanted corneal endothelium derived from tissue culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci*1981 Apr;20(4):467-80.
231. Alvarado JA, Gospodarowicz D, Greenburg G. Corneal endothelial replacement. I. In vitro formation of an endothelial monolayer. *Invest Ophthalmol Vis Sci*1981 Aug;21(2):300-16.

232. Koizumi N, Sakamoto Y, Okumura N, Okahara N, Tsuchiya H, Torii R, et al. Cultivated corneal endothelial cell sheet transplantation in a primate model. *Invest Ophthalmol Vis Sci*2007 Oct;48(10):4519-26.
233. Mimura T, Amano S, Usui T, Araie M, Ono K, Akihiro H, et al. Transplantation of corneas reconstructed with cultured adult human corneal endothelial cells in nude rats. *Exp Eye Res*2004 Aug;79(2):231-7.
234. Gomes JA, Romano A, Santos MS, Dua HS. Amniotic membrane use in ophthalmology. *Curr Opin Ophthalmol*2005 Aug;16(4):233-40.
235. Muraine M, Gueudry J, Toubreau D, Gardea E, Verspyck E, Menguy E, et al. [Advantages of amniotic membrane transplantation in eye surface diseases]. *J Fr Ophthalmol*2006 Nov;29(9):1070-83.
236. Wencan W, Mao Y, Wentao Y, Fan L, Jia Q, Qinmei W, et al. Using basement membrane of human amniotic membrane as a cell carrier for cultivated cat corneal endothelial cell transplantation. *Curr Eye Res*2007 Mar;32(3):199-215.
237. Ide T, Nishida K, Yamato M, Sumide T, Utsumi M, Nozaki T, et al. Structural characterization of bioengineered human corneal endothelial cell sheets fabricated on temperature-responsive culture dishes. *Biomaterials*2006 Feb;27(4):607-14.
238. Lai JY, Chen KH, Hsu WM, Hsiue GH, Lee YH. Bioengineered human corneal endothelium for transplantation. *Arch Ophthalmol*2006 Oct;124(10):1441-8.
239. Hsiue GH, Lai JY, Chen KH, Hsu WM. A novel strategy for corneal endothelial reconstruction with a bioengineered cell sheet. *Transplantation*2006 Feb 15;81(3):473-6.
240. Carlsson DJ, Li F, Shimmura S, Griffith M. Bioengineered corneas: how close are we? *Curr Opin Ophthalmol*2003 Aug;14(4):192-7.
241. Nguyen KT, West JL. Photopolymerizable hydrogels for tissue engineering applications. *Biomaterials*2002 Nov;23(22):4307-14.
242. Chen J, Li Q, Xu J, Huang Y, Ding Y, Deng H, et al. Study on biocompatibility of complexes of collagen-chitosan-sodium hyaluronate and cornea. *Artif Organs*2005 Feb;29(2):104-13.
243. Huang YX, Li QH. An active artificial cornea with the function of inducing new corneal tissue generation in vivo-a new approach to corneal tissue engineering. *Biomed Mater*2007 Sep;2(3):S121-5.

244. Rafat M, Li F, Fagerholm P, Lagali NS, Watsky MA, Munger R, et al. PEG-stabilized carbodiimide crosslinked collagen-chitosan hydrogels for corneal tissue engineering. *Biomaterials* 2008 Oct;29(29):3960-72.
245. Lagali NS, Griffith M, Shinozaki N, Fagerholm P, Munger R. Innervation of tissue-engineered corneal implants in a porcine model: a 1-year in vivo confocal microscopy study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007 Aug;48(8):3537-44.
246. Li F, Carlsson D, Lohmann C, Suuronen E, Vascotto S, Kobuch K, et al. Cellular and nerve regeneration within a biosynthetic extracellular matrix for corneal transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003 Dec 23;100(26):15346-51.
247. Liu W, Deng C, McLaughlin CR, Fagerholm P, Lagali NS, Heyne B, et al. Collagen-phosphorylcholine interpenetrating network hydrogels as corneal substitutes. *Biomaterials* 2009 Mar;30(8):1551-9.
248. Liu L, Kuffova L, Griffith M, Dang Z, Muckersie E, Liu Y, et al. Immunological responses in mice to full-thickness corneal grafts engineered from porcine collagen. *Biomaterials* 2007 Sep;28(26):3807-14.
249. Whitcher JP, Srinivasan M, Upadhyay MP. Corneal blindness: a global perspective. *Bull World Health Organ* 2001;79(3):214-21.
250. Price MO, Thompson RW, Jr., Price FW, Jr. Risk factors for various causes of failure in initial corneal grafts. *Arch Ophthalmol* 2003 Aug;121(8):1087-92.
251. Petroll WM, Jester JV, Bean JJ, Cavanagh HD. Myofibroblast transformation of cat corneal endothelium by transforming growth factor-beta1, -beta2, and -beta3. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998 Oct;39(11):2018-32.
252. Bourne WM, McLaren JW. Clinical responses of the corneal endothelium. *Exp Eye Res* 2004 Mar;78(3):561-72.
253. Seitzman GD. Cataract surgery in Fuchs' dystrophy. *Curr Opin Ophthalmol* 2005 Aug;16(4):241-5.
254. Bourne WM. Cellular changes in transplanted human corneas. *Cornea* 2001 Aug;20(6):560-9.
255. Stéphanie Proulx, Maxime Guillemette, Manon Gaudreault, Patrick Carrier, François A. Auger, Sylvain L. Guérin and Lucie Germain. Tissue engineering of human

cornea (Chapter 6). In: Chirila PTV, editor. Biomaterials and regenerative medicine in ophthalmology Queensland Eye Institute: Australia; 2010 (in press).

256. America EBAo. *Statistical Report on Eye Banking Activity for 2007*. Washington, DC2008.

257. Birnbaum F, Reinhard T, Bohringer D, Sundmacher R. Endothelial cell loss after autologous rotational keratoplasty. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*2005 Jan;243(1):57-9.

258. Chen CH, Chen VN, Chen SC. Effect of chondroitin sulfate on the endothelium in corneal storage. *Cornea*1996 Jan;15(1):35-40.

259. Hoppenreijts VP, Pels E, Vrensen GF, Treffers WF. Corneal endothelium and growth factors. *Surv Ophthalmol*1996 Sep-Oct;41(2):155-64.

260. Van Horn DL, Sendele DD, Seideman S, Bucu PJ. Regenerative capacity of the corneal endothelium in rabbit and cat. *Invest Ophthalmol Vis Sci*1977 Jul;16(7):597-613.

261. Landshman N, Solomon A, Belkin M. Cell division in the healing of the corneal endothelium of cats. *Arch Ophthalmol*1989 Dec;107(12):1804-8.

262. Adams S, Lucas DR. The behaviour of cat and human corneas in organ culture in various media. *Curr Eye Res*1981;1(5):291-9.

263. Mandell KJ, Holley GP, Parkos CA, Edelhauser HF. Antibody blockade of junctional adhesion molecule-A in rabbit corneal endothelial tight junctions produces corneal swelling. *Invest Ophthalmol Vis Sci*2006 Jun;47(6):2408-16.

264. Stein RM, Laibson PR. Comparison of chondroitin sulfate to McCarey-Kaufman medium for corneal storage. *Am J Ophthalmol*1987 Nov 15;104(5):490-3.

265. Bourne WM, Lindstrom RL, Doughman DJ. Endothelial cell survival on transplanted human corneas preserved by organ culture with 1.35% chondroitin sulfate. *Am J Ophthalmol*1985 Dec 15;100(6):789-93.

266. Lin CP, Bohnke M, Draeger J. Effects of fibroblast growth factor and chondroitin sulfate on predamaged corneal endothelium. An organ culture study. *Ophthalmic Res*1990;22(3):173-7.

267. Stein RM, Bourne WM, Campbell RJ. Chondroitin sulfate for corneal preservation at 4 degrees C. Evaluation by electron microscopy. *Arch Ophthalmol*1986 Sep;104(9):1358-61.

268. Yue BY, Niedra R, Baum JL. Effects of ascorbic acid on cultured rabbit corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*1980 Dec;19(12):1471-6.
269. Cintron C, Covington HI, Kublin CL. Morphogenesis of rabbit corneal endothelium. *Curr Eye Res*1988 Sep;7(9):913-29.
270. Coster DJ, Williams KA. The impact of corneal allograft rejection on the long-term outcome of corneal transplantation. *Am J Ophthalmol*2005 Dec;140(6):1112-22.
271. Busin M, Bhatt PR, Scorcia V. A modified technique for descemet membrane stripping automated endothelial keratoplasty to minimize endothelial cell loss. *Arch Ophthalmol*2008 Aug;126(8):1133-7.
272. Amann J, Holley GP, Lee SB, Edelhauser HF. Increased endothelial cell density in the paracentral and peripheral regions of the human cornea. *Am J Ophthalmol*2003 May;135(5):584-90.
273. Hitani K, Yokoo S, Honda N, Usui T, Yamagami S, Amano S. Transplantation of a sheet of human corneal endothelial cell in a rabbit model. *Mol Vis*2008;14:1-9.
274. Amano S. Transplantation of cultured human corneal endothelial cells. *Cornea*2003 Oct;22(7 Suppl):S66-74.
275. Amano S, Mimura T, Yamagami S, Osakabe Y, Miyata K. Properties of corneas reconstructed with cultured human corneal endothelial cells and human corneal stroma. *Jpn J Ophthalmol*2005 Nov-Dec;49(6):448-52.
276. Reichl S, Bednarz J, Muller-Goymann CC. Human corneal equivalent as cell culture model for in vitro drug permeation studies. *Br J Ophthalmol*2004 Apr;88(4):560-5.
277. Reichl S, Muller-Goymann CC. The use of a porcine organotypic cornea construct for permeation studies from formulations containing befunolol hydrochloride. *Int J Pharm*2003 Jan 2;250(1):191-201.
278. Tegtmeier S, Papantoniou I, Muller-Goymann CC. Reconstruction of an in vitro cornea and its use for drug permeation studies from different formulations containing pilocarpine hydrochloride. *Eur J Pharm Biopharm*2001 Mar;51(2):119-25.