

NICOLAS GAGNON

AMÉLIORATION DE LA CULTURE DES CELLULES CORNÉENNES ENDOTHÉLIALES PORCINES

Mémoire présenté
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval
dans le cadre du programme de maîtrise en médecine expérimentale
pour l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)

FACULTÉ DE MÉDECINE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

2007

Résumé

Les conditions d'extraction et de culture de cellules endothéliales cornéennes de porc adultes (CECP) ont été optimisées avec succès. La découverte la plus importante était que la co-culture des CECP avec des cellules murines irradiées 3T3, tout en offrant aux CECP une grosseur et une morphologie plus près de celles retrouvées *in situ* et permettant leur culture à partir d'un petit nombre de cellules extraites d'une cornée, diminuait en même temps de moitié leur taux de prolifération. Les autres optimisations à être apportées comprennent (a) la méthode utilisée pour isoler les cellules de cornées fraîchement excisées, (b) le pourcentage de confluence avant trypsination, (c) la surface de culture recouverte par des CECP, (d) la densité initiale des cellules, (e) le milieu de culture de base, (f) le pourcentage de sérum dans le milieu de culture et (g) l'effet sur les CECP de différentes concentrations d'additifs variés.

Abstract

The isolation and culture conditions of adult porcine corneal endothelial cells (PCEC) have been successfully optimized. The most important discovery was that the culture of PCEC in the presence of a feeder layer of irradiated murine 3T3 cells, while offering the PCEC a smaller cell size and a morphology closer to the one found *in situ*, as well as allowing their culture from a smaller initial cellular seeding density, decreased by half the number of actively proliferating cells in a given culture. Other optimizations included (a) the method used for the isolation of endothelial cells from freshly excised cornea, (b) the percentage of confluence before trypsinization, (c) the culture surface covered by the PCEC, (d) the initial cellular seeding density, (e) the basic cell culture medium, (f) the concentration of serum present in the culture medium and (g) the effect on PCEC of different concentrations of various additives.

Avant-propos

D'abord et avant tout, j'aimerais remercier ma femme Roberta pour le soutien qu'elle m'a accordé pendant mon temps au laboratoire et lors de la rédaction et la correction de mon mémoire. Sans sa compagnie, je n'aurais jamais réussi ce que je m'étais engagé à accomplir. De plus, je sais gré à mes parents et mes amis au Canada de bien avoir voulu rester patient à mon égard pendant tout ce temps. Je suis aussi reconnaissant aux familles Abraão et Takemoto pour leur aide lorsque j'ai rédigé à l'extérieur. Des remerciements se doivent également d'être présentés à tous ceux et celles du laboratoire qui ont su m'offrir leur aide, leur expertise, leurs conseils et leur amitié, afin que je puisse franchir les obstacles et profiter au plus de mon environnement. Enfin, merci à ma directrice, Lucie Germain, pour l'orientation qu'elle m'a apportée et pour ainsi m'avoir servi de boussole à travers les épreuves que j'ai dû affronter.

Table des matières

Résumé.....	ii
Abstract.....	iii
Avant-propos.....	iv
Liste des tableaux.....	vii
Liste des figures.....	viii
Liste des abréviations	x
1 Introduction	12
1.1 L'anatomie et fonction de l'œil.....	14
1.1.1 La tunique fibreuse.....	15
1.1.2 La tunique uvéale	16
1.1.3 La tunique nerveuse.....	18
1.1.4 Les milieux transparents.....	19
1.1.5 La cornée	21
1.1.5.1 L'épithélium cornéen.....	22
1.1.5.2 La membrane de Bowman	24
1.1.5.3 Le stroma et ses kératocytes	25
1.1.5.4 La membrane de Descemet.....	28
1.1.5.5 L'endothélium	28
1.2 Pathologies et traumatismes à l'endothélium.....	33
1.2.1 Des pathologies affectant l'endothélium.....	34
1.2.1.1 Le kératocône.....	34
1.2.1.2 La <i>cornea guttata</i> et la dystrophie de Fuchs.....	35
1.2.1.3 La kératopathie bulleuse	37
1.2.2 Traumatismes non-chirurgicaux à l'endothélium	38
1.3 La greffe cornéenne	39
1.4 Le génie tissulaire	40
1.4.1 Connaissances actuelles	41
1.4.1.1 Des additifs au milieu de culture	44
1.4.1.2 La co-culture	46

1.4.1.3	Prolifération cellulaire	46
1.5	Problématique et objectifs.....	47
2	Méthodologie.....	50
2.1	Optimisation de l'extraction des CECP.....	50
2.2	Pourcentage de confluence optimal	52
2.3	Choix de la surface de culture.....	53
2.4	Densité d'ensemencement optimale et co-culture	53
2.5	Choix du milieu de base.....	55
2.6	Effets d'additifs sur les cultures de CECP.....	55
3	Résultats	57
3.1	Optimisation de l'extraction des CECP.....	57
3.2	Pourcentage de confluence optimal	61
3.3	Choix de la surface de culture.....	65
3.4	Densité d'ensemencement optimale et co-culture	67
3.5	Choix du milieu de base.....	72
3.6	Effets d'additifs sur les cultures de CECP.....	75
4	Discussion et conclusion.....	78
	Bibliographie	85

Liste des tableaux

Chapitre 1

Tableau 1-1	Différences entre les milieux DMEM et Opti-MEM I.....	43
--------------------	---	----

Chapitre 2

Tableau 2-1	Formulation des solutions de trypsine / EDTA.....	51
--------------------	---	----

Chapitre 3

Tableau 3-1	Effet de la méthode d'extraction sur la viabilité et le nombre de CECP obtenues.....	57
Tableau 3-2	Nombre de cellules de cultures trypsinées à différentes densités	62
Tableau 3-3	Grosueur des cellules en fonction de la densité cellulaire des cultures.....	62
Tableau 3-4	Nombre de cellules cultivées sur plastique ou avec FNC	65
Tableau 3-5	Grosueur de cellules cultivées sur plastique ou avec FNC.....	65
Tableau 3-6	Vitesse de croissance de cellules cultivées avec ou sans FNC	67
Tableau 3-7	Effet des 2 milieux de base différents sur le nombre et la grosueur des CECP	73
Tableau 3-8	Effet du pourcentage de sérum sur les cellules endothéliales	76

Liste des figures

Chapitre 1

Figure 1-1	Diagramme de l'anatomie de l'œil humain.....	14
Figure 1-2	Comparaison d'épaisseur entre la cornée porcine et humaine	21
Figure 1-3	Histologie de la partie antérieure de la cornée porcine	23
Figure 1-4	Vue parallèle à la surface cornéenne des lamelles de collagène stromal	26
Figure 1-5	Vue perpendiculaire des lamelles de collagène stromal.....	27
Figure 1-6	Histologie de la partie postérieure de la cornée porcine.	29
Figure 1-7	Détails de l'endothélium au microscope spéculaire	29
Figure 1-8	Comparaison structurale entre le BrdU et la thymidine.....	47

Chapitre 2

Figure 2-1	Fabrication propre du récipient à cornée.....	51
-------------------	---	----

Chapitre 3

Figure 3-1	Viabilité et nombre de cellules endothéliales extraites de cornées porcines fraîchement excisées.....	58
Figure 3-2	Morphologie cellulaire de cultures de cellules extraites avec des concentrations variées de trypsine et de EDTA.....	60
Figure 3-3	Nombre et grosseur de cellules en fonction de la confluence	63
Figure 3-4	Morphologie de cellules issues de cultures trypsinées à différentes confluences.....	64
Figure 3-5	Nombre et grosseur de cellules cultivées avec ou sans FNC.....	66
Figure 3-6	Morphologie de cellules cultivées seules ou en co-culture à différentes densités initiales	68
Figure 3-7	Grosseur de cellules cultivées seules ou en co-culture	70

Figure 3-8	Pourcentage de cellules positives au BrdU	71
Figure 3-9	Effet des 2 milieux de base différents sur le nombre et la grosseur des CECP	73
Figure 3-10	Morphologie de cellules cultivées dans du DMEM ou de l'Opti-MEM 1	75

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
AQP1	Aquaporine-1
BrdU	5-Bromodeoxyuridine
CECP	Cellule Endothéliale Cornéenne de Porc
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (milieu essentiel minimal de Dulbecco)
ECGS	<i>Endothelial Cell Growth Supplement</i> (supplément de croissance cellulaire endothélial)
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i> (acide éthylène diamino tétraacétique)
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i> (facteur de croissance épidermique)
bFGF	<i>basic Fibroblast Growth Factor</i> (facteur de croissance fibroblastique basique)
GAG	<i>Glycosaminoglycan</i> (glycosaminoglycane)
I.C.	Intervalle de confiance
LASIK	<i>Laser-Assisted in situ Keratomileusis</i> (kératomileusis, laser in situ)
LIO	Lentille Intraoculaire
LOEX	Laboratoire d'Organogénèse Expérimentale
MEM	<i>Minimum Essential Medium, Eagle</i> (milieu essentiel minimal de Eagle)
ml	Millilitre
mm	Millimètre
nm	Nanomètre
NGF	<i>Nerve Growth Factor</i> (facteur de croissance neuronale)
Opti-MEM 1	<i>Reduced Serum Medium, a modification of MEM</i> (milieu à serum réduit, une modification du MEM)

PBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i> (tampon phosphate physiologique)
RPM	Rotations Par Minute
SVF	Sérum de Veau Fœtal
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor β</i> (facteur de croissance transformant β)
μL	Microlitre
μm	Micromètre

CHAPITRE 1

Introduction

Depuis l'antiquité, du temps de Platon et de son étudiant Aristote, de nombreux philosophes et savants ont tenté de définir la vision et de mieux la comprendre. D'ailleurs, Aristote voyait l'importance de la vision dans la poursuite de connaissances menant à une meilleure compréhension de l'être humain et à un état de *sophos* (sage) (Aristote 1973). Avant Aristote, le premier véritable philosophe athénien Anaxagore croyait que la philosophie était à la base un art et que de tous les arts, il était le seul régi par des lois stables et le seul dont les activités étaient droites et belles; donc, la philosophie était le seul art pouvant être utilisé pour expliquer les phénomènes l'entourant (Zevort 1843). La médecine, un autre art, ne devait servir qu'à traiter les problèmes de santé, non à les expliquer. Ainsi, suivant Anaxagore, Aristote devait lui aussi se servir de la philosophie pour expliquer la vision. Il se fia donc uniquement sur son intellect et sa raison, plutôt que de se fier à des dissections d'yeux, par exemple, pour arriver à une conclusion par rapport à la question de la vision. Il expliqua ainsi de cette manière la capacité de voir de l'être humain comme étant dépendante sur une matière qu'il appela *diaphane* (éther), laquelle était présente dans l'air, l'eau et dans tout corps coloré. Selon Aristote, c'est l'éther qui permettait à l'homme de voir par son œil; cet éther assurait la connexion physique nécessaire entre les objets colorés et l'œil et était donc le véhicule de la couleur et le moyen par lequel l'homme voyait (Aristote 1846).

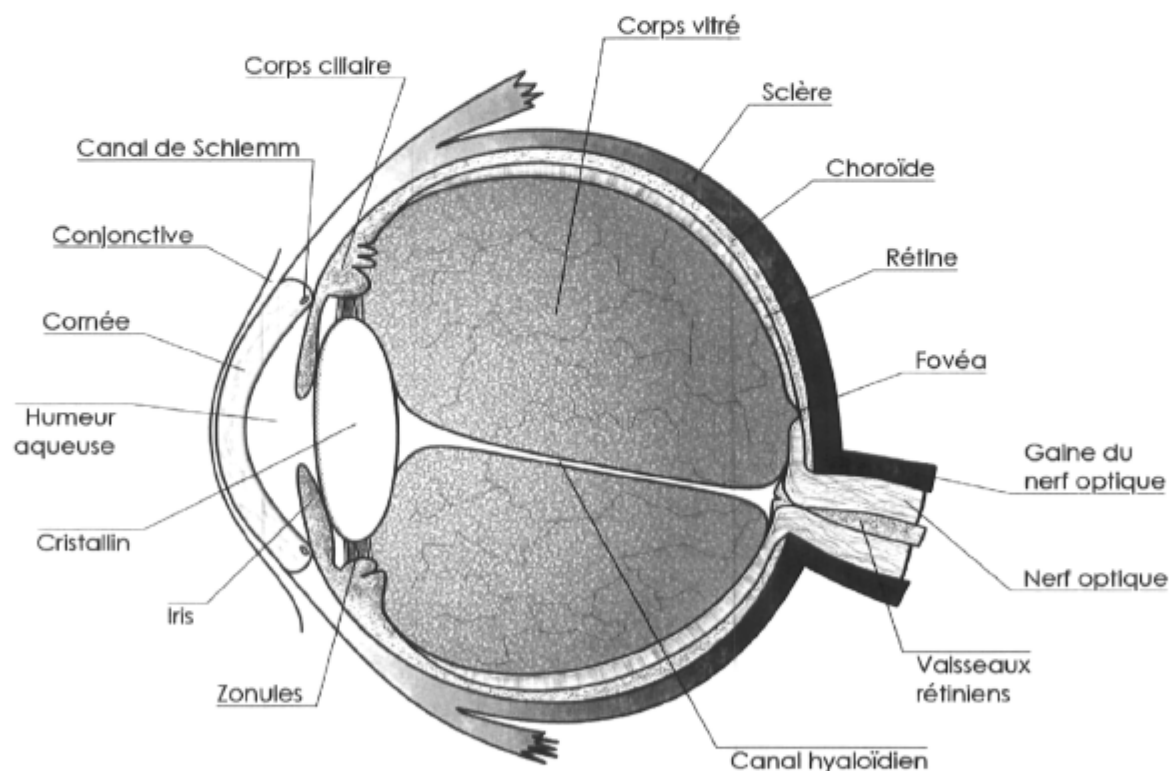
Évidemment, depuis ce temps, les notions rattachées à la vision et à l'œil ont grandement avancées, grâce entre autres à des philosophes, savants et hommes de médecine tels que Abu Zayd Hunayn ibn Ishaq al-Ibadi (809-873). Celui-ci, chargé en l'an 830 par le khalife Al-Ma'mun de traduire les traités des grands philosophes grecques pour la collection d'œuvres publiques *Bayt al Hikmah*, élaborera pour ses traductions et ses 29

ouvrages originaux les premières figures connues de l'œil comprenant les principaux éléments du système optique oculaire (Glick 2005). De nombreux autres hommes de science sont à considérer également, tels que Abu Ali al-Hasan ibn al-Haytham (965-1039), qui associa pour la première fois l'œil à une chambre noire (Lindberg 1968) et Benvenuto Grassi (12^{ème} siècle), auteur du premier livre d'ophtalmologie, *De Oculis Eorumque Egritudinibus et Curis*, publié en 1474. Depuis ces temps, les progrès en vision et en ophtalmologie ont été de plus en plus nombreux, dans des domaines tels que la chirurgie et ses instruments, les drogues, le génie tissulaire et au niveau le plus fondamental, la biologie moléculaire. Tous affectent encore le traitement de différentes maladies oculaires ayant des impacts sociaux plus ou moins importants. Avec la fondation en 1928 de l'ARO (Association for Research in Ophthalmology), devenue en 1970 l'ARVO (Association for Research in Vision and Ophthalmology), l'importance de la recherche et des réponses qu'elle offre aux problèmes était officiellement reconnue. Aussi, à chaque année, de plus en plus de personnes reconnaissent l'importance du travail scientifique, espérant toujours que l'on trouvera des réponses aux problèmes qui tourmentent avec persistance l'humanité.

Dans un premier temps, ce mémoire traitera de l'anatomie de l'œil d'une façon générale pour ensuite entrer en détail dans la présentation de la cornée. Ses cinq couches seront discutées séparément et les interactions entre ces couches seront abordées avec l'emphase portant sur l'endothélium. Le premier chapitre servira aussi à introduire différents problèmes pouvant affecter de façon spécifique l'endothélium cornéen, que ce soit des pathologies ou des traumatismes, ainsi que les traitements présentement offerts pour venir en aide aux patients qui se trouvent affectés par ces problèmes. Il traitera donc du génie tissulaire et de sa part dans le traitement des problèmes étayés. Il verra également à expliquer la problématique ainsi que la méthodologie du projet et de façon spécifique l'utilisation du génie tissulaire pour arriver à solutionner le problème à la base du projet. La méthodologie sera expliquée en détails dans le deuxième chapitre. Le troisième chapitre servira à étayer les résultats du projet. Le quatrième et dernier chapitre discutera des résultats obtenus et présentera les conclusions qu'on peut en tirer.

1.1 L'anatomie et fonction de l'œil

L'œil est l'un des organes les plus légers et petits, ne pesant que 7 grammes et possédant un diamètre d'environ 24 mm (Forrester 2002). Il est complexe, étant formé de plusieurs parties et comprenant 22 types de collagènes, dont 6 types ne se retrouvent que dans l'œil et le cartilage (Ihanamäki 2004). C'est par l'œil que passe une énorme quantité d'information du monde nous entourant. Il est pratiquement indispensable dans la vie quotidienne, tant pour le travail que pour le divertissement, sans compter son importance dans des situations d'urgence, lesquelles nécessitent des réflexes et une réaction rapide, dépendant souvent de la capacité à voir, analyser et comprendre la situation.



© Nicolas Gagnon, 2007

Figure 1-1 Diagramme de l'anatomie de l'œil humain

L'œil humain est composé de trois tuniques formant les parois solides de l'œil ainsi que de milieux transparents contenus dans les tuniques. Ces dernières sont, de l'extérieur vers l'intérieur de l'œil, la tunique fibreuse, offrant rigidité au globe oculaire, la tunique uvéale, fournissant à l'œil les vaisseaux sanguins, les nerfs et la tunique nerveuse, qui est responsable de la réception des rayons lumineux et de la transmission des signaux au cerveau. Les milieux transparents de l'œil sont l'humeur aqueuse, le cristallin et le corps vitré. Une attention plus particulière sera portée à l'anatomie et à la fonction de la cornée, laquelle fait partie de la tunique fibreuse.

1.1.1 La tunique fibreuse

La forme sphérique et la rigidité du globe oculaire lui sont conférées par la tunique fibreuse, qui comprend la sclère et la cornée. Tandis que la sclère est opaque et blanche, la cornée, qui est la continuation antérieure de la sclère, est transparente.

La sclère (Figure 1-1), qui compte pour les 5/6 postérieurs de la tunique fibreuse, tient son nom de sa densité extrême et de sa rigidité. Sa fonction principale est de conserver la forme sphérique de l'œil pendant les changements de pression à l'intérieur de l'œil et pendant les mouvements de l'œil, pour éviter les perturbations au processus de vision. Elle est plus épaisse à l'arrière qu'à l'avant et est surtout lisse, exception faite des points d'insertion des muscles droits et obliques. Sa partie postérieure (lamina cribrosa) est percée par les nerfs ciliaires, les artères ciliaires courtes et longues et par le nerf optique. La sclère est continue avec la gaine de dure-mère du nerf optique. Elle transmet également les veines et artères centrales de la rétine et les veines vortiqueuses à l'équateur. La sclère elle-même est peu innervée et vascularisée et c'est pourquoi elle reste blanche. La partie antérieure de la sclère est directement continue avec la cornée, la ligne d'union entre la sclère et la cornée étant la jonction ou le limbe cornéoscléral. La sclère possède quatre couches qui sont, de l'extérieur vers l'intérieur, la capsule de Tenon, l'épiscière, le stroma scléral et la *lamina fusca*. La sclère est formée majoritairement de collagène, présent dans le stroma scléral et

composé de fibrilles de collagène de diamètres divers des types I, III, V et VI. La *lamina fusca*, elle, est composée de fibres élastiques sclérales (Watson 2004).

La partie antérieure de la tunique fibreuse est la cornée (Figure 1-1). La cornée a deux fonctions principales: (1) elle est responsable des deux tiers du pouvoir de réfraction de l'œil et (2) elle sert de barrière imperméable pour protéger l'œil, car elle est située à l'avant de l'œil et donc toujours en contact avec l'environnement extérieur. La cornée doit être transparente et n'est donc pas vascularisée. Cependant, puisqu'elle a une fonction de barrière, elle contient un très grand nombre de terminaisons nerveuses, la rendant extrêmement sensible (Zander 1951). Elle est composée de cinq couches: l'épithélium, la couche de Bowman, le stroma, la membrane de Descemet et l'endothélium. La cornée sera présentée plus tard plus en détails (voir section 1.1.5).

1.1.2 La tunique uvéale

La tunique uvéale est la deuxième tunique de l'œil et se situe entre la sclère et la rétine (Figure 1-1). Aussi appelée uvée, elle tire son nom de sa ressemblance à un raisin (*uva* en latin). Elle est composée de l'iris à l'avant, suivi de près du corps ciliaire et de la choroïde à l'arrière. La choroïde couvre les 5/6 du globe et est jointe à la circonférence de l'iris via le corps ciliaire. L'iris est un diaphragme circulaire permettant de régler l'intensité de la lumière entrant dans le globe et est percée près du centre d'un trou circulaire appelé la pupille.

La choroïde est une membrane hautement vascularisée avec une épaisseur postérieure d'environ 200 µm et antérieure d'environ 100 µm. Elle est percée à l'arrière par le nerf optique, où elle est fermement attachée à la sclère (Figure 1-1). Elle comprend principalement des capillaires, des petites veines et des artères et est abondante en collagène de type VIII (Tamura 1991). La choroïde elle-même est composée de deux couches. À sa surface extérieure, faisant face à la sclère, se retrouve la *lamina vasculosa*,

qui comprend surtout les veines verticales ainsi que les larges branches des artères ciliaires courtes. Entre ces vaisseaux sont situés des mélanocytes, lesquels ont pour rôle d'absorber la lumière n'ayant pas été captée par la rétine. La deuxième couche est la *lamina choriocapillaris*, qui contient un plexus de capillaires extrêmement fin. Les deux couches sont connectées par le *stratum intermedium*, lequel est fait de fines fibres élastiques. La membrane basale de la choroïde, la *lamina basalis*, sert à séparer la couche choroïdienne hautement vascularisée de la rétine. Les rôles de la choroïde sont de subvenir aux besoins nutritionnels de la rétine et d'acheminer les vaisseaux sanguins au corps ciliaire et à l'iris. Elle remplace le rôle du canal hyaloïdien, par lequel passent les vaisseaux sanguins chez le fœtus (Barishak 1992).

Le corps ciliaire comprend l'*orbiculus ciliaris*, les processus ciliaires et le muscle ciliaire. La première partie, l'*orbiculus ciliaris*, a une largeur de 4 mm et est continue avec la partie antérieure de la choroïde. Elle possède plusieurs crêtes arrangées de façon radiale. Les processus ciliaires sont formés par le repliement intérieur des couches de la choroïde. Ils sont arrangés en forme de cercle autour de la pupille et sont attachés d'une part au corps ciliaire via ses crêtes et d'une autre part aux zonules, lesquelles tiennent le cristallin en place directement à l'arrière de l'iris. Le muscle ciliaire est fait de fibres non striées et forme une bande circulaire d'environ 3 mm sur la surface externe de la partie antérieure de la choroïde. Il y a des fibres méridionales, qui sont attachées aux processus ciliaires et des fibres circulaires, lesquelles sont responsables de l'accommodation ou ajustement de l'œil à la vision d'objets plus rapprochés ou éloignés. Pour se faire, ils peuvent se contracter ou se relaxer. Les collagènes I, II, III et IV jouent des rôles importants dans la structure du corps ciliaire (Marshall 1993; Savontaus 1997; Myllyharju 2001).

La dernière partie de l'uvée, l'iris, est un disque contractile contenant plusieurs pigments donnant un patron de couleurs unique à chaque œil. Il est percé par la pupille légèrement vers le côté nasal et est continu avec le corps ciliaire à sa périphérie et est aussi attaché à la cornée (Figure 1-1). Il est composé d'un stroma, comprenant des fibres

arrangées de façon radiale. Entre ces fibres passent des nerfs et vaisseaux sanguins. Quelques cellules pouvant contenir des pigments peuplent le stroma. L'iris contient également des fibres musculaires arrangées de façon circulaire, qui forment le sphincter de la pupille et aussi de façon radiale, qui forment la pupille dilatatrice. Enfin, la surface postérieure de l'iris contient deux couches de cellules épithéliales pigmentées. La couleur d'un iris dépend de la quantité et de la disposition spatiale des pigments (Gray 1918).

1.1.3 La tunique nerveuse

La tunique nerveuse ou tunique interne (*tunica interna*), est en fait la rétine (Figure 1-1). C'est une membrane nerveuse très délicate qui sert à capter les images qui sont ensuite traduites par le cerveau. Sa surface externe est en contact avec la choroïde, tandis que sa surface interne est en contact avec la membrane hyaloïdienne. La surface postérieure de la rétine est continue avec le nerf optique tandis que sa surface antérieure, où elle recouvre légèrement l'iris et les processus ciliaires, est dépourvue de nerfs. La rétine est transparente et contient des cellules disposant de pigments excités par la lumière. Elle est donc responsable de la transformation du signal de la lumière en signal électrique qui est plus tard acheminé vers le cerveau pour y être analysé (Gray 1918).

La rétine est composée de sept couches distinctes. La lumière doit d'abord traverser la couche contenant les fibres optiques, qui proviennent des axones de cellules ganglionnaires et qui sont acheminées vers l'arrière de l'œil pour former le nerf optique. La lumière passe ensuite par cinq autres couches avant d'atteindre la dernière couche de cellules nerveuses. Celle-ci contient les cellules photoréceptrices qui sont les cônes (vision en couleurs) et les bâtonnets (vision en conditions de faible éclairage). L'œil humain contient environ 17 fois plus de bâtonnets que de cônes. L'activation du signal visuel via des molécules photosensibles entraîne une hyperpolarisation de la membrane de la cellule photoréceptrice. Celle-ci transmet le signal aux autres cellules nerveuses pour se rendre au nerf optique, où un manque de cellules photoréceptrices dans la rétine fait place au nerf optique. Cet endroit ne participe donc pas à la détection de la lumière et ne sert pas à la

vision; c'est la papille optique. Il y a une partie spécialisée de la rétine, la fovéa, où les couches de la rétine dépourvues de cellules photoréceptrices sont amincies. La densité de cellules photoréceptrices de la fovéa se trouve donc plus élevée et on y retrouve presque uniquement des cônes. Grâce à la densité accrue de cônes, ce point central de la vision possède donc une grande acuité et une précision améliorée (Gray 1918).

1.1.4 Les milieux transparents

Les milieux transparents sont l'humeur aqueuse, le cristallin et le corps vitré (Figure 1-1). Les deux premiers ont le rôle de séparer les différentes parties de l'œil et de transmettre la lumière vers la rétine, tandis que le troisième joue un rôle crucial dans la convergence et la divergence de la lumière entrant dans l'œil.

L'humeur aqueuse se situe entre la cornée et le cristallin et remplit les chambres postérieures (entre le cristallin et l'iris) et antérieures (entre l'iris et la cornée) de l'œil. Sa composition est près de celle du plasma sanguin et est produite par le corps ciliaire. Elle est constituée majoritairement d'eau et contient moins de protéines que le plasma mais plus d'ascorbate, de pyruvate et de lactate (Wang 1993).

Le corps vitré est une masse gélatineuse occupant 80% du volume du globe oculaire. Il se retrouve à l'arrière du cristallin et est encaissé dans une membrane très fine, la membrane hyaloïdienne. Le corps vitré est légèrement évidé à sa surface antérieure pour laisser place au cristallin. Il est composé à 99% d'eau et contient des molécules telles des fibrilles de collagène, des larges polymères d'acide hyaluronique, des cellules périphériques (les hyalocytes), des sels inorganiques, des sucres et de l'acide ascorbique (Balazs 1959). Les polymères d'acide hyaluronique donnent la consistance gélatineuse au corps vitré (Allen 1977) et sont incorporés à des intervalles spécifiques entre les fibrilles de collagène, réduisant l'effet de diffraction dû à la présence des biomolécules dans le corps vitré (Forrester 2002). Le corps vitré est nourri via les quelques vaisseaux de la rétine et des

processus ciliaires. Il a comme fonction de fournir une pression interne au globe oculaire, ce qui aide la rétine à rester collée à la choroïde. Avec l'âge, le corps vitré perd lentement sa consistance gélatineuse pour une consistance plus liquide, ce qui entraîne parfois le détachement du corps vitré de la rétine (Foos 1972). Par le fait même, la rétine se trouve détachée de la choroïde, ce qu'on appelle un décollement de rétine, entraînant de graves problèmes (Margo 2005).

Le dernier composant transparent de l'œil, le cristallin, a comme fonction la convergence et la divergence de la lumière pour que l'œil puisse faire le focus sur un objet pour ainsi former une image correcte sur la rétine. C'est un corps biconvexe ayant une surface postérieure légèrement plus convexe que sa surface antérieure et se situant entre la chambre postérieure de l'œil et le corps vitré. La vision d'objets éloignés rend le cristallin plus étiré et celui-ci prend ainsi une forme plus concave. À l'inverse, la vision d'un objet rapproché entraîne un relâchement du cristallin, qui prend donc une forme plus convexe. C'est ce qu'on appelle l'accommodation du cristallin. Une capsule riche en collagènes I, III, IV et XVIII (Ihanamäki 2004) ainsi qu'en glycoprotéines entoure le cristallin, qui présente à sa surface antérieure un épithélium simple et cuboïdal. Un plan vertical parallèle à la cornée passant par le centre du cristallin délimite son équateur. Les cellules épithéliales, à l'équateur, perdent leur forme cuboïdale et s'allongent, chacune d'elle étant une cellule prismatique et une seule fibre du cristallin. Avec l'âge, plus de cellules s'allongent et deviennent fibreuses, ce qui peut avoir comme effet d'opacifier le cristallin, ce qui mène à une cataracte (Asbell 2005). Le cytosquelette des cellules est très développé et une protéine, la cristalline, y est abondante (Clark 2004). Grâce à son organisation tridimensionnelle, la diffusion de la lumière qui devrait être apparente avec une concentration importante de cristalline ne se produit pas et le cristallin demeure transparent (Maurice 1957).

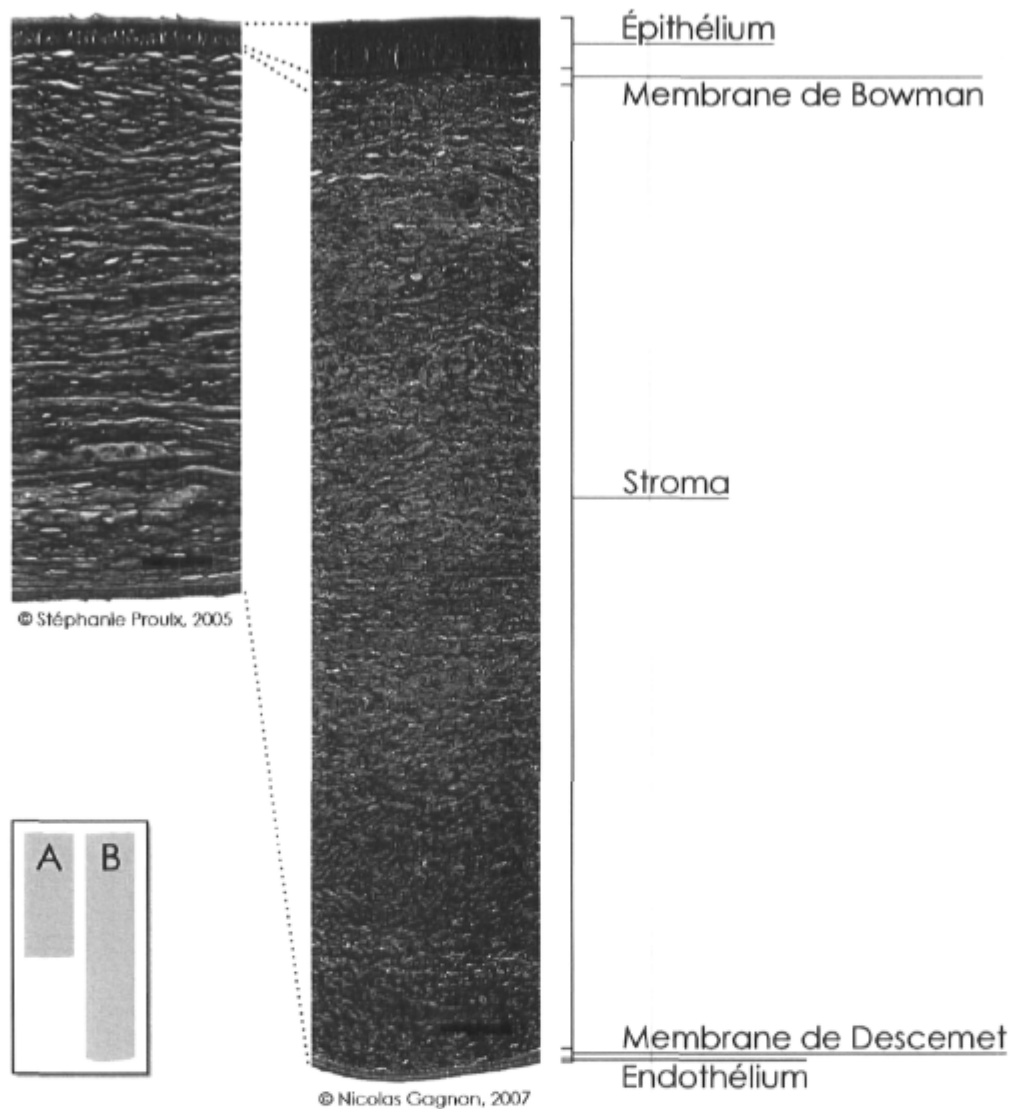


Figure 1-2 Comparaison d'épaisseur entre la cornée porcine et humaine

Comparaison entre une épaisseur complète (A) d'une cornée humaine normale et (B) d'une cornée porcine normale. Coloration au Trichrome de Masson (Barre = 100 μm).

1.1.5 La cornée

La cornée fait partie de la tunique fibreuse. Elle est la section transparente à l'avant de l'œil permettant l'entrée de la lumière dans le globe oculaire et joint la sclère opaque au

limbe cornéoscléral. Elle n'est pas parfaitement circulaire; vue de sa face antérieure, elle est plus large (12.6 mm) que haute (11.7 mm) (Klyce 1997). Chez l'humain, comme chez le porc, la cornée comporte cinq couches séparées (Camber 1987). De la surface antérieure vers la surface postérieure, les couches sont: l'épithélium, la membrane de Bowman, le stroma, la membrane de Descemet et l'endothélium. Certaines différences se présentent entre la cornée humaine et la cornée porcine (Figure 1-2). D'abord, la cornée humaine a une épaisseur variant entre environ 550 et 640 μm , dépendant de l'instrument utilisé pour la mesurer (Módís 2001). Chez le porc elle peut varier entre 1 et 2 mm, selon l'espèce (Merindano 2002). Une seconde différence se situe au niveau de la membrane de Bowman. Même si cette dernière est présente chez le porc, elle est pratiquement impossible à distinguer des fibres du stroma, puisqu'elle est inégale et ondulée (Camber 1987).

1.1.5.1 L'épithélium cornéen

L'épithélium cornéen (Figure 1-3) représente 10% de l'épaisseur cornéenne totale (Ehlers 1970). C'est un épithélium squameux stratifié non kératinisé qui comprend de quatre à six couches de cellules. Ces strata se situent dans trois couches morphologiques: la couche superficielle, la couche de cellules ailées (*wing cells*) et la couche de cellules basales. Les seules cellules qui entrent en mitose sont les cellules basales, qui se déplacent vers l'extérieur de la cornée pour former les cellules ailées. Celles-ci se détachent de l'épithélium après être passées par la couche squameuse. Ce cycle se complète normalement en sept jours (Hanna 1961).

Les cellules superficielles de la couche squameuse sont très aplaties avec un diamètre de 40 à 60 μm et une épaisseur variant entre 2 et 6 μm (Klyce 1997). Ces cellules n'ont que très peu d'organelles et ont une durée de vie très limitée. Ce sont elles qui maintiennent la barrière physique entre la cornée et l'air ambiant grâce à leurs jonctions serrées qui entourent complètement chaque cellule (Edelhauser 1998). Elles sont aussi responsables de l'attachement du film lacrymal à l'épithélium cornéen via leur glycocalyx (Ito 1974). Cette couche de glycocalyx à la surface peut se mouvoir légèrement grâce à un

réseau de filaments d'actine que l'on retrouve immédiatement sous la surface de la membrane cellulaire (Kivela 1998).

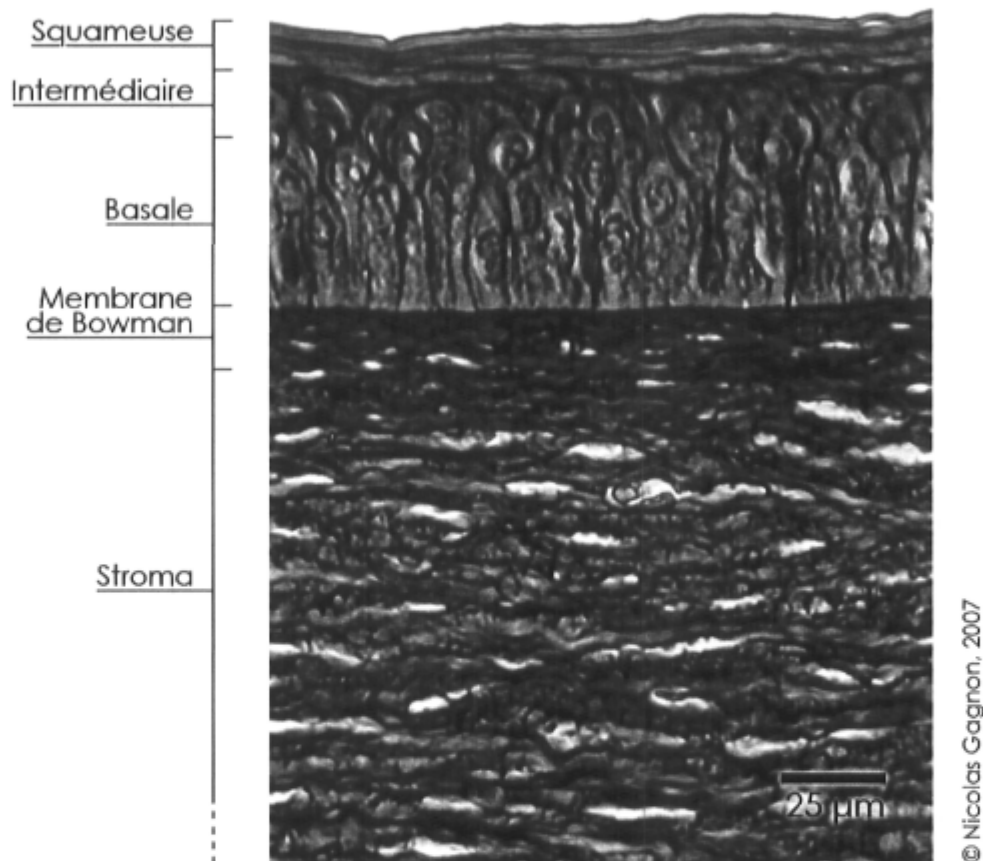


Figure 1-3 Histologie de la partie antérieure de la cornée porcine
Coloration au Trichrome de Masson

Les cellules ailées (*wing cells*) proviennent des cellules basales. Entre elles, on y retrouve des jonctions lacunaires ainsi que des jonctions serrées et des desmosomes (Langbein 2002; Williams 2002). Ces jonctions font en sorte que les cellules ailées soient digitées. Leur cytosquelette est rempli de filaments intermédiaires d'environ 8 nm de diamètre qui aident à maintenir la forme de la cellule (Kivelä 1998). Quelques organelles sont présentes, mais comme pour les cellules superficielles, elles ne sont pas nombreuses.

Les cellules basales sont cuboïdales et ont un diamètre de 8 à 10 μm et une hauteur de 18 à 20 μm (Klyce 1997). Elles forment la couche germinative de l'épithélium, tandis que les cellules souches proprement dites, qui donnent naissance à toutes les cellules de l'épithélium, se retrouvent dans la région basale du limbe (Tseng 1996; Dua 2000). Des trois types morphologiques de l'épithélium, les cellules basales sont celles qui contiennent le plus d'organelles ainsi que d'amples réserves d'énergie sous forme de granules de glycogène, lesquelles sont utilisées en cas de besoin lors de la guérison d'une plaie (Lu 2001). Des filaments d'actine sont présents le long de la membrane cellulaire et sont impliqués dans la motilité des cellules lors d'une guérison (Chifflet 2005). Comme les cellules ailées de la couche intermédiaire, les cellules basales sont très digitées entre elles et possèdent à quelques endroits des jonctions lacunaires (Williams 2002).

Immédiatement sous les cellules basales se trouve la membrane basilaire, qui est sécrétée par les cellules basales. Celle-ci remplit deux fonctions importantes; elle sépare le stroma de l'épithélium et elle sert de base pour la formation et l'organisation de l'épithélium (Vracko 1972). Son absence permet l'invasion de la membrane de Bowman ou du stroma par des cellules épithéliales et sans elle, l'épithélium ne peut adhérer au stroma. Elle peut être séparée en deux parties distinctes en microscopie électronique: la *lamina lucida* à la surface antérieure et la *lamina densa*, située à la surface postérieure. La membrane basilaire est attachée au stroma cornéen via des fibrilles de collagène de type VII qui s'étendent de la *lamina densa* jusqu'au réseau de collagène du stroma (Sakai 1986).

1.1.5.2 La membrane de Bowman

La membrane postérieure à la membrane basilaire est la membrane de Bowman. Elle est composée d'une couche de fibrilles de collagène de type V, qui provient probablement de la production épithéliale du même type de collagène. L'épithélium joue donc probablement un rôle dans la formation de la membrane de Bowman (Gordon 1994). D'autres types de collagène sont aussi présents, mais en quantités moins importantes, tels que les types I, III, VI et XII (Jacobsen 1984; Myllyharju 2001). Les fibrilles de collagène

de la membrane de Bowman sont moins uniformes que celles du stroma cornéen (Gordon 1994) et ont un diamètre inférieur de 33% à celles du stroma cornéen. Ce collagène se joint au collagène stromal, permettant l'adhérence de la membrane de Bowman au stroma. Cette dernière est acellulaire chez l'humain et est formée par la concentration de la portion antérieure du stroma (Pouliquen 1966). Cependant, au début du développement de la cornée, elle contient des kératocytes (Ozanic 1977). La sensibilité exquise de la cornée est due à la pénétration d'axones non myélinisés dans la membrane de Bowman (Matsuda 1968; Müller 2003) et aide à la prévention de dommages à la cornée. Cependant, il est supposé que la membrane de Bowman n'a aucune fonction spécifique essentielle (Wilson 2000).

1.1.5.3 Le stroma et ses kératocytes

Le stroma est la couche la plus épaisse de la cornée; il constitue 90% de l'épaisseur cornéenne totale (Forrester 2002). La caractéristique principale du stroma cornéen est l'arrangement spécifique tridimensionnel de ses fibrilles de collagène, lesquelles forment approximativement 71% de la masse sèche de la cornée (Newsome 1981). La forte concentration de collagène du stroma lui permet d'offrir une grande résistance mécanique à la pression intraoculaire normale. Ceci est très important, puisque le pouvoir de réfraction constant de la cornée repose sur le fait que sa forme ne change pas. Sans cette résistance mécanique élevée, les changements de pression intraoculaire pourraient modifier sa forme et ainsi affecter la vision.

Le collagène prédominant du stroma est du type I, mais on y retrouve également les types III, V, VI, XII et XIII (Ihanamäki 2004). Les triples hélices de collagène sont assemblées en fibrilles avec un diamètre moyen de 36 nm (Holmes 2001). Les fibrilles de collagène stromal sont organisées en 300 à 500 lamelles d'environ 1.75 μm d'épaisseur. Ces lamelles sont parallèles à la surface cornéenne (Figure 1-4). La majorité des angles entre ces lamelles ont environ 60°, mais certains angles sont plus ou moins orthogonaux et ce surtout dans le stroma postérieur. Les lamelles communiquent souvent entre elles en

s'échangeant des fibrilles. Près de la membrane de Descemet, les lamelles sont arrangées de façon plus aléatoire et sont enlacées les unes avec les autres, formant des réseaux desserrés (Komai 1991). La grande quantité de collagène dans le stroma devrait en fait mener à une diffraction importante de la lumière (Maurice 1957). Pourtant, elle reste transparente, grâce au diamètre très uniforme des fibrilles de collagène et surtout grâce à l'espacement régulier entre ces fibrilles (Figure 1-5). Cet espacement est constant partout dans le stroma et est d'environ 43 nm, du centre d'une fibrille au centre d'une autre, soit la distance de ~20 nm entre deux fibrilles plus l'épaisseur d'une fibrille de ~23 nm (Müller 2004). Il demeure constant grâce à la matrice extracellulaire polyanionique, laquelle est sécrétée par les kératocytes du stroma.

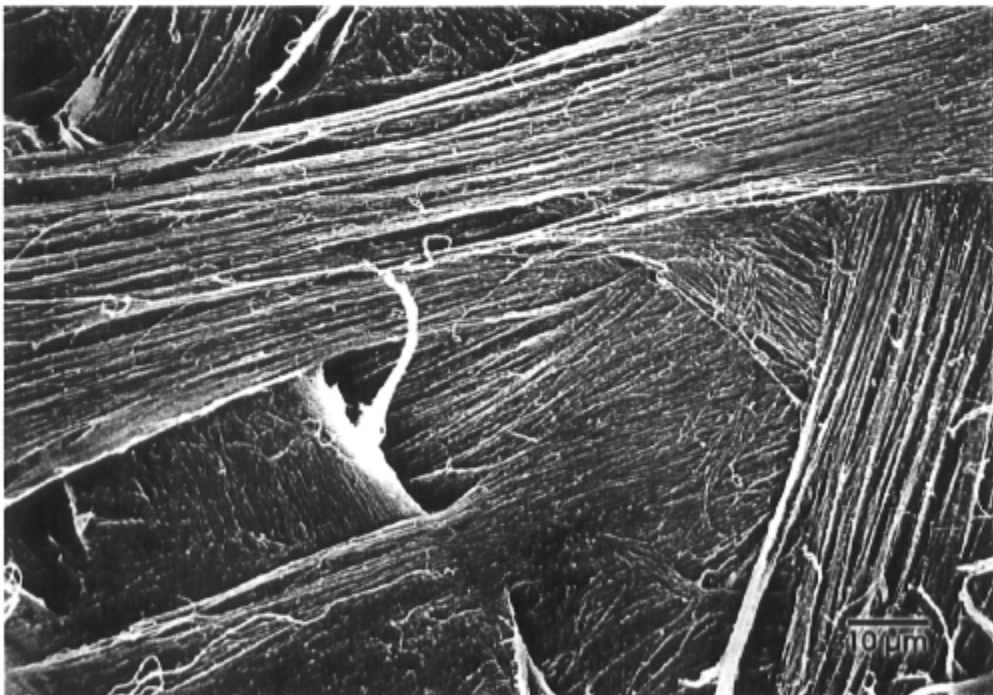


Figure 1-4 Vue parallèle à la surface cornéenne des lamelles de collagène stromal

Source: (Meek 2001)

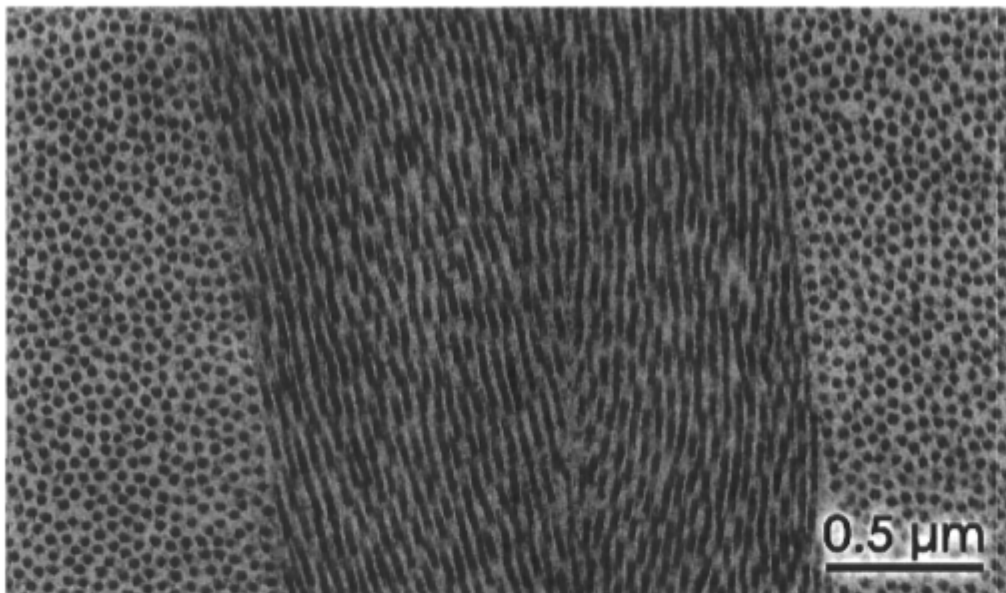


Figure 1-5 Vue perpendiculaire des lamelles de collagène stromal

Source: (Gisselberg 1991)

Les kératocytes occupent de 3 à 5% du volume du stroma cornéen et sont positionnés entre les lamelles de collagène (Klyce 1997). Ces cellules possèdent des fins prolongements cellulaires de quelques microns de diamètre au plus. Ceux-ci pénètrent parfois les lamelles de collagène sans toutefois les traverser. Ces mêmes prolongements servent à connecter les kératocytes entre eux, en se connectant soit aux prolongements d'autres kératocytes ou directement au corps cellulaire de ces derniers (Kang 2005a). Les kératocytes produisent et sécrètent de façon constante du collagène et de la matrice extracellulaire polyanionique. Cette matrice, qui aide à garder l'espacement constant, contient une grande quantité de glycosaminoglycans (GAG) sulfatés conférant à la matrice une charge négative. La majorité sont des sulfates de kératane, de chondroïtine et de dermatane (Scott 1990). Ces GAG sulfatés ont des interactions faibles avec les fibrilles de collagène, via des liens électrostatiques et hydrogènes (Gisselberg 1991; Clark 2004). L'épaisseur de la cornée est proportionnelle au degré de sulfatation des GAG du stroma. Également, la sulfatation des GAG dépend de l'apport d'oxygène à la cornée via l'épithélium, ce qui explique l'épaississement temporaire de la cornée suite au port de lentilles cornéennes qui bloquent le passage de l'oxygène (Fonn 2005).

1.1.5.4 La membrane de Descemet

La membrane de Descemet est une membrane basilaire d'une épaisseur de 5 μm et est sécrétée par les cellules endothéliales cornéennes (Johnson 1982). Elle est composée d'une couche antérieure bandée, qui contient des bandes de collagène largement espacées et d'une couche postérieure non bandée amorphe. La membrane de Descemet compte du collagène des types IV, VI et VIII (Myllyharju 2001). Étant une membrane basilaire, on y retrouve également de la laminine et de la fibronectine (Newsome 1981). L'épaisseur de la couche postérieure non bandée augmente lentement avec l'âge et atteint 10 μm à 80 ans, tandis qu'elle est de 2 μm à 10 ans (Johnson 1982). La membrane de Descemet est attachée faiblement au stroma via des bouts de fibrilles de collagène stromal de quelques dixièmes de microns qui pénètrent la membrane de Descemet (Binder 1991). Elle est beaucoup plus élastique que le stroma (Jue 1986). L'attachement est très faible et il arrive donc fréquemment que la membrane se déchire ou se détache partiellement ou complètement du stroma, par exemple suivant une phacoémulsification ou une chirurgie pour enlever une cataracte (Kansal 2001; Nouri 2002). Des hémorragies causées par des accidents peuvent aussi entraîner des détachements, par exemple suivant une brûlure alcaline (Najjar 2004).

1.1.5.5 L'endothélium

L'endothélium cornéen est la couche la plus postérieure de la cornée (Figure 1-6). Il forme une monocouche comptant chez un adulte normal environ 400 000 cellules, pour une épaisseur de 4 à 6 μm (Tuft 1990). Une vue de la surface postérieure de l'endothélium révèle des cellules aplaties avec une forme hexagonale (Figure 1-7) et un diamètre d'environ 20 μm (Alaerts 1959). Cette morphologie est constante dans tout l'endothélium et les écarts de forme et de grosseur sont minimes. Les cellules endothéliales présentent une texture de surface irrégulière avec de nombreuses invaginations et jonctions entre elles (Klyce 1997). Aussi, à sa surface postérieure, l'endothélium possède plusieurs microvilli de 0.5 et 0.6 μm qui entrent dans l'humeur aqueuse (Atchison 2000). Il est intéressant de noter que l'endothélium cornéen ne possède pas de vraies cellule, puisqu'il est dérivé, comme les kératocytes cornéens, de la crête neurale mésenchymateuse (Waring 1982).

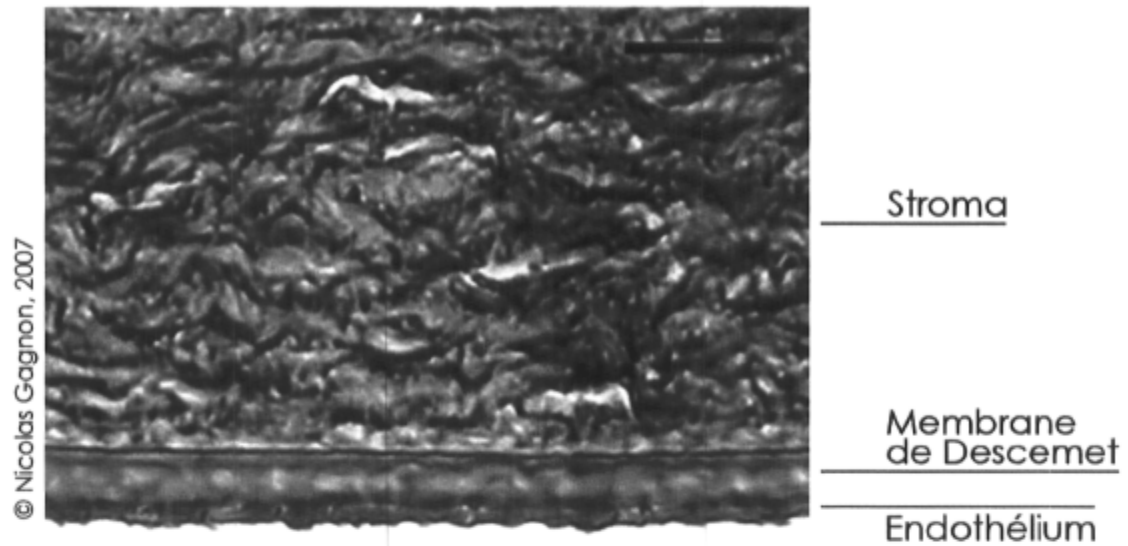


Figure 1-6 Histologie de la partie postérieure de la cornée porcine.
Coloration au Trichrome de Masson (Barre = 25 μ m).

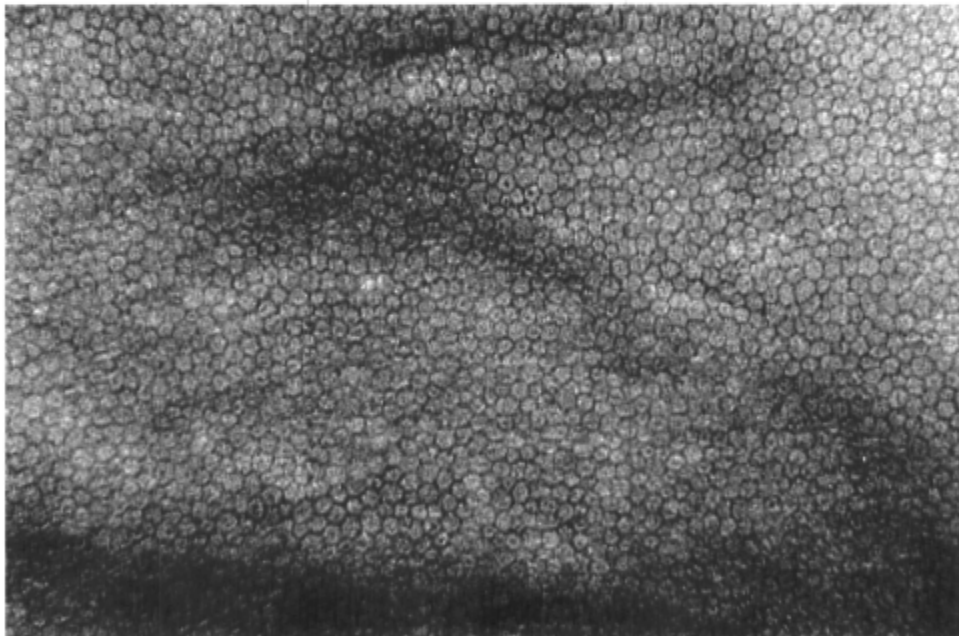


Figure 1-7 Détails de l'endothélium au microscope spéculaire
Source: (Cotinat 1999)

Les cellules endothéliales ne prolifèrent pas ou alors très peu *in vivo*. Une des causes probables est l'inhibition de prolifération par contact cellule-cellule (Joyce 1996; Joyce 2003). De plus, le facteur de croissance transformant β ou "transforming growth factor β " (TGF- β) qui est présent dans l'humeur aqueuse empêche l'entrée dans la phase S de cellules endothéliales *in vivo* (Chen 1999). Le TGF- β , couplé à l'inhibition par contact cellule-cellule, serait responsable du manque de prolifération de cellules endothéliales cornéennes *in vivo* (Joyce 2002). Pendant le premier mois de vie, une cornée humaine possède environ 6 000 cellules endothéliales par mm^2 de surface postérieure cornéenne (Bahn 1986) avec un maximum de 7 500 cellules par mm^2 (Tuft 1990). Cette densité diminue tout au long de la vie. De la naissance et ce jusqu'à l'âge de 18 ans environ, la diminution de la densité des cellules endothéliales est la plus élevée. Ceci est dû au grossissement normal de la cornée suivant le développement physique de l'enfant. Après l'âge de 18 ans, la diminution de la densité cellulaire se maintient constante à 0.6% par année (Murphy 1984; Bourne 1997; Roszkowska 2004). Cette diminution est due à une perte graduelle et constante de cellules endothéliales. Chez l'adulte normal, la densité cellulaire endothéliale de la cornée centrale est d'environ 2 500 cellules par mm^2 . Ce nombre est similaire chez d'autres espèces, telles que le porc, le bœuf, le chat, le chien et le lapin (Bahn 1986). Dans les régions paracentrales et périphériques de la cornée, la densité est légèrement plus élevée que dans la région centrale. On observe une augmentation dans le compte cellulaire de 5.80% dans la région paracentrale et de 9.60% dans la région périphérique (Amann 2003). Avec l'âge, la morphologie de l'endothélium devient de plus en plus irrégulière. Les cellules deviennent moins hexagonales (pléomorphisme) et le nombre de cellules plus larges augmente (polymégathisme) (Laule 1978; Blatt 1979; Carlson 1988).

La raison pour laquelle les cellules perdent leur morphologie hexagonale caractéristique et que ces mêmes cellules deviennent plus larges est qu'elles ne prolifèrent pas *in vivo*. Donc, lorsqu'une cellule endothéliale meurt, les cellules avoisinantes s'élargissent et s'aplatissent pour combler l'espace vide laissée par la cellule morte, pour ainsi ne pas laisser de trou dans l'endothélium, ce qui aide à préserver sa fonction

primordiale. Normalement, cette perte d'environ 0.6% des cellules par année n'affecte pas la vision, mais il y a une limite inférieure de densité sous laquelle se développent un œdème stromal et une perte de vision. Cette limite se situe entre 400 et 700 cellules par mm^2 (Klyce 1997).

L'endothélium est très important et même essentiel au bon fonctionnement de la cornée. D'abord, pendant le développement, la présence de l'endothélium est nécessaire pour le développement du segment antérieur de l'œil. En fait, l'endothélium cornéen, d'un point de vue développemental, est plutôt un épithélium postérieur qu'un endothélium véritable (Meier 1977). L'absence de l'endothélium cause le collage de l'iris et du cristallin sur la matrice extracellulaire de la cornée dénudée. Son manque entraîne un épaissement du stroma, qui se développe de façon désorganisée. Enfin, où devrait se situer normalement le segment antérieur, on retrouve plutôt un nombre anormalement élevé de cellules stromales (Reneker 2000). Chez l'adulte, l'endothélium est requis pour maintenir l'hydratation et l'épaisseur constante de la cornée et par conséquent la transparence cornéenne. Pour que le stroma demeure transparent, la distance entre ses fibrilles de collagène doit être petite et constante (Maurice 1957; Farrell 1994; Ameen 1998). La charge globale négative de la matrice extracellulaire du stroma crée un déséquilibre ionique, qui cause une pression de gonflement dans le stroma (Hodson 1993). C'est en fait une extension de la deuxième loi de la thermodynamique et on y donne le nom d'effet membranaire de Donnan (Donnan 1995). Cet effet a été le premier à être suggéré comme étant responsable pour le gonflement du stroma (Davson 1949) et il est maintenant accepté comme étant la seule cause (Hodson 1993). L'épithélium, possédant des jonctions serrées tout autour de ses cellules, empêche l'entrée d'eau à partir du film lacrymal. L'endothélium n'en possède pas et donc l'eau peut entrer par la surface postérieure de la cornée (Tuft 1990).

L'effet de Donnan fait entrer l'eau de l'humeur aqueuse dans le stroma. Ceci a pour effet de gonfler le stroma et ainsi de perturber les interactions faibles entre ses fibrilles, ce

qui les sépare les unes des autres et ainsi opacifie la cornée (Clark 2004). Le rôle de l'endothélium dans cette situation comporte deux aspects (Maurice 1951). D'abord, il contrôle, via sa perméabilité ionique, le passage d'eau de l'humeur aqueuse vers le stroma. En effet, l'eau et les petits solvants diffusent dans le stroma entre les espaces paracellulaires de l'endothélium (Maurice 1985). Ensuite, des pompes situées dans l'endothélium servent à transporter de façon active l'eau du stroma vers l'humeur aqueuse. L'endothélium utilise principalement deux pompes du style cotransporteur; une pompe $\text{Na}^+ 2\text{HCO}_3^-$ et une pompe $\text{Na}^+ 3\text{HCO}_3^-$ pour réguler sa perméabilité à l'ion bicarbonate (Li 2005). Les ions bicarbonate entrent dans les cellules endothéliales à leur surface basolatérale, se déplacent intracellulairement et sortent à leur surface apicale, où ils rejoignent l'humeur aqueuse (Hodson 1976). L'eau, excessive dans le stroma, suit le mouvement des ions bicarbonate lorsque les pompes endothéliales sont activées et retourne dans l'humeur aqueuse. Ainsi, la régulation de l'hydratation et donc de l'épaisseur de la cornée et de sa transparence sont dépendantes du transport endothélial de HCO_3^- via des cotransporteurs qui requièrent la présence d'ions sodium pour fonctionner (Hodson 1974). Un autre pore d'importance à la fonction normale de l'endothélium est l'aquaporine-1 (AQP1), qui est impliqué dans le contrôle de l'épaisseur cornéenne. Dans la cornée, ce pore est responsable du transport osmotique de l'eau à travers de l'endothélium vers le stroma (Verkman 2002). Lorsque AQP1 est supprimé, la perméabilité à l'eau de l'endothélium se trouve diminuée. Ainsi, l'eau n'entre plus avec autant d'aisance dans le stroma et l'épaisseur de la cornée est plus mince d'approximativement 18%. Également, la restauration de la transparence suivant un gonflement stromal est ralentie, montrant que AQP1 joue un rôle important dans l'équilibre osmotique du stroma (Thiagarajah 2002). Enfin, le cotransporteur $\text{Na}^+ \text{K}^+ 2\text{Cl}^-$ est aussi responsable du transport d'anions Cl^- vers l'extérieur du stroma, permettant à l'eau de quitter le stroma (Bonanno 2003). Le mécanisme de ce cotransporteur est similaire à la pompe $\text{Na}^+ 2\text{HCO}_3^-$.

La fonction des pompes endothéliales semble diminuer avec l'âge et chez les patients ayant reçu une greffe cornéenne (Bourne 1998). L'épaisseur et donc l'hydratation de la cornée affectent sa rigidité, puisque la structure tridimensionnelle de la cornée,

fournie par le réseau de collagène stromal, s'en trouve perturbée. Ainsi, l'hydratation cornéenne affecte grandement le résultat de procédures réfractives incisionnelles, puisqu'une incision dans une cornée moins rigide est plus difficile à pratiquer (Hjortdal 1998). Puisque l'hydratation stromale est directement reliée à la fonction des pompes endothéliales, les patients plus âgés, ceux avec des pathologies affectant la fonction des pompes de l'endothélium ainsi que ceux avec un transplant cornéen sont plus à risque pour des complications.

1.2 Pathologies et traumatismes à l'endothélium

Plusieurs pathologies peuvent endommager la cornée ou de façon plus spécifique l'endothélium cornéen. Ces pathologies peuvent souvent être traitées mais dans certains cas nécessitent des transplantations de cornées. Les techniques utilisées pour corriger les diverses pathologies ont chacune des côtés positifs aussi bien que négatifs. Ainsi, certaines techniques sont naturellement privilégiées. Avec l'évolution des connaissances en ophtalmologie et le développement de nouvelles techniques, on garde l'espoir de traiter ces pathologies sans côté négatif et sans effets secondaires graves. De nouvelles avancées dans le domaine du génie tissulaire pourraient se montrer utiles et mener à l'élaboration de nouvelles techniques chirurgicales, lesquelles pourraient être très bénéfiques.

Des pathologies pouvant affecter soit directement ou indirectement l'endothélium seront maintenant abordées. De plus, des traumatismes pouvant entraîner une perte de cellules endothéliales cornéennes seront présentés. Seront également couvertes quelques techniques chirurgicales étant utilisées pour régler des pathologies n'affectant pas directement l'endothélium mais pouvant, avec la mise en jeu de divers facteurs, l'affecter indirectement.

1.2.1 Des pathologies affectant l'endothélium

Les quatre pathologies affectant l'endothélium cornéen et requérant souvent une transplantation sont le kératocône, la *cornea guttata*, la dystrophie de Fuchs et la kératopathie bulleuse. Quoique d'autres pathologies puissent affecter l'endothélium, elles ne seront pas décrites puisque le problème ne se situe pas principalement à l'endothélium. Leur traitement ne requière alors pas de greffe. Le glaucome et le diabète de type I sont de bons exemples. Les patients affectés par le glaucome ont des cornées avec moins de cellules endothéliales et une densité cellulaire qui diminue plus rapidement que chez un individu normal (Gagnon 1997; Lass 1998). Les diabétiques possèdent des cellules endothéliales morphologiquement différentes et ont un polymégathisme et un pléomorphisme plus élevés, mais ni leur fonction de pompe ni leur perméabilité ne sont affectées (Weston 1995; Bourne 1998).

1.2.1.1 Le kératocône

Le kératocône est une dystrophie cornéenne qui se caractérise par une protrusion et un amincissement non inflammatoires de la cornée. Il est généralement découvert à l'adolescence et est bilatéral dans 86% des cas (Amsler 1961), mais il y a des variations ethniques. Au Japon, par exemple, il est surtout unilatéral et affecte plus les hommes que les femmes (Takeuchi 1980). Sa prévalence est estimée à 54.5 pour 100 000 (Rabinowitz 1998). Il n'est généralement associé à aucune autre pathologie, mais des liens ont été faits entre le kératocône et la trisomie 21 (Colin 2005). Ce lien pourrait être relié au fait que les trisomiques ont tendance à souvent se frotter les yeux vigoureusement, ce qui a été démontré, avec le port de lentilles de contact rigides, comme étant un facteur pouvant aggraver le kératocône (Hartstein 1968). Chez les patients atteints, l'activité augmentée des cellules endothéliales cause la désintégration de la membrane de Descemet, entraînant ce qu'on appelle des déchirures de Descemet (Gupta 1965; Suveges 1981). Dû à sa forme conique, la cornée du patient kératoconique est moins transparente et le patient est affecté par une myopie et un astigmatisme irréguliers.

La première étape dans le traitement du kératocône ne fait que tenter de corriger la myopie et l'astigmatisme par le port de lunettes. Les formes plus avancées de kératocône nécessitent l'utilisation de lentilles de contact et ce port obligatoire de lentilles de contact entraîne une perte de cellules endothéliales significative (Edmonds 2004). Lorsqu'un kératocône est très sévère et que les lentilles de contact ne suffisent plus pour corriger les amétropies du patient ou lorsque les lentilles de contact ne sont plus tolérées par le patient, une greffe de cornée est indiquée (Bron 1988; Rabinowitz 1998). En France et dans certaines régions des États-Unis, le kératocône serait ainsi la première cause de greffes de cornée (Mamalis 1992; Colin 2005).

1.2.1.2 La *cornea guttata* et la dystrophie de Fuchs

La *cornea guttata* et la dystrophie endothéliale de Fuchs sont reliées de près et leurs changements pathologiques sont dus à une maladie de l'endothélium (Iwamoto 1971). La dystrophie de Fuchs a été nommée par Ernst Fuchs, qui l'a identifiée en 1910. C'est la terminologie utilisée dans le cas spécifique d'une *cornea guttata* qui évolue vers l'œdème cornéen (Borderie 1999). Ce sont des maladies bilatérales qui affectent trois fois plus de femmes que d'hommes et elles sont accompagnées d'hypermétropie et d'astigmatisme (Borderie 1999). Elles sont caractérisées par la formation de gouttes dans l'endothélium central et sont parfois accompagnées de granules pigmentaires à l'intérieur ou près des cellules endothéliales (Borboli 2002). L'œdème apparaît lorsque les gouttes sont confluentes au centre de la cornée et une perte de la transparence cornéenne peut en résulter (Wilson 1988). Également, les cellules endothéliales ont des complexes jonctionnels moins serrés entre elles (Iwamoto 1971) et sont apoptotiques (Szentmary 2005). La *cornea guttata* est très prévalente. Une étude a démontré que 31.5% des personnes entre 10 et 39 ans et 70.4% au-delà de 40 ans ont des gouttes identifiables en microscopie spéculaire (Lorenzetti 1967). La maladie, qui est probablement génétique, serait due à une anomalie dans le développement de l'endothélium et prend généralement de 10 à 20 ans à progresser jusqu'à l'œdème cornéen. Cependant, la plupart des cas de *cornea guttata* ne se rendent pas jusqu'à l'œdème (Waring 1982; McCartney 1988; Weisenthal 1997). Une étude a permis de démontrer que l'épaississement est dû à la diminution de la fonction de pompe de

l'endothélium (Mandell 1989). Il a aussi été remarqué que la dystrophie de Fuchs est plus prévalente chez les patients kératoconiques (Orlin 1990).

La dystrophie de Fuchs est classé en trois stades évolutifs. Au stade 1, les premiers symptômes sont observés; il s'agit de lésions sur l'endothélium (aussi appelées gouttes) visibles au microscope spéculaire. Elles apparaissent généralement chez les patients âgés entre 30 et 50 ans. Malgré ces gouttes, la fonction de la cornée n'est aucunement affectée et le patient atteint ne s'en rend pas compte. Au stade 2 le patient commence à remarquer des effets sur sa vision. Un œdème de cornée apparaît, entraînant pour le patient une perte d'acuité visuelle ainsi que la perception de halos colorés. Cet œdème apparaît le matin quand le patient se lève et disparaît pendant la journée. Lorsque la dystrophie est plus avancée, l'œdème dure plus longtemps et un jour peut devenir permanent. Au stade 3, une fibrose sous-épithéliale se développe, menant à une baisse de l'acuité visuelle encore plus importante, jusqu'à ce que le patient ne puisse distinguer que des mouvements. Au stade 4, la cornée est opaque et les gouttes dans l'endothélium sont rendues confluentes. Au dernier stade, aucune cellule endothéliale ni contour cellulaire n'est visible au microscope spéculaire (Borderie 1999).

Le traitement de la dystrophie de Fuchs dépend de l'étape de l'évolution de la maladie. La plupart des cas (96%) de *cornea guttata* demeurent au stade 1. S'il y a un œdème transitoire matinal (stade 2), un traitement symptomatique peut être prescrit. Celui-ci consiste à appliquer un sérum salé hypertonique sur la cornée pour faire disparaître plus rapidement l'œdème (Borderie 1999). Au prochain stade de la maladie (stade 3), le port d'une lentille de contact hydrophile aide à diminuer l'œdème et les épisodes douloureux de ruptures de bulles présentes sous l'épithélium (Borboli 2002). Finalement, lorsque les symptômes ne peuvent plus être contrôlés de façon adéquate et que la cornée s'opacifie (stade 4), une greffe de cornée doit être faite. La dystrophie de Fuchs est ainsi responsable d'environ 10 à 15% des greffes de cornée (Adamis 1993; Price 1993).

1.2.1.3 La kératopathie bulleuse

La kératopathie bulleuse est une complication de la chirurgie pour cataracte, surtout lors d'implantation d'une lentille intraoculaire (LIO) dans la chambre antérieure (Tuft 1990; Schraepen 2003). Son incidence diminue de plus en plus avec la discontinuation de certains types de LIO avec lesquels étaient associés un risque élevé de développer une kératopathie bulleuse. Depuis les derniers 15 ans, le kératocône a dépassé la kératopathie bulleuse comme indication pour la greffe de cornée dans certaines régions (Mamalis 1992). Pourtant, avec plus de 1 500 000 extractions de cataracte par année seulement aux États-Unis, elle demeure encore un problème, puisque de 1 à 5% des extractions de cataracte sont accompagnées d'une kératopathie (Desai 2001; Wu 2005). À la suite de l'extraction d'une cataracte, il y a une perte rapide de cellules endothéliales au centre de la cornée dans les premiers 3 à 12 mois suivant la chirurgie (Galin 1979). Suivant cette période, il y a une perte plus importante dans les cas impliquant une LIO (Sugar 1978; Liesegang 1984). Les causes principales de la perte de cellules endothéliales sont des traumatismes mécaniques à l'endothélium pendant la chirurgie et des fluides d'irrigation utilisés lors de la chirurgie qui sont incompatibles avec l'endothélium (Polack 1977; Tuft 1990). Les traumatismes mécaniques peuvent impliquer un contact entre l'endothélium et l'instrument chirurgical, un fragment de cristallin ou la LIO (Binder 1976; Kaufman 1976; Polack 1976). Une étude a permis de démontrer que le détachement pathologique de la membrane de Descemet est associé dans 43% des cas à une kératopathie bulleuse (Pieramici 1994).

Dans la plupart des cas, la kératoplastie pénétrante est la seule option viable pour solutionner le stade symptomatique de la kératopathie (Farge 1978; Schraepen 2003). La kératopathie bulleuse est responsable pour un bon nombre de transplantations de cornée, mais plusieurs études ont rapporté des pourcentages très différents, dépendant de la région dans le monde (Price 1993; Nguyen 2004; Kang 2005b). Certaines études américaines rapportent que la kératopathie bulleuse est encore la première indication pour la greffe de cornée (Cosar 2002; Thompson 2003).

1.2.2 Traumatismes non-chirurgicaux à l'endothélium

Les traumatismes oculaires sont la deuxième cause de cécité dans le monde (Larian 1999). Puisque l'endothélium est en contact direct avec la membrane de Descemet et qu'aucun complexe jonctionnel n'est présent entre eux, un traumatisme mécanique à l'œil peut facilement déloger l'endothélium (sans compter les autres types de traumatismes) (Waring 1974). Les traumatismes qui seront décrits ici sont les contusions et les plaies perforantes. D'autres traumatismes oculaires directs affectant la cornée peuvent impliquer des produits chimiques. Pour bien remédier à de telles situations, il est important de réagir très rapidement (Mitchell 2000).

La majorité des traumatismes oculaires répertoriés dans les salles d'urgence sont des abrasions cornéennes avec ou sans corps étranger (Markovchick 1993). Dans les cas les plus graves, l'abrasion sera la cause d'une plaie perforante accompagnée d'un corps étranger. Selon la vitesse de pénétration et la grosseur de l'objet, la cornée seule peut être affectée. À des vitesses supérieures, les effets sont plus importants et le segment postérieur de l'œil sera affecté et ce à divers degrés de gravité (Dannenberg 1992b; Nguyen 2002). Lorsque seule la cornée est atteinte, elle peut guérir par elle-même sans intervention chirurgicale si l'objet est assez petit. Il peut cependant s'avérer nécessaire d'avoir recours à une greffe si la perforation est assez grande et/ou profonde. Dans 22% des cas, la perforation survient au travail et peut impliquer des situations tel que le sablage au jet (Dannenberg 1992a). Un autre 22% des cas impliquent l'utilisation de couteaux, ciseaux, barres de métal et autres lors d'agressions (Dannenberg 1992b). De plus, un grand nombre des traumatismes perforants impliquent des armes à feu et explosifs (Quere 1969; Doswald-Beek 1993). De plus, les nombreux conflits modernes ne font qu'augmenter ce chiffre (Lashkari 1995; Aslam 2005; Ari 2006; Mader 2006).

Une contusion à l'œil peut, dans les cas les plus simples, causer une kératopathie annulaire postérieure (anneau endothélial cornéen). Cette kératopathie est causée par l'onde

de choc qui est propagée dans la cornée suivant la contusion. Les cellules endothéliales deviennent oedémateuses et endommagées dans une forme ressemblant au microscope spéculaire à un anneau, d'où son nom (Cibis 1978). L'anneau est visible durant quelques jours et disparaît ensuite complètement, laissant des cellules plus grosses qu'avant l'incident (Maloney 1979). Dans les cas les plus graves, la contusion est associée à un traumatisme violent impliquant un objet sphérique de petit diamètre (tennis, squash, golf, bouchon de champagne, etc.). Dans ce cas, une hématicornée peut apparaître, qui est le produit de dégradation de l'hémoglobine forcé à entrer dans la cornée dû à l'hyperpression dans la chambre antérieure (Pouliquen 1967). On peut tenter de remédier à la situation en faisant des lavages et une ablation des caillots présents dans la cornée mais lorsque l'hématicornée persiste, une transplantation peut être requise.

1.3 La greffe cornéenne

La greffe de cornée est la méthode chirurgicale privilégiée pour le traitement de nombreux désordres affectant l'endothélium cornéen (Yeh 2004). Aux États-Unis, pratiquement la moitié des transplantations de cornée sont faites pour régler un problème dû à un endothélium non fonctionnel, pathologique ou absent (Laibson 2002). Pourtant, bien qu'étant utilisée pour régler des complications liées à un endothélium anormal, la greffe cornéenne n'est pas sans complication. Elle entraîne toujours une perte centrale de cellules endothéliales (Tuft 1990) ainsi qu'une myopie et un astigmatisme inhérents à la technique chirurgicale (Tomidokoro 2004; Chang 2005; Javadi 2005). Ces amétropies peuvent parfois être corrigées en utilisant des moyens simples (Szcotka 2003). Plusieurs patients ayant subis une greffe cornéenne ne peuvent ainsi plus avoir leur amétropie corrigée par le port de lunettes ou de verres de contact et doivent avoir recours à la chirurgie réfractive, comme le LASIK (Chang 2005). Pour ce qui est du rejet immunitaire, suivant une greffe pour kératocône, de 7.8 à 31% des greffes sont rejetées après 1 à 2 ans. Chez les patients atteints de trisomie 21, les rejets sont plus fréquents (Chandler 1974; Sharif 1991). La greffe allogénique est avantageuse puisqu'elle n'est pas très dispendieuse et est relativement simple à effectuer. Les désavantages incluent la perte de cellules endothéliales, les amétropies et le rejet possible de la greffe. Également, le manque général

de cornées ainsi que les difficultés légales et culturelles à se procurer des cornées dans certains pays ne font qu'empirer la situation (Lee 1992; Patel 1992; Shaheen 2004). En effet, dans les pays industrialisés, il y a plus de patients en attente d'une transplantation cornéenne qu'il y a de donneurs. Ceci mène souvent à des transplantations unilatérales chez les patients atteints d'un problème bilatéral (Muraine 2002).

Une alternative est la transplantation autologue de tissu sain, mais cette technique ne peut être utilisée dans les cas requérant une kératoplastie pénétrante. Cette technique a l'avantage de ne pas être allogénique et il n'y a donc aucun rejet. Cependant, il se peut que la pathologie en question soit bilatérale, ce qui rend l'utilisation de cellules autologues impraticable. De plus, le nombre de cellules requises pour une greffe autologue est important, ce qui, dans plusieurs cas, empirerait la situation. C'est ici qu'entre en jeu le génie tissulaire, qui pourrait hypothétiquement être utilisé pour produire une greffe autologue, même avec un petit nombre initial de cellules saines (Germain 2000).

1.4 Le génie tissulaire

Le génie tissulaire est une branche émergente de la biotechnologie et est un champ multidisciplinaire qui regroupe la biologie, le génie et la médecine. Son but est de réparer, régénérer ou remplacer les tissus et organes humains qui se trouvent endommagés. Ses partisans espèrent ainsi révolutionner la médecine et améliorer la santé de millions de personnes à travers le monde. Les tissus reconstruits par génie tissulaire ont un rôle clinique dans lequel le tissu endommagé ou pathologique d'un patient est régénéré *in situ* ou encore fabriqué *in vitro* et ensuite transplanté chez le patient. Les tissus reconstruits peuvent également servir de modèles expérimentaux dans le laboratoire (Bell 1991). Les applications expérimentales impliquent l'utilisation des tissus reconstruits pour mesurer, par exemple, le métabolisme, l'absorption, la toxicité et la pathogénicité d'une drogue. Le génie tissulaire est organisé en diverses sections: (a) les biomatériaux, qui sont développés et utilisés pour diriger la croissance, l'organisation et la différenciation des cellules lors de la formation d'un tissu, (b) la section de la culture cellulaire, qui cherche à fournir des

méthodologies pratiques pour un approvisionnement en cellules simple et rapide, pour leur prolifération *in vitro* et si nécessaire leur différenciation, (c) les biomolécules, qui sont utilisées en relation avec la culture cellulaire pour fournir aux cellules les facteurs de croissance et de différenciation requis, (d) les aspects de design en génie, qui entrent en jeu dans la construction de bioréacteurs, dans la vascularisation des tissus reconstruits et dans l'entreposage et le transport de tissus reconstruits et (e) les aspects de design en biomécanique, qui sont étudiés pour fournir aux tissus reconstruits les propriétés des tissus d'origine et vérifier leur sécurité pour les futures transplantations (Bell 1991). Les interactions entre toutes ces sections sont nombreuses et continues.

L'application du génie tissulaire au présent projet implique la section de la culture cellulaire dans l'isolement et la prolifération des cellules endothéliales cornéennes de porc. Le porc a été choisi comme modèle pour des raisons budgétaires et de disponibilité. La cornée porcine étant très semblable à la cornée humaine, elle substitue bien celle-ci comme modèle. Nous espérons donc pouvoir appliquer les données accumulées sur le porc à l'humain sans trop de modifications. Le laboratoire d'accueil de l'auteur, le Laboratoire d'Organogénèse Expérimentale (LOEX), a déjà une ample expérience dans le domaine du génie tissulaire et ce dans plus d'un secteur, que ce soit dans la culture cellulaire, les biomolécules ou encore les aspects de design en génie et en biomécanique.

1.4.1 Connaissances actuelles

Les techniques de culture cellulaire utilisant des cellules endothéliales cornéennes porcines (CECP) adultes ne sont pas très avancées. D'une part, une bonne partie des résultats présents dans la littérature sont obtenus avec des CECP fœtales, qui prolifèrent spontanément *in vitro* (Pistsov 1988). En effet, des études ont permis de remarquer que des cultures de cellules endothéliales provenant de cornées fœtales ne présentent pas de signes de sénescence, même en suivant les cultures jusqu'au dixième passage (Schneider 1997). Par contre, des cellules de cornées adultes ne se gardent en culture que jusqu'au cinquième ou sixième passage (Reichl 2003). Aussi, les cellules adultes requièrent un stimuli fourni

par des mitogènes tel que le sérum de veau fœtal pour proliférer *in vitro* (Engelmann 1988). D'autre part et ce de plus en plus, les cellules humaines sont utilisées directement (Blake 1997; Chen 2001; Amano 2003), grâce entre autres à l'obtention plus facile d'yeux humains et au développement d'un milieu de culture complet favorisant leur expansion (Zhu 2004). Dans le cas du présent projet de recherche, il était nécessaire d'utiliser des cellules adultes de porc âgés de 2 à 3 ans, puisque le laboratoire d'accueil de l'auteur participait à un projet dont l'utilisation de ces cellules était centrale. Des améliorations ont donc dû être apportées aux méthodes en utilisation pour l'extraction et la culture des CECP.

D'abord, les cellules doivent être isolées. Il existe présentement deux méthodes prédominantes pour l'isolement des cellules endothéliales cornéennes chez le porc. L'une implique la dissection horizontale de la cornée excisée à travers le stroma et le dépôt subséquent du morceau obtenu sur une membrane de cellulose pour permettre aux cellules de migrer de l'échantillon vers la membrane de cellulose (Schneider 1997). L'autre utilise une solution de trypsine avec de l'acide éthylène diamino tétraacétique (EDTA) pour décoller les cellules de la cornée. C'est cette dernière qui permet d'obtenir des cellules ayant la plus belle morphologie. Il existe quelques variations de la deuxième méthode. L'une implique l'utilisation d'une spatule pour gratter la surface postérieure de la cornée pour retirer les cellules endothéliales détachées par le mélange de trypsine et EDTA (Reichl 2003). L'autre utilise un jet liquide pour aider à décoller les cellules endothéliales de la membrane de Descemet (Engelmann 1999). Une autre technique est utilisée pour isoler les cellules des cornées humaines, dans laquelle la membrane de Descemet avec les cellules endothéliales est disséquée du stroma, suivi de l'extraction enzymatique des cellules (Zhu 2004). Cette technique emploie du FNC Coating Mix (Biological Research Faculty & Facility, Ijamsville, MD). Ce dernier est un réactif de culture cellulaire sans sérum contenant de la fibronectine, du collagène et de l'albumine. Il est vendu en tant que substrat pour la culture cellulaire et est supposé aider les cellules à se fixer à leur surface de culture.

Les effets de quelques milieux de bases sur la croissance des CECP ont déjà été étudiés (Engelmann 1989; Schneider 1999). Ces milieux incluent le milieu de Eagle modifié par Dulbecco ou *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), le milieu essentiel minimal de Eagle ou *Minimum Essential Medium, Eagle* (MEM), ainsi que du DMEM additionné du supplément nutritionnel F12. Le pourcentage de sérum qui donne les meilleurs résultats a aussi déjà été déterminé dans une étude utilisant des cellules endothéliales de porc, quoique les cellules provenaient de fœtus de porc et non de porcs adultes (Schneider 1999). Le niveau optimal de sérum pourra donc aussi être déterminé. Le milieu qui a été retenu pour les expériences est le DMEM contenant 20% de sérum de veau fœtal (SVF). Le milieu de base utilisé dans le milieu décrit récemment pour la culture de cellules endothéliales humaines, soit l'Opti-MEM I, sera aussi étudié (Zhu 2004). Les milieux DMEM et Opti-MEM I sont des modifications du milieu MEM. Les différences entre les deux sont présentées dans le tableau 1-1. Les milieux présentement utilisés pour la culture de CECP contiennent comme additif du sérum et une optimisation du milieu de culture sera peut-être possible en essayant d'y ajouter différents facteurs de croissance en tant qu'additifs. En plus des additifs, l'effet de certaines conditions de culture sur la culture des cellules endothéliales, comme par exemple l'utilisation de co-culture, sera évalué.

Tableau 1-1 Différences entre les milieux de base DMEM et Opti-MEM I

supplément	DMEM	Opti-MEM I
hypoxanthine	-	×
thymidine	-	×
pyruvate de sodium	×	×
insuline	-	×
transférine	-	×
L-glutamine	×	×
L-glycine	×	-
L-sérine	×	-
facteurs de croissance	-	×

1.4.1.1 Des additifs au milieu de culture

L'action de plusieurs facteurs de croissance et cytokines sur la capacité à proliférer et sur la morphologie de cellules *in vivo* et *in vitro* est connue. Ces molécules sont présentes *in vivo* dans le film lacrymal recouvrant la cornée et dans la matrice sécrétée par l'endothélium et peuvent agir lors d'une blessure à la cornée (Imanishi 2000). Il y a donc une possibilité que ces facteurs de croissance puissent être utilisés comme additifs dans un milieu de culture pour CECP pour augmenter leur capacité à proliférer ou encore pour améliorer leur morphologie (Engelmann 1989). Ces additifs potentiels pour l'endothélium sont le facteur de croissance épidermique ou "epidermal growth factor" (EGF), le facteur de croissance fibroblastique basique ou "basic fibroblast growth factor" (bFGF), le supplément de croissance cellulaire endothéliale ou "endothelial cell growth supplement" (ECGS) et le facteur de croissance nerveux ou "nerve growth factor" (NGF).

Le facteur de croissance épidermique est une protéine de 6 kDa qui est présente dans plusieurs tissus, tels que la glande lacrymale, les reins, la glande thyroïde et le pancréas (Imanishi 2000). Pour ce qui est des cellules de la cornée, il stimule la prolifération des cellules épithéliales (Savage 1973) et endothéliales (Gospodarowicz 1977; Samples 1991; Hongo 1992). Les cellules endothéliales possèdent deux types de récepteurs pour l'EGF: un avec une faible affinité et un autre avec une haute affinité pour l'EGF (Imanishi 2000). De plus, il a été utilisé dans la culture de cellules endothéliales humaines à 5 et 6 ng/ml (Nayak 1984; Zhu 2004).

Le facteur de croissance fibroblastique basique, aussi appelé bFGF ou FGF-2, est le premier FGF d'une famille de 23 membres à avoir été découvert et cloné (Abraham 1986). Il existe 4 récepteurs pour ces 23 FGF (récepteurs FGF-1, 2, 3 et 4), l'épissage étant ce qui les différencie (Riva 2005). Des recherches ont démontré que le bFGF se lie à la membrane de Descemet *in vivo* (Soubrane 1990) et que l'ARN messager des trois motifs (alpha, beta et gamma) du récepteur FGF-1 est présent dans les cellules endothéliales cornéennes (Wilson

1993). Il a aussi été démontré que la présence de bFGF dans le milieu de culture de cellules endothéliales humaines et bovines améliore leur aspect morphologique (Gospodarowicz 1977; Engelmann 1999). De plus, Lee *et al* ont démontré que des cellules endothéliales de lapin exposées au bFGF peuvent perdre leur inhibition de croissance causée par les contacts entre les cellules et devenir migratoires (Lee 2003; Lee 2006). Enfin, le bFGF augmente la production d'ADN endothélial cornéen chez le boeuf (Woost 1992). Les études publiées utilisaient le bFGF à des concentrations de 10 ou 12.5 ng/ml. Il sera donc testé sur les cellules endothéliales de porc pour voir s'il produit les mêmes effets que chez les autres espèces. Il sera alors peut-être possible d'augmenter le nombre de CECP en croissance active en utilisant le bFGF.

Le supplément de croissance cellulaire endothéliale (ECGS) est un mélange de plusieurs facteurs de croissance élaboré à partir du cerveau bovin. Il contient entre autre le facteur de croissance cellulaire endothéliale ou "endothelial cell growth factor" (ECGF). Ce facteur a un poids moléculaire d'environ 75 kDa et a été isolé pour la première fois à partir de l'hypothalamus bovin. Il possède une activité mitogénique sur les cellules endothéliales vasculaires (Maciag 1979). Également, il a déjà été utilisé dans des cultures de cellules endothéliales cornéennes humaines à des concentrations variant de 25 ng/ml (Nayak 1984) jusqu'à 150 µg/ml (Blake 1997).

Le facteur de croissance neuronale ou NGF est le membre le mieux connu d'une petite famille de neurotrophines bien conservées (Micera 2004). C'est un facteur qui promouvoit la croissance cellulaire, la différenciation et a un certain contrôle sur la survie et la mort cellulaire (Levi-Montalcini 1987). Il a été démontré que le NGF améliore l'aspect morphologique des cellules endothéliales cornéennes humaines, sans toutefois promouvoir leur prolifération et est utilisé à une concentration de 20 ng/ml (Zhu 2004).

1.4.1.2 La co-culture

Certains types cellulaires requièrent qu'une couche de cellules nourricières soit présente pour pouvoir proliférer *in vitro*. Ceci est souvent le cas puisqu'un type cellulaire donné est rarement seul *in vivo*. Il est souvent en contact avec un autre type cellulaire qui peut libérer des facteurs de croissance ou des cytokines, par exemple. Un type de cellule nourricière largement utilisé est la lignée murine fibroblastique NIH/3T3. La première utilisation de cette lignée en tant que couche nourricière remonte à 30 ans, lorsqu'elle a été mis en co-culture avec des kératinocytes épidermiques humains, leur permettant ainsi de former des colonies à partir d'un petit nombre de cellules (Rheinwald 1975). L'utilisation d'une couche de cellules nourricières est maintenant commune *in vitro* (Honda 2006; Jang 2006). Souvent, une couche nourricière de cellules 3T3 irradiées est utilisée dans la culture de différents types cellulaires, tels que les cellules épithéliales cornéennes (Lindberg 1993). Puisque l'endothélium est en fait plus près d'un épithélium que d'un endothélium véritable (Meier 1977), l'utilisation d'une couche de cellules nourricières, telles que les cellules murines 3T3, pourrait être bénéfique. Les cellules endothéliales ont une tendance à perdre leur morphologie typiquement hexagonale et à entrer en différenciation terminale lorsqu'elles sont peu nombreuses sur une surface donnée. Ainsi, la présence de cellules 3T3 dans une culture de cellules endothéliales cornéennes devrait aider à remplir l'espace qui est normalement occupé par des cellules endothéliales *in vivo*, aidant les autres cellules endothéliales à demeurer hexagonales et à ne pas entrer en différenciation terminale.

1.4.1.3 Prolifération cellulaire

Le nombre de cellules dans une culture ainsi que leur morphologie et leur grosseur sont des données facilement analysées et comparées d'une culture à une autre en n'utilisant qu'un microscope et un compteur de cellules. Par contre, la mesure de la capacité à proliférer des cellules endothéliales requiert l'utilisation d'un protocole plus élaboré. Une méthode a déjà été décrite utilisant le 5-bromodeoxyuridine (BrdU) (van Erp 1988). Le BrdU est une molécule analogue de la thymidine (Figure 1-8). La seule différence entre ces deux molécules est le remplacement d'un groupe méthyl dans la

thymidine par un atome de brome. Lorsqu'une cellule est en prolifération active, elle entre dans une phase de synthèse d'ADN. L'ajout au milieu de culture d'une faible quantité de BrdU permet son incorporation dans l'ADN fraîchement synthétisé. Pour détecter la présence du BrdU dans l'ADN des cellules, celles-ci sont perméabilisées et leur ADN est partiellement dénaturé. Un anticorps anti-BrdU spécifique, couplé à une molécule fluorescente, est alors utilisé pour révéler le BrdU. L'analyse se fait par cytométrie de flux et on obtient alors le pourcentage des cellules qui sont en prolifération active. Cette donnée quantitative s'apprête bien à la comparaison des effets de différentes conditions de culture sur la prolifération cellulaire.

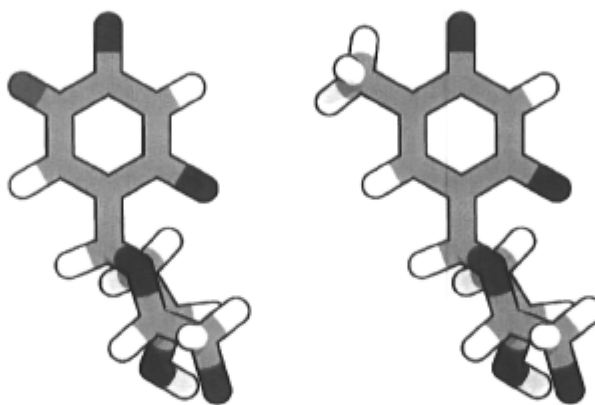


Figure 1-8 Comparaison structurale entre le BrdU et la thymidine

La seule différence entre la structure du BrdU (gauche) et celle de la thymidine (droite) est le remplacement dans la thymidine d'un groupe méthyle par un atome de brome.

1.5 Problématique et objectifs

Le projet de maîtrise à la base du présent mémoire cherche à utiliser le génie tissulaire pour solutionner un problème relié au développement par un autre laboratoire d'une nouvelle technique chirurgicale visant à offrir aux chirurgiens une nouvelle alternative pour la correction de problèmes précis. Quoique cette technique ne soit pas

expliquée ni abordée directement dans ce projet, son développement en soi nécessitera l'application du génie tissulaire et de façon plus spécifique de la culture cellulaire. Un accord a été conclu entre les deux laboratoires afin d'utiliser des cornées de porc et ces cornées sont prévues, en autant que possible, être reconstruites par génie tissulaire. Leur reconstruction nécessitera un nombre élevé de cellules, puisque chaque cornée comporte, en terme de cellules endothéliales seulement, autour de 400 000 cellules (Tuft 1990). Le choix de l'animal modèle s'est arrêté sur le porc, puisque celui-ci a une cornée qui ressemble de très près à la cornée humaine en terme de structure, de diamètre, d'épaisseur et de propriétés biomécaniques (Zeng 2001). C'est donc un modèle optimal pour le développement d'une technique chirurgicale. Pourtant, la recherche axée sur la culture prolongée de cellules endothéliales cornéennes porcines adultes n'est pas avancé. La problématique ayant mené à ces expériences est donc la suivante : peut-on optimiser les techniques d'extraction et de culture des cellules endothéliales cornéennes de porc adulte? Le premier objectif de ce projet est donc le développement et l'optimisation des techniques pour l'isolement de CECP viables provenant de cornées fraîches obtenues dans des abattoirs locaux. Le deuxième objectif est d'optimiser les techniques pour la culture efficace des CECP, afin de pouvoir obtenir de cornées porcines adultes le plus grand nombre de cellules possédant les caractéristiques des cellules observées *in vivo*. Pour ce faire, une série d'expériences a été complétée ayant comme buts (a) l'optimisation de l'extraction des CECP à partir de cornées porcines fraîches obtenues dans des abattoirs et (b) l'optimisation des différents paramètres intervenant dans la culture des CECP. Les variables analysées sont la surface de culture et l'utilisation possible de substrat de culture, le milieu de culture et ses additifs, l'utilisation de co-culture, la densité cellulaire et la confluence optimale pour les passages.

Pour ce qui est de l'extraction des cellules, la méthode déjà décrite donnant les meilleurs résultats (Engelmann 1999) est analysée pour voir si elle se prête bien aux cellules de pores adultes. Les auteurs l'ayant décrite l'avait seulement utilisée sur des porcs de 6 mois, tandis que les porcs des abattoirs locaux sont âgés de 2 à 3 ans. Si la méthode convient aux cellules adultes, elle pourra peut-être aussi être optimisée en modifiant les

concentrations des réactifs. Les densités d'ensemencement retrouvées dans la littérature suggèrent que les cellules sont ensemencées à des densités élevées, certaines allant jusqu'à 64 000 cellules / cm² (Reichl 2003). Cependant, si l'on espère pouvoir partir d'un nombre restreint de cellules tout en obtenant des cultures confluentes de CECP, des densités moindres devront être utilisées. La densité d'ensemencement doit donc aussi être optimisée pour les cellules de porcs adultes âgés de 2 à 3 ans. Également dans la littérature, les CECP sont souvent passées lorsque leur culture atteint la confluence (Engelmann 1999; Schneider 1999). Il est cependant connu que les cellules endothéliales de la cornée tendent à ne pas proliférer lorsqu'elles sont en contact les unes avec les autres, ce qui se passe lorsqu'une culture a atteint la confluence (Joyce 2003). Le pourcentage de confluence utilisé lors du passage des CECP adultes doit donc également être optimisé.

Enfin, des additifs seront ajoutés au milieu de culture pour tenter d'obtenir une plus grande quantité de cellules endothéliales possédant la morphologie caractéristique des CECP. Le EGF sera utilisé à 1, 10 ou 20 ng/ml, suivant de près les concentrations de 5 ou 6 ng/ml utilisée dans la culture des cellules endothéliales humaines (Nayak 1984; Zhu 2004). Des concentrations de 1, 10 et 20 ng/ml seront également essayées pour le NGF, suivant la concentration de 20 ng/ml utilisée avec les cellules humaines (Zhu 2004). Le bFGF sera testé à des concentrations de 1 et de 10 ng/ml, alors que l'utilisation rapportée dans la littérature est à 10 ou 12.5 ng/ml (Nayak 1984; Lee 2003). Par la suite, le ECGS sera ajouté au milieu de culture à 25 µg/ml, une valeur située quelque part entre les valeurs publiées, qui varient largement d'une étude à une autre.

CHAPITRE 2

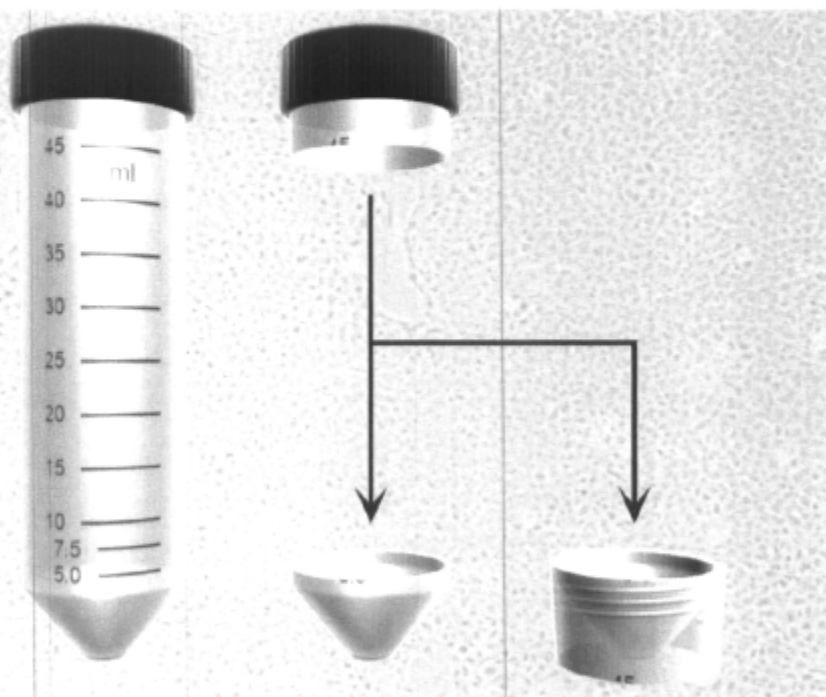
Méthodologie

2.1 Optimisation de l'extraction des CECP

54 yeux porcins frais (27 paires) ont été obtenus d'un abattoir local (Rolland Pouliot et fils, St-Henri-de-Lévis, QC). Chaque paire a été lavée 3 fois dans 20 ml de DMEM (Gibco, Invitrogen) contenant des antibiotiques (100 UI ml⁻¹ pénicilline (Sigma) et 25 µg ml⁻¹ gentamicine (Schering)). Les cornées ont été excisées à l'aide de ciseaux Castroviejo courbes et lavées 3 fois dans 10 ml de DMEM avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF) (Hyclone) et des antibiotiques. Chaque cornée a ensuite été placée l'endothélium vers le haut dans un récipient fabriqué sur mesure à partir de tubes coniques de centrifugation de 50 ml stérilisé (BD Falcon™, BD Biosciences) (Figure 2-1). De 0.3 à 0.5 ml d'une solution de trypsine (Intergen) avec EDTA (Fisher) d'une de 9 différentes concentrations (Tableau 2-1) ont été déposées sur les endothéliums et les cornées ont été incubées 20 minutes à 37°C dans une atmosphère humide. Chaque concentration a été testée sur 3 paires de cornées. Par la suite, la suspension de cellules endothéliales a été aspirée doucement dans chacune des cornées et transférée dans un tube de 50 ml (les deux cornées d'une même paire d'yeux ont été mises dans le même tube). Une aiguille de grosseur 18G a ensuite été placée sur une seringue stérile de 60 ml et la seringue remplie de DMEM contenant 10% de SVF et des antibiotiques. En créant un jet avec la seringue, chaque cornée a été rincée avec 15 ml de milieu. Le liquide contenant les cellules détachées a été récupéré dans le tube contenant déjà la suspension cellulaire initiale. Les tubes ont ensuite été centrifugés 10 minutes à 1180 RPM avec les culots cellulaires de chaque tube resuspendus dans 4 ml de DMEM avec 20% SVF et des antibiotiques. Un *aliquot* de 200 µL a été prélevé dans chaque tube pour compter les cellules à l'aide d'un Coulter Counter® (Beckman Coulter). Le pourcentage de viabilité des cellules a aussi été déterminé en

Tableau 2-1 Formulation des solutions de trypsine / EDTA

	Solution de trypsine / EDTA								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
eau (ml)	-	9	9	9	9	9	9	9	9
PBS 1X (ml)	-	1	1	1	1	1	1	1	1
trypsine (mg)	-	0	0	50	100	50	50	100	100
EDTA (mg)	-	20	50	0	0	20	50	20	50
dextrose (mg)	-	5	5	5	5	5	5	5	5
pénicilline (mg)	-	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
gentamicine (mg)	-	0.42	0.42	0.42	0.42	0.42	0.42	0.42	0.42
% trypsine	0	0	0	0.5	1	0.5	0.5	1	1
% EDTA	0	0.2	0.5	0	0	0.2	0.5	0.2	0.5

**Figure 2-1** Fabrication propre du récipient à cornée

Un tube BD Falcon[™] de 50 ml est coupé à deux endroits. La partie conique du bas est placée à l'intérieur de la partie du haut et les deux pièces sont fixées ensemble en chauffant le plastique.

utilisant la méthode de l'exclusion du bleu de trypan avec un hémacimètre. Les cellules ont enfin étéensemencées dans 3 ml de DMEM avec 20% SVF et des antibiotiques dans des plaques de 6 puits à 12 000 cellules cm^{-2} . Chaque puits contenait les cellules d'une seule paire d'yeux, pour un total de 27 puits. Les cultures ont été placées dans des incubateurs à 37°C, leur milieu a été changé à tous les 2 ou 3 jours et leur aspect morphologique observé au microscope à contraste de phase jusqu'à confluence. L'expérience a été complétée deux fois.

2.2 Pourcentage de confluence optimal

18 yeux porcins frais (9 paires) ont été obtenus d'un abattoir local (Rolland Pouliot et fils, St-Henri-de-Lévis, QC). Les cellules endothéliales ont été extraites tel que décrit précédemment dans la section 2.1 en utilisant la solution 6 du tableau 2-1. Suivant le compte cellulaire, les cellules ont étéensemencées dans 3 ml de DMEM avec 20% SVF et des antibiotiques dans des plaques de 6 puits à 12 000 cellules cm^{-2} . Chaque puits contenait les cellules d'une seule paire d'yeux, pour un total de 9 puits. Les cultures ont été placées dans des incubateurs à 37°C et leur milieu a été changé à tous les 2 ou 3 jours. Un tiers des cultures (3 paires d'yeux) a été sous-cultivé lorsque les cultures avaient atteint 90% de confluence. Un tiers des cultures (3 paires d'yeux) a été sous-cultivé lorsque les cultures avaient atteint 100% de confluence. Un tiers des cultures (3 paires d'yeux) a été sous-cultivé 1 jour après que les cultures aient atteint 100% de confluence. Lors du premier passage, les cellules ont été transférées dans des flacons de 25 cm^2 avec les mêmes paramètres que la primo-culture, mais dans 5 ml de DMEM avec 20% SVF et des antibiotiques. Leur aspect morphologique a été observé régulièrement au microscope à contraste de phase sur 5 passages et les cellules ont été comptées à chaque passage et leur grosseur mesurée à l'aide d'un Coulter Counter[®]. À chaque passage, les cellules d'une même lignée étaient trypsinées au même pourcentage de confluence (90%, 100% ou 100% + 1 jour). L'expérience a été complétée deux fois.

2.3 Choix de la surface de culture

12 yeux porcins frais (6 paires) ont été obtenus d'un abattoir local (Rolland Pouliot et fils, St-Henri-de-Lévis, QC). Les cellules endothéliales ont été extraites comme décrit précédemment dans la section 2.1 en utilisant la solution 6 du tableau 2-1. Suivant le compte cellulaire, les cellules ont étéensemencées dans 3 ml de DMEM avec 20% SVF et des antibiotiques dans une plaque de 6 puits à 12 000 cellules cm^{-2} . Chaque puits contenait les cellules d'une seule paire d'yeux, pour un total de 6 puits. Les fonds de la moitié des puits (3 puits) ont été préalablement couverts d'une fine couche de FNC Coating Mix et l'autre moitié laissée sans traitement. Le FNC Coating Mix est un réactif de culture cellulaire sans sérum contenant de la fibronectine, du collagène et de l'albumine. Les cultures ont été placées dans des incubateurs à 37°C et leur milieu a été changé à tous les 2 ou 3 jours. Lors du premier passage, les cellules ont été transférées dans des flacons de 25 cm^2 avec les mêmes paramètres que la primo-culture, mais dans 5 ml de DMEM avec 20% SVF et des antibiotiques. Leur aspect morphologique a été observé régulièrement sur 5 passages et les cellules ont été comptées et leur grosseur mesurée à chaque passage. L'expérience a été complétée deux fois.

2.4 Densité d'ensemencement optimale et co-culture

Une première expérience a été complétée en utilisant des CECP extraites comme décrit précédemment dans la section 2.1 d'yeux obtenus d'un abattoir local (Salaisons Brochu (Lafleur), St-Henri-de-Lévis, QC). Un mélange de cellules provenant de 2 paires d'yeux a été utilisé pour l'expérience. Suivant le compte cellulaire, les cellules ont étéensemencées à des concentrations de 90 000, 110 000, 130 000, 150 000 ou 170 000 cellules par puits de 9.6 cm^2 , dans 2 ml de DMEM avec 20% SVF et des antibiotiques. Les cultures ont été trypsinées, leurs cellules comptées et leur grosseur mesurée à tous les jours.

Suivant les résultats obtenus dans la première partie, 14 yeux porcins frais (7 paires) ont été obtenus d'un abattoir local (Salaisons Brochu (Lafleur), St-Henri-de-Lévis, QC). Les yeux ont été séparés en 2 ensembles de 7 yeux chacun. Les cellules endothéliales des 2 ensembles ont ensuite été extraites comme décrit précédemment dans la section 2.1 en utilisant la solution 6 du tableau 2-1 et gardées en 2 fractions (2 lignées). Suivant le compte cellulaire, les cellules ont étéensemencées à des concentrations variées avec ou sans couche de cellules nourricières, dans 5 ml de DMEM avec 20% SVF et des antibiotiques dans des flacons de 25 cm². Les cellules nourricières étaient des cellules murines fibroblastiques 3T3 irradiées préalablement afin d'empêcher leur prolifération. Les cellules 3T3 étaient à une densité constante de 20 000 cellules par cm². Les densités des CECP étaient de 400, 4 000, 8 000 ou 12 000 cellules par cm². Pour chaque densité, 4 flacons de 25 cm² ont été préparés, 2 avec cellules 3T3 et 2 sans 3T3. Les cultures ont été suivies durant 5 passages. Les cellules ont été comptées et leur grosseur mesurée à chaque passage.

De plus, la croissance cellulaire a été suivie utilisant l'incorporation du BrdU comme mesure, en utilisant une modification d'un protocole déjà décrit (van Erp 1988). À chacun des passages 1, 3 et 5, un flacon de 25 cm² par condition et par lignée a été réservé pour mesurer la croissance cellulaire. À chacun des passages, lorsque la culture a atteint 90% de confluence, du BrdU (10 µM) a été incorporé pendant 45 minutes à 37°C. La culture a ensuite été fixée dans de l'éthanol 70% à -20°C. À la fin des 5 passages, toutes les cultures ont été marquées avec un anticorps monoclonal de souris anti-BrdU couplé à la fluorescéine (Becton, Dickinson and Company). Des témoins ont également été préparés avec un anticorps de souris (IgG1) couplé à la fluorescéine (Becton, Dickinson and Company). Un témoin a également été préparé avec des cellules ayant été traitées de la même façon lors de l'incorporation du BrdU mais sans BrdU ajouté. Les cellules ont été analysées avec un FACScalibur[®] (Becton, Dickinson and Company) avec une acquisition de 15 000 évènements. Les paramètres analysés étaient la diffusion frontale (*forward scatter*), la diffusion latérale (*side scatter*) ainsi que la fluorescence verte. Lors de l'analyse des données dans le programme CellQuest Pro (Becton, Dickinson and Company), des

régions ont été formées pour exclure les débris cellulaires. L'expérience a été complétée une fois.

2.5 Choix du milieu de base

12 yeux porcins frais (6 paires) ont été obtenus d'un abattoir local (Salaisons Brochu (Lafleur), St-Henri-de-Lévis, QC). Les yeux ont été séparés en 3 ensembles de 2 paires chacun et mis à 4°C. Chaque ensemble a été traité séparément durant toute l'expérience. Les cellules endothéliales ont été extraites comme décrit précédemment dans la section 2.1. Suivant le compte cellulaire, les cellules ont étéensemencées dans 5 ml de DMEM avec 20% SVF et des antibiotiques dans un flacon de 25 cm² à 12 000 cellules cm⁻². Cette procédure a été répétée avec les autres yeux, un après l'autre. Les cultures ont été placées dans des incubateurs à 37°C et leur milieu a été changé à tous les 2 ou 3 jours. Quand les cellules avaient atteint 90% de confluence au premier passage, elles ont été trypsinées et séparées en deux parties égales. Elles ont ensuite été comptées et resuspendues soit dans du DMEM ou dans du Opti-MEM I (Gibco, Invitrogen) avec 5% SVF et des antibiotiques. Suivant la resuspension, les cellules ont étéensemencées dans des puits de 9.6 cm² à 12 000 cellules cm⁻² à raison de 2 ml par puits pour un total de 108 puits, la moitié contenant des cellules dans du DMEM et l'autre moitié contenant des cellules dans du Opti-MEM I. Les cellules ont été placées dans des incubateurs à 37°C et les cultures ont été trypsinées et comptées et la grosseur cellulaire a été mesurée à tous les jours pour 6 jours. L'expérience a été complétée trois fois.

2.6 Effets d'additifs sur les cultures de CECF

16 yeux porcins frais (8 paires) ont été obtenus d'un abattoir local (Salaisons Brochu (Lafleur), St-Henri-de-Lévis, QC). Les yeux ont été séparés en 2 ensembles de 4 paires chacun et mis à 4°C. Chaque ensemble a été traité séparément durant toute l'expérience. Les cellules endothéliales ont été extraites comme décrit précédemment dans la section 2.1. Suivant le compte cellulaire, les cellules ont étéensemencées dans 20 ml de

Opti-MEM I avec 20% SVF et des antibiotiques dans un flacon de 75 cm² à 12 000 cellules cm⁻². Cette procédure a été répétée avec le deuxième mélange de 8 yeux. Les cultures ont été placées dans des incubateurs à 37°C et leur milieu a été changé à tous les 2 ou 3 jours. Quand les cellules avaient atteint 90% de confluence au premier passage, elles ont été trypsinées, comptées et resuspendues dans des milieux contenant différentes concentrations d'additifs ou dans du Opti-MEM I sans additifs (contrôle). Les additifs étaient SVF (5, 10 ou 20%), EGF (1, 10 ou 20 ng/ml) (Austral Biological), NGF (1, 10 ou 20 ng/ml) (Biomedical Technologies), ECGS (25 µg/ml) (Sigma) et bFGF (1 ou 10 ng/ml) (Sigma). Les cellules de chaque condition ont ensuite étéensemencées dans 2 ml de leur milieu respectif dans des puits de 9.6 cm² à 12 000 cellules cm⁻². Chaque condition de chacun des deux ensembles d'yeux a été répétée 3 fois. Les cellules ont été placées dans des incubateurs à 37°C. Leur milieu a été changé à tous les 2 jours et leur morphologie a été suivie à chaque jour. L'expérience a été complétée deux fois.

CHAPITRE 3

Résultats

3.1 Optimisation de l'extraction des CECP

Les solutions contenant de la trypsine avec de l'EDTA ont permis l'extraction, de cornées fraîchement excisées, des CECP avec une viabilité acceptable (Tableau 3-1). Deux des conditions (2 et 3), ne contenant que de la trypsine à 0.5% ou 1%, ont donné un petit nombre de cellules avec une viabilité de 48%. Deux autres conditions (4 et 5), ne contenant que de l'EDTA à 0.2% ou 0.5%, ont donné moins de cellules que les solutions de trypsine. De plus, ces cellules avaient une viabilité moyenne légèrement plus élevée par rapport aux cellules extraites en n'utilisant que de la trypsine, mais cette différence en viabilité n'était pas significative à 95%. Le plus grand nombre de cellules et la meilleure viabilité ont été obtenus avec les conditions 6 et 7, avec 0.5% de trypsine et 0.2% ou 0.5% de EDTA. Les deux dernières conditions (8 et 9), contenant 1% de trypsine et 0.2% ou 0.5% de EDTA, ont permis d'isoler le même nombre de cellules, avec une viabilité légèrement plus basse. Pour la formulation exacte de chaque condition, se rapporter au tableau 2-1.

Tableau 3-1 Effet de la méthode d'extraction sur la viabilité et le nombre de CECP obtenues

Condition	Contenu	Cellules	% Viabilité
1	eau	9 213	5
2	trypsine 0.5%	56 953	48
3	trypsine 1%	57 490	48
4	EDTA 0.2%	41 464	52
5	EDTA 0.5%	46 178	50
6	trypsine 0.5% + EDTA 0.2%	211 284	92
7	trypsine 0.5% + EDTA 0.5%	220 621	90
8	trypsine 1% + EDTA 0.2%	215 110	79
9	trypsine 1% + EDTA 0.5%	216 958	77

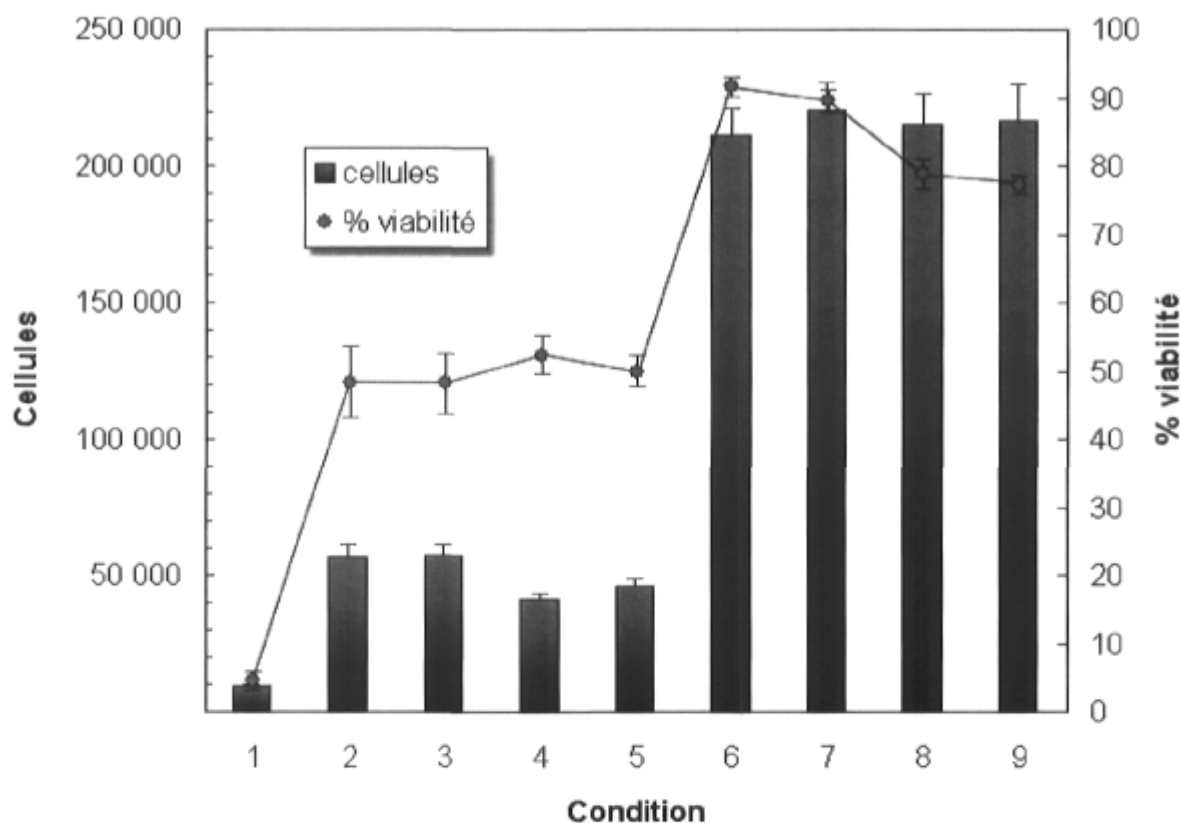


Figure 3-1 Viabilité et nombre de cellules endothéliales extraites de cornées porcines fraîchement excisées.

Les données sont présentées \pm l'intervalle de confiance à 95%. Les conditions donnant le plus grand nombre de cellules avec la meilleure viabilité sont les conditions 6 et 7, contenant 0.5% de trypsine avec 0.2% (6) ou 0.5% (7) de EDTA ($n = 3$).

Pour calculer l'intervalle de confiance (I.C.), il est nécessaire tout d'abord d'évaluer l'écart type σ . L'I.C. à 95% est ensuite calculé utilisant la formule $1.96 \sigma \div n^{0.5}$. Le résultat est additionné ou soustrait à la moyenne de l'échantillon pour obtenir l'intervalle \bar{x} dans lequel se situe 95% des résultats appartenant au même échantillon. Ainsi, pour que deux données (provenant de deux conditions de culture différentes, par exemple) soient considérées comme étant différentes de façon significative et ce avec 95% de certitude, leur intervalle de confiance à 95% doivent ne pas se chevaucher. S'ils se chevauchent, les deux données sont alors considérées comme pouvant faire partie du même échantillon et on ne peut alors conclure que les deux données sont significativement différentes à 95%.

En calculant l'intervalle de confiance à 95% des données obtenues avec les 9 méthodes d'extraction différentes, on s'aperçoit qu'il n'y a aucune différence significative à 95% entre le nombre de cellules obtenues avec la condition 2 et la condition 3 (trypsine seule). Également, les conditions 6 à 9 (trypsine avec EDTA) ont permis l'extraction du même nombre de cellules à 95% de certitude. Il n'y a donc aucune différence significative entre les concentrations de 0.5% et 1% lorsque la trypsine est utilisée seule ni entre les variations de concentrations lorsque la trypsine et l'EDTA sont utilisés ensemble. Par contre, il y a une différence significative de la viabilité des cellules isolées entre les conditions 6, 7 (trypsine à 0.5%) et 8, 9 (trypsine à 1%), ce qui montre que l'utilisation de trypsine à 1% et non à 0.5% diminue légèrement la viabilité des cellules extraites avec succès.

Il semble donc que l'utilisation de l'EDTA pour détacher les CECP de la membrane de Descemet en conjonction avec de la trypsine pour détacher les cellules entre elles donne les meilleurs résultats. En effet, lorsque l'EDTA était utilisé seul, les cellules obtenues étaient agrégées entre elles. Entre les conditions utilisant les deux produits, la seule affectant la viabilité était l'utilisation d'une concentration plus élevée de trypsine, comme observé dans les conditions 8 et 9. Pourtant, cette différence dans la viabilité n'a été observée que lorsque la trypsine à 1% était utilisée avec de l'EDTA, suggérant que la trypsine à 1% diminue la viabilité des cellules extraites, mais ceci est seulement observable lorsque les cellules sont détachées avec succès de leur membrane avec de l'EDTA. En effet, il n'y avait pas de différence notable entre la trypsine à 0.5% et à 1% lorsqu'elle était utilisée seule (conditions 2 et 3). Il est possible que si une plus grande quantité de milieu avait été envoyée avec la seringue sur les cornées incubées avec la trypsine seule à 1%, une différence significative de viabilité soit observable, puisque plus de cellules seraient alors physiquement détachées. Donc, le fait que la différence en viabilité soit significative entre les conditions 8 et 9 et non entre les conditions 2 et 3 pourrait être dû au fait que moins de cellules aient été récupérées dans les conditions 2 et 3 par rapport aux conditions 8 et 9.

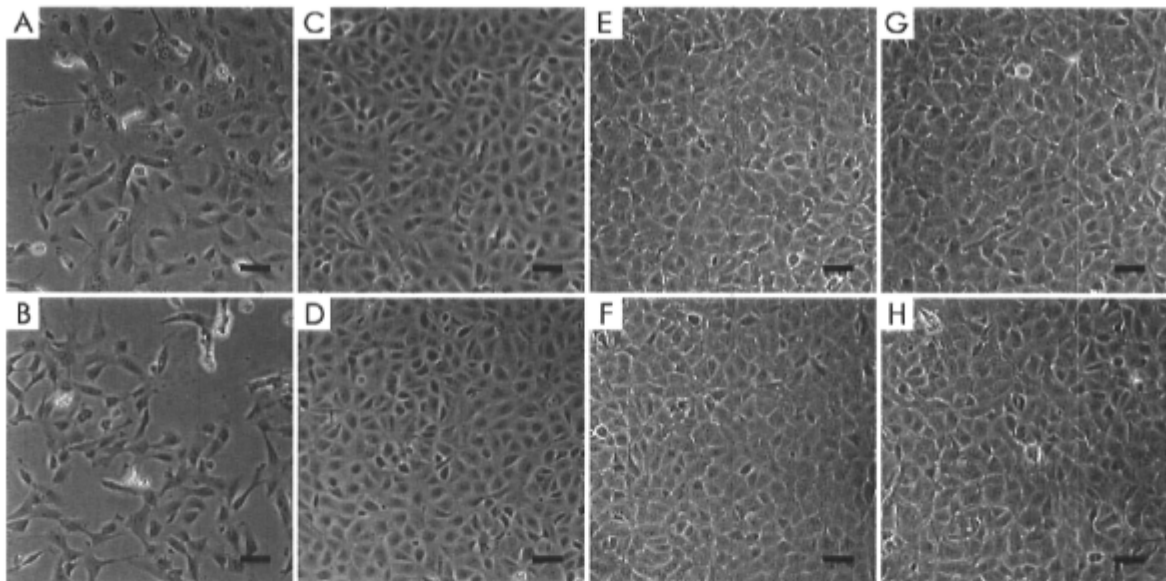


Figure 3-2 Morphologie cellulaire de cultures de cellules extraites avec des concentrations variées de trypsine et de EDTA.

Aspect morphologique de cultures de CECP lors de l'utilisation de solutions contenant (A) trypsine à 0.5%, (B) trypsine à 1%, (C) EDTA à 0.2%, (D) EDTA à 0.5%, (E) trypsine à 0.5% avec EDTA à 0.2%, (F) trypsine à 0.5% avec EDTA à 0.5%, (G) trypsine à 1% avec EDTA à 0.2% et (H) trypsine à 1% avec EDTA à 0.5% (Barre = 50 μm).

Les cellules extraites lors de l'utilisation des conditions 6 à 9, contenant de la trypsine avec de l'EDTA, avaient une morphologie similaire qui ne changeait pas avec la concentration de trypsine ou de EDTA (Figure 3-2, photos E à H). Les cellules extraites avec EDTA seulement avait une morphologie semblable à ces dernières (Figure 3-2, photos C et D). Enfin, la morphologie des cellules extraites avec de la trypsine seulement était défavorable et ne ressemblait pas autant à la morphologie des CECP *in situ*. L'isolement des cellules avec la trypsine seule ou l'EDTA seul ne donnait pas assez de cellules pour pouvoir les ensemercer à 12 000 cellules cm^{-2} . Également, les cultures issues de cellules isolées avec la trypsine seule avaient un taux de croissance plus bas que les autres cultures, si bien qu'elles ne se sont pas rendu à confluence, suggérant un plus petit nombre de cellules proliférant activement lorsqu'elles ont été isolées avec la trypsine seule. Il se pourrait donc que la morphologie défavorable de ces cellules soit due au bas pourcentage de confluence observé dans ces cultures. Donc, les conditions qui donnaient la plus grande

quantité de cellules ayant une viabilité élevée et une morphologie typique des CECP *in vivo* étaient les conditions 6 et 7 ou les conditions contenant 0.5% de trypsine et 0.2% ou 0.5% de EDTA. Puisque les cellules extraites par l'EDTA seulement (conditions 4 et 5) étaient agrégées entre elles, il était plus difficile de mesurer leur nombre exact lors de l'ensemencement. L'utilisation de la trypsine avec l'EDTA permet donc d'avoir un résultat plus sûr lors du compte cellulaire et ainsi une densité d'ensemencement égale d'une culture à une autre. Enfin, étant donné la similarité entre les conditions 6 et 7, le compte cellulaire plus sûr lors de l'utilisation de la trypsine avec l'EDTA ainsi que pour utiliser le minimum d'enzyme nécessaire, la condition qui a été retenue pour les expériences subséquentes avec les CECP est la condition 6, avec 0.5% de trypsine et 0.2% de EDTA.

3.2 Pourcentage de confluence optimal

Le nombre de cellules comptées lors de la trypsination d'une culture ainsi que leur grosseur ont été déterminés pour des cultures ayant été trypsinées à 90% de confluence (condition "90%"), à 100% de confluence (condition "100%") ou 1 jour suivant la confluence (condition "100% + 1"). Les données obtenues sont présentées dans les tableaux 3-2 et 3-3 et peuvent être visualisées sur la figure 3-3. La grosseur des cellules augmentait à chaque passage de 5% à 14%, dépendant de la condition (moyenne = 9.96%). L'augmentation était plus élevée dans les conditions où la confluence avait été atteinte (conditions 100% et 100% + 1). Inversement, le nombre de cellules recueillies à la trypsination diminuait à chaque passage et cette diminution était plus rapide dans les conditions où les cultures avaient atteint la confluence (conditions 100% et 100% + 1).

Tableau 3-2 Nombre de cellules de cultures trypsinées à différentes densités

Passage	Nombre de cellules (\pm I.C. à 95%)					
	90%		100%		100% + 1	
1	8 786 148	(\pm 173 509)	9 418 183	(\pm 139 273)	9 646 333	(\pm 158 276)
2	6 487 217	(\pm 152 782)	5 426 500	(\pm 187 045)	5 169 565	(\pm 120 437)
3	4 734 522	(\pm 89 370)	3 715 548	(\pm 125 356)	3 149 585	(\pm 119 363)
4	3 383 437	(\pm 80 245)	2 319 783	(\pm 84 063)	1 990 921	(\pm 159 728)
5	2 335 214	(\pm 122 311)	1 511 503	(\pm 161 122)	1 187 743	(\pm 105 635)

Tableau 3-3 Grosseur des cellules en fonction de la densité cellulaire des cultures

Passage	Grosseur cellulaire en μm (\pm I.C. à 95%)					
	90%		100%		100% + 1	
1	11.5	(\pm 0.08)	11.4	(\pm 0.12)	11.4	(\pm 0.08)
2	12.2	(\pm 0.12)	12.6	(\pm 0.05)	12.7	(\pm 0.09)
3	12.9	(\pm 0.05)	13.4	(\pm 0.12)	13.6	(\pm 0.08)
4	13.9	(\pm 0.13)	15.0	(\pm 0.06)	15.3	(\pm 0.05)
5	15.7	(\pm 0.07)	17.0	(\pm 0.05)	17.4	(\pm 0.08)

On aperçoit que les valeurs de la grosseur cellulaire sont significativement différentes, avec $\alpha = 0.05$, entre les cultures trypsinées systématiquement à 90% et à 100% de confluence, sauf au premier passage. Au cinquième passage, la différence atteint plus de 1 μm . Cependant, il n'y avait aucune différence significative entre la grosseur des cellules de cultures trypsinées à confluence et celles trypsinées un jour suivant la confluence, sauf aux quatrième et cinquième passages où la différence atteignait au plus un demi micron. À chaque passage et ce peu importe la condition des cultures, le nombre de grosses cellules augmentait, ce qui est un indice de l'approche d'une culture vers la sénescence. Également, il a déjà été démontré que le contact des cellules entre elles a un rôle à jouer dans l'inhibition de la prolifération des cellules endothéliales (Joyce 2002). Il est donc possible que les cultures qui atteignent la confluence avant d'être trypsinées aient moins de cellules en prolifération active, ce qui expliquerait les nombres inférieurs de cellules obtenues à chaque passage dans les cultures trypsinées à confluence et un jour suivant la confluence. Les cultures trypsinées à 90% de confluence avaient l'aspect morphologique le plus semblable à celui retrouvé *in situ* (Figure 3-4, photo A). Par contre, les cultures qui avaient

été trypsinées à confluence ou un jour suivant la confluence présentait plus de cellules plus grosses que la normale (polymégathisme) qui avaient perdu leur forme typique hexagonale et possédaient des prolongements cellulaires longs et fins (Figure 3-4, photos B et C), ce qui peut parfois indiquer qu'une culture de cellules endothéliales cornéennes est plus près de la sénescence. Ces prolongements étaient présents dans les cultures trypsinées un jour suivant la confluence (Figure 3-4, photo C) et le polymégathisme y était aussi plus facile à remarquer.

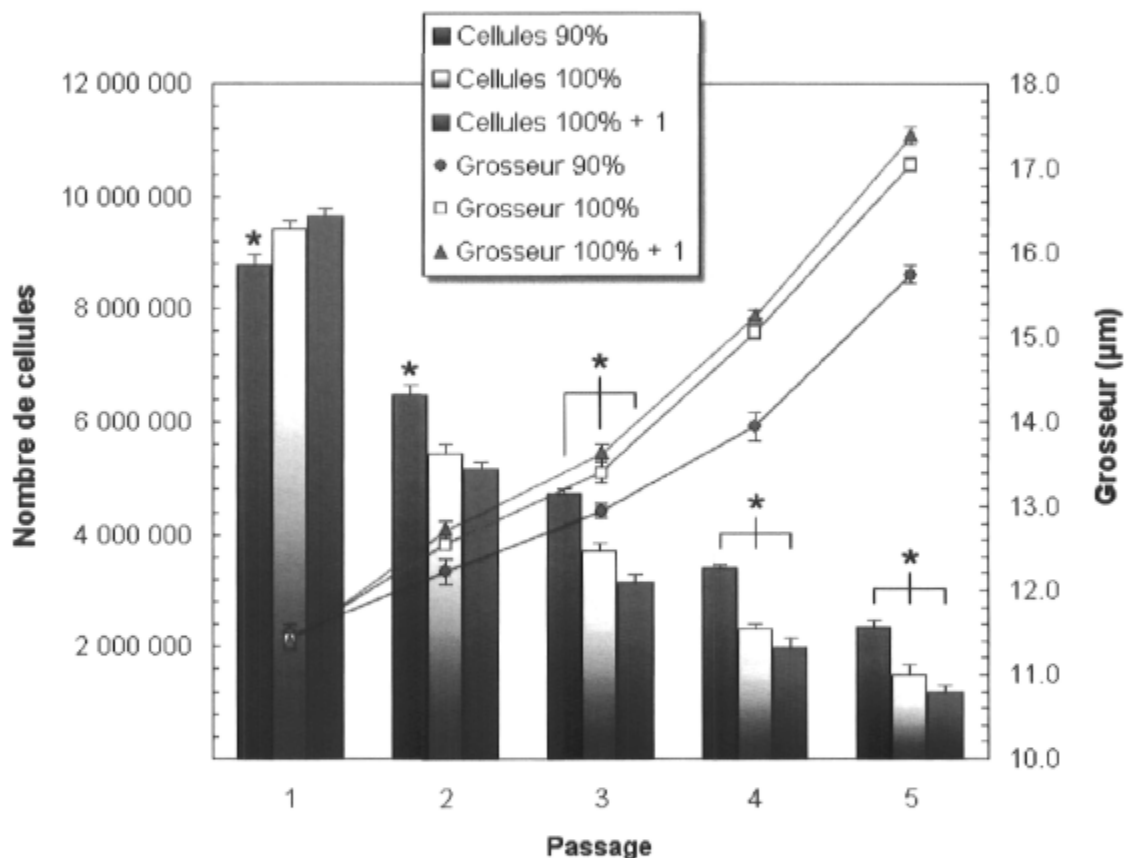


Figure 3-3 Nombre et grosseur de cellules en fonction de la confluence

Les cellules ont été trypsinées lorsqu'elles ont atteint différents niveaux de confluence, soit à 90% de confluence (condition 90%), à 100% de confluence (condition 100%) ou 1 jour suivant la confluence (condition 100% + 1). La grosseur cellulaire augmentait à chaque passage et elle augmentait plus rapidement dans les conditions où les cellules avaient atteint la confluence. Aussi, le nombre de cellules diminuait à chaque passage et il diminuait plus rapidement dans les conditions où les cellules étaient trypsinées lorsqu'elles avaient atteint la confluence. Les différences significatives sont marquées d'un astérisque ($n = 3$).

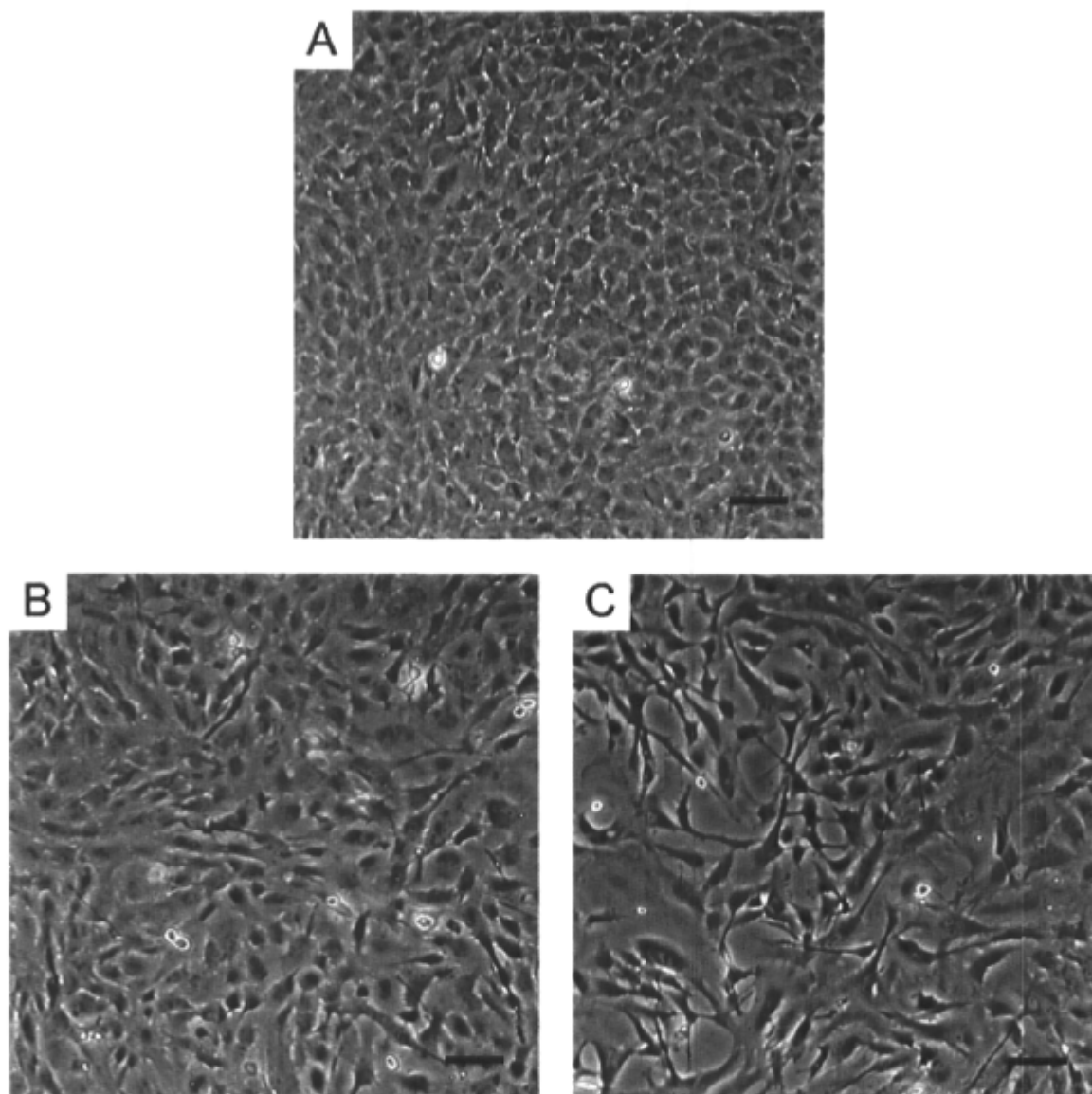


Figure 3-4 Morphologie de cellules issues de cultures trypsinées à différentes confluences.

Aspect morphologique de CECP en passage 5 provenant de cultures ayant été trypsinées à 90% de confluence (A), à 100% de confluence (B) ou un jour suivant la confluence (C) et ce, à chaque passage. Les cellules trypsinées à 90% de confluence (A) ont une morphologie typique hexagonale et il y a très peu de grosses cellules. Quelques unes des cellules trypsinées à 100% de confluence (B) ont une grosseur anormalement élevée. Les cultures trypsinées un jour post-confluence (C) ont plusieurs cellules très grosses et ne possèdent que peu la forme typique hexagonale et on voit apparaître des prolongements cellulaires fins typiques de cellules sénescents (Barre = 50 μm).

3.3 Choix de la surface de culture

Les cellules cultivées dans des flacons dont la surface de culture avait été recouverte d'une fine couche de FNC Coating Mix (un mélange de fibronectine, de collagène et d'albumine) ont réagi différemment de celles cultivées sur du plastique. Les résultats sont étayés dans les tableaux 3-4 (nombre de cellules) et 3-5 (grosseur des cellules) et résumés dans la figure 3-5. Peu importe que la surface de culture soit du plastique ou du plastique recouvert d'une fine couche de FNC, on retrouvait le même nombre de cellules sur 5 passages (tableau 3-4) et ces cellules avaient la même grosseur (tableau 3-5). Également, la morphologie des cellules était similaire entre les deux conditions. Une analyse statistique de l'intervalle de confiance montre qu'il n'y a aucune différence significative ($\alpha = 0.05$) sur 5 passages entre la culture des cellules sur du plastique ou sur du plastique recouvert de FNC, en ce qui a trait au nombre de cellules et à leur grosseur (figure 3-5).

Tableau 3-4 Nombre de cellules cultivées sur plastique ou avec FNC

	Nombre de cellules $\times 10^6$ (\pm IC à 95%)				
	Passage				
	1	2	3	4	5
plastique	8.076 \pm 0.175	6.941 \pm 0.151	5.295 \pm 0.155	3.428 \pm 0.132	2.190 \pm 0.233
FNC	8.218 \pm 0.149	6.702 \pm 0.091	5.460 \pm 0.093	3.473 \pm 0.152	2.220 \pm 0.156

Tableau 3-5 Grosseur de cellules cultivées sur plastique ou avec FNC

	Grosseur cellulaire en μm (\pm IC à 95%)				
	Passage				
	1	2	3	4	5
plastique	11.9 \pm 0.2	12.7 \pm 0.2	13.4 \pm 0.2	14.4 \pm 0.2	15.8 \pm 0.2
FNC	12.0 \pm 0.2	12.7 \pm 0.3	13.5 \pm 0.3	14.3 \pm 0.3	15.7 \pm 0.4

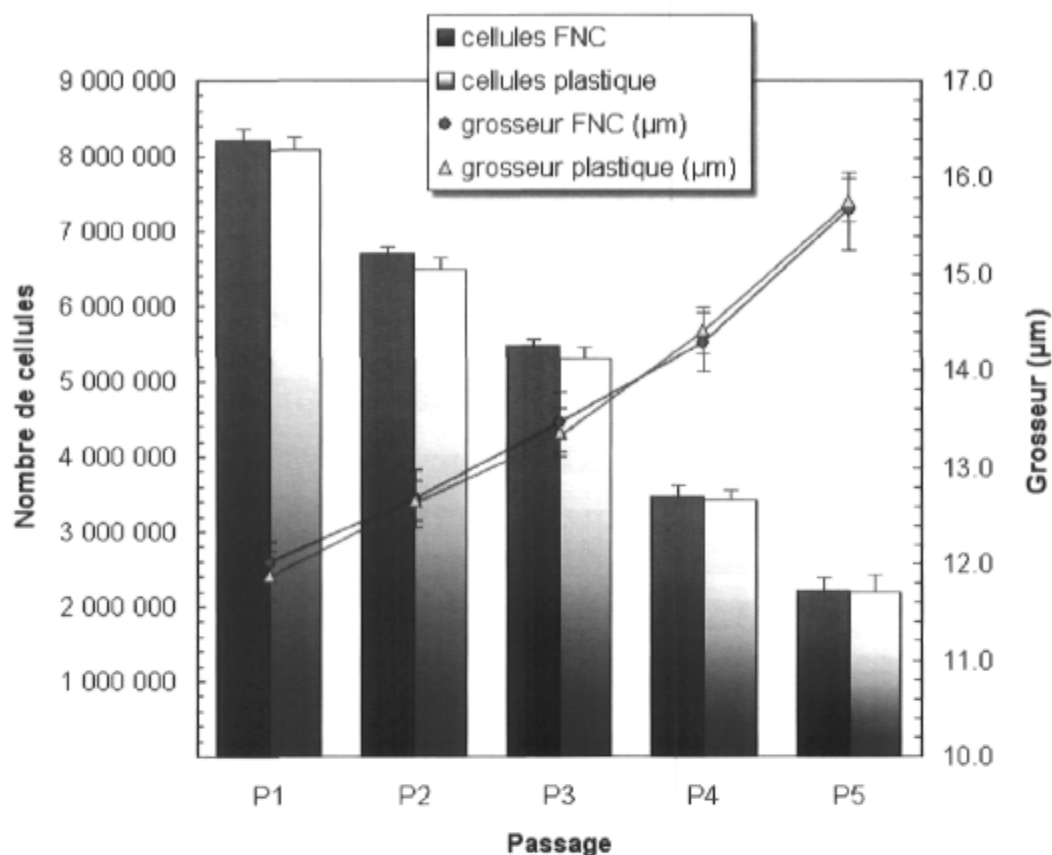


Figure 3-5 Nombre et grosueur de cellules cultivées avec ou sans FNC

Les cellules cultivées sur du plastique (rouge) ou sur du plastique recouvert d'une fine couche de FNC (bleu) se comportaient de la même façon. Sur 5 passages, il y avait le même nombre de cellules et ces cellules avaient la même grosueur ($\alpha = 0.05$, $n = 3$).

Par contre, la vitesse à laquelle les cultures atteignaient la confluence était légèrement plus élevée dans le cas des cellules cultivées sur du plastique recouvert de FNC (tableau 3-6). Cette différence était significative à 95%. À chacun des passages 1 à 5, les cellules cultivées en présence de FNC se divisaient plus rapidement ($\alpha = 0.05$). Aussi, il a été observé que lors des passages, les cellules mises en flacon avec une couche de FNC s'attachaient plus rapidement à la surface de culture. La différence était généralement de quelques heures. La vitesse accrue d'attachement des cellules à leur surface de culture, couplé à la vitesse supérieure de division cellulaire favorisée par la couche de FNC, laisse

croire que le FNC joue un rôle dans l'attachement des cellules à la surface de culture, ce qui diminue le temps requis pour atteindre la confluence.

Tableau 3-6 Vitesse de croissance de cellules cultivées avec ou sans FNC

	Temps écoulé entre deux passages (jours \pm I.C. à 95%, n = 3)				
	Passage				
	0 à 1	1 à 2	2 à 3	3 à 4	4 à 5
plastique	4.8 \pm 0.3	5.5 \pm 0.4	6.0 \pm 0.5	6.5 \pm 0.4	7.2 \pm 0.6
FNC	3.2 \pm 0.3	4.2 \pm 0.3	4.5 \pm 0.4	5.0 \pm 0.5	5.8 \pm 0.6

3.4 Densité d'ensemencement optimale et co-culture

La culture des CECP à différentes densités d'ensemencement a donné des résultats différents quant à la grosseur des cellules et à leur morphologie. Les cellules conservant la morphologie ressemblant le plus à la morphologie typique des cellules *in situ* pendant le plus de temps étaient les cellules cultivées aux densités initiales les plus élevées. Ces densités plus élevées aidaient aussi les cellules à demeurer plus petites. Également, l'ajout de cellules murines irradiées 3T3 en tant que couche nourricière pour les CECP affectait leur morphologie. En effet, elles amélioraient la morphologie des cultures ayant des densités d'ensemencement plus faibles et rendaient les cellules généralement plus petites. Aussi, la co-culture avec les cellules 3T3 rendait plus uniformes les morphologies observées dans ces cultures. En effet, il n'y avait pas autant de différence remarquable au point de vue de la morphologie cellulaire entre les cellules en culture dans un même flacon.

La figure 3-6 révèle les différences morphologiques aux densités d'ensemencement utilisées et montre aussi les différences observées entre la simple culture des CECP et leur co-culture avec les cellules 3T3. À la densité très basse de 400 cellules cm^{-2} , il y a un manque d'uniformité morphologique dans la culture (Figure 3-6, photo A), tandis qu'à la même densité mais en co-culture, les cellules sont beaucoup plus petites et les cellules sont plus uniformes (Figure 3-6, photo E). Le fait d'ensemencer les CECP à 8 000 et 12 000

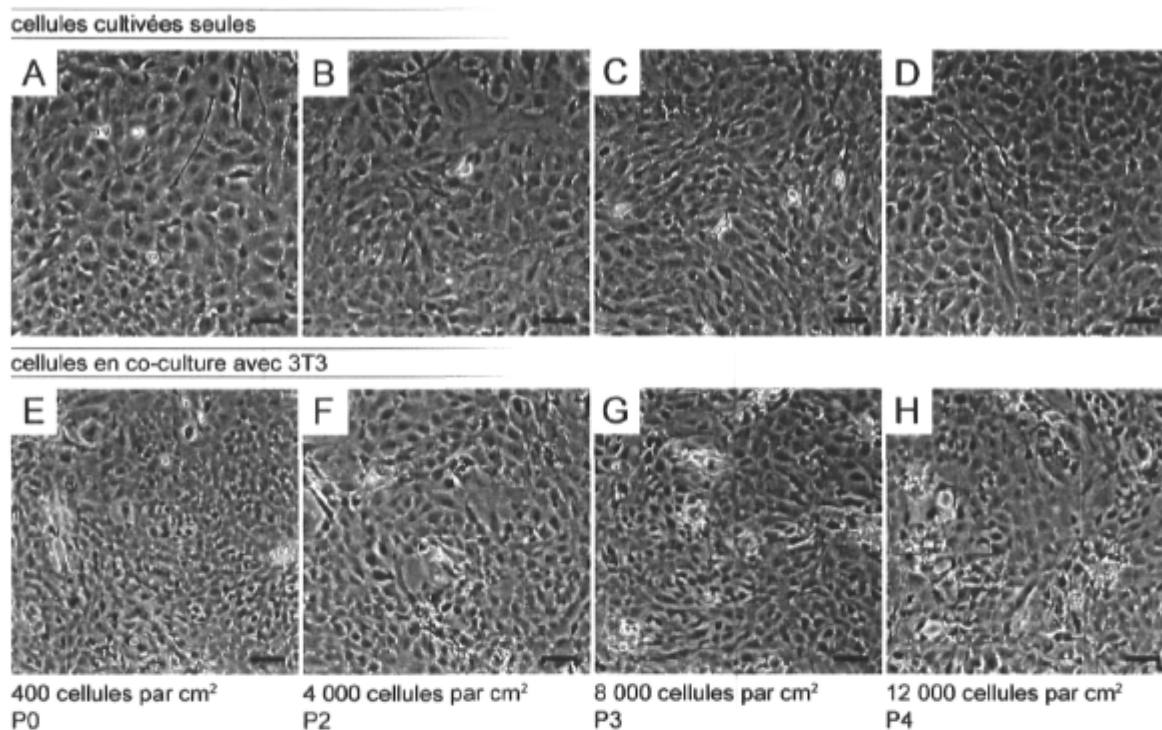


Figure 3-6 Morphologie de cellules cultivées seules ou en co-culture à différentes densités initiales

Photographies à contraste de phase représentatives de cultures dont la densité d'ensemencement variait entre (A, E) 400, (B, F) 4 000, (C, G) 8 000 ou (D, H) 12 000 cellules par cm². Les CECP sont soit (A, B, C, D) seules en culture ou (E, F, G, H) en co-culture avec des cellules murines irradiées 3T3 (Barre = 100 µm).

cellules cm⁻² rendait moins facilement observable l'effet bénéfique sur les CECP de la co-culture avec les cellules 3T3. En effet, les cellules de ces cultures semblent déjà avoir une morphologie et une grosseur plus uniformes sans avoir besoin de la présence des cellules 3T3 (Figure 3-6, photos C, D, G, H). En effet, même en étant seules en culture, les CECP à une densité d'ensemencement de 8 000 ou 12 000 cellules cm⁻² avaient une morphologie qui ressemblait plus à celle retrouvée *in situ* que les cultures à 400 ou même 4 000 cellules cm⁻². De plus, la culture ayant étéensemencée à 12 000 cellules cm⁻² conservait la morphologie typique le plus longtemps. La culture avec une densité initiale de 8 000 cellules cm⁻² retenait aussi la morphologie typique pendant plus de temps que les densités inférieures à 8 000 et ainsi de suite pour les cultures à 4 000 cellules cm⁻² (Figure 3-6, notez

les passages des cultures). Des densités d'ensemencement plus basses ont aussi été testées, de 3 600 à 6 800 cellules cm^{-2} (données non montrées). Les résultats ont permis de déterminer les densités à être essayées par la suite et de choisir la densité initiale de 400 cellules cm^{-2} comme densité inférieure.

La grosseur cellulaire augmentait à tous les passages, peu importe la densité d'ensemencement et la présence ou absence d'une couche nourricière. Par contre, cette augmentation était plus marquée dans les cultures dont les CECp étaient cultivées seules (Figure 3-7 A). Dans les cultures avec une couche nourricière (Figure 3-7 B), l'augmentation de la grosseur cellulaire était beaucoup moindre. L'effet sur la grosseur cellulaire était observé le plus dans les cultures à des densités d'ensemencement de 400 et de 4 000 cellules cm^{-2} , où la grosseur des cellules augmentait le plus rapidement. Au troisième passage, les cellules à 4 000 cellules cm^{-2} cultivées seules avaient déjà 2 μm de plus que celles en co-culture, tandis qu'il fallait attendre au cinquième passage pour voir la même différence entre les cultures de CECp seules et celles en co-culture dont la densité initiale d'ensemencement à chaque passage était de 8 000 ou 12 000 cellules cm^{-2} .

Les résultats du test d'incorporation de BrdU dans l'ADN des CECp cultivées seules ou en co-culture avec des 3T3 sont présentés dans la figure 3-8. Les cultures de CECp cultivées seules avaient un taux d'incorporation de BrdU d'au plus deux fois supérieur aux cellules en co-culture, dépendant de la densité initiale de la culture (Figure 3-8). Donc, les cellules cultivées seules avaient un plus grand nombre de cellules en prolifération active. Ceci pouvait aussi être observé en comptant le nombre de jours que prenaient les cultures pour se rendre à confluence. Les cultures avec couche nourricière prenaient approximativement deux fois plus de temps à se rendre à confluence (données non présentées). Les cultures à une densité d'ensemencement de 400 cellules cm^{-2} avaient pris 25 jours avant d'atteindre la confluence au premier passage, soit 79% plus de temps que les cultures à la même densité d'ensemencement sans couche de cellules nourricières. Ce n'était donc pas une densité optimale et la culture a été détruite à la suite du premier

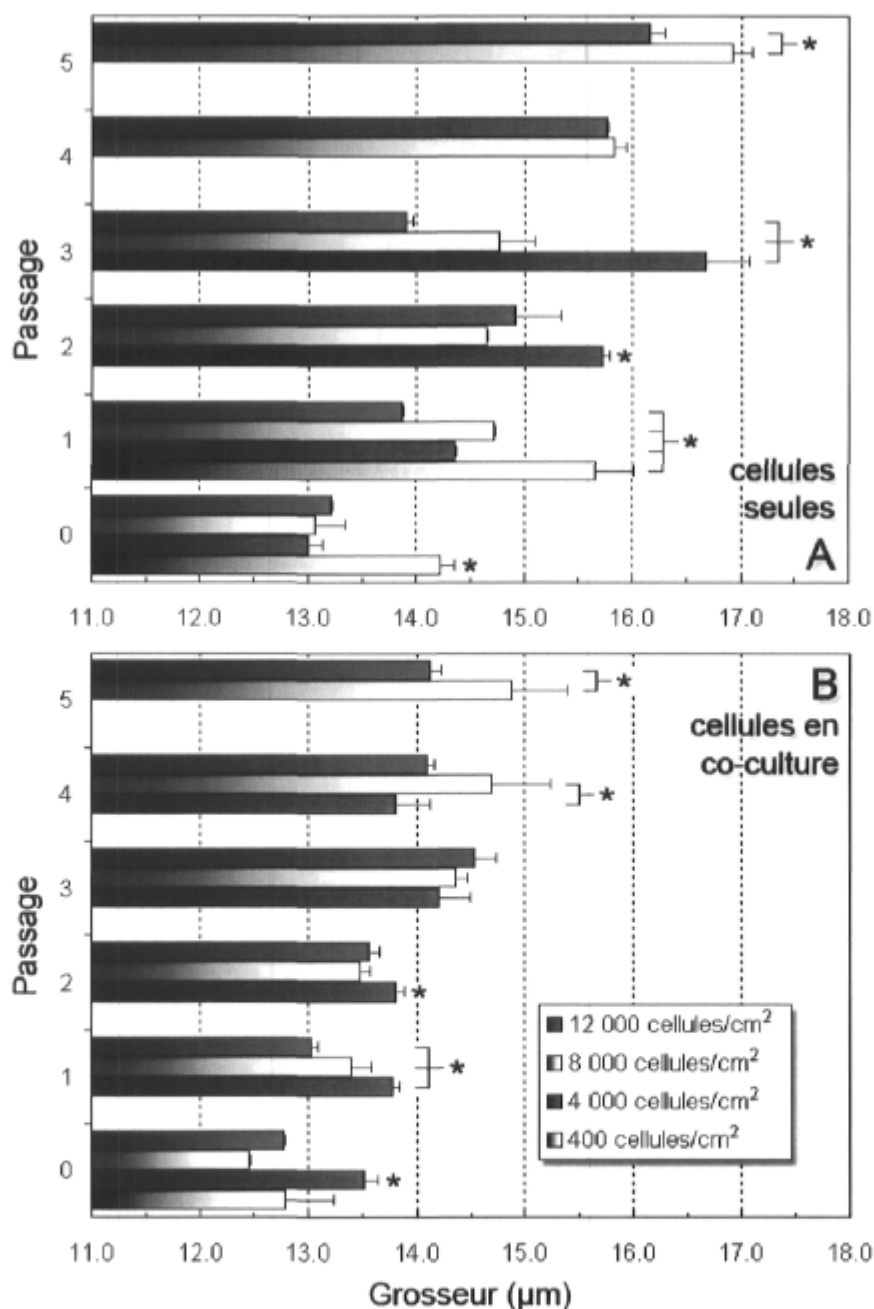


Figure 3-7 Grosueur de cellules cultivées seules ou en co-culture

Grosueur (\pm I.C. à 95%) mesurée de CECP à différentes densités d'ensemencement, soit **(A)** seules en culture ou **(B)** en co-culture avec des cellules murines irradiées 3T3. La grosueur cellulaire augmente à chaque passage lorsque les cellules sont seules en culture **(A)**, tandis qu'elle augmente plus lentement lorsque les CECP sont en co-culture avec des cellules 3T3 **(B)**. Les différences significatives sont marquées d'un astérisque ($n = 2$).

passage. Les cultures à une densité de 4 000 cellules cm^{-2} prenaient également beaucoup de temps avant d'atteindre la confluence en présence de la couche nourricière. En effet, ces cultures prenaient 56% plus de temps à atteindre la confluence que les cultures à 4 000 cellules cm^{-2} cultivées seules. Voilà pourquoi seules les cultures à 8 000 et 12 000 cellules cm^{-2} ont été retenues pour les 5 passages ainsi que pour le test au BrdU. Aussi, les cultures à une densité d'ensemencement de 12 000 cellules cm^{-2} avaient environ deux fois plus de cellules en prolifération que celles à 8 000 cellules cm^{-2} , sauf au cinquième passage avec les cellules en co-culture à 12 000 cellules cm^{-2} (Figure 3-8). Enfin, pour une même condition, l'incorporation du BrdU et donc la prolifération des cellules, diminuaient. Ceci a été observé pour toutes les conditions à chaque passage.

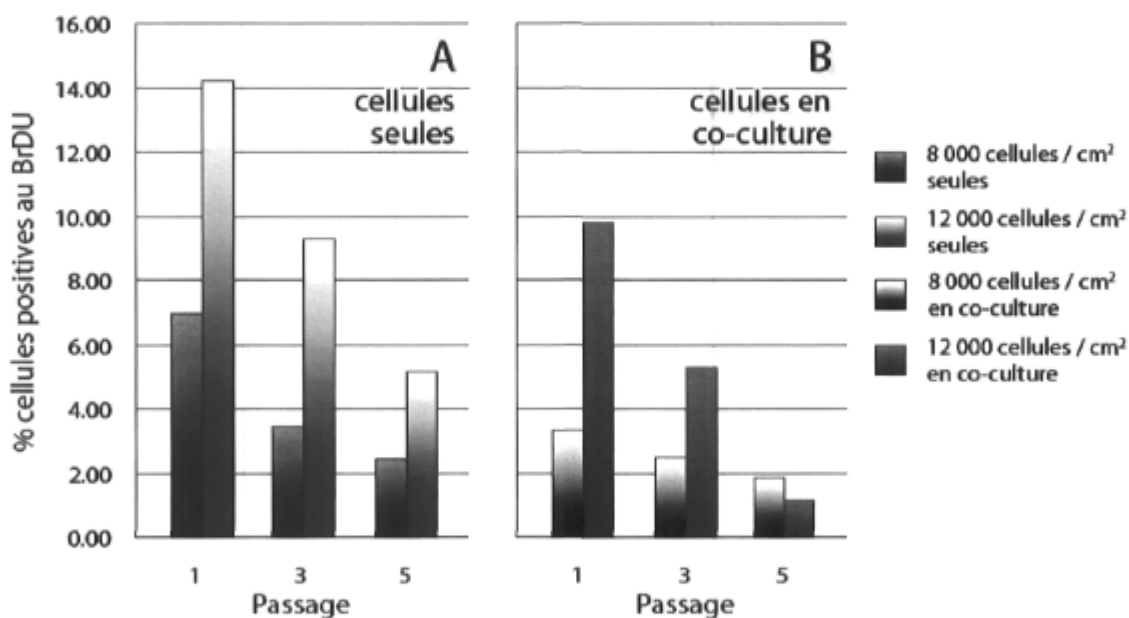


Figure 3-8 Pourcentage de cellules positives au BrdU

Pourcentage de CECP ayant incorporé le BrdU dans leur ADN ayant été soit (A) seules en culture ou (B) en co-culture avec des cellules murines irradiées 3T3.

Finalement, les cultures à une densité d'ensemencement de 8 000 et 12 000 cellules cm^{-2} avaient les cellules dont la grosseur (Figure 3-7) et la morphologie (Figure 3-6) ressemblaient le plus à ce qui est observé *in situ*. Les cellules cultivées seules avec une

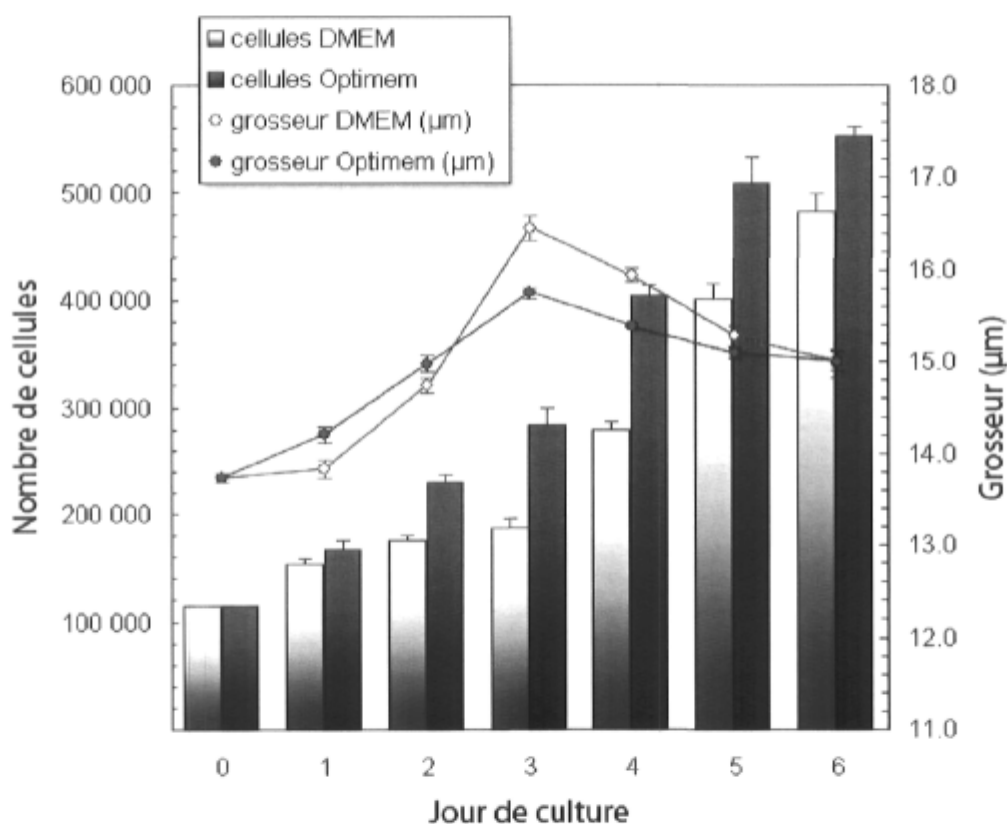
densité d'ensemencement sous 8 000 cellules cm^{-2} n'étaient pas en mesure de conserver la morphologie typique. Les cellules en co-culture étaient plus petites à des densités d'ensemencement moindres (Figure 3-7) mais moins d'entre elles proliféraient (Figure 3-8) et leur culture prenait plus de temps à atteindre la confluence. Aussi, la co-culture aidait les cellules aux plus basses densités d'ensemencement de garder une morphologie qui ressemblait plus à celle retrouvée *in situ*. Enfin, les cultures à une densité d'ensemencement de 12 000 cellules cm^{-2} avaient la meilleure incorporation de BrdU et donc le plus grand nombre de cellules en prolifération (Figure 3-8). L'augmentation des contacts cellulaires entre les cellules de la couche nourricière et les CECP, pouvant inhiber la prolifération des cellules, pourrait aider à expliquer le fait que les CECP aient pris autant de temps à atteindre la confluence (Joyce 2002). En effet, il y avait près de deux fois moins de cellules qui avaient incorporé le BrdU lorsqu'elles étaient en co-culture, comparativement à lorsqu'elles étaient seules en culture (Figure 3-8). Enfin, il se pourrait que la couche nourricière sécrète une molécule, comme le TGF- β , signalant aux cellules endothéliales de ralentir leur prolifération. Compte tenu du plus bas taux de prolifération des cellules en co-culture, cette méthode pourrait donc être utilisée dans les cas où le nombre de cellules disponible est très petit et qu'on ne peut pas utiliser la densité d'ensemencement optimale de 12 000 cellules cm^{-2} .

3.5 Choix du milieu de base

Pour cette expérience, des CECP au premier passage ont été cultivées soit dans du milieu DMEM ou dans du milieu Opti-MEM I pour voir l'effet de ceux-ci sur le nombre de cellules obtenues, ainsi que sur la grosseur et la morphologie cellulaire. Les résultats sont résumés dans le tableau 3-7 et illustrés dans les figures 3-9 et 3-10. L'utilisation du milieu de base Opti-MEM I donnait un nombre de cellules significativement supérieur au milieu de base DMEM à tous les passages (Tableau 3-7 et Figure 3-9). Le nombre de cellules dans le DMEM augmentait plus lentement pour les trois premiers jours de culture mais à partir du jour 3, leur nombre augmentait à la même vitesse que les cellules cultivées dans l'Opti-MEM I. L'utilisation du DMEM induit donc un délai de 3 jours dans la croissance des CECP, tandis que la croissance des CECP dans l'Opti-MEM I est plus constante.

Tableau 3-7 Effet des 2 milieux de base différents sur le nombre et la grosseur des CECP

Jour	Cellules (\pm I.C. à 95%)		Grosseur en μm (\pm I.C. à 95%)	
	DMEM	Opti-MEM I	DMEM	Opti-MEM I
0	115 200 (\pm 0)	115 200 (\pm 0)	13.7 (\pm 0.0)	13.7 (\pm 0.0)
1	153 079 (\pm 5 957)	167 974 (\pm 8 462)	13.8 (\pm 0.1)	14.2 (\pm 0.1)
2	175 606 (\pm 4 961)	229 710 (\pm 6 489)	14.7 (\pm 0.1)	15.0 (\pm 0.1)
3	187 707 (\pm 7 929)	283 915 (\pm 15 049)	16.4 (\pm 0.1)	15.7 (\pm 0.1)
4	279 122 (\pm 6 790)	403 742 (\pm 11 120)	15.9 (\pm 0.1)	15.4 (\pm 0.0)
5	400 979 (\pm 14 542)	509 206 (\pm 24 219)	15.3 (\pm 0.1)	15.1 (\pm 0.1)
6	481 618 (\pm 17 073)	553 683 (\pm 7 588)	15.0 (\pm 0.2)	15.0 (\pm 0.1)

**Figure 3-9** Effet des 2 milieux de base différents sur le nombre et la grosseur des CECP

Nombre et grosseur (\pm I.C. à 95%) des CECP cultivées soient dans le milieu de base DMEM (en rouge) ou dans le milieu de base Opti-MEM I (en bleu). Le nombre de cellules est significativement plus élevé dans l'Opti-MEM I à tous les passages, tandis que le DMEM présente un délai dans les 3 premiers jours de culture. Enfin, la grosseur cellulaire était la même dans les deux milieux de base au sixième jour, lorsque les cultures avaient atteint la confluence ($n = 3$).

Aussi, la fin du délai de 3 jours du DMEM coïncidait avec la diminution de la grosseur cellulaire des jours 3 à 6 de la culture. En effet, pendant les deux premiers jours de culture, les cellules cultivées dans l'Opti-MEM I étaient significativement plus grosses ($\alpha = 0.05$) que celles dans le DMEM et ce de 0.3 à 0.4 μm . De façon intéressante, au troisième jour, les cellules dans l'Opti-MEM I commençaient à être significativement plus petites que celles dans le DMEM. La différence de grosseur cellulaire entre les deux milieux était modifiée pour passer de 0.7 μm au jour 3, à 0.5 μm au jour 4, à 0.2 μm au jour 5. Le dernier jour de culture, lorsque les cultures avaient atteint la confluence, la grosseur des cellules cultivées dans l'Opti-MEM I étaient la même que celles cultivées dans le DMEM. Par contre, le délai causé par le DMEM donnait comme résultat final un nombre supérieur de cellules dans le milieu de culture Opti-MEM I, puisque celui-ci offrait aux PCEC une croissance plus constante sur les 6 jours de culture (Tableau 3-7 et Figure 3-9).

Pour ce qui est de la morphologie des cellules, elle était semblable dans les deux milieux de base. Aucune différence importante ne pouvait être observée entre des cellules cultivées dans du milieu DMEM (Figure 3-10, photo C) ou des cellules cultivées dans du milieu Opti-MEM I (Figure 3-10, photo D) lorsque les cultures avaient atteint la confluence. Avant d'avoir atteint la confluence, les cellules cultivées dans les deux milieux de base ne présentaient non plus aucune différence (Figure 3-10, photos A et B). Dans les deux cas, les cellules avaient encore la morphologie typique d'une cellule endothéliale *in situ* et il n'y avait que très peu de cellules anormalement grandes. Aussi, le nombre de cellules flottantes, c'est-à-dire celles n'ayant pas eu l'occasion ou le temps de s'attacher à la surface de culture, était similaire dans les deux conditions. Il n'y a donc aucun facteur affectant la morphologie de façon différentielle entre les milieux DMEM et Opti-MEM I.

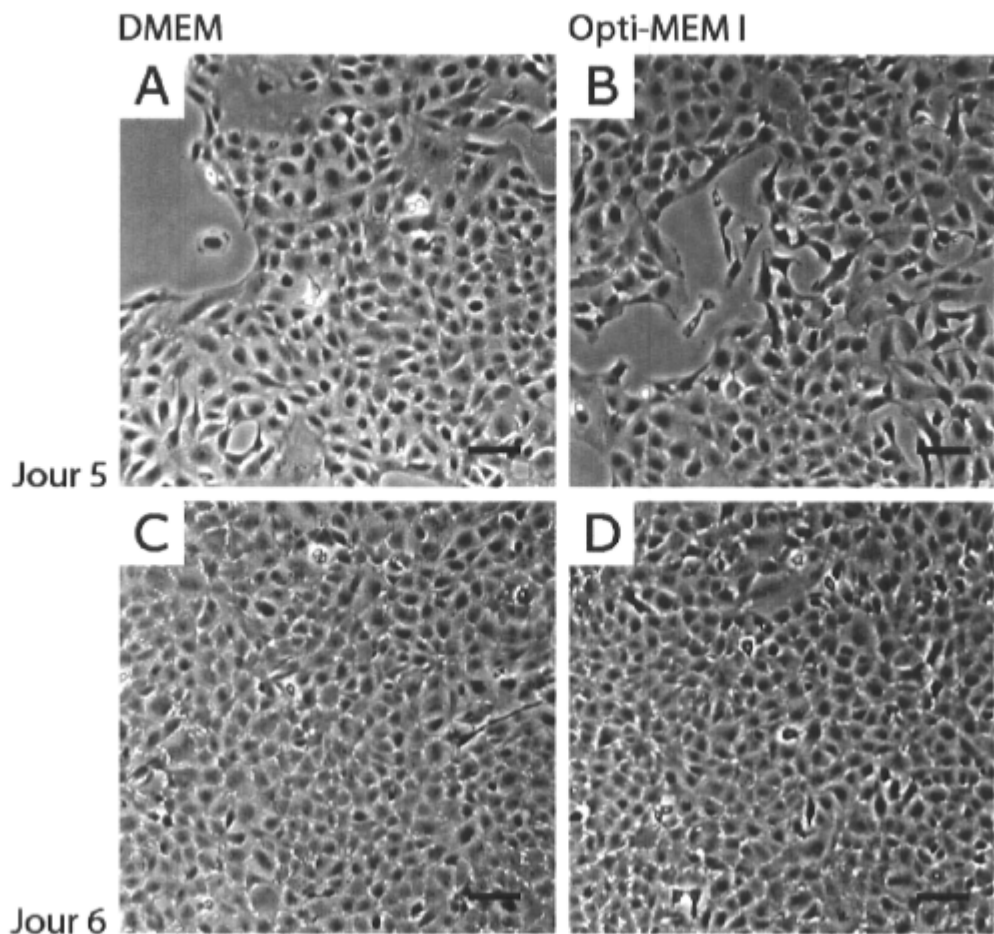


Figure 3-10 Morphologie de cellules cultivées dans du DMEM ou de l'Opti-MEM I

Aspect morphologique observé au microscope de CECP cultivées soit dans du milieu de base DMEM (A, C) ou dans du milieu Opti-MEM I (B, D) aux jours de culture 5 (A, B) et 6 (C, D). La morphologie est très similaire dans les deux milieux utilisés (Barre = 100 μ m).

3.6 Effets d'additifs sur les cultures de CECP

Les différents additifs (SVF, EGF, NGF, ECGS et bFGF) ont été ajoutés au milieu de base Opti-MEM I pour voir s'ils avaient un effet sur la croissance des CECP. Chaque additif a été testé un à la fois en absence de sérum et ce à différentes concentrations afin de distinguer la présence d'un effet dû uniquement à l'additif en question et non au sérum. Dû à la très faible croissance des cellules dans le milieu sans sérum, les résultats ont été

enregistrés de façon qualitative et non quantitative, c'est-à-dire en notant l'effet sur la culture et non en comptant les cellules issues de ces cultures. D'ailleurs, seules les cultures contenant du SVF, soit à 5%, 10% ou 20%, avaient une croissance cellulaire suffisamment élevée pour pouvoir trypsiner les cellules, les compter et en mesurer la grosseur (Tableau 3-8). Il y avait environ 53% plus de cellules dans les cultures contenant 10% de SVF comparé à celles avec 5% seulement, tandis que la différence entre 20% et 10% de SVF ne représentait qu'une augmentation dans le nombre de cellules d'environ 18%. Tandis que les différentes concentrations de SVF affectaient différenciellement le nombre de cellules dans les cultures, elles n'affectaient pas de façon significative la grosseur cellulaire (Tableau 3-8). Même si le nombre absolu de cellules était plus élevé avec 20% de SVF, le pourcentage de SVF retenu a été 10%, afin de réduire la dépendance des cellules sur le sérum.

Tableau 3-8 Effet du pourcentage de sérum sur les cellules endothéliales

% SVF	Cellules (\pm I.C. à 95%)	Grosseur en μm (\pm I.C. à 95%)
5	327 660 (\pm 20 133)	15.3 (\pm 0.5)
10	502 516 (\pm 39 604)	15.2 (\pm 0.1)
20	592 696 (\pm 25 409)	14.9 (\pm 0.4)

Les autres additifs (EGF, NGF, ECGS et bFGF) n'ont pas eu le même effet apparent sur les CECP. Après un délai initial de deux jours, au troisième jour de culture, des différences entre les différentes conditions commençaient à être observables. Les cultures contenant du EGF à 10 et 20 ng/ml et du ECGS à 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ avaient un nombre limité de cellules attachées dans le fond du flacon de culture. Ce nombre était cependant inférieur aux cultures contenant du sérum. Par contre, aucune cellule n'avait attaché dans les cultures contenant uniquement du milieu de base Opti-MEM I. Donc le EGF à partir de 10 ng/ml et le ECGS à 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ avaient un effet favorable sur les cellules les aidant à se fixer à la surface de culture. Par opposition à ces résultats, il n'y avait aucune différence observable entre les cultures avec le EGF à 1 ng/ml, le NGF à 1, 10 ou 20 ng/ml ou le bFGF à 1 ou 10 ng/ml et les cultures contrôles ne contenant que du milieu de base. Ces cultures ne

contenaient pas de cellules attachées à la surface de culture et ne présentaient donc aucune croissance. Ces observations ont été faites au cinquième jour de culture, en même temps que la trypsination des cultures contenant du SVF.

Donc, le sérum de veau fœtal est encore nécessaire à l'attachement et/ou la culture des CECP. Les additifs ayant eu un effet sur l'attachement des cellules, soient le EGF à 10 ou 20 ng/ml et le ECGS à 25 µg/ml, pourraient donc avoir un effet bénéfique sur les cellules si ils étaient ajoutés à des cultures contenant du sérum. Pour ce qui est du NGF, il a déjà été démontré que son utilisation a un effet bénéfique sur la morphologie de cellules endothéliales humaines *in vitro* (Zhu 2004). Par contre, il n'a aucun effet sur l'attachement et/ou la croissance des CECP, mais pourrait tout de même être inclus dans le milieu de culture pour CECP, puisqu'il est possible qu'il ait le même effet sur la morphologie des cellules porcines que sur les cellules humaines. Le NGF est donc probablement utile vers la fin d'une culture, lorsque plus de cellules approchent la sénescence, plutôt qu'au début de cultures, lorsque les cellules tentent de s'attacher à la surface de culture. Les résultats de l'ajout des additifs au milieu de culture étaient difficiles à analyser en raison du faible taux d'attachement des cellules à leur surface de culture en absence de sérum. D'autres tests pourront donc être faits en utilisant des concentrations basses de SVF, soit à 5% et 10%, en même temps que le EGF, le ECGS et le NGF, pour pouvoir suivre la culture pendant assez de temps, jusqu'à ce qu'un effet provenant du NGF puisse ou non être observé.

CHAPITRE 4

Discussion et conclusion

L'optimisation de l'extraction et de la culture des cellules endothéliales cornéennes porcines ont été effectuées. Bien entendu, comme dans n'importe quelle situation d'optimisation, il y aura toujours place à amélioration. Avec les améliorations à la culture des CECP, il sera possible de cultiver des cellules qui ressemblent de très près aux cellules retrouvées *in vivo*. Les critères utilisés lors de la comparaison de méthodes variées et de différentes conditions de culture étaient le nombre de cellules obtenus, leur grosseur et leur morphologie. Les améliorations ont compris (a) la méthode utilisée pour isoler les cellules endothéliales de cornées fraîchement excisées, (b) le pourcentage de confluence avant trypsination, (c) la surface de culture des CECP, (d) la densité initiale des cellules, (e) l'effet sur les CECP de leur co-culture avec des cellules murines irradiées 3T3, (f) le milieu de culture de base, (g) le pourcentage de sérum dans le milieu de culture et (h) l'effet sur les CECP de différentes concentrations d'additifs variés.

La première amélioration à avoir été faite était de déterminer les concentrations des réactifs utilisés lors de l'extraction des CECP adultes. Ceci est dû au fait que les méthodes publiées étaient toutes utilisées sur des fœtus de porc ou encore sur des porcs de 6 mois d'âge (Pistsov 1988; Schneider 1997; Engelmann 1999), tandis que les porcs utilisés pour ce projet étaient des adultes de 2 à 3 ans d'âge. Il a donc été nécessaire de s'assurer que les concentrations qui avaient été optimisées au préalable par d'autres auteurs seraient les mêmes pour les porcs adultes. Suivant les essais de différentes concentrations autour de celles présentées dans la littérature, il a été montré que la méthode optimale pour les cellules fœtales l'était aussi pour les CECP adultes. La méthode est donc celle décrite par Engelmann (Engelmann 1999). Elle consiste à exciser la cornée et de la laver avec du DMEM contenant 10% de SVF. Ensuite, elle est incubée dans une solution composée de

0.5% trypsine et 0.2% EDTA. Cette solution aide les cellules endothéliales à se détacher de la membrane de Descemet, ce qui permet leur culture. Un léger jet de DMEM avec 10% de SVF est ensuite envoyé avec une seringue sur l'endothélium pour aider les cellules à se décoller le plus possible. Avec cette méthode, on réussit ainsi à obtenir pour chaque œil porcine environ 105 000 cellules endothéliales cornéennes ayant une viabilité d'environ 92%.

L'effet de la confluence avant la trypsination lors du passage d'une culture de CECPC a aussi été déterminé. Il a été trouvé qu'un niveau de confluence de 90% permettait aux cellules de garder leur grosseur et morphologie typiques de cellules endothéliales cornéennes retrouvées *in vivo*. Ceci est différent de la méthode utilisée dans la culture de cellules porcines qui consiste à passer les cultures lorsqu'elles viennent d'atteindre la confluence (Engelmann 1999; Schneider 1999). Le passage de cultures ayant atteint la confluence donnait comme résultat des cultures avec de plus grandes déviations morphologiques entre les cellules et la capacité prolifératives de ces cultures diminuait plus rapidement que dans les cultures ayant été passées à 90% de confluence. Également, le nombre de cellules obtenues lorsque la culture était trypsinée à confluence était, selon le passage, de 16% à 35% inférieur au nombre obtenu lorsque la culture était trypsinée à 90% de confluence. La confluence a donc un effet sur la capacité de prolifération des cellules endothéliales cornéennes porcines à proliférer subséquemment. Il semble donc que les cellules porcines réagissent similairement aux cellules humaines en ce qui a trait à l'inhibition de leur prolifération par contact cellule-cellule (Joyce 2002). Pour que les cellules gardent la morphologie typique des cellules *in vivo*, il est donc primordial qu'une culture soit trypsinée avant que celle-ci n'atteigne la confluence si on désire poursuivre la culture pour plusieurs passages.

La surface de culture optimale retenue suite aux expériences est le plastique simple. La seule différence significative ayant été trouvée entre la culture sur le plastique et la culture sur une fine couche de FNC est que les cellules cultivées avec le FNC atteignaient

la confluence plus rapidement. En revanche, le nombre de cellules obtenues par passage ainsi que leur grosseur et leur morphologie étaient les mêmes dans les deux conditions testées et ce sur 5 passages. Il serait intéressant de savoir ce qui augmente la vitesse de croissance des cellules lors de l'ajout de FNC, sans toutefois changer le nombre final de cellules obtenues lors de la trypsination. D'autres substances appliquées en couche sur la surface de culture pourraient également avoir un effet sur la prolifération ou la morphologie des cellules, tel que le collagène seul, par exemple. Aussi, d'autres surfaces de culture pourraient être essayées, telle que le flacon de culture CellBIND[®] (Corning Life Sciences).

Puisqu'elles sont affectées en culture par la présence et la proximité de cellules, les cellules endothéliales agissent différemment dépendant de leur densité à l'ensemencement et de la présence d'autres types cellulaires. Ces facteurs ont une influence sur la capacité à proliférer des CECP. Cela a été observé lors de l'optimisation de la densité d'ensemencement des CECP et de leur co-culture. Il a été trouvé que la densité optimale d'ensemencement était de 12 000 cellules cm^{-2} , environ trois fois moins élevé que ce qui est généralement utilisé dans la littérature (Schneider 1999; Reichl 2003). Bien que des densités supérieures puissent toujours être utilisées, cette densité relativement basse ressemble plus à la situation lorsque seulement un nombre restreint de cellules viables peuvent être récoltées d'une biopsie. Le pourcentage de cellules prolifératives dans les cultures avec une densité initiale de 12 000 cellules cm^{-2} était le double de celles avec une densité d'ensemencement de 8 000 cellules cm^{-2} . Également, la présence d'une couche de cellules nourricières, dans ce cas des cellules murines irradiées 3T3, augmentait le temps que des cellules à des densités d'ensemencement plus basses pouvaient être gardées avec succès en culture. Par contre, la co-culture augmentait aussi de façon significative le temps que prend une culture pour atteindre la confluence. De plus, elle diminue le pourcentage de cellules prolifératives dans une culture de 30% à 50%. Ceci est probablement dû à un certain niveau d'inhibition par contact cellule-cellule (Joyce 2002). Cependant, le fait que le type cellulaire de la couche nourricière ne soit pas endothélial suggère que l'inhibition partielle de prolifération ne soit pas nécessairement médié par un contact entre deux cellules endothéliales mais plutôt entre une cellule endothéliale et un autre type cellulaire.

Les cultures à une densité initiale de 12 000 cellules cm^{-2} étaient plus affectées en ce sens par la présence de cellules 3T3 que les cultures à 8 000 cellules cm^{-2} . Laissées seules, les cellules à très basses densités d'ensemencement (400 et 4 000 cellules cm^{-2}) ne peuvent être gardées longtemps en culture. Par contre, en pratique, lorsqu'il est impossible d'obtenir un nombre suffisant de cellules endothéliales et qu'une culture ne peut êtreensemencé à une densité initiale de 12 000 cellules cm^{-2} , l'utilisation de la co-culture demeure une possibilité.

Le milieu de base joue un rôle primordial dans l'optimisation de la culture des cellules endothéliales cornéennes porcines. Certains milieux ont déjà été testés (Schneider 1999), mais jamais le milieu Opti-MEM I, lequel est déjà utilisé pour la culture de cellules endothéliales cornéennes humaines (Zhu 2004). Ce milieu a donc été comparé au milieu de base DMEM pour la culture des CECP. Lorsque le milieu Opti-MEM I est utilisé pour cultiver des CECP, les cellules ont une croissance plus régulière et cette croissance est plus rapide, menant la culture à la confluence plus rapidement. Également, il a été trouvé que la grosseur des cellules cultivées dans du Opti-MEM I varie moins que dans du milieu DMEM. De plus, lorsque les cellules sont cultivées dans du DMEM, leur grosseur commence à diminuer le même jour qu'elles commencent à croître à un rythme similaire à celui des cellules cultivées dans du Opti-MEM I, suggérant un lien possible entre la grosseur cellulaire et le niveau ou vitesse de prolifération de la culture. Malgré ces différences de croissance, la morphologie des cellules est très similaire dans les deux milieux de base et la grosseur cellulaire après 6 jours de culture est la même dans les deux conditions. Les résultats obtenus montrent donc que le milieu Opti-MEM I convient mieux à la culture des CECP que le milieu DMEM, tout comme avec les cellules endothéliales cornéennes humaines (Zhu 2004).

Il est possible que la quantité de sérum requis pour la culture des cellules endothéliales puisse être diminuée en utilisant des additifs spécifiques à des concentrations déterminées de façon empirique. Certains additifs ont été testés (EGF, NGF, ECGS, bFGF)

et il a été déterminé que dans l'absence complète de sérum, seuls le EGF à 10 et 20 ng/ml et le ECGS à 25 µg/ml avaient un effet sur l'attachement des cellules à la surface de culture. Les concentrations de EGF auxquelles un effet a été aperçu étaient supérieures à celle utilisée avec les cellules humaines (Zhu 2004). De plus, la concentration du ECGS est bien supérieure à celle utilisée par certains chercheurs (Nayak 1984) et pourrait peut-être être diminuée davantage en gardant l'effet désiré. Cependant, il a été difficile d'évaluer l'effet des autres additifs (NGF et bFGF) ainsi que le EGF à 1 ng/ml, puisque sans sérum, aucune cellule ne collait sur leur surface de culture dans ces conditions. Il a aussi été trouvé que les cellules cultivées dans le milieu Opti-MEM I avec 10% de SVF avaient une plus belle morphologie que celles cultivées dans le milieu DMEM contenant 20% de SVF. L'utilisation du EGF et du ECGS aux concentrations mentionnées dans de l'Opti-MEM I avec moins de sérum qu'au début des expériences (20%) pourrait avoir un effet bénéfique sur la croissance des CECP et sur leur morphologie. Bien entendu, cette partie pourrait être poussée beaucoup plus loin, en déterminant les molécules dans le sérum responsables de l'effet sur la croissance des cellules pour pouvoir éviter l'utilisation de sérum et ainsi n'utiliser que les facteurs de croissance requis par les cellules endothéliales.

En conclusion, de nouvelles optimisations ont été amenées à l'extraction et à la culture des cellules endothéliales cornéennes de porc. C'est la première fois que de telles optimisations aient été faites utilisant des cellules porcines adultes et non fœtales. Cette étude des conditions d'extraction et de culture de CECP a servi à comparer les effets de plusieurs facteurs influençant la morphologie, la grosseur ainsi que la capacité à proliférer de ces cellules en culture et ce sur plusieurs passages. Ces facteurs ont inclus la méthode d'extraction des CECP, la présence de cellules nourricières dans la culture, le milieu de base utilisé, la concentration de sérum utilisée, les facteurs de croissance présents dans le milieu de croissance ainsi que la confluence à laquelle les cultures étaient trypsinées. Il a été déterminé que la meilleure façon d'isoler les cellules était d'incuber le côté endothélial de la cornée avec une solution contenant 0.5% de trypsine et 0.2% de EDTA. Cette méthode est la même qui avait déjà été décrite pour les CECP fœtales (Engelmann 1999). Des optimisations ont ensuite été amenées à la culture des cellules obtenues. La première a

été d'établir le pourcentage de confluence optimal avant trypsinisation des cultures des CECP. Il a été trouvé qu'une culture trypsinée lorsqu'elle a atteint 90% de confluence a des cellules ayant une morphologie plus près de celle retrouvée *in situ* que les cellules issues de cultures trypsinées à confluence. Ceci est différent de la façon normalement présentée dans la littérature, qui est de passer les cellules lorsque celles-ci atteignent la confluence. Ensuite, il a été déterminé que le plastique suffisait en tant que surface de culture. En effet, aucune différence significative n'a été trouvée entre le nombre de cellules obtenues lorsqu'elles étaient cultivées sur le plastique et lorsqu'elles étaient cultivées sur une fine couche de FNC. Par la suite, la densité d'ensemencement optimale a été établie à 12 000 cellules cm^{-2} , bien en-dessous des densités utilisées par d'autres chercheurs (Reichl 2003). Également, la co-culture des CECP avec des cellules 3T3 diminuait de façon constante la grosseur des cellules. Ceci n'avait jamais été fait auparavant avec des cellules endothéliales cornéennes porcines. Cet effet était plus évident dans les culturesensemencées à moins de 12 000 cellules cm^{-2} . De plus, il a été déterminé que la co-culture augmente de quelques semaines le temps requis d'une culture pour atteindre la confluence et diminue la quantité de cellules en prolifération active de 30 à 50%. Ceci est probablement dû au fait d'une certaine inhibition de la prolifération des cellules endothéliales par leur contact avec les cellules de la couche nourricière. Malencontreusement, l'effet de différents additifs (EGF, NGF et bFGF) n'a pu être proprement étudié, puisqu'en absence de sérum dans le milieu de culture, les cellules ne réussissent pas à s'attacher à leur surface de culture. Par contre, les cultures contenant du EGF à 10 ou 20 ng/ml ou du ECGS à 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ contenaient quelques cellules attachées, suggérant un effet particulier du EGF et du ECGS sur l'attachement des CECP. Enfin, le sérum à une concentration de 10% dans le milieu de culture offrait aux cellules une bonne croissance ainsi qu'une belle morphologie et une petite grosseur cellulaire.

Grâce aux optimisations de l'extraction et de la culture des CECP adultes, leur culture prolongée est dès lors possible sur plusieurs passages. Dû au manque de cellules humaines facilement disponibles, il peut s'avérer nécessaire d'avoir un modèle animal qui ressemble de près à l'humain et dont les cellules peuvent être cultivées avec facilité. L'œil

porcin étant facilement disponible lorsqu'on le requiert, étant un bon modèle animal ressemblant de près à l'œil humain et étant maintenant cultivable de façon prolongée, il est dorénavant possible d'utiliser les CECP adultes lorsqu'on en verra la nécessité. De plus, avec plus de travail, il sera possible d'utiliser des cellules cornéennes endothéliales porcines adultes dans des cultures qui serviront à reconstruire des cornées porcines pour de futures expériences comprenant soit des techniques chirurgicales en développement, soit l'effet de médicaments sur la cornée, entre autre. Il est donc maintenant indispensable d'étudier de plus près l'effet précis du sérum sur la culture des CECP. Un ou plusieurs facteurs de croissance et/ou autres biomolécules présents dans le sérum ont un effet sur la croissance des CECP. Leur identification et isolement pourront aider à optimiser encore plus la culture des cellules endothéliales, en permettant de les garder pendant plus de passages ou encore en leur offrant une morphologie encore plus près de celle retrouvée *in situ*. On pourra aussi déterminer les effets des différents additifs déjà essayés (EGF, NGF, ECGS et bFGF) en les ajoutant à un milieu de culture contenant une faible quantité de sérum. On pourra par exemple compter le nombre de cellules en prolifération active et ainsi déterminer quels additifs pourraient être recommandés pour l'utilisation dans un milieu de culture pour CECP. Enfin et ce malgré le fait qu'il n'avait aucun effet positif ou négatif sur la prolifération des CECP, l'utilisation du NGF demeure un additif probable du milieu de culture pour CECP, puisqu'il est possible qu'il améliore la morphologie des cellules en culture. Pour l'instant, les optimisations amenées à l'isolement ainsi qu'à la culture de cellules endothéliales cornéennes de porc permettront de cultiver des cellules ayant une morphologie et une grosseur cellulaire similaires à celles retrouvées *in situ* et offriront une culture plus fiable des cellules endothéliales cornéennes.

Bibliographie

- Abraham, J.A., Mergia, A., et al. (1986). "Nucleotide sequence of a bovine clone encoding the angiogenic protein, basic fibroblast growth factor." *Science* **233**(4763): 545-8.
- Adamis, A.P., Filatov, V., et al. (1993). "Fuchs' endothelial dystrophy of the cornea." *Surv Ophthalmol* **38**(2): 149-68.
- Alaerts, L. (1959). "Biomicroscopic aspects of the corneal endothelium." *Bull Soc Belge Ophthalmol* **122**: 320-31.
- Allen, W.S., Otterbein, E.C., et al. (1977). "Isolation and characterization of the sulfated glycosaminoglycans of the vitreous body." *Biochim Biophys Acta* **498**(1): 167-75.
- Amann, J., Holley, G.P., et al. (2003). "Increased endothelial cell density in the paracentral and peripheral regions of the human cornea." *Am J Ophthalmol* **135**(5): 584-90.
- Amano, S. (2003). "Transplantation of cultured human corneal endothelial cells." *Cornea* **22**(7 Suppl): S66-74.
- Ameen, D.B., Bishop, M.F., et al. (1998). "A lattice model for computing the transmissivity of the cornea and sclera." *Biophys J* **75**(5): 2520-31.
- Amsler, M. (1961). "Some data on the problem of keratoconus." *Bull Soc Belge Ophthalmol* **129**: 331-54.
- Ari, A.B. (2006). "Eye injuries on the battlefields of Iraq and Afghanistan: public health implications." *Optometry* **77**(7): 329-39.
- Aristote (1846). "La psychologie d'Aristote - Traité de l'âme." Jules Barthélemy-Saint-Hilaire (Traduction). Paris, Librairie philosophique de Ladrangé: 40.
- Aristote (1973). "La morale d'Aristote." René Antoine Gauthier (Traduction). Paris, Presses universitaires de France: 105.
- Asbell, P.A., Dualan, I., et al. (2005). "Age-related cataract." *Lancet* **365**(9459): 599-609.
- Aslam, S. et Griffiths, M.F. (2005). "Eye casualties during Operation Telic." *J R Army Med Corps* **151**(1): 34-6.
- Atchison, D. et Smith, G. (2000). "Optics of the Human Eye." Elsevier Health Sciences: 11-5.
- Bahn, C.F., Glassman, R.M., et al. (1986). "Postnatal development of corneal endothelium." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **27**(1): 44-51.

- Balazs, E.A., Laurent, T.C., et al. (1959). "Studies on the structure of the vitreous body. VIII. Comparative biochemistry." *Arch Biochem Biophys* **81**(2): 464-79.
- Barishak, Y.R. (1992). "Embryology of the eye and its adnexae." *Dev Ophthalmol* **24**: 1-142.
- Bell, E. (1991). "Tissue engineering: a perspective." *J Cell Biochem* **45**(3): 239-41.
- Binder, P.S., Rock, M.E., et al. (1991). "High-voltage electron microscopy of normal human cornea." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **32**(8): 2234-43.
- Binder, P.S., Sternberg, H., et al. (1976). "Corneal endothelial damage associated with phacoemulsification." *Am J Ophthalmol* **82**(1): 48-54.
- Blake, D.A., Yu, H., et al. (1997). "Matrix stimulates the proliferation of human corneal endothelial cells in culture." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **38**(6): 1119-29.
- Blatt, H.L., Rao, G.N., et al. (1979). "Endothelial cell density in relation to morphology." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **18**(8): 856-9.
- Bonanno, J.A. (2003). "Identity and regulation of ion transport mechanisms in the corneal endothelium." *Prog Retin Eye Res* **22**(1): 69-94.
- Borboli, S. et Colby, K. (2002). "Mechanisms of disease: Fuchs' endothelial dystrophy." *Ophthalmol Clin North Am* **15**(1): 17-25.
- Borderie, V., Baudrimont, M., et al. (1999). "Cornea guttata et dystrophie de Fuchs." *J Fr Ophtalmol* **22**(9): 987-1002.
- Bourne, W.M. (1998). "Clinical estimation of corneal endothelial pump function." *Trans Am Ophthalmol Soc* **96**: 229-39; discussion 39-42.
- Bourne, W.M., Nelson, L.R., et al. (1997). "Central corneal endothelial cell changes over a ten-year period." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **38**(3): 779-82.
- Bron, A.J. (1988). "Keratoconus." *Cornea* **7**(3): 163-9.
- Camber, O., Rehbinder, C., et al. (1987). "Morphology of the pig cornea in normal conditions and after incubation in a perfusion apparatus." *Acta Vet Scand* **28**(2): 127-34.
- Carlson, K.H., Bourne, W.M., et al. (1988). "Variations in human corneal endothelial cell morphology and permeability to fluorescein with age." *Exp Eye Res* **47**(1): 27-41.
- Chandler, J.W. et Kaufman, H.E. (1974). "Graft reactions after keratoplasty for keratoconus." *Am J Ophthalmol* **77**(4): 543-7.
- Chang, D.H. et Hardten, D.R. (2005). "Refractive surgery after corneal transplantation." *Curr Opin Ophthalmol* **16**(4): 251-5.

- Chen, K.H., Azar, D., et al. (2001). "Transplantation of adult human corneal endothelium ex vivo: a morphologic study." *Cornea* **20**(7): 731-7.
- Chen, K.H., Harris, D.L., et al. (1999). "TGF-beta2 in aqueous humor suppresses S-phase entry in cultured corneal endothelial cells." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **40**(11): 2513-9.
- Chifflet, S., Hernandez, J.A., et al. (2005). "A possible role for membrane depolarization in epithelial wound healing." *Am J Physiol Cell Physiol* **288**(6): C1420-30.
- Cibis, G.W., Weingeist, T.A., et al. (1978). "Traumatic corneal endothelial rings." *Arch Ophthalmol* **96**(3): 485-8.
- Clark, J.I. (2004). "Order and disorder in the transparent media of the eye." *Exp Eye Res* **78**(3): 427-32.
- Colin, J. et Simonpoli, S. (2005). "Le kératocône : options chirurgicales actuelles." *J Fr Ophthalmol* **28**(2): 205-17.
- Cosar, C.B., Sridhar, M.S., et al. (2002). "Indications for penetrating keratoplasty and associated procedures, 1996-2000." *Cornea* **21**(2): 148-51.
- Cotinat, J. (1999). "Microscopie spéculaire de l'endothélium cornéen." *J Fr Ophthalmol* **22**(2): 255-61.
- Dannenber, A.L., Parver, L.M., et al. (1992a). "Penetration eye injuries in the workplace. The National Eye Trauma System Registry." *Arch Ophthalmol* **110**(6): 843-8.
- Dannenber, A.L., Parver, L.M., et al. (1992b). "Penetrating eye injuries related to assault. The National Eye Trauma System Registry." *Arch Ophthalmol* **110**(6): 849-52.
- Davson, H. (1949). "Some considerations on the salt content of fresh and old Ox cornea." *Br J Ophthalmol* **33**: 175-82.
- Desai, M., Pratt, L.A., et al. (2001). "Trends in vision and hearing among older Americans." *Aging Trends*(2): 1-8.
- Donnan, F.G. (1995). "Theory of membrane equilibria and membrane potentials in the presence of non-dialysing electrolytes. A contribution to physical-chemical physiology." *J. Membr. Sci.* **100**: 45-55.
- Doswald-Beek, E. (1993). "Blinding weapons." Geneva, International Committee of the Red Cross.
- Dua, H.S. et Azuara-Blanco, A. (2000). "Limbal stem cells of the corneal epithelium." *Surv Ophthalmol* **44**(5): 415-25.
- Edelhauser, H.F., Rudnick, D.E., et al. (1998). "Corneal epithelial tight junctions and the localization of surface mucin." *Adv Exp Med Biol* **438**: 265-71.

- Edmonds, C.R., Wung, S.F., et al. (2004). "Corneal endothelial cell count in keratoconus patients after contact lens wear." *Eye Contact Lens* **30**(1): 54-8.
- Ehlers, N. (1970). "Some comparative studies on the mammalian corneal epithelium." *Acta Ophthalmol (Copenh)* **48**(4): 821-8.
- Engelmann, K., Bohnke, M., et al. (1988). "Isolation and long-term cultivation of human corneal endothelial cells." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **29**(11): 1656-62.
- Engelmann, K., Drexler, D., et al. (1999). "Transplantation of adult human or porcine corneal endothelial cells onto human recipients in vitro. Part I: Cell culturing and transplantation procedure." *Cornea* **18**(2): 199-206.
- Engelmann, K. et Friedl, P. (1989). "Optimization of culture conditions for human corneal endothelial cells." *In Vitro Cell Dev Biol* **25**(11): 1065-72.
- Farge, E.J. (1978). "Results of penetrating keratoplasty over a four-year period." *Ophthalmology* **85**(6): 650-4.
- Farrell, R.A. (1994). "Corneal Transparency." Dans: "Principle and Practice of Ophthalmology, Basic Sciences." D.M. Albert et F.A. Jakobiec, Eds. London, Saunders: 64-81.
- Fonn, D., Sweeney, D., et al. (2005). "Corneal oxygen deficiency." *Eye Contact Lens* **31**(1): 23-7.
- Foos, R.Y. (1972). "Posterior vitreous detachment." *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol* **76**(2): 480-97.
- Forrester, J.V., Dick, A.D., et al. (2002). "The Eye: Basic Sciences in Practice." London, Elsevier Health Sciences: 16, 204.
- Gagnon, M.M., Boisjoly, H.M., et al. (1997). "Corneal endothelial cell density in glaucoma." *Cornea* **16**(3): 314-8.
- Galin, M.A., Lin, L.L., et al. (1979). "Time analysis of corneal endothelial cell density after cataract extraction." *Am J Ophthalmol* **88**(1): 93-6.
- Germain, L., Carrier, et al. (2000). "Can we produce a human corneal equivalent by tissue engineering?" *Prog Retin Eye Res* **19**(5): 497-527.
- Gisselberg, M., Clark, J.I., et al. (1991). "A quantitative evaluation of Fourier components in transparent and opaque calf cornea." *Am J Anat* **191**(4): 408-18.
- Glick, T., Livesey, S.J., et al., Eds. (2005). "Medieval Science, Technology and Medicine." Routledge: 232-3.

- Gordon, M.K., Foley, J.W., et al. (1994). "Type V collagen and Bowman's membrane. Quantitation of mRNA in corneal epithelium and stroma." *J Biol Chem* **269**(40): 24959-66.
- Gospodarowicz, D., Mescher, A.L., et al. (1977). "Stimulation of corneal endothelial cell proliferations in vitro by fibroblast and epidermal growth factors." *Exp Eye Res* **25**(1): 75-89.
- Gray, H. (1918, May 2000). "Anatomy of the human body." 20e édition. Accédé le 7 octobre 2005, au site <http://www.bartleby.com/107/>.
- Gupta, J.S., Kumar, K., et al. (1965). "Posterior Craterlike Lesion of Cornea." *Am J Ophthalmol* **59**: 111-2.
- Hanna, C., Bicknell, D.S., et al. (1961). "Cell turnover in the adult human eye." *Arch Ophthalmol* **65**: 695-8.
- Hartstein, J. (1968). "Keratoconus that developed in patients wearing corneal contact lenses. Report of four cases." *Arch Ophthalmol* **80**(3): 345-6.
- Hjortdal, J.O. (1998). "On the biomechanical properties of the cornea with particular reference to refractive surgery." *Acta Ophthalmol Scand Suppl*(225): 1-23.
- Hodson, S. (1974). "The regulation of corneal hydration by a salt pump requiring the presence of sodium and bicarbonate ions." *J Physiol* **236**: 271-302.
- Hodson, S. et Earlam, R. (1993). "The incorporation of gel pressure into the irreversible thermodynamic equation of fluid flow in order to explain biological tissue swelling." *J Theor Biol* **163**(2): 173-80.
- Hodson, S. et Miller, F. (1976). "The bicarbonate ion pump in the endothelium which regulates the hydration of rabbit cornea." *J Physiol* **263**(3): 563-77.
- Holmes, D.F., Gilpin, C.J., et al. (2001). "Corneal collagen fibril structure in three dimensions: Structural insights into fibril assembly, mechanical properties, and tissue organization." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(13): 7307-12.
- Honda, M.J., Shimodaira, T., et al. (2006). "A novel culture system for porcine odontogenic epithelial cells using a feeder layer." *Arch Oral Biol* **51**(4): 282-90.
- Hongo, M., Itoi, M., et al. (1992). "Distribution of epidermal growth factor (EGF) receptors in rabbit corneal epithelial cells, keratocytes and endothelial cells, and the changes induced by transforming growth factor-beta 1." *Exp Eye Res* **54**(1): 9-16.
- Ihanamäki, T., Pelliniemi, L.J., et al. (2004). "Collagens and collagen-related matrix components in the human and mouse eye." *Prog Retin Eye Res* **23**(4): 403-34.

- Imanishi, J., Kamiyama, K., et al. (2000). "Growth factors: importance in wound healing and maintenance of transparency of the cornea." *Prog Retin Eye Res* **19**(1): 113-29.
- Ito, S. (1974). "Form and function of the glycocalyx on free cell surfaces." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **268**(891): 55-66.
- Iwamoto, T. et DeVoe, A.G. (1971). "Electron microscopic studies on Fuchs'combined dystrophy. I. Posterior portion of the cornea." *Invest Ophthalmol* **10**(1): 9-28.
- Jacobsen, I.E., Jensen, O.A., et al. (1984). "Structure and composition of Bowman's membrane. Study by frozen resin cracking." *Acta Ophthalmol (Copenh)* **62**(1): 39-53.
- Jang, Y.K., Jung, D.H., et al. (2006). "Mesenchymal stem cells feeder layer from human umbilical cord blood for ex vivo expanded growth and proliferation of hematopoietic progenitor cells." *Ann Hematol* **85**(4): 212-25.
- Javadi, M.A., Motlagh, B.F., et al. (2005). "Outcomes of Penetrating Keratoplasty in Keratoconus." *Cornea* **24**(8): 941-6.
- Johnson, D.H., Bourne, W.M., et al. (1982). "The ultrastructure of Descemet's membrane. I. Changes with age in normal corneas." *Arch Ophthalmol* **100**(12): 1942-7.
- Joyce, N.C. (2003). "Proliferative capacity of the corneal endothelium." *Prog Retin Eye Res* **22**(3): 359-89.
- Joyce, N.C., Harris, D.L., et al. (2002). "Mechanisms of mitotic inhibition in corneal endothelium: contact inhibition and TGF-beta2." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **43**(7): 2152-9.
- Joyce, N.C., Mekler, B., et al. (1996). "Cell cycle protein expression and proliferative status in human corneal cells." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **37**(4): 645-55.
- Jue, B. et Maurice, D.M. (1986). "The mechanical properties of the rabbit and human cornea." *J Biomech* **19**(10): 847-53.
- Kang, G.M. et Ko, M.K. (2005a). "Morphological characteristics and intercellular connections of corneal keratocytes." *Korean J Ophthalmol* **19**(3): 213-8.
- Kang, P.C., Klintworth, G.K., et al. (2005b). "Trends in the indications for penetrating keratoplasty, 1980-2001." *Cornea* **24**(7): 801-3.
- Kansal, S. et Sugar, J. (2001). "Consecutive Descemet membrane detachment after successive phacoemulsification." *Cornea* **20**(6): 670-1.
- Kaufman, E. et Katz, J.I. (1976). "Endothelial damage from intraocular lens insertion." *Invest Ophthalmol* **15**(12): 996-1000.

- Kivela, T. et Uusitalo, M. (1998). "Structure, development and function of cytoskeletal elements in non-neuronal cells of the human eye." *Prog Retin Eye Res* **17**(3): 385-428.
- Kivelä, T. et Uusitalo, M. (1998). "Structure, development and function of cytoskeletal elements in non-neuronal cells of the human eye." *Prog Retin Eye Res* **17**(3): 385-428.
- Klyce, S.D. et Beuerman, R.W. (1997). "Structure and Function of the Cornea." Dans: "The Cornea." Herbert E. Kaufman, Bruce A. Barron et Marguerite B. McDonald, Eds. Boston, Butterworth-Heinemann: 3-50.
- Komai, Y. et Ushiki, T. (1991). "The three-dimensional organization of collagen fibrils in the human cornea and sclera." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **32**(8): 2244-58.
- Laibson, P.R. (2002). "Current concepts and techniques in corneal transplantation." *Curr Opin Ophthalmol* **13**(4): 220-3.
- Langbein, L., Grund, C., et al. (2002). "Tight junctions and compositionally related junctional structures in mammalian stratified epithelia and cell cultures derived therefrom." *Eur J Cell Biol* **81**(8): 419-35.
- Larian, B., Wong, B., et al. (1999). "Facial trauma and ocular/orbital injury." *J Craniomaxillofac Trauma* **5**(4): 15-24.
- Lashkari, K., Lashkari, M.H., et al. (1995). "Combat-related eye trauma: a review of 5,320 cases." *Int Ophthalmol Clin* **35**(1): 193-203.
- Lass, J.H., Khosrof, S.A., et al. (1998). "A double-masked, randomized, 1-year study comparing the corneal effects of dorzolamide, timolol, and betaxolol. Dorzolamide Corneal Effects Study Group." *Arch Ophthalmol* **116**(8): 1003-10.
- Laule, A., Cable, M.K., et al. (1978). "Endothelial cell population changes of human cornea during life." *Arch Ophthalmol* **96**(11): 2031-5.
- Lee, H.T. et Kay, E.P. (2003). "FGF-2 induced reorganization and disruption of actin cytoskeleton through PI 3-kinase, Rho, and Cdc42 in corneal endothelial cells." *Mol Vis* **9**: 624-34.
- Lee, J.G. et Kay, E.P. (2006). "FGF-2-induced wound healing in corneal endothelial cells requires Cdc42 activation and Rho inactivation through the phosphatidylinositol 3-kinase pathway." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **47**(4): 1376-86.
- Lee, P.P., Yang, J.C., et al. (1992). "Worldwide legal requirements for obtaining corneas: 1990." *Cornea* **11**(2): 102-7.
- Levi-Montalcini, R. (1987). "The nerve growth factor 35 years later." *Science* **237**(4819): 1154-62.

- Li, J., Sun, X.C., et al. (2005). "Role of NBC1 in apical and basolateral HCO₃⁻ permeabilities and transendothelial HCO₃⁻ fluxes in bovine corneal endothelium." *Am J Physiol Cell Physiol* **288**(3): C739-46.
- Liesegang, T.J., Bourne, W.M., et al. (1984). "Short- and long-term endothelial cell loss associated with cataract extraction and intraocular lens implantation." *Am J Ophthalmol* **97**(1): 32-9.
- Lindberg, D. (1968). "Alhazen's theory of vision and its reception in the west." *Isis* **58**: 321-41.
- Lindberg, K., Brown, M.E., et al. (1993). "In vitro propagation of human ocular surface epithelial cells for transplantation." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **34**(9): 2672-9.
- Lorenzetti, D.W., Uotila, M.H., et al. (1967). "Central cornea guttata. Incidence in the general population." *Am J Ophthalmol* **64**(6): 1155-8.
- Lu, L., Reinach, P.S., et al. (2001). "Corneal epithelial wound healing." *Exp Biol Med (Maywood)* **226**(7): 653-64.
- Maciag, T., Cerundolo, J., et al. (1979). "An endothelial cell growth factor from bovine hypothalamus: identification and partial characterization." *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**(11): 5674-8.
- Mader, T.H., Carroll, R.D., et al. (2006). "Ocular war injuries of the Iraqi Insurgency, January-September 2004." *Ophthalmology* **113**(1): 97-104.
- Maloney, W.F., Colvard, M., et al. (1979). "Specular microscopy of traumatic posterior annular keratopathy." *Arch Ophthalmol* **97**(9): 1647-50.
- Mamalis, N., Anderson, C.W., et al. (1992). "Changing trends in the indications for penetrating keratoplasty." *Arch Ophthalmol* **110**(10): 1409-11.
- Mandell, R.B., Polse, K.A., et al. (1989). "Corneal hydration control in Fuchs' dystrophy." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **30**(5): 845-52.
- Margo, C.E. et Harman, L.E. (2005). "Posterior vitreous detachment." *Postgrad Med* **117**(3): 37-42.
- Markovchick, V., Pons, P., et al. (1993). "Emergency medicine secrets." Philadelphia, Hankey and Belfus: 370-2.
- Marshall, G.E., Konstas, A.G., et al. (1993). "Collagens in ocular tissues." *Br J Ophthalmol* **77**(8): 515-24.
- Matsuda, H. (1968). "Electron microscopic study of the corneal nerve with special reference to the nerve endings." *Nippon Ganka Gakkai Zasshi* **72**(7): 880-93.

- Maurice, D.M. (1951). "The permeability to sodium ions of the living rabbit's cornea." *J Physiol* **112**(3-4): 367-91.
- Maurice, D.M. (1957). "The structure and transparency of the cornea." *J Physiol* **136**(2): 263-86.
- Maurice, D.M. (1985). "Passive ion fluxes across the corneal endothelium." *Curr Eye Res* **4**(4): 339-49.
- McCartney, A.C. et Kirkness, C.M. (1988). "Comparison between posterior polymorphous dystrophy and congenital hereditary endothelial dystrophy of the cornea." *Eye* **2** (Pt **1**): 63-70.
- Meek, K.M. et Fullwood, N.J. (2001). "Corneal and scleral collagens--a microscopist's perspective." *Micron* **32**(3): 261-72.
- Meier, S. (1977). "Initiation of corneal differentiation prior to cornea-lens association." *Cell Tissue Res* **184**(2): 255-67.
- Merindano, M.D., Costa, J., et al. (2002). "A comparative study of Bowman's layer in some mammals: Relationships with other constituent corneal structures." *Eur J Anat* **6**(3): 133-9.
- Micera, A., Lambiase, A., et al. (2004). "Nerve growth factor involvement in the visual system: implications in allergic and neurodegenerative diseases." *Cytokine Growth Factor Rev* **15**(6): 411-7.
- Mitchell, J. (2000). "Eye, ear, nose, throat and oral surgery." Dans: "Emergency medicine: a comprehensive study guide." J.E. Tintinalli, G. Kelen et J. Stapczynski, Eds. New York, McGraw-Hill: 1501-26.
- Módis, L., Jr., Langenbacher, A., et al. (2001). "Scanning-slit and specular microscopic pachymetry in comparison with ultrasonic determination of corneal thickness." *Cornea* **20**(7): 711-4.
- Müller, L.J., Marfurt, C.F., et al. (2003). "Corneal nerves: structure, contents and function." *Exp Eye Res* **76**(5): 521-42.
- Müller, L.J., Pels, E., et al. (2004). "A new three-dimensional model of the organization of proteoglycans and collagen fibrils in the human corneal stroma." *Exp Eye Res* **78**(3): 493-501.
- Muraine, M., Toubeau, D., et al. (2002). "Analysing the various obstacles to cornea postmortem procurement." *Br J Ophthalmol* **86**(8): 864-8.
- Murphy, C., Alvarado, J., et al. (1984). "Prenatal and postnatal cellularity of the human corneal endothelium. A quantitative histologic study." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **25**(3): 312-22.

- Myllyharju, J. et Kivirikko, K.I. (2001). "Collagens and collagen-related diseases." *Ann Med* **33**(1): 7-21.
- Najjar, D.M., Rapuano, C.J., et al. (2004). "Descemet membrane detachment with hemorrhage after alkali burn to the cornea." *Am J Ophthalmol* **137**(1): 185-7.
- Nayak, S.K. et Binder, P.S. (1984). "The growth of endothelium from human corneal rims in tissue culture." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **25**(10): 1213-6.
- Newsome, D.A., Foidart, J.M., et al. (1981). "Detection of specific collagen types in normal and keratoconus corneas." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **20**(6): 738-50.
- Nguyen, N.X., Seitz, B., et al. (2004). "Clinical aspects and treatment of immune reactions following penetrating normal-risk keratoplasty." *Klin Monatsbl Augenheilkd* **221**(6): 467-72.
- Nguyen, Q.D., Kruger, E.F., et al. (2002). "Combat eye trauma: intraocular foreign body injuries during the Iran-Iraq war (1980-1988)." *Int Ophthalmol Clin* **42**(3): 167-77.
- Nouri, M., Pineda, R., Jr., et al. (2002). "Descemet membrane tear after cataract surgery." *Semin Ophthalmol* **17**(3-4): 115-9.
- Orlin, S.E., Raber, I.M., et al. (1990). "Keratoconus associated with corneal endothelial dystrophy." *Cornea* **9**(4): 299-304.
- Ozanic, V., Rayborn, M., et al. (1977). "Observations on the morphology of the developing primate cornea: epithelium, its innervation and anterior stroma." *J Morphol* **153**(2): 263-97.
- Patel, T. (1992). "Legal confusion cuts French cornea transplants." *New Sci* **135**(1841): 9.
- Pieramici, D., Green, W.R., et al. (1994). "Stripping of Descemet's membrane: a clinicopathologic correlation." *Ophthalmic Surg* **25**(4): 226-31.
- Pistsov, M.Y., Sadovnikova, E., et al. (1988). "Human corneal endothelial cells: isolation, characterization and long-term cultivation." *Exp Eye Res* **47**(3): 403-14.
- Polack, F.M. et Sugar, A. (1976). "The phacoemulsification procedure. II. Corneal endothelial changes." *Invest Ophthalmol* **15**(6): 458-69.
- Polack, F.M. et Sugar, A. (1977). "The phacoemulsification procedure. III. Corneal complications." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **16**(1): 39-46.
- Pouliquen, Y. et Desvignes, P. (1967). "Ultrastructure d'une hématoconée." *Arch Ophthalmol Rev Gen Ophthalmol* **27**(1): 45-52.
- Pouliquen, Y., Faure, J.P., et al. (1966). "The sub-epithelial acellular fibrillar zone of the cornea of the embryo. Its relation to the formation of the epithelial basal membrane and Bowman's membrane." *Arch Ophthalmol Rev Gen Ophthalmol* **26**(1): 59-68.

- Price, F.W., Jr., Whitson, W.E., et al. (1993). "Five-year corneal graft survival. A large, single-center patient cohort." *Arch Ophthalmol* **111**(6): 799-805.
- Quere, M.A., Bouchat, J., et al. (1969). "Ocular blast injuries." *Am J Ophthalmol* **67**(1): 64-9.
- Rabinowitz, Y.S. (1998). "Keratoconus." *Surv Ophthalmol* **42**(4): 297-319.
- Reichl, S. et Muller-Goymann, C.C. (2003). "The use of a porcine organotypic cornea construct for permeation studies from formulations containing befunolol hydrochloride." *Int J Pharm* **250**(1): 191-201.
- Reneker, L.W., Silversides, D.W., et al. (2000). "Formation of corneal endothelium is essential for anterior segment development - a transgenic mouse model of anterior segment dysgenesis." *Development* **127**(3): 533-42.
- Rheinwald, J.G. et Green, H. (1975). "Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells." *Cell* **6**(3): 331-43.
- Riva, M.A., Molteni, R., et al. (2005). "Emerging role of the FGF system in psychiatric disorders." *Trends Pharmacol Sci* **26**(5): 228-31.
- Roszkowska, A.M., Colosi, P., et al. (2004). "Age-related modifications of the corneal endothelium in adults." *Int Ophthalmol* **25**(3): 163-6.
- Sakai, L.Y., Keene, D.R., et al. (1986). "Type VII collagen is a major structural component of anchoring fibrils." *J Cell Biol* **103**(4): 1577-86.
- Samples, J.R., Binder, P.S., et al. (1991). "Propagation of human corneal endothelium in vitro effect of growth factors." *Exp Eye Res* **52**(2): 121-8.
- Savage, C.R., Jr. et Cohen, S. (1973). "Proliferation of corneal epithelium induced by epidermal growth factor." *Exp Eye Res* **15**(3): 361-6.
- Savontaus, M., Ihanamaki, T., et al. (1997). "Localization of type II collagen mRNA isoforms in the developing eyes of normal and transgenic mice with a mutation in type II collagen gene." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **38**(5): 930-42.
- Schneider, A.I., Maier-Reif, K., et al. (1997). "The Use of an In Vitro Cornea for Predicting Ocular Toxicity." *In Vitro Toxicology* **10**(3): 309-18.
- Schneider, A.I., Maier-Reif, K., et al. (1999). "Constructing an in vitro cornea from cultures of the three specific corneal cell types." *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **35**(9): 515-26.
- Schraepen, P., Koppen, C., et al. (2003). "Visual acuity after penetrating keratoplasty for pseudophakic and aphakic bullous keratopathy." *J Cataract Refract Surg* **29**(3): 482-6.

- Scott, J.E. et Bosworth, T.R. (1990). "A comparative biochemical and ultrastructural study of proteoglycan-collagen interactions in corneal stroma. Functional and metabolic implications." *Biochem J* **270**(2): 491-7.
- Shaheen, F.A. et Souqiyyeh, M.Z. (2004). "Increasing organ donation rates from Muslim donors: lessons from a successful model." *Transplant Proc* **36**(7): 1878-80.
- Sharif, K.W. et Casey, T.A. (1991). "Penetrating keratoplasty for keratoconus: complications and long-term success." *Br J Ophthalmol* **75**(3): 142-6.
- Soubrane, G., Jerdan, J., et al. (1990). "Binding of basic fibroblast growth factor to normal and neovascularized rabbit cornea." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **31**(2): 323-33.
- Sugar, J., Mitchelson, J., et al. (1978). "The effect of phacoemulsification on corneal endothelial cell density." *Arch Ophthalmol* **96**(3): 446-8.
- Suveges, I. (1981). "The endothelial cells in acute keratoconus." *Klin Monatsbl Augenheilkd* **179**(6): 404-5.
- Szczotka, L.B. et Lindsay, R.G. (2003). "Contact lens fitting following corneal graft surgery." *Clin Exp Optom* **86**(4): 244-9.
- Szentmary, N., Szende, B., et al. (2005). "Epithelial cell, keratocyte, and endothelial cell apoptosis in Fuchs' dystrophy and in pseudophakic bullous keratopathy." *Eur J Ophthalmol* **15**(1): 17-22.
- Takeuchi, T., Ohno, S., et al. (1980). "Studies on atopic traits in keratoconus." *Nippon Ganka Gakkai Zasshi* **84**(2): 152-5.
- Tamura, Y., Konomi, H., et al. (1991). "Tissue distribution of type VIII collagen in human adult and fetal eyes." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **32**(9): 2636-44.
- Thiagarajah, J.R. et Verkman, A.S. (2002). "Aquaporin deletion in mice reduces corneal water permeability and delays restoration of transparency after swelling." *J Biol Chem* **277**(21): 19139-44.
- Thompson, R.W., Jr., Price, M.O., et al. (2003). "Long-term graft survival after penetrating keratoplasty." *Ophthalmology* **110**(7): 1396-402.
- Tomidokoro, A. et Oshika, T. (2004). "Quantitative assessment of videokeratography data using fourier series harmonic analysis." *Cornea* **23**(8 Suppl): S71-7.
- Tseng, S.C. (1996). "Regulation and clinical implications of corneal epithelial stem cells." *Mol Biol Rep* **23**(1): 47-58.
- Tuft, S.J. et Coster, D.J. (1990). "The corneal endothelium." *Eye* **4** (Pt 3): 389-424.

- van Erp, P.E., Brons, P.P., et al. (1988). "A rapid flow cytometric method for bivariate bromodeoxyuridine/DNA analysis using simultaneous proteolytic enzyme digestion and acid denaturation." *Cytometry* **9**(6): 627-30.
- Verkman, A.S. (2002). "Aquaporin water channels and endothelial cell function." *J Anat* **200**(6): 617-27.
- Vracko, R. et Benditt, E.P. (1972). "Basal lamina: the scaffold for orderly cell replacement. Observations on regeneration of injured skeletal muscle fibers and capillaries." *J Cell Biol* **55**(2): 406-19.
- Wang, S.Y., Hasty, C.E., et al. (1993). "Analysis of metabolites in aqueous solutions using laser Raman spectroscopy." *Applied Optics* **32**(6): 925-9.
- Waring, G.O., 3rd, Bourne, W.M., et al. (1982). "The corneal endothelium. Normal and pathologic structure and function." *Ophthalmology* **89**(6): 531-90.
- Waring, G.O., 3rd, Laibson, P.R., et al. (1974). "Clinical and pathological alterations of Descemet's membrane: with emphasis on endothelial metaplasia." *Surv Ophthalmol* **18**: 325-68.
- Watson, P.G. et Young, R.D. (2004). "Scleral structure, organisation and disease. A review." *Exp Eye Res* **78**(3): 609-23.
- Weisenthal, R.W. et Streeten, B.W. (1997). "Posterior membrane dystrophies." Dans: "Cornea." J. H. Krachmer, M.J. Mannis et E.J. Holland, Eds. St-Louis, Mosby-Year Book: 1063-90.
- Weston, B.C., Bourne, W.M., et al. (1995). "Corneal hydration control in diabetes mellitus." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **36**(3): 586-95.
- Williams, K. et Watsky, M. (2002). "Gap junctional communication in the human corneal endothelium and epithelium." *Curr Eye Res* **25**(1): 29-36.
- Wilson, S.E., Bourne, W.M., et al. (1988). "Endothelial function and aqueous humor flow rate in patients with Fuchs' dystrophy." *Am J Ophthalmol* **106**(3): 270-8.
- Wilson, S.E. et Hong, J.W. (2000). "Bowman's layer structure and function: critical or dispensable to corneal function? A hypothesis." *Cornea* **19**(4): 417-20.
- Wilson, S.E., Lloyd, S.A., et al. (1993). "Fibroblast growth factor-1 receptor messenger RNA expression in corneal cells." *Cornea* **12**(3): 249-54.
- Woost, P.G., Jumblatt, M.M., et al. (1992). "Growth factors and corneal endothelial cells: I. Stimulation of bovine corneal endothelial cell DNA synthesis by defined growth factors." *Cornea* **11**(1): 1-10.

- Wu, T.T., Amini, L., et al. (2005). "Cataracts and cataract surgery in mentally retarded adults." *Eye Contact Lens* **31**(2): 50-3.
- Yeh, P.C., Azar, D.T., et al. (2004). "Selective endothelial transplantation: novel surgical techniques for the treatment of endothelial dysfunction." *Int Ophthalmol Clin* **44**(1): 51-66.
- Zander, E. et Weddell, G. (1951). "Observations on the innervation of the cornea." *J Anat* **85**(1): 68-99.
- Zeng, Y., Yang, J., et al. (2001) "A comparison of biomechanical properties between human and porcine cornea." *J Biomech* **34**(4): 533-7.
- Zevort, C.M. (1843). "Anaxagore." Paris, Joubert: 80-1.
- Zhu, C. et Joyce, N.C. (2004). "Proliferative response of corneal endothelial cells from young and older donors." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **45**(6): 1743-51.