



THÈSE

En vue de l'obtention du DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

Présentée et soutenue par
Tatiana LUPASCO

Le 25 mars 2019

**Etude comparative du programme de différenciation terminale de
l'épithélium de la cornée normale et des patients atteints de
kératocône**

Ecole doctorale : **BSB - Biologie, Santé, Biotechnologies**

Spécialité : **PHYSIOPATHOLOGIE**

Unité de recherche :

UDEAR - Unité Différenciation Epidermique et Autoimmunité Rhumatoïde

Thèse dirigée par

François MALECAZE et Stéphane GALIACY

Jury

Mme Muriel Cario-Andre, Rapporteur
M. Vincent Daien, Rapporteur
M. Frederic Chiambaretta, Rapporteur
M. Michel Simon, Examineur
Mme Claire Racaud Sultan, Examinatrice
M. François MALECAZE, Directeur de thèse

« En plein cœur de toute difficulté, se cache une opportunité ».

Albert Einstein

Remerciements

Je tiens à remercier tout d'abord Mme le Docteur Muriel Cario-Andre, Mr le Professeur Frédéric Chiambaretta et Mr le Professeur Vincent Daien de m'avoir fait l'honneur d'être les rapporteurs de mon manuscrit de thèse.

Je remercie également Mme le Docteur Claire Racaud et Mr le Docteur Michel Simon d'avoir accepté de faire partie de mon jury.

Ce travail a été effectué dans le cadre de Unité "Différenciation Epithéliale et Autoimmunité Rhumatoïde" dirigé par Mr le Professeur Guy Serre dont j'exprime toute ma gratitude pour sa confiance, son soutien et sa disponibilité.

Un immense merci pour Mr le Professeur François Malecaze, mon directeur de thèse, pour m'avoir accepté dans son équipe et pour ses conseils scientifiques, ses critiques constructives et son aide tout au long de ma thèse.

J'adresse les plus vifs remerciements à Mr le Docteur Stéphane Galiacy, pour son encadrement durant ces 4 années, ainsi pour sa patience et sa disponibilité.

Je tiens à remercier très chaleureusement Mr le Docteur Michel Simon de son implication active surtout durant ma dernière année de thèse, sans son aide et sa disponibilité je ne serai pas arrivée jusqu'au bout.

Je remercie énormément l'équipe du laboratoire de Saint Etienne dirigée par Mr le Professeur Philippe Gain et notamment à Dr Zhiguo He pour les analyses en immunohistochimie.

Ce travail ayant pu être réalisé grâce au financement ERASMUS Medea et la Fondation de la France, je tiens également à remercier tous ces membres ainsi qu'aux patients qui ont donné leur consentement pour utiliser leurs cornées pour la recherche.

Un grand merci à Cyrielle Tricoire de m'avoir initié aux différentes techniques de biologie moléculaire, ainsi que pour son aide, son encouragement et sa bonne humeur surtout dans les moments difficiles. Nos longues journées passées « à la paillasse » ainsi que nos fous rires constituent des super souvenirs.

Merci également à Lise Brion, pour son aide autant technique que morale, en particulier à la fin de ma thèse.

Un grand merci à Celia Zazo-Seco pour son œil scientifique, son soutien quotidien et son aide.

Merci à Mme le Docteur Michelle Allouche pour sa disponibilité, ses conseils scientifiques et sa bonne humeur.

Je tiens à remercier les membres de l'équipe des ophtalmologistes pour leur aide et la collecte des échantillons. Je remercie Mr le Professeur Pierre Fournié pour ses conseils et les corrections apportées à mon manuscrit dans la partie kératocône.

Je souhaite également remercier l'ensemble des membres du laboratoire qui m'ont quotidiennement facilité la vie au laboratoire : Marie Claire Méchin, pour sa disponibilité et ses explications, Corine Leprince pour sa bonne humeur et sa gentillesse, Géraldine Offer pour son écoute et sa présence surtout dans les moments difficiles, ainsi que Carole, Céline, Marie, Johanne, Brigitte, Laurence, Théo, Roxanne, Emeline, Saber, Sokhna, Mélanie pour leur capacité à créer une ambiance chaleureuse en contribuant ainsi à faciliter mon séjour en France.

Je tiens également à remercier tous ceux en dehors du laboratoire qui m'ont soutenu et beaucoup aidé surtout moralement : Mme Michelle Caria, Audrey, Laurent, et Carine.

Ces remerciements ne seraient pas complets sans remercier mes amis et ma famille : mes parents qui m'ont soutenu avec amour durant toutes ces longues années de thèse, ainsi que les familles Mihalache et Scutelnic et notre amie Nathalie.

Et enfin, je remercie mon fils, Alexandre, qui est resté avec moi pendant tout ce temps et qui a été, surtout dans les moments difficiles, la seule raison pour laquelle je suis restée jusqu'à la fin.

Je vous remercie encore une fois, sans vous tous rien n'aurait été possible.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	9
CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTERATURE	11
Partie 1: La cornée humaine: structure et fonctions	13
1.1.1 Introduction	15
1.1.2 Embryogénèse.....	16
1.1.3 Histologie	16
1.1.3.1 L'épithélium cornéen	17
1.1.3.1.1 Les cellules basales	18
1.1.3.1.2 Les cellules intermédiaires	19
1.1.3.1.3 Les cellules superficielles	20
1.1.3.2 La membrane de Bowman.....	22
1.1.3.3 Le stroma.....	22
1.1.3.4 La couche Dua	24
1.1.3.5 La membrane de Descemet	24
1.1.3.6 L'endothélium	25
1.1.4 Le limbe et les cellules souches	26
1.1.4.1 Le limbe	26
1.1.4.2 Les cellules souches	28
1.1.4.2.1 Le renouvellement de l'épithélium cornéen	29
1.1.4.2.2 La régulation du renouvellement de l'épithélium cornéen.....	30
1.1.5 Innervation cornéenne	31
1.1.6 Fonctions de la cornée.....	31
1.1.6.1 La protection du segment antérieur de l'œil.....	32
1.1.6.1.1. Barriere semi perméable et antimicrobienne	32
1.1.6.1.2 Barrière mécanique	32
1.1.6.1.3 Barrière photoprotectrice et antioxydante.....	32
1.1.6.2 La réfraction.....	33
1.1.6.3 La transmission de la lumière	33
Partie 2 : La peau humaine : structure et fonctions	35
1.2.1 Introduction	37
1.2.2 Embryogénèse.....	37
1.2.3 Histologie	38
1.2.3.1 L'épiderme.....	38
1.2.3.1.1. La couche basale	39
1.2.3.1.2. La couche épineuse	39
1.2.3.1.3. La couche granuleuse	40
1.2.3.1.4. La couche cornée.....	41
1.2.3.2 Le derme	42
1.2.3.3 L'hypoderme.....	42
1.2.4 Les cellules souches.....	43

1.2.4.1 Le renouvellement de l'épiderme.....	45
1.2.5 Fonctions de la peau.....	46
Partie 3: Les programmes de différenciation terminale de l'épiderme et de l'épithélium cornéen	51
3.1 Introduction	53
3.2 Les kératines	57
3.3 Le complexe jonctionnel	60
3.3.1 Les jonctions serrées- les claudines.....	61
3.3.2 Les jonctions d'ancrage : les desmosomes	64
3.4 Le complexe de différenciation épidermique.....	68
3.4.1 La régulation de l'expression des gènes du complexe de différenciation épidermique.....	71
3.4.2 L'involucrine.....	72
3.4.3 La loricrine	74
3.4.4 La famille SFTPs : exemple des filaggrine, filaggrine 2 et hornerine	75
4.1 Définition.....	81
4.2 Étiologie et facteurs de risque.....	82
4.2.1 Facteurs génétiques	82
4.2.2 Facteurs environnementaux	86
4.2.3. Facteurs géographiques	87
4.3 Physiopathologie	87
4.4. Analyse histologique de la cornée kératocônique.....	97
4.5 Classification du kératocône	103
4.6 Manifestations cliniques.....	107
4.7 Méthodes d'exploration.....	109
4.8 Diagnostic précoce = Mapping épithélial	111
4.9 Traitements du KC	113
4.9.1 Prise en charge contactologique	114
4.9.2 Prise en charge chirurgicale	115
4.9.2.1 Le traitement stabilisateur du KC : le « cross-linking » du collagène cornéen (CXL).....	116
4.9.2.2 Les anneaux intra-cornéens pour le KC	118
4.9.2.3 Les implants toriques	121
4.9.2.4 Greffes de cornée.....	121
4.9.2.5 Les traitements combinés	124
4.9.3 Nouvelles stratégies à l'étude dans le traitement du KC	126
CHAPITRE II : OBJECTIFS DE LA THESE	127
CHAPITRE III: RESULTATS EXPERIMENTAUX	131
ARTICLE.....	133
CHAPITRE IV : DISCUSSION	161
CONCLUSION.....	174
PERSPECTIVES.....	177
Annexe 1.....	178
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	183

LISTE DES ABREVIATIONS

ABCB5	ATP Binding cassette subfamily B
ABCG2	ATP-binding cassette super-family G member 2
ADN	Acide désoxyribonucléique
AIC	Anneaux intra-cornéens
AP1	Activator protein 1
ARE	Antioxydant responsive element
ARN	Acide ribonucléique
AV	Acuité visuelle
BMP	Bone morphogenetic proteins
CAT	Cellule amplificatrice transitoire
CB	Couche basale
CC	Couche cornée
CDSN	Corneodesmosine
C/EBP alpha	CCAAT/enhancer-binding proteins
CG	Couche granuleuse
CLDN	Claudine
CP	Cellule progénitrice
CS	Cellule souche
CXL	Crosslinking
DHEA-S	Dehydroepiandrotestosterone
DP	Desmoplakine
DSC	Desmocolline
DSG	Desmogléine
EVPL	Envoplakine
FLG	Filaggrine
FNH	Facteur naturel d'hydratation
FP	Folicule pileux
HMOX-1,2	Heme oxygenase (decycling) 1
HRNR	Hornerine
IL	Interleukine
IVL	Involucrine
KC	Kératocone
Keap1	Kelch-like ECH-associated protein 1
Klf4	Kruppel like factor 4
KRT	Kératine

LC3A	Microtubule associated protein 1 light chain 3 alpha
LIO	Lentille intraoculaire
LOR	Loricrine
LOX	Lysyl oxydase
LRPG	Lentille rigides permeable au gaz
MMP	Métalloprotéases matricielles
MAP kinases	Mitogen-activated protein kinase
NISCH	Neonatal Ichthyosis Sclerosing and Cholangitis syndrome
NQO1	NAD(P)H Quinone Dehydrogenase 1
Nrf2	Nuclear factor erythroid-2-related factor 2
OCT	Optical Coherence Tomography
PAX6	Paired box 6
PPL	Périplakine
ROS	Reactive oxygen species
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
SFRP1	Secreted Frizzled Related Protein 1
SFTPs	S100 Fused Type Proteins
SOD	Superoxide dismutase
SPRR	Small proline rich proteins
TGF β	Transforming growth factor beta
TIMP	Tissue inhibitors of metalloproteinases
TNF	Tumor necrosis factor
TUBA3D	Tubulin Alpha 3d
VSX	Visual system homeobox
Wnt	Wingless related beta catenine
WT	Wild type
ZNF	Zinc finger protein
ZO	Zonula occludens

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1. Représentation schématique de la face antérieure du globe oculaire.....	15
Figure 2. Les dérivés du feuillet ectodermique.	16
Figure 3. Représentation schématique de la cornée humaine.....	17
Figure 4. Structure de l'épithélium cornéen.....	17
Figure 5. Représentation schématique des interactions de la couche basale de l'épithélium cornéen avec la membrane basale.....	19
Figure 6. Image en microscopie confocale in vivo de l'épithélium cornéen normal	20
Figure 7. Microscopie électronique à balayage de la face apicale des cellules épithéliales cornéennes superficielles.....	21
Figure 8. Structure du film lacrymal	22
Figure 9. Images en microscopie électronique à balayage du stroma cornéen.	24
Figure 10. La couche Dua de la cornée humaine.....	24
Figure 11. Représentation schématique de la membrane de Descemet et ses composants	25
Figure 12. Endothélium cornéen vu en microscopie spéculaire.....	26
Figure 13. Représentation schématique du limbe cornéen (1) D'après (G. Gonzalez et al. 2018) et des Palissades de Vogt (2). D'après (Bizheva et al. 2017).....	27
Figure 14. Représentation schématique du limbe et des cellules qui siègent dans les cryptes.	28
Figure 15. Modèle simplifié de l'hypothèse X/Y/Z du renouvellement cornéen proposé par Thoft (1983)	29
Figure 16. Schéma de l'innervation cornéenne (à gauche) et représentation tridimensionnelle de l'innervation de la cornée humaine (à droite).....	31
Figure 17. Fonctions de la cornée.	32
Figure 18. Représentation schématique de la peau.	38
Figure 19. Représentation schématique de l'épiderme.	39
Figure 20. La couche épineuse de l'épiderme observée en microscopie électronique à transmission.	40
Figure 21. La couche granuleuse en microscopie électronique a transmission.	41
Figure 22. La couche cornée de l'épiderme en microscopie électronique à balayage (à gauche) et à transmission (à droite).	42
Figure 23. Répartition des cellules souches dans l'épiderme.....	43
Figure 24. Représentation schématique des deux modèles de renouvellement de l'épiderme.	46
Figure 25. Représentation schématique des principales fonctions de la peau.....	46

Figure 26. Pax6, WNT7A et ABCB5 jouent un rôle primordial dans la transformation des cellules souches épithéliales en cellules souches cornéennes.....	54
Figure 27. Organisation d'un filament intermédiaire.	57
Figure 28. Le réseau de filaments intermédiaires dans les kératinocytes vu avec différentes techniques de microscopie.....	58
Figure 29. Le complexe jonctionnel dans une cellule.	60
Figure 30. Analyse protéique en Western blot (A), microscopie électronique 100nm (B) et immunofluorescence 80 µm (C) des claudines 1 et 4 dans l'épiderme de souris	63
Figure 31. Analyse de la distribution des claudines par RT-PCR dans l'épithélium cornéen et conjonctival (à gauche) et par immunofluorescence dans l'épithélium cornéen (à droite).	63
Figure 32. Représentation schématique de la structure des desmosomes et corneodesmosomes.	65
Figure 33. Représentation schématique de l'expression des protéines du desmosome et du corneodesmosome au cours de la différenciation épidermique.....	66
Figure 34. Analyse par Western blot des différentes protéines des desmosomes dans l'épithélium nasal (N), cornéen (C) et conjonctival (Conj) du bœuf.....	67
Figure 35. Localisation des Dsc et Dsg dans l'épithélium cornéen central (A,B) et limbique (C,D) bovin.....	67
Figure 36. Les souris Dsg3 KO présentent des lésions oculaires	68
Figure 37. Les trois étapes de la formation de l'enveloppe cornée.	70
Figure 38. Représentation schématique du chromosome 1 humain et la localisation des gènes du complexe de différenciation épidermique.....	71
Figure 39. Marquage par immunofluorescence indirecte (à droite) de l'involucrine sur des coupes d'épiderme murin.	73
Figure 40. Marquage par immunofluorescence indirecte de l'involucrine sur des coupes de l'épithélium cornéen humain (3,4).	73
Figure 41. Marquage par immunofluorescence indirecte de la loricrine sur des coupes (50 µm) d'épithélium cornéen et d'épiderme humains.....	74
Figure 42. Expression de la filaggrine dans l'épiderme normale et l'épithélium conjonctival pathologique (dans le Syndrome Stevens- Johnson)	76
Figure 43. Analyse par immunohistochimie de l'expression de l'HRNR dans les structures oculaires.....	77
Figure 44. Représentation schématique d'une cornée normale et d'une cornée kératocônique avec image simulée des troubles de la vision.....	81
Figure 45. Distribution des âges de découverte du KC.	82
Figure 46. Les mécanismes physiopathologiques impliqués dans le développement et la progression du KC. Plusieurs hypothèses sont proposées.	88

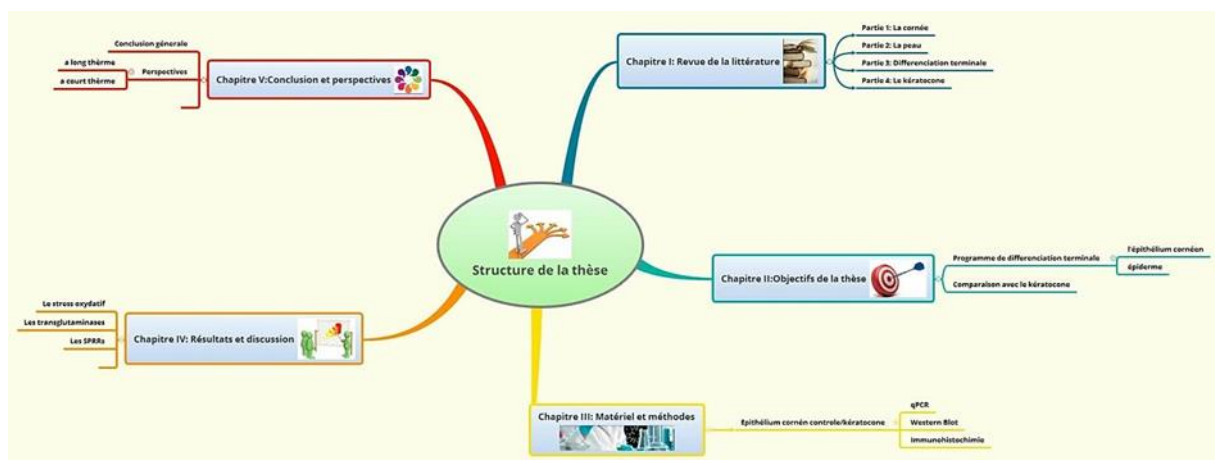
Figure 47. Le déséquilibre entre les inhibiteurs de protéinases et la protéolyse pourrait jouer un rôle fondamental dans la physiopathogénie du KC	89
Figure 48. Classification de la morphologie des cellules de Langerhans.....	92
Figure 49. Localisation des médiateurs immunitaires solubles dans le liquide lacrymal, le tissu cornéen et l'humeur aqueuse des patients atteints de KC.	93
Figure 50. Analyse de l'expression en ARNm des gènes liés à la voie autophagique dans l'épithélium cornéen entier (à gauche) et dans la région du cône et de la périphérie (à droite) des patients atteints de KC.	95
Figure 51. Images en microscopie confocale de la couche des cellules superficielles de la cornée du KC. Cellules superficielles allongées fusiformes de KC sévère	98
Figure 52. Image en microscopie confocale des cellules intermédiaires de l'épithélium cornéen kératocônique (A) et normal (B).....	98
Figure 53. Image en microscopie confocale de la couche basale de l'épithélium cornéen kératocônique (A) et normal (B).	99
Figure 54. Image en microscopie optique et confocale de la région apicale de la cornée kératocônique.....	101
Figure 55. Classification du KC d'après Amsler- Krumeich	104
Figure 56. La classification Belin ABCD du KC.	105
Figure 57. Différents aspects topographiques à partir de cartes axiales en échelle absolue.	105
Figure 58. Indices en topographie spéculaire permettant de distinguer les KC infra-cliniques des KC avérés.....	106
Figure 59. Indices en topographie d'élévation sur la carte pachymétrique des cas suspects de KC.....	106
Figure 60. Signe de Munson.....	107
Figure 61. Les stries de Vogt.....	108
Figure 62. L'anneau de Fleischer dans le KC.	108
Figure 63 Images obtenues en topographie spéculaire en utilisant le disque de Placido et leur transcription sur des cartes colorées.....	109
Figure 64. Exemple d'une topographie d'élévation d'une cornée normale (1) et d'un KC (2).	110
Figure 65. Exemple du profil d'épaisseur épithéliale dans le diagnostic du KC.	112
Figure 66. Arbre décisionnel pour la prise en charge du KC.....	114
Figure 67. Les lentilles utilisées pour améliorer la vision du patient atteint de KC.	115
Figure 68. Réticulation du collagène cornéen par le cross-linking.	117
Figure 69. Les anneaux intra-cornéens pour le KC.	118

Figure 70. Les principales indications et contre-indications du CXL et de la pose d'anneaux intra-cornéens.	120
Figure 71. Exemples d'anneaux intra-cornéens.	120
Figure 72. Représentation schématique de différentes greffes de cornée utilisées dans le traitement du KC.	122
Figure 73. Examen biomicroscopique d'un patient après greffe de la couche de Bowman.	124
Figure 74. Représentation schématique de l'activation de la voie de signalisation de Nrf2 par les espèces réactives de l'oxygène.	171
Figure 75. Représentation schématique de l'action d'hème oxygénase.	173
Figure 76. Modèle des mécanismes physiopathogéniques impliqués dans le kératocône	176
Figure 77. Différentes conditions testées pour produire des épithéliums cornéens reconstruits.	180
Figure 78. Coloration en hémalin-éosine des épithéliums cornéens reconstruits (à gauche) et l'expression en ARNm des gènes de différenciation épidermique (KRT10, KRT14 FLG) et cornéen (KRT3).	180

Liste des tableaux

Tableau 1. Distribution des kératines dans l'épiderme et l'épithélium cornéen.	58
Tableau 2. Distribution des glycoprotéines desmosomales dans les épithéliums cornéen, conjonctival et épiderme bovin	68
Tableau 3. Les gènes candidats avec mutations identifiés chez les patients atteints de KC.	84

INTRODUCTION



Chapitre I : Revue de la littérature

L'objectif principal de ma thèse est l'étude comparative du programme de différenciation terminale de l'épithélium cornéen en situation physiologique et pathologique, en particulier dans le cas du kératocône.

Ainsi, mon introduction comporte 4 parties :

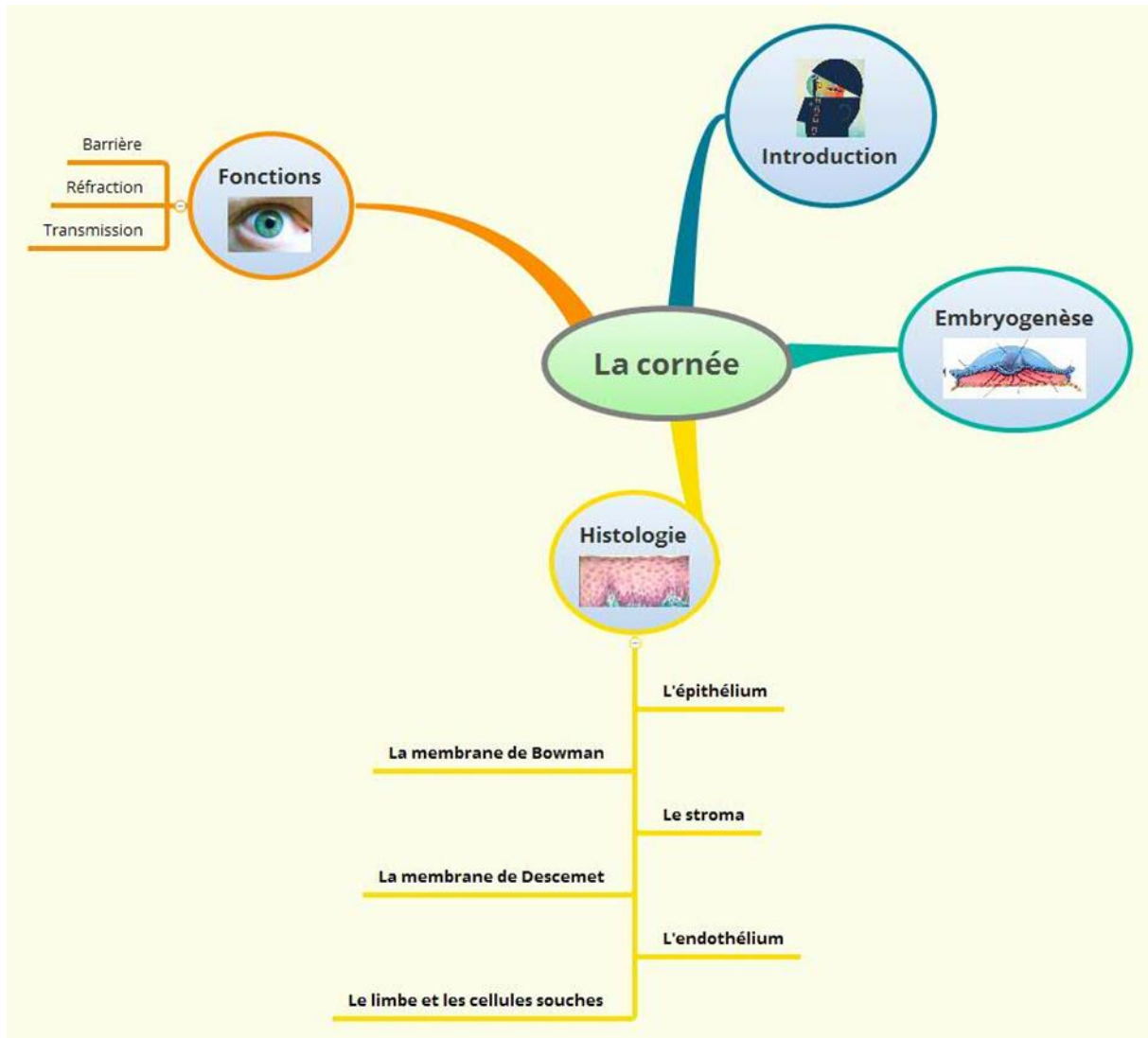
La première partie décrira l'organisation structurelle et fonctionnelle des différentes couches de la cornée et plus précisément celles de l'épithélium cornéen.

La deuxième partie retracera les principales composantes de l'épiderme, ainsi que les fonctions spécifiques dues à l'enveloppe cornée

La troisième partie sera consacrée au programme de différenciation terminale de l'épiderme et l'épithélium cornéen. Une étude comparative entre ces deux tissus sera menée afin de rechercher des similarités et des différences entre ces deux épithéliums pavimenteux pluristratifiés.

La quatrième partie introductive, décrira les principales voies physiopathologiques connus comme étant impliquées dans l'apparition et la progression du kératocône - une ectasie cornéenne d'origine multifactorielle.

Partie 1: La cornée humaine: structure et fonctions

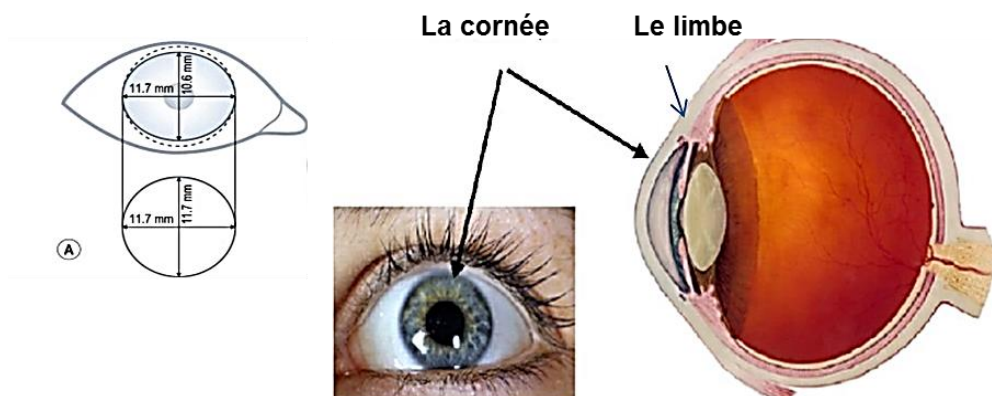


1.1.1 Introduction

Il y a dans le monde près de 285 millions de personnes qui présentent une déficience visuelle : 39 millions d'entre elles sont aveugles et 246 millions présentent une baisse de l'acuité visuelle (Flaxman et al. 2017). Les défauts de réfraction non corrigés constituent la principale cause de déficience visuelle. Les maladies de la surface oculaire et plus précisément de la cornée sont à l'origine de nombreuses consultations ophtalmologiques et peuvent être responsables d'un handicap visuel sévère.

La cornée humaine est une membrane solide et transparente au travers de laquelle la lumière entre à l'intérieur de l'œil. Elle est constamment susceptible de subir des lésions qui peuvent être d'origine traumatique ou non. Quelle que soit leur origine, ces lésions peuvent entraîner des dommages superficiels ou profonds. Bien que les atteintes superficielles cicatrisent sans laisser de séquelles, l'altération de la qualité de la cicatrisation peut entraîner des opacités cornéennes résiduelles. La conséquence d'une telle situation est une réduction de la vision.

La cornée (Figure 1) constitue la face antérieure du globe oculaire. Elle a une forme lisse et convexe, elle est avasculaire et mesure 11-12 mm horizontalement et 9-10 mm verticalement. L'épaisseur de la cornée varie entre 550 µm dans le centre et 700 µm en périphérie. Cette tunique externe représente $\frac{2}{3}$ du pouvoir réfractif de l'œil, en ayant une puissance dioptrique de 43 dioptries. En périphérie se trouve le limbe, un véritable réservoir de cellules à haute capacité proliférative.



La cornée est la membrane transparente, orientée, avasculaire, située dans la partie antérieure de l'œil.

Le limbe représente une zone de transition entre la cornée transparente et la sclérotique. On trouve dans les cryptes du limbe (palissades de Vogt) des cellules souches qui assurent le renouvellement de l'épithélium cornéen. Entre les cellules épithéliales limbiques s'insinuent quelques mélanocytes et cellules de Langerhans, mais pas de cellules à mucus.

D'après <http://kompendium.com.ua/rogoviza.html>

Figure 1. Représentation schématique de la face antérieure du globe oculaire

1.1.2 Embryogénèse

La cornée est un organe épithélio-mésenchymateux et sa constitution fait appel à un assemblage de différents éléments tissulaires constitués à partir de l'ectoderme (pour l'épithélium) et du mésoderme (pour le mésenchyme) (**Figure 2**) (Collomb 2010). Au cours du développement, la cornée se forme après que la vésicule cristallinienne se soit détachée de l'ectoderme par la migration des cellules mésenchymateuses périoculaires, issues des crêtes neurales (Yang 2006).

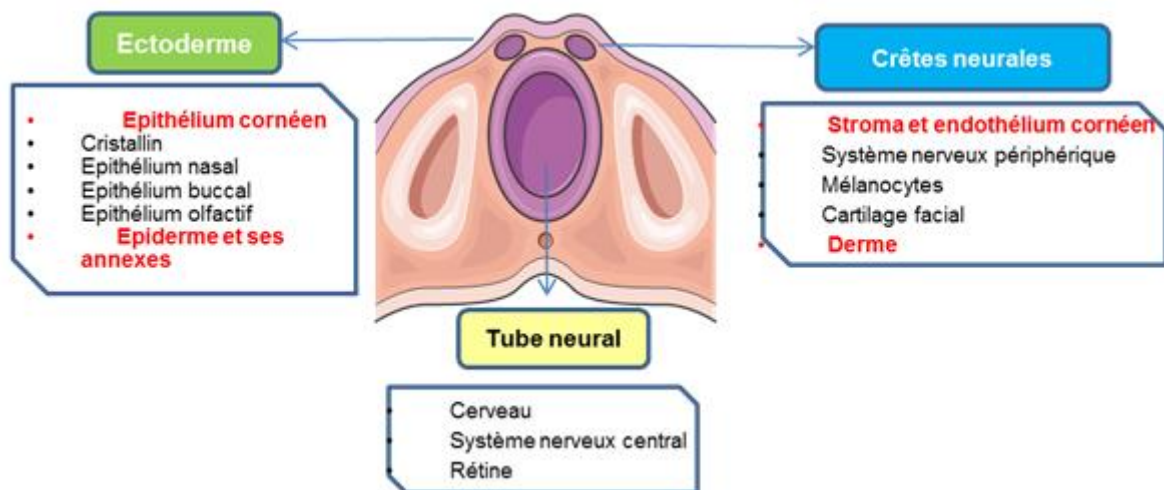


Figure 2. Les dérivés du feuillet ectodermique.

L'ectoderme est composé de trois principales structures: l'ectoderme de surface qui va former l'épiderme et les l'épithélium de surface; le tube neural qui est à l'origine du cerveau et du système nerveux central et la rétine; les crêtes neurales, qui vont former le système nerveux périphérique le derme, le stroma et l'endothélium cornéen. En rouge sont présentés les composants de la peau et de l'œil. Modifié d'après (Collomb 2010)

1.1.3 Histologie

De nombreuses fonctions de la cornée, indispensables pour une bonne vision, lui sont conférées grâce à une organisation complexe et dynamique.

La cornée se divise en six couches distinctes (**Figure 3**): l'épithélium, la membrane de Bowman, le stroma, la couche Dua, la membrane de Descemet et l'endothélium.

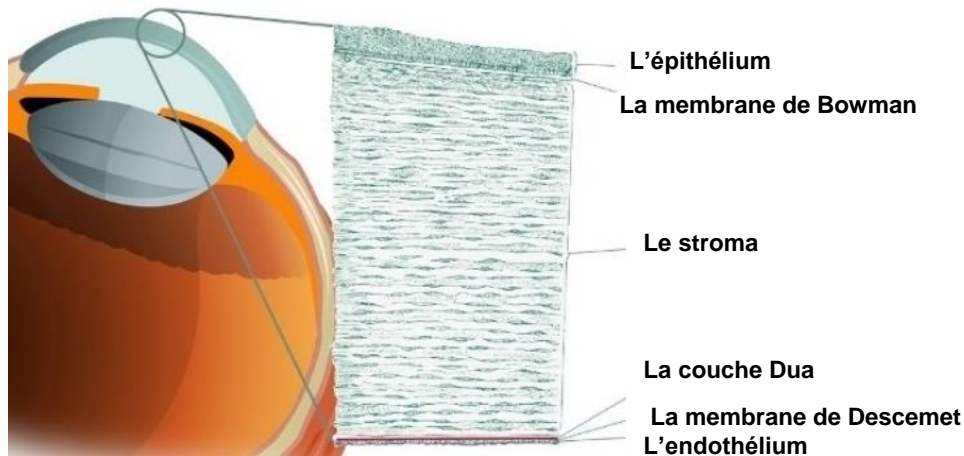


Figure 3. Représentation schématique de la cornée humaine.

D'après <http://samvizhu.ru/stroenie-glaza/struktura-funkcii-rogovicy-glaza.html>

1.1.3.1 L'épithélium cornéen

L'épithélium cornéen, un épithélium stratifié non cornifié, joue un rôle optique fondamental et protège la cornée des agressions extérieures. Il représente 10% de l'épaisseur de la cornée, soit environ 50 μm . C'est une structure tissulaire en continuité avec l'épithélium conjonctival.

L'épithélium cornéen est formé de 5 à 7 couches de cellules au centre et 8-10 en périphérie qui se renouvellent tous les 7 jours environ (Poli 2014). Il existe trois niveaux de différenciation des cellules épithéliales: les cellules basales, intermédiaires (dites ailées) et superficielles qui desquament en surface dans le film lacrymal (Figure 4).

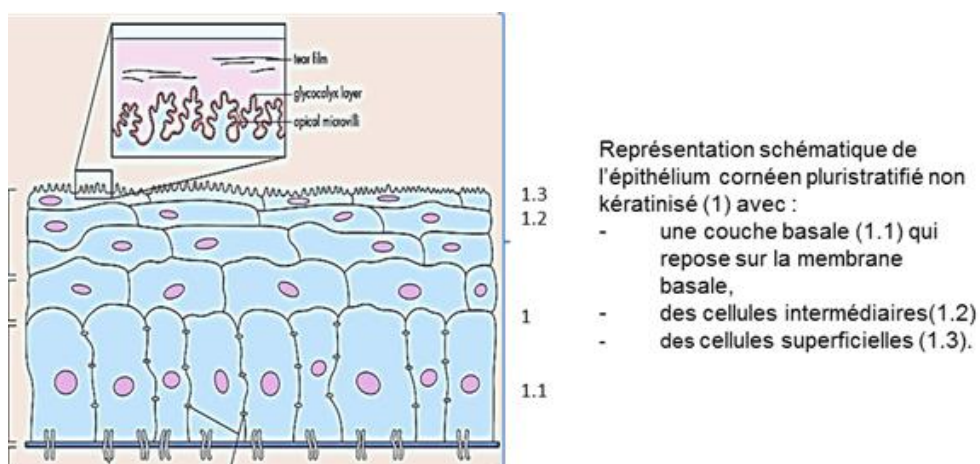


Figure 4. Structure de l'épithélium cornéen

D'après (Yanoff, Duker, and Augsburger 2009)

A la périphérie de l'épithélium cornéen, dans la région limbique, siègent également des cellules non épithéliales représentées par des lymphocytes (essentiellement T), des cellules de Langerhans présentatrices d'antigènes et qui interviennent dans la réponse immunitaire, et des mélanocytes dans la couche basale (*Goldschmit et al. 2011*).

L'épithélium cornéen, en contact direct avec le film lacrymal, joue un rôle de protection et de défense, en agissant en tant que barrière mécanique grâce à des jonctions intercellulaires du type desmosomes et jonctions serrées.

1.1.3.1.1 Les cellules basales

Les cellules basales représentent la couche germinative de l'épithélium. Ce sont les seules cellules épithéliales capables de mitose. Les cellules filles se déplacent en avant vers la surface, en maintenant le contact avec les cellules voisines jusqu'à ce qu'elles se desquament dans le film lacrymal.

Il s'agit d'une couche monocellulaire de cellules cylindriques qui mesurent 18 µm de haut et 10 µm de diamètre reposant sur une lame basale (*Poli 2014*). Leur noyau est ovale et il est orienté dans le grand axe, c'est à dire perpendiculairement à la lame basale. En microscopie électronique à balayage, les cellules basales présentent un cytoplasme riche en granules de glycogène, qui constituent une source d'énergie métabolique stockée à utiliser en période de stress épithélial, comme l'hypoxie et la cicatrisation. Les filaments d'actine sont visibles le long du côté cytoplasmique de la membrane et peuvent être importants pour la migration cellulaire lors de la cicatrisation, au cours de laquelle les cellules basales peuvent devenir mobiles (*Klyce 1972*). On trouve aussi des microtubules et surtout des filaments de kératines qui les connectent entre eux par l'intermédiaire des desmosomes et avec la lame basale par les héli-desmosomes. A ce niveau, les cellules expriment la paire de kératines 5 et 14 (*Pitz and Moll 2002*).

Au niveau des faces apicales et latérales des cellules, on retrouve des jonctions du type gap et des desmosomes, les deux étant impliqués dans la cohésion. Chaque épithéliocyte est ancrée à la lame basale via les héli-desmosomes qui assurent l'adhérence forte de l'épithélium cornéen à la lame basale sous-jacente (*Poli 2014*).

La lame basale est synthétisée par les cellules épithéliales et sépare la membrane de Bowmann de l'épithélium cornéen. Elle a une structure assez complexe (**Figure 5**) et on y retrouve du collagène IV et VII, des laminines, de la fibronectine et des protéoglycanes dont certains contenant du sulfate d'héparane (*Torricelli et al. 2013*). Les collagènes sont des protéines fibrillaires extracellulaires qui ont une structure hélicoïdale à trois brins. Trois chaînes polypeptidiques appelées chaîne α sont enroulées les unes autour des autres pour former une molécule de collagène. L'association des différentes formes de chaîne α va permettre d'identifier les types de collagène. La famille des collagènes comporte 19 formes

différentes de molécules chez les vertébrés. L'épaisseur de la lame basale, de 80 Å environ, peut augmenter avec l'âge et dans certaines circonstances pathologiques (diabète ou dystrophie de Cogan).

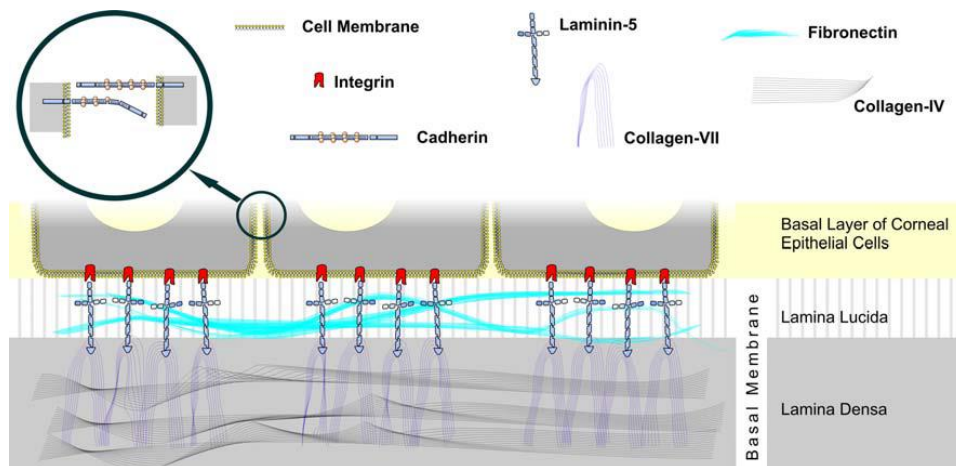


Figure 5. Représentation schématique des interactions de la couche basale de l'épithélium cornéen avec la membrane basale

Les cellules de la couche basale de l'épithélium cornéen sont fixées aux collagènes (IV et VII) de la lamina densa de la membrane basale par un système de protéines d'ancrage (laminines, intégrines, fibronectines) qui envahissent la lamina lucida. D'après (Avetisov, S.V. Trufanov, 2016)

L'étude en microscopie électronique permet de détecter deux parties:

- la lamina lucida qui est au contact direct avec les cellules épithéliales et apparaît claire au microscope.
- la lamina densa, vers le côté stromal, qui apparaît sombre au microscope et assure
 - 1) la migration cellulaire lors de la morphogenèse;
 - 2) le maintien de l'architecture des tissus;
 - 3) la semi-perméabilité membranaire ainsi que le support pour l'adhésion cellulaire.

En dehors de son rôle de support mécanique, la lame basale influence le comportement cellulaire en modulant les concentrations locales des facteurs de croissance et de cytokines (Hynes 2009).

1.1.3.1.2 Les cellules intermédiaires

Ce sont des cellules de transition entre les cellules basales et les cellules superficielles. Elles forment 2 à 3 assises cellulaires dans la partie centrale de l'épithélium cornéen et 5 à 6 en périphérie. En microscopie optique, ces cellules ont une structure polygonale, avec une face antérieure convexe et une face postérieure concave. Le noyau est allongé cette fois-ci dans l'axe de la cellule. Le cytoplasme est riche en microtubules et filaments de kératines. L'appareil de Golgi est bien développé. Les cellules intermédiaires sont interconnectées par des jonctions desmosomales du type gap.

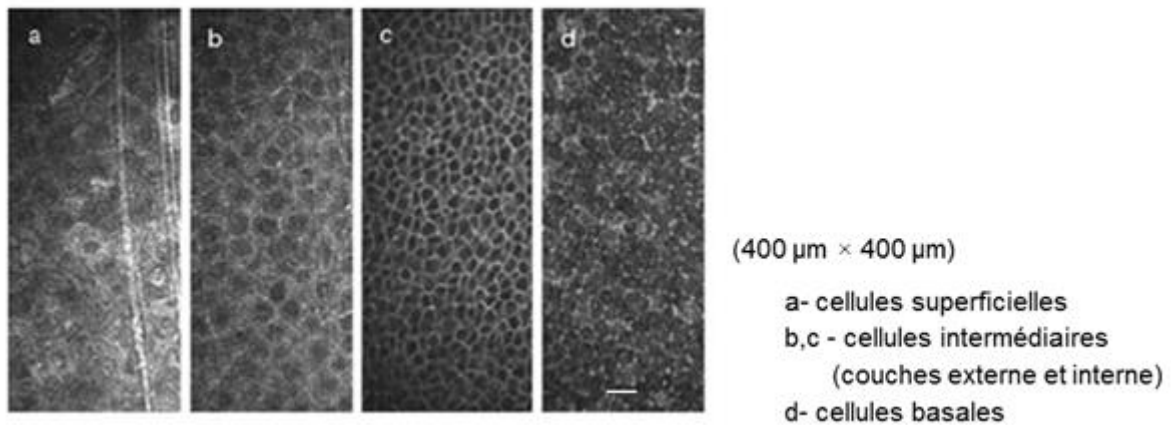


Figure 6. Image en microscopie confocale in vivo de l'épithélium cornéen normal

D'après (Petroll and Robertson 2015)

1.1.3.1.3 Les cellules superficielles

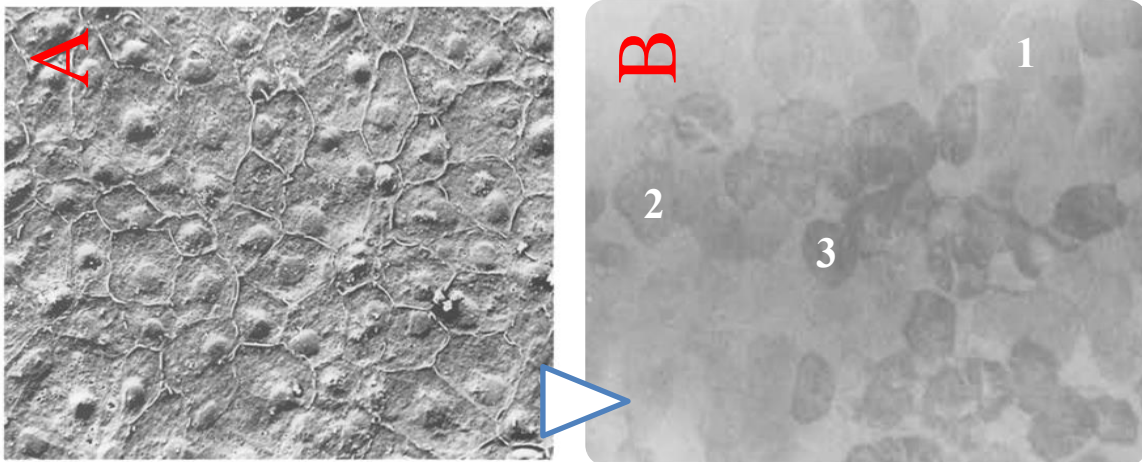
Les cellules superficielles épithéliales (**Figure 6**) sont réparties en 2 ou 3 couches de cellules squameuses très différenciées. Ces cellules présentent des caractéristiques structurales bien particulières. En microscopie optique, elles sont allongées et aplaties, ayant une forme polygonale avec une longueur de 40 à 60 μm . Leur noyau ne persiste que sous forme de mottes chromatiniennes condensées et les mitochondries sont rares.

Une particularité importante des cellules superficielles est que leur membrane cytoplasmique apicale est redressée de microvillosités et de microplis de 0.5-1 μm d'épaisseur, ce qui augmente considérablement la surface d'échange avec le film lacrymal et assurent aussi son ancrage (*Poli 2014*). Une propriété essentielle de la couche cellulaire superficielle est le complexe des jonctions formé avec les cellules latéralement adjacentes. Ce complexe est constitué des jonctions serrées qui entourent complètement la cellule et qui empêchent ainsi le mouvement des substances du film lacrymal dans les espaces intercellulaires de l'épithélium.

Le complexe des jonctions serrées apical en combinaison avec la très faible perméabilité de la membrane externe de la cellule squameuse superficielle est la représentation anatomique de la propriété de barrière de l'épithélium cornéen. Les terminaisons nerveuses sensorielles dans l'épithélium aident à préserver l'intégrité de cette importante structure de barrière de surface en provoquant une réponse douloureuse importante aux blessures. Un test clinique visant à déterminer si cette barrière est intacte utilise des colorants, tels que la fluorescéine, qui est instillés dans le sac conjonctival. La surface épithéliale normale se tache peu ou pas du tout. Plusieurs facteurs, tels que la perte rapide ou anormale de cellules épithéliales ou l'incapacité à former des jonctions serrées, entraînent une coloration de la surface de l'épithélium cornéen.

Grâce à la microscopie électronique à balayage, on peut distinguer 3 types de cellules superficielles en fonction de leur luminosité et de leur densité en microvillosités et en microplis (**Figure 7**):

- les cellules claires, riches en microvillosités et microplis, de petites tailles, représentant 30 % des cellules superficielles ;
- les cellules intermédiaires, les plus nombreuses ($\pm 40\%$) ;
- les cellules sombres, de grande taille, dont les villosités et les plis sont limités à la partie centrale.



B. Cellules claires (1), Intermédiaires (2) et sombres (3)

Figure 7. Microscopie électronique à balayage de la face apicale des cellules épithéliales cornéennes

Image en microscopie électronique à balayage des cellules de la surface de l'épithélium cornéen (A) humain illustrant à la fois les noyaux situés au centre et les bordures des cellules latérales proéminentes. Les bordures latérales entre les cellules adjacentes forment une barrière étroite à travers la surface de la cornée
Grossissement : $\times 500$.
D'après (Beuerman et al. 1994)

La variation dans le nombre et la taille des microplis correspondrait à une différence de maturation cellulaire. Les cellules claires seraient les plus jeunes, les cellules intermédiaires seraient des cellules matures, et les cellules sombres, des cellules hyper-matures en voie de desquamation vers le film lacrymal. Les cellules superficielles, hautement différenciées, expriment les marqueurs tardifs de différenciation cornéenne. Le couple de kératines K3/K12 est reconnu comme caractéristique de ce tissu (*Chaloin-Dufau et al. 1993*).

Le film lacrymal est l'interface entre l'œil et le monde extérieur. Il est composé d'eau, d'enzymes, d'immunoglobulines, de lipides, de différents métabolites et de cellules exfoliées multinucléées. Le film lacrymal s'organise en trois phases (**Figure 8**) : lipidique, aqueuse et mucineuse.

- la *phase lipidique* est une couche superficielle de 0,1 μm d'épaisseur, directement au contact de l'air, qui permet de retarder l'évaporation du film lacrymal. Elle est sécrétée par les glandes de Zeiss et de Meibomius présentes au niveau de la marge palpébrale (Lozato, Pisella, and Baudouin 2001).
- la *phase aqueuse* est une couche intermédiaire de 7 μm , sécrétée par les glandes lacrymales avec un débit d'environ 1,2 $\mu\text{L}/\text{min}$;
- la *phase mucineuse* est une couche profonde, sécrétée par les cellules caliciformes de l'épithélium conjonctival. Ce mucus est en relation avec les cellules apicales épithéliales par l'intermédiaire du glycocalyx.

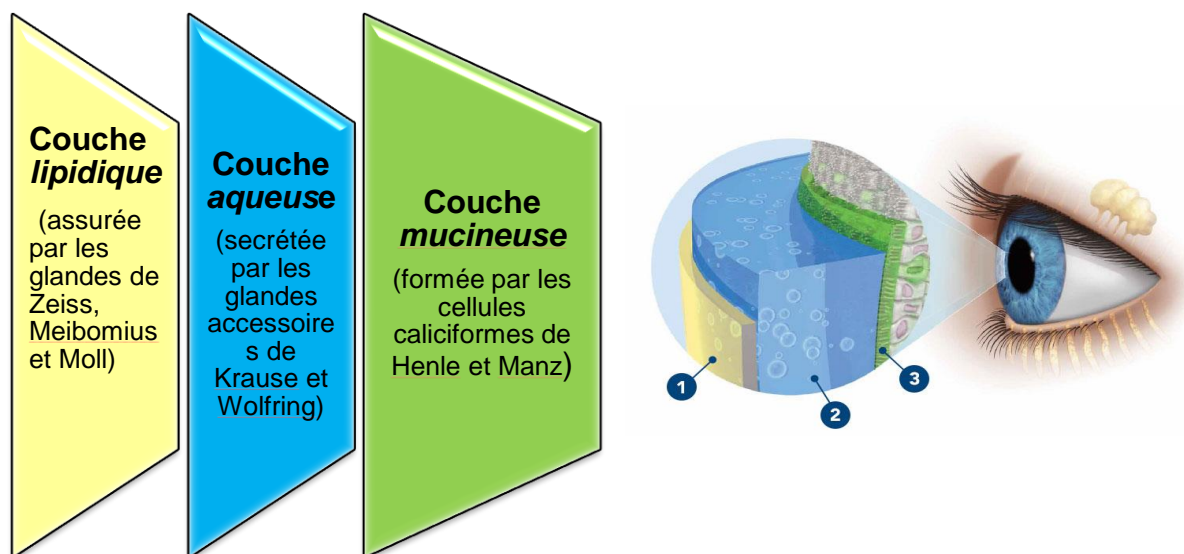


Figure 8. Structure du film lacrymal

D'après <http://www.systeme.ca/fr/secheresse-oculaire/en-quoi-consistent-les-larmes/>

1.1.3.2 La couche de Bowman

L'épithélium cornéen et la lame basale reposent sur une membrane acellulaire, la couche de Bowman. Elle est constituée de plusieurs fibrilles de collagène de type V, VI et VII ainsi que du collagène IV, principal constituant des lames basales (Fitch et al. 1998). Les seules parties cellulaires présentes à son niveau sont représentées par de fines expansions des cellules de Schwann entourant les terminaisons nerveuses. Une particularité importante est que cette membrane n'est pas régénérée après une blessure (Collomb 2010).

1.1.3.3 Le stroma

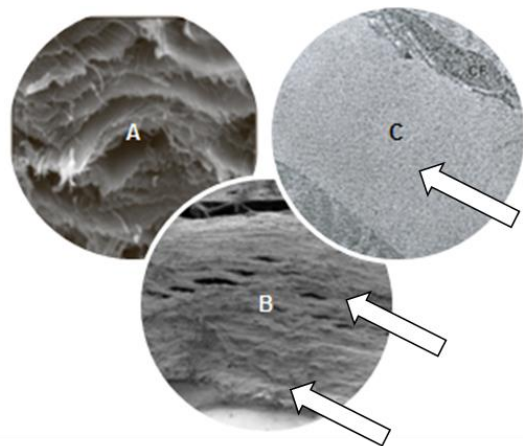
Le stroma cornéen représente environ 90% de l'épaisseur de la cornée. Il est constitué de kératocytes à l'origine d'un tissu conjonctif dense très particulier dont l'organisation des

fibrilles de collagène a pour but d'assurer la transparence de la cornée et sa résistance mécanique.

Les kératocytes issus de la migration des cellules des crêtes neurales présents dans le stroma, sont éparpillés entre les lamelles de collagène (*Hay 1980*). Malgré la faible densité cellulaire des kératocytes dans le stroma (2-3% du volume stromal), ils forment un réseau complexe connecté par des extensions cytoplasmiques (*T. Nishida et al. 1988*). Les kératocytes sont des cellules d'origine mésenchymateuse. Ce sont des cellules plates, avec un noyau volumineux, à bords réguliers, avec un réticulum endoplasmique granuleux mal développé et peu de mitochondries. Cette pauvreté en organites est caractéristique des cellules à faible activité métabolique. En microscopie optique on voit de multiples expansions cytoplasmiques qui forment un réseau tridimensionnel, entrant en contact avec les expansions des kératocytes adjacents grâce à des jonctions du type gap. Ils sont normalement quiescents et synthétisent le collagène à un taux très lent. Dans les conditions physiologiques, leur rôle essentiel est d'assurer l'intégrité de la matrice extracellulaire.

En cas de blessure du stroma, les kératocytes quiescents sont activés et synthétisent alors une nouvelle matrice extracellulaire, mais de composition différente et non organisée. Afin de permettre une contractilité de la plaie, les keratocytes peuvent, à leur tour, se différencier en myofibroblastes. Cependant, cette transformation est irréversible. Tous ces facteurs contribuent à la formation de cicatrices opaques, fréquentes dans des cas de blessures du stroma (*Fini 1999*).

La matrice extracellulaire est composée essentiellement de collagène et des protéoglycanes. Les collagènes du stroma sont principalement le collagène de type I (50 à 90%) et, dans une moindre mesure, de type III, V et VI (*Fitch et al. 1998*)(*Marshall, Konstas, and Lee 2004*). Le collagène de type III est majoritairement exprimé lors du processus de cicatrisation ou au cours de l'inflammation. Selon une étude (*Zimmermann et al. 1988*), une des caractéristiques les plus importantes des collagènes cornéens, est la proportion très élevée de collagène de type VI. Les molécules de collagène vont s'assembler en fibrilles, puis en fibres et finalement en lamelles (**Figure 9 A, B**) qui vont s'étendre tout le long de la cornée, de limbe à limbe (*Marshall, Konstas, and Lee 2004*). Les fibres de collagène sont alignées en lamelles au sein desquelles les microfibrilles de collagène sont toutes parallèles entre elles et chaque lamelle est empilée sur la suivante de façon perpendiculaire (**Figure 9C**).



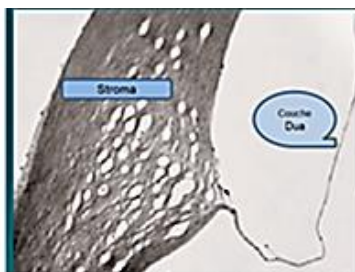
A- Image en coupe transversale de la cornée (grossissement 420X)
 B- Stroma cornéen humain. Grossissement 1000X. La régularité du diamètre et de l'espacement des fibrilles de collagène assurent la transparence de la cornée
 C- Les lamelles de collagène (flèches) et un fibroblaste (CF).
 A noter que les fibrilles de collagène dans les lamelles adjacentes sont orientées perpendiculairement l'une par rapport à l'autre, ce qui assure la transparence de la cornée. D'après (Малюгин Б.Э., Борзенко С.А., Мороз З.И., Шацких А.В. 2014)(DW. 1994)

Figure 9. Images en microscopie électronique à balayage du stroma cornéen.

En général, la cornée humaine comporte 200-250 lamelles qui sont disposées à angle droit au niveau du stroma postérieur et à angle aigu dans le stroma antérieur. Cet arrangement régulier et uniformément espacé des lamelles de collagène, maintenues par des protéoglycanes, permet une bonne transparence de la cornée, ainsi qu'une résistance mécanique à la pression intraoculaire (Collomb 2010). La transparence de la cornée est aussi assurée par le diamètre constant des fibrilles de collagène (22,5-35 nm) et par leur espacement constant (41,5 nm).

1.1.3.4 La couche Dua

Les travaux récents de H. Dua évoquent l'existence d'une nouvelle couche de la cornée: la couche Dua. Cette nouvelle couche a pu être mise en évidence lors de l'introduction d'air entre le stroma et la membrane de Descemet (Figure 10). C'est une tunique acellulaire, en dessus de la membrane de Descemet, d'une épaisseur de 10-15 µm, composée de 5 à 8 lamelles de collagène de type I disposées d'une manière transversale, longitudinale et oblique.



(Source :<http://www.opthalmologytimes.com/modern-medicine-feature-articles/new-layer-human-cornea-discovered>)

Figure 10. La couche Dua de la cornée humaine

Après l'introduction d'air entre le stroma et la membrane de Descemet, il y a une séparation d'une tunique acellulaire- la couche Dua.

1.1.3.5 La membrane de Descemet

Il s'agit d'une couche acellulaire synthétisée par les cellules endothéliales et qui assure la fonction de membrane basale pour ces dernières. Elle mesure 3 μm à la naissance et peut atteindre 8 à 12 μm à l'âge adulte, en ayant une composition plus fibreuse et provoquant des anomalies visuelles (*Kurpakus-Wheater, Kernacki, and Hazlett 2001*).

La membrane de Descemet est composée des fibrilles de collagène du type IV (**Figure 11**), de fibronectine, de laminine de type 1 et de protéoglycanes à héparane, dermatane et kératane sulfates (*Muriel Poli, 2014*).

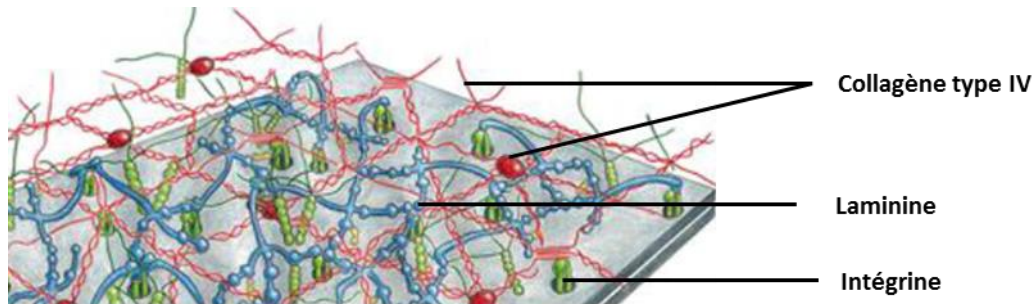


Figure 11. Représentation schématique de la membrane de Descemet et ses composants

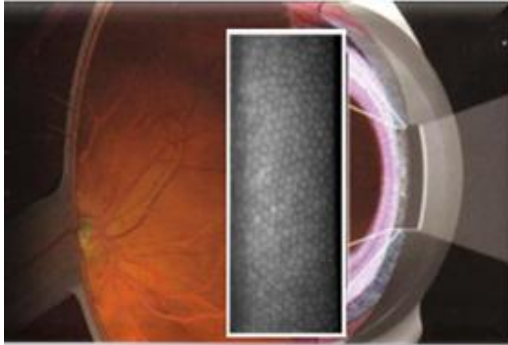
D'après *Yanoff, Duker, and Augsburger 2009*

1.1.3.6 L'endothélium

L'endothélium cornéen (**Figure 12**) représente la couche la plus profonde de la cornée. C'est un épithélium pavimenteux simple, très fin et qui se trouve en contact direct avec l'humeur aqueuse (*Imanishi et al. 2000*)(*Kurpakus-Wheater, Kernacki, and Hazlett 2001*). Les cellules ont une forme hexagonale, régulière et expriment la paire des kératines 8 et 18. Cette régularité change au niveau de la périphérie et de la membrane de Descemet, où on observe des interdigitations fines afin de permettre une meilleure cohésion intercellulaire. Une grande partie de la cellule est occupée par le noyau. Le cytoplasme est clair, dans sa partie apicale on retrouve de nombreuses vacuoles et de fins granules, ce qui montre une importante activité métabolique. La membrane plasmique comporte une face basale en contact direct avec la membrane de Descemet, une face apicale en rapport avec l'humeur aqueuse qui contient de courtes microvillosités et une face latérale où siègent les mécanismes jonctionnels intercellulaires (jonctions serrées et de type gap).

L'endothélium cornéen joue un rôle primordial dans l'hydratation, la transparence et l'épaisseur de la cornée. En effet, en cas d'absence totale de l'endothélium ou d'une faible densité cellulaire, l'eau de l'humeur aqueuse va s'infiltrer dans le stroma et provoquer un œdème (*Joyce 2005*). Le maintien du taux d'hydratation cornéen s'effectue grâce à des pompes actives Na/K/ATPase. Une fois l'organogenèse de l'œil accomplie, l'endothélium ne change plus durant toute la vie de l'individu. Ses cellules ne sont donc pas renouvelables,

mais elles sont capables de changer de forme et de migrer vers des zones de rupture tissulaire (Collomb 2010). Leur densité diminue avec l'âge (4000 cellules/mm² à la naissance contre 2500 à 80 ans).



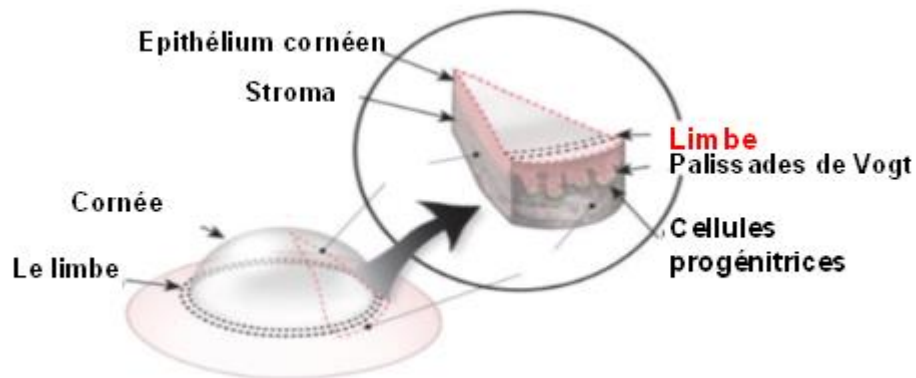
À partir de ces images spéculaires, on peut examiner les cellules endothéliales et calculer plusieurs variables morphologiques: la densité cellulaire moyenne, la surface cellulaire moyenne, le coefficient de variation de la surface cellulaire et le pourcentage de cellules hexagonales). Modifié d'après (Dziasko and Daniels 2016)

Figure 12. Endothélium cornéen vu en microscopie spéculaire

1.1.4 Le limbe et les cellules souches

1.1.4.1 Le limbe

Le limbe (Figure 13.1) est la zone de transition entre la cornée et la sclère. C'est une région semi transparente très vascularisée. La jonction scléro-cornéenne a une forme de niche, elle comporte des cryptes où se situent les cellules progénitrices.



(1)

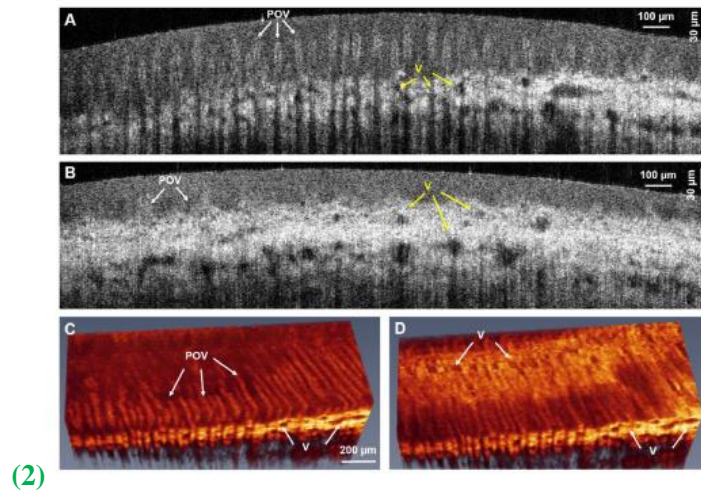


Figure 13. Représentation schématique du limbe cornéen (1) D'après (G. Gonzalez et al. 2018) et des Palissades de Vogt (2).

Images en OCT in vivo (tomographie en cohérence optique) en coupe transversale du limbe inférieur dans une direction tangentielle avec l'objectif du microscope 5x, plus près de l'extrémité cornéenne du limbe (A) et plus près de l'extrémité sclérale du limbe (B). Les Palissades de Vogt (PDV) apparaissent comme des structures très réfléchissantes, étroites et en forme de boucle (A). Le sang et les vaisseaux lymphatiques (V) apparaissent comme des ombres sombres sur le fond de la matrice de collagène. Entre 20 et 50 µm sous la base du POV. Images volumétriques du limbe inférieur (C, D). D'après (Bizheva et al. 2017)

L'épithélium limbique dérive de l'ectoderme embryonnaire, tandis que le stroma limbique se différencie à partir du mésenchyme issu des crêtes neurales.

C'est la jonction entre l'épithélium cornéen, pavimenteux et pluristratifié, et l'épithélium conjonctival, pluristratifié et cylindrique. Cette région est représentée par une série d'élévations radiaires appelées palissades de Vogt (Goldberg and Bron 1982), plus nombreuses dans l'extrémité cornéenne que sclérale (Figure 13.2). Dans la couche basale de l'épithélium limbique on retrouve de nombreuses cellules souches (CS) responsables du renouvellement des épithéliums cornéen et conjonctival. Entre les cellules progénitrices on peut également trouver quelques mélanocytes et cellules de Langerhans. Les marqueurs des cellules basales du limbe sont ABCG2 (ATP-binding cassette super-family G member 2) (Schlötzer-Schrehardt and Kruse 2005), KRT19 et l'intégrine alpha 9.

Sur le plan fonctionnel, le limbe est une région cruciale (Figure 14):

- il constitue le siège principal des CS qui assurent le renouvellement de l'épithélium cornéen,
- il représente une barrière anatomique et fonctionnelle contre l'envahissement conjonctival de la cornée,
- il est l'endroit des réactions immunitaires de la cornée (cellules Langerhans),
- il est le lieu des principales voies de l'excrétion de l'humeur aqueuse (Poli 2014).

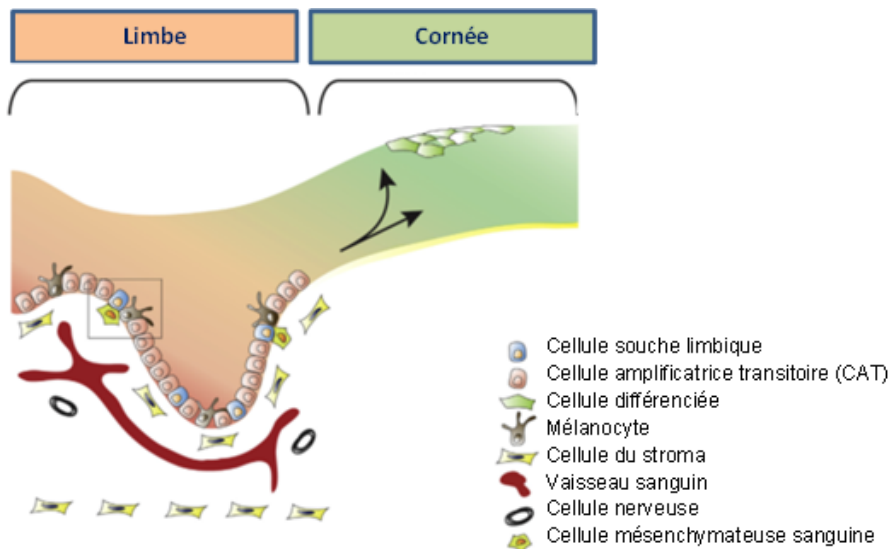


Figure 14. Représentation schématique du limbe et des cellules qui siègent dans les cryptes.

Source (Dziasko and Daniels 2016)

1.1.4.2 Les cellules souches

L'épithélium cornéen forme une barrière protectrice contre les facteurs environnementaux (stress mécanique, rayons UV et pathogènes). Afin d'assurer ce rôle, il faut préserver l'homéostasie épithéliale : il est indispensable que l'auto-renouvellement de la couche basale compense la desquamation des épithélioctes à la surface de la cornée.

Les CS présentent deux caractéristiques fondamentales: leur capacité à s'auto renouveler et leur pouvoir à se différencier en d'autres types cellulaires (*Pastushenko et al. 2015*). En général, les CS sont situées dans des endroits bien particuliers, appelés "niches" (**Figure 14**), ce qui leur permet de garder ce caractère "souche" (*Barrandon and Green 1987*). Ces régions sont situées dans des zones protégées des agressions externes. De plus, dans leur voisinage, on trouve aussi des facteurs solubles et des cellules de soutien au niveau de la lame basale. L'ensemble de ces facteurs favorise le maintien du phénotype de CS et aussi son passage à l'étape de différenciation.

Les CS limbiques fournissent également une source de renouvellement constant pour l'épithélium cornéen, car elles se divisent et migrent continuellement de manière centripète vers le centre de la cornée selon un modèle de tourbillon. Les CS qui arrivent au centre de la cornée sont des cellules transitoires issues des progéniteurs du limbe. Ce processus de renouvellement constant est apparemment nécessaire pour l'homéostasie de l'épithélium, car le déficit en CS limbiques peut entraîner une réépithélialisation anormale par l'épithélium conjonctival voisin, une vascularisation et des anomalies épithéliales récurrentes. La

question de savoir si ces cellules limbiques sont de véritables CS ou des "progéniteurs engagés" fait l'objet de débats; néanmoins, leur contribution à l'épithélium est essentielle.

1.1.4.2.1 Le renouvellement de l'épithélium cornéen

L'épithélium cornéen est constamment renouvelé grâce à un système très complexe de contrôle de la migration et différenciation des CS. La compréhension des mécanismes assurant ce processus reste un sujet de débat et à l'heure actuelle il existe plusieurs hypothèses qui pourraient expliquer cette dynamique.

Selon la théorie de Shapiro, suggérée en 1981, l'épithélium cornéen provient de l'épithélium conjonctival. Cette idée a été fondée sur ses travaux chez le lapin au cours desquels il a observé un remplacement total de l'épithélium cornéen par celui de la conjonctive suite à une abrasion totale de la cornée (*Shapiro, Friend, and Thoft 1981*).

Des études qui en suivent (*Thoft and Friend 1983*) sont en accord avec ce modèle et suggèrent qu'il existe un flux constant de cellules épithéliales issues de la conjonctive qui migrent d'une manière centripète vers la cornée. Une fois que ces cellules arrivent au niveau de la membrane de Bowman, elles subissent un processus de trans-différenciation en cellules épithéliales cornéennes suite à l'influence du microenvironnement. Plus tard, cette théorie a été largement contestée (*Kruse et al. 1990*) en montrant sur des cornées de lapin traitées par différents agents chimiques (n-heptanol), qu'il existe effectivement un remplacement de l'épithélium cornéen par la conjonctive suite à une ablation complète des cellules limbiques, mais que cette épithélialisation est pathologique et s'accompagne toujours d'une vascularisation et de la perte de la transparence de la cornée (*Dua and Forrester 1990*).

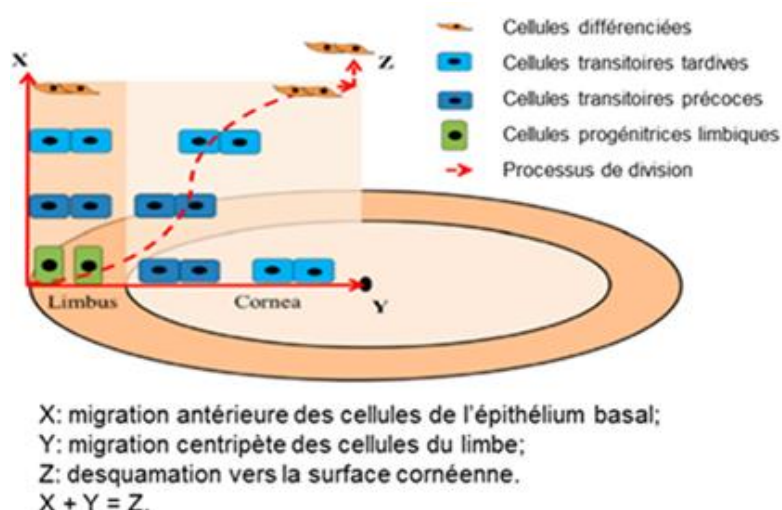


Figure 15. Modèle simplifié de l'hypothèse X/Y/Z du renouvellement cornéen proposé par Thoft D'après (Guo et al. 2018)

La principale théorie retenue jusqu'à présent (**Figure 15**) est celle des CS limbiques, situées dans la couche basale du limbe, qui vont migrer d'une manière centripète vers le centre de la cornée en passant par la phase de cellules d'amplification transitoire, afin de subir un processus de différenciation terminale au niveau des couches superficielles de l'épithélium cornéen. Le renouvellement de l'épithélium cornéen peut donc être considéré comme un processus initié à partir de CS indifférenciées situées dans les couches basales du limbe. Ces cellules, en se divisant, donneront naissance à des cellules amplificatrices transitoires qui migreront vers le centre de la cornée pour y constituer une assise basale à activité mitotique intense. Ces cellules acquièrent rapidement les caractéristiques phénotypiques des cellules épithéliales cornéennes. Ces dernières migrent alors de façon verticale, avec une activité mitotique décroissante, puis se transforment en surface en cellules hyper différenciées ne se multipliant plus et disparaissent en desquamant dans le film lacrymal (*Castro-Muñozledo 2013*)(*Pellegrini et al. 2009*). Les cellules basales du limbe montrent, en culture *in vitro*, une prolifération caractéristique des CS avec leur potentiel élevé de prolifération (*Ebato, Friend, and Thoft 1987*). La prolifération et la migration des cellules épithéliales de la cornée se feraient selon un mouvement centripète. Initialement observé grâce à la migration de pigments à travers la cornée (*Davanger and Evensen 1971*), le mouvement centripète des cellules épithéliales a également été confirmé par des études retraçant la migration des cellules à l'aide de particules d'encre (*Buck 1985*)(*Schwab, Reyes, and Isseroff 2000*).

Il existe une théorie plus récente développée par Majo et al. (*Majo et al. 2008*) qui évoque des CS épithéliales dans les couches basales de la cornée centrale qui seraient activées lors du processus de cicatrisation.

Il est possible que les contradictions entre ces différentes études proviennent du matériel utilisé (cornée entière du lapin ou épithélium de souris) et aussi des méthodes choisies qui diffèrent d'un travail à l'autre. Ainsi, les mécanismes de renouvellement de l'épithélium cornéen sont très complexes et ne sont pas encore totalement élucidés.

1.1.4.2.2 La régulation du renouvellement de l'épithélium cornéen

Le processus du renouvellement de l'épithélium cornéen est très complexe et implique de nombreux facteurs de transcription. Ainsi, la combinaison de ces différents facteurs semble déterminer, de manière coordonné, la spécificité d'expression des différents gènes lors de la différenciation. Seuls quelques exemples de ces facteurs seront donnés ici.

Les CS vont communiquer dans leur niche par de nombreuses façons : soit par contact cellule à cellule, soit par contact cellule-matrice, soit en impliquant des mécanismes paracrines. Différentes études ont montré que des signaux tels que la voie Shh (Sonic

Hedgehog), la voie Wnt (wingless-related)/ β -caténine , Notch et la voie TGF- β (transforming growth factor beta) / BMP (Bone morphogenetic proteins) jouent un rôle important dans le contrôle de l'homéostasie des CS limbiques (L. Li and Xie 2005).

L'inactivation conditionnelle de Notch 1 chez la souris adulte induit une hyperplasie et une kératinisation de l'épithélium cornéen avec activation de la voie de β -caténine, tout en imitant la différenciation épidermique (Nicolas et al. 2003).

1.1.5 Innervation cornéenne

La cornée est le tissu le plus innervé du corps. A titre de comparaison, la cornée présente une densité sensorielle 300 à 600 fois supérieure à celle de l'innervation de la peau. Le segment antérieur de l'œil reçoit son innervation de trois ganglions (Figure 17) : le ganglion trigéminé, le ganglion cervical supérieur et le ganglion ciliaire. La cornée quant à elle dépend principalement de la branche ophtalmique afférente du ganglion trigéminé par l'intermédiaire des nerfs ciliaires longs pour son innervation sensitive et du ganglion cervical supérieur pour son innervation sympathique.

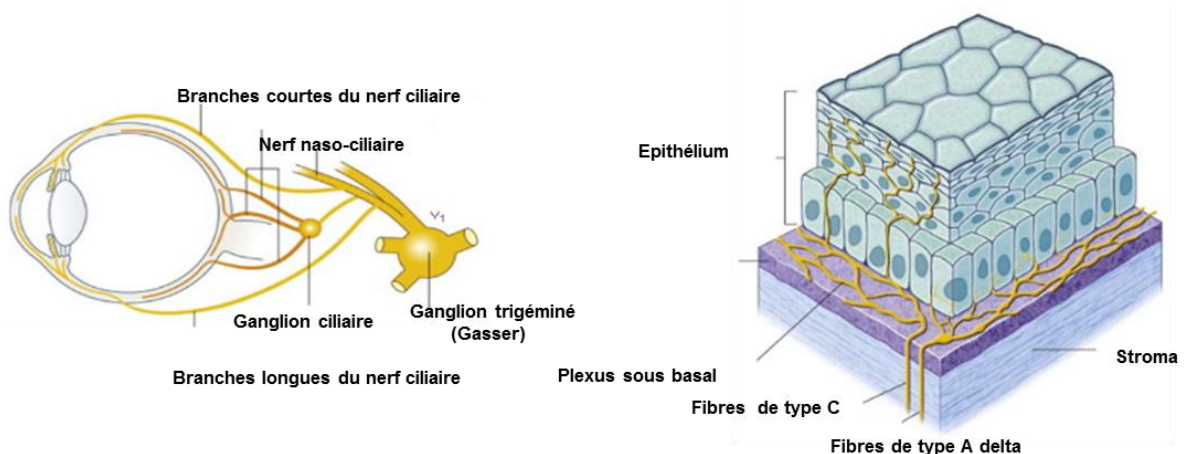


Figure 16. Schéma de l'innervation cornéenne (à gauche) et représentation tridimensionnelle de l'innervation de la cornée humaine (à droite).

D'après (Kaufman, P. L., Levin, L. A., Adler, F. H., & Alm 2011).

1.1.6 Fonctions de la cornée

Grâce à sa structure unique, la cornée possède 3 fonctions principales (Figure 17) : protection du segment antérieur de l'œil, réfraction et transmission de la lumière.

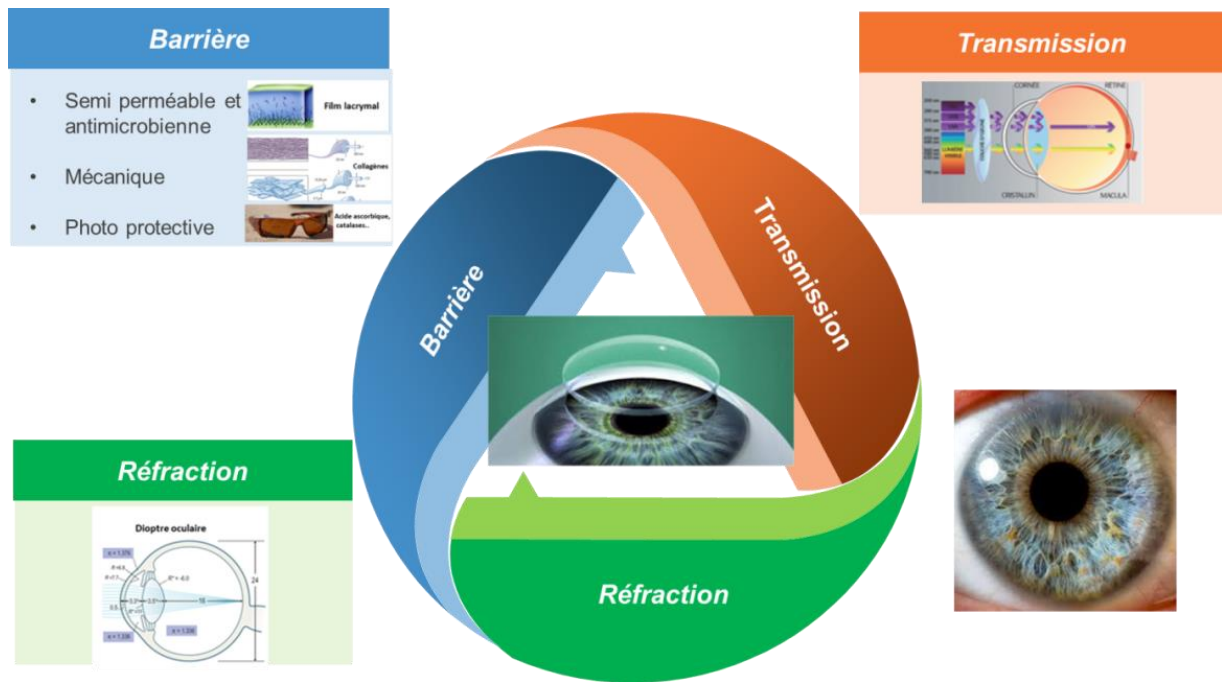


Figure 17. Fonctions de la cornée.

Pour détails voir le texte ci-dessous

1.1.6.1 La protection du segment antérieur de l'œil

1.1.6.1.1. Barrière semi perméable et antimicrobienne

La cornée intervient dans le maintien de la forme du globe oculaire et de la pression intraoculaire.

Elle empêche la pénétration dans l'œil d'éléments extérieurs pathogènes et toxiques. Cette fonction est assurée aussi par le film lacrymal (la couche aqueuse hydrate la cornée, prévient de la kératinisation et donc de l'opacification; la couche muqueuse participe à l'élimination des corps étrangers et des microorganismes grâce à ses propriétés antibactérienne et antifongique (MUC7); la couche lipidique superficielle limite l'évaporation des larmes) (Baudouin and Labbé 2018).

1.1.6.1.2 Barrière mécanique

La résistance de la cornée au stress mécanique est assurée par les fibres de collagène, les kératines et le système jonctionnel complexe (jonctions serrées, desmosomes et hémidesmosomes).

1.1.6.1.3 Barrière photoprotectrice et antioxydante

Étant toujours en contact direct avec l'air, la cornée assure une barrière antioxydante importante contre les rayons UV. Cette fonction est assurée grâce aux molécules

détoxifiantes présentes dans la cornée comme l'acide ascorbique, les superoxydes dismutases, la catalase, etc.

1.1.6.2 La réfraction

La cornée est l'élément réfractif le plus important de tout le système oculaire humain, car elle représente les deux tiers du pouvoir réfractif de l'œil en l'absence d'accommodation. L'indice de réfraction du stroma est de 1,376 (collagène=1,55, substance fondamentale=1,34). L'interface principale de réfraction se situe entre l'air et le film lacrymal précornéen. Avec un pouvoir de réfraction de 48 dioptries au niveau de sa face antérieure et de -5 dioptries au niveau de sa face postérieure, la cornée représente un dioptré de 43 dioptries. La cornée est un exemple de lentille sphéro-cylindrique, classiquement divisée en deux zones :

- une zone centrale d'environ 4 mm de diamètre, légèrement décalée en bas et en dedans, réalisant une calotte sphérique régulière de rayon de courbure constant;
- une zone périphérique s'étendant jusqu'au limbe montrant un aplatissement progressif. Son rayon de courbure moyen central est de 7.7 mm. Le rayon de courbure maximal se situe au niveau du limbe (car la cornée est asphérique).

Le rôle principal de la cornée est de faire converger les rayons lumineux incidents qui se dirigent ensuite au travers de la chambre antérieure de l'œil, vers le cristallin puis au niveau de la rétine.

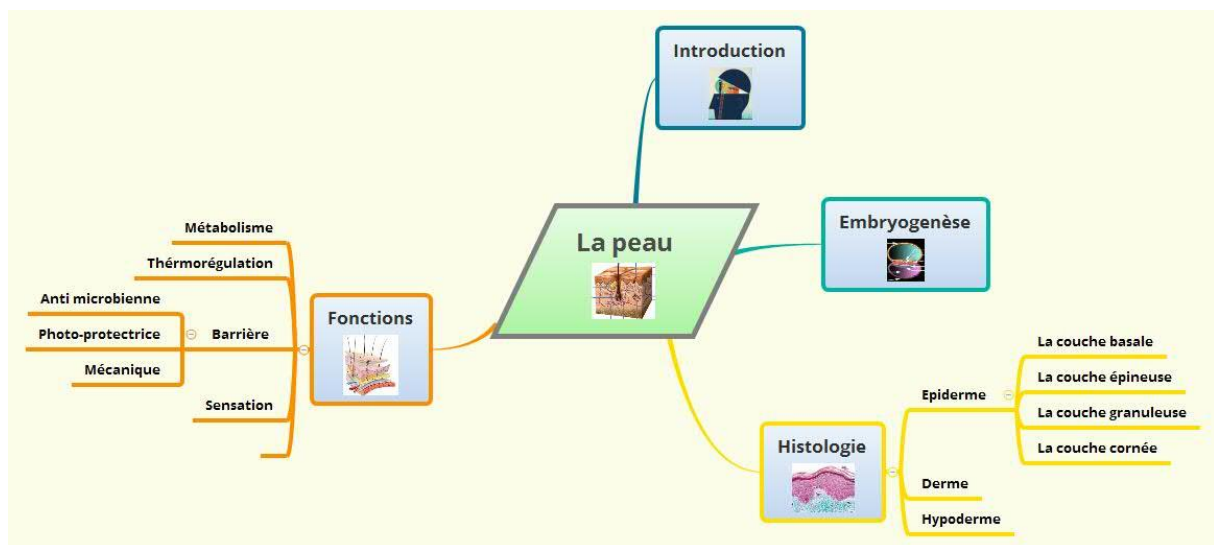
Ce pouvoir optique important provient de la structure et de la forme de la cornée : elle possède une courbure plus importante que celle du cristallin et surtout, elle est au contact de l'air ambiant, offrant la plus grande différence d'indice de réfraction aux rayons lumineux incidents (indice de la cornée; 1.376, indice de l'air : 1, soit une différence égale à 0.376 : à titre de comparaison la différence d'indice entre l'humeur aqueuse et le cristallin est environ 10 fois moins importante) (*Grosvenor and Goss 1998*).

1.1.6.3 La transmission de la lumière

Une propriété optique fondamentale de la cornée est la transmission de la lumière qui augmente avec la longueur d'onde dans le spectre de la lumière visible (400 à 750 nm)

La cornée agit comme une fenêtre par laquelle la lumière pénètre dans l'œil. Elle joue un rôle prépondérant dans la focalisation de la lumière sur la rétine.

Partie 2 : La peau humaine : structure et fonctions



1.2.1 Introduction

La peau est un des organes les plus étendus (1,8 m² de surface) de l'organisme. Elle possède de multiples fonctions et constitue avant tout une barrière protectrice contre les agressions externes. Cette barrière s'oppose aussi aux pertes hydriques, et participe à la régulation thermique et au sens du toucher.

Outre ses fonctions vitales, la peau joue un rôle social. Elle reflète l'état de santé physique mais aussi psychique de l'individu. Elle donne un caractère individuel à chaque personne (empreintes digitales).

L'état de la peau dépend de l'âge, de la nutrition et du mode de vie. Cela est particulièrement vrai pour la peau du visage, car elle est affectée le plus par les effets nocifs de l'environnement.

Notre peau représente:

- environ 5 millions de poils;
- 60% d'humidité, chez les enfants jusqu'à 90%;
- 100 pores par centimètre carré;
- 200 récepteurs par centimètre carré;
- une épaisseur en moyenne de 1 à 2 mm;
- un poids sans l'hypoderme de 4 à 6% du poids total;
- une moyenne de 18 kg d'épiderme kératinisé et complètement renouvelé pendant toute la vie d'un adulte.

L'épaisseur de l'épiderme est en moyenne de 100 µm mais varie considérablement selon les régions du corps (de 50 µm au niveau des paupières jusqu'à 1 mm dans les régions palmo-plantaires).

1.2.2 Embryogénèse

La formation de la peau repose sur un dialogue complexe entre des tissus d'origine embryologique différente, l'épiderme, le derme et l'hypoderme. Chez les mammifères, peu de temps après la gastrulation, les cellules du neurectoderme qui restent à la surface de l'embryon forment l'épiderme, qui commence à former une couche unique des cellules progénitrices non spécifiées. Au cours du développement, cette couche des cellules forme un épiderme stratifié (parfois appelé l'épiderme interfolliculaire), les follicules pileux, les glandes sébacées et les glandes apoclines sudoripares. Les cellules dérivées du mésoderme sont à l'origine des fibroblastes qui sécrètent le collagène du derme sous-jacent, des vaisseaux sanguins qui fournissent les nutriments à la peau, des muscles arrecteurs qui se fixent à chaque follicule pileux, des cellules adipeuses sous-cutanées et des cellules immunitaires qui s'infiltrant et résident dans la peau. Les cellules dérivées de la crête neurale contribuent à la formation des mélanocytes, des terminaisons nerveuses sensorielles de la

peau et du derme de la tête. Au total, environ 20 types de cellules différentes résident dans la peau.

1.2.3 Histologie

La peau est composée de 3 tissus différents: l'épiderme, le derme et l'hypoderme (**Figure 18**). La partie superficielle, la plus mince, est formée d'un tissu épithélial pluristratifié kératinisé, l'épiderme. La partie sous-jacente, plus épaisse, est constituée du tissu conjonctif, le derme. En dessous du derme, on trouve l'hypoderme, composé de tissu conjonctif lâche qui contient des adipocytes.

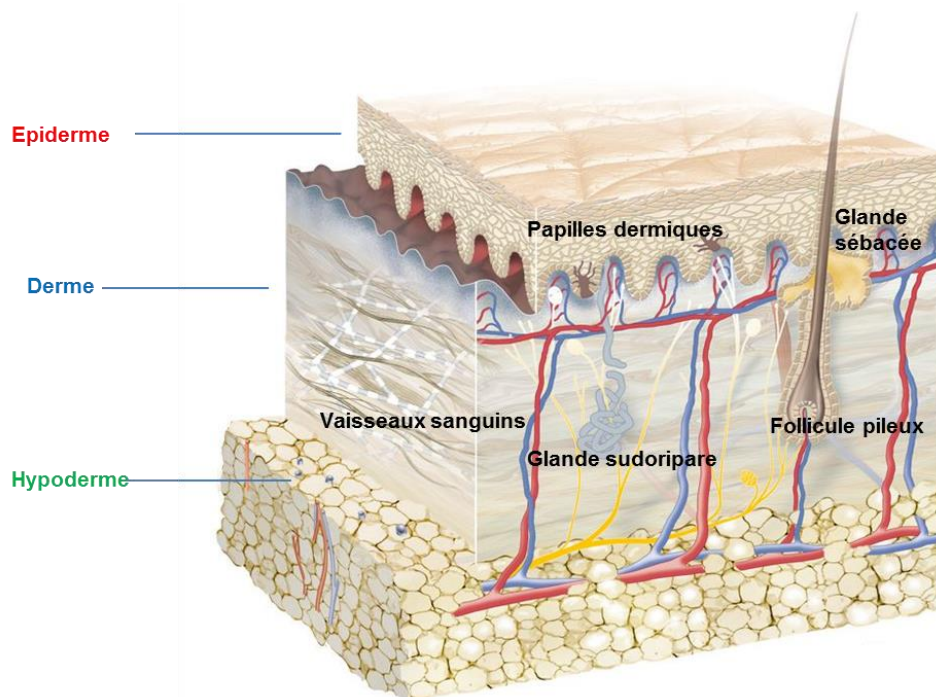


Figure 18. Représentation schématique de la peau.

La peau est composée de 3 compartiments superposés qui sont de la profondeur vers la surface l'hypoderme, le derme et l'épiderme. Quand on associe les annexes épidermiques (follicules pileux, glandes sébacées et sudoripares) on parle du système tégumentaire. D'après <https://int.eucerin.com/about-skin/basic-skin-knowledge/skin-structure-and-function>

1.2.3.1 L'épiderme

L'épiderme est un tissu pluristratifié pavimenteux et kératinisé d'origine ectodermique qui représente la partie la plus superficielle de la peau. Il est constitué de 4 couches de kératinocytes: la couche basale, la couche épineuse, la couche granuleuse et la couche cornée (**Figure 19**).

Les kératinocytes représentent 80% des cellules épidermiques. Ils vont migrer des régions basales vers les couches superficielles et donner à l'épiderme ses caractéristiques morphologiques. Les 20% d'autres cellules de l'épiderme sont dispersées entre les kératinocytes. Ce sont les mélanocytes, les cellules de Langerhans et les cellules de Merkel. Les mélanocytes et les cellules de Merkel proviennent des crêtes neurales alors que les cellules de Langerhans ont pour origine la moelle hématopoïétique.

L'épiderme n'est pas vascularisé mais il contient des terminaisons nerveuses sensibles.

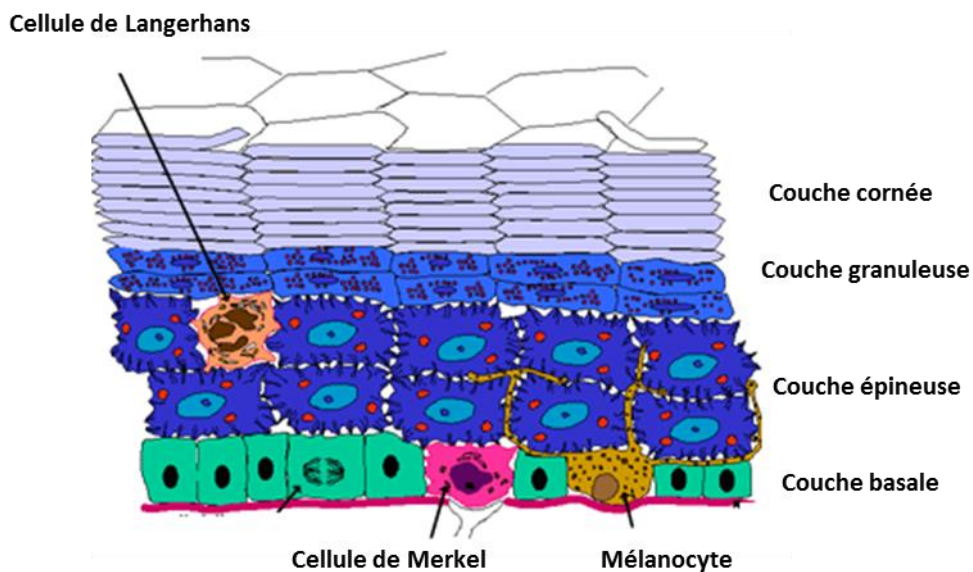


Figure 19. Représentation schématique de l'épiderme.

L'épiderme humain est composé de 4 strates : couches basale, épineuse, granuleuse et cornée. Au niveau de la couche cornée, les kératinocytes changent de forme et de structure (ils deviennent très aplatis et anucléés) et on les appelle des cornéocytes. D'après <https://int.eucerin.com/about-skin/basic-skin-knowledge/skin-structure-and-function>

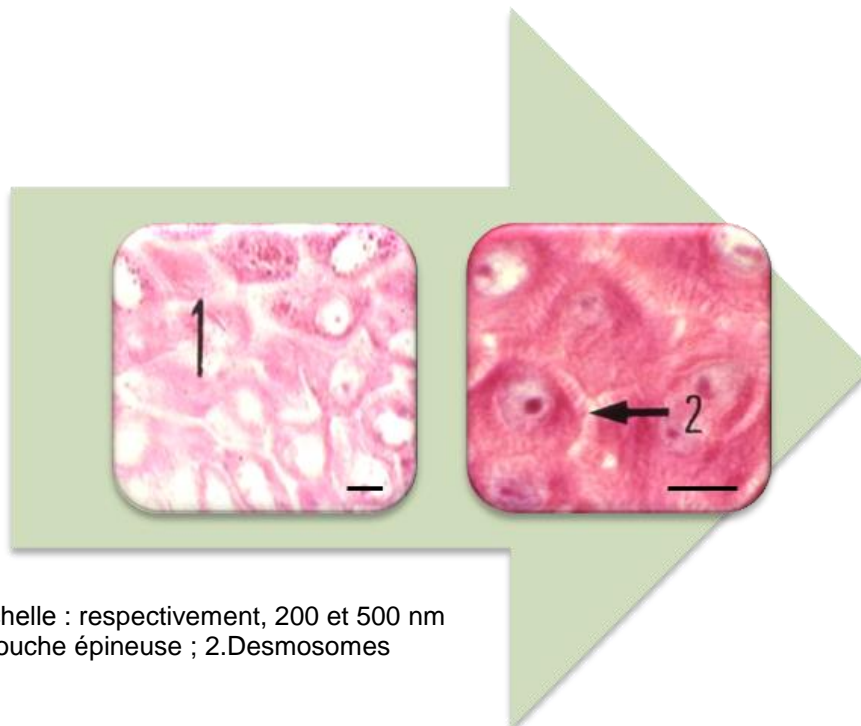
1.2.3.1.1. La couche basale

C'est une assise cellulaire qui contient des kératinocytes prolifératifs de petite taille, cubiques, avec un noyau basophile qui occupe une grande partie de la cellule. Ils sont ancrés à la lame basale par des hémidesmosomes et reliés via les desmosomes. On trouve aussi dans la couche basale des mélanocytes qui vont sécréter la mélanine sous forme de granules. Une partie des kératinocytes vont migrer dans les couches supérieures et s'engager dans le processus de différenciation épidermique. Comme dans l'épithélium cornéen, c'est la seule couche avec des cellules présentant une capacité proliférative.

1.2.3.1.2. La couche épineuse

La couche épineuse est constituée de 5-10 assises cellulaires. Une caractéristique importante de ces cellules est qu'elles changent de forme et deviennent polyédriques avec un noyau beaucoup plus petit et un cytoplasme riche en filaments intermédiaires. En microscopie optique, on observe de multiples desmosomes qui entourent les cellules et qui jouent un rôle dans la résistance de l'épiderme et lui confèrent cet aspect particulier "épineux" (Figure 20).

Figure 20. La couche épineuse de l'épiderme observée en microscopie électronique à transmission.



D'après <http://webapps.fundp.ac.be/umdb/histohuma>

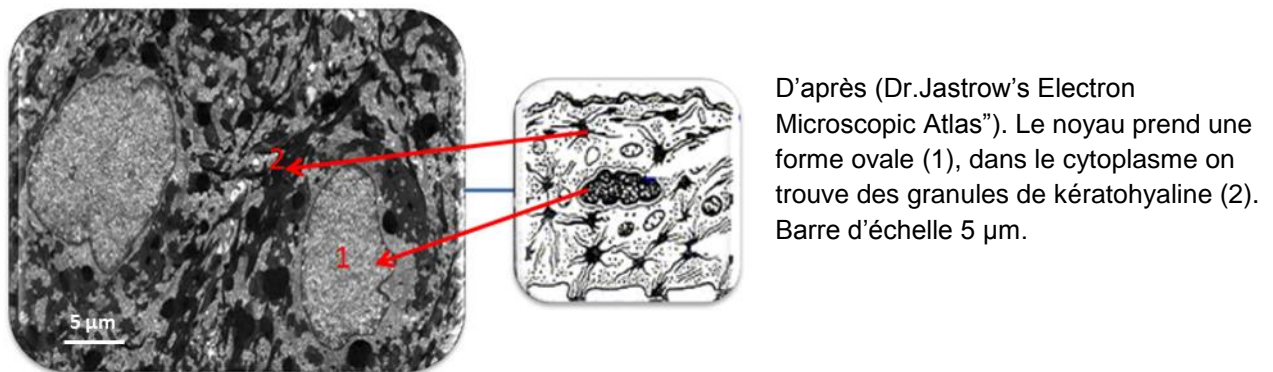
1.2.3.1.3. La couche granuleuse

La couche granuleuse est constituée de 2 à 5 assises de cellules aplaties. Dans le cytoplasme des cellules granuleuses, on observe de nombreux grains de kératohyaline (agrégats protéiques amorphes stockés pour la dernière étape du processus de différenciation épidermique, la cornification), d'où le nom de couche granuleuse. C'est la dernière couche de cellules vivantes, ce qui explique la synthèse dans cette région des composants principaux de la couche cornée comme la loricine (granules L) et la profilaggrine (granules F).

En microscopie électronique à transmission (**Figure 21**), les kératinocytes présentent certaines particularités :

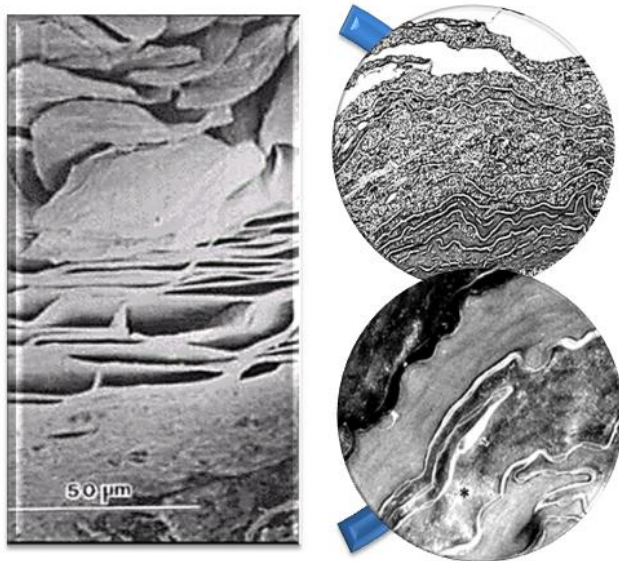
- L'espace intercellulaire est pratiquement absent ;
- Les cellules forment une multitude de jonctions d'ancrage des filaments intermédiaires de kératines qu'on appelle des desmosomes (voir chapitre I partie 3) ;
- Les noyaux des cellules sont assez volumineux et ronds ;
- Dans le cytoplasme, de nombreuses structures denses aux électrons sont visibles : ce sont des kératinosomes ;

Figure 21. La couche granuleuse en microscopie électronique a transmission.



1.2.3.1.4. La couche cornée

La couche cornée est constituée de 15 à 20 assises de cellules aplaties, anucléées, appelées cornéocytes (**Figure 22**). La couche cornée est compacte en profondeur au contact de la couche granuleuse, et desquamante en superficie.



On peut noter les cornéocytes denses aux électrons en dessus de la couche granuleuse et moins denses dans la partie la plus externe de la couche cornée. La barre d'échelle représente 50 µm;

D'après (Norlén and Al-Amoudi 2004),(Fitoussi et al. 2011)

Figure 22. La couche cornée de l'épiderme en microscopie électronique à balayage (à gauche) et à transmission (à droite).

La migration des kératinocytes de la couche basale vers la couche cornée se fait normalement en 3 à 4 semaines.

Le processus de cornification comporte une série de changements bien visibles au microscope électronique. On assiste à un remplacement de la membrane plasmique par une coque protéique rigide - l'enveloppe cornée - et une diminution considérable du volume du cytoplasme rempli par une matrice fibreuse de kératines. Les desmosomes, après incorporation de la cornéodesmosine, deviennent des cornéodesmosomes qui vont finalement être dégradés pour permettre la desquamation.

1.2.3.2 Le derme

Le derme (ou corium) est le tissu épais et souple qui constitue la couche intermédiaire de la peau. Il permet la protection et la réparation des tissus endommagés et est quatre fois plus épais que l'épiderme (la couche externe de la peau). Le derme est un tissu conjonctif essentiellement constitué de fibroblastes, de mucopolysaccharides et de fibres (de collagène et élastine). Il est constitué de deux zones distinctes: papillaire et réticulaire.

Le derme nourrit l'épiderme et contient les terminaisons nerveuses et les vaisseaux sanguins. La base des poils est également située dans le derme.

1.2.3.3 L'hypoderme

Au-dessous du derme se trouve le tissu adipeux, appelé hypoderme. Ce tissu est riche en graisse et en vaisseaux sanguins. Les cellules adipeuses servent de réserve d'énergie, leurs graisses sont consommées lorsque les nutriments se font rares dans le flux sanguin. Le tissu sous-cutané protège les muscles, les os et les organes des traumatismes et isole le corps du froid.

1.2.4 Les cellules souches.

L'exposition continue de la peau aux stress mécaniques et chimiques de l'environnement nécessite un auto-renouvellement permanent de l'épiderme et de ses annexes (follicules pileux, glandes sébacées et sudoripares), même à l'âge adulte, afin de maintenir ses diverses fonctions (par exemple, la fonction de barrière) (Y. C. Hsu, Li, and Fuchs 2014). Cette capacité d'auto-renouvellement est assurée par les CS qui résident dans des unités morphologiques et fonctionnelles spécialisées dotées d'un microenvironnement spécifique que l'on appelle "niches". Au sein de la peau humaine, au moins cinq niches (Figure 23) différentes ont été délimitées (la couche basale de l'épiderme inter-folliculaire, le follicule pileux, la glande sébacée, le derme et les papilles dermiques), abritant différents types de CS (Choi 2015).

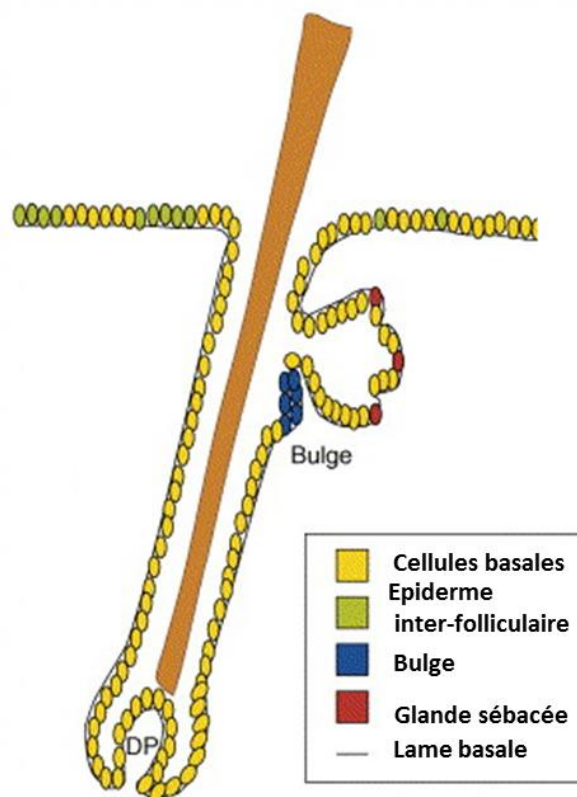


Figure 23. Répartition des cellules souches dans l'épiderme.

D'après <https://www.erudit.org/fr/revues/ms/2004-v20-n3-ms713/007841ar/>

Les CS de la région interfolliculaire constituent environ 1% à 7% des cellules basales épidermiques. Outre la régénération de l'épiderme, il a été démontré que les CS interfolliculaires sont dotées de la capacité de générer des poils ([Choi 2015](#)).

Dans les follicules pileux, plusieurs types de CS ont été identifiés. Une population de CS multipotentes réside dans le bulbe situé à la base du follicule pileux (au cours de la phase télogène du développement du cheveu) ou sous la glande sébacée associée au follicule pileux. La stimulation de ces CS à sortir de leur niche ainsi que leur prolifération et leur différenciation pour former des follicules pileux matures est étroitement liée au cycle de croissance des cheveux.

A côté de ces cellules épidermiques, une autre population de cellules multipotentes réside dans les papilles dermiques qui proviennent de la crête neurale embryonnaire. Ces CS d'une part peuvent donner naissance à des lignées cellulaires mélanocytaires, neuronales et myogéniques et, d'autre part, se différencier vers les lignées mésenchymateuses, puisqu'elles peuvent être à l'origine des progéniteurs d'adipocytes, de chondrocytes et des ostéocytes. En raison de leur plasticité physiologique avantageuse, de leur multipotence, de leur accessibilité simple et de problèmes éthiques non controversés, ces CS sont considérés comme des cellules donneuses prometteuses pour la réparation des lésions du système nerveux ([Clewes et al. 2011](#)).

Les CS situées au niveau des glandes sébacées vont, comme les autres sébocytes, dégénérer au cours de la sécrétion holocrine, libérant du sébum riche en lipides dans le canal pileux tout en maintenant une lubrification adéquate de la surface de l'épiderme ([Ghazizadeh and Taichman 2001](#)).

Les CS mélanocytaires proviennent de la crête neurale et résident dans le bulbe du follicule pileux, l'épiderme interfolliculaire et probablement aussi dans le derme. Elles donnent naissance à des mélanocytes producteurs de pigment dans l'épiderme et la matrice capillaire. Le destin de ces mélanocytes est lié aux phases de la croissance du follicule pileux, où les mélanocytes prolifèrent et se différencient au cours de la phase de croissance du cheveu (anagène) et diminuent par apoptose dans la phase de dégradation (catagène). Un dysfonctionnement de cette population de CS entraîne des défauts de pigmentation qui se manifestent phénotypiquement par l'apparition des cheveux blancs ([Gola et al. 2012](#)) ([Lang, Mascarenhas, and Shea 2013](#)).

Le remodelage du derme et des fibroblastes est assuré par les CS mésenchymateuses. Elles sont situées dans le tissu conjonctif du derme, entourent les FP (en particulier dans la gaine folliculaire et les papilles) ou se trouvent parmi les péricytes autour des vaisseaux sanguins. Outre les fibroblastes, les CS mésenchymateuses du derme génèrent des myofibroblastes, des cellules endothéliales, des nerfs, des vaisseaux sanguins, des ostéoblastes, des chondrocytes et des adipocytes ([Proding et al. 2017](#)).

1.2.4.1 Le renouvellement de l'épiderme

L'épiderme est composé de blocs de construction moléculaires, chacun d'entre eux étant constitué d'une unité pilosébacée (follicule pileux et glande sébacée) et de son épiderme interfolliculaire environnant. L'épiderme interfolliculaire contient ses propres cellules progénitrices pour assurer le renouvellement tissulaire en absence de lésion, et les unités pilosébacées contiennent des CS multipotentes qui sont activées lors d'une blessure pour fournir des cellules permettant la régénération de follicule pileux, de la glande sébacée et la réparation de l'épiderme.

Le renouvellement de l'épiderme est assuré par les kératinocytes basaux qui montrent un fort potentiel prolifératif. Il existe deux modèles distincts (**Figure 24**) qui expliquent le renouvellement de l'épiderme: le modèle hiérarchique et le modèle stochastique (*Y. C. Hsu, Li, and Fuchs 2014*).

Le modèle hiérarchique stipule que l'épiderme est constitué d'unités prolifératives épidermiques distinctes avec une CS centrale à cycle lent produisant des cellules amplificatrices transitoires (CAT) à division rapide, qui quittent la couche basale après plusieurs divisions pour générer des cellules différenciées.

Le modèle stochastique suggère que la couche basale épidermique est composée d'un seul type de progéniteurs prolifératifs dont les cellules filles choisissent de manière aléatoire de se différencier ou de rester en tant que progéniteurs. Chaque division des cellules basales peut produire trois résultats différents: (1) une cellule fille qui se retire du cycle cellulaire et quitte la couche basale et une cellule progénitrice qui reste dans la couche basale et continue à se diviser; (2) deux cellules filles qui vont se différencier; et (3) deux cellules progénitrices qui vont rester au niveau de la couche basale. Bien que les choix reste aléatoire, la génération de cellules différenciées et le maintien de pools de progéniteurs engagés restent équilibrés, en assurant ainsi l'homéostasie à long terme.

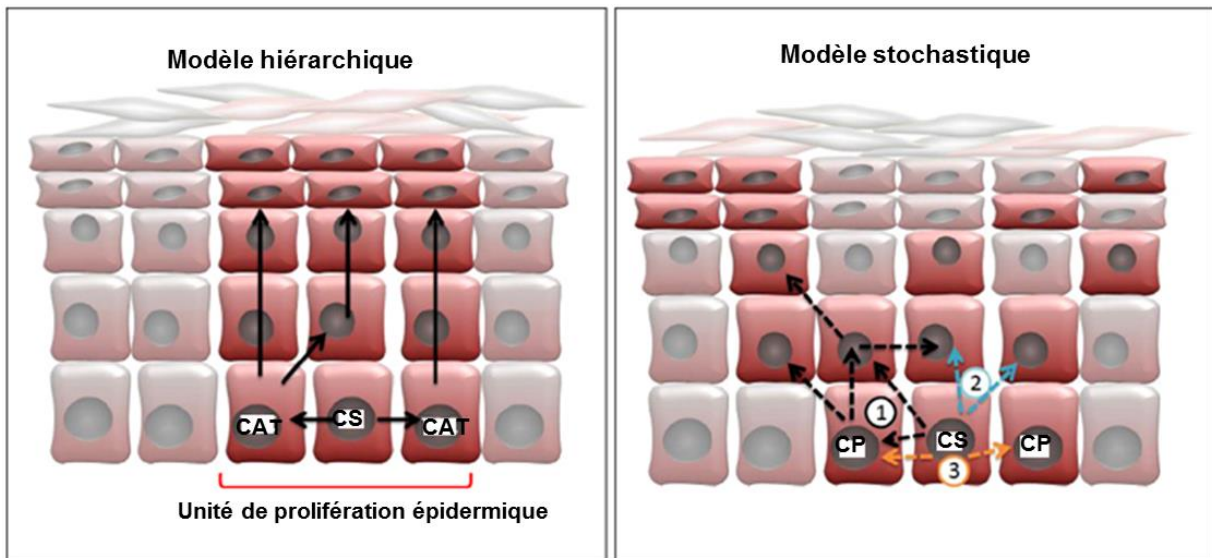


Figure 24. Représentation schématique des deux modèles de renouvellement de l'épiderme.

Dans un modèle hiérarchique, les divisions rares entre cellules souches génèrent des cellules d'amplification transitoire qui se divisent à leur tour assez rapidement, donnant ainsi naissance à des cellules différenciées. En revanche, dans un modèle stochastique, toutes les cellules basales sont identiques et chaque division peut donner trois résultats différents: (1) une cellule qui va se différencier et une cellule progénitrice qui reste dans la couche basale et continue à se diviser; (2) deux cellules différenciées ; et (3) deux cellules progénitrices qui restent au niveau de la couche basale. CS : cellule souche ; CP : cellule progénitrice ; CAT : cellule d'amplification transitoire
D'après (Proding et al. 2017)

1.2.5 Fonctions de la peau

Les principales fonctions de la peau sont regroupés dans la **Figure 25**.



Figure 25. Représentation schématique des principales fonctions de la peau

(Voir détails dans le texte).

1. Thermorégulation

La peau joue un rôle régulateur dans l'échange de chaleur entre le corps et l'environnement. La thermorégulation dépend du système nerveux. Dans la peau sont incorporées les terminaisons nerveuses qui perçoivent les différences de température. Le froid est perçu plus rapidement que la chaleur. C'est grâce aux récepteurs thermorégulateurs de la peau que notre organisme garde une température constante (36,6°C) quelle que soit la température ambiante. La stimulation des nerfs provoque une vasodilatation ou une vasoconstriction; dans le premier cas la chaleur est retenue dans le corps, dans le second il y a un plus grand dégagement de chaleur. Dans le transfert de chaleur, les glandes sudoripares jouent aussi un rôle important. En moyenne, une personne émet 600 à 900 ml de sueur par jour. L'évaporation à la surface de la peau entraîne une diminution de la température corporelle.

2. Métabolisme

La peau est étroitement liée à tous les organes et systèmes du corps. Elle remplit un certain nombre de fonctions très diverses liées au métabolisme. Elle élimine certains résidus (déchets), participe au métabolisme eau-sel, des glucides et des protéines. Sa grande importance dans le système immunitaire est prouvée.

La peau - un véritable laboratoire de chimie

- Sous l'influence de la lumière du soleil, la peau synthétise la vitamine D. Celle-ci garantit que le corps ait suffisamment de calcium pour former les os, ainsi que pour de nombreux autres processus métaboliques.
- Sous l'influence de la stimulation lumineuse, les mélanocytes convertissent la tyrosine en mélanine, une substance colorante. Ce pigment, en tant que "parapluie naturel", protège la peau contre le rayonnement ultraviolet et son effet destructeur sur les cellules.
- Pouvoir supplémentaire de la peau : la capacité de certaines de ses enzymes à activer des hormones. Par exemple, la cortisone dans la peau devient une substance encore plus efficace, l'hydrocortisone, et l'hormone sexuelle mâle, la testostérone devient de la dihydrotestostérone.

3. Sensation

La peau est l'organe du cinquième sens, après les yeux, les oreilles, la bouche et le nez. Ce n'est pas seulement l'organe le plus grand mais aussi un des plus sensibles. Sa sensibilité incroyable est due aux minuscules corps tactiles, aux récepteurs de pression, au froid et à la chaleur, aux fibres nerveuses libres et à d'autres capteurs dans le tissu conjonctif et le derme. Ils sont directement reliés par les voies nerveuses au cerveau et à la moelle

épinière. Les informations livrées sont immédiatement évaluées, transformées en sensations et, si nécessaire, en actions.

4. Barrière physique

La peau représente un obstacle mécanique. Elle s'oppose à la pénétration dans le corps humain de substances provenant de son environnement en prévenant l'invasion d'agents pathogènes et en combattant les agressions chimiques et physiques. Elle prévient aussi la perte non régulée d'eau et de solutés du corps.

Cette fonction de barrière de la peau est en grande partie assurée par l'épiderme et notamment, au niveau de la couche cornée, par les cornéocytes (enveloppe cornée, éléments du cytosquelette et cornéodesmosomes qui vont, d'une part, former une vraie armure contre les agressions mécaniques et, d'autre part, absorber et redistribuer les chocs) et les domaines intercellulaires enrichis en lipides. L'épiderme nucléé, avec ses jonctions intercellulaires variées, en particulier les jonctions serrées et les desmosomes, contribue également à cette fonction de barrière. L'enveloppe cornée, une structure protéo-lipidique robuste remplace la membrane plasmique à la périphérie des cornéocytes. Des hydroxycéramides sont liés de manière covalente à l'involucrine sur la face externe de l'enveloppe cornée. La filaggrine est réticulée à l'enveloppe cornée après avoir agrégé les filaments de kératines en macrofibrilles pour former la matrice fibreuse intracornéocytaire. Les cytokines, l'AMPc et le calcium influencent la formation et le maintien de la fonction de barrière cutanée. Des modifications de la composition lipidique et de la différenciation épidermique conduisent à une barrière cutanée perturbée, ce qui est à l'origine de certaines pathologies de la peau, comme la dermatite de contact, l'ichtyose, le psoriasis ou la dermatite atopique ([Proksch, Brandner, and Jensen 2008](#)).

L'épiderme possède au niveau de sa couche cornée des molécules hygroscopiques (appelées collectivement facteur naturel d'hydratation (FNH) ([Harding and Rawlings 2018](#)) ([Imokawa, Kuno, and Kawai 1991](#)) qui maintiennent l'hydratation en limitant la perte d'eau trans-épidermique. Ce facteur consiste pour moitié en un mélange d'acides aminés provenant de la protéolyse de la filaggrine et qui servent d'humectant endogène. L'une des fonctions critiques de l'eau dans la couche cornée est de participer aux nombreux processus enzymatiques hydrolytiques nécessaires à la desquamation normale de la peau.

La peau protège aussi dans une certaine mesure les organes vitaux du corps contre les blessures et les chocs. Le tissu adipeux sous-cutané et les fibres du derme fournissent cette protection.

5. Barrière photo-protectrice

La peau protège l'organisme des effets néfastes des rayons ultraviolets. Une telle protection est nécessaire, car les rayons ultraviolets à ondes courtes entraînent la formation

des dérivés réactifs de l'oxygène, qui sont des espèces oxygénées possédant un électron célibataire sur leur couche périphérique, ce qui leur confère un fort degré de réactivité. Cela peut entraîner un dysfonctionnement des cellules en modifiant leurs composants.

Dans un premier temps, l'épiderme utilise les antioxydants naturellement présents dans ses cellules, comme le glutathion et les vitamines C (acide ascorbique) et E (tocophérol).

Si le stress oxydatif persiste, l'épiderme met alors en route un second système de protection en stimulant la production d'enzymes, qui catalysent la destruction ou la transformation chimique des radicaux libres ou des molécules pro-oxydantes. Ces enzymes sont présentes dans l'ensemble des cellules de l'épiderme dont les plus connues sont les superoxydes dismutases, les catalases et les peroxydases du glutathion.

Un autre mécanisme de protection des rayons UV correspond à la mélanine, un pigment réparti au-dessus du noyau des kératinocytes de la couche basale de l'épiderme. La couche protectrice de pigment absorbe la lumière de toutes les longueurs d'ondes ou filtre les rayons particulièrement dangereux (*Brenner and Hearing 2008*).

De plus, l'acide urocanique - produit du métabolisme de l'histidine – est aussi associé aux qualités photoprotectives de l'épiderme. Il n'est présent que sous la forme d'un isomère trans qui, après irradiation ultraviolette, est converti en isomère cis. L'acide urocanique absorbe jusqu'à 80% des rayons ultraviolets (*de fine Olivarius et al. 1996*). Il fait partie du Facteur Naturel d'Hydratation.

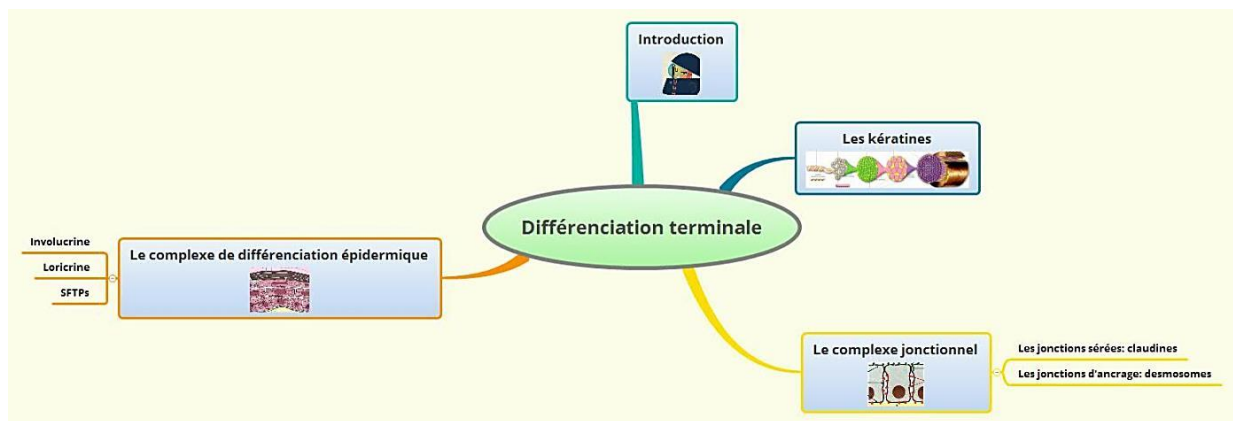
6. Barrière antimicrobienne

Ce type de protection est réalisé à différents niveaux.

La couche cornée représente une structure imperméable aux microorganismes grâce aux peptides antimicrobiens sécrétés par les kératinocytes granuleux et à son pH acide de 5,5 qui est défavorable à leur croissance. Le film lipidique à la surface de la peau est un mélange de sébum et de sueur (riches en acide lactique) sécrétés par les glandes sébacées et sudoripares. À la différence des microorganismes étrangers (transitoires), la microflore résidente ne représente aucun danger pour l'homme et participe à la création d'un manteau antimicrobien de la peau.

Les cellules impliquées dans la barrière immunologique de l'épiderme sont les cellules de Langerhans.

Partie 3: Les programmes de différenciation terminale de l'épiderme et de l'épithélium cornéen



3.1 Introduction

Comme nous l'avons vu ce sont deux épithéliums pluristratifiés de morphologie similaire.

L'épiderme et l'épithélium cornéen sont des tissus issus de l'ectoderme embryonnaire qui présentent des caractéristiques communes. La transformation de l'un en l'autre est donc envisageable. La mise en évidence de la flexibilité de l'épithélium cornéen et la confirmation du fort potentiel inducteur du derme a été faite par recombinaison tissulaire hétérotopique. Par exemple, un derme embryonnaire dorsal de souris de 14,5 jours de développement lorsqu'il est associé à un épithélium de cornée centrale de lapin adulte, dépourvue de CS, provoque après un mois de greffe la disparition de l'épithélium cornéen au profit d'un épiderme ([Ferraris et al. 2000](#)). Le programme de différenciation épidermique apparaît être un programme par défaut par rapport à celui de l'épithélium cornéen ([Collomb 2010](#)).

PAX6- le chef d'orchestre de la morphogenèse oculaire.

Le facteur de transcription Pax6 (paired box 6) joue un rôle clé dans la morphogenèse de l'œil, et plus particulièrement dans le développement des dérivés ectodermiques oculaires, le cristallin et l'épithélium cornéen. Son gène est situé au niveau du chromosome 11 humain. Chez les vertébrés, Pax6 s'exprime dans le système nerveux central, dérivé du feuillet ectodermique, et notamment dans la neurorétine.

L'importance de Pax6 dans le développement de l'œil est établie par deux observations : des mutations de ce gène chez les vertébrés vont être responsables des défauts de développement de l'œil et l'expression de Pax6 dans les cellules non oculaires conduit à la formation d'yeux ectopiques dans les tissus que ces cellules devraient normalement former ([Halder, Callaerts, and Gehring 1995](#)). Ce dernier exemple est assez intéressant car plusieurs études sur ce sujet en suivent. En effet, il y a quelques années, une équipe de l'Université de Californie, San Diego, a publié un article dans *Nature* en montrant que la transduction de PAX6 dans les CS de l'épiderme entraîne leur transformation en CS limbiques (**Figure 26**). De plus, l'expression de PAX6 dans ces cellules ainsi que leur différenciation ultérieure en épithélium cornéen est sous le contrôle de la voie WNT7A (wingless-type MMTV integration site family member 7) ([Ouyang et al. 2014](#)).

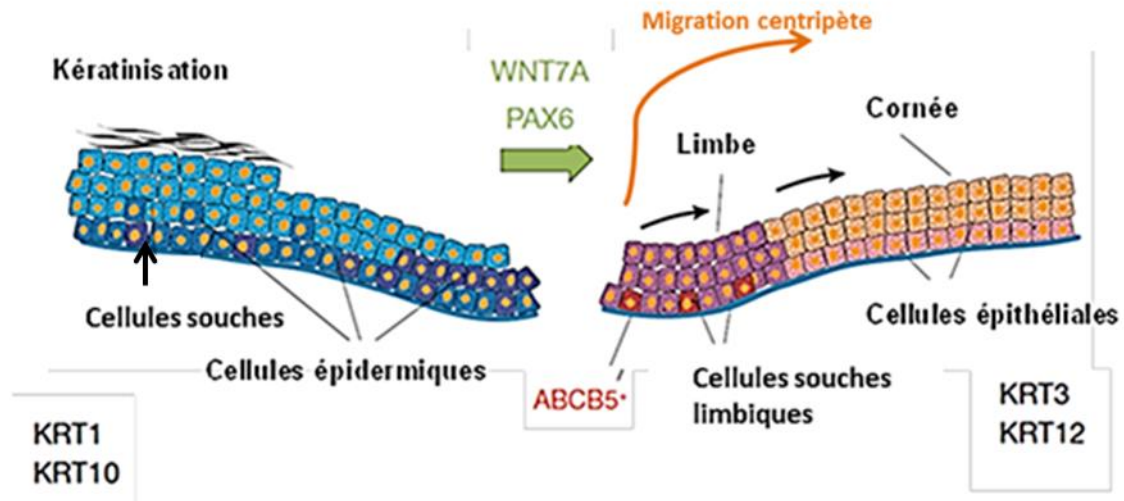


Figure 26. Pax6, WNT7A et ABCB5 jouent un rôle primordial dans la transformation des cellules souches épithéliales en cellules souches cornéennes.

Ces cellules provenant de l'épiderme modifiées pour exprimer PAX6 vont rétablir une surface cornéenne saine après leur transplantation dans un modèle de maladie cornéenne chez le lapin. Ces résultats suggèrent le rôle central de l'axe WNT7A - PAX6 dans la détermination des cellules de l'épithélium cornéen.

Dans une autre étude, une équipe de Harvard a proposé le gène de ABCB5 (ATP binding cassette subfamily B) comme étant le marqueur pour la sélection des CS limbiques à fort potentiel régénératif (*Ksander et al. 2014*). De plus, les cellules isolées ABCB5+ peuvent restaurer complètement la surface oculaire dans différents modèles murins de déficience en CS limbiques.

La perte de ces 3 gènes (PAX6, WNT7A et ABCB5) va avoir comme conséquence la transformation de la morphologie épithéliale cornéenne transparente exprimant la paire des kératines spécifiques K3/K12 vers une morphologie épidermique opaque qui exprime la paire des kératines K1/K10.

Dans l'épithélium cornéen, les cellules « filles » se différencient et migrent d'une manière centripète (**Figure 26**) vers la surface épithéliale à partir de la couche basale (la couche germinative de l'épithélium). Elles subissent une maturation et une différenciation de la couche basale vers les couches superficielles, mais aussi de la partie limbique vers la partie centrale. Après la différenciation terminale, les cellules mortes sont évacuées dans les larmes par desquamation.

Dans la peau, la différenciation de l'épiderme est un phénomène orienté au cours duquel les kératinocytes issus de l'assise basale présentent une série de remaniements métaboliques et structuraux tout au long de leur migration vers la surface de la peau. Dans les stades tardifs, ils subissent un processus spécifique de mort cellulaire programmée, la cornification, qui aboutit à la transformation du kératinocyte granuleux, dernier stade nucléé de la différenciation kératinocytaire, en cornéocyte. La couche cornée, formée de l'empilement des cornéocytes, assure une des principales fonctions de l'épiderme, la fonction dite de barrière, vitale pour l'organisme. Ainsi, c'est au niveau du kératinocyte granuleux que culmine la production des précurseurs de l'enveloppe cornée et autres constituants cellulaires spécifiques de la couche cornée.

Dans l'épithélium cornéen, il n'existe pas de couche cornée comme dans l'épiderme, mais certains des précurseurs de l'enveloppe cornée pourraient quand même y être exprimés ([Yang 2006](#)).

La peau et la cornée sont des organes protecteurs directement en contact avec le milieu extérieur et donc soumis en continu à de nombreuses agressions. L'épiderme et l'épithélium cornéen qui forment la partie superficielle de ces organes nécessitent un constant et rapide renouvellement afin de conserver leur intégrité. L'épithélium cornéen a un renouvellement plus rapide que l'épiderme. La peau et la cornée sont des organes qui jouent un rôle essentiel, non seulement pour la protection, mais aussi sur le plan sensoriel. L'intégrité et le maintien de l'homéostasie de ces tissus sont donc primordiaux pour l'organisme. Les pathologies issues d'un défaut lors de la morphogenèse de ces organes ou les pathologies perturbant le renouvellement de ces organes en touchant les CS sont donc très graves.

La microphthalmie avec syndrome de malformations cutanées linéaires ([Sharma et al. 2008](#)) est une pathologie à transmission dominante liée au chromosome X et est létale chez les garçons. Chez les personnes atteintes de cette maladie, un ou les deux yeux peuvent être très petits ou mal développés (microphthalmie), et des dysplasies cutanées linéaires sur la tête et le cou peuvent aussi être observées. Ces marques suivent les chemins empruntés par les cellules pour migrer à mesure que la peau se développe avant la naissance (lignes de Blaschko). Les défauts de la peau s'améliorent généralement avec le temps et laissent des cicatrices variables. Outre les problèmes oculaires et les marques cutanées caractéristiques, cette affection peut entraîner des anomalies du cerveau, du cœur et du système génito-urinaire. Les personnes affectées peuvent également présenter des dystrophies des ongles.

Le syndrome oculo-cérébral avec hypopigmentation est une maladie héréditaire extrêmement rare caractérisée par une hypopigmentation de la peau et des cheveux et par

des anomalies du système nerveux central qui affectent les yeux et certaines parties du cerveau (anomalies oculocérébrales). Les signes physiques à la naissance comprennent une couleur de peau anormalement claire et des cheveux gris argenté. On pense que le syndrome oculocérébral avec hypopigmentation est hérité d'un trait génétique autosomique récessif.

La compréhension des mécanismes moléculaires conduisant à la morphogenèse de ces tissus présente à la fois un grand intérêt scientifique et un grand intérêt thérapeutique.

Les épithéliums jouent, dans un premier temps, un rôle de barrière entre deux compartiments. Cette fonction est due à la polarité morphologique et fonctionnelle des cellules qui les composent : le pôle basal est en contact avec la membrane basale, le pôle apical avec l'extérieur. Dans les épithéliums formés de plusieurs couches cellulaires (pluristratifiés comme l'épiderme et l'épithélium cornéen), cette polarité est marquée par une différenciation progressive depuis la couche basale vers les couches superficielles.

La différenciation terminale d'un épithélium est l'acquisition de caractères morphologiques originaux habituellement en rapport avec une spécialisation fonctionnelle. Elle nécessite la définition des coordonnées spatiales de la cellule, l'obtention d'une identité tissulaire et la réalisation de mouvements morphogénétiques. Toutes les cellules épithéliales se différencient dans une direction commune caractérisée par l'établissement de jonctions intercellulaires. L'expression de gènes spécifiques – que l'on appelle les marqueurs de différenciation, et l'inhibition des autres permet à la cellule de se différencier pour former tel ou tel tissu. La caractérisation de tels marqueurs permet de classer les tissus de manière objective à côté de critères morphologiques et fonctionnels.

Il y a d'abord la prolifération cellulaire. Puis, un signal extérieur émanant d'autres cellules du même tissu ou d'un autre tissu entraîne l'arrêt du cycle cellulaire. Lorsque la différenciation est terminale, la prolifération s'arrête.

Il existe peu d'épithéliums dont le programme de différenciation terminale a été bien décrit au niveau moléculaire. L'exemple le plus évoquant pour caractériser ce processus complexe est la différenciation terminale de l'épiderme.

Ce mécanisme se rapporte à l'ensemble de changements biochimiques et structuraux que subit le kératinocyte lors de sa migration de l'assise basale vers les couches superficielles de l'épiderme, afin de former une couche cornée rigide, avec une matrice fibreuse riche en protéines. Cette migration dirigée est accompagnée par de nombreuses modifications au niveau du cytosquelette (filaments intermédiaires et microtubules principalement) mais aussi des jonctions cellulaires. La dernière étape de la différenciation

épidermique correspond à la cornification - un processus de mort cellulaire programmée aboutissant à la desquamation.

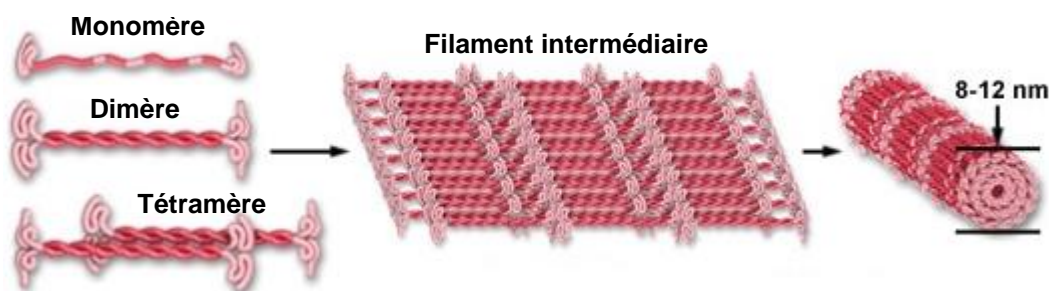
Dans cette partie, on va voir en détails certains gènes tardifs de la différenciation terminale de l'épiderme qui je regrouperai en 3 catégories : les kératines (composants des filaments intermédiaires), les composants des jonctions (des jonctions serrées comme la claudine 1, et des desmosomes comme les desmogléines, les desmocollines et la cornéodesmosine) et les composants de l'enveloppe cornée (involucrine, loricrine, filaggrine et hornerine).

3.2 Les kératines

Les filaments intermédiaires sont les filaments les plus stables de la cellule et aussi les plus rigides. C'est sur ces filaments intermédiaires que sont condensées la chromatine et l'ADN, et on les localise dans le cytoplasme en réseau et sous la membrane de la cellule. Il y a différents types de filaments intermédiaires en fonction du type cellulaire. C'est une information importante parce qu'elle montre en quelque sorte l'origine cellulaire ou organique de la cellule, et c'est un outil qui est utilisé notamment en cancérologie.

Les kératines sont des protéines insolubles dans l'eau, prédominantes dans les épithéliums des vertébrés et qui rentrent dans la composition des filaments intermédiaires. Elles se répartissent en 2 grandes familles selon leurs propriétés biochimiques et leurs séquences en acides aminés: type I (acide, K9-K28 et K31-K40) de faible poids moléculaire et type II (basique ou neutre, K1-K8, K71-K86) de plus haut poids moléculaire (*Moll et al. 1982*)(*Schweizer et al. 2006*). Pour former un filament intermédiaire, il faut qu'une kératine acide s'associe à une kératine basique afin de former un dimère (**Figure 27**). Les dimères vont créer des tétramères, puis des protofilaments de 3 nm et finalement des filaments intermédiaires de 10 nm de diamètre qui vont converger vers les desmosomes et hémidesmosomes (*Homberg and Magin 2014*).

Figure 27. Organisation d'un filament intermédiaire.



D'après ("Cytosquelette: Filaments Intermédiaires") *Lodish et al: pp. 991-1020; Voet et Voet: pp. 1250-1260.*

Les kératines ont un rôle majeur dans la stabilité mécanique et l'intégrité des tissus, dans le soutien de l'enveloppe nucléaire, et entrent dans la constitution de la couche cornée cutanée et des phanères. Leur localisation spécifique dans les tissus épithéliaux permet de les utiliser comme marqueurs histochimiques de différenciation épithéliale (**Tableau 1**).

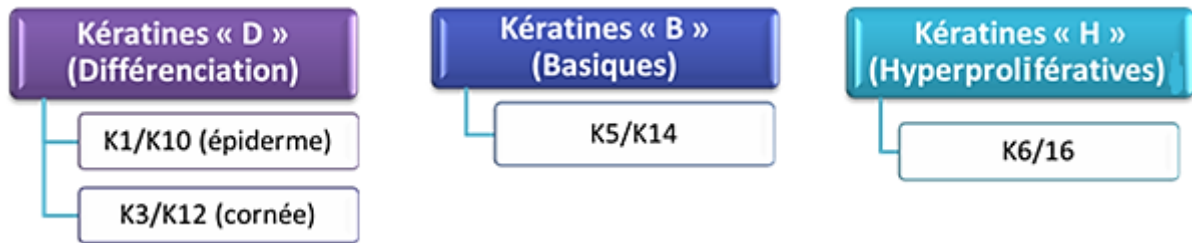


Tableau 1. Distribution des kératines dans l'épiderme et l'épithélium cornéen.

La spécificité cellulaire est déterminée par l'expression de la paire des kératines « D » (liées à la différenciation)- K1/K10 pour l'épiderme et K3/K12 pour les épithéliums cornéens. Les kératines basiques « B » sont communes à tous les épithéliums stratifiés (K5/K14). Les états hyperprolifératifs (« H ») expriment la paire des kératines 6/16. D'après (S. Shetty and Gokul 2012)

Ainsi les épithéliums stratifiés (cornée, conjonctive, épiderme et muqueuses bucco-pharyngée, laryngée, trachéale, bronchique, vésicale et vaginale) expriment la paire de kératines K5/K14 au niveau de la couche basale. Toutefois, ce sont des kératines non spécifiques d'un tissu particulier (**Figure 28**).

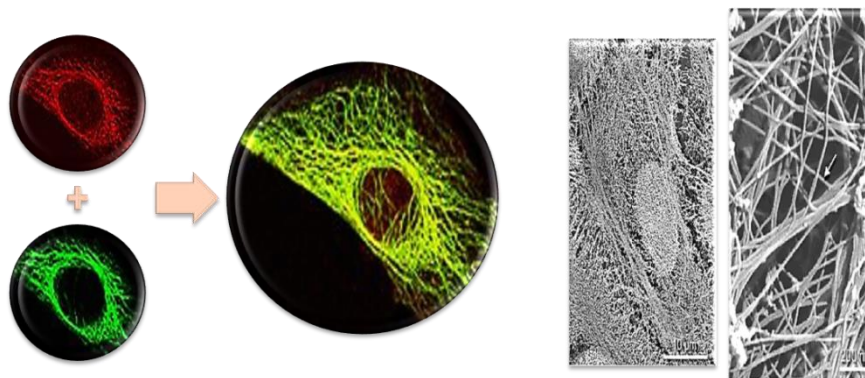


Figure 28. Le réseau de filaments intermédiaires dans les kératinocytes en culture vu avec différentes techniques de microscopie.

Les paires de kératines 5 (rouge) et 14 (vert) et leur superposition (orange) vues en microscopie confocale (à gauche) et les filaments intermédiaires vus en microscopie électronique à balayage à faible (10 µm) et fort (200 µm) grossissement.

Modifié d'après (Nafeey et al. 2016) (Velez-Delvalle et al. 2016)

Les travaux du laboratoire de Sun (1982) ont montré que les couches suprabasales de l'épiderme contiennent la paire de kératines K1, K2/K10. Cooper le premier a avancé l'idée

d'une paire de kératines spécifiques de la différenciation d'un épithélium donné (SUN et al. 1985). L'épithélium cornéen est caractérisé par la paire K3 (basique, 64 kDa) et K12 (acide, 55 kDa). Cette paire de kératines est retrouvée au niveau des couches intermédiaires et surtout superficielles de l'épithélium cornéen et constitue donc un marqueur de la différenciation épithéliale de type cornéen (Moll et al. 1982) (Schermer, Galvin, and Sun 1986), (Kasper et al. 1988), (Chiambaretta et al. 2002). Les CS de l'assise basale du limbe n'expriment pas le couple K3/K12 (Schermer, Galvin, and Sun 1986). Une mutation des gènes du couple K3/K12 est à l'origine de la dystrophie de Meesman, qui se caractérise par la présence de microkystes intra-épithéliaux cornéens (Irvine et al. 2002) (K. Nishida et al. 1997).

L'expression des kératines est clairement dépendante de la différenciation, comme on peut le voir au cours d'un état d'hyperprolifération (Nelson and Sun 1983). Lors de certaines maladies hyperprolifératives ou dans l'épiderme palmo-plantaire, les cellules suprabasales ont tendance à cesser de synthétiser leur paire de kératines liée à la différenciation et expriment à la place la paire de kératines K6 (56 kDa) / K16 (48 kDa) (McGuire, Osber, and Lightfoot 1984). Cette dernière paire de kératines a été appelée marqueurs des kératinocytes "hyperprolifératifs" (ou marqueurs de l'hyperprolifération" ou "H"). Une synthèse transitoire de K6/K16 a également été observée *in vivo* au cours de la régénération épithéliale de la cornée lors d'une blessure avec perte des cellules des couches superficielles et intermédiaires. Une fois que l'épithélium est réparé, la synthèse des kératines K6/16 s'arrête. *In vitro*, les cellules de l'épithélium de la cornée de lapin, synthétisent K6/K16 lorsqu'elles sont en phase de croissance exponentielle ; cette synthèse est supprimée lorsque les cellules atteignent la confluence, elles expriment alors K3/K12 (Schermer et al. 1989). Les résultats de l'équipe d'Alexandre Schermer indiquent également que, même si l'hyperprolifération est généralement associée à l'expression de K6 / K16, l'inverse n'est pas toujours vrai. La synthèse de cette paire de kératines se poursuit, à la fois dans l'épithélium cornéen bien différencié et dans les cultures épidermiques humaines qui ne synthétisent pas assez de K1/K10. Cela indique clairement que la synthèse de K6 / K16 peut être dissociée du processus d'hyperprolifération en soi. Prises dans leur ensemble, les données montrent que K6/K16 sont synthétisées, peut-être par défaut, en tant que paire de kératines suprabasales alternatives dans des conditions non permissives pour que les kératinocytes expriment leur paire de kératines liées à la différenciation normale. Le mécanisme moléculaire sous-tendant cette relation réciproque est actuellement inconnu, mais pourrait impliquer, par exemple, la concurrence d'un ensemble commun de facteurs de transcription impliqués dans le contrôle de la synthèse de ces deux types de kératines.

Le fait que les kératines K6/K16 soient exprimées dans des conditions d'hyperprolifération par presque tous les kératinocytes, indépendamment de leur origine

tissulaire (Nelson and Sun 1983), indique qu'elles effectuent une fonction non spécifique d'un tissu et donc peut-être plus primitive que les paires de kératines liées au tissu. Une autre caractéristique intéressante de ces deux kératines K6 et K16 est que leur séquence en acides aminés sont remarquablement similaires à celles de K5 et K14 (Blumenberg 1988). Ces observations soulèvent la possibilité intrigante que K6 / K16 puisse avoir évolué relativement tôt, peut-être même avant que l'épithélium ait montré une spécificité tissulaire, dans le but d'augmenter le contenu cytoplasmique des filaments de kératines dans les cellules suprabasales. Bien que les filaments de K6/K16 suprabasaux soient structurellement et probablement fonctionnellement similaires aux filaments de K5 / K14 de la couche basale, une augmentation de la teneur en kératines dans les cellules suprabasales peut être importante pour obtenir une structure épithéliale physiquement plus forte.

3.3 Le complexe jonctionnel

Le système des jonctions intercellulaires est la base de construction d'un tissu pluricellulaire. Ce sont des structures stables dans le temps qui vont permettre la cohésion tissulaire sur la durée et représentent une barrière sélective pour la circulation des fluides.

Il existe 3 grandes groupes de jonctions :

- les jonctions serrées ;
- les jonctions d'ancrage ou adhérentes (ceintures d'adhérence ou zonula adherens; desmosomes ou macula adhérens; points de contacts focaux et héli-desmosomes) ;
- et les jonctions communicantes (ou gap junctions ou jonctions d'échange).

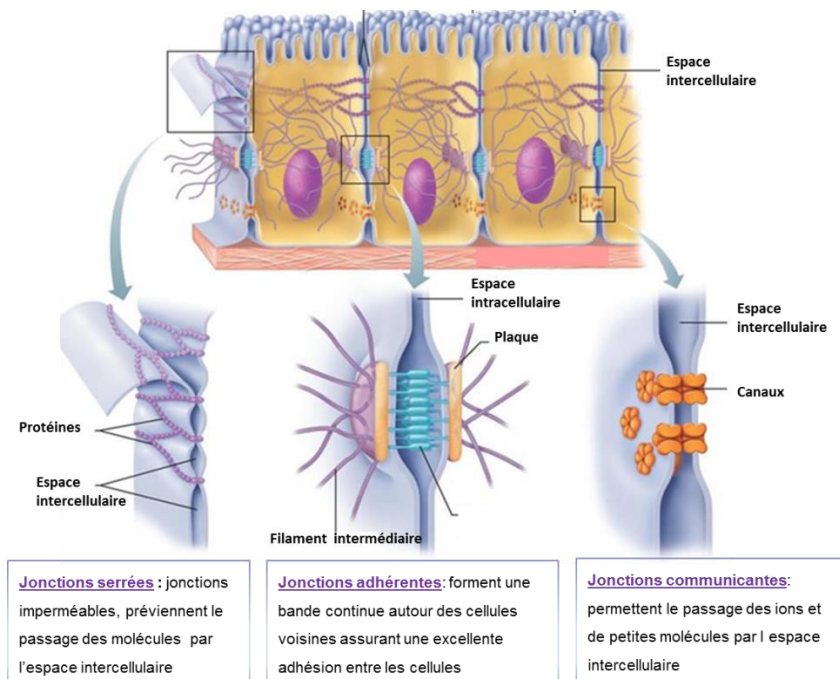


Figure 29. Le complexe jonctionnel dans une cellule.

Modifié d'après <https://www.slideshare.net/vicky14381/epithelium-cellstissues-histology>

3.3.1 Les jonctions serrées- les claudines.

Les jonctions serrées déterminent la cohésion entre 2 cellules et empêchent le passage de molécules par la voie intercellulaire. L'étanchéité tissulaire est assurée par ces régions spécifiques qui limitent le passage des solutés (barrière paracellulaire) en contrôlant le passage des petites molécules et des ions ; elles assurent donc un rôle de pore sélectif intercellulaire (*Kirschner and Brandner 2012*). Elles se présentent en microscopie électronique comme une série de points de fusion apparente des feuilletts externes des membranes plasmiques de deux cellules adjacentes. Dans l'épiderme, les jonctions serrées sont au niveau de la membrane apico-latérale des kératinocytes granuleux. Les jonctions serrées sont requises pour maintenir la polarité des cellules épithéliales et endothéliales. Ces structures présentent une organisation assez complexe. Elles sont constituées de trois groupes de protéines : les protéines transmembranaires (occludine, claudine et molécules d'adhésion jonctionnelles); les protéines membranaires périphériques (ZO-1, ZO-2, ZO-3, MUPP-1), qui se lient aux protéines transmembranaires, et des protéines cytoplasmiques (cinguline, antigène 7H6, etc.)

Ces molécules d'adhérence interagissent grâce à leurs domaines homophiles. L'occludine (du latin *occludere* = enfermer) et les claudines (du latin *claudere* = fermer) sont des protéines transmembranaires de, respectivement, 64 et 22 kDa. L'occludine et les claudines contiennent quatre domaines transmembranaires, avec à la fois les extrémités N et C orientées dans le cytoplasme, mais ces deux protéines n'ont aucune similitude de séquence.

Les claudines, qui composent une famille d'au moins 24 membres, sont capables de se polymériser et de former des pores qui permettent une diffusion sélective des ions et molécules à travers l'espace paracellulaire. La perméabilité sélective de ces canaux dépend de la concentration et du type de claudine exprimé par la cellule épithéliale ou endothéliale. Les claudines ont été divisées en deux groupes, sur la base de résultats d'expériences *in vitro*, celles qui augmentent la résistance électrique transépithéliale ou améliorent la fonction de barrière comme les claudines-1 et -4, et celles qui réduisent la résistance et perturbent donc la fonction de barrière, comme les claudines-2 et -6 (*Utech, Brüwer, and Nusrat 2006*). Au moins deux claudines différentes sont exprimées dans chaque cellule. Les claudines sont les seules protéines jonctionnelles connues pour avoir une spécificité tissulaire.

La densité cellulaire module l'expression des claudines. Dans les cellules épithéliales en croissance, le niveau d'expression des protéines des jonctions serrées est faible. À l'inverse, l'augmentation de la densité cellulaire stimule l'expression et l'accumulation des protéines des jonctions serrées.

Des travaux déjà anciens ont suggéré que les jonctions intercellulaires constituent un domaine préférentiel d'accrochage des vésicules de transport (Louvard 1980). De fait, les petites protéines G Rab3b, Rab8 et Rab13 (Marzesco et al. 2002) qui régulent les différentes étapes du trafic membranaire, sont localisées au niveau des jonctions serrées. Elles coordonnent l'assemblage de complexes protéiques requis pour l'adressage et l'arrimage des vésicules de transport avec les membranes cibles (Zahraoui, Louvard, and Galli 2000).

Plusieurs carcinomes sont associés à une perte de polarité cellulaire et à la dissociation des jonctions serrées. La claudine 1 est fortement exprimée dans plusieurs cancers colorectaux (Miwa et al. 2001).

En plus de ces fonctions liées aux jonctions serrées, certaines fonctions "non canoniques" de la claudine-1 ont été récemment trouvées. Par exemple, la claudine-1 semble être importante pour la prolifération et la différenciation cellulaires, la motilité et la migration cellulaire, les régulations d'expression génique et présente des fonctions anti-apoptotiques (Alshbool and Mohan 2014).

Dans l'épiderme, les claudines-1 et -4 sont fortement exprimées dans la couche granuleuse (Figure 30), tandis que d'autres claudines, comme les claudine-3 et -12, sont peu retrouvées. C'est à ce niveau que l'on peut observer la formation des jonctions serrées en microscopie électronique.

Les souris dépourvues du gène de la claudine 1 ont un déficit de barrière cutanée, ce qui entraîne une déshydratation sévère et une mort précoce (Furuse et al. 2002).

L'absence de claudine-1 chez l'homme, due à des mutations de son gène, est responsable du syndrome NISCH (pour «syndrome d'ichtyose néonatale et de cholangite sclérosante») qui se caractérise par une peau sèche et squameuse et une inflammation des voies biliaires (Grosse et al. 2012). Une diminution de l'expression des claudines-1 et -23 est signalée dans la dermatite atopique humaine. Cette anomalie serait due à des mutations de leur gène, mais peut aussi apparaître secondairement suite à l'environnement cytokinique de type Th2. La perturbation des jonctions serrées entraîne le passage des dendrites des cellules de Langerhans jusque dans les couches superficielles de l'épiderme (Klechevsky et al. 2008). Cette incorporation dans la couche cornée peut entraîner l'activation des cellules de Langerhans puis leur migration vers les tissus lymphoïdes secondaires, pour y présenter les antigènes de l'environnement aux lymphocytes T (De Benedetto et al. 2011).

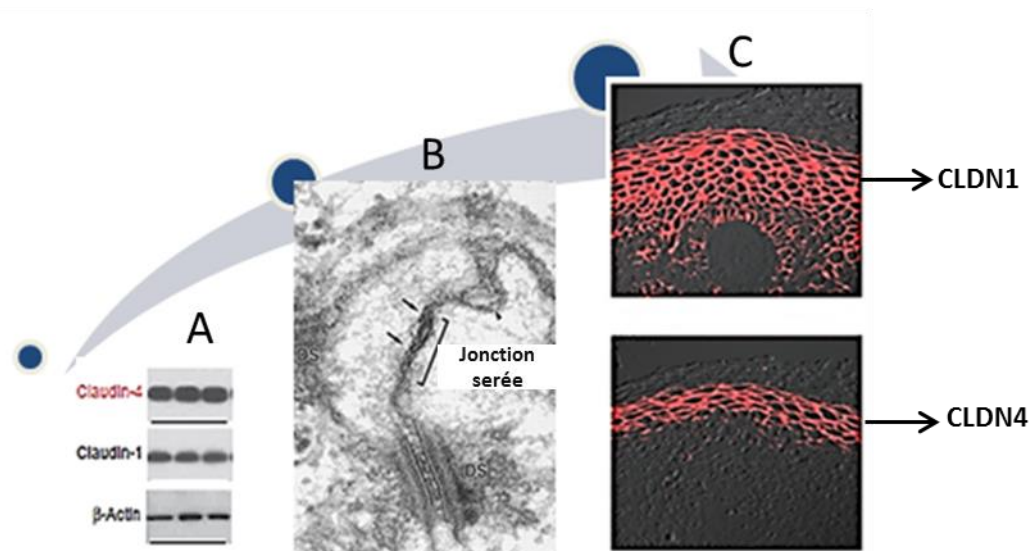


Figure 30. Analyse protéique en Western blot (A), microscopie électronique 100nm (B) et immunofluorescence 80 µm (C) des claudines 1 et 4 dans l'épiderme de souris

La Claudine 1 est exprimée dans toutes les couches de l'épiderme, tandis que la Claudine 4 est localisée surtout au niveau de la couche granuleuse. Modifié d'après (Yuki et al. 2011)(Peltonen et al. 2007)(Furuse et al. 2002)

En ce qui concerne, l'expression et la localisation des claudines dans ***l'épithélium cornéen humain***, l'utilisation de la RT-PCR a mis en évidence l'expression des ARNm de la claudine-1 mais aussi d'autres isotopes (claudine- 2, -3, -4, -7, -9 et -14) (**Figure 31**). En immunohistochimie, les claudines-1, -4 et -7 ont été localisées dans toutes les couches cellulaires de l'épithélium. Pourtant, quelques études en microscopie électronique ont montré que les jonctions serrées ne sont observables qu'au niveau des couches superficielles. La claudine-3 est absente de l'épithélium conjonctival mais est présente dans la cornée. Par contre, la claudine-10 n'est présente que dans l'épithélium conjonctival (*Yoshida, Ban, and Kinoshita 2009*).

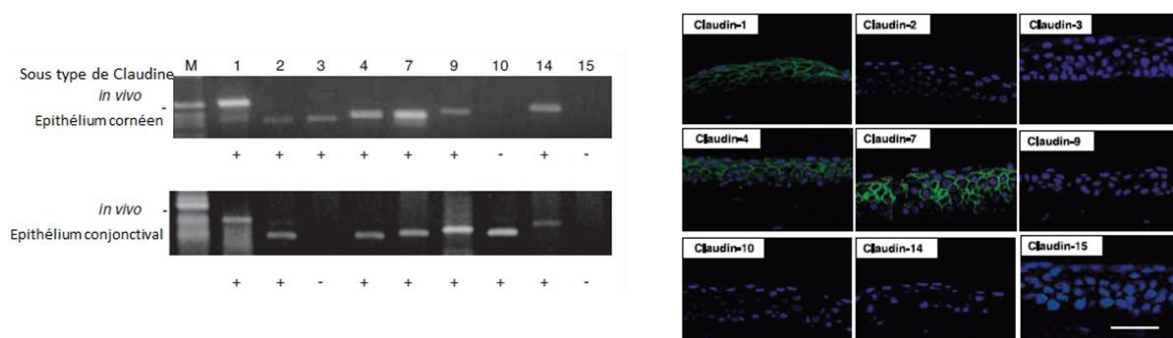


Figure 31. Analyse de la distribution des claudines par RT-PCR dans l'épithélium cornéen et conjonctival (à gauche) et par immunofluorescence dans l'épithélium cornéen (à droite). La barre d'échelle = 50 µm. D'après (Yoshida, Ban, and Kinoshita 2009)

Le troisième type de protéines transmembranaires des jonctions serrées est la protéine JAM (pour « junctional adhesion molecule »), de 33 kDa et dont la chaîne protéique traverse la membrane une seule fois.

Les protéines transmembranaires des jonctions serrées sont liées à des protéines intracellulaires comme ZO-1 et ZO-2 qui à leur tour sont fixées au cytosquelette d'actine. Cette interaction avec le cytosquelette détermine la localisation de la jonction au domaine apical de la cellule.

3.3.2 Les jonctions d'ancrage : les desmosomes

Les desmosomes sont des zones d'ancrage des filaments intermédiaires sous la forme de tache en microscopie, d'où le nom de macula. Ils vont consolider la formation des jonctions entre les cellules. Les desmosomes comportent 2 régions (**Figure 32**) :

- intracellulaire, représentée par la plaque desmosomale ;
- extracellulaire : la désmoglie ou cœur.

Les études en microscopie électronique ont permis de montrer leur structure symétrique avec au centre le cœur entouré par deux plaques discoïdes cytoplasmiques où vont s'accrocher les filaments intermédiaires de kératines.

En ce qui concerne la plaque desmosomale, elle est constituée par un groupe de protéines intra-cytoplasmiques qui favorisent la fixation aux protéines du cytosquelette et sont appelées plakines (desmoplakines 1 et 2, envoplakine et périplakine) et armadillo (plakoglobine et plakophiline).

La desmoglie est formée de protéines d'adhésion dépendant du calcium de la famille des cadhérines : desmocollines 1, 2 et 3, et desmogléines 1, 2, 3 et 4. Leur gène sont regroupés dans un cluster sur le chromosome 18. Ces cadhérines desmosomiales vont former des liaisons homophiles et hétérophiles et assurent ainsi le maintien de la forme de la cellule et une résistance cytoplasmique (*Matthieu Simon 2011*).

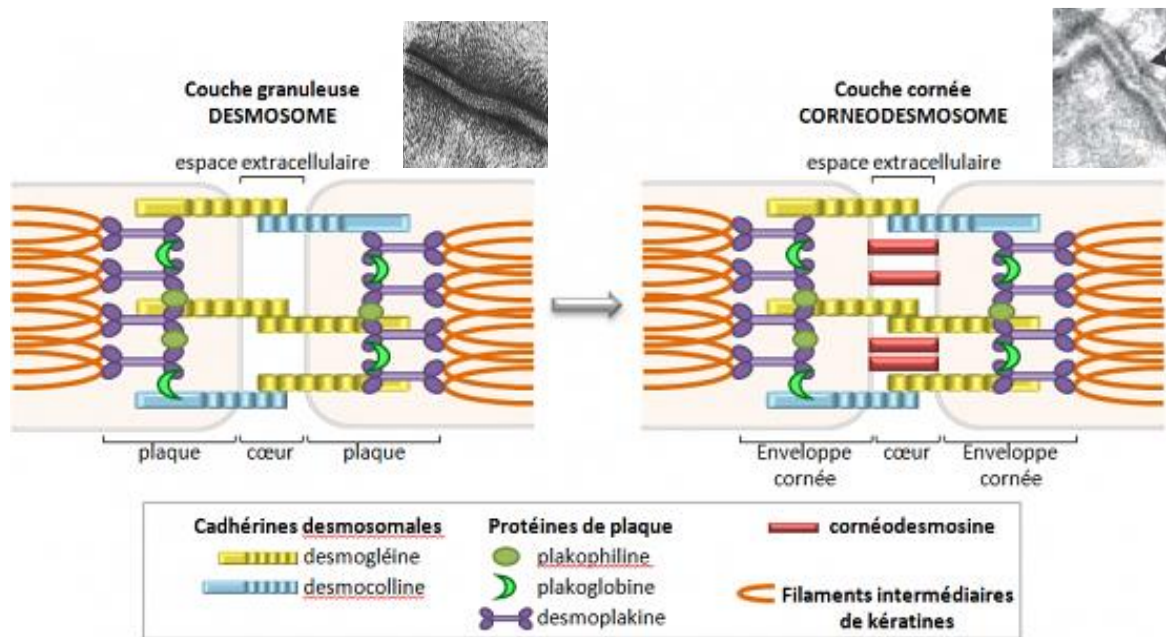


Figure 32. Représentation schématique de la structure des desmosomes et cornéodesmosomes.

D'après (Marie Reyner, 2016)

L'expression des différentes protéines desmosomales varie au cours de la différenciation épidermique (Jonca et al. 2011) (Figure 33) et ce en même temps que le nombre et la taille des desmosomes augmentent.

La formation de ces structures, responsables de l'interaction entre les cadhérines et les filaments de kératines, est régulée par le calcium ainsi que par différentes kinases et phosphatases membranaires.

La desmoplakine est la protéine majeure des plaques desmosomales. Elle est nécessaire à l'assemblage des desmosomes et à leur association avec les filaments intermédiaires.

Au cours du processus de cornification, les desmosomes subissent des modifications structurales majeures pour former les cornéodesmosomes. La plaque desmosomale est progressivement incorporée à l'enveloppe cornée jusqu'à devenir invisible en microscopie électronique et le cœur intercellulaire se densifie. Ceci s'accompagne de l'intégration d'une protéine supplémentaire, la cornéodesmosine (Figure 32). Cette protéine est synthétisée au sein des kératinocytes épineux supérieurs et granuleux. Sécrétée par l'intermédiaire des corps lamellaires, la cornéodesmosine est secondairement incorporée au niveau du cœur des desmosomes. Il s'agit de la seule protéine identifiée à ce jour comme étant spécifique des cornéodesmosomes. Son contenu riche en résidus sérine et glycine s'organisant en boucles souples est compatible avec des fonctions d'adhésion. Toutefois, ses partenaires protéiques restent encore à définir (Michel Simon et al. 2001)(Jonca et al. 2010).

Il est important de noter que la cornéodesmosine (*Michel Simon et al. 1997*) et les desmoplakines, periplakines et invoplakines sont également des composants de l'enveloppe cornée (*Huber 2003*).

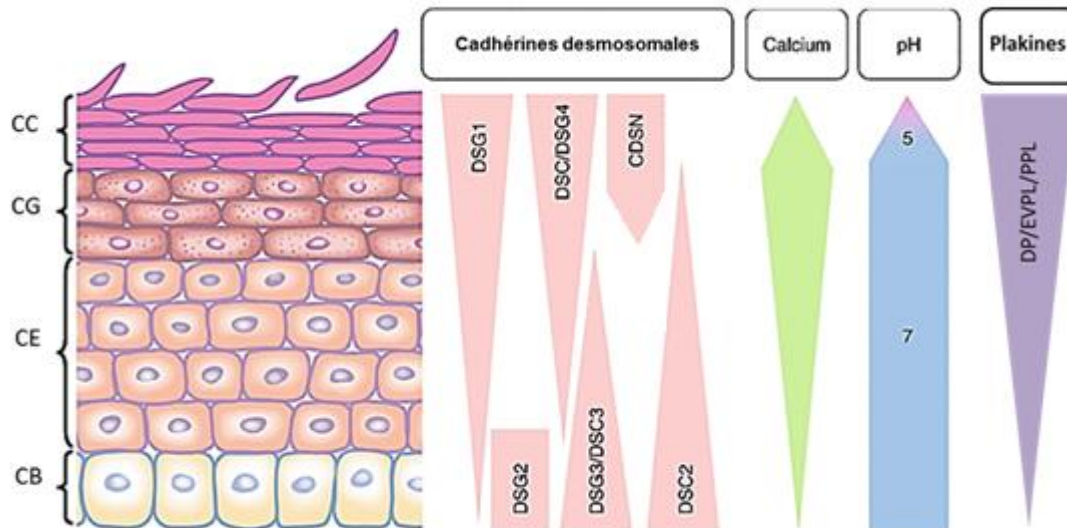


Figure 33. Représentation schématique de l'expression des protéines du desmosome et du corneodesmosome au cours de la différenciation épidermique.

DSG : desmogléine, DSC : desmocolline, CDSN : cornéodesmosine, DP : desmoplakine, EVPL : envoplakine, PPL : périplakine CB : couche basale, CE : couche épineuse, CG : couche granuleuse, CC : couche cornée. D'après (Voegeli and Rawlings 2012) et (Jonca N, Caubet C, Guerrin M, Simon M 2009)

Ainsi, on retrouve la protéine DSG2 exclusivement dans la couche basale, alors que les protéines DSC2, DSC3 et DSCG3 sont exprimées dans la couche basale puis progressivement remplacées par les protéines DSG1, DSC1 et DSG4 dans les couches les plus différenciées. L'expression des plakines (*DP, EVPL, PPL*) augmente aussi lors de la différenciation épidermique.

Des défauts des protéines desmosomales sont impliqués dans les maladies bulleuses cutanées et les cardiomyopathies. Le **pemphigus foliacé** est une maladie bulleuse auto-immune due à l'inactivation de la desmogléine-1 par des auto-anticorps. L'inactivation de la desmogléine-3 par des auto-anticorps entraîne une autre maladie bulleuse cutanée, le **pemphigus vulgaire**, caractérisée par des bulles intraépidermiques et des érosions étendues sur une peau et des muqueuses apparemment saines.

La desmogléine-1 peut aussi être inactivée par les toxines exfoliatives produites par *Staphylococcus aureus* (*Ohnemus et al. 2008*).

Les mutations non-sens du gène de la cornéodesmosine sont responsables de deux maladies rares, *l'hypotrichose simple du cuir chevelu* (Levy-Nissenbaum et al. 2003) et *le syndrome de la peau qui pèle* (Mazereeuw-Hautier et al. 2011).

Dans l'oeil, l'expression des isoformes des glycoprotéines desmosomales a été étudiée dans l'épithélium cornéen et conjonctival bovin (Messent et al. 2000). La desmocolline 2 (Dsc2) et la desmogléine 2 (Dsg2) sont exprimées dans l'ensemble de l'épithélium cornéen et conjonctival (Figure 34 et 35), les Dsc3 et Dsg3 ne sont détectées que dans l'épithélium conjonctival ; de plus, les études en immunofluorescence ont montré que les Dsc3 et Dsg3 sont retrouvées essentiellement au niveau de la couche basale.

Les Dsc1 et Dsg1 ne sont pas détectées. Cette absence de Dsc1 et Dsg1 pourrait être corrélée à l'absence de kératinisation des épithéliums oculaires.

Dans l'épithélium cornéen, les desmosomes sont les plus nombreux dans les couches superficielles (Hogan, Alvarado, and Weddell 1971). Cette particularité assure une forte adhésion intercellulaire et le maintien de l'intégrité de l'épithélium lors de l'abrasion créée par le clignotement et les mouvements oculaires.

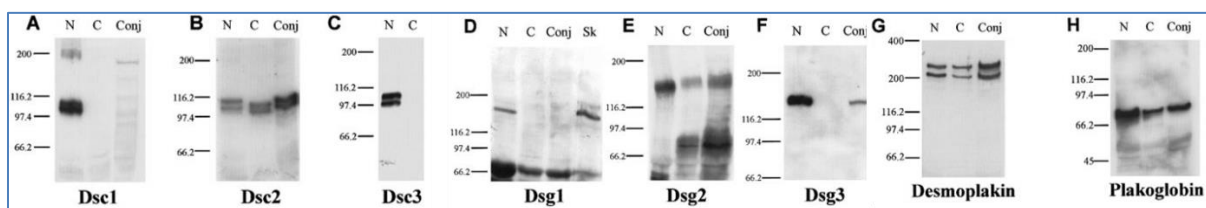
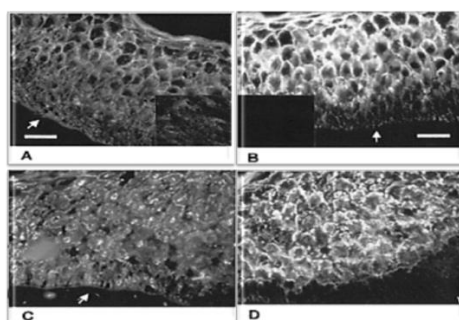


Figure 34. Analyse par Western blot des différentes protéines des desmosomes dans l'épithélium nasal (N), cornéen (C) et conjonctival (Conj) du bœuf.

D'après (Messent et al. 2000)

Figure 35. Localisation des Dsc et Dsg dans l'épithélium cornéen central (A,B) et limbique (C,D) bovin.



Analyse immunohistochimique sur des cryocoupes avec des anticorps anti-Dsc2 (A, C) et anti-Dsg2 (B, D). Barres d'échelle, 50µm.

A- Couches basales
B- Cornée centrale
C, D Limbe

Tableau 2 Distribution des glycoprotéines desmosomales dans les épithéliums cornéen, conjonctival et épiderme bovin

	DSC1/DSG1			DSC2/DSG2			DSC3/DSG3		
	B	I	S	B	I	S	B	I	S
Peau	-	-/+	+++	++	+++	++	+++	+	-
Cornée	-	-	-	+++	+++	+++	-	-	-
Conjonctive	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+	-

B=basale ; I= intermédiaires ; S= superficielle.

+++ Forte expression ; ++moyenne expression ; + faible expression ; -/+ très faible expression ; - manque d'expression. DSC= desmocolline ; DSG= desmogléine

Des maladies cornéennes liées aux anomalies des protéines desmosomales n'ont pas été décrites dans la littérature. Cependant, une étude allemande (Vielmuth et al. 2016) a montré que les souris dont le gène de la Dsg 3 a été inactivé présentent des bulles intra-épidermiques et souffrent fréquemment de lésions oculaires, histologiquement évidentes sous forme de détachements des couches superficielles de l'épithélium cornéen (Figure 36).

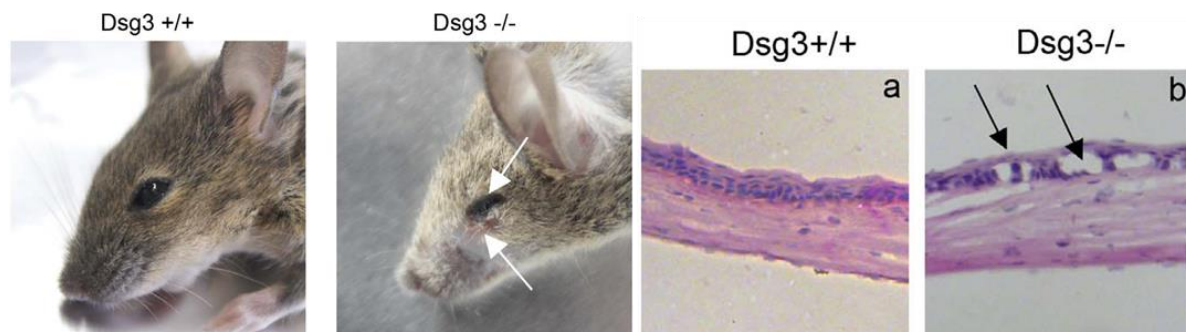


Figure 36. Les souris Dsg3 KO présentent des lésions oculaires.

Contrairement à des souris normales (WT) (à gauche), les souris Dsg3 KO ont des atteintes oculaires macroscopiquement visibles sous forme de rougeur bulbaire, des paupières collées et de petits saignements à l'angle interne de l'œil (à droite, flèches). La coloration en hémalin-éosine (à droite) montre des déchirures locales dans les couches superficielles de l'épithélium cornéen (flèches). D'après (Vielmuth et al. 2016)

3.4 Le complexe de différenciation épidermique.

Lors de la différenciation terminale de l'épiderme, les kératinocytes subissent de multiples changements morphologiques et biochimiques ; en particulier ils synthétisent une structure

péricellulaire rigide et insoluble, l'enveloppe cornée. Pour assurer la construction de cette coque, les liaisons qui se créent entre ses composants sont des liaisons covalentes. L'enveloppe cornée se met en place progressivement et en 3 étapes, comme décrit en 2001 ([A. Kalinin, Marekov, and Steinert 2001](#)) (**Figure 37**).

- Dans la 1ère étape on a l'association du complexe periplakine-envoplakine et de l'involucrine sous la membrane plasmique d'une manière calcium dépendante, catalysée par la transglutaminase 1.
- Dans la 2ème étape on assiste à une formation des corps lamellaires qui dérivent de l'appareil de Golgi (en particulier de leurs lipides) dans la région de transition entre couche granuleuse/couche cornée. Certains d'entre eux (oméga-hydroxy-céramides) sont liés sur la face externe des enveloppes.
- En 3ème étape, les transglutaminases 3 assurent la liaison covalente de la loricrine, la protéine la plus abondante de l'enveloppe cornée, et des SPRRs (small proline rich proteins) à l'échafaudage protéique précédent.

Finalement, les filaments intermédiaires (notamment les kératines 1 et 10) et une partie de la filaggrine vont être liés sur la face interne des enveloppes afin de former une véritable barrière mécanique.

Les composants des enveloppes sont réticulés par des transglutaminases, enzymes dépendantes du Ca^{2+} qui catalysent la formation de liaisons N- ϵ (γ -glutamyl)-lysine entre les protéines. Sept transglutaminases ont été identifiées chez l'homme ([J. S. K. Chen and Mehta 1999](#)), et les cellules épidermiques en expriment quatre, les transglutaminases 1, 2, 3 et 5 ([Esposito and Caputo 2005](#)). Seules les isoformes 1,3 et 5 sont impliquées dans la formation des enveloppes cornées.

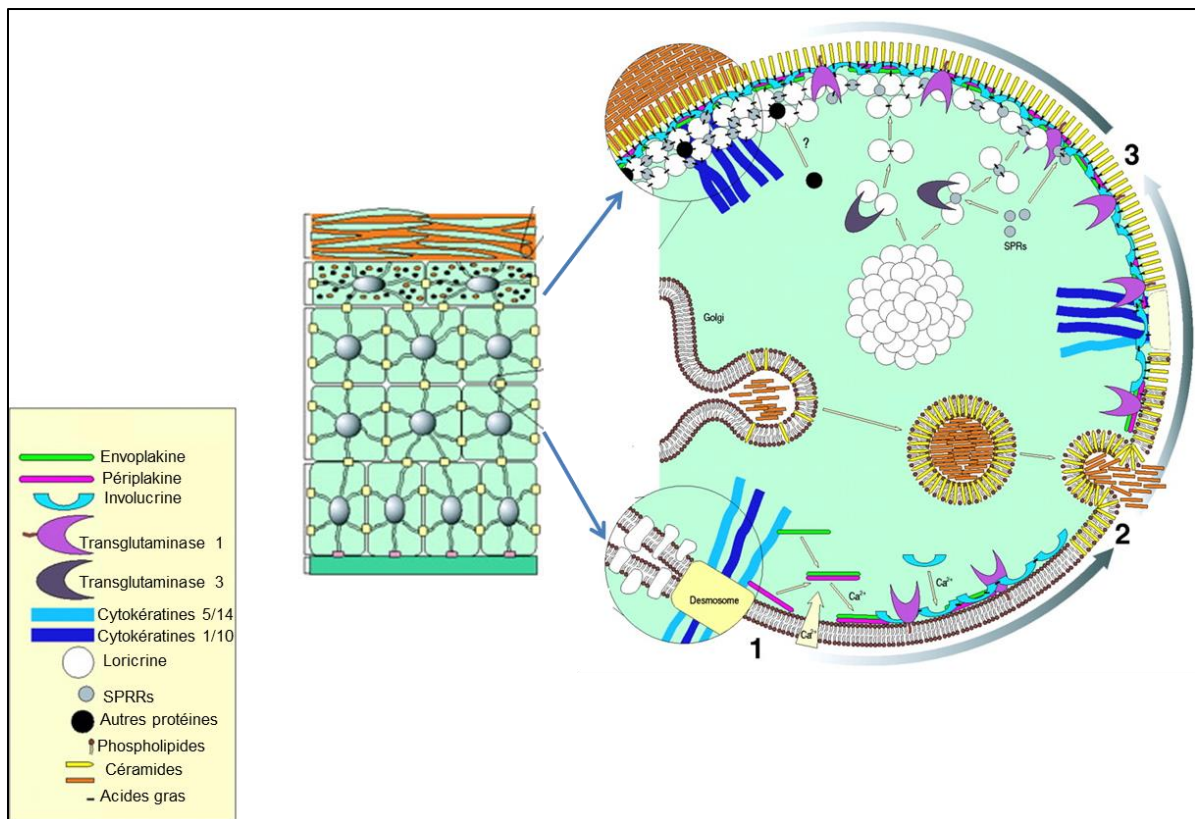


Figure 37. Les trois étapes de la formation de l'enveloppe cornée.

Voir le texte ci-dessus. D'après (A. E. Kalinin, Kajava, and Steinert 2002)

L'enveloppe cornée, de par son échafaudage protéique, la séquestration des microfibrilles de kératines de la matrice cornéocytaire et sa composante lipidique ancrée aux lipides des espaces intercornéocytaires, contribue aux propriétés biomécaniques de la couche cornée.

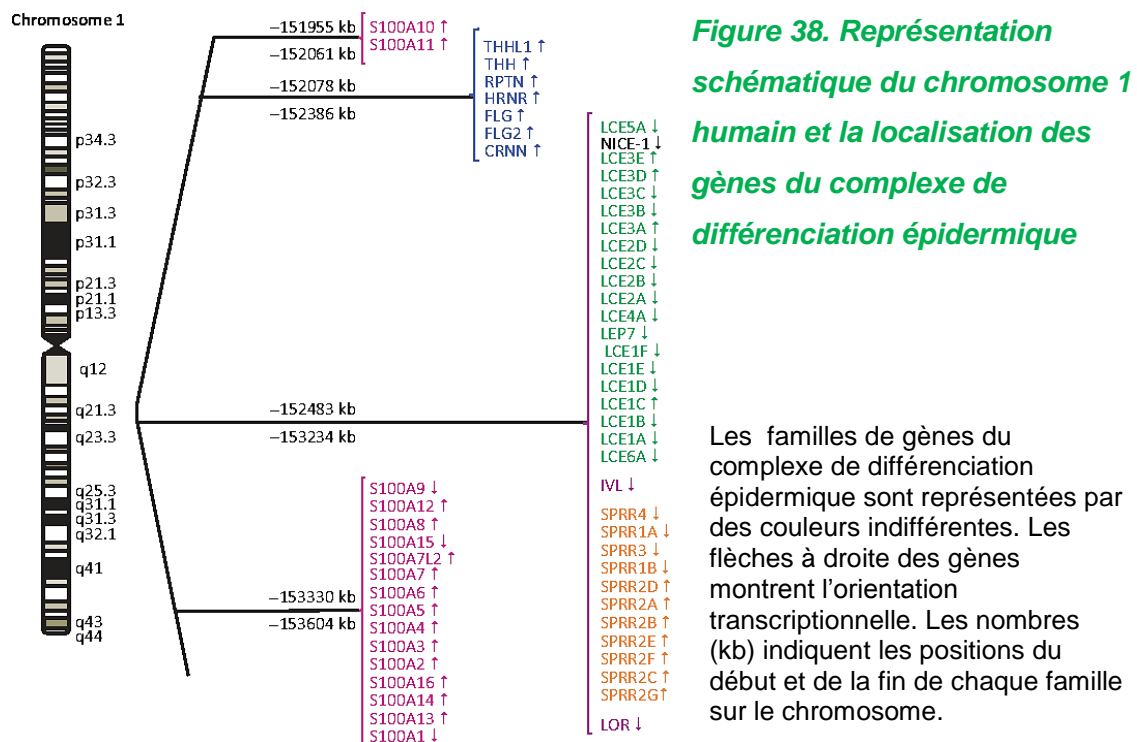
Parallèlement, les lipides (phospholipides, cholestérol et glucosylcéramides) s'accumulent dans les corps lamellaires, organites tubulo-vésiculaires de sécrétion, qui se développent à partir de l'appareil de Golgi. Les corps lamellaires sécrètent ces lipides et leur contenu protéique (lipases, protéases, inhibiteurs de protéases, cornéodesmosine, etc.) dans les espaces intercellulaires. Les lipides (acides gras libres, céramides, cholestérol) issus de la modification dans les espaces intercornéocytaires des espèces sécrétés s'assemblent sous forme de lamelles parallèles à la surface des cornéocytes. Ils assurent l'étanchéité de la couche cornée.

Le stratum corneum est maintenu par un équilibre entre le renouvellement constant et la desquamation des cornéocytes. La desquamation dépend de l'équilibre entre la synthèse des protéines structurales des cornéodesmosomes et leur dégradation par des protéases spécifiques (kallikréines 5, 7 et 14, et éventuellement la kallikréine 8 et l'élastase 2). Leur

activité enzymatique est contrôlée par un gradient de pH dans la couche cornée (de 7 à 5,5) et par des inhibiteurs de protéases.

De nombreux gènes qui codent pour les protéines de l'enveloppe cornée sont localisés dans la même région du chromosome 1 (1q21) (**Figure 38**), nommé "complexe de différenciation épidermique" (*Mischke et al. 1996*). Outre les gènes de l'involucrine et la loricrine, ce locus contient quatre familles de gènes qui sont exprimés dans l'épiderme et codent pour :

- un groupe des protéines précurseurs de l'enveloppe cornée, les SPRRs. un autre groupe des protéines tardives de l'enveloppe cornée (late cornified envelope, LCE).
- des protéines liant le calcium (S100) avec deux domaines EF-hand (*Marenholz, Heizmann, and Fritz 2004*).
- les protéines de la famille des SFTPs (S100-Fused Type Proteins) : la filaggrine, la filaggrine 2, la trichohyaline, la trichohyaline-like, l'hornerine, la répétine et la cornuline.



D'après (Kyriiotou, Huber, and Hohl 2012)

3.4.1 La régulation de l'expression des gènes du complexe de différenciation épidermique

Malgré le regroupement des gènes sur une région spécifique, 1q21, un régulateur unique de leur expression, de façon similaire au locus des immunoglobulines, n'a pas encore été identifié. Ainsi, il semble que l'expression des gènes soit contrôlée par un pool de régulateurs transcriptionnels, comprenant les facteurs AP1, AP2, Sp1, Ets et *POU* (*Rossi et al. 1998*)(*Jang and Steinert 2002*).

Il existe d'autres facteurs de transcription qui sont cruciaux pour la formation d'une barrière épidermique mature, et dont l'ablation chez la souris est mortelle :

- Les souris «Kruppel-like factor 4» (Klf4) –KO meurent après la naissance suite à un défaut de barrière avec des lamelles lipidiques défectueuses.
- L'ablation épidermique du gène *Gata 3* provoque la mort périnatale des souris en raison d'une synthèse défectueuse des lipides et une différenciation anormale avec une perte de la fonction de barrière. Il en résulte une diminution de l'expression en ARNm de l'hornerine, de la lorocrine, de l'involucrine et une hyperprolifération avec augmentation de l'expression des kératines K6/K16 (*de Guzman Strong et al. 2006*).

3.4.2 L'involucrine

L'involucrine est un composant mineur en quantité de l'enveloppe cornée (2-5% chez les humains) mais très important pour les premières étapes de sa formation (*Marekov and Steinert 1998*).

Le gène de l'involucrine humaine code pour une protéine de 585 acides aminés (120 kDa) qui est riche en glutamate et contient une région interne composée de 39 répétitions de 10 acides aminés. Elle est exprimée dans les épithéliums squameux stratifiés au niveau des couches épineuse supérieure et granuleuse (**Figure 39**) ainsi que dans les gaines épithéliales interne et externe des follicules pileux (*de Viragh, Huber, and Hohl 1994*).

La régulation du promoteur du gène *IVL* implique deux régions distinctes : une région régulatrice distale située à -2473 / -1953 pb et une région régulatrice proximale à -241 / -7 pb. La transcription du gène de l'involucrine est augmentée par l'influx calcique, l'activation de la Protéine Kinase C et les esters de phorbol via la voie de signalisation des MAP Kinases et est diminuée par les rétinoïdes et par l'IL 4 et l'IL 13 (*Eckert et al. 2004*) (*B. E. Kim et al. 2008*). Un équilibre entre les activateurs transcriptionnels AP1 (*Welter et al. 1995*), Sp1 et C / EBPalpha, et les inhibiteurs transcriptionnels, tels que les protéines à domaine POU, sont responsables du contrôle du promoteur du gène *IVL* (*Eckert et al. 2004*).

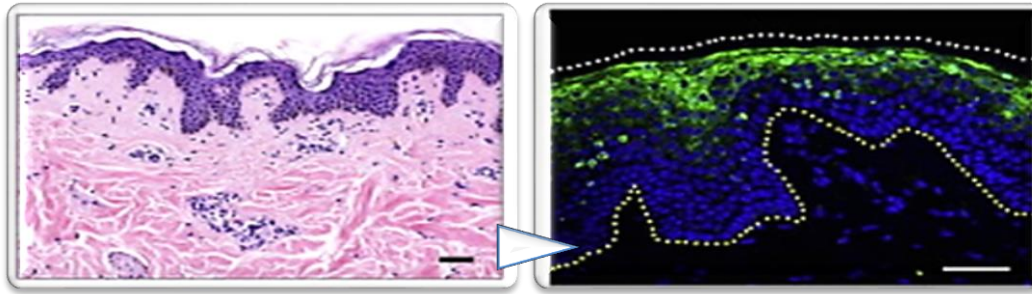
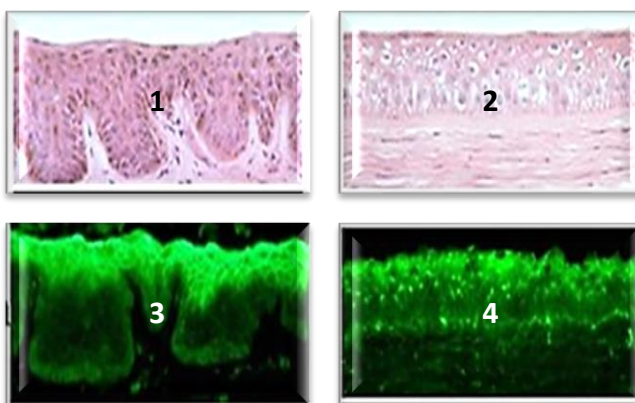


Figure 39. Marquage par immunofluorescence indirecte (à droite) de l'involucrine sur des coupes d'épiderme murin.

A gauche- l'épiderme vu en coloration hémalum-éosine. Les barres d'échelle = 50 µm. D'après (Sriram et al. 2018)

Les souris dont le gène de l'involucrine a été inactivé sont en bonne santé et leurs enveloppes cornées semblent normales. Les loricrine et SPRR1 sont normalement exprimées, ce qui suggère l'absence de mécanismes compensatoires (Djian, Easley, and Green 2000). Les souris triple-KO pour l'involucrine, l'envoplakine et la périplakine présentent un défaut de barrière épidermique (qui n'est pas observé dans les doubles KO envoplakine et périplakine) (Sevilla et al. 2007).

L'épithélium cornéen ne contient pas de couche cornée. Néanmoins, l'involucrine y est exprimée (Figure 40), dans les couches superficielles. Une production accrue de l'involucrine et de la protéine SPRR-2 a été observé dans un modèle murin d'œil sec avec l'osmolarité des larmes 2 fois plus élevée que normalement (Stewart et al. 2005).



1,2 Les épithéliums limbique et central colorés à l'hémalum-éosine

Figure 40. Marquage par immunofluorescence indirecte de l'involucrine sur des coupes de l'épithélium cornéen humain (3,4).

D'après (Lin et al. 2012)

3.4.3 La loricrine

La loricrine humaine (26 kDa) est l'élément le plus abondant de l'enveloppe cornée (65-70%) (*Daniel Hohl et al. 1991*), ce qui en fait donc une protéine majeure de la différenciation terminale du kératinocyte. Elle est exprimée tardivement dans la couche granuleuse de l'épiderme (*D Hohl 1990*). Riche en glycine et sérine, la loricrine forme des structures tridimensionnelles en boucles dites «boucles glycine» qui lui confèrent une grande flexibilité. C'est grâce à la présence de nombreux résidus cystéine, que ces boucles sont stabilisées par des ponts disulfures (*Mehrel et al. 1990*).

La régulation de son expression implique de multiples facteurs de transcription tels que AP1, Sp1 et p300 / CBP (*Jang and Steinert 2002*). Comme pour les autres précurseurs de la couche cornée, l'expression de la loricrine est induite par le calcium et inhibée par les rétinoïdes (*D Hohl et al. 1991*).

Le rôle essentiel de la loricrine dans l'homéostasie de la barrière épidermique a été mis en évidence par le développement de modèles murins. Ainsi, les souris déficientes en loricrine naissent avec une érythrodermie, un érythème inflammatoire concernant plus de 90 % de la peau. Ce phénotype disparaît 4-5 jours après la naissance par un processus de compensation par accumulation d'autres protéines du complexe de différenciation épidermique telles que la répétine, les SPRR2D et 2H et les protéines LCE. Cependant, ce mécanisme n'est pas suffisant pour surmonter la fragilité de la couche cornée à des contraintes mécanique (*Koch et al. 2000*).

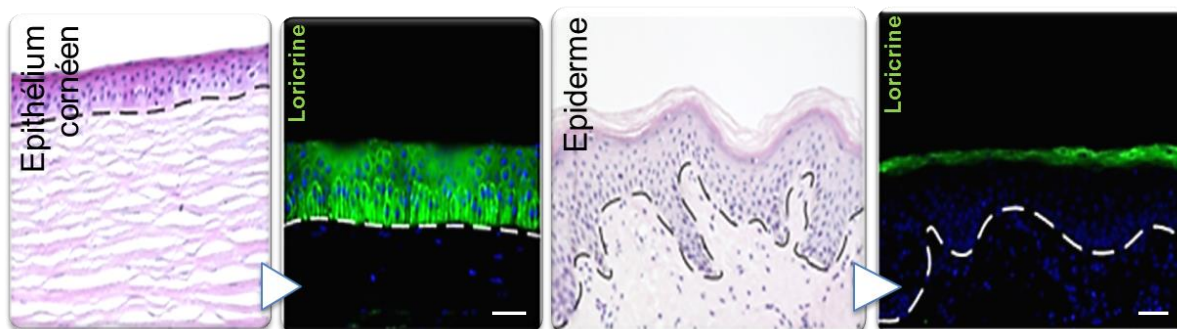


Figure 41. Marquage par immunofluorescence indirecte de la loricrine sur des coupes d'épithélium cornéen et d'épiderme humains.

Les noyaux ont été marqués avec le DAPI (bleu). Les lignes en pointillés indiquent la membrane basale et la barre d'échelle est égale à 20 μ m. D'après (*Lotz et al. 2018*)

Des mutations du gène de la loricrine humaine par insertion d'un nucléotide ont des conséquences plus graves en ce qui concerne l'intégrité de l'épiderme et sont la cause d'une forme particulière de kératodermie (*A. E. Kalinin, Kajava, and Steinert 2002*), le

syndrome de Vohwinkel. C'est une affection héréditaire rare, caractérisée par une atteinte potentiellement mutilante des doigts et des orteils. Outre une kératodermie avec kératose en nid d'abeille, il existe, parfois dès le plus jeune âge, un processus d'installation de brides circulaires constrictives au niveau des doigts.

Dans l'épithélium cornéen, la loricrine est exprimée dans toutes les assises cellulaires (Figure 41).

3.4.4 La famille SFTPs : exemple des filaggrine, filaggrine 2 et hornerine

La famille des **SFTPs** comporte sept membres qui présentent beaucoup de similitudes entre eux. Il semble qu'ils résultent d'une fusion de gènes des protéines S100A avec des gènes de précurseurs de l'enveloppe cornée. Leur gène sont constitués de 3 exons, dont le premier est non codant. Leur composition en acides aminés est très proche, la plupart étant riches en serine, glycine et histidine.

La filaggrine

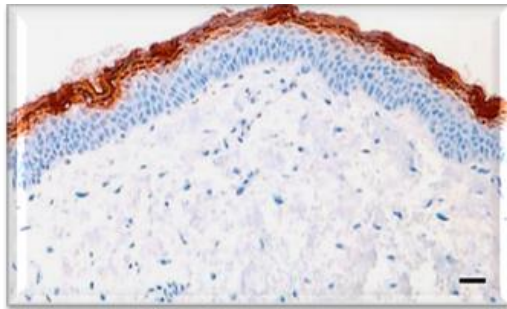
Le premier gène de cette famille qui a été étudié est celui de la filaggrine (Dale 1977). La filaggrine est présente au niveau de l'épiderme, de l'épithélium de la langue, du palais dur et de la gencive, et de la muqueuse buccale (Manabe and O'Guin 1994). Comme son nom l'indique, elle est impliquée dans les phénomènes d'agrégation des filaments intermédiaires. La filaggrine est synthétisée sous forme d'un précurseur nommé la profilaggrine (400 kDa chez l'homme) et stockée sous forme insoluble dans les grains de kératohyaline cytoplasmique (dans la couche granuleuse de l'épiderme). Au cours de la cornification, la profilaggrine est déphosphorylée et transformée par protéolyse en monomères de filaggrine (324 acides aminés; 37 kDa chez l'homme) (Henry et al. 2012).

Dans la couche cornée inférieure, la désimination des résidus arginyle de la filaggrine par les peptidylarginine désiminases de types 1 et 3 (PAD1 et PAD3) entraîne la dissociation de la filaggrine de sa matrice (Méchin et al. 2007) et favorise sa dégradation en acides aminés libres. Ceux-ci sont importants pour la production du facteur naturel d'hydratation, pour la rétention d'eau dans la couche cornée (en particulier l'acide pyrrolidone carboxylique dérivé de la glutamine) (Rawlings and Harding 2004) et pour la protection des UV (en particulier l'acide urocanique dérivé de l'histidine) (Barresi et al. 2011).

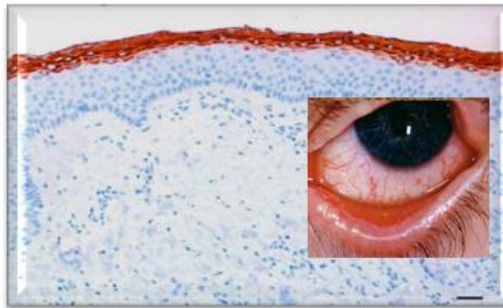
On retrouve une partie de la filaggrine incorporée dans l'enveloppe cornée, avec des kératines, ce qui augmente la résistance mécanique des cornéocytes (Michel Simon et al. 1996).

L'importance de la filaggrine dans l'homéostasie cutanée a été récemment démontrée lorsque des mutations non-sens de son gène (*FLG*) se sont avérées responsables de

l'ichtyose vulgaire (F. J. D. Smith et al. 2006) et constituent un facteur de risque majeur du développement de la dermatite atopique (Palmer et al. 2006).



Dans les échantillons de peau, la filaggrine a été détectée dans les couches superficielles de l'épiderme (Barre d'échelle 100 μ m)



Dans la conjonctive normale, la filaggrine est absente. Pourtant on retrouve le même marquage de la filaggrine dans le syndrome Stevens Johnson au niveau des couches parakératinisées de l'épithélium

(Barre d'échelle 100 μ m)

Figure 42. Expression de la filaggrine dans l'épiderme normal et l'épithélium conjonctival pathologique (dans le Syndrome Stevens- Johnson)

D'après (Lund 2012)

Au niveau oculaire, la filaggrine est peu exprimée dans l'épithélium cornéen et conjonctival normal (Lapp et al. 2014), par contre elle est retrouvée dans la conjonctive kératinisée (Stevens-Johnson syndrome) ou dans les métaplasies conjonctivales (Figure 42) (Lund 2012).

L'hornerine

Le gène *HRNR* humain code pour l'hornerine (également connue sous le nom de S100A18), une protéine de 2850 acides aminés ayant une masse moléculaire estimée à 282 kDa. Le grand domaine central se compose de six sous-unités de base répétées en tandem (468-22 acides aminés), chacune étant divisée en 3 segments A, B et C.

L'hornerine humaine est détectée dans les couches les plus différenciées de l'épiderme, d'où son nom (« horny layers »). Elle est présente dans le cytoplasme des kératinocytes dans la couche granuleuse de l'épiderme, à la périphérie des granules de kératohyaline. Dans la couche cornée, alors que la filaggrine est principalement détectée dans la matrice fibreuse intracornéocytaire des cornéocytes inférieurs, l'hornerine est détectée à la périphérie de tous les cornéocytes. Elle est incorporée dans l'enveloppe cornée. L'hornerine, comme la filaggrine, est produite sous forme de grand précurseur puis traitée par protéolyse

au cours de la cornification (*Henry et al. 2011*). Elle est crosslinkée par la transglutaminase 3 in vitro, formant des oligomères de haut poids moléculaire (*Makino et al. 2001*).

Le rôle principal de l'hornerine consiste à renforcer les enveloppes et à contribuer à la résistance mécanique de la couche cornée de l'épiderme. Un rôle dans la défense antimicrobienne a également été proposé pour certains peptides dérivés de l'hornerine qui inhibent la croissance d'E.coli, Pseudomonas aeruginosa et C.albicans (*Gerstel et al, Scientific reports, 2018*).

Son expression est réduite dans l'épiderme des patients atteints de dermatite atopique et de psoriasis (*Henry et al. 2011*).

Au niveau de la **surface oculaire**, on retrouve l'hornerine dans l'épithélium cornéen, dans la conjonctive ainsi qu'au niveau de l'appareil lacrymal (**Figure 43**) où elle joue plutôt un rôle antimicrobien (*Garreis et al. 2017*).

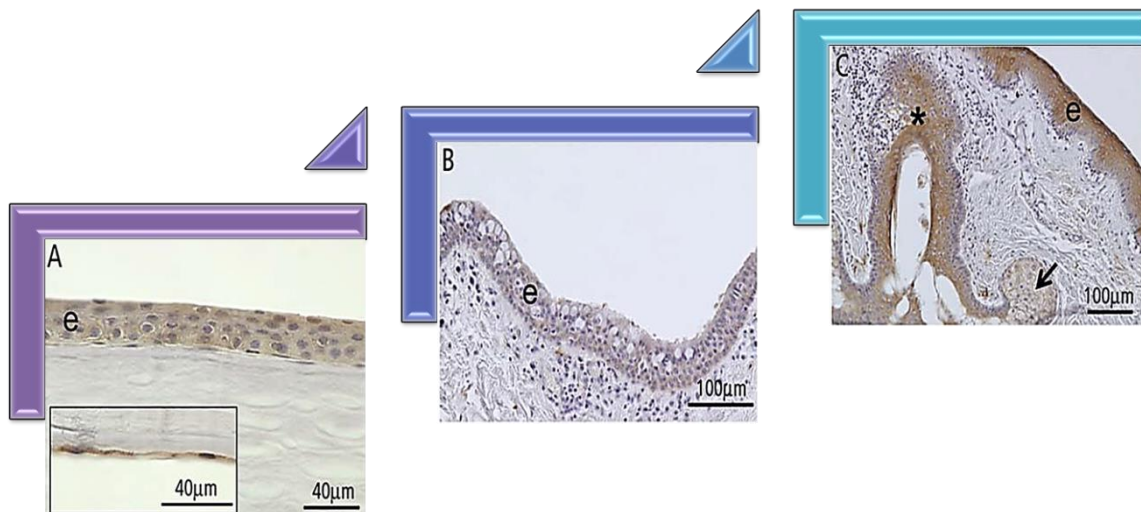


Figure 43. Analyse par immunohistochimie de l'expression de l'HRNR dans les structures oculaires.

La localisation de l'HRNR est marquée (marron) dans les cellules épithéliales (e) de la cornée (A), de la conjonctive (B), de l'épiderme et du follicule pileux (*) de la paupière (C)

D'après (Garreis et al. 2017)

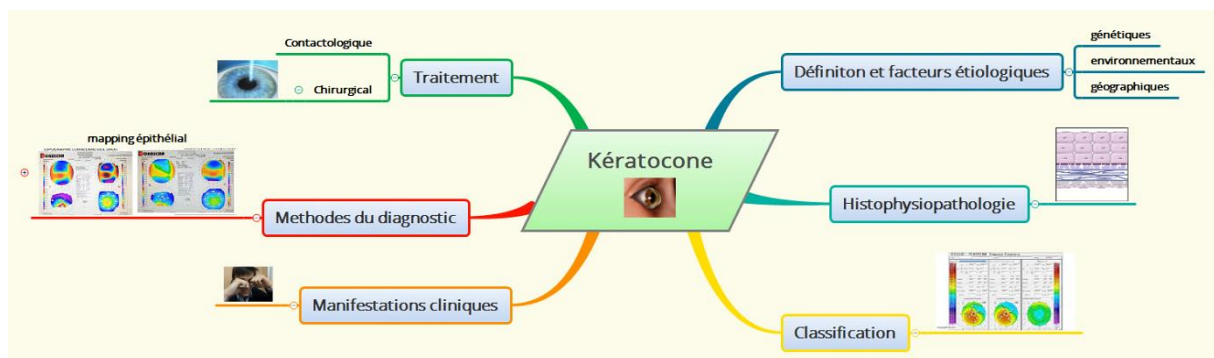
La filaggrine 2

La filaggrine 2 humaine est une protéine de 248 kDa qui présente de nombreuses analogies avec la filaggrine et l'hornerine. Chez l'homme on la retrouve au niveau de l'estomac, du thymus, des testicules, des amygdales, du placenta et de la peau. Dans l'épiderme, la filaggrine-2 est principalement détectée dans les couches granuleuse et cornée (*Hansmann et al. 2012*). Au niveau de la dernière assise de la couche granuleuse et des premières assises de la couche cornée, Hsu et al ont retrouvé une colocalisation de la

filaggrine et de la filaggrine 2. Puis les deux protéines sont dégradées, simultanément, vraisemblablement par les mêmes enzymes (*C. Y. Hsu et al. 2011*).

L'expression de la filaggrine 2 est réduite dans l'épiderme des patients atteints de DA, probablement sous l'effet des cytokines pro-inflammatoires de type II (IL4, IL13, etc.). Des mutations non-sens de son gène sont associées à une forme persistante de la maladie dans les populations Afro-Américaines (*Margolis et al. 2014*) et responsables d'une génodermatose rare, le « peeling skin syndrome » de type A (*Mohamad et al. 2018*). Le rôle de la filaggrine-2 n'est toujours pas clair. La structure moléculaire et la composition en acides aminés de la filaggrine, de l'hornerine et de la filaggrine-2 indiquent que ces protéines ont des fonctions similaires ou complémentaires dans l'épiderme (composants du facteur naturel d'hydratation, agrégation des filaments intermédiaires, photo protection de la couche cornée, etc). Il a très récemment été montré que la partie amino-terminale de la filaggrine 2 est liée de manière covalente aux enveloppes cornées (*Albérola et al., 2019*).

Partie 4. Le kératocône : une pathologie cornéenne mystérieuse



4.1 Définition

Le kératocône (KC) (**Figure 44**) est une maladie cornéenne évolutive, caractérisée par un amincissement progressif de la cornée, à l'origine de l'apparition d'une protrusion cornéenne, d'un astigmatisme irrégulier et d'une diminution de l'acuité visuelle.

C'est une maladie cornéenne le plus souvent bilatérale (dans plus de 95 % des cas) mais il est fréquent qu'elle soit asymétrique, avec un délai de survenue et d'aggravation variables sur le deuxième œil.

Cette affection concerne 1 personne sur 2 000 (*M C Kenney et al. 1994*) et son incidence paraît stable. Même s'il s'agit d'une maladie rare, le KC est toutefois désigné comme la maladie de la cornée la plus fréquente dans la population générale.

La prévalence rapportée du KC varie considérablement en fonction de l'emplacement géographique, des critères de diagnostic utilisés et de la cohorte de patients sélectionnés. La prévalence dans différentes études peut varier de 0,3 pour 100 000 (0,0003%) en Russie (*Gorskova and Sevost'ianov 1998*) à 2300 pour 100 000 en Inde centrale (2,3%) (*Jonas et al. 2009a*). En France, la prévalence est estimée à 50 cas pour 100 000 habitants.

Le KC touche indifféremment les deux sexes, mais une légère prédominance masculine est rapportée (*Pearson et al. 2000a*)(*Owens and Gamble 2003*).

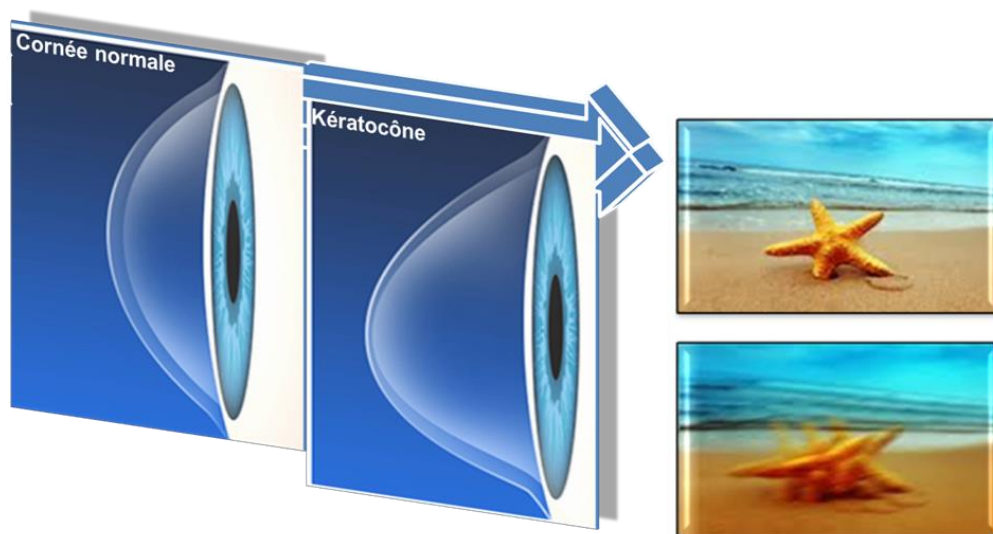


Figure 44. Représentation schématique d'une cornée normale et d'une cornée kératocônique avec image simulée des troubles de la vision.

D'après <http://www.opervisus.ru/keratokonus.htm>

L'âge de survenue du KC varie selon les séries. Une série multicentrique (**Figure 45**) de 38 centres portant sur 1579 patients rapporte un âge moyen de découverte de $27,3 \pm 9,5$ ans avec près de 90% des patients diagnostiqués entre 10 et 39 ans (*Zadnik K, Barr JT, Gordon MO 1996*).

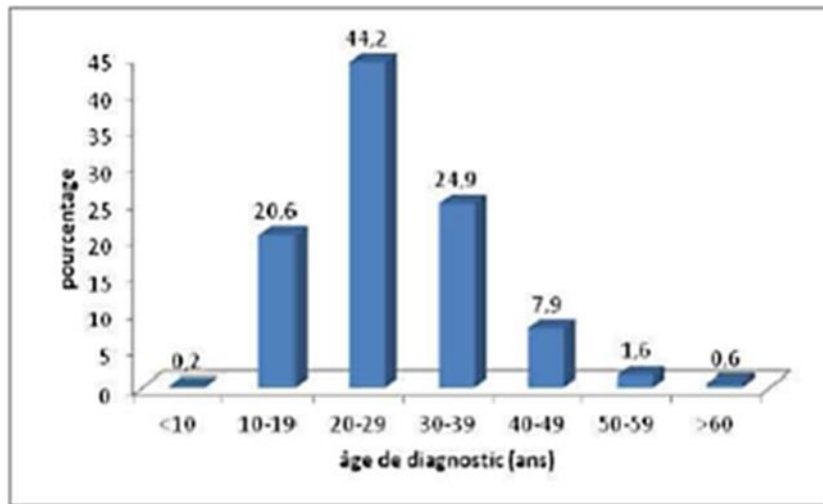


Figure 45. Distribution des âges de découverte du KC.

D'après (Zadnik K, Barr JT, Gordon MO 1996)

Classiquement, on considère que la maladie est typiquement diagnostiquée durant l'adolescence et atteint son stade le plus avancé vers 20-30 ans. Le bombement (la localisation du cône) est le plus souvent inféro-nasal, dans 50 à 70% des cas, inféro-temporal dans 31% des cas et dans les autres quadrants dans 7% des cas (Schmitt, Simonpoli, and Colin 2008).

4.2 Étiologie et facteurs de risque

L'étiologie du KC est inconnue et est probablement multifactorielle. Plusieurs facteurs sont impliqués dans la physiopathologie du KC : génétiques, environnementaux ou géographiques.

4.2.1 Facteurs génétiques

Dans la majorité des cas, le KC est sporadique. Cependant, 6 à 23,5% des patients kératocôniques ont des antécédents familiaux (Karimian et al. 2008). Ainsi, une origine génétique du KC a été suggérée à partir des résultats de certaines études épidémiologiques.

L'étude des arbres généalogiques a fait envisager plusieurs modes de transmission possibles. Le plus probable, la transmission autosomique dominante est l'hypothèse la plus convaincante (Parker et al. 1996)(Michael A. Hauser et al. 2012).

Wang et al. ont suggéré que le KC est probablement hérité en raison d'un défaut majeur de gènes (Y Wang et al. 2000), tandis que Kriszt et al. ont indiqué que le KC est une maladie complexe non mendélienne (Kriszt et al. 2014).

Les études réalisées avant les techniques de topographie cornéenne ont rapporté que 6 à 8% des sujets avec un KC avaient des proches touchés par la maladie ([Hammerstein 1974](#)). Cependant, les analyses de la topographie cornéenne ont montré que jusqu'à 50% des sujets atteints de KC ont au moins un proche parent affecté par la maladie ([V. Gonzalez and McDonnell 1992](#)). Or, les enfants de patients atteints de KC ont un risque de 15 à 67 fois supérieur de développer un KC que ceux qui n'ont pas d'antécédents de KC dans leur famille.

À ce jour, 19 paires de jumeaux monozygotes atteints de KC ont été décrits dans la littérature. Dans la plupart des cas, les deux jumeaux ont été touchés, bien qu'avec des niveaux de gravité différents ([Weed, MacEwen, and McGhee 2006](#)) ou similaires ([Bechara, Waring, and Inslér 1996](#)), ce qui suggère la présence d'une forte composante génétique nécessaire pour le développement de la maladie, peut-être aussi combinée avec des facteurs environnementaux. Cependant, lors d'une autre étude de deux paires de jumeaux, les auteurs n'ont pas réussi à détecter de KC chez le deuxième jumeau ([McMahon et al. 1999](#)).

Néanmoins, aucune étude génétique n'a permis d'identifier une mutation responsable de la maladie, et l'étude de gènes candidats demeure décevante. En l'absence de cause précise, le KC est considéré comme une pathologie d'origine multifactorielle, dont les manifestations cliniques sont favorisées par la conjonction de phénomènes environnementaux et d'un terrain génétique propice ([Michael A. Hauser et al. 2012](#))

De ce fait, on peut dire qu'en ce qui concerne son étiologie génétique, le KC est compatible avec une transmission autosomique et un taux de concordance plus élevé chez les jumeaux monozygotes comparé aux jumeaux dizygotes ([Parker et al. 1996](#)).

Tableau 3. Les gènes candidats avec mutations identifiés chez les patients atteints de KC.

Gène	Rôle physiologique
V5X1	Développement cranio-facial et oculaire
SOD1	Enzyme anti oxydative
TGFβ	Cytokine impliquée dans des processus de cicatrisation et réparation tissulaire
MIR 184	Exprimé dans la cornée et cristallin, rôle dans la réparation
Col4A3/Col4A4	Rôle dans la formation du collagène dans la cornée
ZNF469	Rôle dans la synthèse et organisation du collagène
TUB A3D	Transport intracellulaire et formation du fuseau mitotique
LOX	Formation et crosslinking du collagène

D'après (Bykhovskaya, Margines, and Rabinowitz 2016)

À ce jour, plusieurs gènes ont été rapportés (**Tableau 3**) comme étant liés à la maladie (Hao et al. 2015), y compris, mais sans s'y limiter, celui de la lysyloxidase (LOX ; identification du gène: 4015, OMIM 153455) , de l'interleukine-1 (IL1 ; 3552, OMIM 147760) (Yani Wang et al. 2016), du « système visuel à homeo box 1 » (VSX1; 30813, OMIM 605020) (Yani Wang et al. 2013), du microARN 184 (mir184 ; 406960, OMIM 613146) (Lechner et al. 2013), et du facteur de croissance transformant bêta induite (TGFBI ; 7045, OMIM 601692) (Guan et al. 2012).

Le gène ZNF469.

Des études récentes montrent l'implication dans la pathogénie du KC du gène de ZNF469 (zinc finger protein) (Yildiz et al. 2017). Abu et al. ont rapporté que ZNF469 partage 30% d'homologie avec les parties hélicoïdales de trois types de collagène (COL1A1, COL1A2 et COL4A1), ce qui suggère que ZNF469 peut participer à l'homéostasie du collagène dans la cornée humaine. Une étude montre que des mutations de ce gène identifiées dans une cohorte de patients chinois (53 patients avec KC primaire) pourraient être impliquées dans la pathogénie de la maladie. Seize variants de séquence dans les régions codantes de ZNF469 ont été identifiés : cinq polymorphismes mono nucléotidiques (SNP) déjà connus, trois mutations qui ont également été retrouvées après séquençage de l'exome entier, et sept nouvelles mutations (c.2059G> A, c.2137C> A, c.3466G> A, c.3749C> T, c.4300G> A, c.4684G> A, et c.7262G> A) prédites comme potentiellement dommageables. Aucune des

mutations n'a été détectée chez les contrôles sains. Toutes ces sept mutations (Yu et al. 2017) étaient à l'état hétérozygote.

Le gène TUBA3D.

Ce gène code pour un membre de la famille des alpha-tubulines. La tubuline est un composant majeur des microtubules, composés d'hétérodimères des tubulines alpha et bêta et de protéines associées aux microtubules. Les microtubules maintiennent la structure cellulaire et jouent un rôle fondamental dans le transport intracellulaire et la formation du fuseau mitotique. Les protéines TUBA3D mutantes sont instables et peuvent conduire à une expression de MMPs par les fibroblastes plus élevée et un stress oxydatif. Ces changements ainsi que la réduction de la quantité de matrice extracellulaire dans les cornées jouent sans aucun doute un rôle majeur dans l'amincissement du stroma, caractéristique des cornées de KC. Ainsi, l'étude de Xiao-dan Hao et al. a montré que *TUBA3D* est un gène potentiellement impliqué dans la pathogenèse du KC (Hao et al. 2017)

Le gène LOX (Lysyl oxydases).

Le groupe des Lysyl oxydases comprend quatre enzymes LOX-like (LOXL1-4) qui catalysent la formation de réticulations du collagène et de l'élastine dans le stroma cornéen. Bien que la pathogenèse du KC soit complexe et peu claire, une hypothèse actuelle repose sur des modifications de l'organisation et de la structure des fibrilles de collagène et de la matrice extracellulaire.

Selon la littérature, les quatre enzymes de type LOX sont présentes dans chaque couche cornéenne, ainsi que dans le limbe et la conjonctive. Une expression plus faible de LOXL2 a été trouvée en utilisant les techniques d'immunohistochimie et de Western blot dans des échantillons de KC (Dudakova et al. 2016). De plus, une méta-analyse évaluant l'association de variants génétiques avec le KC a démontré que deux variants de *LOX* (rs2956540 et rs10519694) peuvent affecter la sensibilité individuelle au KC. Cependant, les résultats sont restés peu concluants en raison de la grande hétérogénéité entre les populations (Zhang et al. 2015). Des études génétiques multi-ethniques et à une plus grande échelle sont nécessaires pour valider ces résultats.

En raison de l'hétérogénéité génétique suspectée du KC, les efforts d'identification de gènes mutés ont été jusqu'à présent concentrés sur quelques rares grandes familles ou des populations génétiquement restreintes (ex. agrégation familiale particulière). La découverte du(es) gène(s) du KC permettrait de grandes avancées diagnostiques et thérapeutiques :

- en précisant sa physiopathologie exacte, rebelle aux approches scientifiques habituelles (biochimie, biologies moléculaire et cellulaire)
- en permettant d'affiner les critères diagnostiques pour le dépistage avant chirurgie réfractive
- en recentrant la thérapeutique sur la cause et non pas sur l'effet de l'affection.

4.2.2 Facteurs environnementaux

Outre les facteurs génétiques, beaucoup de facteurs environnementaux ont été documentés en tant que contributeurs à la pathogénie du KC.

Parmi ces facteurs on peut citer : l'allergie oculaire ou générale (kératoconjonctivite printanière, maladie atopique) (*Nemet et al. 2010*), les microtraumatismes mécaniques (le port des lentilles de contact et les frottements oculaires (*McMonnies 2009*), l'amincissement cornéen (post chirurgie de LASIK).

L'étude de la littérature médicale a mis en évidence des associations entre le KC et certaines pathologies générales.

Maladies génétiques. Le KC est plus fréquemment rencontré chez les personnes ayant une autre maladie génétique, telle que la trisomie 21, la maladie d'Ehlers-Danlos, le prolapsus de la valve mitrale ou autres. En effet, des études ont rapporté que 0,5 à 15%, (soit 10 à 300 fois la prévalence de la population générale) des sujets atteints du syndrome de Down souffrent de KC. Néanmoins, cette association se produit suite à des frottements oculaires dus à l'augmentation du taux de blépharite observée chez environ 46% des individus atteints du syndrome de Down. Il a également été constaté que 30 à 41% des sujets atteints d'amaurose congénitale de Leber, une maladie génétique rare, souffrent également de KC.

L'atopie. Aucun marqueur biomoléculaire spécifique du KC n'a jamais été identifié. Sur le plan clinique et environnemental, le KC est en revanche clairement associé à la présence d'un terrain atopique, et les épisodes de kératoconjonctivite chronique constituent un terrain favorable (*Kennedy, Bourne, and Dyer 1986*). Cette composante atopique est retrouvée dans presque 50% des cas chez les personnes kératocôniques et elle est présente dans seulement 10% des cas dans la population générale. A l'inverse, alors que la fréquence du KC est d'environ 0,05% dans la population générale, elle peut atteindre 15% des atopiques sévères. Dans tous ces cas associés, il est certain qu'il y a une anomalie du collagène ou des protéoglycanes à l'origine des signes cliniques et généraux.

Les modifications hormonales. Comme on l'a vu précédemment, le KC débute à la puberté, ce qui fait penser à une association entre les changements hormonaux et l'apparition de la maladie. Pourtant, il est très compliqué d'attribuer un lien direct entre le KC et les facteurs généraux.

Le rôle des facteurs mécaniques dans l'apparition du KC est un sujet qui prend de plus en plus d'ampleur. En effet, D. Gatinel affirme que "les frottements oculaires chroniques et répétés sont la cause primitive, nécessaire et suffisante, c'est à dire la condition *sine qua non* pour le KC" et que seulement l'arrêt des frottements peut stopper l'évolution de la maladie ou même son apparition (Gatinel 2016). De plus, tous les autres facteurs de risque (la sécheresse, l'irritation oculaire, la pollution, les particules irritantes ou les poussières) ne constituent que des facteurs qui induisent le frottement des yeux.

Même si la physiopathologie du KC est mal connue, il convient de conseiller de "ne pas se frotter" les yeux et de "limiter" toute inflammation de la sphère conjonctivo-palpébrale notamment.

4.2.3. Facteurs géographiques

Le KC affecte plus particulièrement certaines ethnies et est plus fréquemment observé dans certaines régions comme le pourtour méditerranéen, le sous-continent indien et certaines régions de l'Asie du Sud-Est (Yaron S Rabinowitz 1998).

On retrouve souvent une incidence et une prévalence beaucoup plus grande du KC chez les asiatiques comparées à la population caucasienne (Georgiou et al. 2004). L'équipe de Pearson et al. (Pearson et al. 2000) trouvent une prévalence du KC dans la population asiatique de 229 pour 100 000 alors qu'elle n'est que de 57 pour 100 000 chez les caucasiens.

Les études récentes, basées sur les critères topographiques de la cornée, retrouvent une prévalence de cette affection de 2.5% pour l'ethnie perse et de 7.9% pour l'ethnie non perse (Assiri et al. 2005)

Les régions géographiques très ensoleillées comme l'Inde (Jonas et al. 2009) et le Moyen-Orient ont une prévalence plus élevée par rapport aux endroits avec des climats plus froids et moins ensoleillés comme la Finlande (Ihalainen 1986), le Danemark, (Nielsen K, Hjortdal J, Aagaard Nohr E 2007) et la Russie. Une explication plausible à toutes ces variations est que le stress oxydatif, induit par la lumière ultraviolette, pourrait jouer un rôle important dans la physiopathologie du KC.

4.3 Physiopathologie

L'éthiopathogénie du KC est encore mal établie, mais paraît être la manifestation finale de divers processus pathologiques. Pourtant, il existe plusieurs mécanismes décrits comme

étant impliqués dans l'apparition et la progression de la maladie : des déséquilibres enzymatiques, l'inflammation, le stress oxydatif, l'autophagie et des modifications hormonales (Figure 46).

Bien que de nombreuses études aient été effectuées pour étudier les voies de la progression du KC ou signaler les changements histopathologiques dans les cornées atteintes par cette pathologie, certains de ces résultats sont contradictoires. Cela pourrait être dû à de nombreux facteurs. Le premier est l'inhomogénéité dans les différents types d'échantillons de la cornée utilisés dans les différentes études, tels que la cornée entière, l'épithélium isolé ou le stroma. Le deuxième facteur est l'utilisation de tissus ou de cellules d'origine versus des cellules cultivées, et le troisième facteur est la variation des plateformes expérimentales utilisées pour étudier l'expression des protéines sélectionnées.

Le KC est une déformation et un amincissement irréversible de la cornée qui survient quand le stress mécanique répété excède sa capacité de résistance biomécanique.

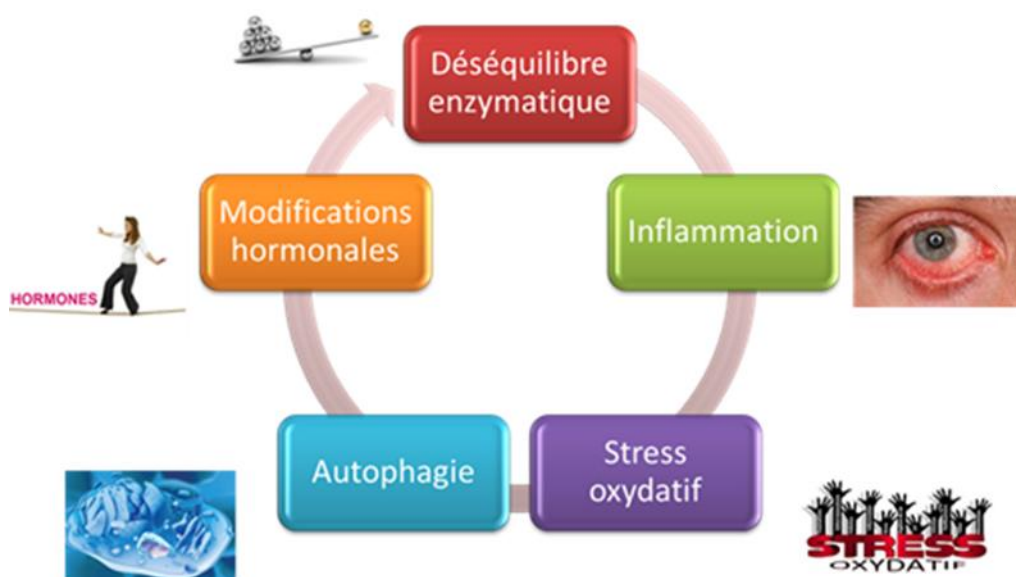


Figure 46. Les mécanismes physiopathologiques impliqués dans le développement et la progression du KC. Plusieurs hypothèses sont proposées.

1. Déséquilibre enzymatique

Il existe à l'heure actuelle de nombreuses théories qui suggèrent que l'amincissement cornéen se produit suite à la perte de composants structuraux de la cornée.

La dégradation excessive du stroma cornéen observée dans le KC pourrait être le résultat d'une activité protéolytique accrue (Fukuchi et al. 1994) ou d'une diminution des niveaux des inhibiteurs des protéases (Figure 47) (tels que les α 2-macroglobuline et α 1-anti-protéases) (Sawaguchi et al. 1994). Néanmoins, les nombreuses études sur ce sujet

donnent des résultats souvent contradictoires, si bien qu'il est difficile à ce jour d'avoir une idée précise de l'implication d'une enzyme dans le développement de la maladie.

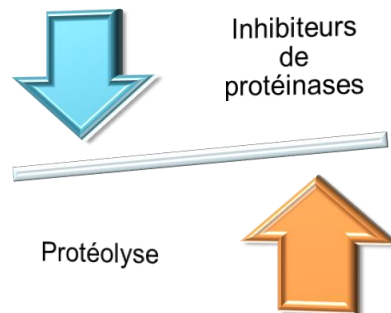


Figure 47. Le déséquilibre entre les inhibiteurs de protéinases et la protéolyse pourrait jouer un rôle fondamental dans la physiopathogénie du KC.

Une activité protéolytique intense provoque une dénaturation du collagène qui peut accélérer la progression de la maladie. Balasubramanian et al. ont étudié l'importance de la protéolyse dans la progression du KC en comparant le taux total de protéines lacrymales, les protéases et les molécules inflammatoires chez les patients atteints de KC, les patients après « cross-linking » (traitement proposé pour arrêter la progression de la maladie) et les sujets normaux. L'étude a montré une augmentation des taux de gélatinases et de collagénases (1,9 fois plus élevés), ainsi que des taux élevés d'autres MMPs (MMP3 et MMP7), et de cytokines (IL-6 et de TNF-alpha) dans le KC (Sivaraman Arumugam Balasubramanian et al. 2013)(Desiree L.,2015).

Les MMPs sont un groupe d'enzymes protéolytiques capables de dégrader les principaux composants de la matrice extracellulaire conduisant à une diminution considérable du collagène dans le stroma. Les MMPs sont inhibées par l'inhibiteur tissulaire des métalloprotéinases (TIMP) (Verma and Hansch 2007). Ce complexe (MMP-TIMP) est responsable de l'intégrité du tissu conjonctif et d'une cicatrisation normale des plaies (Brew, Dinakarbandian, and Nagase 2000). En raison de ces propriétés, les MMPs ont souvent été considérées comme jouant un rôle central dans la pathogenèse de la progression du KC. Des études (V. A. Smith et al. 2006) (Matthews et al. 2007) (Predović et al. 2008) ont montré l'existence de changements quantitatifs et qualitatifs des MMPs et de l'inhibiteur tissulaire de métalloprotéinases matricielles (TIMP1) dans chaque couche de la cornée du KC. L'activité accrue d'autres protéases telles que les cathepsines pourrait également contribuer à la détérioration structurelle vue dans le KC. Ces facteurs peuvent entraîner une altération de la biomécanique avec des cornées kératocôniques plus élastiques et moins rigides que celles des sujets normaux.

Plusieurs groupes de recherche ont rapporté une augmentation significative du niveau de la cathepsine B (M. Cristina Kenney et al. 2005)(Sivaraman A Balasubramanian et al. 2013),

une protéase lysosomiale capable de dégrader les protéines de la matrice extracellulaire du film lacrymal de patients kératocôniques. De l'autre côté, il y avait des niveaux diminués de cystatine (un groupe d'inhibiteurs de protéase) (Sivaraman Arumugam Balasubramanian et al. 2013). Balasubramanian et al. ont complété l'étude précédente en supposant que le frottement des yeux modifie les niveaux des protéases et des cytokines. Un frottement oculaire réalisé pendant 60 secondes, ce qui est généralement réalisé par les patients atteints de KC, a entraîné une augmentation significative de la MMP-13 dans les larmes des sujets sains. Cette augmentation des protéases et des médiateurs inflammatoires contenus dans les larmes semble donc être exacerbée par le frottement oculaire persistant et important, ce qui peut contribuer à la progression de la maladie.

LOX (Lysyl oxidase)

Récemment, LOX a été la cible de nombreuses études compte tenu de son potentiel d'applications en ophtalmologie. LOX est une amine oxydase qui confère des propriétés mécaniques au tissu conjonctif. Elle oxyde les résidus lysine et hydroxy-lysine présents dans le collagène et les lysines présentes dans l'élastine, afin de produire des groupements α -aminoadipique- δ -semialdéhydes. Ceux-ci, très réactifs, peuvent spontanément se combiner avec les aldéhydes voisins ou les amines epsilon des lysines non modifiées, pour créer des liaisons covalentes et stabiliser les fibres de collagène et d'élastine de la matrice extracellulaire en les rendant insolubles (Sethi, Wordinger, and Clark 2012).

Les polymorphismes du gène codant pour LOX sont en corrélation avec une probabilité accrue de développer un KC (Hasanian-Langroudi et al. 2015).

Dans 63% des cas de KC, la distribution de LOX s'est avérée nettement diminuée et son activité est plus de 2,5 fois inférieure à celle des contrôles (Dudakova et al. 2012).

Pahuja et al. (Pahuja et al. 2016) ont étudié l'expression d'un ensemble de facteurs moléculaires locaux dans la zone du cône ectasique de la cornée afin de trouver une cause fonctionnelle de l'affaiblissement focal de la cornée caractéristique du KC. Les cellules épithéliales ont été prélevées chez des patients atteints de KC (n = 66) qui ont subi des procédures de traitement par « cross-linking » à partir de l'apex du cône et de la périphérie. Les patients ayant eu une chirurgie réfractive pour la myopie (n = 23) ont servi de témoins.

Le rapport entre l'expression des gènes dans le cône et celle à la périphérie de chaque œil a été analysé en qPCR et corrélé avec les données cliniques. L'épithélium du sommet du cône des patients atteints de KC présentait des taux élevés de facteurs inflammatoires tels que le facteur de nécrose tumorale α (TNF-alpha), l'IL-6 et la MMP-9, mais une LOX réduite. Cette étude fournit la première preuve qu'une altération de l'expression épithéliale et stromale cornéenne de gènes spécifiques, à l'apex du cône cornéen, entraîne une faiblesse structurelle focale chez les patients atteints de KC.

2. L'inflammation

Le KC a d'abord été décrit comme une maladie ectasique non inflammatoire, une théorie qui commence à être contredite par de nombreuses études qui ont apporté de solides preuves pour soutenir le rôle de l'inflammation dans la pathogenèse de la maladie. (*Sivaraman A Balasubramanian, Pye, and Willcox 2013*) (*I Lema et al. 2009*). Les études mentionnées ci-dessous mettent en évidence les conclusions les plus pertinentes.

En 2009, Lema et al. ont montré une augmentation du taux d'IL-6 et de TNF-alpha dans les yeux avec KC subclinique et avancé, alors que la MMP-9 n'était détectée que dans les larmes des patients présentant une maladie manifeste (*I Lema et al. 2009*).

De plus, Sorkhabi et al. ont démontré la présence marquée des cytokines pro-inflammatoires dans le liquide lacrymal chez 42 sujets atteints de KC, telles que l'IL-6, l'IL-1 bêta et l'interféron-gamma, et une diminution du taux d'IL-10 anti-inflammatoire (*Sorkhabi et al. 2015*). Par contre, peu d'études reflètent une corrélation entre les médiateurs inflammatoires dans le liquide lacrymal et la sévérité du KC (**Figure 49**).

Il a également été proposé que les kératocytes de patients atteints de KC expriment quatre fois plus de récepteurs à l'IL-1 que ceux des sujets sains (*Bureau et al. 1993*). L'IL-1 a été postulée comme étant le modulateur de la prolifération, différenciation et mort des kératocytes. Il a été suggéré que la perte de kératocytes des zones stromales antérieures pourrait survenir en raison d'un excès de mort cellulaire apoptotique entraînant un amincissement stromal.

En outre, le TNF-alpha et l'IL-6 peuvent également être retrouvés dans les kératoconjunctivites atopiques et vernoales, ce qui suggère que le KC pourrait être associé à des allergies et à une augmentation du taux d'IgE sériques (*Sivaraman A Balasubramanian, Pye, and Willcox 2013*).

Étant un tissu avasculaire, la cornée normale est supposée immunologiquement privilégiée et dépourvue de cellules présentatrices d'antigènes. Cependant des cellules dendritiques, équivalentes aux cellules de Langerhans présentatrices de l'antigène dans l'épiderme, ont été identifiées dans l'épithélium cornéen par des analyses en histochimie, immunofluorescence, microscopie confocale et microscopie électronique (*Zhivov et al. 2005*).

Des études récentes ont signalé une augmentation de la densité cellulaire des cellules de Langerhans dans l'épithélium cornéen dans diverses affections de la surface oculaire, y compris la sécheresse oculaire, l'usure des lentilles de contact, et la kératite infectieuse (*Zhivov et al. 2005*).

Les cellules de Langerhans jouent un rôle important dans la réponse inflammatoire de la surface oculaire par rapport à la présentation de l'antigène. Dans la cornée normale, les cellules de Langerhans ont généralement été observées au niveau du plexus nerveux sous-

basal. Selon la morphologie, les cellules de Langerhans peuvent être classées en 3 catégories : corps cellulaires sans dendrites, des cellules avec des dendrites courtes et des cellules avec de longues dendrites (**Figure 48**).

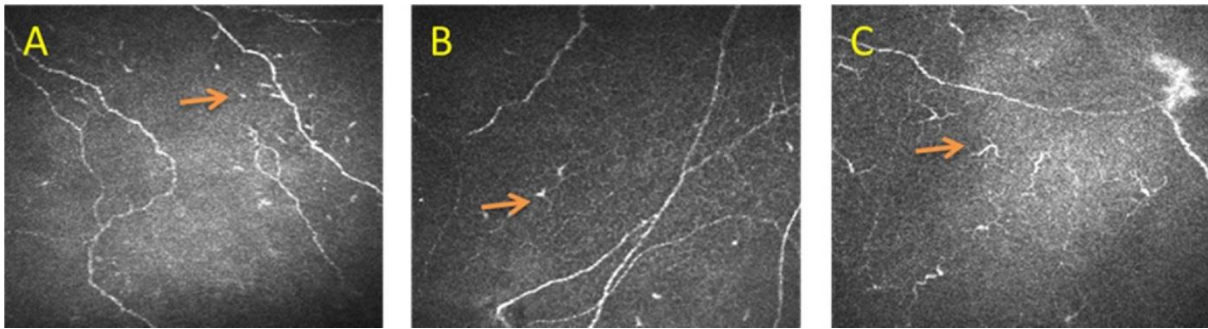


Figure 48. Classification de la morphologie des cellules de Langerhans.

D'après (Mandathara et al. 2018)

(A) grade 1 - cellules sans dendrites, (B) grade 2 - cellules avec de courtes dendrites, (C) grade 3 - cellules avec de longues dendrites.

Les cellules sans dendrites sont considérées comme immatures et se caractérisent par une grande capacité de capture et traitement de l'antigène, mais avec un faible taux de stimulation des cellules T lymphatiques (Hamrah et al. 2003).

A la maturation, les cellules produisent des processus dendritiques, ont une mauvaise capacité de capture de l'antigène mais sont de puissants stimulateurs des lymphocytes T (Mellman and Steinman 2001).

Les cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 et le TNF-alpha dans le microenvironnement sont connues pour favoriser la maturation de cellules de Langerhans. Les cellules de Langerhans de morphologie mature sont fréquemment observées dans la cornée périphérique tandis que les cellules immatures sont dans la cornée centrale et périphérique (Zhivov et al. 2005).

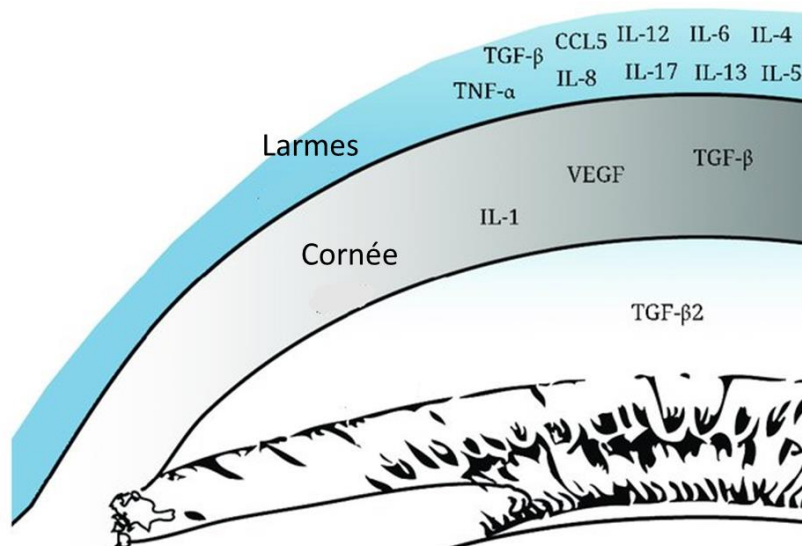


Figure 49. Localisation des médiateurs immunitaires solubles dans le liquide lacrymal, le tissu cornéen et l'humeur aqueuse des patients atteints de KC.

(Voir détails dans le texte). D'après (Wisse 2016)

Il existe un cercle vicieux entre les cytokines pro-inflammatoires, les enzymes protéolytiques et les inhibiteurs responsables des modifications micro-environnementales du KC. Ce déséquilibre déclenche la signalisation de voies inflammatoires dans la cornée induisant des anomalies structurales conduisant à la progression de la maladie (Ionescu et al. 2016).

3. Le stress oxydatif

Le stress oxydatif induit une augmentation des espèces réactives de l'oxygène (ROS) responsables de dommages aux composants cellulaires, et un déséquilibre des marqueurs de l'autophagie. Les rayons UV représentent une source importante du stress oxydatif dans la cornée (Wenk, Brenneisen, and Meewes 2004).

Un tel stress oxydatif a été observé dans le KC (Buddi et al. 2002). Il provoque une diminution des niveaux d'expression des marqueurs antioxydants au niveau cellulaire, ce qui entraîne la dégradation de la matrice extracellulaire et l'amincissement ultérieur du stroma cornéen (Arnal et al. 2011). En outre, dans les cornées kératocôniques il y a une diminution du niveau de l'aldéhyde déshydrogénase 3 et du superoxyde dismutase, des enzymes importantes pour la détoxification des espèces réactives de l'oxygène.

Dans le KC, les principaux facteurs liés à l'augmentation des ROS sont les rayons UV, l'atopie et les micro-traumatismes mécaniques ; ces derniers pourraient survenir suite à des frottements chroniques des yeux et à l'usure des lentilles de contact. Parmi les conduites à tenir pour réduire les dommages oxydatifs et potentiellement prévenir le développement

kératocônique on peut citer : (1) l'utilisation de filtres aux ultraviolets ; (2) l'amélioration du confort oculaire avec l'utilisation de médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens ; (3) l'utilisation de larmes artificielles sans conservateur et des médicaments contre les allergies ; (4) l'ajustement des lentilles de contact pour minimiser les microtraumatismes de la cornée.

4. L'autophagie

Une expression différente des marqueurs d'autophagie a été observée dans la région centrale de l'épithélium cornéen kératocônique par rapport à la périphérie du même échantillon (*R. Shetty et al. 2017*).

L'autophagie est un mécanisme cellulaire qui consiste en la dégradation partielle du cytoplasme de la cellule en utilisant ses propres lysosomes. Elle intervient à différents niveaux, que ce soit dans la réparation d'éléments cellulaires, dans la nutrition de la cellule en cas de jeûne, dans la réponse immunitaire ou dans la mort cellulaire, et regroupe plusieurs mécanismes. C'est un mécanisme de protection contre les infections, le cancer, la neurodégénérescence et le vieillissement (*Levine and Kroemer 2008*). A l'homéostasie cellulaire, l'autophagie se produit à un niveau basal et est activée ou régulée pendant les dommages oxydatifs.

Le mécanisme de l'autophagie implique l'initiation d'un autophagosome, qui est appelé « l'inducteur ». Cela commence par la formation du phagophore qui se prépare à englober le matériau qui doit être dégradé. La fusion de l'autophagosome avec des lysosomes contenant l'hydrolase pour former des autolysosomes est appelé le flux autophagique (*Klionsky et al. 2012*). Ces étapes sont régulées par des systèmes de conjugaison de protéines analogues à l'ubiquitine et aux protéines liées à l'autophagie (ATG). Un échec de l'induction de l'autophagie ou du flux d'autophagie (dynamique) dû au stress oxydatif peut perturber la réponse adaptative et conduire à la mort cellulaire induite par l'autophagie.

Pour explorer le rôle éventuel de l'autophagie dans le KC, Shetty et al. (*R. Shetty et al. 2017*) ont étudié les niveaux d'expression des marqueurs de la voie autophagique lysosomale dans l'épithélium de la cornée de 78 patients (stade I-III selon la classification d'Amsler-Krumeich). Leurs découvertes suggèrent qu'une régulation autophagique défectueuse peut entraîner des conséquences préjudiciables pour l'épithélium cornéen suite à des dommages oxydatifs, ce qui pourrait être un mécanisme dans la pathogenèse du KC.

La comparaison du cône et de la zone périphérique de l'épithélium de KC de stade III n'a révélé aucune différence dans le profil d'expression de l'ARNm des gènes impliqués dans la formation et la maturation de l'autolysosome (LC3A, RAB7, LAMP1). Par rapport à des contrôles, l'épithélium cornéen de différents grades cliniques de patients atteints de KC a montré une diminution des taux des protéines LC3AI et LAMP1 (*R. Shetty et al. 2017*) dans les régions coniques et périphériques (**Figure 50**).

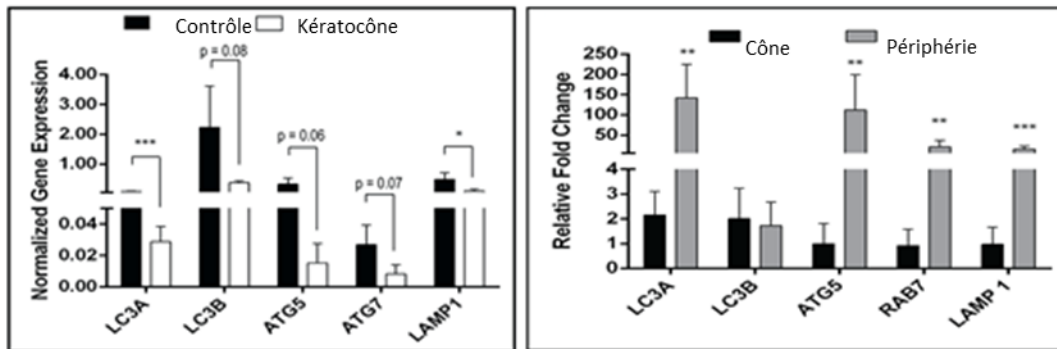


Figure 50. Analyse de l'expression en ARNm des gènes liés à la voie autophagique dans l'épithélium cornéen entier (à gauche) et dans la région du cône et de la périphérie (à droite) des patients atteints de KC.

Les résultats de qPCR ont été normalisés avec la β -actine. La signification statistique a été notée (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, comparé aux niveaux d'expression de l'ARNm dans l'épithélium contrôle). D'après (R. Shetty et al. 2017)

Cela pourrait traduire une activité autophagique insuffisante dans le cône par rapport à la région périphérique durant la progression de la maladie.

Une étude antérieure a rapporté les profils d'expression différentielle de LC3 et de Secreted Frizzled Related Protein 1 (SFRP1) dans l'épithélium de KC suggérant une liaison entre la voie de signalisation Wnt et l'autophagie (Iqbal et al. 2013).

Il a été rapporté que le stress oxydatif pourrait être impliqué dans les dommages des membranes lysosomales provoquant la libération d'enzymes protéolytiques et le déclenchement de l'amincissement de la cornée (M. Cristina Kenney et al. 2005).

Certains auteurs suggèrent que la modulation de l'autophagie pourrait être une cible thérapeutique potentielle pour le KC. Les inducteurs de l'autophagie (tréhalose) maintiennent l'intégrité cellulaire et réduisent l'activité des MMPs dans l'épithélium cornéen exposé au rayonnement UV-B (Čejková et al. 2010).

5. Lactoferrine / Transferrine.

L'anneau de Fleischer, le dépôt de fer à la base du cône de la cornée, est un signe clinique commun de KC (Iwamoto and Devoe 1976). Physiologiquement, les cornées saines ont besoin de fer pour l'achèvement du cycle de l'acide citrique et la production d'ATP, et le fer est également un composant essentiel de l'enzyme ribonucléotide réductase impliquée dans la synthèse de l'ADN (He et al. 2007). Étant donné que le fer est nécessaire dans de nombreuses fonctions cornéennes, les dérèglements de l'homéostasie du fer et l'augmentation de son niveau peuvent conduire à certaines maladies cornéennes. Le fer est porté par deux glycoprotéines, la lactoferrine et la transferrine. Ces glycoprotéines se trouvent dans de nombreux fluides muqueux, y compris les larmes (Loh, Hadziahmetovic,

and Dunaief 2009). En se liant au fer, la lactoferrine aide à réguler le niveau de fer, à prévenir les dommages oxydatifs et à renforcer les défenses antibactériennes de la cornée. La diminution de l'expression de la lactoferrine a été rapportée dans les cellules épithéliales cornéennes de patients atteints du KC (*Chaerkady et al. 2013*). Plusieurs études ont également signalé une diminution de l'expression de la lactoferrine dans les larmes collectées chez les patients (*Sivaraman Arumugam Balasubramanian et al. 2012*) (*Isabel Lema et al. 2010*). La transferrine s'est avérée être aussi exprimée à des niveaux inférieurs dans le stroma cornéen (*Roy Joseph, Srivastava, and Pfister 2012*). Toutes ces données indiquent que l'expression réduite des protéines de liaison du fer peut contribuer à la déposition de fer dans la cornée des patients atteints de KC.

6. Les modifications hormonales

Le développement du KC a été corrélé avec les changements hormonaux qui se produisent pendant la puberté, la grossesse ou à la ménopause (*Bilgihan et al. 2011*)(*Hoogewoud, Gatziofas, and Hafezi 2013*). Cependant, des informations cliniques liées aux hormones sexuelles chez les patients sont souvent limitées, ce qui constitue un obstacle important pour l'étude. En 2010, Fink et al. ont étudié les effets du genre et le statut hormonal sur la sévérité et la progression du KC sur une période de trois ans (*Fink et al. 2010*). Cette étude a regroupé les femmes en groupes hormone-active et hormone-inactive pendant la transition ménopausique mais n'a pas réussi à identifier une différence significative dans la progression de la maladie entre ces groupes. Inversement, il y a eu d'autres cas signalés pour lesquels la grossesse a induit l'aggravation du KC indiquée par une diminution de l'acuité visuelle corrigée de loin et des fluctuations réversibles des topographies cornéennes (*Hoogewoud, Gatziofas, and Hafezi 2013*). Ce qui est important à noter c'est que tous ces changements sont revenus au niveau normal une fois la période de lactation postpartum terminée (*Pizzarello 2003*).

Il est plausible que les œstrogènes puissent être responsables de l'affaiblissement de la cornée par la stimulation des MMPs et la libération de prostaglandines, ce qui provoque l'activation des collagénases, la perturbation des réseaux de collagène et une réduction de la rigidité cornéenne (*E. Spoerl et al. 2007*). Récemment, une étude a signalé une progression du KC dans les yeux de 3 femmes après une fécondation *in vitro*, ce qui augmente les niveaux d'oestrogène (*Yuksel et al. 2016*). De même, une étude récente a identifié une élévation significative du niveaux salivaire de sulfate de déshydroépiandrostérone (DHEA-S, précurseur commun aux autres androgènes) et une diminution du taux d'œstrone (un œstrogène naturel) chez les patients, indépendamment du sexe (*McKay et al. 2016*). La DHEA-S augmente probablement l'expression de cytokines spécifiques (IL-16) en bloquant l'activité des glucocorticoïdes endogènes. Cependant, aucune corrélation n'a été observée

entre l'augmentation du taux de DHEA-S salivaire et l'aggravation de la maladie. L'hormone progestérone inhibe en revanche les prostaglandines. Il est donc possible que la stabilisation de la biomécanique cornéenne pendant la dernière moitié d'une grossesse normale soit due à l'action de cette hormone (Koob et al. 1980)

Comme il y a une corrélation entre les changements dans la physiologie de la cornée et des taux élevés d'œstrogènes, le KC pourrait être déclenché par des niveaux élevés d'œstrogène couplés à une prédisposition génétique responsable d'une faiblesse de la cornée.

De plus, certaines études ont corrélié la progression du KC avec des taux élevés dans les larmes de l'hormone thyroxine, indépendamment de son taux sérique.

4.4. Analyse histologique de la cornée kératocônique

Des anomalies ont été retrouvées dans toutes les couches de la cornée kératocônique. L'analyse histopathologique des cornées kératocôniques montre un amincissement de l'épithélium et du stroma dans la région apicale du cône, des ruptures de la couche de Bowman, des fibroses focales, et une apoptose des kératocytes stromaux antérieurs (Sykakis et al. 2012).

En utilisant la tomographie en cohérence optique *in vivo*, Sandali et al. ont proposé un système de classification pour caractériser la progression du KC (Sandali et al. 2013). Les patients de stade 1 ont un épithélium cornéen plus fin et le stroma au niveau du cône inchangé. Au stade 2, des anomalies dans la couche de Bowman sont remarquées avec un épaissement épithélial et un stroma opaque. Au stade 3, il y a une augmentation de l'épaissement épithélial et un amincissement du stroma avec perturbations dans la couche de Bowman. Le stade 4 montre des cicatrices pan-stromales et enfin, le stade 5 est considéré comme la forme aiguë du KC (hydrops) avec la rupture de la membrane de Descemet et des cicatrices cornéennes. Brautaset et al. ont proposé que le KC est un désordre d'amincissement pan-cornéen basé sur l'amincissement de la cornée dans la région ectasique périphérique et centrale (Brautaset et al. 2013). Des études en microscopie confocale *in vivo* (Efron and Hollingsworth 2008)(Ghosh et al. 2017) ont permis d'analyser l'ensemble des modifications dues au kératocône dans toutes les couches de la cornée.

La **couche épithéliale** est souvent amincie dans la région de l'apex du cône. Dans les stades avancées de la maladie, les **cellules épithéliales superficielles** sont plus allongées, irrégulières et prennent un aspect fusiforme (Figure 51) (Efron and Hollingsworth 2008). Ces modifications ont été rapportées par d'autres équipes de recherche (Somodi et al. 1996)(Uçakhan et al. 2006) qui ont trouvé des cellules superficielles allongées disposées en

tourbillon chez 18% des patients atteints de KC sévère. De plus, tous ces changements morphologiques sont en corrélation directe avec la sévérité de la maladie.

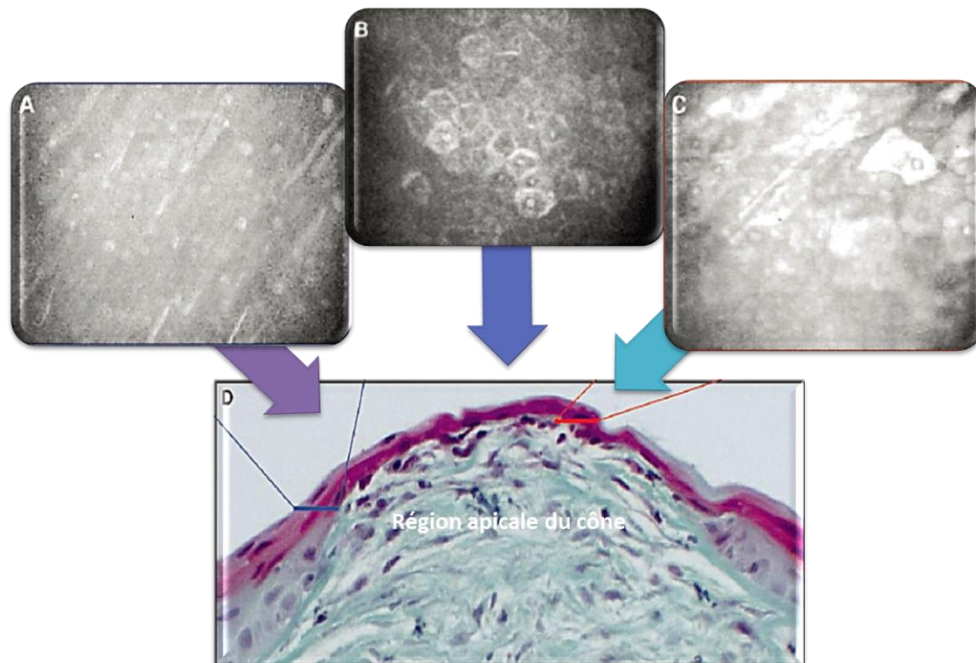


Figure 51. Images en microscopie confocale de la couche des cellules superficielles de la cornée du KC.

- A. Cellules superficielles irrégulières et hyper-réfléctives situées au niveau apical du cône
- B. Image en microscopie optique de l'apex du cône d'un patient atteint d'un KC sévère (grossissement X40). D'après (Efron and Hollingsworth 2008)

La couche des **cellules intermédiaires** de l'épithélium cornéen du KC semblerait être normale dans seulement 8% des yeux (Hollingsworth et al. 2001), tous présentant un KC modéré. Chez les patients avec un KC sévère, la couche des cellules intermédiaires présente de gros noyaux irrégulièrement espacés (Figure 52) et leur diamètre ($9,2 \pm 1,0 \mu\text{m}$) est significativement supérieur ($p < 0,0001$) à celui de la population normale ($6,4 \pm 0,8 \mu\text{m}$).

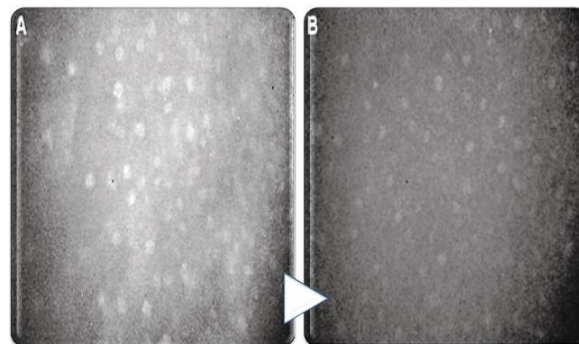


Figure 52. Image en microscopie confocale des cellules intermédiaires de l'épithélium cornéen kératocônique (A) et normal (B).

On note la présence de noyaux hyper-réfléctifs et de plus grande taille dans les cellules ailées du kératocône. D'après (Efron and Hollingsworth 2008).

Les images en microscopie confocale de la couche des **cellules basales** de l'épithélium cornéen du KC ont révélé une variabilité considérable d'un patient à l'autre. Une apparence normale de bordures de cellules avec un agencement régulier des cellules a été retrouvée dans 8% des yeux, qui ont tous été classés comme présentant un KC débutant ou modéré (Hollingsworth et al. 2001). La constatation la plus fréquente était l'aspect flou des cellules. Dans 12% des yeux, la couche des cellules basales avait un aspect irrégulier, avec de grandes cellules et des limites de cellules très pâles (Figure 53). La plupart de ces yeux ont été classés comme présentant un KC sévère.

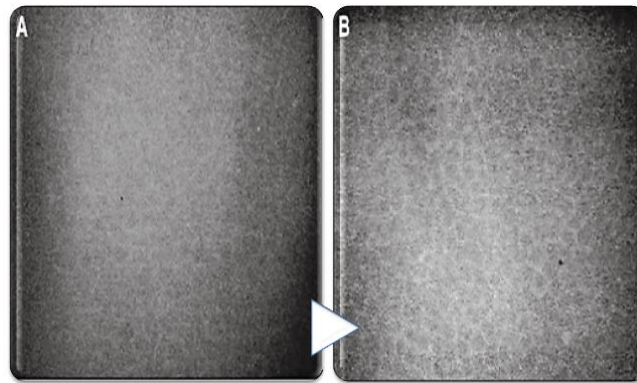


Figure 53. Image en microscopie confocale de la couche basale de l'épithélium cornéen kératocônique (A) et normal (B).

(Efron and Hollingsworth 2008)

Le diamètre moyen des cellules épithéliales basales chez les patients kératocôniques ($11,4 \pm 1,2 \mu\text{m}$) était significativement supérieur ($p < 0,05$) à celui des sujets témoins ($10,4 \pm 0,9 \mu\text{m}$). Cela concorde avec les conclusions de Weed et al. (Weed et al. 2007) qui ont constaté que la densité cellulaire basale dans les KC modérés ($4\,592 \pm 414 \text{ cellules} / \text{mm}^2$) et les KC sévères ($4\,530 \pm 596 \text{ cellules} / \text{mm}^2$) était inférieure à celle des sujets sains.

Il existe aussi des variations de l'épaisseur épithéliale à travers la cornée du KC. L'épithélium est plus mince dans la région centrale et plus épais vers la cornée périphérique (Figure 54). Des variations similaires ont également été observées en microscopie optique (Scroggs and Proia 1992), en microscopie électronique à transmission (Aktekin et al. 1998) et à balayage (Jongebloed and Worst 1987).

De plus, dans les cornées normales, la fibronectine, la laminine et le collagène de type IV sont retrouvés au niveau de la lame basale, formant une couche continue sans rupture ni discontinuité (Greene, Kuo, and Sherwin 2017). La fibronectine favorise l'adhérence

cellulaire et est impliquée dans l'organisation de la matrice extracellulaire. La laminine représente le constituant majeur de la lame basale. Des changements patents dans ces composants de la lame basale ont été observés dans les cornées kératocôniques. Il s'agit de la localisation différente de la laminine et du collagène de type IV situés non pas au niveau de la lame basale mais au niveau du stroma antérieur, ainsi que de l'absence de fibronectine dans cette région. Ces résultats suggèrent un rôle fondamental de la membrane basale dans l'initiation et la progression du KC (*Greene, Kuo, and Sherwin 2017*).

D'autres études montrent que des fragments de laminine et de fibronectine stimulent la production de la MMP9 et du TNF (*Adair-Kirk et al. 2003*) (*Beezhold and Personius 1992*), ce qui renforce l'idée du rôle d'un déséquilibre enzymatique dans la pathogénie du KC (Voir 4.3)

La **couche de Bowman (Figure 54)** est également affectée par la maladie, avec parfois un contact direct du stroma cornéen et de la couche épithéliale. Des cellules ont été observées dans cette structure normalement acellulaire (*T. Sherwin et al. 2002*). D'autres études ont montré des ruptures dans la couche de Bowman (*Sykakis et al. 2012*) (*Scroggs and Proia 1992*), avec une invasion des enzymes protéolytiques conduisant à un amincissement focal de la cornée.

Dans certains cas, l'examen histologique d'une cornée qui présente un KC sévère a montré un dédoublement de la couche de Bowman dans la région de l'apex du cône (**Figure 54 A**). L'aspect bicouche est présenté dans la **Figure 54 B** où on observe des noyaux de kératocytes à droite du champ et une région amorphe à gauche. L'aspect normal de la couche de Bowman est illustré dans la **Figure 54C**. De même, la couche de Bowman apparaît comme un champ hyper-réfléchissant (**Figure 54D**) dans la région du cône.

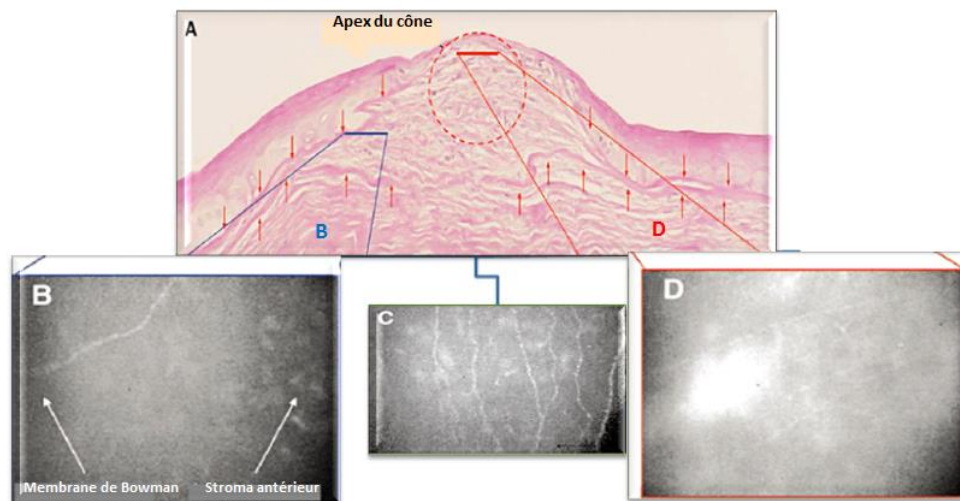


Figure 54. Image en microscopie optique et confocale de la région apicale de la cornée kératocônique

(Objectif X10). A. Le cercle en pointillé indique la région cicatricielle du cône. Les flèches indiquent le tracé de la couche de Bowman, qui apparaît sous la forme d'une couche unique à l'extrême droite du champ, puis se sépare en une bicouche. Les images au microscope confocal (rangée du bas) indiquent diverses apparences de la couche de Bowman :

- B. «Champ divisé» par la couche de Bowman
- C. Apparence normale chez un sujet témoin
- D. Hyper-réflexivité dans la région apicale du cône

A noter également les zones d'hyper-prolifération épithéliale dans la périphérie du cône et d'amincissement au niveau de l'apex cornéen. D'après (Efron and Hollingsworth 2008)

Le KC a été considéré pendant longtemps comme une maladie du **stroma cornéen**, la plupart des études montrant des modifications de cette couche.

En effet, l'épaisseur des lamelles de collagène dans le KC est inchangée, mais leur nombre semble être significativement réduit par rapport au tissu normal (Trevor Sherwin and Brookes 2004), l'orientation des fibrilles de collagène dans les lamelles étant également altérée (Mathew et al. 2015). Il est probable que ces changements reflètent les résultats d'un processus de dégradation ou ceux de mécanismes de réparation insuffisants (Morishige et al. 2007). Des études en microscopie électronique à balayage (Somodi et al. 1996) ont révélé des changements dans la morphologie des kératocytes dans les cornées kératocôniques. Leur densité est inférieure de 12%, en particulier celle des kératocytes postérieurs (Erie et al. 2002); et cette perte en kératocytes pourrait être due à l'apoptose. Quelques études (W. J. Kim et al. 1999) ont confirmé cette hypothèse en mettant en évidence un processus apoptotique dans 60% des cornées kératocôniques.

Plus récemment, il a été montré que la masse fibrillaire du collagène est inégalement répartie dans une cornée kératocônique, ce qui conduit à un amincissement de la cornée centrale et aux changements associés de la courbure cornéenne du KC. Le diamètre des

fibres de collagène est altéré avec une diminution de l'espace inter-fibrillaire. La proportion des différents constituants de la matrice extracellulaire semble également modifiée.

Mon équipe a montré que le gène *ACTB* codant pour la β -actine est sous exprimé dans le KC (*Macé et al. 2011*), ce qui suggère une déstabilisation du cytosquelette, et un affaiblissement du stroma (*Roy Joseph, Srivastava, and Pfister 2012*).

La **membrane de Descemet** n'est souvent pas affectée, sauf dans les cas de rupture, tout comme la couche des cellules endothéliales (*Weed, MacEwen, and McGhee 2007*). Cependant, un pléomorphisme (du grec pléôn : plus abondant, et morphê : forme) et une élongation des cellules endothéliales ont été rapportés (*Meek et al. 2005*), ainsi que leur dégénérescence (*Sturbaum and Peiffer 1993*)(*El-Agha et al. 2014*)(*Mocan et al. 2008*). A l'inverse, certaines études ont rapporté une légère augmentation de la densité cellulaire endothéliale dans le KC (*Isabel Lema and Durán 2005*). De plus, le traitement clinique soutient le manque d'implication de l'endothélium dans la pathogenèse du KC.

L'endothélium cornéen dans le cas du kératocône est présenté sous forme d'une monocouche de cellules plus allongées, pourtant des différences significatives entre les cellules endothéliales du KC et du sujet sain n'ont pas été observées.

L'analyse des couches cornéennes dans le KC avancé avec différents types de microscopie, est résumée dans le **Tableau 4**.

En conclusion, on peut dire qu'à ce jour, la physiopathologie du KC reste mystérieuse. Les analyses globales commencent à faire ressortir les grandes voies de signalisation affectées, mais il y a encore beaucoup d'efforts à fournir pour comprendre le développement de cette maladie.

Couche de la cornée	Biomicroscope à la lampe à fente	Microscope confocal (in vitro)	Microscope optique (in vitro)	Microscope électronique (in vitro)
Epithélium	<ul style="list-style-type: none"> - Anneau de Fleischer - Contours effacés 	<ul style="list-style-type: none"> - Cellules superficielles: allongées, aspect fusiforme - Cellules intermédiaires: noyaux irrégulièrement espacés - Cellules basales: irrégulières avec les noyaux visibles 	<ul style="list-style-type: none"> - Aminci - Cellules allongées et irrégulières 	<ul style="list-style-type: none"> - Disparition de la couche des cellules basales - Aminci - Anomalies de la membrane basale
Plexus sous-basal	Non visible	<ul style="list-style-type: none"> - Les faisceaux des fibres nerveuses suivent le contour de la base du cône - Aspect épais et proéminent 	Non reporté	Non reporté
Membrane de Bowman	Cicatrices superficielles	<ul style="list-style-type: none"> - Des cellules épithéliales et/ou des kératocytes parfois visibles - Hyper réflectivité 	<ul style="list-style-type: none"> - Bicouche près de l'apex - Noyaux irréguliers 	<ul style="list-style-type: none"> - Fibres de collagène mal alignées et amincis - Ruptures
Stroma	<ul style="list-style-type: none"> - Stries de Vogt - Cicatrices - Œdème 	<ul style="list-style-type: none"> - Hyper réflectivité - Noyaux des kératocytes irréguliers - Alternance des bandes claires et sombres 	<ul style="list-style-type: none"> - Désorganisé - Accumulation des kératocytes - Noyaux irréguliers 	<ul style="list-style-type: none"> - Dégénérescence fibrillaire - Accumulation des kératocytes sous les ruptures de la couche de Bowman - Morphologie anormale des kératocytes
Membrane de Descemet	- Hydrops à proximité de la membrane de Descemet	Normal	Plis et ruptures	- Ruptures avec accumulation des cellules endothéliales
Endothélium	Normal	Cellules allongées	Aplatissement cellulaire et noyaux éloignés	Dégénérescence

Tableau 4. Les couches de la cornée du KC examinées par différents types de microscopes.

4.5 Classification du kératocône

Plusieurs classifications faisant intervenir différents paramètres morphologiques du KC sont disponibles. Il n'existe cependant pas de consensus international.

A l'issue de l'examen clinique, le KC peut être classé en 4 stades selon la **classification d'AMSLER (Figure 55)** :

- **KC du premier degré** caractérisé par un astigmatisme oblique avec une asymétrie perceptible au kératomètre de Javal,
- **KC du second degré** : l'astigmatisme est plus marqué, l'asymétrie est plus manifeste et au biomicroscope, on note l'amincissement de la cornée qui reste transparente,
- **KC du troisième degré** : toute mesure au Javal, même approximative, est impossible et l'amincissement cornéen est marqué,
- **KC du quatrième degré** : il comporte en plus des signes précédents la présence d'opacités cornéennes linéaires.

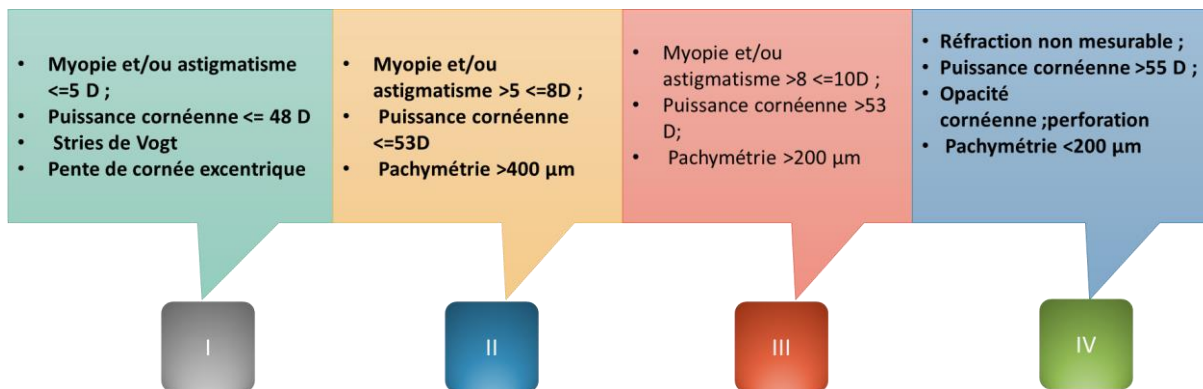


Figure 55. Classification du KC d'après Amsler- Krumeich

Il existe aussi la classification clinique de Krumeich (Figure 55)

=> stade 1 :

myopie et/ou astigmatisme <5 Dioptries ; Puissance cornéenne < 48 Dioptries ; Stries de Vogt

=> stade 2 :

Myopie et/ou astigmatisme $>5 <8$; Puissance cornéenne <53 dioptries ; Pachymétrie $>400 \mu\text{m}$

=> stade 3 :

Myopie et/ou astigmatisme $>8 <10$; Puissance cornéenne >53 dioptries ; Pachymétrie $>200 \mu\text{m}$

=> stade 4 :

Réfraction non mesurable ; Puissance cornéenne >55 dioptries ; Opacité cornéenne ; Pachymétrie $<200 \mu\text{m}$;

La classification de BELIN ABCD (Figure 56) qui tient compte des données de la face postérieure de la cornée. Cette classification a pour avantage d'être intégrée directement dans la plateforme Pentacam. Celle-ci inclut des données tomographiques telles que le rayon de courbure antérieur et postérieur des 3 mm autour du point le plus fin, la pachymétrie (épaisseur de la cornée) minimale, mais également l'acuité visuelle mesurée. Elle permet ainsi de manière automatisée de documenter les modifications significatives et d'évaluer l'efficacité d'un traitement tel que le « cross-linking ».

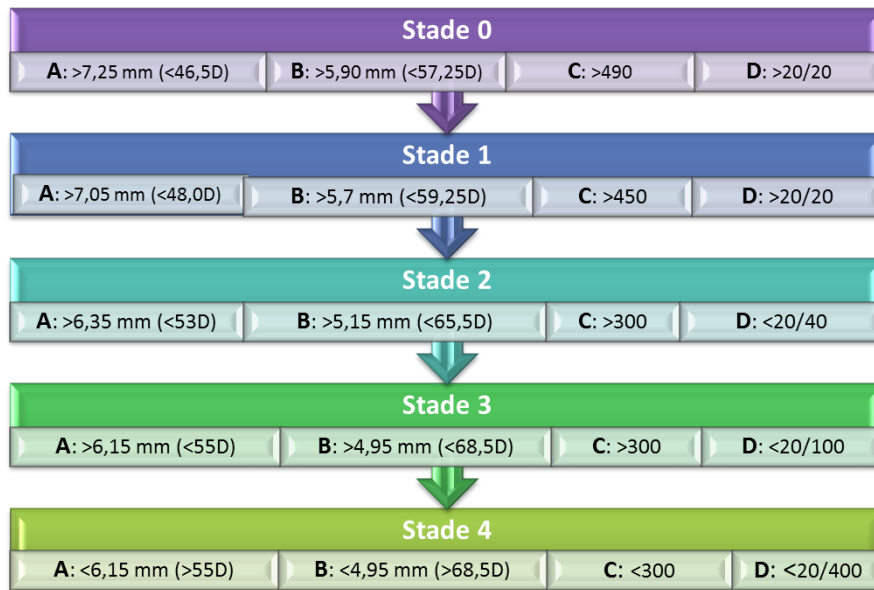


Figure 56. La classification Belin ABCD du KC.

Les critères ABCD comprennent : **A** (Rayon de courbure antérieur), **B** (rayon de courbure postérieur), **C** (pachymétrie), **D** (meilleure acuité visuelle corrigée)

Grâce aux développements des méthodes numériques de détection du KC, et notamment à partir des données spéculaires, d'autres classifications sont apparues.

Rabinowitz et MacDonnell (Figure 57) ont été les premiers à caractériser ces critères (Y S Rabinowitz and McDonnell 1989).

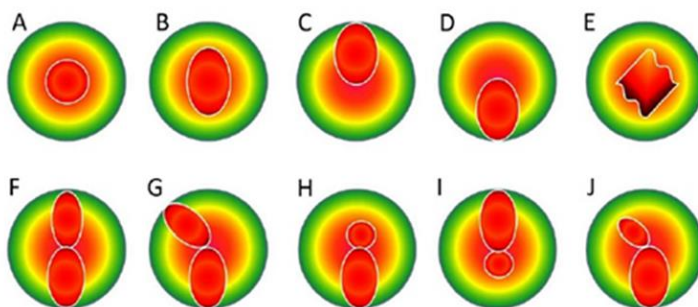


Figure 57. Différents aspects topographiques à partir de cartes axiales en échelle absolue.

D'après (Matalia and Swarup 2013)

D'autres indices vidéotopographiques (Figure 58, 59):

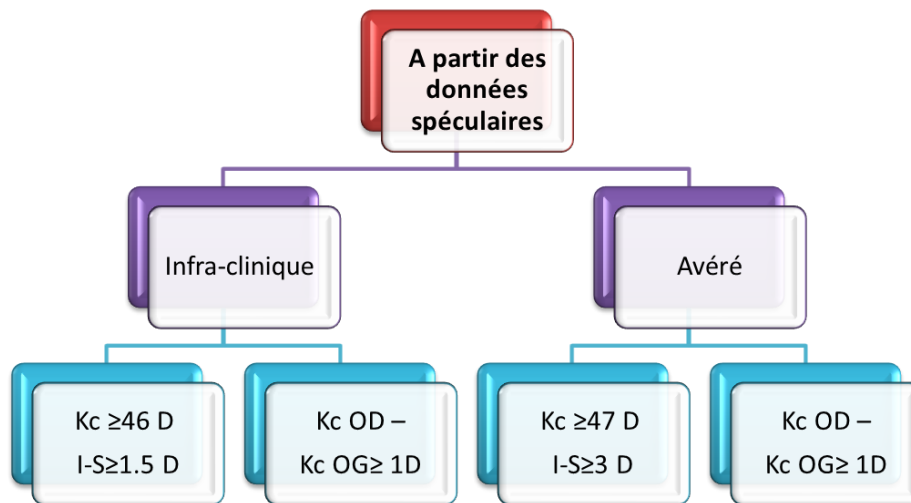


Figure 58. Indices en topographie spéculaire permettant de distinguer les KC infra-cliniques des KC avérés.

(D'après Gatinel, 2011)

On considère un KC avéré si : _ la puissance centrale de la cornée est supérieure à 47 D ;_il existe une différence de plus de 1D entre l'œil droit et l'œil gauche ;_des différences entre les zones supérieures et inférieures de la région paracentrale de la cornée représentent plus de 3D.

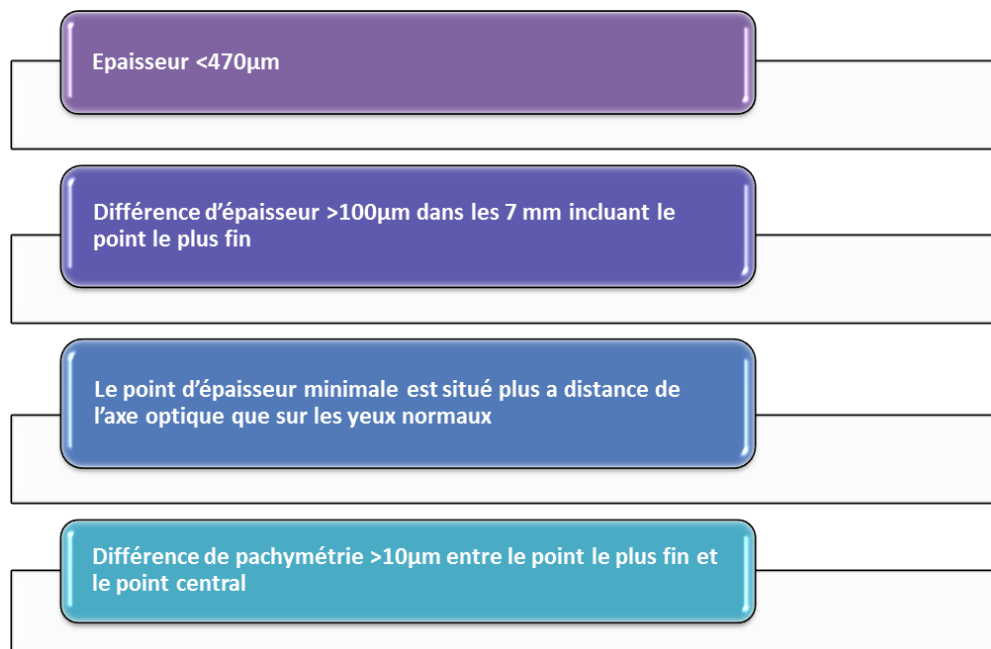


Figure 59. Indices en topographie d'élévation sur la carte pachymétrique des cas suspects de KC. D'après (Schmitt, Simonpoli, and Colin 2007)

Le diagnostic évolutif du KC est posé grâce à la comparaison des résultats entre deux visites :

- une augmentation de la sphère et de l'astigmatisme lors de la réfraction ;
- une perte de la meilleure acuité visuelle corrigée ;
- une différence observée à la topographie cornéenne de plus de 1 dioptrie du Kmax à 6 mois d'intervalle.

Le diagnostic repose sur un faisceau d'arguments dont l'augmentation du Kmax. En cas de diagnostic évolutif le patient sera orienté vers un traitement stabilisateur, le « cross-linking cornéen » (*Jurkiewicz and Marty 2017*). Comme on l'a vu précédemment, le KC affecte les deux yeux, mais souvent, à des stades évolutifs différents entre les yeux.

On distingue 2 formes clinique et infraclinique du KC. Les formes cliniques sont celles qui sont détectables à l'examen biomicroscopique et l'acuité visuelle corrigée ne peut pas être corrigée par des lunettes à cause d'un astigmatisme irrégulier important.

Les formes précliniques précoces sont généralement appelées « subcliniques » ou "forme fruste" du KC. Le KC fruste est une forme très précoce de KC infraclinique, c'est l'œil qui ne présente pas de signes cliniques chez un sujet avec un KC cliniquement manifeste dans l'autre œil.

4.6 Manifestations cliniques

Les symptômes qui exigent une consultation ophtalmologique sont non spécifiques. On retrouve souvent une baisse d'acuité visuelle non complètement corrigable par les verres de lunettes, ni, souvent, par des lentilles de contact à géométrie simple. L'examen biomicroscopique en fente fine à 30° va rechercher 3 signes caractéristiques présents à des degrés très variables selon le stade de la maladie : un astigmatisme irrégulier, un amincissement cornéen avec une cornée en forme de cône et des opacités cornéennes au sommet du cône.

Quand la déformation liée à la maladie atteint un stade très évolué, elle est visible à l'examen direct ; le signe de Munson (**Figure 60**) qui correspond à une déformation caractéristique du rebord palpébral dans le regard vers le bas.



La cornée déforme en « V » la paupière inférieure.
D'après www.gatinel.com

Figure 60. Signe de Munson.

Les opacités cornéennes peuvent être superficielles, réticulaires. Elles se situent dans le stroma antérieur au sommet du cône et correspondent à des ruptures de la couche de Bowman remplacée par du tissu conjonctif. Les opacités profondes représentent des ruptures ou compressions de la membrane de Descemet et sont présentes dans les KCs évolués. Ce sont de fines lignes de contrainte, le plus souvent verticales qui sont visibles dans le stroma profond (Stries de Vogt) (**Figure 61**).

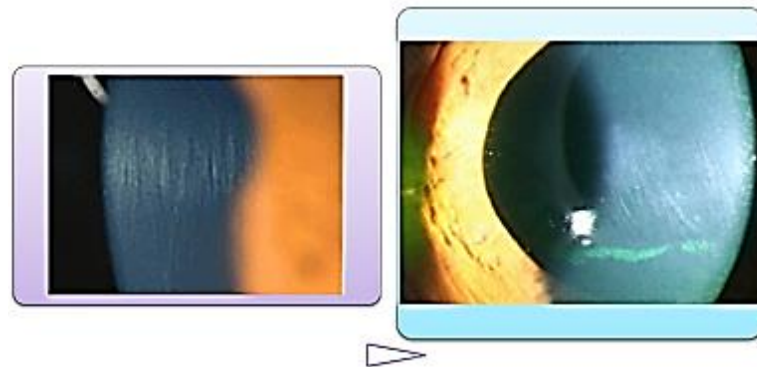


Figure 61. Les stries de Vogt.

Les stries de Vogt correspondent à de fines striations en rapport avec des plis anormaux de la cornée. D'après <https://webeye.ophth.uiowa.edu/eyeforum/atlas/pages/vogts-striae.htm>

Dans des formes plus sévères on peut retrouver un anneau brun situé à la base du cône : c'est l'anneau de Fleischer (**Figure 62**), qui correspond à un dépôt épithélial cornéen de la ferritine provenant des larmes.

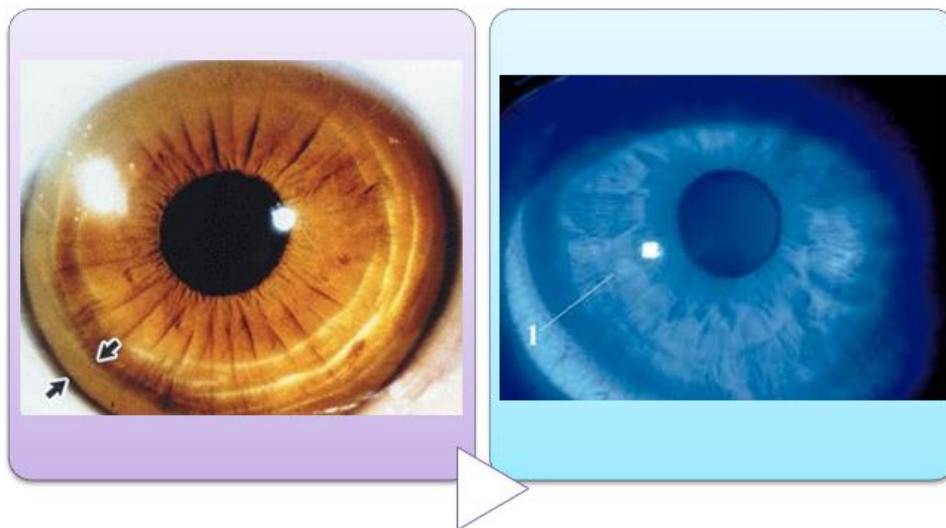


Figure 62. L'anneau de Fleischer dans le KC.

C'est un dépôt de ferritine (1) sous forme d'un halo jaune-brun visible à la limite de la zone déformée et non déformée de la cornée. D'après

www.ophtalmology.wordpress.com/2009/01/07/cornea/fleischer-ring/

On peut citer aussi la visibilité des nerfs cornéens mais ce n'est pas un signe spécifique du KC.

4.7 Méthodes d'exploration

Pour le KC avéré, la recherche de signes cliniques spécifiques et donc un examen biomicroscopique est souvent suffisant pour établir le diagnostic. Le problème se pose surtout pour les formes frustes et infracliniques où des méthodes d'examen supplémentaires sont indispensables.

Le diagnostic objectif du KC est toujours confirmé par la réalisation de la vidéotopographie cornéenne.

La topographie spéculaire

La topographie spéculaire (**Figure 63**) est un examen essentiel à la détection et au suivi du KC. Elle permet d'analyser les rayons de courbure en différents points de la surface antérieure de la cornée, en cumulant les données fournies par un disque Placido. Ces données sont transformées en cartes colorées, puis analysées selon des échelles bien établies.

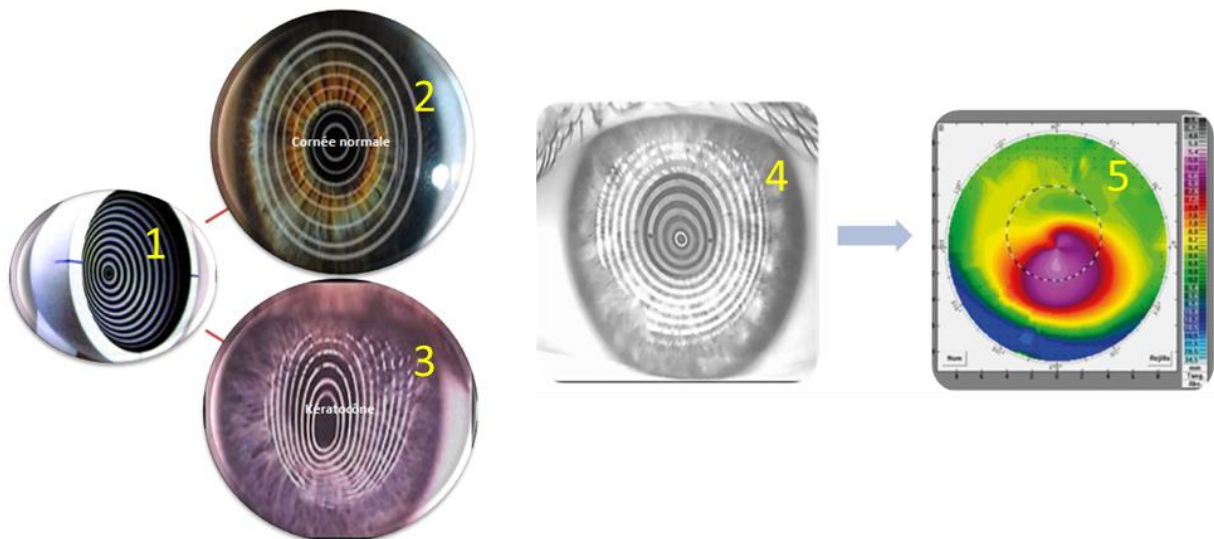


Figure 63. Images obtenues en topographie spéculaire en utilisant le disque de Placido et leur transcription sur des cartes colorées.

1. Disque de Placido. 2. Image d'une cornée normale. 3. Image d'une cornée kératocônique 4. Image du disque Placido réfléchi sur la cornée (images de Purkinje) dans un cas de KC avec calcul en chaque point des mire, du rayon de courbure cornéenne. 5. Transcription en carte colorée par attribution d'une couleur à chaque pas de rayons de courbure mesurés. D'après (Ortiz-Toquero et al. 2016)

La topographie d'élévation

Cet examen caractérise le relief de la cornée. L'élévation est mesurée par triangulation par rapport à une surface de référence, la hauteur par rapport à cette surface étant calculée en μm . L'acquisition se fait soit par un système de balayage en fente lumineuse (Orbscan®)

(Figure 64) soit par une caméra rotative Scheimpflug (Pentacam®). L'avantage de cette technique par rapport à la précédente (topographie spéculaire) est qu'elle permet l'étude de la face postérieure de la cornée, permettant ainsi la détection précoce des formes infracliniques de KC.

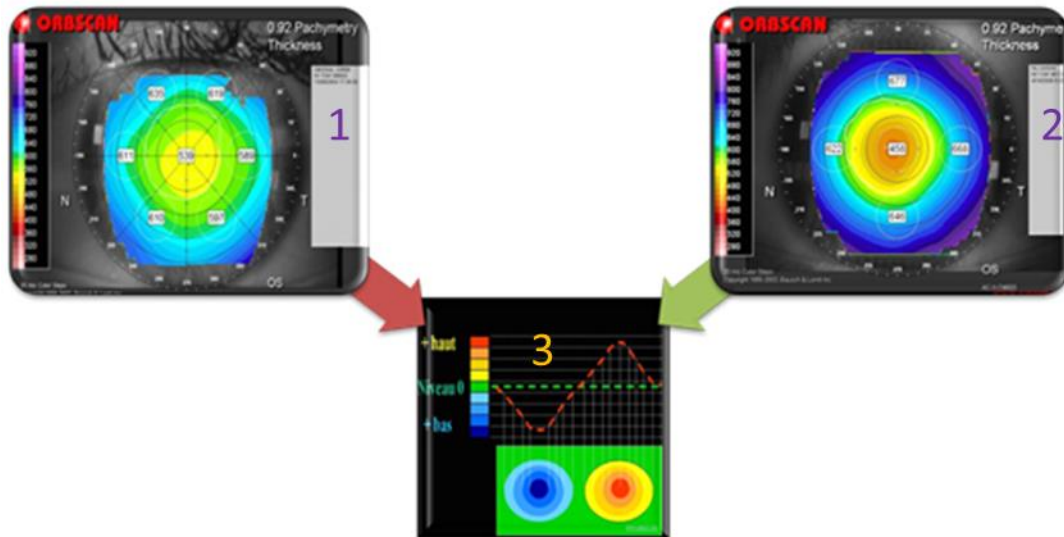


Figure 64. Exemple d'une topographie d'élévation d'une cornée normale (1) et d'un KC (2).

L'échelle correspond à la distribution de l'épaisseur en microns. Les chiffres présentés sur les cartes correspondent à des épaisseurs moyennes locales (carte pachymétrique). **Échelle colorimétrique pour l'élévation** (3). L'unité habituelle est le micron. Chaque couleur correspond à un pas, le plus souvent égal à 5 microns par défaut. Les couleurs chaudes (jaune, orange, rouge, violet) représentent ce qui est bombé, au-dessus de la surface de référence. Les couleurs froides (bleu ciel jusqu'au vert) représentent ce qui est plat, au-dessous de la surface de référence. Le vert est utilisé pour définir les valeurs moyennes.

L'acquisition conjointe des données relatives à la face antérieure et à la face postérieure permet alors de réaliser une carte d'épaisseur en tout point de mesure : carte de pachymétrie cornéenne (Schlegel, Hoang-Xuan, and Gatineau 2008). On parle dans ce cas de tomographie cornéenne.

Imagerie par tomographie par cohérence optique (OCT)

Outre la possibilité de réaliser une tomographie cornéenne, il existe des moyens qui vont permettre d'avoir d'autres indices importants de la cornée et notamment les valeurs pachymétriques, mesurées directement. C'est la tomographie par cohérence optique (OCT). C'est une méthode qui est intéressante à utiliser lorsque l'on est confronté à des formes infracliniques de KC.

L'utilisation de l'OCT possède des indications particulières : en cas d'hydrops, cette technique est utile pour visualiser l'existence d'une rupture de la membrane de Descemet et

en suivre la cicatrisation. L'augmentation du pouvoir de résolution de cette technologie donne de nouvelles possibilités de diagnostic précoce, en permettant au clinicien d'étudier les caractéristiques de la couche épithéliale dont le remodelage au cours de l'évolution du KC pourrait expliquer certaines discordances entre topographie antérieure et postérieure.

Ocular Reponse Analyzer (ORA)

Le concept de cette technique repose sur la mesure de la déformation de la surface cornéenne suite à l'application d'un jet d'air pulsé et calibré. Cette technique est complémentaire aux autres car elle permet d'analyser certains paramètres de la biomécanique cornéenne.

4.8 Diagnostic précoce = Mapping épithélial

Dans les yeux présentant un KC modéré à sévère, les données de la tomographie en ce qui concerne l'épithélium cornéen sont très spécifiques. En effet, le débridement épithélial augmente la magnitude de la kératométrie antérieure de la cornée et de l'astigmatisme. Ces données suggèrent que l'épithélium cornéen donne une surface plate et régulière à l'irrégularité sous-jacente de la couche de Bowman dans le KC.

Le profil d'épaisseur de l'épithélium cornéen est asymétrique, légèrement plus épais en inféro-nasal qu'en supéro-temporal et a un effet important sur la puissance cornéenne totale. Il change la forme du film lacrymal et affecte l'analyse tomographique de cette interface. Dans les yeux kératocôniques, l'épithélium cornéen présente un amincissement localisé sur le cône entouré d'un anneau d'épaississement épithélial (**Figure 65**) (Reinstein, Gobbe, et al. 2010).

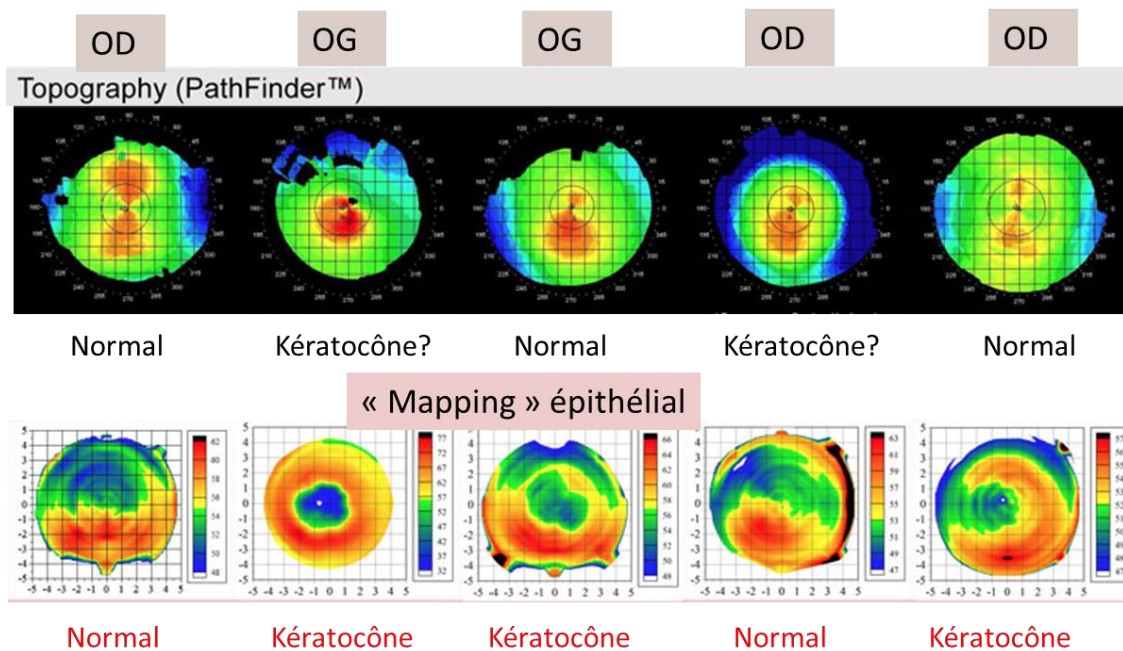


Figure 65. Exemple du profil d'épaisseur épithéliale dans le diagnostic du KC.

Ici sont présentés 5 cas de patients dont le diagnostic du KC est posé après l'étude des cartes épithéliales. D'après (Reinstein, Gobbe, et al. 2010)

C'est la raison pour laquelle il a été postulé que la cartographie de l'épithélium peut être un moyen plus sensible pour le diagnostic précoce du KC (Reinstein, Archer, et al. 2010) (Y. Li et al. 2012) (Anastasios J. Kanellopoulos and Asimellis 2014) (Temstet et al. 2015).

La contribution de l'épithélium à la réfraction de la cornée des patients atteints de KC revêt une importance particulière car ces dernières années, des procédures de remodelage de la surface cornéenne ont été développées pour améliorer la forme cornéenne en combinant la kératectomie photoréfractive transépithéliale et le « cross-linking » (Ziaei et al. 2015). L'épithélium cornéen a le potentiel de modifier la courbure cornéenne antérieure et de maintenir la qualité optique de l'œil par un processus de remodelage visant à compenser les anomalies de la surface stromale observées dans les yeux présentant des irrégularités de surface ; l'épithélium a tendance à lisser les anomalies stromales en étant plus épais sur les "vallées" cornéennes et plus fin sur les "collines" (Anastasios John Kanellopoulos, Aslanides, and Asimellis 2012). On suppose que cette capacité de remodelage est plus importante dans les yeux kératocôniques, ce qui masque les anomalies cornéennes stromales initiales observées dans les ectasies précoces ou infracliniques (Touboul et al. 2012). Le degré de changement épithélial semble corrélé à la sévérité du KC et pourrait être utile pour suivre la progression de la maladie (Reinstein, Gobbe, et al. 2010b).

En conclusion, on peut affirmer que l'épithélium cornéen joue un rôle important de masquage dans les variables topographiques cornéennes antérieures des yeux

kératocôniques. La base cellulaire des changements n'a pas été élucidée et nécessite des recherches supplémentaires. Cet effet de réorganisation de l'épithélium cornéen est important, en particulier à une époque où des systèmes laser excimer personnalisés sont attendus pour traiter la forme de la couche de Bowman (en soustrayant le profil épithélial de la topographie cornéenne) pour améliorer les résultats thérapeutiques. Cette programmation précise de l'épaisseur de l'épithélium dans le nomogramme d'ablation des traitements guidés par topographie transépithéliale pourrait réduire l'erreur résultant des propriétés de masquage de l'épithélium cornéen. Une étude antérieure menée par Vinciguerra et ses collaborateurs ([Vinciguerra et al. 2013](#)) a révélé que les ablations sur la base de la couche de Bowman étaient efficaces dans le traitement de cornées hautement irrégulières grâce à des mesures qui ont été prises par la topographie préopératoire après le débridement épithélial.

La connaissance de la distribution de l'épaisseur de l'épithélium peut être utile dans le dépistage de candidats pour la chirurgie réfractive au laser excimer. La raison en est que l'épithélium n'est pas d'une épaisseur homogène sur la couche de Bowman.

Dans les ectasies cornéennes infracliniques, si l'épithélium est plus mince au niveau de la région ectasique, les cartes de profil épithélial peuvent aider un clinicien à identifier les patients chez qui les procédures d'ablation cornéenne sont contre-indiquées.

Reinstein et al. ont montré en utilisant le scanner Artemis® à ultrasons de très haute fréquence qu'un « doughnut » épithélial suggère la présence d'un cône stromal sous-jacent ([Reinstein, Archer, and Gobbe 2009](#)). L'absence du « doughnut » épithélial indiquerait que la topographie anormale n'était pas due au KC. La compensation épithéliale peut masquer la présence d'un cône sous-jacent dans les stades précoces de la maladie ([Mas Tur et al. 2017](#)).

Le dépistage précoce du KC se heurte en pratique à l'absence de critères uniques, génétique, morphologique ou biochimique (par exemple enzymatique), permettant d'en affirmer le diagnostic. La forme fruste est à redouter car c'est le facteur de risque principal de l'ectasie iatrogène post-LASIK (Laser in situ keratomileusis qui est une technique de chirurgie réfractive pour corriger la myopie). Le dépistage du KC fruste est une priorité en chirurgie réfractive car le LASIK est contre-indiqué en raison du risque de survenue d'une ectasie cornéenne.

4.9 Traitements du KC

Lors de la prise en charge du KC, nous sommes confrontés à 2 problèmes : l'évolutivité (c'est le domaine du « cross-linking ») et la réhabilitation visuelle.

Voici un exemple d'arbre décisionnel de prise en charge du KC ([Figure 66](#))

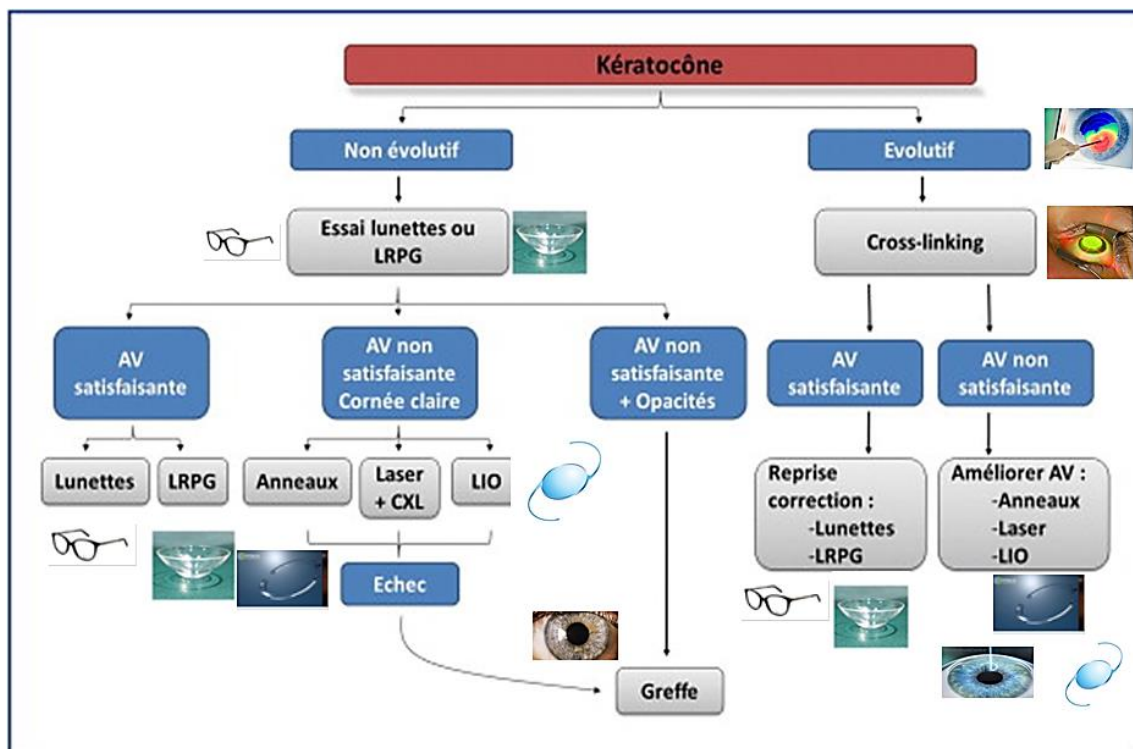


Figure 66. Arbre décisionnel pour la prise en charge du KC.

D'après (Fournié et al. 2013). LRPG : lentilles rigides perméables au gaz ; CXL : cross-linking ; AV : acuité visuelle ; LIO : lentille intraoculaire

4.9.1 Prise en charge contactologique

Les lunettes

Les verres correcteurs constituent le mode de correction initiale du KC débutant. Si ce traitement est insatisfaisant, le patient peut éprouver un inconfort visuel relatif lorsque l'astigmatisme irrégulier devient trop important.

Les lentilles

L'adaptation en lentilles est proposée aux patients pour mieux corriger les défauts optiques créés par l'irrégularité cornéenne. En effet, le KC est à l'origine d'un astigmatisme irrégulier mais également d'autres aberrations optiques de haut degré.

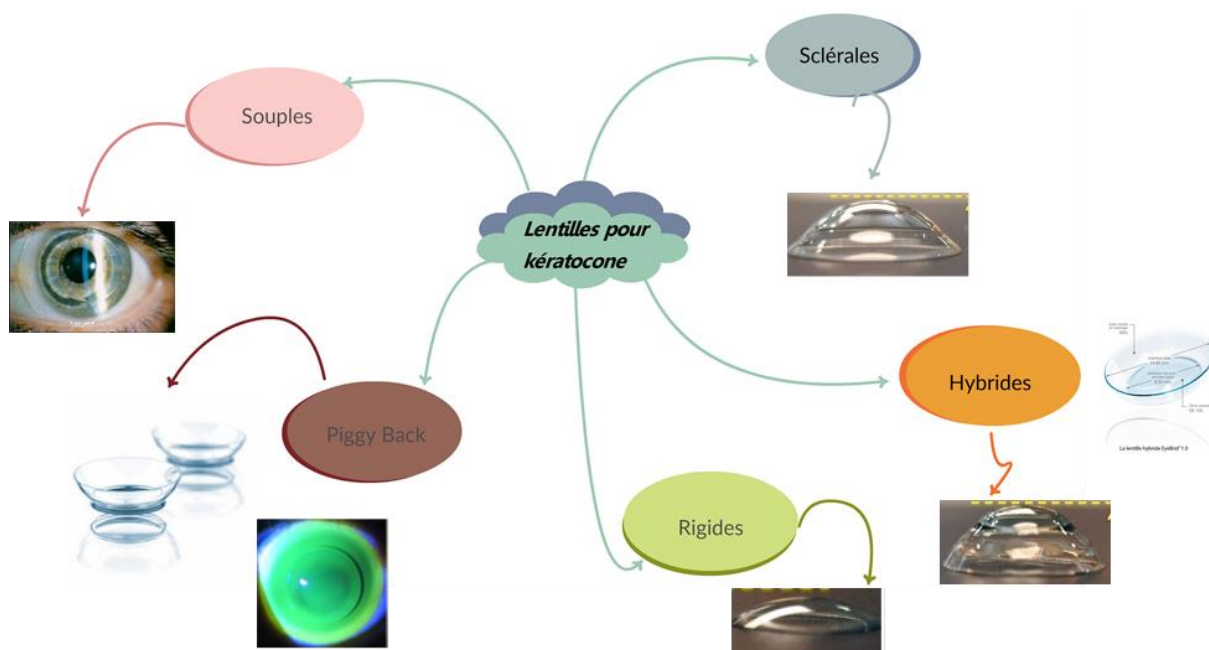


Figure 67. Les lentilles utilisées pour améliorer la vision du patient atteint de KC.

(Voir le texte ci-dessous)

Il existe plusieurs types de lentilles pouvant être proposées aux patients (**Figure 67**) :

- les lentilles souples : réservées aux petits astigmatismes plutôt réguliers ;
- les lentilles rigides perméables à l'oxygène : elles sont de petit diamètre et permettent de corriger les défauts de la cornée en utilisant comme surface optique, la surface régulière de l'optique de la lentille ;
- les lentilles hybrides : elles possèdent un centre rigide et une collerette souple. Elles sont mieux tolérées que les lentilles rigides seules ;
- les lentilles sclérales : qui sont de plus grand diamètre, elles passent en pont au-dessus de la cornée et contiennent un réservoir de larmes au centre. Elles sont particulièrement bien tolérées chez les patients avec une cambrure cornéenne élevée.
- les lentilles « piggy bag » : il s'agit d'une lentille souple placée sous une lentille rigide, toujours dans l'objectif d'améliorer la tolérance.

L'avantage des lentilles de contact par rapport aux lunettes est lié à l'interface qu'elle crée avec le film lacrymal. Cette dernière permet de « gommer » et compenser une grande partie des irrégularités de la cornée. Les lentilles rigides sont beaucoup plus efficaces mais plus complexes à adapter et à tolérer. Lorsque la lentille n'est pas ou plus tolérée, ou si la correction optique devient insatisfaisante, il est licite de proposer une alternative chirurgicale.

4.9.2 Prise en charge chirurgicale

2 possibilités à envisager :

- Le « *cross-linking* » cornéen, qui est indiqué pour stopper la progression de la maladie.
- Les cornéoplasties par anneaux intra-cornéens, les implants toriques et les greffes de cornée dont l'objectif est la réhabilitation visuelle.

4.9.2.1 Le traitement stabilisateur du KC : le « *cross-linking* » du collagène cornéen (CXL)

Cette technique a été proposée pour la première fois par Theo Seiler dans le traitement du KC en 1997 à Dresde en Allemagne. Elle a pour but d'arrêter la progression de la maladie en « rigidifiant » la cornée. Le principe repose sur une réaction photochimique entre les ultraviolets-A (UVA) et la riboflavine (vitamine B2) afin de créer des ponts entre les chaînes de collagène. Les UVA serviront de catalyseur, et la riboflavine sera utilisée comme photosensibilisant (elle absorbe aussi les UVA et protège ainsi les structures internes de l'œil).

Cette procédure permet une stabilisation du KC dans près de 90 % des cas via une augmentation :

- de la résistance biomécanique de la cornée (*Wollensak et al. 2004*)
- de la résistance aux enzymes dégradant les liaisons entre les fibres de collagène (*Eberhard Spoerl, Wollensak, and Seiler 2004*)

Certaines études ont montré une augmentation de la sensibilité aux contrastes et une augmentation de l'acuité visuelle après le « *cross-linking* » chez certains patients (*Lamy et al. 2013*), même si ce n'est pas l'effet principal recherché. Enfin, des études en cours suggèrent que l'action du *cross-linking* (technique épi-OFF après avoir retiré l'épithélium cornéen) serait due à une diminution de la sensibilité cornéenne entraînant une diminution des frottements oculaires. Il existe certaines conditions à la réalisation de cette procédure. La cornée doit être transparente, le KC doit être évolutif, et avoir une pachymétrie supérieure à 400 µm et une densité de cellules endothéliales d'au moins 2000 cellules/mm².

Le « *cross-linking* » consiste, après désinfection locale et sous anesthésie topique, en une désépithélialisation cornéenne mécanique, suivie d'une imprégnation du stroma cornéen par de la riboflavine pendant 30 minutes et d'une irradiation par rayonnement UVA (360 nm) de 3 mW/cm² pendant 30 minutes.

Le but du traitement est de rigidifier le collagène pour stabiliser ou faire régresser la maladie.

La photopolymérisation du collagène cornéen est une stratégie de traitement du KC peu invasive. Cette réaction de formation de radicaux libres oxygénés qui vont induire la

formation d'une liaison covalente entre les terminaisons hydrocarbonées des fibrilles de collagène est biochimiquement irréversible (**Figure 68**).

Certains patients par contre "ne répondent pas" au traitement et voient leur KC progresser.

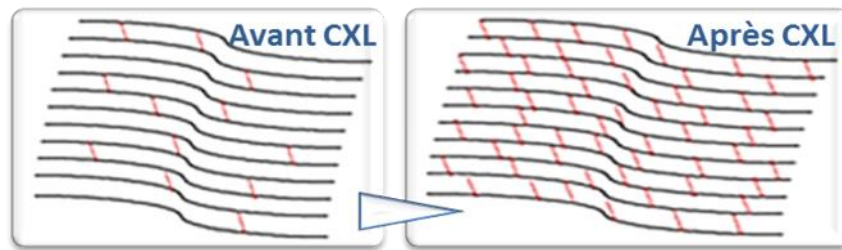


Figure 68. Réticulation du collagène cornéen par le cross-linking.

Les liaisons physico-chimiques entre les fibres de collagène avant et après CXL.

La tolérance est bonne et aucun effet secondaire majeur cristallinien ou rétinien n'a pas été constaté.

Actuellement, le « cross-linking » est le plus souvent proposé à un adulte jeune qui présente un KC évolutif ainsi qu'une épaisseur cornéenne supérieure à 400 μm .

Un « cross-linking » cornéen, en cas de progression kératométrique rapide, est indiqué afin de stabiliser la maladie. Cette procédure peut être associée à la pose d'anneaux intra-cornéens ou à la réalisation d'un laser Excimer guidé par la topographie cornéenne.

L'implantation d'anneaux intra-cornéens, réversible, peut permettre une diminution de l'amétropie sphéro-cylindrique et des aberrations de haut degré par un aplatissage du sommet du cône. La mise en place d'un implant phaque, sphérique ou torique, constitue une alternative thérapeutique, mais son indication doit rester très prudente. En présence d'opacités cornéennes centrales ou paracentrales, une greffe de cornée est indiquée (kératoplastie lamellaire antérieure profonde).

Comme on vient de le dire, le but du « crosslinking » est d'arrêter l'évolution de la maladie, c'est pourquoi il est nécessaire de connaître les critères de progression de la maladie. En effet, même s'il n'y a pas de consensus, la plupart des auteurs s'accordent pour définir la progression d'un KC sur :

- une augmentation de la kératométrie maximale de 0,5 à 1 D ; ou la nécessité d'adapter le rayon de courbure d'une lentille de contact sur une période de 2 ans ; ou une baisse d'acuité visuelle
- une augmentation de la correction sphérique myopique $\geq 0,5$ dioptrie ; ou une augmentation du cylindre ≥ 1 dioptrie.

Les effets indésirables sont la douleur pendant les 48 heures postopératoires, l'infection, le pseudo-haze (cicatrices cornéennes responsables d'une baisse d'acuité visuelle réversible dans les 3 premiers mois), les infiltrats aseptiques et la nécrose cornéenne très rarement.

Quoi de neuf ?

Afin de pouvoir éviter les effets secondaires liés au retrait de l'épithélium et/ou bien afin d'appliquer cette technique sur des cornées d'épaisseur inférieure au consensus établi à 400 μm , différentes variantes de cette technique sont proposées :

- Des techniques de conservation de l'épithélium :
 - Le « cross-linking » du collagène transépithélial (ou CXL Epi-ON) qui favorise la diffusion de la riboflavine en ajoutant à la solution conventionnelle une ou plusieurs molécules favorisant le passage à travers l'épithélium (*Gore, Shortt, and Allan 2013*) ;
- La iontophorèse qui consiste à faire pénétrer une molécule de riboflavine chargée à travers l'épithélium de la cornée grâce à l'application locale d'un champ électrique de faible intensité (*Bikbova and Bikbov 2014*) ;
- Le « cross-linking » avec une solution hypo-osmolaire qui est pratiqué sur des cornées inférieures à 400 μm . Après désépithélialisation de la cornée, celle-ci peut être artificiellement œdématiée avec de la riboflavine 0,1 % hypo-osmolaire jusqu'à atteindre une épaisseur supérieure à 400 μm , puis la même procédure que celle décrite précédemment est appliquée (*Cadraghe 2014*).

4.9.2.2 Les anneaux intra-cornéens pour le KC

Les anneaux intra-cornéens (AIC) sont proposés aux patients présentant un échec d'adaptation aux lentilles mais pour qui une greffe de cornée semble prématurée. Ils sont posés pour le KC depuis 1997. Pour pouvoir bénéficier des anneaux intra-cornéens, le patient doit avoir une cornée claire, une épaisseur et une kératométrie « acceptables », variables selon les anneaux disponibles.

L'objectif principal des anneaux est d'essayer de diminuer l'anomalie de la forme cornéenne sans enlever le tissu cornéen et sans toucher le centre de la cornée (*Schmitt, Simonpoli, and Colin 2008*).

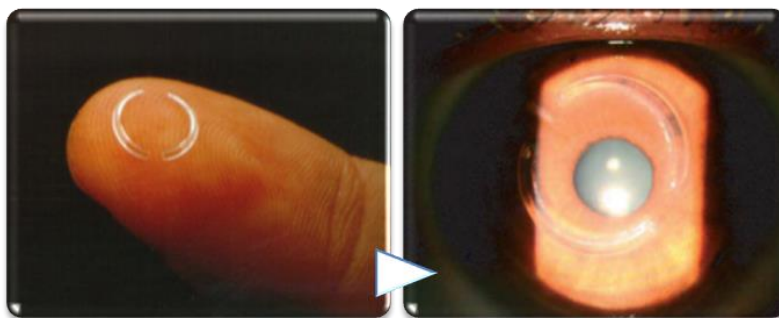


Figure 69. Les anneaux intra-cornéens pour le KC.

La pose d'anneaux (**Figure 69**) se fait par des incisions dans la cornée, de 2 mm, réalisés manuellement ou par laser femtoseconde. Ces anneaux vont permettre d'aplanir la cornée et

de réduire le Kmax d'environ 2 dioptries, ce qui correspond à un gain d'une à trois lignes d'acuité visuelle chez 70 à 80 % des patients. Dans la plupart des cas, une adaptation en lunettes ou lentilles sera nécessaire après la pose d'anneaux pour optimiser le gain visuel. La pose d'anneaux intra-cornéens ne gêne pas une greffe de cornée ultérieure car ils peuvent être retirés facilement.

Une paire d'anneaux est généralement placée en moyenne périphérie de la cornée. Le centre de la cornée est donc totalement préservé. Leur épaisseur est environ égale à la moitié de l'épaisseur cornéenne normale. Ils sont introduits lors d'une courte intervention chirurgicale. L'intervention est par ailleurs considérée comme réversible. Le résultat est en général bon si l'indication est bien posée. La prédictibilité est cependant moyenne en raison des différentes présentations cliniques d'ectasie cornéenne et de réactions cicatricielles variables.

Étant donné qu'il s'agit d'une technique opératoire, la pose des anneaux comporte certains risques, rares, tels que : des cas d'extrusion spontanée, de perforation de la cornée, d'infiltrats cornéens, de néovascularisation et de kératites infectieuses. Certaines contre-indications sont à prendre en compte :

- Cicatrice de la cornée centrale
- Épaisseur de la moyenne périphérie cornéenne insuffisante.
- Kérométrie moyenne centrale excessive (cornée « trop bombée »).

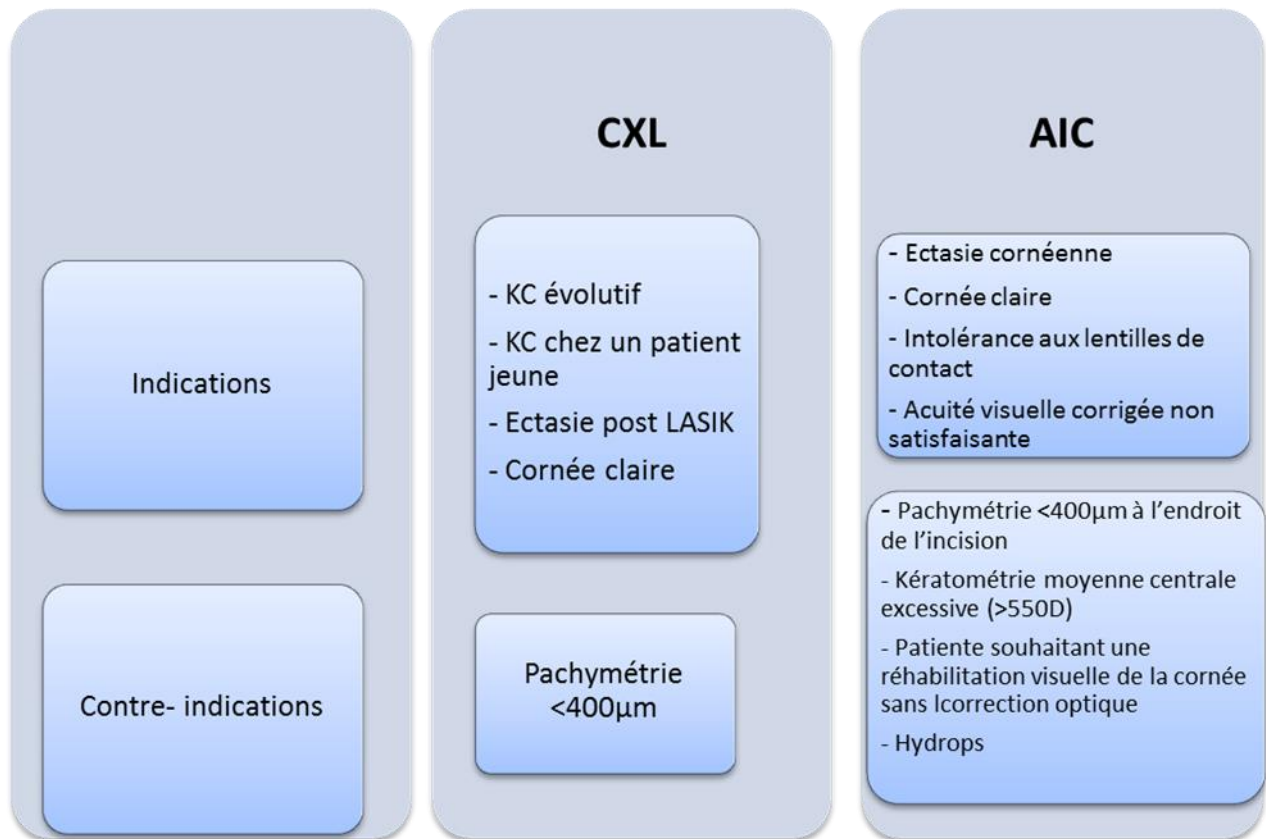


Figure 70. Les principales indications et contre-indications du CXL et de la pose d'anneaux intra-cornéens.

(Cadrage 2014)

Quoi de neuf ?

Il existe à l'heure actuelles des modèles innovants (**Figure 71**) d'anneaux intra-cornéens, quasi-circulaires ou asymétriques notamment, qui s'adaptent plus précisément aux irrégularités cornéennes et présentent des variations d'épaisseur progressive (par pas de 50 µm sur leur longueur).



Figure 71. Exemples d'anneaux intra-cornéens.

D'après <https://www.opthalmicdata.com/manufacturers/ferrara/>

4.9.2.3 Les implants toriques

Lorsque l'astigmatisme est trop important pour être corrigé par des lunettes ou par des lentilles, si la cornée centrale est claire et que l'astigmatisme n'est pas trop irrégulier, il est possible de proposer un implant intra-oculaire correcteur. Cet implant peut être torique pour corriger l'astigmatisme. Il n'est pas incompatible avec la présence d'anneaux intra-cornéens insuffisamment efficaces. En cas d'intolérance ou d'inefficacité, il peut être retiré. Ce geste est possible dans les suites d'une greffe de cornée. Bien que potentiellement utiles, ces implants sont encore rarement posés mais pourraient à l'avenir prendre une place plus codifiée dans la prise en charge de la maladie.

Les implants toriques peuvent être utilisés pour les patients phakes (avec leur propre cristallin) ou pseudophakes (avec implant de cristallin artificiel) afin de corriger les défauts optiques. Pour pouvoir utiliser cette technique, il faut respecter certaines règles :

- la cornée du patient doit être transparente;
- avoir une réfraction stable;
- la puissance cornéenne doit être « modérée » ce qui correspond à des KC modérées (les formes sévères devront plutôt bénéficier de cornéoplasties),

4.9.2.4 Greffes de cornée

Le KC constitue la deuxième indication opératoire de greffe de cornée en France. C'est la plus ancienne greffe de tissu réalisée avec succès chez l'homme (1887 – Von Hippel). Elle consiste à remplacer un fragment de cornée opaque par une cornée saine et transparente.

La cornée est considérée comme étant un site privilégié pour la greffe car elle est dépourvue de vaisseaux sanguins et lymphatiques, elle comporte peu de cellules et présente un tissu conjonctif compact, d'où un conflit immunologique réduit. C'est la raison pour laquelle les taux de réussite de ces greffes sont élevés avec de bons résultats et un pourcentage de rejet faible.

A l'heure actuelle il existe 2 techniques de greffe de cornée utilisées dans le traitement du KC (**Figure 72**) :

- la kératoplastie lamellaire profonde qui permet de traiter des lésions jusqu'à la membrane de Descemet (**Figure 72 B**);
- et la kératoplastie transfixiante qui permet le changement de toute l'épaisseur de la cornée (**Figure 72 A**);

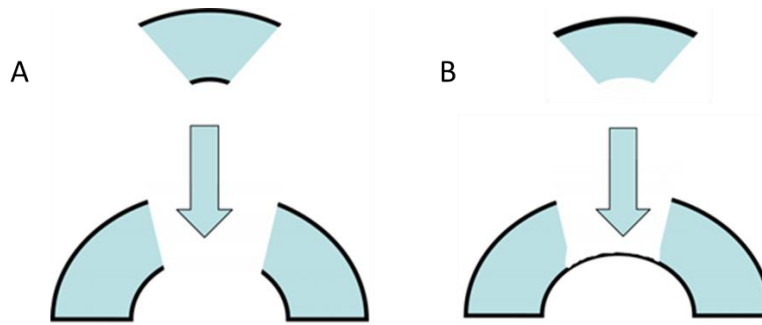


Figure 72. Représentation schématique de différentes greffes de cornée utilisées dans le traitement du KC.

A- kératoplastie transfixiante ; B- kératoplastie lamellaire profonde.

La greffe de cornée peut être proposée aux patients atteints de KC lorsque les autres traitements sont en échec. Ceci signifie que le port de lentilles de contact est devenu impossible à cause de la courbure cornéenne ou du développement d'une intolérance de la surface oculaire aux lentilles (conjonctivite chronique giganto-papillaire par exemple). Les patients candidats à la greffe ont un KC de stade III ou IV dans la classification d'Amsler. Il s'agit donc de KCs cliniquement évidents à la lampe à fente. Étant donné le risque de complications sévères non négligeables, il ne semble pertinent de proposer la greffe que lorsque le handicap visuel devient important ou sévère.

La greffe peut soit remplacer toute l'épaisseur de la cornée soit garder la partie la plus profonde. On parle de **greffe transfixiante** lorsque toute l'épaisseur de la cornée est remplacée, et de **greffe lamellaire antérieure** lorsqu'il s'agit uniquement de la partie externe de la cornée qui est greffée. Dans le KC, il s'agit de greffe lamellaire antérieure **pré-descemétique** puisque toute la cornée est remplacée sauf sa couche la plus profonde (membrane de Descemet + couche endothéliale).

L'avantage des greffes lamellaires pré-descemétiques est qu'elles sont réalisées à globe fermé ce qui diminue les risques peropératoires par rapport à une « chirurgie à ciel ouvert ». De plus, elles présentent moins de risque de rejet car la partie endothéliale du patient n'est pas greffée. La conservation de la couche endothéliale, qui n'est pas malade dans le KC, assure enfin une plus grande longévité au greffon puisque lorsqu'il est greffé, le nombre de cellules endothéliales diminue plus vite qu'un état normal. Cependant, les greffes lamellaires antérieures pré-descemétiques sont plus délicates à réaliser et restent donc encore rares.

La greffe transfixiante reste donc la modalité de greffe la plus pratiquée. Comme pour toute chirurgie il existe des risques per- et post-opératoires que le chirurgien doit faire connaître à son patient.

Les risques sont :

- un retard de réépithélialisation du greffon
- une défaillance précoce de l'endothélium du greffon (pour la greffe transfixiante)
- un rejet immunitaire ou « maladie du greffon »
- une récurrence de la maladie causale
- un astigmatisme post-opératoire important
- une inflammation oculaire qui dans des cas sévères peut évoluer jusqu'à l'endophtalmie (infection touchant tous les tissus internes du globe oculaire).

La durée de vie du greffon dépend du risque de rejet de greffe, de la qualité initiale du greffon (densité de cellules endothéliales) et des complications inflammatoires et tensionnelles possibles. En moyenne un greffon transfixiant dure 20 à 30 ans. Les résultats visuels sont globalement bons (en moyenne 5/10) mais la rapidité de réhabilitation visuelle lente. Il faut compter 3 mois avant de retrouver une cornée transparente, et 4 à 6 mois avant de pouvoir débiter l'ablation sélective des points de suture. Cette étape permet d'ajuster l'astigmatisme et d'équiper le sujet soit en verres de lunettes soit en lentilles de contact à nouveau. Il existe quelques rares cas de récurrences de KC sur greffon (en moyenne 17 ans), qui correspondent le plus souvent à une poursuite évolutive de la maladie sur la collerette réceptrice non greffée.

Quoi de neuf ?

1. Greffe de la couche de Bowman

Comme on l'a vu précédemment, une caractéristique pathogénique du KC est la fragmentation de la couche de Bowman avec (voir 4.4) une sortie des enzymes protéolytiques amenant à un amincissement de la cornée, d'où l'idée d'utiliser un moyen de traitement par renforcement de cette membrane pour stabiliser la maladie.

Récemment, une nouvelle hypothèse a été émise afin d'augmenter la résistance et la stabilité cornéenne par un implant médio-stromal d'une greffe de couche de Bowman isolée

(Figure 73).

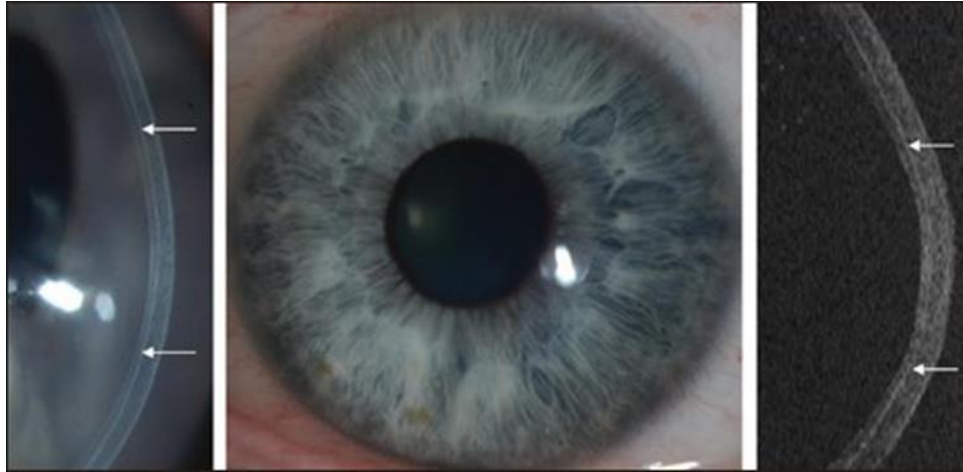


Figure 73. Examen biomicroscopique d'un patient après greffe de la couche de Bowman.

D'après (Van Dijk et al. 2015)

La procédure s'est avérée bénéfique pour réduire l'ectasie dans les KC avancés. Étant donné que cette membrane est acellulaire, le risque de complications postopératoires est très faible (cataracte, glaucome, rejet et infections). Il faut noter que cette procédure est destinée à limiter la progression de la maladie, c'est la raison pour laquelle parler de gain visuel est un peu prématuré.

Les candidats idéaux pour cette technique sont les patients avec un KC avancé et progressif, avec une bonne vision corrigée par des lentilles de contact, qui ne sont pas indiqués pour un « cross-linking », en raison de la minceur cornéenne notamment, et ont des problèmes de tolérance aux lentilles de contact.

2. « Le lifting cornéen »

C'est une méthode qui permet de sculpter la cornée à l'aide d'une kératectomie périphérique au laser Excimer en forme de croissant. Cette technique a été décrite par le Professeur Carriazo et a pour but de réduire la profondeur de la chambre antérieure, ainsi que de diminuer la kératométrie et de corriger l'astigmatisme irrégulier (Carriazo and Cosentino 2017).

4.9.2.5 Les traitements combinés

Les moyens thérapeutiques du KC se sont considérablement développés ces dernières années.

Les traitements combinés se caractérisent par l'application, simultanée ou proche dans le temps, de plusieurs principes thérapeutiques de façon à mieux contrôler la maladie du patient. Le développement de ces associations est venu modifier les schémas thérapeutiques classiques. Les traitements combinés permettent en effet une prise en

charge dont les modalités sont en évolution permanente avec un meilleur contrôle de la maladie dans de nombreuses situations cliniques.

L'objectif est bien sûr la stabilisation de l'ectasie dont le seul recours est le « cross-linking » et l'amélioration de la fonction visuelle par correction du trouble réfractif associé (anneaux intra cornéens, implants toriques, photoablation laser). Plusieurs techniques sont proposées :

1. « Cross-linking » et photoablation réfractive guidée par la topographie

C'est une démarche suggérée par Kanellopoulos *et al.* (*A John Kanellopoulos and Binder 2007*) qui réalisent dans un premier un « cross-linking » classique avec une désépithélialisation poursuivie 12 mois après par la photo-ablation. Cette procédure combinée permet de corriger l'astigmatisme irrégulier mais on ne peut l'envisager que sur des cornées dont l'épaisseur est supérieure à 400 µm. En réalisant cette technique (198 yeux), de meilleurs indices ont été obtenus notamment en ce qui concerne les données kératométriques (*Anastasios John Kanellopoulos 2009*). Cette étude a été confirmée par d'autres (*Tuwairqi and Sinjab 2012*)(*Labiris et al. 2012*).

2. « Cross-linking » et implantation d'anneaux intra-cornéens

L'objectif de ces traitements est d'améliorer la prise en charge des patients et de diminuer le recours à la greffe de cornée.

Ainsi, pour les patients atteints de KCs progressifs conservant une cornée claire dont l'épaisseur est suffisante (au moins 400 µm en son centre), le « cross-linking » et la pose d'anneaux intra-cornéens constituent ainsi des thérapeutiques indiquées en cas d'échec des corrections visuelles classiques. Elles peuvent être indiquées indépendamment l'une de l'autre ou combinées. De nombreux essais sont en cours afin d'optimiser l'efficacité de cette combinaison. Les résultats de plusieurs études montrent qu'au niveau du gain visuel, il n'y a pas de différence significative entre la réalisation de ces procédures chirurgicales simultanément ou d'une manière séparée.

3. Implantation d'anneaux intra-cornéens, « Cross-linking » et photoablation laser guidée par topographie simultanées

Cette triple approche résulte des deux précédentes et vise à permettre la prise en charge la plus complète de l'ectasie cornéenne. Une seule étude réalisée sur 5 yeux retrouve une amélioration de la meilleure acuité visuelle corrigée, une stabilisation de l'ectasie cornéenne et suggère la sécurité de la procédure qui peut constituer une option raisonnable de traitement (*Iovieno et al. 2011*).

4. « Cross-linking » et implant phaqué torique

Cette procédure vise à stabiliser l'ectasie cornéenne et corriger l'astigmatisme myopique résiduel par l'implantation d'un implant torique quelques mois après.

Sur une série de 17 yeux, la stabilité de l'ectasie cornéenne est satisfaisante à 36 mois d'évolution et sur le plan réfractif 76 % des patients sont à $\pm 1D$ de la correction attendue de l'astigmatisme (Güell et al. 2012).

Ces divers traitements combinés représentent donc une autre possibilité de la prise en charge du KC évolutif et sont assez encourageants, selon les premiers résultats. Lorsqu'une bithérapie s'impose, le choix d'une association bien déterminée, avec de nombreux intérêts, est devenu plus légitime et totalement justifié. En effet, le choix de tel ou tel traitement repose toujours sur une appréciation du rapport bénéfices-risques lié à l'intervention chez le patient que le médecin doit prendre en charge. Dans ces conditions, il ne serait pas fondé de conclure trop précocement à la supériorité de telle procédure sur telle autre. La meilleure approche est celle qui permet d'améliorer la qualité de vie des patients et d'obtenir une meilleure observance thérapeutique.

4.9.3 Nouvelles stratégies à l'étude dans le traitement du KC

IVMED-80 (iVeena) est un collyre conçu pour le traitement du KC indépendamment de la chirurgie ou du traitement au laser. Ce médicament contient un cofacteur de la lysyl-oxydase.

Les résultats expérimentaux de l'effet des gouttes oculaires iVeena sur les cornées kératocôniques humaines *in vitro* ont montré une augmentation de l'activité des LOX et de la rigidité de la cornée. Un aplatissement cornéen central suite au traitement chez le lapin a été démontré lors d'imagerie cornéenne effectuée en OCT (Tomographie par Cohérence Optique).

Ce médicament pourrait représenter un pas en avant pour la prise en charge non invasive du KC. En particulier, si les résultats cliniques démontrent sa sécurité et son efficacité, cette thérapie pourrait être une méthode séduisante pour traiter le KC progressif ou être un traitement adjuvant de l'épithélium après « cross-linking ». En revanche, des tests complémentaires sont nécessaires pour identifier la concentration spécifique de LOX afin de prédire la progression du KC et la réponse aux traitements combinés.

Au vu du rythme des avancées scientifiques en ce qui concerne le KC, et de la place de plus en plus large que prennent les différentes technologies dans la pratique quotidienne, autant sur le plan diagnostique que thérapeutique, il est très probable dans les années à venir que des moyens simples et accessibles de diagnostic précoce et de traitement de cette maladie vont apparaître.

Chapitre II : OBJECTIFS DE LA THESE

L'organogenèse de la peau et de l'œil sont le résultat d'interactions cellulaires complexes dont les supports moléculaires présentent des similarités. L'épithélium cornéen, épithélium stratifié non cornifié, joue un rôle optique fondamental et protège la cornée contre les agressions extérieures. Alors que la caractérisation et la localisation des CS à l'origine de son renouvellement continu sont relativement bien connues, le programme de différenciation terminale des cellules épithéliales qui le composent est nettement moins étudié. Or, nous savons que plusieurs pathologies impliquent des désordres de celle-ci, en particulier le KC. Le KC est une affection très préoccupante pour le patient et le praticien car la déformation cornéenne altère la vision et peut nécessiter une greffe de cornée, seul recours imparfait pour les formes sévères. Des études récentes montrent l'importance d'analyser le rôle de l'épithélium cornéen dans le KC pour plusieurs raisons :

- Le mapping épithélial permet de détecter les formes sous-cliniques ou frustes de KC, d'où l'idée que cette pathologie trouve son origine au niveau de l'épithélium.
- Il existe des cas cités dans la littérature de réapparition du KC après la greffe transfixiante de la cornée, suite à une réépithélialisation pathologique de la surface oculaire, sur un stroma « normal » car il provient du donneur sain.
- Des altérations dans l'épithélium conjonctival ont été retrouvées chez les patients atteints du KC ([Fukuchi et al. 1994](#)), ce qui prouve que le KC n'est pas seulement une maladie stromale.

Nous faisons l'hypothèse d'une anomalie de la différenciation épithéliale dans le KC et proposons de rechercher et d'identifier des marqueurs précoces du KC en caractérisant, dans un premier temps, le programme de différenciation de l'épithélium cornéen normal et en le comparant ensuite avec celui du KC.

Dans ce contexte, l'objectif de mon travail de thèse était double :

1. Caractériser le programme de différenciation terminale de l'épithélium cornéen en prenant comme référence des gènes de différenciation épidermique.

Pour cela, j'ai tout d'abord analysé 3 groupes de marqueurs plus ou moins tardifs de la différenciation épidermique : les kératines (K1/K10 et K6/K16), les composants des jonctions serrées (claudine 1) et des desmosomes (desmoglénines, desmocollines et cornéodesmosine) et les composantes de l'enveloppe cornée (involucrine, loricine, filaggrine et hornerine).

2. Comparer le programme de différenciation de l'épithélium cornéen normal avec celui du KC.

Chapitre III: RESULTATS EXPERIMENTAUX

ARTICLE

L'expression de composants de l'enveloppe cornée et de gènes liés au stress oxydatif est diminuée dans l'épithélium cornéen des patients atteints de kératocône.

Tatiana Lupasco, Zhiguo He, Myriam Cassagne, Cyrielle Suarez, Pierre Fournié, Guy Serre, Philippe Gain, Gilles Thuret, François Malecaze, Michel Simon, Stéphane Galiacy

Résumé

Le kératocône (KC) est une maladie cornéenne multifactorielle évolutive caractérisée par un amincissement progressif de la cornée à l'origine de l'apparition d'une protrusion et d'un astigmatisme irrégulier. Malgré les avancées dans le diagnostic précoce et le traitement des déficiences visuelles provoquées par cette maladie, son étiologie est encore très mal comprise. Sur la base d'arguments morphologiques et moléculaires, nous avons supposé une implication de l'épithélium cornéen dans l'apparition et la progression de la maladie.

Des prélèvements de l'épithélium de la cornée provenant de 35 contrôles et 28 patients atteints de KC (22 précoces et 6 évolués) ont été analysés par RT-qPCR. Le programme de différenciation de l'épithélium cornéen étant peu étudié, nous avons pris comme référence celui de l'épiderme, un autre épithélium pluristratifié issu de l'ectoderme et qui joue aussi un rôle de barrière entre l'organisme et son environnement. Nous avons ainsi recherché l'expression de divers gènes exprimés aux différentes étapes du programme de différenciation terminale des kératinocytes. Nous avons tout d'abord montré que certains gènes exprimés dans l'épiderme le sont aussi dans l'épithélium de la cornée, en particulier ceux des composants des desmosomes (*DSG1-3*, *DSP*, *PPL* et *EVPL*) et de l'enveloppe cornée (*SPRR1A*, *SPRR2A*, *SPRR3*, *IVL*, *TGM1* et *TGM5*). Nous avons ensuite constaté une diminution des transcrits des composants de l'enveloppe cornée dans l'épithélium de la cornée des patients atteints de KC précoces et, pour la plupart, de patients atteints de KC avancé. Nous avons confirmé ces résultats au niveau protéique pour l'involucrine, par western blot et immunohistologie. Les enveloppes cornées n'étant pas détectées dans l'épithélium cornéen, nous avons supposé que leurs composants pourraient jouer un autre rôle dans l'épithélium cornéen, en particulier de protection contre le stress oxydatif. En effet, les protéines SPRRs sont capables *in vitro* de fixer les espèces réactives de l'oxygène.

L'expression des gènes SPRRs étant sous contrôle du facteur de transcription NRF2 (pour nuclear factor erythroid 2-related factor 2), nous avons comparé l'expression de *NRF2* dans les cornées des contrôles et des patients, et montré une diminution dans les cornées des patients. NRF2 régule aussi la transcription de protéines impliquées dans la détoxification

des espèces réactives de l'oxygène (hème oxygénase, lysyl oxydase, NAD(P)H quinone oxydoréductase 1, etc.). Nous avons observé que l'expression des hème oxygénases 1 et 2 est réduite dans l'épithélium des patients, tout comme celle des gènes *KEAP1* et *CUL3* qui codent pour des régulateurs de NRF2.

Ces résultats suggèrent que dans l'épithélium cornéen des patients atteints de KC un défaut de résistance mécanique et/ou de défense contre le stress oxydatif dû à une dérégulation de la voie NRF2 joue un rôle physiopathologique. Si cette hypothèse est confirmée, cela pourrait indiquer une nouvelle piste thérapeutique pour améliorer la prise en charge des malades.

Corneal epithelium in keratoconus underexpresses a subset of cornified envelope markers and of oxidative stress-related genes

Tatiana Lupasco¹, Zhiguo He², Myriam Cassagne^{1,3}, Lise Brion¹, Pierre Fournié^{1,3}, Guy Serre¹, Philippe Gain^{2,4}, Gilles Thuret^{2,4}, Michèle Allouche¹, François Malecaze^{1,3}, Michel Simon*¹, Stéphane Galiacy*^{1,3}

¹UDEAR, Inserm University of Toulouse III, U1056, Toulouse, France.

² Laboratory "Biology, Engineering, and Imaging of Corneal Graft", BiiGC, EA2521, Faculty of Medicine, Jean Monnet University, Saint-Etienne, France

³Department of ophthalmology, Toulouse University Hospital, Toulouse, France.

⁴Department of ophthalmology, St Etienne University Hospital, Saint-Etienne, France.

*Correspondance: Michel Simon & Stéphane Galiacy, UDEAR, Inserm-Université Paul Sabatier, CHU Purpan, Place Dr Baylac TSA40031, 31059 Toulouse, France; michel.simon@inserm.fr; stephane.galiacy@inserm.fr

MS and SG contributed equally to the work presented here and should therefore be regarded as equivalent authors

Running title: Differential expression of cornified envelope markers in corneal epithelium of keratoconus

Keywords: keratoconus, corneal epithelium, cornified envelope, gene expression, oxidative stress.

Abstract

Purpose. Keratoconus (KC) is a multifactorial progressive ectatic disorder characterized by local thinning of the cornea, leading to decreased visual acuity due to irregular astigmatism and opacities. Despite the evolution of advanced imaging methods, the exact etiology of KC remains unknown. Our aim was to investigate the involvement of corneal epithelium in the pathophysiology of the disease.

Methods. Corneal epithelial samples were collected from 35 controls and from 2 cohorts of patients with KC: 22 undergoing corneal crosslinking (early KC) and 6 patients before penetrating keratoplasty (advanced KC). The expression of genes involved in the epidermal terminal differentiation program and of the oxidative stress pathway was assessed by real time PCR analysis. Presence of some of the differentially expressed transcripts was confirmed at protein level using western blot and immunohistochemistry (IHC) techniques.

Results. We found statistically significant under-expression in KC samples of some genes known to be involved in the mechanical resistance of the epidermis (*KRT16*, *IVL*, *SPRR1A*, *SPRR2A*, *SPRR3*, *TGM1*, *TGM5* and *PPL*) and in oxidative stress pathways (*NRF2*, *KEAP1*, *HMOX1*, *HMOX2* and *CUL3*) compared to controls. Decreased expression of the protein KRT16 and IVL was confirmed using IHC. Moreover, differential localization was noted for IVL and CLDN1.

Conclusions. These results strongly suggest a defect in the mechanical resistance and the oxidative stress defense possibly mediated via the NRF2 pathway in the corneal keratoconic epithelium.

INTRODUCTION

The corneal epithelium displays many similarities with the epidermis. Both are multilayer polarized epithelia derived from the ectoderm and form, at the surface of eye or skin, a multifunctional barrier that protects from harmful agents, such as microbes, chemicals and UV radiations. In the epidermis, most of these functions are provided by the upper cornified layer. This layer is also called *stratum corneum* and characterizes the ultimate step of the keratinocyte differentiation program. In contrast, the corneal epithelium lacks a cornified layer. However, in advanced corneal diseases some degree of cornification has been reported,¹ as well as other epithelial defects.^{2 3}

Keratoconus is a progressive ectatic disease characterized by progressive thinning and deformation of the cornea, causing corneal protrusion, irregular astigmatism and decreased visual acuity. Eventually, corneal deformation and associated mechanical stress may result in irreversible corneal opacities. KC is the most common corneal ectasia with an incidence of 1 in 2000 in the general population.⁴ When visual acuity can no longer be corrected by contact lenses, the only treatment consists in replacing the corneal tissue by corneal transplantation. The etiology of KC is unknown and suspected to be multifactorial, with the involvement of genetic and environmental factors. To date, several genes have been associated with this disease,⁵ including, but not limited to, those of lysyl oxidase, interleukin-1,⁶ visual system homeobox 1,⁷ microRNA 184,⁸ transforming growth factor beta,⁹ and zinc finger protein 469.¹⁰ Many environmental factors are thought to be responsible of the disease development and progression,¹¹ such as ocular or general allergy¹² (spring keratoconjunctivitis and atopic diseases) and mechanical microtrauma (usage of contact lens and eye rubbing, corneal thinning following Laser-Assisted In-Situ Keratomileusis surgery).

KC is a complex disorder and appears to be the manifestation of various pathological processes: tissue disruption impacting epithelial basal lamina,^{4, 13} enzymatic imbalances,¹⁴ inflammation,¹⁵ oxidative stress,¹⁶ autophagy¹⁷ and hormonal changes.¹⁸ Recent studies support a chronic inflammatory process,¹⁹ as well as a possible link with atopic dermatitis²⁰ in the pathogenesis of the disease. In keratoconic eyes, the corneal epithelium presents a localized thinning at the level of the cone apex surrounded by a thickening ring with a kind of donut pattern that is highly characteristic of this condition.²¹ In KC, both epithelial hyperplasia and hypoplasia have been described, associated or not with a rupture of the basal lamina. It has been suggested that the KC epithelium undergoes a remodeling process to compensate the abnormalities of the stromal surface.²² We previously identified a number of differentially expressed genes in whole cornea of KC, suggesting an imbalance between apoptosis cellular proliferation and differentiation.²³

Based on these arguments, we hypothesized that the corneal epithelium could be involved in the KC development. The aim of this study was to analyze the expression of genes related to the epidermal terminal differentiation program in corneal epithelium of KC patients and controls.

METHODS

Biological samples

Human cornea epithelial samples used in this study were obtained from the Department of Ophthalmology and from the French National Reference Center for Keratoconus, Toulouse University Hospital. All procedures were in accordance with the Declaration of Helsinki. Informed consent was obtained from all participants prior to sample collection with authorization from the Patient Protection Committee (DC2012-1701).

Control epithelium samples (CTRL group) were collected from patients undergoing Photo Refractive Keratectomy procedure for mild myopia (less than 3 diopters): prior to the Excimer laser ablation, cornea was prepared by manual removal of the central (8 mm diameter) epithelium. The epithelium was scraped off with Beaver-type blade, collected in a sterile RNase-free eppendorf, and immediately immersed in liquid nitrogen for transport. Before RNA or protein extraction, the samples were stored at -80°C. Corneal epitheliums from patients with progressive KC (early KC group) were collected during collagen crosslinking procedure used to halt the disease progression. Manual de-epithelialization is necessary for the impregnation of the corneal stroma with riboflavin before irradiation with UVA. The samples were then transported and stored as described above. The third group of corneal epithelium samples (advanced KC, stage IV i.e. with corneal opacities) was similarly obtained from patients undergoing Penetrating Keratoplasty surgery.

For immunohistochemistry (IHC) analysis, 3 fresh corneas were used as healthy epithelial controls. They came from 3 body donation for Science. Each donor volunteered their body and gave written consent to the Laboratory of Anatomy of Jean Monnet University. The fresh corneas were included immediately in the tissue embedding medium, OCT after dissection from the eyeballs, and then stored at -80°C. The donor age was 77, 79 and 83

years. The time between death and tissue embedding was 13, 16 and 35 hours. Handling of donor tissues adhered to the tenets of the Declaration of Helsinki of 1975 and its 1983 revision in protecting donor confidentiality. 3 KC corneas were collected during corneal graft surgery. Samples were placed in OCT and immediately frozen in liquid nitrogen then kept at -80°C until further use.

Reverse transcriptase real time polymerase chain reaction

Total RNA was extracted with Qiagen MicroRNA extraction kit according to the manufacturer's instructions (Qiagen S.A.S., Courtaboeuf, France). Reverse transcriptase was performed using the Invitrogen Superscript III VILO kit according to the manufacturer's recommendations (ThermoFisher Scientific, Villebon-sur-Yvette, France). Real time polymerase chain reaction (rt-PCR) was performed on triplicate samples (50 pg cDNA) in a Roche LightCycler 480 using Roche supermix for PCR (Roche, Paris, France). Expression of 22 genes involved in epidermal terminal differentiation, 6 genes involved in NRF2 pathway, and of *KRT3* as a tissue specific gene of the corneal epithelium was investigated. We selected some markers of early and late keratinocyte differentiation, based on our previous work.²⁴ Primer sequences are described in Supplementary Table S1. The PCR conditions were: 95° C for 10 min, followed by 40 cycles of denaturation at 95° C for 15 s and annealing at 60° C for 20 s. We used three genes for normalization (encoding ubiquitin, tatabox binding protein and beta 2 macroglobulin). Fold-change in gene expression was calculated using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ratio according to the previously described method.²⁵ All PCR products were checked by sequencing and the primer efficiencies were examined using cDNA dilutions (from 1/10 to 1/320) and Roche software analysis program.

Protein extraction

Proteins were solubilized in TE-NP40 buffer (40 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.5% Nonidet-P40, 10 mM EDTA and 0.25 mM PMSF) for 15 min using a homogenizer. After a centrifugation step at $12,000 \times g$ for 15 min and 4 °C, the supernatant was collected, aliquoted and stored at -80 °C until use.

Western-blotting

Equal amounts of protein (according to Ponceau staining) were resolved by SDS-10% polyacrylamide gel electrophoresis and electrotransferred onto nitrocellulose membranes (GE Healthcare, Danderyd, Sweden). Membranes were blocked in PBS 1X-Tween 0.2% containing 5% skimmed milk, then incubated overnight at 4°C with primary antibodies (see Supplementary Table S2) and finely incubated for 2h at room temperature with secondary horseradish peroxidase-conjugated antibodies diluted to 2:10000 (Goat anti-Mouse IgG-HRP; Bethyl Laboratories, Montgomery, TX; Goat Anti-rabbit IgG-HRP; Southern Biotech, Birmingham, AL). The detection was realized with ECL Prime system (GE Healthcare) and images acquired with a G:BOX Chemi XT4CCD camera (Syngene, Cambridge, United Kingdom) and GeneSys software (Genesys, Daly City, CA). ImageJ software was used to quantify immunoreactive bands. Signals were normalized to actin immunodetection.

Immunohistochemistry (IHC)

As previously described,²⁶ corneal sections (10 µm thick) were prepared using Cryostat Microm HM550 (ThermoFisher Scientific). Frozen slides were warmed and dried at RT for 5 min then rehydrated for 5 min. Samples were then incubated at 37°C for 30 min in saturating solution (PBS supplemented with 2% heat-inactivated goat serum (Eurobio-Ingen, Les Ullis, France) and 2% bovine serum albumin (ThermoFisher Scientific)). Slides were incubated at

37°C for 1 hour with primary antibody (see Supplementary Table S2) diluted in saturating solution. Nonspecific rabbit and mouse IgG (Zymed, Carlsbad, CA, USA) were used as primary antibodies for negative controls. These two controls were performed for each cornea. Secondary antibodies were Alexa Fluor 488 goat anti-mouse or anti-rabbit IgG for single staining and Alexa Fluor 488 goat anti-mouse combined with Alexa Fluor 555 goat anti-rabbit IgG (Invitrogen, Eugene, OR, USA) for double staining. Secondary antibodies diluted by 1:1000 in saturating solution were incubated for 1 hour at 37°C. Lastly, nuclei were counterstained with TO-PRO-3 Iodide (1/1000) (ThermoFisher Scientific) in PBS for 5 min at RT. Three rinses in PBS were performed between each step except between blocking of nonspecific protein binding sites and incubation with primary antibodies. Finally, the slides were mounted using Vectashield medium (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Images were captured with a confocal microscope (IX83 Fluoview FV-1000, Olympus), equipped with the Olympus Fluoview software. Setup were determined from the control conditions and applied to the other samples.

Statistical analyses

For all experiments group to group comparisons were performed and plotted with GraphPad Prism 6 using a non-parametric Wilcoxon test. $P < 0.05$ was considered as statistically significant.

RESULTS

Differentially Expressed Transcripts in KC versus Control Corneal Epithelium

The corneal epithelium of 35 CTRL and 28 KC patients (22 early and 6 advanced KC) was collected. Average age was 29 years +/- 9.5 in the CTRL group, 22 years +/- 4.2 in the early KC group, and 45 years +/-7 in the advanced KC group. Using real time PCR, we first evaluated the expression of 22 genes involved in epidermal terminal differentiation and of *KRT3* as a typical gene of the corneal epithelium. High expression of *KRT3* was observed in the CTRL group (Table 1). Concerning the epidermal differentiation genes, three classes of transcripts based on their relative abundance to normalization genes could be observed in the CTRL group (Table 1). Highly expressed genes *DSG1*, *CLDN1*, *DSP* and *PPL* (encoding proteins of desmosomes and tight junctions). Medium expressed genes *DSG2*, *DSG3* and *EVPL* (encoding proteins of desmosomes); *SPRR2A*, *IVL*, *SPRR1A*, *SPRR3*, *TGM1* and *TGM5* (encoding proteins of the epidermis cornified envelope, a peculiar pericellular structure of cornified layer cells); and *KRT16*. Finally poorly or not expressed genes *FLG*, *HRNR*, *LOR*, *DSC1*, *CDSN*, *FLG2*, *TGM3* and *KRT10*.

When we compared the expression of this set of genes between CTRL and early KC groups (Figure 1, Table 2), we observed in the early KC a significant decrease in the expression of *KRT16*, *IVL*, *PPL*, *SPRR1A*, *SPRR2A* and *SPRR3* (fold change of 0.08, 0.31, 0.67, 0.20, 0.11 and 0.08, respectively). Only *CLDN1* was slightly over-expressed (fold change of 1.18).

The same analysis was then performed in advanced KC (Figure 1 and Table 2). We observed a statistically significant down-regulation in KC as compared to CTRL of *IVL*, *SPRR1A*, *SPRR2A* and *SPRR3* (fold change of 0.38, 0.24, 0.2 and 0.13 respectively) and an overexpression of *KRT3* (fold change of 1.89).

Since it is known that in the epidermis, involucrin (IVL), SPRRs, desmosomal proteins and others are crosslinked by transglutaminases 1, 3 and 5 (TGM1, 3 and 5) to form the cornified envelopes, we investigated the expression of these transglutaminase genes in the corneal epithelium. We detected the expression of *TGM1* and 5, but not that of *TGM3* (Table 1). We further showed that *TGM1* and *TGM 5* were underexpressed in early KC epithelium (Figure 1, Table 2, fold change of 0.29 and 0.31, respectively).

Differentially Expressed Proteins

We then analyzed the expression of proteins on sections of cornea samples from 3 CTRL and 3 advanced KC, using indirect immunofluorescence and confocal observations (Figure 2). We first observed, as expected,²⁷ differences in the KC epithelial thickness on the same section with areas of hyperplasia and areas of hypoplasia (see Supplementary Figure S1).

DSG1, FLG and KRT10 expression was investigated. No expression was found for FLG and KRT10 in both CTRL and aKC groups. DSG1 was expressed in all epithelial layers but no difference was observed between CTRL and aKC group (data not shown).

In the CTRL group, IVL was highly detected in the upper cell layers of the epithelium (apical and underlying intermediate). In the advanced KC group, IVL expression was slightly decreased, and it was detected only in the apical cell layer, confirming the data obtained at the mRNA level.

KRT16 was detected in the upper epithelial cell layers of the CTRL group whereas it was not or barely detected in the advanced KC group. Claudin 1 (CLDN1), a protein of tight junctions, was detected in all epithelial layers in the CTRL group, as previously described by others,²⁸ while it was not expressed in basal cells and only seen in the upper cell layers of the epithelium of advanced KC group.

Finally, KRT3 was strongly expressed in the corneal epithelium of both groups without any visible differences, while its mRNA was found to be slightly overexpressed.

We next investigated the expression of some of these genes at the protein level using western-blotting in a group of additional 12 CTRL and 12 early KC corneal epithelia (mean age 29 +/- 5 and 35 +/- 7 for CTRL and KC, respectively). Most of the proteins were not consistently detected, except IVL. We observed a slightly decreased expression of IVL protein in the early KC group, as compared to the CTRL group (one representative blot is shown in Supplemental Figure S2). When the immunodetection levels were quantified, a tendency was observed (1.20 vs 0.88 arbitrary unit) but the statistical significance was not reached ($p = 0.27$), because of high interindividual variations and/or low number of patients (Supplemental Figure S2).

Decreased Expression of Transcripts Related to Oxidative Stress Resistance

We were surprised to detect the expression of some components of cornified envelopes, namely IVL, SPRR1A, SPRR2A, SPRR3, TGM1 and TGM5, their expression being lower in KC, while others members such as FLG, HRNR and LOR were not detectable. Indeed, cornified envelopes have never been described in corneal epithelium. Confirming their absence, we were not able to observe them when we applied to corneal epithelium the procedure currently used to purify epidermal cornified envelopes²⁹ (data not shown). We therefore suspected that this set of proteins could have another role in the corneal epithelium. In fact, some products of these genes such as SPRRs, have previously been shown to also display quenching activity against reactive oxygen species.^{30,31} In addition, their expression is known to be controlled by nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NRF2). NRF2 is a transcription factor that regulates the expression of antioxidant proteins that protect against oxidative damage triggered by injury and inflammation. We therefore focused our next analysis on *NRF2* pathway, and on known targets of NRF2 related to oxidative stress

protection (Figure 3 and Table 3). In early KC, we observed a strong decrease in several transcripts encoding proteins of the NRF2 system: *NRF2* itself, *CUL3* encoding cullin3 and *KEAP1* encoding Kelch-like ECH-associated protein 1 (fold change of 0.29, 0.28 and 0.38 respectively). NRF2 targets *HMOX1* and 2 encoding heme oxygenases were also underexpressed (fold change of 0.08 and 0.31 respectively) while *NQO1* encoding NAD(P)H deshydrogenase (quinone) 1 had a similar expression in both groups. In advanced KC, we still observed a decrease of expression of *HMOX1*, while *NRF2* had a tendency for down-expression (Figure 3 and Table 3).

DISCUSSION

In our previous transcriptome analysis of KC versus normal whole corneas, we reported that in KC there was an imbalance in apoptosis, proliferation and differentiation pathways. In this work, we hypothesized that corneal epithelium might have a more important role in KC development than what is actually described. Thus, we decided to investigate corneal epithelium transcripts of early KC patients when the KC is evulsive and before major stromal changes (when stromal depth is still superior to 400 μ m). We investigated the expression of epidermal terminal differentiation genes in the corneal epithelium, and whether the expression of these genes was altered in early KC corneal epithelium. Transcript expression analysis revealed that some but not all keratinocyte terminal differentiation genes are also expressed in the normal cornea. Not surprisingly, most of the cornification related genes were not or barely detected (*FLG*, *FLG2*, *LOR*, *HRNR*, *CDSN*, *DSC1* and *TGM3*). The corresponding proteins were not detected as well. Interestingly, we detected a set of transcripts (*IVL* and several *SPRRs*) encoding proteins that, in the epidermis, are part of cornified envelope. This is a resistant highly cross-linked structure that replaces the plasma membrane of corneocytes, the end products of keratinocyte differentiation. IVL protein expression was confirmed by western blotting and immunohistochemistry. Our results are in agreement with those of Tong et al.³² We also detected mRNAs encoding the enzymes necessary for cornified envelope formation. However, cornified envelopes appear to be absent in the corneal epithelium. Thus, the role of IVL and SPRRs in the cornea is not clear. They may be associated with cell mechanical resistance properties as previously suggested.³² As we found these transcripts underexpressed in KC corneas, this could suggest that biomechanical properties of epithelial cells are impaired in KC. In agreement to this statement, we observed several changes in structural gene expression. We found *CLDN1* transcript to be slightly overexpressed but more interestingly we observed that in normal corneas CLDN1 is expressed in all epithelial cell

layers while in KC corneas it is absent from the basal cell layer. In the epidermis, *CLDN1* is known to play a role in the mechanical barrier function.³³ This result highlights that epithelial barrier might be different in keratoconus epithelium and more importantly that the repartition and density of tight junctions might be different. Moreover, we found that *PPL*, which encodes a desmosomal plaque protein, was also downregulated in KC as well as *KRT16* transcript and protein. Little is known about *KRT16* function in the cornea. *KRT16* has been found to be overexpressed in epidermis diseases in hyperproliferative areas³⁴ and during corneal wound healing.³⁵ Whether *KRT16* expression is associated to the proliferative state of the cell or to the loss of phenotype remains unclear.³⁵ Two previous proteomic analyses have reported an overexpression of *KRT16* in KC corneas.^{36,37} The discrepancy between this and our results could be explained by differences in disease severity.³⁸

However, as a number of mechanical partners of IVL and SPRRs are missing in the corneal epithelium, this leads us to consider alternative function for these genes in the cornea.

Indeed, SPRRs are able to quench reactive oxygen species in vitro,³⁹ thus we propose that they may display oxidative stress protecting properties in the cornea. Moreover, IVL and SPRRs promoter contain an AP1 response element, which could explain their reduced expression in KC corneas as we and others have previously demonstrated^{23, 40} that this transcription factor is underexpressed in KC corneas. SPRRs are also under the control of NRF2 transcription factor. NRF2 is also known to target several anti-oxidative stress enzymes, namely HMOX1, HMOX2 and NQO1, that we found to be also expressed in the corneal epithelium. We then compared the expression levels of these transcripts between CTRL and early KC corneal epithelium. We here described for the first time that in KC epithelium, transcripts of *NRF2*, its heterotrimeric partners (i.e., *KEAP1* and *CUL3*) and target genes *HMOX1* and *HMOX2* are downregulated. The most striking result was the 12 fold reduced expression of *HMOX1* transcript. These data strongly suggest an increased sensitivity

of KC corneal epithelium to oxidative stress. HMOX1 is an important enzyme as it mediates the first step of heme catabolism.⁴¹ Iron deposition and reduced oxidative stress response are observed in *Hmox1* knock-out mice.⁴² Interestingly iron accumulation is frequently observed in KC corneas.⁴³ Moreover, HMOX1 promoter also contains an AP1 response element, which is the other pathway used to activate this enzyme. Last but not least, transcripts analysis of advanced KC, at the stage of corneal grafting, where severe stromal thinning and opacities are found, confirmed a downregulation of *IVL*, *SPPRs* and *HMOX1* transcripts. This clearly demonstrates that all through the course of the disease, these transcripts undergo a strong downregulation.

All these data strongly suggests that in KC epithelia, several pathways that are working together to protect the cornea from oxidative stress and mechanical injury are severely impaired. Functional investigations are now required for understanding whether this impairment is directly due to KC epithelium defects or is indirectly driven by others sources (tears, nerves, stroma, etc.).

REFERENCES

1. De Paiva CS, Villarreal AL, Corrales RM, et al. Dry eye-induced conjunctival epithelial squamous metaplasia is modulated by interferon-gamma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48:2553-2560.
2. Soler VJ, Tran-Viet KN, Galiacy SD, et al. Whole exome sequencing identifies a mutation for a novel form of corneal intraepithelial dyskeratosis. *J Med Genet* 2013;50:246-254.
3. Grieve K, Georgeon C, Andreiuolo F, et al. Imaging Microscopic Features of Keratoconic Corneal Morphology. *Cornea* 2016;35:1621-1630.
4. Kenney MC, Nesburn AB, Burgeson RE, Butkowski RJ, Ljubimov AV. Abnormalities of the extracellular matrix in keratoconus corneas. *Cornea* 1997;16:345-351.
5. Hao XD, Chen P, Chen ZL, Li SX, Wang Y. Evaluating the Association between Keratoconus and Reported Genetic Loci in a Han Chinese Population. *Ophthalmic Genet* 2015;36:132-136.
6. Wang Y, Wei W, Zhang C, et al. Association of Interleukin-1 Gene Single Nucleotide Polymorphisms with Keratoconus in Chinese Han Population. *Curr Eye Res* 2016;41:630-635.
7. Wang Y, Jin T, Zhang X, et al. Common single nucleotide polymorphisms and keratoconus in the Han Chinese population. *Ophthalmic Genet* 2013;34:160-166.
8. Lechner J, Bae HA, Guduric-Fuchs J, et al. Mutational analysis of MIR184 in sporadic keratoconus and myopia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013;54:5266-5272.
9. Guan T, Liu C, Ma Z, Ding S. The point mutation and polymorphism in keratoconus candidate gene TGFBI in Chinese population. *Gene* 2012;503:137-139.
10. Yildiz E, Bardak H, Gunay M, et al. Novel Zinc Finger Protein Gene 469 (ZNF469) Variants in Advanced Keratoconus. *Curr Eye Res* 2017;42:1396-1400.
11. Gordon-Shaag A, Millodot M, Shneur E, Liu Y. The genetic and environmental factors for keratoconus. *Biomed Res Int* 2015;2015:795738.
12. Nemet AY, Vinker S, Bahar I, Kaiserman I. The association of keratoconus with immune disorders. *Cornea* 2010;29:1261-1264.
13. Kim WJ, Rabinowitz YS, Meisler DM, Wilson SE. Keratocyte apoptosis associated with keratoconus. *Exp Eye Res* 1999;69:475-481.
14. Fukuchi T, Yue BY, Sugar J, Lam S. Lysosomal enzyme activities in conjunctival tissues of patients with keratoconus. *Arch Ophthalmol* 1994;112:1368-1374.
15. Lema I, Duran JA. Inflammatory molecules in the tears of patients with keratoconus. *Ophthalmology* 2005;112:654-659.
16. Buddi R, Lin B, Atilano SR, Zorapapel NC, Kenney MC, Brown DJ. Evidence of oxidative stress in human corneal diseases. *J Histochem Cytochem* 2002;50:341-351.
17. Shetty R, Sharma A, Pahuja N, et al. Oxidative stress induces dysregulated autophagy in corneal epithelium of keratoconus patients. *PLoS One* 2017;12:e0184628.
18. Bilgihan K, Hondur A, Sul S, Ozturk S. Pregnancy-induced progression of keratoconus. *Cornea* 2011;30:991-994.
19. Galvis V, Tello A, Barrera R, Nino CA. Inflammation in Keratoconus. *Cornea* 2015;34:e22-23.
20. Droitcourt C, Touboul D, Ged C, et al. A prospective study of filaggrin null mutations in keratoconus patients with or without atopic disorders. *Dermatology* 2011;222:336-341.
21. Reinstein DZ, Archer TJ, Gobbe M. Corneal epithelial thickness profile in the diagnosis of keratoconus. *Journal of refractive surgery* 2009;25:604-610.
22. Kanellopoulos AJ, Aslanides IM, Asimellis G. Correlation between epithelial thickness in normal corneas, untreated ectatic corneas, and ectatic corneas previously treated with CXL; is overall epithelial thickness a very early ectasia prognostic factor? *Clin Ophthalmol* 2012;6:789-800.
23. Mace M, Galiacy SD, Erraud A, et al. Comparative transcriptome and network biology analyses demonstrate antiproliferative and hyperapoptotic phenotypes in human keratoconus corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52:6181-6191.

24. Henry J, Toulza E, Hsu CY, et al. Update on the epidermal differentiation complex. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2012;17:1517-1532.
25. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 2002;3:RESEARCH0034.
26. Guindolet D, Crouzet E, He Z, et al. Storage of Porcine Cornea in an Innovative Bioreactor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2017;58:5907-5917.
27. Efron N, Hollingsworth JG. New perspectives on keratoconus as revealed by corneal confocal microscopy. *Clin Exp Optom* 2008;91:34-55.
28. Yoshida Y, Ban Y, Kinoshita S. Tight junction transmembrane protein claudin subtype expression and distribution in human corneal and conjunctival epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50:2103-2108.
29. Simon M, Haftek M, Sebbag M, et al. Evidence that filaggrin is a component of cornified cell envelopes in human plantar epidermis. *The Biochemical journal* 1996;317 (Pt 1):173-177.
30. Pradervand S, Yasukawa H, Muller OG, et al. Small proline-rich protein 1A is a gp130 pathway- and stress-inducible cardioprotective protein. *EMBO J* 2004;23:4517-4525.
31. Vermeij WP, Backendorf C. Skin cornification proteins provide global link between ROS detoxification and cell migration during wound healing. *PLoS One* 2010;5:e11957.
32. Tong L, Corrales RM, Chen Z, et al. Expression and regulation of cornified envelope proteins in human corneal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47:1938-1946.
33. Utech M, Bruwer M, Nusrat A. Tight junctions and cell-cell interactions. *Methods Mol Biol* 2006;341:185-195.
34. McGuire J, Osber M, Lightfoot L. Two keratins MW 50,000 and 56,000 are synthesized by psoriatic epidermis. *Br J Dermatol* 1984;111 Suppl 27:27-37.
35. Schermer A, Jester JV, Hardy C, Milano D, Sun TT. Transient synthesis of K6 and K16 keratins in regenerating rabbit corneal epithelium: keratin markers for an alternative pathway of keratinocyte differentiation. *Differentiation* 1989;42:103-110.
36. Chaerkady R, Shao H, Scott SG, Pandey A, Jun AS, Chakravarti S. The keratoconus corneal proteome: loss of epithelial integrity and stromal degeneration. *J Proteomics* 2013;87:122-131.
37. Joseph R, Srivastava OP, Pfister RR. Differential epithelial and stromal protein profiles in keratoconus and normal human corneas. *Exp Eye Res* 2011;92:282-298.
38. Kalinin A, Marekov LN, Steinert PM. Assembly of the epidermal cornified cell envelope. *J Cell Sci* 2001;114:3069-3070.
39. Schafer M, Farwanah H, Willrodt AH, et al. Nrf2 links epidermal barrier function with antioxidant defense. *EMBO Mol Med* 2012;4:364-379.
40. You J, Corley SM, Wen L, et al. RNA-Seq analysis and comparison of corneal epithelium in keratoconus and myopia patients. *Sci Rep* 2018;8:389.
41. Loboda A, Damulewicz M, Pyza E, Jozkowicz A, Dulak J. Role of Nrf2/HO-1 system in development, oxidative stress response and diseases: an evolutionarily conserved mechanism. *Cell Mol Life Sci* 2016;73:3221-3247.
42. Poss KD, Tonegawa S. Reduced stress defense in heme oxygenase 1-deficient cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:10925-10930.
43. Avetisov SE, Mamikonyan VR, Novikov IA, Pateyuk LS, Osipyan GA, Kiryushchenkova NP. [Abnormal distribution of trace elements in keratoconic corneas]. *Vestn Oftalmol* 2015;131:34-42.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank all the donors for human cornea samples. Tatiana Lupasco PhD was supported by Erasmus Mundus Medea project, the Fondation de France, grant Berthe Fouassier (00079329). This work was supported by INSERM, Paul Sabatier Toulouse III University and Retina France. The authors declare no conflicts of interest.

We thank Cyrielle Tricoire for her technical expertise and help with the Western Blot and PCR experiments, and Dr Celia Zazo-Seco for her very valuable comments on this article.

TABLES

Table 1. Transcript relative expression of epidermal terminal differentiation genes in control corneal epithelium.

* Mean expression normalized to that of housekeeping genes. dCT: deltaCycleThreshold. [§]

Standard error to the mean. Nd: not detected.

Genes Name	dCT*	SEM [§]
<i>KRT3</i>	-4.95	0.11
<i>DSG1</i>	-2.74	0.13
<i>CLDN1</i>	-1.17	0.13
<i>DSP</i>	-0.98	0.17
<i>PPL</i>	-0.79	0.21
<i>DSG2</i>	1.10	0.25
<i>SPRR2A</i>	3.32	0.40
<i>DSG3</i>	3.44	0.46
<i>IVL</i>	3.84	0.28
<i>EVPL</i>	3.99	0.33
<i>TGM1</i>	4.02	0.18
<i>SPRR1A</i>	4.27	0.59
<i>KRT16</i>	4.92	0.20
<i>SPRR3</i>	6.29	0.58
<i>TGM5</i>	6.51	0.40
<i>FLG</i>	8.19	0.18
<i>HRNR</i>	9.87	0.23
<i>LOR</i>	10.36	0.25
<i>DSC1</i>	Nd	
<i>CDSN</i>	Nd	
<i>FLG2</i>	Nd	
<i>TGM3</i>	Nd	
<i>KRT10</i>	Nd	

Table 2. Genes with significant differential transcript expression in early and advanced keratoconus

* Mean expression normalized to that of housekeeping genes. dCT: deltaCycleThreshold. ^{\$}

Standard error to the mean. CTRL, control; eKC, early keratoconus; aKC, advanced keratoconus.

Gene Name	CTRL (dCT)*	eKC (dCT)*	Fold Change	p value	aKC (dCT)*	Fold Change	p value
<i>KRT16</i>	4.92	8.61	0.08	<0.0001	6.42	0.35	0.1
<i>IVL</i>	3.84	5.51	0.31	0.0003	5.22	0.38	0.001
<i>PPL</i>	-0.79	-0.21	0.67	<0.0001	-0.63	0.89	0.3
<i>SPRR1A</i>	4.27	6.58	0.20	0.0002	6.32	0.24	0.0305
<i>SPRR2A</i>	3.32	6.44	0.11	<0.0001	5.61	0.20	0.0098
<i>SPRR3</i>	6.29	9.86	0.08	<0.0001	9.24	0.13	0.02
<i>CLDN1</i>	-1.17	-1.41	1.18	0.0436	-1.5	1.26	0.34
<i>KRT3</i>	-4.95	-5.02	1.04	0.5	-5.87	1.89	0.0003
<i>TGM1</i>	4.02	5.81	0.29	0.0001	4.62	0.66	0.28
<i>TGM5</i>	6.51	8.19	0.31	0.0409	6.73	0.86	0.92

Table 3. Transcript relative expression of NRF2 pathway genes in control and keratoconus corneal epithelium.

* Mean expression normalized to that of housekeeping genes. dCT: deltaCycleThreshold.

CTRL, control; eKC, early keratoconus; aKC, advanced keratoconus.

Genes Name	dCT CTRL*	dCT eKC*	Fold change	P value	dCT aKC*	Fold change	P value
<i>NRF2</i>	-0.49	1.3	0.29	0.0012	0.15	0.64	0.17
<i>CUL3</i>	0.79	2.63	0.28	0.0088	0.61	1.14	0.89
<i>KEAP1</i>	3.12	4.54	0.38	0.0048	3.59	0.72	0.32
<i>HMOX1</i>	4.89	8.61	0.08	<0.0001	7.66	0.15	0.0001
<i>HMOX2</i>	1.98	3.66	0.31	0.0015	2.18	0.97	0.96
<i>NQO1</i>	-3.44	-3.33	0.93	0.58	-3.40	0.97	0.55

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Differentially expressed transcripts in early and advanced keratoconus. Box and whiskers plots of gene expression in the corneal epithelium of control (CTRL; n = 35), early keratoconus (eKC; n = 22) and advanced keratoconus (aKC; n = 6). Transcript level expressed as mean of delta cycle threshold (dCT) normalized to housekeeping genes.

Figure 2. Differentially expressed proteins in KC.

Sections of normal (CTRL; n = 3) and late keratoconus (KC; n = 3) corneas were analyzed by indirect immunofluorescence (green) with the indicated antibodies. Nuclei were stained with DAPI (blue). Scale bar = 100 μ m.

Figure 3. Comparative transcripts expression of NRF2 pathway genes in early and advanced keratoconus. Box and whiskers plots of gene expression in the corneal epithelium of control (CTRL; n = 13), early keratoconus (eKC; n = 11) and advanced keratoconus (aKC; n = 6). Transcript level expressed as mean of delta cycle threshold (dCT) normalized to housekeeping genes.

Supplementary Table S1. Sequences of primers used for qPCR.

Gene name	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
<i>B2M</i>	GAGGCTATCCAGCGTACTCCA	CGGCAGGCATACTCATCTTTT
<i>CDSN</i>	ACTGCTGCTGGCTGGTCT	AGAGCTTCTGGCACTGGAAA
<i>CLDN 1</i>	TGGCATGAAGTGTATGAAGTGCTT	AGAGCTTCTGGCACTGGAAA
<i>CUL3</i>	TGTGGAGAACGTCTACAATTTGG	GCGCCTCTGTCTACGACTT
<i>DSC1</i>	CATGGGTGGTCAGCCTTTCGGT	TCCTGATCCTGTACCTTCATTGGCA
<i>DSG1</i>	GAAGGCAGAAACGTGAATGGA	TTTTGGCGATTGGGTTCT
<i>DSG2</i>	CTAACAGGTTACGCTTTGGATGC	GTGAACACTGGTTCGTTGTGAT
<i>DSG3</i>	GCAAAAACGTGAATGGGTGAAA	TCCAGAGATTCGGTAGGTGATT
<i>DSP</i>	GCA-GGA-TGT-ACT-ATT-CTC-GGC	CCT-GGA-TGG-TGT-TCT-GGT-TCT
<i>EVPL</i>	GGCGAAGCTCAACTCCAATT	CAGCCGTTTTTCTCTGCC
<i>FLG</i>	GCAAGGTCAAGTCCAGGAGAA	CCCTCGGTTTCCACTGTCTC
<i>FLG2</i>	TCTGAAGAACCCAGATGATCCA	CATCAAAAGAAACTCAGTAAAGTCAA
<i>HMOX1</i>	AAGACTGCGTTCCTGCTCAAC	AAAGCCCTACAGCAACTGTGC
<i>HMOX2</i>	TCAGCGGAAGTGGAAACCTC	AGAAGTCCTTGACAAACTGGGT
<i>HRNR</i>	AGGACAGGGCTATAGTCAGCA	CCGAAGCGTGATGGGAGG
<i>IVL</i>	GGGTGGTTATTTATGTTTGGGTGG	GCCAGGTCCAAGACATTCAAC
<i>KEAP1</i>	CTGGAGGATCATACCAAGCAGG	GGATACCCTCAATGGACACCAC
<i>KRT3</i>	GCAGGGCACAAGTTCATCT	TCTCTCCCCGAGGATGTTGTC
<i>KRT10</i>	TGATGTGAATGTGGAAATGAATGC	GTAGTCAGTTCCTTGCTCTTTTCA
<i>KRT16</i>	GACCGGCGGAGATGTGAAC	CTGCTCGTACTGGTCACGC
<i>LOR</i>	CGAAGGAGTTGGAGGTGTTT	ACTGGGGTTGGGAGGTAGTT
<i>LOX</i>	CGGCGGAGGAAAACCTGTCT	TCGGCTGGGTAAGAAATCTGA
<i>NQO1</i>	GAAGAGCACTGATCGTACTGGC	GGATACTGAAAGTTCGCAGGG
<i>NRF2</i>	TCAGCGACGGAAAGAGTATGA	CCACTGGTTTCTGACTGGATGT
<i>PPL</i>	GCACCAATGAGCTGTACTGG	GCTGGGGTAGTCGAGGTTG
<i>SPRR1A</i>	TGGCCACTGGATACTGAACA	CCCAAATCCATCCTCAAATG
<i>SPRR2A</i>	TATTTGGCTCACCTCGTTCC	CCAGGACTTCCTTTGCTCAG
<i>SPRR3</i>	TTCCACAACCTGGAAACACA	TTCAGGGACCTTGGTGTAGC
<i>TBP</i>	CCACTCACAGACTCTCACAAAC	CTGCGGTACAATCCCAGAACT
<i>TGM1</i>	CCCCGCAATGAGATCTACA	ATCCTCATGGTCCACGTACACA
<i>TGM3</i>	GGAAGGACTCTGCCACAATGTC	TGTCTGATTCAGGTACTTCTCATACTG
<i>TGM5</i>	CGGAGCAGGTTGAGGACTGT	GAGGACTCCAAGGAAGACTTTCTG
<i>UBB</i>	GGTCCTGCGTCTGAGAGGT	GGCCTTCACATTTTCGATGGT

Supplementary Table S2. Primary Antibodies.

Antigen	Antibody	Source (Reference)	Dilution	
			WB*	IH
Involucrin	Clone SY5	Sigma- Aldrich, St Louis, MO	1:5000	1:400
Filaggrin	Clone AHF3	Simon et al., 1995	1:1000	1:400
Keratin 10	Polyclonal PRB- 159P	Covance, Princeton, NJ	1:30000	1:400
Keratin 3	Monoclonal CBL 218	Merk-Millipore, Darmstadt, Germany	1:10000	1:400
Keratin 16	Monoclonal LL025	Thermofisher	1:2000	1:400
Claudin 1	Monoclonal ab56417	Abcam, Cambridge, UK	1:200	1:400
Desmoglein 1	Monoclonal P23	Progen, Heidelberg, Germany	1:2000	1:100
Loricrin	Polyclonal AF62	Covance	1:10000	1:400

*WB, western blotting; IH, immunohistology.

1

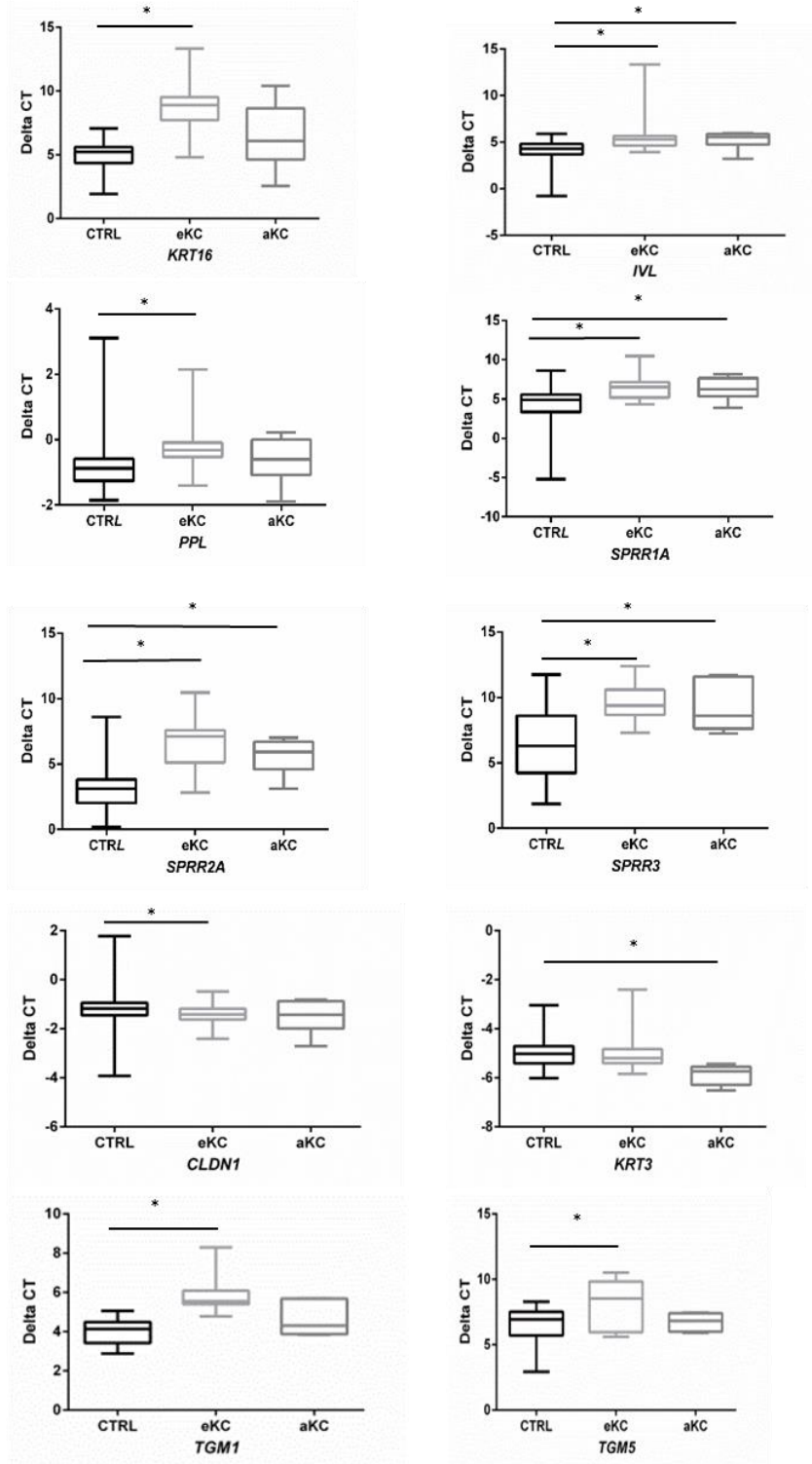


Figure 1. Differentially expressed transcripts in early and advanced keratoconus. Box and whiskers plots of gene expression in the cornea epithelium of control (CTRL; n = 35), early keratoconus (eKC; n = 22) and advanced keratoconus (aKC; n = 6). Transcript level expressed as mean of delta cycle threshold (dCT) normalized to housekeeping genes.

2

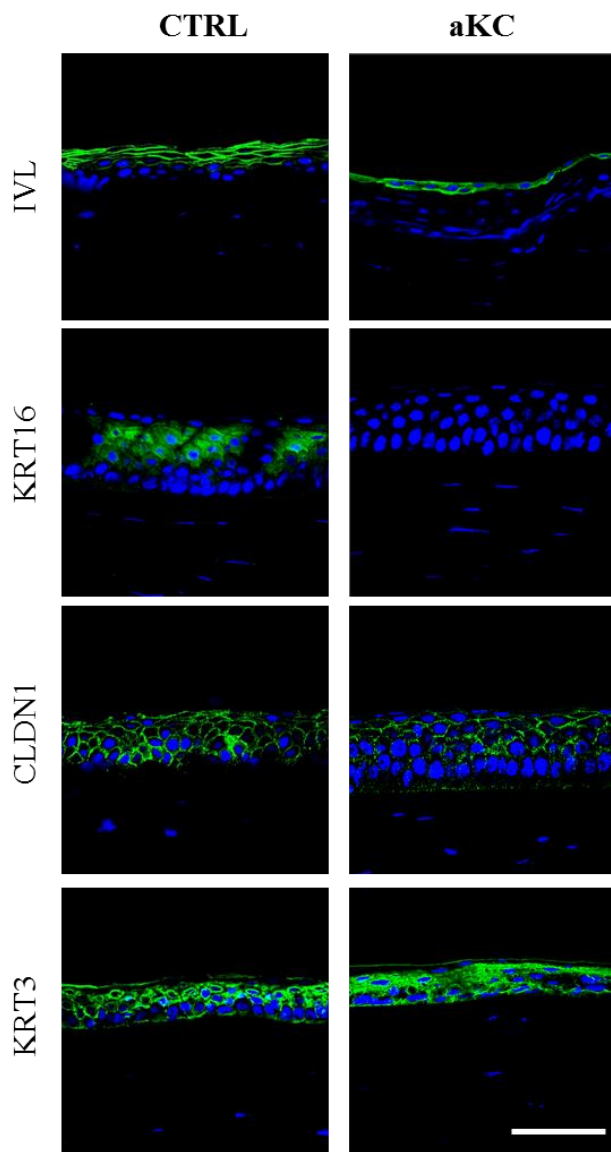


Figure 2. Differentially expressed proteins in advanced KC.

Sections of normal (CTRL; n = 3) and advanced keratoconus (KC; n = 3) corneas were analyzed by indirect immunofluorescence (green) with the indicated antibodies. Nuclei were stained with DAPI (blue). Scale bar = 100 μ m

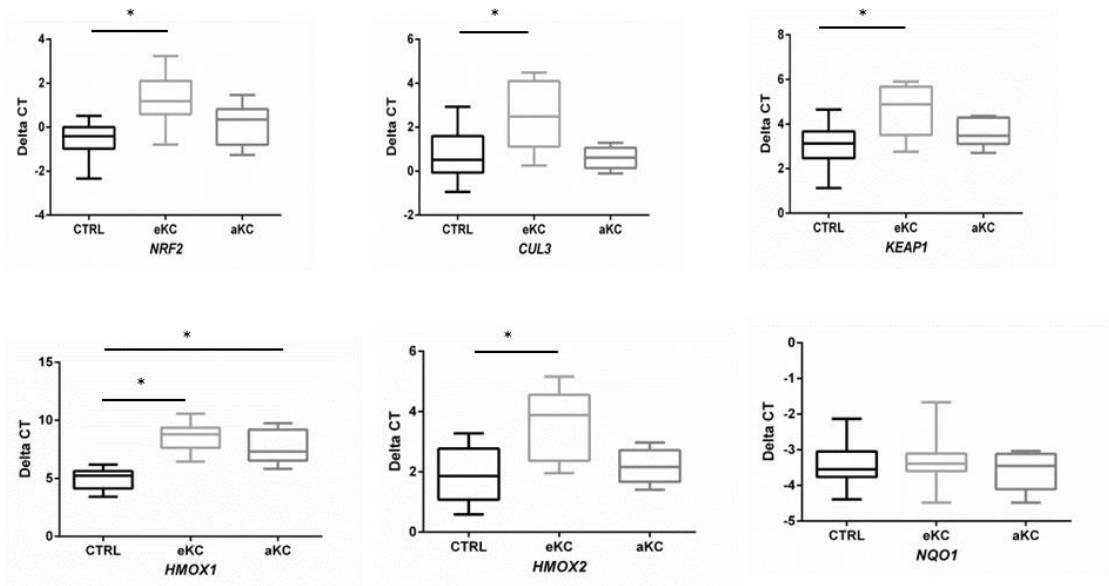


Figure 3. Comparative transcripts expression of NRF2 pathway genes in early and advanced keratoconus. Box and whiskers plots of gene expression in the cornea epithelium of control (CTRL; n = 13), early keratoconus (eKC; n = 11) and advanced keratoconus (aKC; n = 6). Transcript level expressed as mean of delta cycle threshold (dCT) normalized to housekeeping genes.

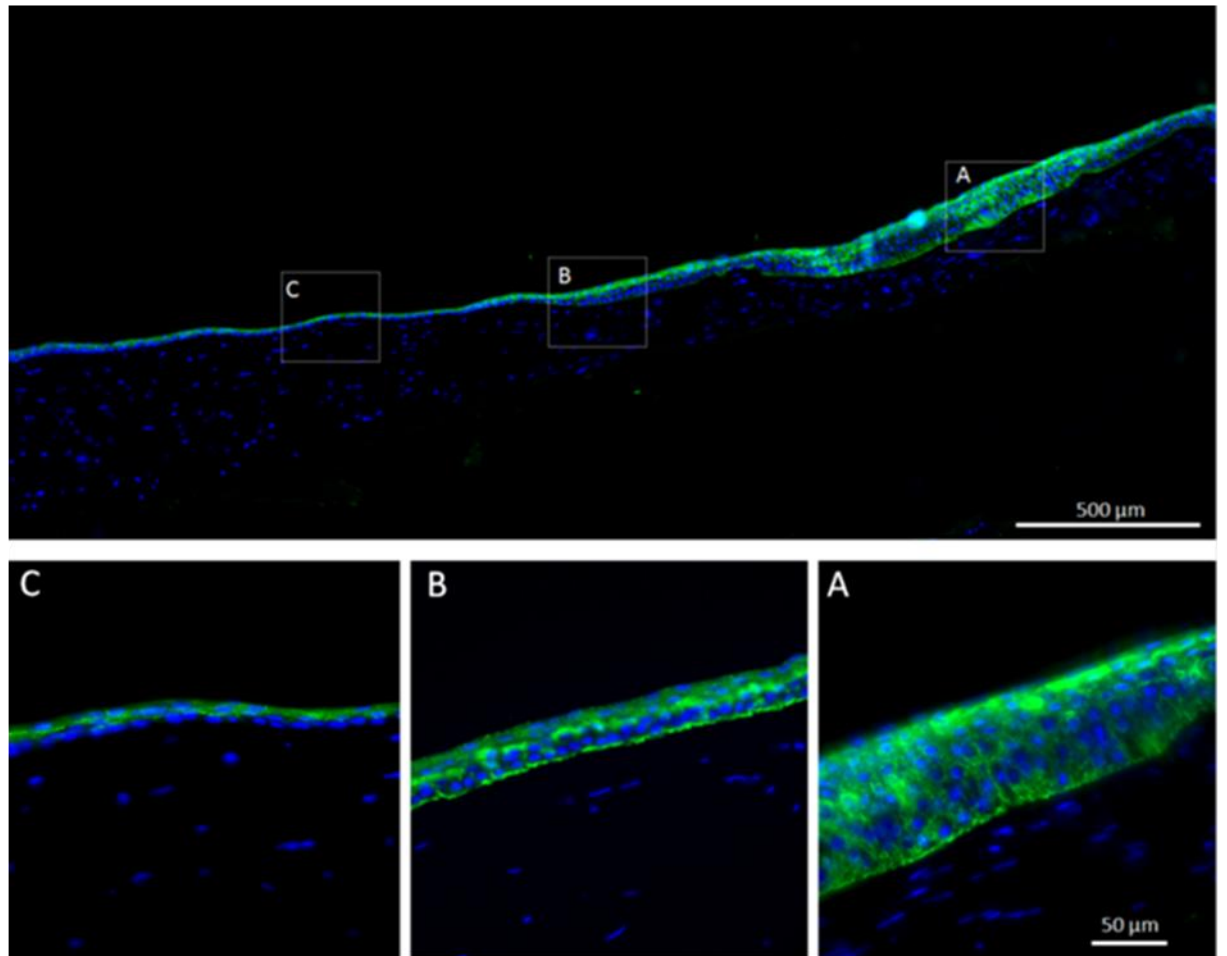


Figure S1. Variation in epithelial thickness on the same section of the corneal epithelium in keratoconus patients. Representative immunodetection of KRT3 (green) on frozen sections of human corneal epithelium of keratoconus patients ($n = 3$). Nuclei were stained with DAPI (blue). A: peripheral hyperplastic zone, B: intermediate zone, normal thickness, C: corneal apex hypoplastic zone.

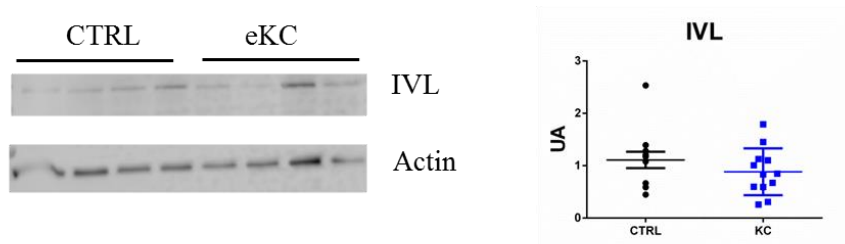


Figure S2: involucrin (IVL) protein expression. Proteins of control (CTRL) and early keratoconus (eKC) were immunoblotted with antibodies specific to IVL and actin, respectively (one representative blot with 4 samples of each condition). Densitometry quantification of western-blot using Image J, $n=12$ $p=0.27$,

Chapitre IV : DISCUSSION

Les approches actuelles utilisées pour la caractérisation de la physiopathologie du KC s'organisent principalement autour de plusieurs axes:

- les études des liaisons génétiques
- les études d'association, basées sur une approche dite gène candidat
- les études biomécaniques
- les études "omiques"
- les modèles expérimentaux (épithélium cornéen reconstruit).

Nous nous sommes proposés d'analyser la physiopathologie du KC par une analyse des gènes candidats, en prenant comme référence les gènes de différenciation épidermique, et nous avons complété ensuite notre recherche en utilisant les données globales obtenues à partir des analyses en "omiques" afin d'accélérer l'identification de nouvelles voies pathognomoniques impliquées dans l'apparition et la progression de la maladie.

Afin de détecter des modifications dans l'épithélium du KC, nous avons utilisé plusieurs approches.

1. Le programme de différenciation terminale de l'épithélium cornéen et de l'épiderme

Notre première stratégie a consisté à caractériser l'expression dans l'épithélium cornéen de différents gènes de la différenciation terminale de l'épiderme, certains exprimés dans les premières étapes de la différenciation comme celui de la kératine 10, d'autres exprimés tardivement comme celui de la FLG. Cette partie de notre étude nous a permis de démontrer que l'épithélium cornéen exprime les ARNm de certains d'entre eux, à des taux variables (très faiblement les gènes de la FLG, la loricrine et l'hornerine); plus abondamment ceux de l'involucrine et de la kératine 14; et très fortement ceux de la claudine 1 et de la desmogléine 1). Les ARNm de la kératine 10, de la filaggrine-2, la desmocolline 1 et de la cornéodesmosine n'ont pas été détectés. Ces niveaux de détection ne corrèlent pas avec le moment auquel ils sont exprimés au cours de la différenciation épidermique; par exemple *DSG1* et *DSC1* sont exprimés en même temps dans les kératinocytes différenciés, *KRT10* est exprimé dès l'entrée des kératinocytes dans le compartiment différenciant. Ces résultats montrent que le programme de différenciation de l'épithélium cornéen correspond pour une partie mais une partie seulement à celui de l'épiderme. Nous avons également montré une expression de la kératine 16.

Nous avons confirmé par western et/ou immunohistologie l'expression de l'involucrine dans l'épithélium cornéen, ainsi que celle de la claudine 1, de la kératine 16 et la desmogléine 1.

2. Différenciation terminale de l'épithélium cornéen kératoconique

Pour la seconde partie de notre projet, nous avons analysé de manière comparative l'expression de ces gènes dans l'épithélium cornéen normal et celui de patients atteints de KC (2 cohortes). Nous avons constaté au niveau des ARNm une diminution de l'expression de la **kératine 16** (en moyenne 12,5 fois) et de **l'involucrine** (3 fois) dans le cas du KC évolutif. Nous avons remarqué aussi une faible augmentation de l'ARNm de la claudine 1 (1,18 fois). Ces résultats n'ont jamais été publiés.

Nos analyses en immunofluorescence ont montré une faible expression de la kératine 16 dans les épithéliums contrôles et sa disparition dans le KC, confirmant les résultats de RT-PCR. Comme on l'a vu dans le paragraphe 3.2, la kératine 16 est souvent associée à des états d'hyper-prolifération (épiderme palmo-plantaire) ou de réparation tissulaire dans différents tissus. Une diminution de la kératine 16 suggère une moindre capacité de prolifération et de régénération de l'épithélium cornéen des patients kératoconiques. En accord avec cette hypothèse, l'épithélium kératoconique est généralement plus fin à l'apex du cône. Deux études protéomiques ([Chaerkady et al. 2013](#))([R. Joseph, Srivastava, and Pfister 2011](#)) ont montré une augmentation de la kératine 16 dans les épithéliums kératoconiques par rapport aux contrôles. Cette discordance est difficile à expliquer et pourrait être liée à des différences interindividuelles, ainsi qu'au nombre d'échantillons examinés (28 KC dans notre étude et 4-5 dans d'autres études).

Concernant l'involucrine, nous avons retrouvé un marquage cytoplasmique des cellules apicales dans le KC, alors que dans les épithéliums contrôles, l'involucrine est détectée au niveau des membranes des cellules intermédiaires et apicales.

Enfin, pour la CLDN1, nous avons retrouvé un marquage péri-celulaire assez homogène dans toutes les couches des cellules épithéliales des contrôles et un marquage limité aux cellules suprabasales dans le KC. Ces résultats n'ont pas été décrits dans d'autres publications.

Nos analyses protéiques en western (fraction soluble) ont montré une légère diminution de l'involucrine dans les épithéliums du KC. Nous n'avons pas obtenus des résultats satisfaisants pour montrer l'expression de la CLDN1 et KRT16.

Les composants de l'enveloppe cornée ont-ils une fonction non structurale dans l'épithélium cornéen ?

Comme on vient de le voir dans l'introduction, les kératinocytes de la peau expriment de nombreuses protéines telles que l'involucrine, la loricrine et l'hornerine, mais aussi les « small proline riche protéines » (SPRRs) et les « late cornified envelope proteins » (LCEs) pour former l'enveloppe cornée, processus médié par les transglutaminases. Nous avons montré que les transcripts de ***l'involucrine*** et en très faible quantités ceux de la loricrine et l'hornerine sont exprimées dans l'épithélium cornéen normal. De plus, nous avons trouvé une réduction de l'expression des ARNm des transglutaminases (1 et 5) et de la périplakine (PPL) dans les épithéliums du kératocône précoces. Les données de la littérature en transcriptomique sont en concordance avec celles que nous avons obtenues. En effet, You et al. ont retrouvé une diminution de *TGM1* (2 fois) (You et al. 2018) et de *KRT6* (Khaled et al. 2018).

Or la présence d'enveloppe cornée n'a pas été décrite à notre connaissance dans les épithéliums oculaires et nous n'avons pas observé de telles structures quand nous avons appliqué à la cornée le protocole de purification des enveloppes épidermiques. Nous avons supposé que ces molécules jouent un rôle différent, plutôt régulateur et non pas structurel. En effet, certains composants de l'enveloppe cornée ont été récemment décrits pour avoir des propriétés anti-oxydantes ou anti-bactériennes

Pour savoir si d'autres composants de l'enveloppe cornée sont exprimés, nous avons recherché l'expression des SPRR1A, SPRR2A et SPRR3.

Les SPRRs : un rôle antioxydant

Tout d'abord nous sommes intéressés à la famille des SPRRs. Ils sont exprimés dans tous les tissus squameux de la peau et dans la plus grande partie de la muqueuse épithéliale du tube digestif.

Dans ***l'épiderme***, il a été démontré que tous les gènes des *SPRR* sont exprimés à l'exception de *SPRR3* (Eckert R, 2005). De faibles expressions des *SPRR1s* ont été détectées par immunohistochimie dans les couches basales et suprabasales, la couche granuleuse étant clairement positive tandis que la couche cornée est négative.

Par ailleurs, plusieurs études ont analysé le rôle du calcium dans l'expression des *SPRRs*. La quasi-totalité des gènes *SPRR* est induite, comme celui de l'involucrine, lorsque la différenciation des kératinocytes est induite par le calcium. Cependant, les kératinocytes épidermiques confluents maintenus à une faible concentration en calcium expriment

l'involucrine et peu les SPRR1s (*Ishida-Yamamoto et al. 1997*). Ces résultats indiquent que la densité cellulaire est suffisante pour augmenter l'expression de l'involucrine mais pas celle des SPRR1s. Les stimuli externes (radiation UV, allergènes) ainsi que leurs effets (inflammation, stress oxydatif) altèrent l'expression des SPRRs.

En ce qui concerne **la cornée**, il existe quelques études qui présentent une augmentation de l'expression des *SPRR1A*, *SPRR2A*, *SPRR2D* et *SPRR2F* dans les stades terminales du trachome, une kérato-conjonctivite d'évolution chronique caractérisée par la présence de follicules, une hyperplasie papillaire et un « pannus » cornéen évoluant jusqu'à la cécité provoquée par des infections répétées à *Chlamydia trachomatis* (*Burton et al. 2011*). Des taux élevés de SPRRs (1 et 2) ont été rapportés dans le syndrome de l'œil sec en réponse à des cytokines pro inflammatoires, comme l'IL1b et l'interféron (*S. Li et al. 2008*).

Outre leur fonction biomécanique, les SPRRs ont d'importantes **propriétés anti-oxydatives** et vont détoxifier ainsi les ROS. Les études réalisées par Vermeij et col (*Vermeij and Backendorf 2010*) ont démontré que les SPRRs peuvent créer une barrière antioxydative protectrice à la périphérie de la cellule en bloquant ainsi la formation des ROS.

Cette fonction protectrice ne semble pas limitée aux épithéliums squameux. Les SPRR1A augmentent suite à une ischémie cardiaque et protège les cardiomyocytes (*Pradervand et al. 2004*).

Nous supposons ainsi que la diminution significative de l'expression des SPRRs que nous avons observée dans le KC a pour conséquence une diminution de la protection de l'épithélium contre le stress oxydatif induit par les ROS. Ceci est en accord avec plusieurs études qui indiquent un rôle du stress oxydant dans le développement du KC (*Arnal et al. 2011*) (*Wojcik et al. 2013*). Les patients atteints de KC présentent un taux plus élevé de radicaux libres et d'autres espèces réactives dans leurs cornées que les témoins (*Chwa et al. 2008*). Les résultats des études *in vitro* sur les fibroblastes du KC indiquent une augmentation de la production de ROS par rapport aux fibroblastes normaux. La diminution des défenses antioxydatives dans les cornées KC et l'augmentation des niveaux de ROS vont induire la dégradation de la matrice extracellulaire du stroma, ce qui expliquerait son amincissement.

Rôle de NRF2- maître contrôleur du stress oxydatif

NRF2, codé par le gène *NFE2L2*, est un facteur de transcription essentiel pour le système de défense anti-oxydatif de la cellule.

En conditions basales, NRF2 se lie à la protéine Keap1 et reste dans le cytoplasme où il subit une ubiquitination et une dégradation par le protéasome. Dans des conditions de stress (UVB, ROS, ...), NRF2 se sépare de Keap1 et est transféré dans le noyau où il se lie à un élément de réponse antioxydante ARE (Antioxydant Response Element) dans la région du promoteur de ses gènes cibles et initie la transcription des enzymes antioxydantes correspondantes, comme la superoxyde dismutase, la catalase, la glutathion S-transférase, la NAD(P)H déshydrogénase (quinone 1) et l'hème oxygénase-1 qui vont détoxifier la cellule des photo-dommages induits par les ROS (**Figure 74**).

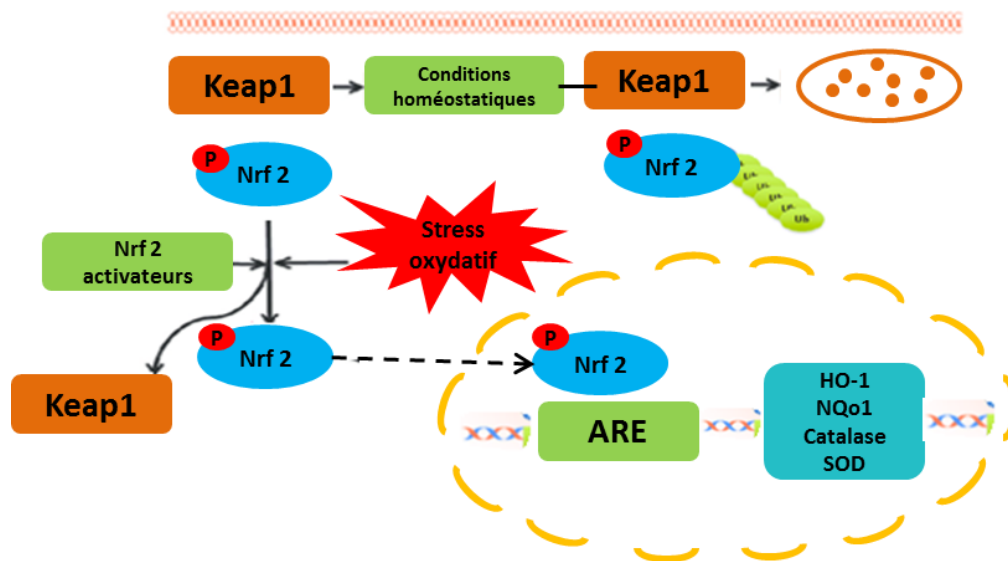


Figure 74. Représentation schématique de l'activation de la voie de signalisation de Nrf2 par les espèces réactives de l'oxygène.

Dans le cytoplasme, dans des conditions normales, NRF2 est lié à la protéine Keap1. Keap1 inhibe la voie de signalisation NRF2 en favorisant l'ubiquitination de Nrf2 et sa dégradation ultérieure par le protéasome. Un stress oxydatif modéré et des activateurs de NRF2 entraînent la dissociation du complexe NRF2-Keap1, la phosphorylation de NRF2 et sa translocation nucléaire. Dans le noyau, Nrf2 favorise l'activation transcriptionnelle des antioxydants (hème oxygenase-1 [HO-1], NAD(P)H: quinone déshydrogénase [NQo1], catalase et superoxyde dismutase [SOD]). D'après (J. Chen, Zhang, and Cai 2014)

Un système NRF2 non fonctionnel est incapable de détoxifier les radicaux libres au sein du réseau cellulaire. Cette activité modifiée de NRF2 est associée à des maladies dégénératives chroniques telles que la maladie de Parkinson ou la maladie d'Alzheimer et au cancer (Todorovic, Wood, and Mellick 2016).

Il a été récemment montré que les défauts de barrière épidermique dus à l'absence de loricrine dans la peau des souris induisent en compensation l'induction des protéines SPRR2 (*Singh et al. 2010*) via l'action du facteur de transcription NRF2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2). De plus, il régule aussi l'expression de la kératine 16 et de certaines protéines desmosomales (*Schäfer et al. 2012*).

Nous avons supposé que NRF2 est exprimé dans l'épithélium de la cornée et que son expression est altérée dans le kératocône. Ainsi, nous avons montré en effet que *NRF2* est bien exprimé dans l'épithélium cornéen et son expression en ARNm est diminuée dans les kératocônes précoces, ainsi celles d'autres genes impliqués dans cette voie de signalisation (*Keap1 et Cul 3*).

Par ailleurs, il existe une étude réalisée sur des fibroblastes du stroma de cornée des patients atteints de KC (*Zhonghua Shiyan, Yanke Zazhi, 2015*) qui montre que dans des conditions de stress oxydatif prononcé, ces cellules présentent une production accrue de ROS, une diminution de la translocation de NRF2 et aucune induction des niveaux d'expression des gènes des protéines anti oxydatives en aval. Ceci suggère que le défaut d'activation de la signalisation NRF2-ARE pourrait être impliqué dans la progression du KC.

Le métabolisme du fer

Le facteur de transcription NRF2 régule aussi plusieurs gènes impliqués dans le métabolisme du fer, par l'intermédiaire de l'hème oxygénase. C'est une enzyme qui catalyse la décomposition de l'hème en une molécule antioxydante, la biliverdine, et 2 composés anti-inflammatoires: le monoxyde de carbone et le fer (**Figure 75**). Il existe 2 isotypes d'hème oxygénase : l'une inductible (HO-1), l'autre constitutive (HO-2).

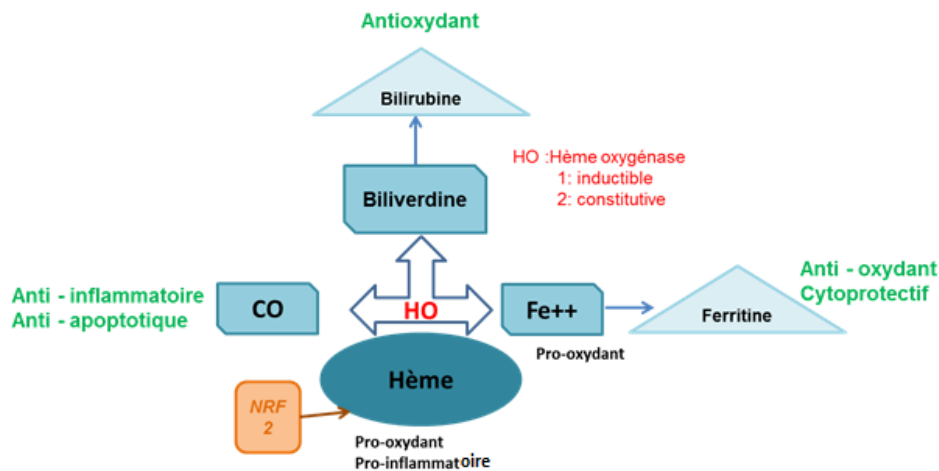


Figure 75. Représentation schématique de l'action d'hème oxygénase.

Le fer et l'oxygène sont intimement liés: le fer est un nutriment essentiel utilisé comme cofacteur dans les enzymes servant au transport de l'oxygène, à la phosphorylation par oxydation et à l'oxydation des métabolites. Cependant, un excès de fer (Fe^{2+}) labile facilite la formation de radicaux libres dérivés de l'oxygène capables d'endommager les biomolécules (réaction de Fenton) (Liochev and Fridovich 2002). Par conséquent, l'utilisation biologique du fer est un processus étroitement contrôlé.

Le fer est stocké dans les cellules sous 2 formes: la ferritine et l'hémosidérine. Dans les larmes, et autres liquides, il est fixé à une glycoprotéine qui présente une forte affinité pour cet élément - la lactoferrine. Cette molécule présente un intérêt majeur car elle pourrait contribuer ainsi à la détoxification de la surface oculaire des ROS.

Comme on l'a vu dans le chapitre 4.3, plusieurs études ont rapporté une expression plus faible de la lactoferrine dans les larmes, le stroma et l'épithélium recueillis chez les patients atteints de KC. Toutes ces données indiquent qu'une expression réduite de protéines liant le fer pourrait contribuer à la déposition du fer dans la cornée de patients atteints de KC. Ces résultats soulèvent la possibilité que la dérégulation de la lactoferrine puisse augmenter les radicaux libres d'oxygène dans la cornée.

En poursuivant nos études sur des épithéliums cornéens kératoconiques, nous avons observé une diminution de *HMOX1* et *HMOX2*. Ces données sont renforcées par le travail d'Avetisov et al. (Avetisov et al. 2015) qui a démontré qu'il existe une redistribution anormale du Fe dans les cornées atteintes du KC. En effet, il existe une accumulation anormale de ces éléments à la base du cône et une perte totale de ces métaux à l'apex, ce qui pourrait provoquer une accentuation du stress oxydatif à ce niveau par manque des mécanismes de détoxification. Comme il existe une diminution des molécules qui transportent le fer dans les cellules, il va s'accumuler et précipiter sous sa forme métallique

(anneau de Fleischer), sans réaliser son rôle de cofacteur des enzymes prolyl- et lysyl-hydroxylases, impliquées dans la synthèse du collagène. Ce processus va aboutir à la désorganisation de la matrice extracellulaire. Ainsi, l'anneau pigmenté à la base du cône, considéré comme juste un symptôme, peut être la cause réelle de la kératectasie. On assiste ainsi à la création d'un vrai cercle vicieux entre la formation de la barrière physico chimique et de l'anneau de Fleischer, le stress oxydatif, la diminution des minéraux de la zone ectasique et les processus de dégradations dans la cornée. Des études en transcriptomique ont montré une diminution d'autres gènes impliqués dans la détoxification des ROS comme *ALDH3A1* (Aldehyde Dehydrogenase 3 Family Member A1) et *FTL* (Ferritin light chain) ([Khaled et al. 2018](#))([You et al. 2018](#)). De plus, des études récentes montrent une diminution de l'expression de *NRF2* dans les kératocytes du stroma du KC lors de l'exposition à des ROS ([Bian et al. 2015](#)) ainsi qu' une diminution de *HMOX2* dans des cellules épithéliales du KC([Caglayan et al. 2018](#)).

Enfin, nous avons montré que les transcrits de l'IVL, *SPRRs* et *HMOX1* étaient aussi exprimés dans les kératocônes avancés, ce qui confirme que les mécanismes inhibant ces gènes sont impliqués tout le temps dans le développement de la maladie.

Conclusion

La **Figure 76** synthétise l'ensemble des résultats obtenus au cours de ma thèse.

La cornée et l'épiderme présentent 2 fonctions de barrières communes : mécanique et photoprotectrice.

Dans **l'épiderme**, la fonction de barrière est réalisé par l'enveloppe cornée, la matrice intercornéocytaire et les corneodesmosomes.

Dans **l'épithélium cornéen**, l'enveloppe cornée est absente ainsi que les cornéodesmosomes.

Pourtant, lors de la décompensation biomécanique, une fragilisation du tissu cornéen s'installe, marquée par une déformation *asymétrique* au sein de la cornée, *focale*, avec apparition d'une augmentation de la cambrure paracentrale et un aplatissement périphérique. C'est le cas de la maladie du **KC**.

La théorie des contraintes mécaniques dans le kératocône est de plus en plus citée dans la littérature. Elle est souvent associé a des frottements oculaires et au port des lentilles de contact). Nos résultats ont montré une diminution de l'expression de certaines composants de l'enveloppe cornée de l'épiderme dans le KC (*IVL, SPRR1A, SPRR2A, SPRR3, TGM et 5, PPL*). Ce résultat n'a jamais été évoqué auparavant.

Etant donné que certains composants de l'enveloppe cornée ont également d'autres fonctions, nous avons de fortes convictions qu'ils jouent dans l'épithélium cornéen un rôle plutôt dans les défenses antioxydatives.

Dans l'épithélium cornéen du kératocône, une diminution des SPRRs pourraient également induire une altération de la barrière antioxydative et une augmentation de la toxicité aux ROS. Une diminution de *HMOX1* et *HMOX2* indiquerait un dérèglement du métabolisme du fer, ce qui pourrait expliquer l'apparition de l'anneau de Fleischer, un signe clinique caractéristique du KC. Il existe probablement une dérégulation de NRF2 et de la voie anti oxydative qu'il contrôle, avec une diminution de son expression mais aussi de celle du complexe d'ubiquitination qui module son activité (*Cul3 et Keap1*).

Le stress oxydatif joue un rôle primordial dans le KC. De plus, il pourrait être impliqué dans la progression de la maladie.

Si, à ce jour, il existe un traitement qui permet de renforcer la barrière mécanique de la cornée du KC (le CXL), une approche pour diminuer la phototoxicité sur un terrain

mécanique altéré n'existe pas. C'est pourquoi les travaux de cette thèse mériteraient d'être poursuivis par des études fonctionnelles.



Figure 76 . Modèle des mécanismes physiopathogéniques impliqués dans le kératocône

Perspectives

Par la suite de ce projet, il faudra confirmer les résultats obtenus en ARNm, notamment pour la voie NRF2, au niveau protéique et en activité enzymatique.

De plus, étant donné qu'on a analysé 6 KC avancés et que dans la plupart des cas nous avons observés des variations mais non significatives des gènes de différenciation épidermique et de la voie NRF2, ça sera pertinent d'élargir la cohorte des patients présentant un kératocône avancé.

Si les résultats en protéines seront validés, afin de mieux comprendre l'ensemble des mécanismes physiopathologiques impliqués dans le développement du KC, il serait intéressant de poursuivre ce travail de thèse par la caractérisation fonctionnelle de NRF2. Ce rôle pourrait être caractérisé *in vitro* à l'aide des cellules épithéliales normales ou du KC en culture en les exposant régulièrement aux UVB. Des analyses ultérieures pourraient établir ultérieurement des liaisons entre les protéines impliquées dans le stress oxydatif (HMOX1, LOX) et celles de la différenciation épidermique (Involucrine, Transglutaminases, SPRRs).

L'ensemble de ces expériences pourrait être poursuivi par l'utilisation de modèles plus complexes tels que des épithéliums cornéens humains reconstruits avec des cellules épithéliales cornéennes normales dont l'expression de NRF2 aura été diminuée par la technique de l'interférence à l'ARN (siRNA ou shRNA). J'ai initié au cours de ma thèse des expériences préliminaires concernant cette axe de recherche (**Voir Annexe 1**). Cette étude permettra de mieux comprendre les mécanismes moléculaires qui sont impliqués dans le contrôle de la différenciation terminale de l'épithélium cornéen.

Annexe 1

Modèle d'épithélium cornéen humain reconstruit in vitro

Une approche assez intéressante pour étudier la physiopathologie du KC serait l'utilisation d'un épithélium cornéen reconstruit *in vitro* en trois dimensions comme modèle expérimental. Cette approche a pour principal avantage de reproduire un phénotype d'un épithélium humain *in vitro*. De plus, étant donné qu'il n'existe pas de modèle animal du KC, les tissus reconstruits représentent un excellent moyen d'étude en recherche fondamentale car ils possèdent des caractéristiques des tissus natifs au niveau de leur morphologie et aspect histologique.

Le premier tissu reconstruit en laboratoire a été l'épiderme (*Prunieras, Regnier, and Woodley 1983*). Aujourd'hui il existe une multitude de tissus et même d'organes reconstruits tels que les valves cardiaques (*Dubé et al. 2014*), les vaisseaux sanguins (*Bourget et al. 2013*) et la cornée (*Germain et al. 1999*) produits sur la base du modèle de l'épiderme.

En ce qui concerne l'épithélium cornéen, les modèles existants sont réalisés pour pallier les abrasions lors de certaines pathologies oculaires ou bien la déficience des cellules souches limbiques. Or, un vrai épithélium bien différencié n'est pas exigé, un pansement avec juste un tissu pluristratifié est suffisant pour recouvrir les zones déficientes. Il est donc nécessaire de mettre au point un protocole de production d'épithéliums cornéens différenciés.

Nous avons adapté le protocole de production des épidermes reconstruits utilisé au laboratoire, avec culture des cellules à l'interface air-liquide.

Culture de progéniteurs des cellules épithéliales cornéennes humaines

Des progéniteurs humains limbiques des cellules épithéliales cornéennes (HCEP pour Human corneal epithelial progenitors) ont été fournis par la société Cellntec (Berne, Suisse). Nous avons débuté par leur mise en culture (5000 cellules par cm²) selon les indications du fabricant dans le milieu CnT® prime (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MI) supplémenté en antibiotiques (penicilline/streptomycine). Toutes les manipulations ont été effectuées sous hotte stérile à flux laminaire vertical.

Prolifération et entretien de la culture cellulaire

Lorsque les cellules étaient à 70% de confluence dans le support de culture, une digestion enzymatique à l'Accutase®+ Dispase à 10 mg/ml suivi d'une centrifugation à 300 G pendant 5min e été réalisé. Le culot de cellules était ensuite remis en suspension avec 3 ml

de CnT® prime et les cellules réensemencées sur T75. Lors de notre expérimentation, nous nous sommes intéressés au nombre de passages maximum avant que les cellules souches perdent leur phénotype de cellules indifférenciées. Pour cela, nous avons prélevé 200 000 cellules lors de chaque passage et nous avons étudié l'expression des gènes de différenciation terminale (*KRT3/12*) et des marqueurs des cellules indifférenciées (*KRT5/14*, *ABCG2*, *14-3-3s*) au niveau ARNm. J'ai constaté que les cellules perdent leur phénotype indifférencié à partir du passage 8.

Mise en culture sur insert de polycarbonate

Les produits suivants ont été utilisés :

- Inserts de culture cellulaire Millicell, 12 mm de diamètre, polycarbonate, pores de 0,4 µm (Millipore, PIHP01250)
- Milieu de culture Epilife "Haut Calcium" contenant 1,5mM de CaCl₂ (Epilife Life Technologies M-EPIC-500-CA)
- Epilife "Différenciation 3D" = Epilife Haut Calcium + 50 µg/ml Vitamine C (Sigma-Aldrich) + 10 ng/ml de "Keratinocyte Growth Factor » (KGF, Sigma-Aldrich).

Étape de différenciation épithéliale

Un insert a été placé par puit de plaque 12 puits (Nunclon™ Delta Surface, ThermoScientific, Roskilde, Denmark) contenant 500 µL d'Epilife « Haut Calcium ». Les cellules ont étéensemencées à différentes concentrations (50 000 et 100 000 cellules par insert) dans 500µl de milieu, puis incubées en chambre humide à 37°C (98% d'humidité relative, 5% de CO₂).

Passage en interface « Air-Liquide »

Deux jours après l'ensemencement, le milieu à l'extérieur de l'insert était remplacé par du milieu Epilife « Différenciation 3D » et l'insert placé à l'interface air-liquide.

Plusieurs conditions ont été testées (**Figure 77**) :

- Epilife + vitamine C + KGF.
- Epilife + vitamine C
- Epilife + KGF

Le milieu à l'intérieur de l'insert était retiré tous les jours pour permettre la stratification de l'épithélium. Le milieu était ensuite changé tous les deux jours. Nous avons évalué différents temps de maintien des cellules à l'interface air liquide (10, 13, 17 et 19 jours).

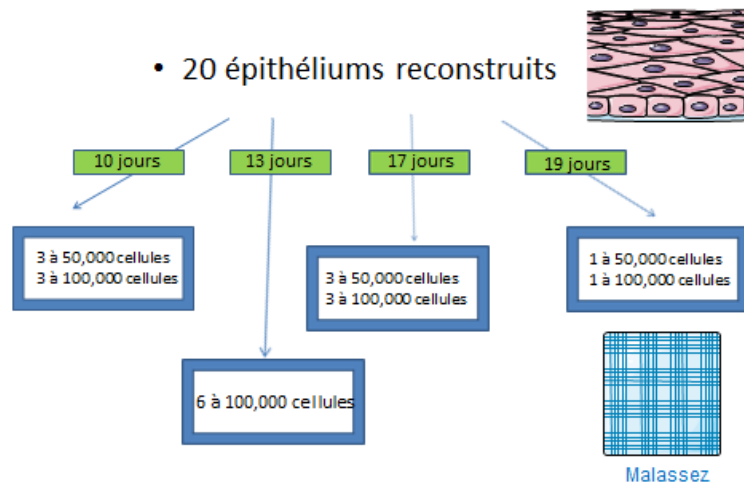


Figure 77. Différentes conditions testées pour produire des épithéliums cornéens reconstruits.

Pour chaque essai le nombre d'inserts et le nombre de cellulesensemencées par insert sont indiqués. A la fin de ce protocole les ARNm étaient extraits (pour une recherche d'expression génique par RT-PCR) ou les épithéliums fixés pendant 24h en formaline 4% avant d'être inclus en paraffine (pour analyse histologique et immuno marquage).

Dans toutes les conditions, des épithéliums pluristratifiés ont été obtenus. Ils montraient tous la présence d'une couche cornée, généralement parakératosique (Figure 78).

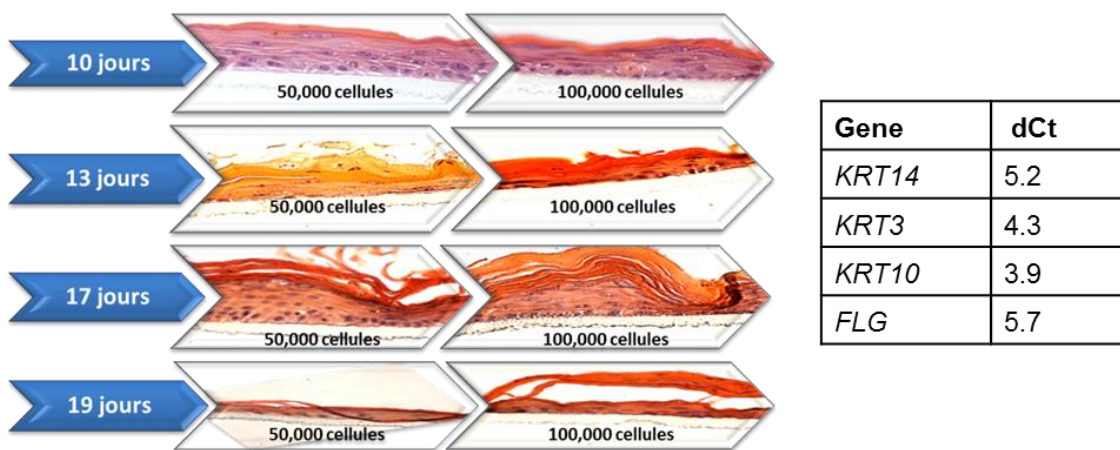


Figure 78. Coloration en hémalin-éosine des épithéliums cornéens reconstruits (a gauche) et l'expression en ARNm des gènes de différenciation épidermique (KRT10, KRT14 FLG) et cornéen (KRT3).

Les données en qPCR sont normalisées par rapport à la moyenne géométrique de *Ubb*, *TBP* et *B2M*.

La faible expression de kératine 3 indiquait que ces épithéliums n'étaient pas différenciés en épithélium cornéen. La présence de kératine 10 et de filaggrine indiquait qu'ils avaient tendance à se différencier vers l'épiderme et à kératiniser.

Les interactions épithélium/stroma jouent un rôle très important lors du développement et du maintien de l'homéostasie des épithéliums. Par conséquent, une perturbation de ces échanges intercellulaires peut mener à des anomalies du développement et de la croissance des cellules épithéliales. Dans l'optique de différencier les cellules progénitrices du limbe vers l'épithélium cornéen et non pas l'épiderme, nous nous sommes proposés de fabriquer des matrices extracellulaires à partir de fibroblastes du stroma cornéen (cornées de la Banque des tissus non utilisés pour la greffe). Pour cela, nous avons mis des fibroblastes en culture dans les inserts (dans le milieu FibroGro supplémenté, voir le tableau ci-dessous). Dans un premier temps, les cellules fibroblastiques, cultivées en présence de milieu supplémenté en acide ascorbique, vont créer leur propre matrice produisant ainsi un équivalent dermique. L'acide ascorbique augmente la synthèse d'ARNm de procollagène et permet l'hydroxylation post-transcriptionnelle de la lysine et de la proline, menant à la formation d'hélices de collagène, à la réticulation du collagène et à l'augmentation de la sécrétion du collagène par les cellules en culture.

De même, nous avons obtenus des épithéliums kératinisés.

Par ailleurs, de nombreuses études ([Kumar et al. 2017](#))([S. W. Kim et al. 2012](#)) ont montré le rôle de l'acide rétinoïque (vitamine A) en tant que modulateur physiologique de la prolifération et de la différenciation de l'épithélium de la surface oculaire. En suivant cette idée, nous nous sommes proposés de tester l'acide rétinoïque à la concentration de 10^{-7} M. Une semaine plus tard, nous avons mis les inserts avec les progéniteurs sur les fibroblastes en créant une interface air liquide 2 jours après (c'est-à-dire les kératocytes nourris par le milieu de culture FibroGro+Epilife et les progéniteurs en contact avec l'air environnant, afin de favoriser la différenciation vers l'épithélium cornéen). Malheureusement, toutes ces conditions n'ont pas donné des résultats favorables, car la présence d'une couche cornée a été observée dans toutes les conditions testées.

Les études récentes sur les IPS (induced pluripotent stem cells) montrent une possibilité assez intéressante de convertir les cellules indifférenciées vers un épithélium cornéen mature en utilisant des inhibiteurs des ROCK et du TGF beta. Cette approche pourrait être intéressante dans les études à venir.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adair-Kirk, Tracy L, Jeffrey J Atkinson, Thomas J Broekelmann, Masayuki Doi, Karl Tryggvason, Jeffrey H Miner, Robert P Mecham, and Robert M Senior. 2003. "A Site on Laminin 5, AQARSAASKVKVSMKF, Induces Inflammatory Cell Production of Matrix Metalloproteinase-9 and Chemotaxis." *The Journal of Immunology* 171 (1): 398–406. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.1.398>.
- Aktekin, M, M F Sargon, P Cakar, H H Celik, and E Firat. 1998. "Ultrastructure of the Cornea Epithelium in Keratoconus." *Okajimas Folia Anatomica Japonica* 75 (1): 45–53. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9715085>.
- Alshbool, Fatima. Z., and Subburaman Mohan. 2014. "Emerging Multifunctional Roles of Claudin Tight Junction Proteins in Bone." *Endocrinology*. <https://doi.org/10.1210/en.2014-1173>.
- Arnal, Emma, Cristina Peris-Martínez, Jose Luis Menezo, Siv Johnsen-Soriano, and Francisco Javier Romero. 2011a. "Oxidative Stress in Keratoconus?" *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 52 (12): 8592–97. <https://doi.org/10.1167/iovs.11-7732>.
- Assiri, A A, B I Yousuf, A J Quantock, P J Murphy, and Abdullah A Assiri. 2005. "Incidence and Severity of Keratoconus in Asir Province, Saudi Arabia." *British Journal of Ophthalmology* 89 (11): 1403–6. <https://doi.org/10.1136/bjo.2005.074955>.
- Avetisov, S.V. Trufanov, I.A. Novicov. n.d. "Vestnik Oftalmologii 2016." *Vestnik Oftalmologii* 132(6):11: 60–67. <https://doi.org/10.17116/oftalma2016132611-19>.
- Avetisov, S. E., V. R. Mamikonyan, I. A. Novikov, L. S. Pateyuk, G. A. Osipyan, and N. P. Kiryushchenkova. 2015. "Abnormal Distribution of Trace Elements in Keratoconic Corneas." *Vestnik Oftal'mologii* 131 (6): 34. <https://doi.org/10.17116/oftalma2015131634-42>.
- Balasubramanian, Sivaraman A, David C Pye, and Mark D P Willcox. 2013. "Effects of Eye Rubbing on the Levels of Protease, Protease Activity and Cytokines in Tears: Relevance in Keratoconus." *Clinical and Experimental Optometry* 96 (2): 214–18. <https://doi.org/10.1111/cxo.12038>.
- Balasubramanian, Sivaraman A, Valerie C Wasinger, David C Pye, and Mark D P Willcox. 2013. "Preliminary Identification of Differentially Expressed Tear Proteins in Keratoconus." *Molecular Vision* 19: 2124–34. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24194634>.
- Balasubramanian, Sivaraman Arumugam, Sujatha Mohan, David Cecil Pye, and Mark Duncan Perry Willcox. 2012. "Proteases, Proteolysis and Inflammatory Molecules in the Tears of People with Keratoconus." *Acta Ophthalmologica* 90 (4): e303–9. <https://doi.org/10.1111/j.1755-3768.2011.02369.x>.
- Balasubramanian, Sivaraman Arumugam, Valerie C Wasinger, David C Pye, and Mark D P Willcox. 2013. "Preliminary Identification of Differentially Expressed Tear Proteins in Keratoconus." *Molecular Vision* 19 (October): 2124–34. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24194634>.
- Barrandon, Y, and H Green. 1987. "Three Clonal Types of Keratinocyte with Different

- Capacities for Multiplication." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 84 (8): 2302–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.8.2302>.
- Barresi, Caterina, Caroline Stremnitzer, Veronika Mlitz, Sanja Kezic, Arthur Kammeyer, Mino Ghannadan, Katja Posa-Markaryan, Clare Selden, Erwin Tschachler, and Leopold Eckhart. 2011. "Increased Sensitivity of Histidinemic Mice to UVB Radiation Suggests a Crucial Role of Endogenous Urocanic Acid in Photoprotection." *Journal of Investigative Dermatology* 131 (1): 188–94. <https://doi.org/10.1038/jid.2010.231>.
- Baudouin, C, and A Labbé. n.d. "Le Film Lacrymal." Accessed September 28, 2018. http://allergo.lyon.inserm.fr/OPHTALMOLOGIE/8bis-1-1_Film_lacrymal.pdf.
- Bechara, Samir J, G O Waring, and Michael S Insler. 1996. "Keratoconus in Two Pairs of Identical Twins." *Cornea* 15 (1): 90–93. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8907387>.
- Beezhold, D H, and C Personius. 1992. "Fibronectin Fragments Stimulate Tumor Necrosis Factor Secretion by Human Monocytes." *Journal of Leukocyte Biology* 51 (1): 59–64. <https://doi.org/10.1002/jlb.51.1.59>.
- Benedetto, Anna De, Nicholas M Rafaels, Laura Y McGirt, Andrei I Ivanov, Steve N Georas, Chris Cheadle, Alan E Berger, et al. 2011. "Tight Junction Defects in Patients with Atopic Dermatitis." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 127 (3): 773–86. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.10.018>.
- Beuerman, R. W., J. A. Laird, S. C. Kaufman, and H. E. Kaufman. 1994. "Quantification of Real-Time Confocal Images of the Human Cornea." *Journal of Neuroscience Methods* 54 (2): 197–203. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(94\)90193-7](https://doi.org/10.1016/0165-0270(94)90193-7).
- Bian, J., M. Qu, Y. Wang, L. Yang, W. Shi, and Q. Zhou. 2015. "Defect of Nrf2-ARE Signaling Activation in Corneal Stromal Cells of Keratoconus." *Zhonghua Shiyan Yanke Zazhi/Chinese Journal of Experimental Ophthalmology* 33 (2). <https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.02.003>.
- Bikbova, Guzel, and Mukharram Bikbov. 2014. "Transepithelial Corneal Collagen Cross-Linking by Iontophoresis of Riboflavin." *Acta Ophthalmologica* 92 (1): e30–34. <https://doi.org/10.1111/aos.12235>.
- Bilgihan, Kamil, Ahmet Hondur, Sabahattin Sul, and Sertac Ozturk. 2011. "Pregnancy-Induced Progression of Keratoconus." *Cornea* 30 (9): 991–94. <https://doi.org/10.1097/ICO.0b013e3182068adc>.
- Bizheva, Kostadinka, Bingyao Tan, Benjamin MacLellan, Zohreh Hosseinaee, Erik Mason, Denise Hileeto, and Luigina Sorbara. 2017. "In-Vivo Imaging of the Palisades of Vogt and the Limbal Crypts with Sub-Micrometer Axial Resolution Optical Coherence Tomography." *Biomedical Optics Express* 8 (9): 4141. <https://doi.org/10.1364/BOE.8.004141>.
- Blumenberg, Miroslav. 1988. "Concerted Gene Duplications in the Two Keratin Gene Families." *Journal of Molecular Evolution* 27 (3): 203–11. <https://doi.org/10.1007/BF02100075>.

- Bourget, Jean Michel, Véronique Laterreur, Maxime Guillemette, Robert Gauvin, Caroline Miville-Godin, Maxence Mounier, Jean Ruel, François A. Auger, Teodor Veres, and Lucie Germain. 2013. "Recent Advances in the Development of Tissue-Engineered Vascular Media Made by Self-Assembly." In *Procedia Engineering*, 59:201–5. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2013.05.111>.
- Brautaset, Rune L., Maria Nilsson, William L. Miller, Norman E. Leach, Johanna H. Tukler, and Jan P. G. Bergmanson. 2013. "Central and Peripheral Corneal Thinning in Keratoconus." *Cornea* 32 (3): 257–61. <https://doi.org/10.1097/ICO.0b013e31825240d7>.
- Brenner, Michaela, and Vincent J Hearing. 2008. "The Protective Role of Melanin against UV Damage in Human Skin." *Photochemistry and Photobiology*. NIH Public Access. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2007.00226.x>.
- Brew, Keith, Deendayal Dinakarpandian, and Hideaki Nagase. 2000. "Tissue Inhibitors of Metalloproteinases: Evolution, Structure and Function." *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology*. [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(99\)00279-4](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(99)00279-4).
- Buck, R C. 1985. "Measurement of Centripetal Migration of Normal Corneal Epithelial Cells in the Mouse." *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 26 (9): 1296–99. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4030257>.
- Buddi, Rajeev, Brian Lin, Shari R. Atilano, Nadia C. Zorapapel, M. Cristina Kenney, and Donald J. Brown. 2002. "Evidence of Oxidative Stress in Human Corneal Diseases." *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 50 (3): 341–51. <https://doi.org/10.1177/002215540205000306>.
- Bureau, J, E J Fabre, C Hecquet, Y Pouliquen, and G Lorans. 1993. "Modification of Prostaglandin E2 and Collagen Synthesis in Keratoconus Fibroblasts, Associated with an Increase of Interleukin 1 Alpha Receptor Number." *Comptes Rendus de l'Academie Des Sciences. Serie III, Sciences de La Vie* 316 (4): 425–30. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8402271>.
- Burton, Matthew J, Saul N Rajak, Julien Bauer, Helen A Weiss, Sonda B Tolbert, Alice Shoo, Esmail Habtamu, et al. 2011. "Conjunctival Transcriptome in Scarring Trachoma." *Infection and Immunity* 79 (1): 499–511. <https://doi.org/10.1128/IAI.00888-10>.
- Bykhovskaya, Yelena, Benjamin Margines, and Yaron S. Rabinowitz. 2016. "Genetics in Keratoconus: Where Are We?" *Eye and Vision* 3 (1): 16. <https://doi.org/10.1186/s40662-016-0047-5>.
- Cadrage, Note D E. 2014. "Crosslinking Du Collagène Cornéen et Anneaux Intra-Cornéens Dans Le Traitement Des Ectasies Cornéennes." [https://doi.org/10.1016/S0973-0826\(08\)60448-2](https://doi.org/10.1016/S0973-0826(08)60448-2).
- Caglayan, Mehtap, Sucattin Ilker Kocamis, Ozge Sarac, Hayriye Tatli Dogan, Pinar Kosekahya, Murat Ayan, and Nurullah Cagil. 2018. "Investigation of Heme Oxygenase 2 Enzyme Protein Expression in Keratoconus and Normal Human Corneal Epithelium: An Immunohistochemical Study." *Current Eye Research*, September 9, 2018. <https://doi.org/10.1080/02713683.2018.1521980>.

- Carriazo, Cesar, and Maria Jose Cosentino. 2017. "A Novel Corneal Remodeling Technique for the Management of Keratoconus." *Journal of Refractive Surgery* 33 (12): 854–56. <https://doi.org/10.3928/1081597X-20171004-05>.
- Castro-Muñozledo, Federico. 2013. "Review: Corneal Epithelial Stem Cells, Their Niche and Wound Healing." *Molecular Vision* 19 (April): 1600–1613. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3724956/>.
- Čejková, Jitka, Cestmír Čejka, Taras Ardan, Jakub Širc, Jiří Michálek, and Jacques Luyckx. 2010. "Reduced UVB-Induced Corneal Damage Caused by Reactive Oxygen and Nitrogen Species and Decreased Changes in Corneal Optics after Trehalose Treatment." *Histology and Histopathology* 25 (11): 1403–16. <https://doi.org/10.14670/HH-25.1403>.
- Chaerkady, Raghothama, Hanjuan Shao, Sherri Gae Scott, Akhilesh Pandey, Albert S. Jun, and Shukti Chakravarti. 2013a. "The Keratoconus Corneal Proteome: Loss of Epithelial Integrity and Stromal Degeneration." *Journal of Proteomics* 87 (July): 122–31. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.05.023>.
- Chaloin-Dufau, C, I Pavitt, P Delorme, and D Dhouailly. 1993. "Identification of Keratins 3 and 12 in Corneal Epithelium of Vertebrates." *Epithelial Cell Biology* 2 (3): 120–25. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7688259>.
- Chen, Jack S.K., and Kapil Mehta. 1999. "Tissue Transglutaminase: An Enzyme with a Split Personality." *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(99\)00045-X](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(99)00045-X).
- Chen, Jing, Zhiguo Zhang, and Lu Cai. 2014. "Diabetic Cardiomyopathy and Its Prevention by Nrf2: Current Status." *Diabetes and Metabolism Journal*. <https://doi.org/10.4093/dmj.2014.38.5.337>.
- Chiambaretta, Frédéric, Loïc Blanchon, Bénédicte Rabier, Winston W-Y Kao, Janice J Liu, Bernard Dastugue, Danièle Rigal, and Vincent Sapin. 2002. "Regulation of Corneal Keratin-12 Gene Expression by the Human Krüppel-like Transcription Factor 6." *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 43 (11): 3422–29. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12407152>.
- Choi, Hye-Ryung. 2015. "Niche Interactions in Epidermal Stem Cells." *World Journal of Stem Cells* 7 (2): 495. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v7.i2.495>.
- Chwa, Marilyn, Shari R. Atilano, Dieter Hertzog, Hong Zheng, Jonathan Langberg, Dae W. Kim, and M. Cristina Kenney. 2008. "Hypersensitive Response to Oxidative Stress in Keratoconus Corneal Fibroblasts." *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 49 (10): 4361–69. <https://doi.org/10.1167/iovs.08-1969>.
- Clewes, Oliver, Alla Narytnyk, Kevin R. Gillinder, Andrew D. Loughney, Alison P. Murdoch, and Maya Sieber-Blum. 2011. "Human Epidermal Neural Crest Stem Cells (HEPI-NCSC)-Characterization and Directed Differentiation into Osteocytes and Melanocytes." *Stem Cell Reviews and Reports* 7 (4): 799–814. <https://doi.org/10.1007/s12015-011-9255-5>.
- Collomb, Elodie. 2010. "Le Tégument Des Vertébrés et La Spécification de l' "

Épithélium Cornéen." *Http://Www.Theses.Fr*, December.
<http://www.theses.fr/s123774#>.

"Cytosquelette: Filaments Intermédiaires." n.d. Accessed October 15, 2018.

http://www8.umoncton.ca/umcm-gauthier_didier/bc4223/csq/csqpdf/csq4fin07.pdf.

Dale, Beverly A. 1977. "Purification and Characterization of a Basic Protein from the Stratum Corneum of Mammalian Epidermis." *BBA - Protein Structure* 491 (1): 193–204. [https://doi.org/10.1016/0005-2795\(77\)90055-1](https://doi.org/10.1016/0005-2795(77)90055-1).

Davanger, M., and A. Evensen. 1971. "Role of the Pericorneal Papillary Structure in Renewal of Corneal Epithelium." *Nature* 229 (5286): 560–61. <https://doi.org/10.1038/229560a0>.

Dijk, Korine Van, Vasilios S. Liarakos, Jack Parker, Lisanne Ham, Jessica T. Lie, Esther A. Groeneveld-Van Beek, and Gerrit R J Melles. 2015. "Bowman Layer Transplantation to Reduce and Stabilize Progressive, Advanced Keratoconus." *Ophthalmology* 122 (5): 909–17. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2014.12.005>.

Djian, Philippe, Karen Easley, and Howard Green. 2000. "Targeted Ablation of the Murine Involucrin Gene." *Journal of Cell Biology* 151 (2): 381–87. <https://doi.org/10.1083/jcb.151.2.381>.

Dua, Harminder S., and John V. Forrester. 1990. "The Corneoscleral Limbus in Human Corneal Epithelial Wound Healing." *American Journal of Ophthalmology* 110 (6): 646–56. [https://doi.org/10.1016/S0002-9394\(14\)77062-X](https://doi.org/10.1016/S0002-9394(14)77062-X).

Dubé, Jean, Jean Michel Bourget, Robert Gauvin, Hugues Lafrance, Charles J. Roberge, François A. Auger, and Lucie Germain. 2014. "Progress in Developing a Living Human Tissue-Engineered Tri-Leaflet Heart Valve Assembled from Tissue Produced by the Self-Assembly Approach." *Acta Biomaterialia* 10 (8): 3563–70. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.04.033>.

Dudakova, Lubica, Petra Liskova, Tomas Trojek, Michalis Palos, Sarka Kalasova, and Katerina Jirsova. 2012. "Changes in Lysyl Oxidase (LOX) Distribution and Its Decreased Activity in Keratoconus Corneas." *Experimental Eye Research* 104 (November): 74–81. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2012.09.005>.

Dudakova, Lubica, Takako Sasaki, Petra Liskova, Michalis Palos, and Katerina Jirsova. 2016. "The Presence of Lysyl Oxidase-like Enzymes in Human Control and Keratoconic Corneas." *Histology and Histopathology* 31 (1): 63–71. <https://doi.org/10.14670/HH-11-649>.

Dziasko, Marc A., and Julie T. Daniels. 2016. "Anatomical Features and Cell-Cell Interactions in the Human Limbal Epithelial Stem Cell Niche." *Ocular Surface*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.jtos.2016.04.002>.

Ebato, B, J Friend, and R A Thoft. 1987. "Comparison of Central and Peripheral Human Corneal Epithelium in Tissue Culture." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 28 (9): 1450–56. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3623831>.

Eckert, Richard L, James F Crish, Tatiana Efimova, Shervin R Dashti, Anne Deucher, Frederic Bone, Gautam Adhikary, Guosheng Huang, Ramamurthy

- Gopalakrishnan, and Sivaprakasam Balasubramanian. 2004. "Regulation of Involucrin Gene Expression." *Journal of Investigative Dermatology*. Elsevier. <https://doi.org/10.1111/j.0022-202X.2004.22723.x>.
- Efron, Nathan, and Joanna G Hollingsworth. 2008. "New Perspectives on Keratoconus as Revealed by Corneal Confocal Microscopy: Invited Review." *Clinical and Experimental Optometry* 91 (1): 34–55. <https://doi.org/10.1111/j.1444-0938.2007.00195.x>.
- El-Agha, Mohamed Sameh H, Yasmine M. El Sayed, Rana M. Harhara, and Hamdy M. Essam. 2014. "Correlation of Corneal Endothelial Changes with Different Stages of Keratoconus." *Cornea* 33 (7): 707–11. <https://doi.org/10.1097/ICO.0000000000000134>.
- Erie, Jay C, Sanjay V Patel, Jay W McLaren, Cherie B Nau, David O Hodge, and William M Bourne. 2002. "Keratocyte Density in Keratoconus. A Confocal Microscopy Study." *American Journal of Ophthalmology* 134 (5): 689–95. [https://doi.org/10.1016/S0002-9394\(02\)01698-7](https://doi.org/10.1016/S0002-9394(02)01698-7).
- Esposito, Carla, and Ivana Caputo. 2005. "Mammalian Transglutaminases: Identification of Substrates as a Key to Physiological Function and Physiopathological Relevance." *FEBS Journal*. Wiley/Blackwell (10.1111). <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2004.04476.x>.
- Ferraris, C, G Chevalier, B Favier, C A Jahoda, and D Dhouailly. 2000. "Adult Corneal Epithelium Basal Cells Possess the Capacity to Activate Epidermal, Pilosebaceous and Sweat Gland Genetic Programs in Response to Embryonic Dermal Stimuli." *Development* 127 (24): 5487–95. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11076768>.
- fine Olivarius, F de, H C Wulf, J Crosby, and M Norval. 1996. "The Sunscreening Effect of Urocanic Acid." *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine* 12 (3): 95–99. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0781.1996.tb00183.x>.
- Fini, M Elizabeth. 1999. "Keratocyte and Fibroblast Phenotypes in the Repairing Cornea." *Progress in Retinal and Eye Research*. [https://doi.org/10.1016/S1350-9462\(98\)00033-0](https://doi.org/10.1016/S1350-9462(98)00033-0).
- Fink, Barbara A, Loraine T Sinnott, Heidi Wagner, Chad Friedman, and Karla Zadnik. 2010. "The Influence of Gender and Hormone Status on the Severity and Progression of Keratoconus." *Cornea* 29 (1): 65–72. <https://doi.org/10.1097/ICO.0b013e3181ac0518>.
- Fitch, John, M. Elizabeth Fini, David C. Beebe, and Thomas F. Linsenmayer. 1998. "Collagen Type IX and Developmentally Regulated Swelling of the Avian Primary Corneal Stroma." *Developmental Dynamics* 212 (1): 27–37. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0177\(199805\)212:1<27::AID-AJA3>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0177(199805)212:1<27::AID-AJA3>3.0.CO;2-4).
- Fitoussi, Richard, Katell Vie, Éric Mathieu, Éric Gooris, and Joseph Hemmerlé. 2011. "TEM Assessments of the Restructuring Effects of an Emollient Cream on the ≪l≫Stratum Corneum≪/l≫." *Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications* 01 (04): 125–32.

<https://doi.org/10.4236/jcdsa.2011.14019>.

- Flaxman, Seth R, Rupert R.A. Bourne, Serge Resnikoff, Peter Ackland, Tasanee Braithwaite, Maria Vittoria Cicinelli, Aditi Das, et al. 2017. "Global Causes of Blindness and Distance Vision Impairment 1990–2020: A Systematic Review and Meta-Analysis." *The Lancet Global Health* 5 (12): e1221–34. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(17\)30393-5](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(17)30393-5).
- Fournié, P., D. Touboul, J. L. Arné, and F. Malecaze. 2013. "Kératocône." *Journal Français d'Ophthalmologie*. <https://doi.org/10.1016/j.jfo.2013.05.004>.
- Fukuchi, Takeo, Beatrice Y.J.T. Yue, Joel Sugar, and Sheridan Lam. 1994a. "Lysosomal Enzyme Activities in Conjunctival Tissues of Patients With Keratoconus." *Archives of Ophthalmology* 112 (10): 1368–74. <https://doi.org/10.1001/archophth.1994.01090220118033>.
- Furuse, Mikio, Masaki Hata, Kyoko Furuse, Yoko Yoshida, Akinori Haratake, Yoshinobu Sugitani, Tetsuo Noda, Akiharu Kubo, and Shoichiro Tsukita. 2002. "Claudin-Based Tight Junctions Are Crucial for the Mammalian Epidermal Barrier: A Lesson from Claudin-1-Deficient Mice." *Journal of Cell Biology* 156 (6): 1099–1111. <https://doi.org/10.1083/jcb.200110122>.
- Garreis, Fabian, Janine Jahn, Katharina Wild, Daniel B. Abrar, Martin Schicht, Jens Michael Schröder, and Friedrich Paulsen. 2017. "Expression and Regulation of S100 Fused-Type Protein Hornerin at the Ocular Surface and Lacrimal Apparatus." *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 58 (13): 5968–77. <https://doi.org/10.1167/iovs.17-22637>.
- Gatinel, Damien. 2016. "Eye Rubbing, a Sine Qua Non for Keratoconus?" *Int J Kerat Ect Cor Dis* 5 (1): 6–12. <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10025-1114>.
- Georgiou, T, C L Funnell, A Cassels-Brown, and R O'Connor. 2004. "Influence of Ethnic Origin on the Incidence of Keratoconus and Associated Atopic Disease in Asians and White Patients." *Eye* 18 (4): 379–83. <https://doi.org/10.1038/sj.eye.6700652>.
- Germain, Lucie, François A. Auger, Eric Grandbois, Rina Guignard, Marcelle Giasson, Hélène Boisjoly, and Sylvain L. Guérin. 1999. "Reconstructed Human Cornea Produced in Vitro by Tissue Engineering." *Pathobiology* 67 (3): 140–47. <https://doi.org/10.1159/000028064>.
- Ghazizadeh, Soosan, and Lorne B. Taichman. 2001. "Multiple Classes of Stem Cells in Cutaneous Epithelium: A Lineage Analysis of Adult Mouse Skin." *EMBO Journal* 20 (6): 1215–22. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.6.1215>.
- Ghosh, Somnath, Haliza Abdul Mutalib, Sharanjeet Kaur, Rituparna Ghoshal, and Shamala Retnasabapathy. 2017. "Corneal Cell Morphology in Keratoconus: A Confocal Microscopic Observation." *Malaysian Journal of Medical Sciences* 24 (2): 44–54. <https://doi.org/10.21315/mjms2017.24.2.6>.
- Gola, Monika, Rafał Czajkowski, Anna Bajek, Aleksander Dura, and Tomasz Drewa. 2012. "Melanocyte Stem Cells: Biology and Current Aspects." *Medical Science Monitor* 18 (10): RA155-RA159. <https://doi.org/10.12659/MSM.883475>.

- Goldberg, Morton F, and Anthony J Bron. 1982. "Limbal Palisades of Vogt." *Transactions of the American Ophthalmological Society* 80: 155–71. <https://doi.org/D - NLM: PMC1312261 EDAT- 1982/01/01 MHDA- 1982/01/01 00:01 CRDT- 1982/01/01 00:00 PST - ppublish>.
- Goldschmit, P, V Borderie, O Touzeau, T Gaujoux, L Laroche, I Goemaere, and J Rault. 2011. "Anatomie de La Cornée." Edited by EM Consulte. *Ophthalmologie* 8 (3): 1–16. [https://doi.org/10.1016/S0246-0343\(11\)44155-1](https://doi.org/10.1016/S0246-0343(11)44155-1).
- Gonzalez, Gabriel, Yuzuru Sasamoto, Bruce R Ksander, Markus H. Frank, and Natasha Y Frank. 2018. "Limbal Stem Cells: Identity, Developmental Origin, and Therapeutic Potential." *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*. <https://doi.org/10.1002/wdev.303>.
- Gonzalez, Victor, and Peter J McDonnell. 1992. "Computer-Assisted Corneal Topography in Parents of Patients with Keratoconus." *Archives of Ophthalmology* 110 (10): 1412–14. <https://doi.org/10.1001/archopht.1992.01080220074024>.
- Gore, D M, A J Shortt, and B D Allan. 2013. "New Clinical Pathways for Keratoconus." *Eye (Basingstoke)*. <https://doi.org/10.1038/eye.2012.257>.
- Gorskova, E N, and E N Sevost'ianov. 1998. "[Epidemiology of Keratoconus in the Urals]." *Vestnik Oftalmologii* 114 (4): 38–40. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9771088>.
- Greene, Carol Ann, Charisse Kuo, and Trevor Sherwin. 2017. "Aberrant Patterns of Key Epithelial Basement Membrane Components in Keratoconus." *Cornea* 36 (12): 1549–55. <https://doi.org/10.1097/ICO.0000000000001393>.
- Grosse, Brigitte, Doris Cassio, Nadya Yousef, Céline Bernardo, Emmanuel Jacquemin, and Emmanuel Gonzales. 2012. "Claudin-1 Involved in Neonatal Ichthyosis Sclerosing Cholangitis Syndrome Regulates Hepatic Paracellular Permeability." *Hepatology* 55 (4): 1249–59. <https://doi.org/10.1002/hep.24761>.
- Grosvenor, Theodore, and David A Goss. 1998. "Role of the Cornea in Emmetropia and Myopia." *Optometry and Vision Science*. <https://doi.org/10.1097/00006324-199802000-00017>.
- Guan, Tao, Chibo Liu, Zhangwei Ma, and Shiping Ding. 2012. "The Point Mutation and Polymorphism in Keratoconus Candidate Gene TGFBI in Chinese Population." *Gene* 503 (1): 137–39. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.04.061>.
- Güell, José L., Merce Morral, Francois Malecaze, Oscar Gris, Daniel Elies, and Felicidad Manero. 2012. "Collagen Crosslinking and Toric Iris-Claw Phakic Intraocular Lens for Myopic Astigmatism in Progressive Mild to Moderate Keratoconus." *Journal of Cataract and Refractive Surgery* 38 (3): 475–84. <https://doi.org/10.1016/j.jcrs.2011.10.031>.
- Guo, Zhi Hou, Wei Zhang, Yang Yan Sheng Jia, Qing Xiu Liu, Zhao Fa Li, and Jun Sheng Lin. 2018. "An Insight into the Difficulties in the Discovery of Specific Biomarkers of Limbal Stem Cells." *International Journal of Molecular Sciences*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute.

<https://doi.org/10.3390/ijms19071982>.

Guzman Strong, Cristina de, Philip W Wertz, Chenwei Wang, Fan Yang, Paul S Meltzer, Thomas Andl, Sarah E Millar, I-Cheng Ho, Sung-Yun Pai, and Julia A Segre. 2006. "The Ethics of Capital Punishment5-7." *The Journal of Cell Biology* 175 (4): 661–70. <https://doi.org/10.1083/jcb.200605057>.

Halder, Georg, Patrick Callaerts, and Walter J Gehring. 1995. "New Perspectives on Eye Evolution." *Current Opinion in Genetics and Development* 5 (5): 602–9. [https://doi.org/10.1016/0959-437X\(95\)80029-8](https://doi.org/10.1016/0959-437X(95)80029-8).

Hammerstein, W. 1974. "[Genetics of Conical Cornea (Author's Transl)]." *Albrecht von Graefes Archiv Fur Klinische Und Experimentelle Ophthalmologie. Albrecht von Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology* 190 (4): 293–308. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4547927>.

Hamrah, Pedram, SO Huq, Ying Liu, Qiang Zhang, and M Reza Dana. 2003. "Corneal Immunity Is Mediated by Heterogeneous Population of Antigen-Presenting Cells." *Journal of Leukocyte Biology* 74 (2): 172–78. <https://doi.org/10.1189/jlb.1102544>.

Hansmann, Britta, Kerstin Ahrens, Zhihong Wu, Ehrhardt Proksch, Ulf Meyer-Hoffert, and Jens Michael Schröder. 2012. "Murine Filaggrin-2 Is Involved in Epithelial Barrier Function and down-Regulated in Metabolically Induced Skin Barrier Dysfunction." *Experimental Dermatology* 21 (4): 271–76. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2012.01449.x>.

Hao, Xiao Dan, Peng Chen, Zhao Li Chen, Su Xia Li, and Ye Wang. 2015. "Evaluating the Association between Keratoconus and Reported Genetic Loci in a Han Chinese Population." *Ophthalmic Genetics* 36 (2): 132–36. <https://doi.org/10.3109/13816810.2015.1005317>.

Hao, Xiao Dan, Peng Chen, Yang Yang Zhang, Su Xia Li, Wei Yun Shi, and Hua Gao. 2017. "De Novo Mutations of TUBA3D Are Associated with Keratoconus." *Scientific Reports* 7 (1): 13570. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13162-0>.

Harding, Clive R, and Anthony V Rawlings. n.d. "Effects of Natural Moisturizing Factor and Lactic Acid Isomers on Skin Function." In . Accessed October 11, 2018. <https://pdfs.semanticscholar.org/0413/dcb1253080a674d4320b05b9a026b3d42008.pdf>.

Hasanian-Langroudi, Farzaneh, Ramin Saravani, Mohammad Hosein Validad, Gholamreza Bahari, and Davood Yari. 2015. "Association of Lysyl Oxidase (LOX) Polymorphisms with the Risk of Keratoconus in an Iranian Population." *Ophthalmic Genetics* 36 (4): 309–14. <https://doi.org/10.3109/13816810.2014.881507>.

Hay, Elizabeth D. 1980. "Development of the Vertebrate Cornea." *International Review of Cytology* 63 (C): 263–322. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)61760-X](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)61760-X).

He, Xining, Paul Hahn, Jared Iacovelli, Robert Wong, Chih King, Robert Bhisitkul,

- Mina Massaro-Giordano, and Joshua L. Dunaief. 2007. "Iron Homeostasis and Toxicity in Retinal Degeneration." *Progress in Retinal and Eye Research*. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2007.07.004>.
- Henry, Julie, Chiung-Yueh Hsu, Marek Haftek, Rachida Nachat, Heleen D. de Koning, Isabelle Gardinal-Galera, Kiyotaka Hitomi, et al. 2011. "Hornerin Is a Component of the Epidermal Cornified Cell Envelopes." *The FASEB Journal* 25 (5): 1567–76. <https://doi.org/10.1096/fj.10-168658>.
- Henry, Julie, Eve Toulza, Chiung-Yueh Hsu, Laurence Pellerin, Stefana Balica, Juliette Mazereeuw-Hautier, Carle Paul, Guy Serre, Nathalie Jonca, and Michel Simon. 2012. "Update on the Epidermal Differentiation Complex." *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)* 17 (January): 1517–32. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22201818>.
- Hogan, Michael John, Jorge A. Alvarado, and Joan Esperson Weddell. 1971. *Histology of the Human Eye; an Atlas and Textbook*. Philadelphia: Saunders. <http://www.worldcat.org/title/histology-of-the-human-eye-an-atlas-and-textbook/oclc/162669>.
- Hohl, D. 1990. "[A New Star in the Heavens of Epidermal Proteins: Loricrin--What Is It?]." *Hautarzt* 41 (0017–8470 (Print)): 299–301. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1696249>.
- Hohl, D, T Mehrel, U Lichti, M L Turner, D R Roop, and P M Steinert. 1991. "Characterization of Human Loricrin. Structure and Function of a New Class of Epidermal Cell Envelope Proteins." *The Journal of Biological Chemistry* 266 (10): 6626–36. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2007607>.
- Hohl, Daniel, T Mehrel, U Lichti, M L Turner, Dennis R Roop, and P M Steinert. 1991. "Characterization of Human Loricrin. Structure and Function of a New Class of Epidermal Cell Envelope Proteins." *The Journal of Biological Chemistry* 266 (10): 6626–36. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2007607>.
- Hollingsworth, Jo, Inma Perez-Gomez, Haliza Abdul Mutalib, and Nathan Efron. 2001. "A Population Study of the Normal Cornea Using an in Vivo, Slit-Scanning Confocal Microscope." *Optometry and Vision Science* 78 (10): 706–11. <https://doi.org/10.1097/00006324-200110000-00010>.
- Homberg, Melanie, and Thomas M. Magin. 2014. "Beyond Expectations: Novel Insights into Epidermal Keratin Function and Regulation." *International Review of Cell and Molecular Biology* 311: 265–306. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800179-0.00007-6>.
- Hoogewoud, Florence, Zisis Gatzoufas, and Farhad Hafezi. 2013. "Transitory Topographical Variations in Keratoconus During Pregnancy." *Journal of Refractive Surgery* 29 (2): 144–46. <https://doi.org/10.3928/1081597X-20130117-11>.
- Hsu, Chiung Yueh, Julie Henry, Anne Aurélie Raymond, Marie Claire Méchin, Valérie Pendaries, Dany Nassar, Britta Hansmann, et al. 2011. "Deimination of Human Filaggrin-2 Promotes Its Proteolysis by Calpain." *Journal of Biological Chemistry* 286 (26): 23222–33. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.197400>.

- Hsu, Ya Chieh, Lishi Li, and Elaine Fuchs. 2014. "Emerging Interactions between Skin Stem Cells and Their Niches." *Nature Medicine*. NIH Public Access. <https://doi.org/10.1038/nm.3643>.
- Huber, O. 2003. "Structure and Function of Desmosomal Proteins and Their Role in Development and Disease." *Cellular and Molecular Life Sciences*. <https://doi.org/10.1007/s00018-003-3050-7>.
- Hynes, Richard O. 2009. "The Extracellular Matrix: Not Just Pretty Fibrils." *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1176009>.
- Ihalainen, A. 1986. "Clinical and Epidemiological Features of Keratoconus Genetic and External Factors in the Pathogenesis of the Disease." *Acta Ophthalmol Suppl.* 178: 1–64. <https://doi.org/10.1111/j.1755-3768.1986.tb03091.x>.
- Imanishi, Jiro, Kenji Kamiyama, Ikuo Iguchi, Masakazu Kita, Chie Sotozono, and Shigeru Kinoshita. 2000. "Growth Factors: Importance in Wound Healing and Maintenance of Transparency of the Cornea." *Progress in Retinal and Eye Research* 19 (1): 113–29. [https://doi.org/10.1016/S1350-9462\(99\)00007-5](https://doi.org/10.1016/S1350-9462(99)00007-5).
- Imokawa, Genji., Hiroshi. Kuno, and Michio. Kawai. 1991. "Stratum Corneum Lipids Serve as a Bound-Water Modulator." *The Journal of Investigative Dermatology*. Elsevier. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12474562>.
- "Index of Dr.Jastrow's Electron Microscopic Atlas." n.d. Accessed October 3, 2018. <http://www.drjastrow.de/WAI/EM/EMAtlas.html>.
- Ionescu, Catalina, Catalina Gabriela Corbu, Cristiana Tanase, Christian Jonescu-Cuyper, Cristina Nicula, Dana Dascalescu, Miruna Cristea, and Liliana Mary Voinea. 2016. "Inflammatory Biomarkers Profile as Microenvironmental Expression in Keratoconus." *Disease Markers*. Hindawi. <https://doi.org/10.1155/2016/1243819>.
- Iovieno, Alfonso, Marie Eve Légaré, Daniel B. Rootman, Sonia N. Yeung, Peter Kim, and David S. Rootman. 2011. "Intracorneal Ring Segments Implantation Followed By Same-Day Photorefractive Keratectomy and Corneal Collagen Cross-Linking in Keratoconus." *Journal of Refractive Surgery* 27 (12): 915–18. <https://doi.org/10.3928/1081597X-20111103-03>.
- Iqbal, Omer, George Fisher, Samir Vira, Daneyal Syed, Nasir Sadeghi, David Freeman, Edward Campbell, et al. 2013. "Increased Expression of Secreted Frizzled-Related Protein-1 and Microtubule-Associated Protein Light Chain 3 in Keratoconus." *Cornea*. <https://doi.org/10.1097/ICO.0b013e318282987a>.
- Irvine, A D, C M Coleman, F. J.D. Smith, W. H.I. McLean, J E Moore, O Swensson, S J Morgan, J H McCarthy, and G. C.M. Black. 2002. "A Novel Mutation in KRT12 Associated with Meesmann's Epithelial Corneal Dystrophy." *British Journal of Ophthalmology* 86 (7): 729–32. <https://doi.org/10.1136/bjo.86.7.729>.
- Ishida-Yamamoto, Akemi, Tonja Kartasova, Shinobu Matsuo, Toshio Kuroki, and Hajime Iizuka. 1997. "Involucrin and SPRR Are Synthesized Sequentially in Differentiating Cultured Epidermal Cells." *Journal of Investigative Dermatology* 108 (1): 12–16. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12285611>.

- Iwamoto, Takeo, and A. Gerard Devoe. 1976. "Electron Microscopical Study of the Fleischer Ring." *Archives of Ophthalmology* 94 (9): 1579–84. <https://doi.org/10.1001/archopht.1976.03910040409017>.
- Jang, Shyh I., and Peter M. Steinert. 2002a. "Loricrin Expression in Cultured Human Keratinocytes Is Controlled by a Complex Interplay between Transcription Factors of the Sp1, CREB, AP1, and AP2 Families." *Journal of Biological Chemistry* 277 (44): 42268–79. <https://doi.org/10.1074/jbc.M205593200>.
- Jonas, Jost B., Vinay Nangia, Arshia Matin, Maithili Kulkarni, and Krishna Bhojwani. 2009a. "Prevalence and Associations of Keratoconus in Rural Maharashtra in Central India: The Central India Eye and Medical Study." *American Journal of Ophthalmology* 148 (5): 760–65. <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2009.06.024>.
- Jonca N, Caubet C, Guerrin M, Simon M, Serre G. 2009. "Corneodesmosomal Proteins." *Skin Moisturization* 2nd editio (Rawlings AV, Leyden JJ Ed, Informa Healthcare): 99–122. <https://www.google.fr/search?ei=-jDHW9XIMafYgAbOhbL4Dw&q=Jonca+N%2C+Caubet+C%2C+Guerrin+M%2C+Simon+M%2C+Serre+G.+Corneodesmosomal+proteins.+In+Skin+Moisturization+2nd+edition%2C+Rawlings+AV%2C+Leyden+JJ+Ed%2C+Informa+Healthcare%2C+NEW+YORK%2C+pp+99-122%2C>.
- Jonca, Nathalie, Cecile Caubet, Marina Guerrin, Michel Simon, and Guy Serre. 2010. "Corneodesmosin: Structure, Function and Involvement in Pathophysiology~!2009-11-06~!2009-12-21~!2010-04-23~!" *The Open Dermatology Journal* 4: 36–45. <https://doi.org/10.2174/1874372201004020036>.
- Jonca, Nathalie, Emilie A Leclerc, Cécile Caubet, Michel Simon, Marina Guerrin, and Guy Serre. 2011. "Corneodesmosomes and Corneodesmosin: From the Stratum Corneum Cohesion to the Pathophysiology of Genodermatoses." *European Journal of Dermatology*. <https://doi.org/10.1684/ejd.2011.1264>.
- Jongebloed, W L, and J F.G. Worst. 1987. "The Keratoconus Epithelium Studied by SEM." *Documenta Ophthalmologica* 67 (1–2): 171–81. <https://doi.org/10.1007/BF00142711>.
- Joseph, R., O. P. Srivastava, and R. R. Pfister. 2011. "Differential Epithelial and Stromal Protein Profiles in Keratoconus and Normal Human Corneas." *Experimental Eye Research* 92 (4): 282–98. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2011.01.008>.
- Joseph, Roy, Om P. Srivastava, and Roswell R. Pfister. 2012a. "Downregulation of β -Actin Gene and Human Antigen R in Human Keratoconus." *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 53 (7): 4032–41. <https://doi.org/10.1167/iovs.11-9062>.
- Joyce, Nancy C. 2005. "Cell Cycle Status in Human Corneal Endothelium." *Experimental Eye Research*. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2005.06.012>.
- Jurkiewicz, Tristan, and Anne Sophie Marty. 2017. "Prise En Charge Des Patients Atteints de Kératocône En 2017." *Revue Francophone d'Orthoptie* 10 (2): 65–70. <https://doi.org/10.1016/j.rfo.2017.07.004>.

- Kalinin, Andrey E., Andrey V. Kajava, and Peter M. Steinert. 2002. "Epithelial Barrier Function: Assembly and Structural Features of the Cornified Cell Envelope." *BioEssays*. <https://doi.org/10.1002/bies.10144>.
- Kalinin, Andrey, Lyuben N Marekov, and Peter M Steinert. 2001. "Assembly of the Epidermal Cornified Cell Envelope." *Journal of Cell Science* 114: 3069–70. <http://jcs.biologists.org>.
- Kanellopoulos, A John, and Perry S Binder. 2007. "Collagen Cross-Linking (CCL) with Sequential Topography-Guided PRK: A Temporizing Alternative for Keratoconus to Penetrating Keratoplasty." *Cornea* 26 (7): 891–95. <https://doi.org/10.1097/ICO.0b013e318074e424>.
- Kanellopoulos, Anastasios J., and George Asimellis. 2014. "OCT-Derived Comparison of Corneal Thickness Distribution and Asymmetry Differences between Normal and Keratoconic Eyes." *Cornea* 33 (12): 1274–81. <https://doi.org/10.1097/ICO.0000000000000275>.
- Kanellopoulos, Anastasios John. 2009. "Comparison of Sequential vs Same-Day Simultaneous Collagen Cross-Linking and Topography-Guided PRK for Treatment of Keratoconus." *Journal of Refractive Surgery* 25 (9): S812–18. <https://doi.org/10.3928/1081597X-20090813-10>.
- Kanellopoulos, Anastasios John, Ioannis M. Aslanides, and George Asimellis. 2012. "Correlation between Epithelial Thickness in Normal Corneas, Untreated Ectatic Corneas, and Ectatic Corneas Previously Treated with CXL; Is Overall Epithelial Thickness a Very Early Ectasia Prognostic Factor?" *Clinical Ophthalmology* 6 (1): 789–800. <https://doi.org/10.2147/OPHTH.S31524>.
- Karimian, Farid, Shiela Aramesh, Hossein Mohammad Rabei, Mohammad Ali Javadi, and Nasrin Rafati. 2008. "Topographic Evaluation of Relatives of Patients with Keratoconus." *Cornea* 27 (8): 874–78. <https://doi.org/10.1097/ICO.0b013e31816f5edc>.
- Kasper, M, R Moll, P Stosiek, and U Karsten. 1988. "Patterns of Cytokeratin and Vimentin Expression in the Human Eye." *Histochemistry* 89 (4): 369–77. <https://doi.org/10.1007/BF00500639>.
- Kaufman, P. L., Levin, L. A., Adler, F. H., & Alm, A. 2011. *Adler's Physiology of the Eye. Elsevier Health Sciences*.
- Kennedy, Robert H, William M Bourne, and John A Dyer. 1986. "A 48-Year Clinical and Epidemiologic Study of Keratoconus." *American Journal of Ophthalmology* 101 (3): 267–73. [https://doi.org/10.1016/0002-9394\(86\)90817-2](https://doi.org/10.1016/0002-9394(86)90817-2).
- Kenney, M. Cristina, Marilyn Chwa, Shari R. Atilano, Annie Tran, Marilee Carballo, Mehrnoosh Saghizadeh, Vasilis Vasiliou, Wakako Adachi, and Donald J. Brown. 2005a. "Increased Levels of Catalase and Cathepsin V/L2 but Decreased TIMP-1 in Keratoconus Corneas: Evidence That Oxidative Stress Plays a Role in This Disorder." *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 46 (3): 823–32. <https://doi.org/10.1167/iovs.04-0549>.
- Kenney, M C, M Chwa, A I. Opbroek, and D J Brown. 1994. "Increased Gelatinolytic

- Activity in Keratoconus Keratocyte Cultures: A Correlation to an Altered Matrix Metalloproteinase-2/Tissue Inhibitor of Metalloproteinase Ratio." *Cornea* 13 (2): 114–24. <https://doi.org/10.1097/00003226-199403000-00003>.
- Khaled, Mariam Lofty, Yelena Bykhovskaya, Sarah E.R. Yablonski, Hanzhou Li, Michelle D. Drewry, Inas F. Aboobakar, Amy Estes, et al. 2018. "Differential Expression of Coding and Long Noncoding Rnas in Keratoconus-Affected Corneas." *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 59 (7): 2717–28. <https://doi.org/10.1167/iovs.18-24267>.
- Kim, Byung Eui, Donald Y M Leung, Mark Boguniewicz, and Michael D Howell. 2008. "Loricrin and Involucrin Expression Is Down-Regulated by Th2 Cytokines through STAT-6." *Clinical Immunology* 126 (3): 332–37. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2007.11.006>.
- Kim, Sun Woong, Kyoung Yul Seo, Taiyoun Rhim, and Eung Kweon Kim. 2012. "Effect of Retinoic Acid on Epithelial Differentiation and Mucin Expression in Primary Human Corneal Limbal Epithelial Cells." *Current Eye Research* 37 (1): 33–42. <https://doi.org/10.3109/02713683.2011.620728>.
- Kim, Woo Jung, Yaron S. Rabinowitz, David M. Meisler, and Steven E. Wilson. 1999. "Keratocyte Apoptosis Associated with Keratoconus." *Experimental Eye Research* 69 (5): 475–81. <https://doi.org/10.1006/exer.1999.0719>.
- Kirschner, Nina, and Johanna M. Brandner. 2012. "Barriers and More: Functions of Tight Junction Proteins in the Skin." *Annals of the New York Academy of Sciences*. Wiley/Blackwell (10.1111). <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2012.06554.x>.
- Klechevsky, Eynav, Rimpei Morita, Maochang Liu, Yanying Cao, Sebastien Coquery, Lu Ann Thompson-Snipes, Francine Briere, et al. 2008. "Functional Specializations of Human Epidermal Langerhans Cells and CD14+Dermal Dendritic Cells." *Immunity* 29 (3): 497–510. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.07.013>.
- Klionsky, Daniel J, Fabio C Abdalla, Hagai Abeliovich, Robert T Abraham, Abraham Acevedo-Arozena, Khosrow Adeli, Lotta Agholme, et al. 2012. "Guidelines for the Use and Interpretation of Assays for Monitoring Autophagy." *Autophagy* 8 (4): 445–544. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22966490>.
- Klyce, S. D. 1972. "Electrical Profiles in the Corneal Epithelium." *The Journal of Physiology* 226 (2): 407–29. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1972.sp009991>.
- Koch, Peter J, Pierre A. De Viragh, Elisabeth Scharer, Donnie Bundman, Mary Ann Longley, Jackie Bickenbach, Yasuhiro Kawachi, et al. 2000. "Lessons from Loricrin-Deficient Mice: Compensatory Mechanisms Maintaining Skin Barrier Function in the Absence of a Major Cornified Envelope Protein." *Journal of Cell Biology* 151 (2): 389–400. <https://doi.org/10.1083/jcb.151.2.389>.
- Koob, Thomas J, John J Jeffrey, Arthur Z Eisen, and Eugene A Bauer. 1980. "Hormonal Interactions in Mammalian Collagenase Regulation. Comparative Studies in Human Skin and Rat Uterus." *BBA - General Subjects* 629 (1): 13–23. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(80\)90260-3](https://doi.org/10.1016/0304-4165(80)90260-3).

- Kriszt, Ágnes, Gergely Losonczy, András Berta, György Vereb, and Lili Takács. 2014. "Segregation Analysis Suggests That Keratoconus Is a Complex Non-Mendelian Disease." *Acta Ophthalmologica* 92 (7): e562–68. <https://doi.org/10.1111/aos.12389>.
- Kruse, F E, J J.Y. Chen, R J.F. Tsai, and S C.G. Tseng. 1990. "Conjunctival Transdifferentiation Is Due to the Incomplete Removal of Limbal Basal Epithelium." *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 31 (9): 1903–13. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2211036>.
- Ksander, Bruce R., Paraskevi E. Kolovou, Brian J. Wilson, Karim R. Saab, Qin Guo, Jie Ma, Sean P. McGuire, et al. 2014. "ABCB5 Is a Limbal Stem Cell Gene Required for Corneal Development and Repair." *Nature* 511 (7509): 353–57. <https://doi.org/10.1038/nature13426>.
- Kumar, Sandeep, Pascal Dollé, Norbert B. Ghyselinck, and Gregg Duester. 2017. "Endogenous Retinoic Acid Signaling Is Required for Maintenance and Regeneration of Cornea." *Experimental Eye Research* 154 (January): 190–95. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2016.11.009>.
- Kurpakus-Wheater, Michelle, Karen A Kernacki, and Linda D Hazlett. 2001. "Maintaining Corneal Integrity How the 'Window' Stays Clear." *Progress in Histochemistry and Cytochemistry* 36 (3): 179–259. [https://doi.org/10.1016/S0079-6336\(01\)80003-6](https://doi.org/10.1016/S0079-6336(01)80003-6).
- Kypriotou, Magdalini, Marcel Huber, and Daniel Hohl. 2012. "The Human Epidermal Differentiation Complex: Cornified Envelope Precursors, S100 Proteins and the 'fused Genes' Family." *Experimental Dermatology*. Wiley/Blackwell (10.1111). <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2012.01472.x>.
- Labiris, Georgios, Athanassios Giarmoukakis, Haris Sideroudi, Maria Gkika, Michael Fanariotis, and Vassilios Kozobolis. 2012. "Impact of Keratoconus, Cross-Linking and Cross-Linking Combined with Photorefractive Keratectomy on Self-Reported Quality of Life." *Cornea* 31 (7): 734–39. <https://doi.org/10.1097/ICO.0b013e31823cbe85>.
- Lamy, Ricardo, Camila F. Netto, Ricardo G. Reis, Bruno Procopio, Travis C. Porco, Jay M. Stewart, Adalmir M. Dantas, and Haroldo V. Moraes. 2013. "Effects of Corneal Cross-Linking on Contrast Sensitivity, Visual Acuity, and Corneal Topography in Patients with Keratoconus." *Cornea* 32 (5): 591–96. <https://doi.org/10.1097/ICO.0b013e31826672e2>.
- Lang, Deborah, Joseph B. Mascarenhas, and Christopher R. Shea. 2013. "Melanocytes, Melanocyte Stem Cells, and Melanoma Stem Cells." *Clinics in Dermatology* 31 (2): 166–78. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2012.08.014>.
- Lapp, Thabo, Claudia Auw-Haedrich, Thomas Reinhard, Rhiannon Evans, Elke Rodríguez, Stephan Weidinger, and Thilo Jakob. 2014. "Analysis of Filaggrin Mutations and Expression in Corneal Specimens from Patients with or without Atopic Dermatitis." *International Archives of Allergy and Immunology* 163 (1): 20–24. <https://doi.org/10.1159/000355965>.
- Lechner, Judith, Ha Ae Bae, Jasenka Guduric-Fuchs, Aine Rice, Gowthaman

- Govindarajan, Salina Siddiqui, Loyal Abi Farraj, et al. 2013. "Mutational Analysis of MIR184 in Sporadic Keratoconus and Myopia." *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 54 (8): 5266–72. <https://doi.org/10.1167/iovs.13-12035>.
- Lema, I, T Sobrino, J. A. Durán, D Brea, and E. Díez-Feijoo. 2009. "Subclinical Keratoconus and Inflammatory Molecules from Tears." *British Journal of Ophthalmology* 93 (6): 820–24. <https://doi.org/10.1136/bjo.2008.144253>.
- Lema, Isabel, David Brea, Raquel Rodríguez-González, Elío Díez-Feijoo, and Tomás Sobrino. 2010. "Proteomic Analysis of the Tear Film in Patients with Keratoconus." *Molecular Vision* 16 (October): 2055–61. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21042560>.
- Lema, Isabel, and Juan A. Durán. 2005. "Inflammatory Molecules in the Tears of Patients with Keratoconus." *Ophthalmology* 112 (4): 654–59. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2004.11.050>.
- Levine, Beth, and Guido Kroemer. 2008. "Autophagy in the Pathogenesis of Disease." *Cell* 132 (1): 27–42. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.12.018>.
- Levy-Nissenbaum, Etgar, Regina C Betz, Moshe Frydman, Michel Simon, Hadas Lahat, Tengiz Bakhan, Boleslaw Goldman, et al. 2003. "Hypotrichosis Simplex of the Scalp Is Associated with Nonsense Mutations in CDSN Encoding Corneodesmosin." *Nature Genetics* 34 (2): 151–53. <https://doi.org/10.1038/ng1163>.
- Li, Linheng, and Ting Xie. 2005. "STEM CELL NICHE: Structure and Function." *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 21 (1): 605–31. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.21.012704.131525>.
- Li, Shimin, Karina Nikulina, Jason DeVoss, Ava J. Wu, Erich C. Strauss, Mark S. Anderson, and Nancy A. McNamara. 2008. "Small Proline-Rich Protein 1B (SPRR1B) Is a Biomarker for Squamous Metaplasia in Dry Eye Disease." *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 49 (1): 34–41. <https://doi.org/10.1167/iovs.07-0685>.
- Li, Yan, Ou Tan, Robert Brass, Jack L. Weiss, and David Huang. 2012. "Corneal Epithelial Thickness Mapping by Fourier-Domain Optical Coherence Tomography in Normal and Keratoconic Eyes." *Ophthalmology* 119 (12): 2425–33. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2012.06.023>.
- Lin, Jing, Kyung Chul Yoon, Lili Zhang, Zhitao Su, Rong Lu, Ping Ma, Cintia S. de Paiva, Stephen C. Pflugfelder, and De Quan Li. 2012. "A Native-Like Corneal Construct Using Donor Corneal Stroma for Tissue Engineering." Edited by Che John Connon. *PLoS ONE* 7 (11): e49571. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049571>.
- Liochev, Stefan I, and Irwin Fridovich. 2002. "The Haber-Weiss Cycle—70 Years Later: An Alternative View." *Redox Report* 7 (1): 55–57. <https://doi.org/10.1179/135100002125000190>.
- Loh, Allison, Majda Hadziahmetovic, and Joshua L. Dunaief. 2009. "Iron Homeostasis and Eye Disease." *Biochimica et Biophysica Acta - General*

Subjects. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2008.11.001>.

Lotz, C, L Kiesewetter, F F Schmid, J Hansmann, H Walles, and F Groeber-Becker. n.d. "Replacing the Draize Eye Test: Impedance Spectroscopy as a 3R Method to Discriminate between All GHS Categories for Eye Irritation OPEN." Accessed October 22, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33118-2>.

Louvard, D. 1980. "Apical Membrane Aminopeptidase Appears at Site of Cell-Cell Contact in Cultured Kidney Epithelial Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 77 (7): 4132–36. <https://doi.org/10.1073/pnas.77.7.4132>.

Lozato, P, P Pisella, and C Baudouin. 2001. "The Lipid Layer of the Lacrimal Tear Film: Physiology and Pathology." *Journal Français d'ophtalmologie* 6 (6): 643–58. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11460063>.

Lund, Anne Sofie Kragegaard. 2012. "Expression of Filaggrin in Normal and Keratinized Conjunctiva." *The Open Ophthalmology Journal* 6 (1): 137–40. <https://doi.org/10.2174/1874364101206010137>.

Macé, Matthias, Stéphane D. Galiacy, Angélique Erraud, José Enrique Mejía, Heather Etchevers, Michèle Allouche, Laurence Desjardins, Patrick Calvas, and François Malecaze. 2011. "Comparative Transcriptome and Network Biology Analyses Demonstrate Antiproliferative and Hyperapoptotic Phenotypes in Human Keratoconus Corneas." *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 52 (9): 6181–91. <https://doi.org/10.1167/iovs.10-70981>.

Majo, François, Ariane Rochat, Michael Nicolas, Georges Abou Jaoudé, and Yann Barrandon. 2008. "Oligopotent Stem Cells Are Distributed throughout the Mammalian Ocular Surface." *Nature* 456 (7219): 250–54. <https://doi.org/10.1038/nature07406>.

Makino, Teruhiko, Mikiro Takaishi, Masaaki Morohashi, and Nam Ho Huh. 2001. "Hornerin, a Novel Profilaggrin-like Protein and Differentiation-Specific Marker Isolated from Mouse Skin." *Journal of Biological Chemistry* 276 (50): 47445–52. <https://doi.org/10.1074/jbc.M107512200>.

Manabe, Motomu, and W. Michael O'Guin. 1994. "Existence of Trichohyalin-Keratohyalin Hybrid Granules: Co-Localization of Two Major Intermediate Filament-Associated Proteins in Non-Follicular Epithelia." *Differentiation* 58 (1): 65–75. <https://doi.org/10.1046/j.1432-0436.1994.5810065.x>.

Mandathara, Preeji S., Fiona J. Stapleton, Jim Kokkinakis, and Mark D.P. Willcox. 2018. "A Pilot Study on Corneal Langerhans Cells in Keratoconus." *Contact Lens and Anterior Eye* 41 (2): 219–23. <https://doi.org/10.1016/j.clae.2017.10.005>.

Marekov, Lyuben N, and Peter M Steinert. 1998. "Ceramide Are Bound to Structural Proteins of the Human Foreskin Epidermal Cornified Cell Envelope." *Journal of Biological Chemistry* 273 (28): 17763–70. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.28.17763>.

Marenholz, Ingo, Claus W. Heizmann, and Günter Fritz. 2004. "S100 Proteins in Mouse and Man: From Evolution to Function and Pathology (Including an Update of the Nomenclature)." *Biochemical and Biophysical Research*

- Communications*. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.07.096>.
- Margolis, David J., Jayanta Gupta, Andrea J. Apter, Tapan Ganguly, Ole Hoffstad, Maryte Papadopoulos, Tim R. Rebbeck, and Nandita Mitra. 2014. "Filaggrin-2 Variation Is Associated with More Persistent Atopic Dermatitis in African American Subjects." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 133 (3): 784–89. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.09.015>.
- Marshall, George E, Anastasios G Konstas, and William R Lee. 2004. "Immunogold Fine Structural Localization of Extracellular Matrix Components in Aged Human Cornea - I. Types I-IV Collagen and Laminin." *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology* 229 (2): 157–63. <https://doi.org/10.1007/BF00170550>.
- Marzesco, Anne-Marie, Irene Dunia, Rudy Pandjaitan, Michel Recouvreur, Daniel Dauzonne, Ennio Lucio Benedetti, Daniel Louvard, and Ahmed Zahraoui. 2002. "The Small GTPase Rab13 Regulates Assembly of Functional Tight Junctions in Epithelial Cells." Edited by Keith Mostov. *Molecular Biology of the Cell* 13 (6): 1819–31. <https://doi.org/10.1093/mbc/13/6/1819>.
- Mas Tur, Veronica, Cheryl MacGregor, Rakesh Jayaswal, David O'Brart, and Nicholas Maycock. 2017. "A Review of Keratoconus: Diagnosis, Pathophysiology, and Genetics." *Survey of Ophthalmology*. <https://doi.org/10.1016/j.survophthal.2017.06.009>.
- Matalia, Himanshu, and Rishi Swarup. 2013. "Imaging Modalities in Keratoconus." *Indian Journal of Ophthalmology* 61 (8): 394. <https://doi.org/10.4103/0301-4738.116058>.
- Mathew, Jessica H., John D. Goosey, Per G. S??derberg, and Jan P. G. Bergmanson. 2015. "Lamellar Changes in the Keratoconic Cornea." *Acta Ophthalmologica* 93 (8): 767–73. <https://doi.org/10.1111/aos.12811>.
- Matthews, Fiona J., Stuart D. Cook, Mohammed A. Majid, Andrew D. Dick, and Valerie A. Smith. 2007. "Changes in the Balance of the Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinases (TIMPs)-1 and -3 May Promote Keratocyte Apoptosis in Keratoconus." *Experimental Eye Research* 84 (6): 1125–34. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2007.02.013>.
- Mazereeuw-Hautier, J., E. A. Leclerc, M. Simon, G. Serre, and N. Jonca. 2011. "A Novel Mutation in CDSN Causes Peeling Skin Disease in a Patient from Morocco." *British Journal of Dermatology*. Wiley/Blackwell (10.1111). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2011.10529.x>.
- McGuire, J, M Osber, and L Lightfoot. 1984. "Two Keratins MW 50,000 and 56,000 Are Synthesized by Psoriatic Epidermis." *The British Journal of Dermatology* 111 Suppl (July): 27–37. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6204677>.
- McKay, Tina B, Jesper Hjortdal, Henrik Sejersen, John M Asara, Jennifer Wu, and Dimitrios Karamichos. 2016. "Endocrine and Metabolic Pathways Linked to Keratoconus: Implications for the Role of Hormones in the Stromal Microenvironment." *Scientific Reports* 6 (1): 25534. <https://doi.org/10.1038/srep25534>.

- McMahon, Timothy T, Julie A Shin, Anna Newlin, Timothy B Edrington, Joel Sugar, and Karla Zadnik. 1999. "Discordance for Keratoconus in Two Pairs of Monozygotic Twins." *Cornea* 18 (4): 444–51. <https://doi.org/10.1097/00003226-199907000-00010>.
- McMonnies, Charles W. 2009. "Mechanisms of Rubbing-Related Corneal Trauma in Keratoconus." *Cornea*. <https://doi.org/10.1097/ICO.0b013e318198384f>.
- Méchin, M. C., M. Sebbag, J. Arnaud, R. Nachat, C. Foulquier, V. Adoue, F. Coudane, et al. 2007. "Update on Peptidylarginine Deiminases and Deimination in Skin Physiology and Severe Human Diseases." *International Journal of Cosmetic Science*. <https://doi.org/10.1111/j.1467-2494.2007.00377.x>.
- Meek, Keith M., Stephen J. Tuft, Yifei Huang, Paulvinder S. Gill, Sally Hayes, Richard H. Newton, and Anthony J. Bron. 2005. "Changes in Collagen Orientation and Distribution in Keratoconus Corneas." *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 46 (6): 1948–56. <https://doi.org/10.1167/iovs.04-1253>.
- Mehrel, Thomas, Daniel Hohl, Joseph A Rothnagel, Mary A Longley, Donnie Bundman, Christina Cheng, Ulrike Lichti, et al. 1990. "Identification of a Major Keratinocyte Cell Envelope Protein, Loricrin." *Cell* 61 (6): 1103–12. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90073-N](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90073-N).
- Mellman, Ira, and Ralph M Steinman. 2001. "Dendritic Cells: Specialized and Regulated Antigen Processing Machines." *Cell*. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00449-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00449-4).
- Messent, Anthea J, Melanie J Blissett, Gillian L Smith, Alison J North, Anthony Magee, David Foreman, David R Garrod, and Mike Boulton. 2000. "Expression of a Single Pair of Desmosomal Glycoproteins Renders the Corneal Epithelium Unique amongst Stratified Epithelia." *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 41 (1): 8–15. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10634593>.
- Michael A. Hauser, Joshua Wheeler, Michael A Hauser, Natalie A Afshari, R. R, Allingham, and Yutao Liu. 2012a. "The Genetics of Keratoconus: A Review." *Reproductive System & Sexual Disorders* 01 (02): 2–9. <https://doi.org/10.4172/2161-038X.S6-001>.
- Michel Simon, Marie Reynier. 2016. "Cornéodesmosome - [Biologie de La Peau]." 2016. <https://biologiedelapeau.fr/spip.php?mot248>.
- Mischke, Dietmar, Bernhard P Korge, Ingo Marenholz, Armin Volz, and Andreas Ziegler. 1996. "Genes Encoding Structural Proteins of Epidermal Cornification and S100 Calcium-Binding Proteins Form a Gene Complex ('Epidermal Differentiation Complex') on Human Chromosome 1q21." *Journal of Investigative Dermatology* 106 (5): 989–92. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12338501>.
- Miwa, Nobutomo, Mikio Furuse, Shoichiro Tsukita, Norio Nikawa, Yusuke Nakamura, and Yoichi Furukawa. 2001. "Involvement of Claudin-1 in the Beta-Catenin/Tcf Signaling Pathway and Its Frequent Upregulation in Human Colorectal Cancers." *Oncology Research*. 2001. <https://doi.org/10.3727/096504001108747477>.
- Mocan, Mehmet C., Pinar Topcu Yilmaz, Murat Irkeç, and Mehmet Orhan. 2008. "In

- Vivo Confocal Microscopy for the Evaluation of Corneal Microstructure in Keratoconus." *Current Eye Research* 33 (11–12): 933–39.
<https://doi.org/10.1080/02713680802439219>.
- Mohamad, Janan, Ofer Sarig, Lisa M. Godsel, Alon Peled, Natalia Malchin, Ron Bochner, Dan Vodo, et al. 2018. "Filaggrin 2 Deficiency Results in Abnormal Cell-Cell Adhesion in the Cornified Cell Layers and Causes Peeling Skin Syndrome Type A." *Journal of Investigative Dermatology* 138 (8): 1736–43.
<https://doi.org/10.1016/j.jid.2018.04.032>.
- Moll, Roland, Werner W Franke, Dorothea L Schiller, Benjamin Geiger, and Reinhard Krepler. 1982a. "The Catalog of Human Cytokeratins: Patterns of Expression in Normal Epithelia, Tumors and Cultured Cells." *Cell*. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(82\)90400-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(82)90400-7).
- Morishige, Naoyuki, Andrew J Wahlert, M Cristina Kenney, Donald J Brown, Koji Kawamoto, Tai Ichiro Chikama, Teruo Nishida, and James V Jester. 2007. "Second-Harmonic Imaging Microscopy of Normal Human and Keratoconus Cornea." *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 48 (3): 1087–94.
<https://doi.org/10.1167/iovs.06-1177>.
- Nafeey, Soufi, Ines Martin, Tatiana Felder, Paul Walther, and Edward Felder. 2016. "Branching of Keratin Intermediate Filaments." *Journal of Structural Biology* 194 (3): 415–22. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2016.03.023>.
- Nelson, W G, and T T Sun. 1983. "The 50- and 58-Kdalton Keratin Classes as Molecular Markers for Stratified Squamous Epithelia: Cell Culture Studies." *Journal of Cell Biology* 97 (1): 244–51. <https://doi.org/10.1083/jcb.97.1.244>.
- Nemet, Arie Y, Shlomo Vinker, Irit Bahar, and Igor Kaiserman. 2010. "The Association of Keratoconus with Immune Disorders." *Cornea* 29 (11): 1261–64.
<https://doi.org/10.1097/ICO.0b013e3181cb410b>.
- Nicolas, Michael, Anita Wolfer, Kenneth Raj, J. Alain Kummer, Pleasantine Mill, Mascha Van Noort, Chi chung Hui, Hans Clevers, G. Paolo Dotto, and Freddy Radtke. 2003. "Notch1 Functions as a Tumor Suppressor in Mouse Skin." *Nature Genetics* 33 (3): 416–21. <https://doi.org/10.1038/ng1099>.
- Nielsen K, Hjortdal J, Aagaard Nohr E, Ehlers N. 2007. "Incidence and Prevalence of Keratoconus in Denmark." *Acta Ophthalmologica Scandinavica* 85 (8): 890–92.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0420.2007.00981.x>.
- Nishida, K, Y Honma, A Dota, S Kawasaki, W Adachi, T Nakamura, A J Quantock, et al. 1997. "Isolation and Chromosomal Localization of a Cornea-Specific Human Keratin 12 Gene and Detection of Four Mutations in Meesmann Corneal Epithelial Dystrophy." *American Journal of Human Genetics* 61 (6): 1268–75.
<https://doi.org/10.1086/301650>.
- Nishida, T, K Yasumoto, T Otori, and J Desaki. 1988. "The Network Structure of Corneal Fibroblasts in the Rat as Revealed by Scanning Electron Microscopy." *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 29 (12): 1887–90.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3192380>.

- Norlén, Lars, and Ashraf Al-Amoudi. 2004. "Stratum Corneum Keratin Structure, Function, and Formation: The Cubic Rod-Packing and Membrane Templating Model." *Journal of Investigative Dermatology* 123 (4): 715–32. <https://doi.org/10.1111/j.0022-202X.2004.23213.x>.
- Ohnemus, Ulrich, Klaas Kohrmeyer, Pia Houdek, Holger Rohde, Ewa Wladykowski, Sabine Vidal, Matthias A. Horstkotte, et al. 2008. "Regulation of Epidermal Tight-Junctions (TJ) during Infection with Exfoliative Toxin-Negative Staphylococcus Strains." *Journal of Investigative Dermatology* 128 (4): 906–16. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5701070>.
- Ortiz-Toquero, Sara, Raul Martin, Mr Gonzalo, Velarde Rodriguez, Victoria De Juan, Mrs Guadalupe, and Rodriguez Zarzuelo. 2016. "TOUCH MEDICAL MEDIA Keratoconus Screening in Primary Eye Care – A General Overview." *European Ophthalmic Review* 10 (CI): 80–85. <https://doi.org/10.17925/EOR.2016.10.02.80>.
- Ouyang, Hong, Yuanchao Xue, Ying Lin, Xiaohui Zhang, Lei Xi, Sherrina Patel, Huimin Cai, et al. 2014. "WNT7A and PAX6 Define Corneal Epithelium Homeostasis and Pathogenesis." *Nature* 511 (7509): 358–61. <https://doi.org/10.1038/nature13465>.
- Owens, Helen, and Greg Gamble. 2003. "A Profile of Keratoconus in New Zealand." *Cornea* 22 (2): 122–25. <https://doi.org/10.1097/00003226-200303000-00008>.
- Pahuja, Natasha, Nimisha R. Kumar, Rushad Shroff, Rohit Shetty, Rudy M.M.A. Nuijts, Anuprita Ghosh, Abhijit Sinha-Roy, Shyam S. Chaurasia, Rajiv R. Mohan, and Arkasubhra Ghosh. 2016. "Differential Molecular Expression of Extracellular Matrix and Inflammatory Genes at the Corneal Cone Apex Drives Focal Weakening in Keratoconus." *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 57 (13): 5372–82. <https://doi.org/10.1167/iovs.16-19677>.
- Palmer, Colin N.A., Alan D Irvine, Ana Terron-Kwiatkowski, Yiwei Zhao, Haihui Liao, Simon P Lee, David R Goudie, et al. 2006. "Common Loss-of-Function Variants of the Epidermal Barrier Protein Filaggrin Are a Major Predisposing Factor for Atopic Dermatitis." *Nature Genetics* 38 (4): 441–46. <https://doi.org/10.1038/ng1767>.
- Parker, J, W W Ko, G Pavlopoulos, P J Wolfe, Y S Rabinowitz, and S T Feldman. 1996a. "Videokeratography of Keratoconus in Monozygotic Twins." *Journal of Refractive Surgery (Thorofare, N.J.: 1995)* 12 (1): 180–83. <https://doi.org/10.3928/1081-597X-19960101-31>.
- Pastushenko, I., L. Prieto-Torres, Y. Gilaberte, and C. Blanpain. 2015. "Células Madre de La Piel: En La Frontera Entre El Laboratorio y La Clínica. Parte I: Células Madre Epidérmicas PALABRAS CLAVE." *Actas Dermosifiliogr* 106 (9): 725–32. <https://doi.org/10.1016/j.ad.2015.05.008>.
- Pearson, A R, B Soneji, N Sarvananthan, and J. H. Sanford-Smith. 2000a. "Does Ethnic Origin Influence the Incidence or Severity of Keratoconus?" *Eye* 14 (4): 625–28. <https://doi.org/10.1038/eye.2000.154>.
- Pellegrini, G, P Rama, F Mavilio, and M De Luca. 2009. "Epithelial Stem Cells in Corneal Regeneration and Epidermal Gene Therapy." *Journal of Pathology*.

<https://doi.org/10.1002/path.2441>.

- Peltonen, S., J. Riehoakainen, K. Pummi, and J. Peltonen. 2007. "Tight Junction Components Occludin, ZO-1, and Claudin-1, -4 and -5 in Active and Healing Psoriasis." *British Journal of Dermatology* 156 (3): 466–72.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2006.07642.x>.
- Petroll, W Matthew, and Danielle M Robertson. 2015. "In Vivo Confocal Microscopy of the Cornea: New Developments in Image Acquisition, Reconstruction, and Analysis Using the HRT-Rostock Corneal Module." *Ocular Surface* 13 (3): 187–203. <https://doi.org/10.1016/j.jtos.2015.05.002>.
- Pitz, Susanne, and Roland Moll. 2002. "Intermediate-Filament Expression in Ocular Tissue." *Progress in Retinal and Eye Research* 21 (2): 241–62.
[https://doi.org/10.1016/S1350-9462\(01\)00025-8](https://doi.org/10.1016/S1350-9462(01)00025-8).
- Pizzarello, Louis D. 2003. "Refractive Changes in Pregnancy." *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology* 241 (6): 484–88.
<https://doi.org/10.1007/s00417-003-0674-0>.
- Poli, Muriel. 2014. "Techniques Modernes de Diagnostic Paraclinique Non Invasif Du Déficit En Cellules Souches Limbiques : Comparaison, Développement, Recommandations," October. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01128231>.
- Pradervand, Sylvain, Hideo Yasukawa, Olivier G Muller, Harald Kjekshus, Tomoyuki Nakamura, Tara R St Amand, Toshitaka Yajima, et al. 2004. "Small Proline-Rich Protein 1A Is a Gp130 Pathway- and Stress-Inducible Cardioprotective Protein." *The EMBO Journal* 23 (22): 4517–25. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600454>.
- Predović, Jurica, Tihomir Balog, Tanja Marotti, Nikica Gabrić, Maja Bohac, Ivana Romac, and Iva Dekaris. 2008. "The Expression of Human Corneal MMP-2, MMP-9, ProMMP-13 and TIMP-1 in Bullous Keratopathy and Keratoconus." *Collegium Antropologicum* 32 Suppl 2 (October): 15–19.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19138000>.
- Prodinger, Christine M., Julia Reichelt, Johann W. Bauer, and Martin Laimer. 2017. "Current and Future Perspectives of Stem Cell Therapy in Dermatology." *Annals of Dermatology*. <https://doi.org/10.5021/ad.2017.29.6.667>.
- Proksch, Ehrhardt, Johanna M Brandner, and Jens Michael Jensen. 2008. "The Skin: An Indispensable Barrier." *Experimental Dermatology* 17 (12): 1063–72.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2008.00786.x>.
- Prunieras, M., M. Regnier, and David Woodley. 1983. "Methods for Cultivation of Keratinocytes with an Air-Liquid Interface." *Journal of Investigative Dermatology*. Elsevier. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12540324>.
- Rabinowitz, Y S, and P J McDonnell. 1989. "Computer-Assisted Corneal Topography in Keratoconus." *Refract Corneal Surg* 5 (6): 400–408.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2488838>.
- Rabinowitz, Yaron S. 1998. "Keratoconus." *Survey of Ophthalmology*.
[https://doi.org/10.1016/S0039-6257\(97\)00119-7](https://doi.org/10.1016/S0039-6257(97)00119-7).

- Rawlings, A. V., and C. R. Harding. 2004. "Moisturization and Skin Barrier Function." *Dermatologic Therapy* 17 (s1): 43–48. <https://doi.org/10.1111/j.1396-0296.2004.04S1005.x>.
- Reinstein, Dan Z., Timothy J. Archer, Marine Gobbe, Ronald H. Silverman, and D. Jackson Coleman. 2010. "Epithelial Thickness After Hyperopic LASIK: Three-Dimensional Display with Artemis Very High-Frequency Digital Ultrasound." *Journal of Refractive Surgery* 26 (8): 555–64. <https://doi.org/10.3928/1081597X-20091105-02>.
- Reinstein, Dan Z., Marine Gobbe, Timothy J. Archer, Ronald H. Silverman, and D. Jackson Coleman. 2010a. "Epithelial, Stromal, and Total Corneal Thickness in Keratoconus: Three-Dimensional Display with Artemis Very-High Frequency Digital Ultrasound." *Journal of Refractive Surgery* 26 (4): 259–71. <https://doi.org/10.3928/1081597X-20100218-01>.
- Reinstein, Dan Z, Timothy J Archer, and Marine Gobbe. 2009. "Corneal Epithelial Thickness Profile in the Diagnosis of Keratoconus." *Journal of Refractive Surgery (Thorofare, N.J. : 1995)* 25 (7): 604–10. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19662917>.
- Rossi, Antonello, S. I. Jang, Roberta Ceci, Peter M. Steinert, and Nedialka G. Markova. 1998. "Effect of AP1 Transcription Factors on the Regulation of Transcription in Normal Human Epidermal Keratinocytes." *Journal of Investigative Dermatology* 110 (1): 34–40. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.1998.00071.x>.
- Sandali, Otman, Mohamed El Sanharawi, Cyril Temstet, Taous Hamiche, Alice Galan, Wajdene Ghouali, Isabelle Goemaere, Elena Basli, Vincent Borderie, and Laurent Laroche. 2013. "Fourier-Domain Optical Coherence Tomography Imaging in Keratoconus." *Ophthalmology* 120 (12): 2403–12. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2013.05.027>.
- Sawaguchi, S, S S Twining, B. Y J T Yue, S. H L Chang, X Zhou, G Loushin, J Sugar, and R S Feder. 1994. "Macroglobulin Levels in Normal Human and Keratoconus Corneas." *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 35 (12): 4008–14. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7525507>.
- Schäfer, Matthias, Hany Farwanah, Ann Helen Willrodt, Aaron J Huebner, Konrad Sandhoff, Dennis Roop, Daniel Hohl, Wilhelm Bloch, and Sabine Werner. 2012. "Nrf2 Links Epidermal Barrier Function with Antioxidant Defense." *EMBO Molecular Medicine* 4 (5): 364–79. <https://doi.org/10.1002/emmm.201200219>.
- Schermer, Alexander, Sharon Galvin, and T. T. Sun. 1986. "Differentiation-Related Expression of a Major 64K Corneal Keratin in Vivo and in Culture Suggests Limbal Location of Corneal Epithelial Stem Cells." *Journal of Cell Biology* 103 (1): 49–62. <https://doi.org/10.1083/jcb.103.1.49>.
- Schermer, Alexander, James V Jester, Carolyn Hardy, Danielle Milano, and Tung Tien Sun. 1989. "Transient Synthesis of K6 and K16 Keratins in Regenerating Rabbit Corneal Epithelium: Keratin Markers for an Alternative Pathway of Keratinocyte Differentiation." *Differentiation* 42 (2): 103–10. <https://doi.org/10.1111/j.1432-0436.1989.tb00611.x>.

- Schlegel, Zuzana, Thanh Hoang-Xuan, and Damien Gatinel. 2008. "Comparison of and Correlation between Anterior and Posterior Corneal Elevation Maps in Normal Eyes and Keratoconus-Suspect Eyes." *Journal of Cataract and Refractive Surgery* 34 (5): 789–95. <https://doi.org/10.1016/j.jcrs.2007.12.036>.
- Schlötzer-Schrehardt, Ursula, and Friedrich E. Kruse. 2005. "Identification and Characterization of Limbal Stem Cells." *Experimental Eye Research*. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2005.02.016>.
- Schmitt, P -T, S Simonpoli, and J Colin. 2007. *Journal Français d'ophtalmologie. /Data/Revues/01815512/00290009/1001/*. Masson. <http://www.em-consulte.com/en/article/111148>.
- Schwab, Ivan R, Merle Reyes, and R Rivkah Isseroff. 2000. "Successful Transplantation of Bioengineered Tissue Replacements in Patients with Ocular Surface Disease." *Cornea* 19 (4): 421–26. <https://doi.org/10.1097/00003226-200007000-00003>.
- Schweizer, Jürgen, Paul E. Bowden, Pierre A. Coulombe, Lutz Langbein, E. Birgitte Lane, Thomas M. Magin, Lois Maltais, et al. 2006. "New Consensus Nomenclature for Mammalian Keratins." *Journal of Cell Biology*. <https://doi.org/10.1083/jcb.200603161>.
- Scroggs, M W, and A D Proia. 1992a. "Histopathological Variation in Keratoconus." *Cornea* 11 (6): 553–59. <https://doi.org/10.1097/00003226-199211000-00012>.
- Sethi, Anirudh, Robert J. Wordinger, and Abbot F. Clark. 2012. "Focus on Molecules: Lysyl Oxidase." *Experimental Eye Research*. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2012.02.002>.
- Sevilla, Lisa M, Rachida Nachat, Karen R Groot, John F Klement, Jouni Uitto, Philippe Djian, Arto Määttä, and Fiona M Watt. 2007. "Mice Deficient in Involucrin, Envoplakin, and Periplakin Have a Defective Epidermal Barrier." *Journal of Cell Biology* 179 (7): 1599–1612. <https://doi.org/10.1083/jcb.200706187>.
- Shapiro, M S, J Friend, and R A Thoft. 1981. "Corneal Re-Epithelialization from the Conjunctiva." *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 21 (1 II): 135–42. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7251297>.
- Sharma, Vishakha M., Arlene M. Ruiz de Luzuriaga, Darrel Waggoner, Mark Greenwald, and Sarah L. Stein. 2008. "Microphthalmia with Linear Skin Defects: A Case Report and Review." *Pediatric Dermatology* 25 (5): 548–52. <https://doi.org/10.1111/j.1525-1470.2008.00724.x>.
- Sherwin, T., N. H. Brookes, I. P. Loh, C. A. Poole, and G. M. Clover. 2002. "Cellular Incursion into Bowman's Membrane in the Peripheral Cone of the Keratoconic Cornea." *Experimental Eye Research* 74 (4): 473–82. <https://doi.org/10.1006/exer.2001.1157>.
- Sherwin, Trevor, and Nigel H Brookes. 2004. "Morphological Changes in Keratoconus: Pathology or Pathogenesis." *Clinical and Experimental Ophthalmology*. <https://doi.org/10.1111/j.1442-9071.2004.00805.x>.

- Shetty, Rohit, Anupam Sharma, Natasha Pahuja, Priyanka Chevour, Neeraja Padmajan, Kamesh Dhamodaran, Chaitra Jayadev, Rudy M. M. A. Nuijts, Arkasubhra Ghosh, and Jeyabalan Nallathambi. 2017. "Oxidative Stress Induces Dysregulated Autophagy in Corneal Epithelium of Keratoconus Patients." Edited by Vladimir Trajkovic. *PLOS ONE* 12 (9): e0184628. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184628>.
- Shetty, Shibani, and S. Gokul. 2012. "Keratinization and Its Disorders." *Oman Medical Journal*. Oman Medical Specialty Board. <https://doi.org/10.5001/omj.2012.90>.
- Simon, Matthieu. 2011. "Adhérence Cellulaire – Cours Pharmacie." 2011. <http://www.cours-pharmacie.com/biologie-cellulaire/adherence-cellulaire.html>.
- Simon, Michel, Marek Haftek, Mireille Sebbag, M Montezin, E Girbal-Neuhausser, D Schmidtt, and G Serre. 1996. "Evidence That Filaggrin Is a Component of Cornified Cell Envelopes in Human Plantar Epidermis." *Biochem. J* 317 (Pt 1): 173–77. <https://doi.org/10.1042/bj3170173>.
- Simon, Michel, Nathalie Jonca, Marina Guerrin, Marek Haftek, Dominique Bernard, Cécile Caubet, Torbjörn Egelrud, Rainer Schmidt, and Guy Serre. 2001. "Refined Characterization of Corneodesmosin Proteolysis during Terminal Differentiation of Human Epidermis and Its Relationship to Desquamation." *Journal of Biological Chemistry* 276 (23): 20292–99. <https://doi.org/10.1074/jbc.M100201200>.
- Simon, Michel, Martine Montézin, Marina Guerrin, Jean Jacques Durieux, and Guy Serre. 1997. "Characterization and Purification of Human Corneodesmosin, an Epidermal Basic Glycoprotein Associated with Corneocyte-Specific Modified Desmosomes." *Journal of Biological Chemistry* 272 (50): 31770–76. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.50.31770>.
- Singh, Shruti, Sonal Vrishni, Brijesh K. Singh, Irfan Rahman, and Poonam Kakkar. 2010. "Nrf2-ARE Stress Response Mechanism: A Control Point in Oxidative Stress-Mediated Dysfunctions and Chronic Inflammatory Diseases." *Free Radical Research*. Taylor & Francis. <https://doi.org/10.3109/10715762.2010.507670>.
- Smith, Frances J.D., Alan D Irvine, Ana Terron-Kwiatkowski, Aileen Sandilands, Linda E Campbell, Yiwei Zhao, Haihui Liao, et al. 2006. "Loss-of-Function Mutations in the Gene Encoding Filaggrin Cause Ichthyosis Vulgaris." *Nature Genetics* 38 (3): 337–42. <https://doi.org/10.1038/ng1743>.
- Smith, V. A., F. J. Matthews, M. A. Majid, and S. D. Cook. 2006. "Keratoconus: Matrix Metalloproteinase-2 Activation and TIMP Modulation." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* 1762 (4): 431–39. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2006.01.010>.
- Somodi, S, Ch Hahnel, Ch Slowik, A Richter, and R Guthoff. 1996a. "Confocal in Vivo Microscopy, Confocal Laser Scanning and Fluorescence Microscopy in Keratoconus." *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 37 (3): 518–25. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9479549>.

- Sorkhabi, Rana, Amir Ghorbanihaghjo, Nazli Taheri, and Mohammad Hosein Ahoor. 2015. "Tear Film Inflammatory Mediators in Patients with Keratoconus." *International Ophthalmology* 35 (4): 467–72. <https://doi.org/10.1007/s10792-014-9971-3>.
- Spoerl, E., V. Zubaty, F. Raiskup-Wolf, and L. E Pillunat. 2007. "Oestrogen-Induced Changes in Biomechanics in the Cornea as a Possible Reason for Keratectasia." *British Journal of Ophthalmology* 91 (11): 1547–50. <https://doi.org/10.1136/bjo.2007.124388>.
- Spoerl, Eberhard, Gregor Wollensak, and Theo Seiler. 2004. "Increased Resistance of Crosslinked Cornea against Enzymatic Digestion." *Current Eye Research* 29 (1): 35–40. <https://doi.org/10.1080/02713680490513182>.
- Sriram, Gopu, Massimo Alberti, Yuri Dancik, Bo Wu, Ruige Wu, Zhaoxu Feng, Srinivas Ramasamy, Paul Lorenz Bigliardi, Mei Bigliardi-Qi, and Zhiping Wang. 2018. "Full-Thickness Human Skin-on-Chip with Enhanced Epidermal Morphogenesis and Barrier Function." *Materials Today* 21 (4): 326–40. <https://doi.org/10.1016/j.mattod.2017.11.002>.
- Stewart, Paul, Zhuo Chen, William Farley, Lisa Olmos, and Stephen C. Pflugfelder. 2005. "Effect of Experimental Dry Eye on Tear Sodium Concentration in the Mouse." *Eye & Contact Lens: Science & Clinical Practice* 31 (4): 175–78. <https://doi.org/10.1097/01.ICL.0000161705.19602.C9>.
- Sturbaum, Christopher W., and R. L. Peiffer. 1993. "Pathology of Corneal Endothelium in Keratoconus." *Ophthalmologica* 206 (4): 192–208. <https://doi.org/10.1159/000310390>.
- SUN, TUNG-TIEN -T, SCHEFFER C.G. TSENG, ANDREW J.-W HUANG, DAVID COOPER, ALEXANDER SCHERMER, MARION H. LYNCH, ROBERT WEISS, and RIVA EICHNER. 1985. "Monoclonal Antibody Studies of Mammalian Epithelial Keratins: A Review." *Annals of the New York Academy of Sciences* 455 (1): 307–29. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1985.tb50419.x>.
- Sykakis, E., F. Carley, L. Irion, J. Denton, and M. C. Hillarby. 2012a. "An in Depth Analysis of Histopathological Characteristics Found in Keratoconus." *Pathology* 44 (3): 234–39. <https://doi.org/10.1097/PAT.0b013e3283511b42>.
- Sykakis, E., F. Carley, L. Irion, J. Denton, and M.C. Hillarby. 2012b. "An in Depth Analysis of Histopathological Characteristics Found in Keratoconus." *Pathology* 44 (3): 234–39. <https://doi.org/10.1097/PAT.0b013e3283511b42>.
- Temstet, Cyril, Otman Sandali, Nacim Bouheraoua, Taous Hamiche, Alice Galan, Mohamed El Sanharawi, Elena Basli, Laurent Laroche, and Vincent Borderie. 2015. "Corneal Epithelial Thickness Mapping Using Fourier-Domain Optical Coherence Tomography for Detection of Form Fruste Keratoconus." *Journal of Cataract and Refractive Surgery* 41 (4): 812–20. <https://doi.org/10.1016/j.jcrs.2014.06.043>.
- Thoft, R A, and J Friend. 1983. "The X, Y, Z Hypothesis of Corneal Epithelial Maintenance." *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6618809>.

- Todorovic, Michael, Stephen A. Wood, and George D. Mellick. 2016. "Nrf2: A Modulator of Parkinson's Disease?" *Journal of Neural Transmission*. Springer Vienna. <https://doi.org/10.1007/s00702-016-1563-0>.
- Tong, Louis, Rosa M Corrales, Zhuo Chen, Arturo L Villarreal, Cintia S De Paiva, Roger Beuerman, De-Quan Li, and Stephen C Pflugfelder. 2006. "Expression and Regulation of Cornified Envelope Proteins in Human Corneal Epithelium." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 47 (5): 1938–46. <https://doi.org/10.1167/iovs.05-1129>.
- Toricelli, André A M, Vivek Singh, Marcony R Santhiago, and Steven E Wilson. 2013. "The Corneal Epithelial Basement Membrane: Structure, Function, and Disease." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 54 (9): 6390–6400. <https://doi.org/10.1167/iovs.13-12547>.
- Touboul, David, Elodie Trichet, Perry S. Binder, Delphine Praud, Camille Seguy, and Joseph Colin. 2012. "Comparison of Front-Surface Corneal Topography and Bowman Membrane Specular Topography in Keratoconus." *Journal of Cataract and Refractive Surgery* 38 (6): 1043–49. <https://doi.org/10.1016/j.jcrs.2012.01.026>.
- Tuwairqi, Waleed S., and Mazen M. Sinjab. 2012. "Safety and Efficacy of Simultaneous Corneal Collagen Cross-Linking With Topography-Guided PRK in Managing Low-Grade Keratoconus: 1-Year Follow-Up." *Journal of Refractive Surgery* 28 (5): 341–47. <https://doi.org/10.3928/1081597X-20120316-01>.
- Uçakhan, Ömür Ö, Ayfer Kanpolat, Nurgül Yılmaz, and Muhip Özkan. 2006. "In Vivo Confocal Microscopy Findings in Keratoconus." *Eye and Contact Lens* 32 (4): 183–91. <https://doi.org/10.1097/01.icl.0000189038.74139.4a>.
- Utech, Markus, Matthias Brüwer, and Asma Nusrat. 2006. "Tight Junctions and Cell-Cell Interactions." *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 341: 185–95. <https://doi.org/10.1385/1-59745-113-4:185>.
- Velez-Delvalle, Cristina, Meytha Marsch-Moreno, Federico Castro-Muñozledo, Ivan J Galván-Mendoza, and Walid Kuri-Harcuch. 2016. "Epithelial Cell Migration Requires the Interaction between the Vimentin and Keratin Intermediate Filaments." *Scientific Reports* 6. <https://doi.org/10.1038/srep24389>.
- Verma, Rajeshwar P., and Corwin Hansch. 2007. "Matrix Metalloproteinases (MMPs): Chemical-Biological Functions and (Q)SARs." *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2007.01.011>.
- Vermeij, Wilbert P., and Claude Backendorf. 2010. "Skin Cornification Proteins Provide Global Link between ROS Detoxification and Cell Migration during Wound Healing." Edited by Joanna Mary Bridger. *PLoS ONE* 5 (8): e11957. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011957>.
- Vielmuth, Franziska, Vera Rötzer, Eva Hartlieb, Christoph Hirneiß, Jens Waschke, and Volker Spindler. 2016. "Pemphigus Autoantibodies Induce Blistering in Human Conjunctiva." *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 57 (10): 4442–49. <https://doi.org/10.1167/iovs.16-19582>.

- Vinciguerra, Riccardo, Mario R. Romano, Fabrizio I. Camesasca, Claudio Azzolini, Silvia Trazza, Emanuela Morengi, and Paolo Vinciguerra. 2013. "Corneal Cross-Linking as a Treatment for Keratoconus: Four-Year Morphologic and Clinical Outcomes with Respect to Patient Age." *Ophthalmology* 120 (5): 908–16. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2012.10.023>.
- Viragh, Pierre A de, Marcel Huber, and Daniel Hohl. 1994. "Involucrin mRNA Is More Abundant in Human Hair Follicles than in Normal Epidermis." *Journal of Investigative Dermatology* 103 (6): 815–19. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12413482>.
- Voegeli, Rainer, and Anthony V. Rawlings. 2012. "Desquamation: It Is Almost All about Proteases." In *Treatment of Dry Skin Syndrome: The Art and Science of Moisturizers*, 9783642276:149–78. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-27606-4_11.
- Wang, Y, Y S Rabinowitz, J I Rotter, and H Yang. 2000. "Genetic Epidemiological Study of Keratoconus: Evidence for Major Gene Determination." *American Journal of Medical Genetics* 93 (5): 403–9. [https://doi.org/10.1002/1096-8628\(20000828\)93:5<403::AID-AJMG11>3.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/1096-8628(20000828)93:5<403::AID-AJMG11>3.0.CO;2-A).
- Wang, Yani, Tianbo Jin, Xuehui Zhang, Wei Wei, Yan Cui, Tingting Geng, Qianping Liu, et al. 2013. "Common Single Nucleotide Polymorphisms and Keratoconus in the Han Chinese Population." *Ophthalmic Genetics* 34 (3): 160–66. <https://doi.org/10.3109/13816810.2012.743569>.
- Wang, Yani, Wei Wei, Changning Zhang, Xue Hui Zhang, Ming Liu, Xiuping Zhu, and Kun Xu. 2016. "Association of Interleukin-1 Gene Single Nucleotide Polymorphisms with Keratoconus in Chinese Han Population." *Current Eye Research* 41 (5): 630–35. <https://doi.org/10.3109/02713683.2015.1045083>.
- Weed, K. H., C. J. MacEwen, and C. N. J. McGhee. 2007. "The Dundee University Scottish Keratoconus Study II: A Prospective Study of Optical and Surgical Correction." *Ophthalmic and Physiological Optics* 27 (6): 561–67. <https://doi.org/10.1111/j.1475-1313.2007.00524.x>.
- Weed, K. H., C. J. MacEwen, and C. N.J. McGhee. 2006. "The Variable Expression of Keratoconus within Monozygotic Twins: Dundee University Scottish Keratoconus Study (DUSKS)." *Contact Lens and Anterior Eye* 29 (3): 123–26. <https://doi.org/10.1016/j.clae.2006.03.003>.
- Weed, K H, C J MacEwen, A Cox, and C. N.J. McGhee. 2007. "Quantitative Analysis of Corneal Microstructure in Keratoconus Utilising in Vivo Confocal Microscopy." *Eye* 21 (5): 614–23. <https://doi.org/10.1038/sj.eye.6702286>.
- Welter, Jean F, James F Crish, Chapla Agarwal, and Richard L Eckert. 1995. "Fos-Related Antigen (Fra-1), JunB, and JunD Activate Human Involucrin Promoter Transcription by Binding to Proximal and Distal API Sites to Mediate Phorbol Ester Effects on Promoter Activity." *Journal of Biological Chemistry* 270 (21): 12614–22. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.21.12614>.
- Wenk, Jutta, Peter Brenneisen, and Christian Meewes. 2004. "UV-Induced Oxidative Stress and Photoaging." *Current Problems in Dermatology* 29: 83–94.

<https://doi.org/10.1159/000060656>.

- Wisse, R.P.L. 2016. "Keratoconus : Inflammatory Associations and Treatment Characteristics," June, 1–261. <https://dspace.library.uu.nl/handle/1874/325112>.
- Wojcik, Katarzyna A, Anna Kaminska, Janusz Blasiak, Jerzy Szaflik, and Jacek P Szaflik. 2013. "Oxidative Stress in the Pathogenesis of Keratoconus and Fuchs Endothelial Corneal Dystrophy." *International Journal of Molecular Sciences*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/ijms140919294>.
- Wollensak, Gregor, Michaela Wilsch, Eberhard Spoerl, and Theo Seiler. 2004. "Collagen Fiber Diameter in the Rabbit Cornea after Collagen Crosslinking by Riboflavin/UVA." *Cornea* 23 (5): 503–7. <https://doi.org/10.1097/01.ico.0000105827.85025.7f>.
- Yang, Ying. 2006. "FACTEURS IMPLIQUES DANS LA DIFFERENCIATION ET LA TRANSDIFFERENCIATION DE L'EPITHELIUM CORNEEN." <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00012079>.
- Yanoff, Myron., Jay S. Duker, and James J. Augsburger. 2009. *Ophthalmology*. Mosby Elsevier. <https://www.twirpx.com/file/1675808/>.
- Yildiz, Elvin, Handan Bardak, Murat Gunay, Yavuz Bardak, Serhat Imamoglu, Halil Ozbas, and Ozkan Bagci. 2017. "Novel Zinc Finger Protein Gene 469 (ZNF469) Variants in Advanced Keratoconus." *Current Eye Research* 42 (10): 1396–1400. <https://doi.org/10.1080/02713683.2017.1325910>.
- Yoshida, Yusuke, Yuriko Ban, and Shigeru Kinoshita. 2009. "Tight Junction Transmembrane Protein Claudin Subtype Expression and Distribution in Human Corneal and Conjunctival Epithelium." *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 50 (5): 2103–8. <https://doi.org/10.1167/iovs.08-3046>.
- You, Jingjing, Susan M. Corley, Li Wen, Chris Hodge, Roland Höllhumer, Michele C. Madigan, Marc R. Wilkins, and Gerard Sutton. 2018. "RNA-Seq Analysis and Comparison of Corneal Epithelium in Keratoconus and Myopia Patients." *Scientific Reports* 8 (1): 389. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18480-x>.
- Yu, Xiaoning, Binbin Chen, Xin Zhang, and Xingchao Shentu. 2017. "Identification of Seven Novel ZNF469 Mutations in Keratoconus Patients in a Han Chinese Population." *Molecular Vision* 23: 296–305. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28484309>.
- Yuki, Takuo, Akira Hachiya, Ayumi Kusaka, Penkanok Sriwiriyanont, Marty O. Visscher, Kazumasa Morita, Masahiko Muto, Yoshiki Miyachi, Yoshinori Sugiyama, and Shintaro Inoue. 2011. "Characterization of Tight Junctions and Their Disruption by UVB in Human Epidermis and Cultured Keratinocytes." *Journal of Investigative Dermatology* 131 (3): 744–52. <https://doi.org/10.1038/jid.2010.385>.
- Yuksel, Erdem, Duygu Yalinbas, Bahri Aydin, and Kamil Bilgihan. 2016. "Keratoconus Progression Induced by In Vitro Fertilization Treatment." *Journal of Refractive Surgery* 32 (1): 60–63. <https://doi.org/10.3928/1081597X-20151207->

10.

- Zadnik K, Barr JT, Gordon MO, Edrington TB. 1996. "Biomicroscopic Signs and Disease Severity in Keratoconus. Collaborative Longitudinal Evaluation of Keratoconus (CLEK) Study Group.Pdf." *Cornea*. 15 (2): 39–46.
<https://doi.org/10.1097/00003226-199603000-00006>.
- Zahraoui, Ahmed, Daniel Louvard, and Thierry Galli. 2000. "Tight Junction, a Platform for Trafficking and Signaling Protein Complexes." *Journal of Cell Biology*. <https://doi.org/10.1083/jcb.151.5.F31>.
- Zhang, Jian, Sha Li, Lu Li, Meng Li, Chongye Guo, Jun Yao, and Shuangli Mi. 2015. "Exosome and Exosomal MicroRNA: Trafficking, Sorting, and Function." *Genomics, Proteomics and Bioinformatics*.
<https://doi.org/10.1016/j.gpb.2015.02.001>.
- Zhivov, Andrey, Joachim Stave, Brigitte Vollmar, and Rudolf Guthoff. 2005. "In Vivo Confocal Microscopic Evaluation of Langerhans Cell Density and Distribution in the Normal Human Corneal Epithelium." *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology* 243 (10): 1056–61. <https://doi.org/10.1007/s00417-004-1075-8>.
- Ziaei, Mohammed, Allon Barsam, Neda Shamie, David Vroman, Terry Kim, Eric D. Donnenfeld, Edward J. Holland, et al. 2015. "Reshaping Procedures for the Surgical Management of Corneal Ectasia." *Journal of Cataract and Refractive Surgery*. <https://doi.org/10.1016/j.jcrs.2015.03.010>.
- Zimmermann, Dieter R, René W. Fischer, Kaspar H. Winterhalter, Rudolf Witmer, and Lloyd Vaughan. 1988. "Comparative Studies of Collagens in Normal and Keratoconus Corneas." *Experimental Eye Research* 46 (3): 431–42.
[https://doi.org/10.1016/S0014-4835\(88\)80031-9](https://doi.org/10.1016/S0014-4835(88)80031-9).

Characterisation of corneal epithelium differentiation program

Tatiana Lupasco, Stéphane Galiacy, Cyrielle Tricoire, Michele Allouche, François Malecaze



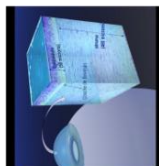
Unité "Différenciation Epithéliale et Autoimmunité Rhumatoïde"
UMR 1056 Inserm - Université de Toulouse



Introduction

Corneal diseases represent the second leading cause of blindness in most developing world countries. There are an estimated 4.9 million new cases of monocular blindness every year which could potentially have their sight restored through corneal transplantation. Only few proteomic studies of mammalian cornea have been performed leading to the identification of less than 2070 proteins in human cornea and 2 markers of epithelial differentiation (keratin 3 and keratin 12)

Human cornea - anterior part of the eye.
Functions: protection, transmission, refraction
Structure : 5 layers



- The Epithelium
- Bowman's membrane
- Stroma
- Descemet's membrane
- Endothelium.

Normal cornea differentiation
Limbus
Cornea
Limbic stem/progenitor cells
Corneal epithelial cells

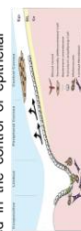
The corneal epithelium - stratified squamous non cornified - fundamental optical role and protects the cornea from external aggressions. 3 types of cells: basal, intermediate and superficial. Several pathologies have as early manifestations disorders of the epithelium (ectodermal dysplasia, conjunctivitis, or keratoconus)

No data of characterisation the differentiation program of the corneal epithelium. Some similarities with the skin (same embryological provenance)

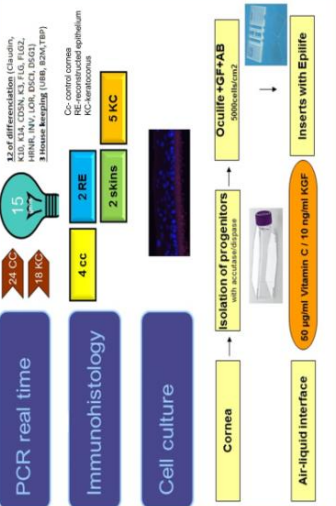


Aim of study

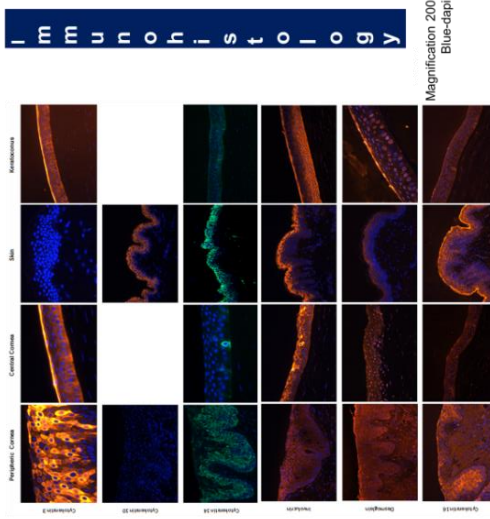
Characterize the terminal differentiation program of the corneal epithelium
- At human donors
- Key factors involved in the control of epithelial differentiation



Methods



Results



Results

Real time PCR

Gene	CC	RE	CC	RE	CC	RE	CC	RE	CC	RE	CC	RE
Control	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
KRT10	1.2	1.5	1.8	2.1	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0
KRT16	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
KRT19	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
KRT20	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
KRT31	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
KRT32	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
KRT33	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
KRT35	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
KRT36	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
KRT37	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
KRT38	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
KRT39	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
KRT40	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
KRT41	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
KRT42	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

ΔCt negativ. strongly expressed
ΔCt > 12 non expressed

Cell culture



Gene	CC	RE	CC	RE	CC	RE	CC	RE	CC	RE	CC	RE
Abundance relative	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
ΔCt	18.12	15.12	14.82	14.52	14.22	13.92	13.62	13.32	13.02	12.72	12.42	12.12
Abundance relative	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
ΔCt	18.12	15.12	14.82	14.52	14.22	13.92	13.62	13.32	13.02	12.72	12.42	12.12

Conclusion

Detection of epidermal terminal differentiation genes in the corneal epithelium (role ... ???)
(INV and LOR in the skin, Desmoglein 1 ...) → Western Blot

⇒ The model of the reconstructed epithelium → the function of new proteins identified (particularly by turning off their expression by the technique of RNA interference) and further explore the pathophysiology of various corneal diseases.

→ iPSc from normal cornea and keratoconus stroma – analyze and characterize the physiopathology of different corneal diseases



Early diagnosis and treatment of various corneal disorders.

Bourses:

Erasmus Medea 2014 - 2017

Fondation de France (Berthe Fouassier) 2017- 2018

Tatiana Lupasco

3 avenue Emile Zola appt.102, 31520 Ramonville St Agne
Tél : 06.45.31.54.39 — Email : tatianalupasco8@gmail.com
35 ans, 1 enfant

Médecin ophtalmologiste

EXPERIENCE PROFESSIONNELLE

- 2012-2014**
- Médecin ophtalmologiste à temps plein,
 - Hôpital Clinique Républicain IMSP, 29, rue N Testemițanu, 2070 Chisinau, Moldova
- Septembre 2010-
septembre 2014**
- Médecin ophtalmologiste à temps plein
 - Hôpital des Urgences, 1 rue Toma Ciorba, Chisinau, Moldova

EDUCATION

- 2014–présent**
- Etudiante en thèse, École Doctorale Biologie Santé, Biotechnologies
Équipe du Professor François Malecaze, Toulouse (France)
 - Prix de la Fondation de France (Berthe Fouassier)
 - Bourse ERASMUS MUNDUS (36 mois)
- 01/06/2014 –
01/01/2015**
- Master 2 en innovation pharmacologique,
Université Paul Sabatier, Toulouse (France)
- 2008–2012**
- Internat en ophtalmologie
USMF "N. Testemitanu", Chisinau (Moldavie)
- 2008–2009**
- Observateur bénévole dans le service d'ophtalmologie Hotel Dieu,
Nantes (France)
 - Bourse de l'Alliance Française
- 2001–2008**
- Faculté de Médecine USMF "N. Testemitanu" Chisinau (Moldavie)
- 2001–2002**
- PCEM1 Faculté de Médecine, Rennes (France)
 - Bourse de l'Alliance Française
- 1990–2001**
- Lycée Francophone "Gh. Asachi", Chisinau (Moldavie)

FORMATION *Ophtalmologie*

- 3-8 mars 2016**
- Training course IPS cell culture, Köln, Germany

- 1-30 aout 2015** - Training ophthalmological course, Bonn, Germany, Grant ESCRS
- 1-30 aout 2014** - Training ophthalmological course Mainz, Germany Grant SOE
- 3-5.02.2012** - Le COP cours de la DMLA et ESCRS Congrès, Prague, République tchèque
- 13-24.02.2012** - Cours phacoémulsification de la cataracte " Centre de microchirurgie Oculaire, Moscou
- 26.03-06.04.2012** - Cours " et Kératoprothèses et kératoplastie, " Centre de microchirurgie Oculaire, Russie
- 23-24.09.2011** - Séminaire Eurokératoconus, Bordeaux, France
- 3-8 juin 2011** - EUPO Cours uvéites et glaucome, Genève, Suisse
- 2008-2009** - Formations chez Menicon : Topographie au service ophtalmologique, Aberrométrie, LRPO : astigmatisme, presbytie, LRPO cas spécifiques, LRPO initiation et astuces
- France**
- Formations chez ALCON : phacoémulsification, techniques et nouveautés en chirurgie vitreoe rétinienne
photocoagulation au laser : pathologie rétinienne
l'échographie : nouveaux aspects
- Formation CIBAVISION : Examen monoculaire, bion/binoculaire (Dr.Morizet)
- Formation ZEISS : Spécialisation OCT
- 29.06-10.07.2009** - Cours avancé d'Optométrie " Institut Helmholtz, Moscou

FORMATION	Participation à des congrès
------------------	------------------------------------

- | | |
|----------------------------|---|
| 22-24 février 2018 | -JRO (Journées de Réflexions Ophtalmologiques), Paris, France |
| 15-16 novembre 2018 | - COP Cornée Pratique et Scientifique, Paris, France |
| 3-6 octobre 2018 | - 13es Journées d'Ophtalmologie Interactive, Toulouse, France |
| 25-26 janvier 2018 | - Journées interactives de formation de réalités ophtalmologiques, Versailles |
| 15-16 décembre 2017 | - AOP Ateliers Ophtalmologie Pratique, Paris, France |
| 30 novembre 2017 | - FTO-SAFIR , Toulouse, France |
| Novembre 2016 | - Retine 360, Toulouse, France |
| 23-24 octobre 2016 | - 12es Journées d'Ophtalmologie Interactive, Toulouse, France |
| 6-8.09.2012 | - III EuCornea Congrès , Milan , Italy |
| 4-7.06.2011 | - SOE et Conférence AAO, Genève, Suisse |
| 17-19.06.2010 | - I Congrès EuCornea , Venise , Italy |
| 12-16.09.2009 | - XXVII ESCRS Congres in Barcelona, Spain |
| 1-4.10.2009 | - VII Congrès in Sinaia, Roumania |
| 2008, 2009 | - " ФедоровскиеЧтения «, Moscow, Russia |
| May 2006 | - Ist International Congress Med Espera , diplôme IInd degree, Moldova |

Publications :

Identification of PITX3 mutations in individuals with various ocular developmental defects

Zazo Seco C¹, Plaisancié J^{1,2}, **Lupasco T**¹, Michot C³, Pechmeja J⁴, Delanne J⁵, Cottureau E⁶, Ayuso C⁷, Corton M⁷, Calvas P^{1,2}, Ragge N^{8,9}, Chassaing N^{1,2}.
February 2018 *Ophthalmic Genetics* 39(3):1-7 DOI: 10.1080/13816810.2018.1430243

Corneal epithelium in keratoconus under-expresses a subset of cornified envelope markers and of oxidative stress-related genes

Tatiana Lupasco¹, Zhiguo He², Myriam Cassagne^{1,3}, Lise Brion¹, Pierre Fournié^{1,3}, Guy Serre¹, Philippe Gain^{2,4}, Gilles Thuret^{2,4}, Michèle Allouche¹, François Malecaze^{1,3}, Michel Simon*¹, Stéphane Galiacy*^{1,3}

1. Lupasco N., Bendelic E., Lupasco V., **LUPASCO T**. Les techniques de la capsulotomie postérieure laser dans les cataractes secondaires. *Annales scientifiques. Edition IV*. Chisinau, 2008, 281-284. ISBN 9975-907-15-6
2. Lupasco N., **LUPASCO T**. L'ultrasonographie oculaire dans le diagnostic des modifications du corps vitré. *Annales scientifiques*. 2009 p. 262-265. ISSN 1857-1719. ISBN 978-9975-918-81-7
3. Lupasco V., **LUPASCO T**. L'actualité et l'analyse des handicaps primaires chez les personnes avec déficiences visuelles. *Santé publique, économie et management* .5(62)/2015 p. 344-348. ISBN 978-9975-113-48-9.
4. Bendelic E., Lupasco V., Lupasco N., **LUPASCO T**. Greffe de cornée. Protocole clinique national. *Santé publique, économie et management*. 5(62)/2015, p.16-52. ISSN 1729-8687.
5. Lupasco N., **LUPASCO T**, "Oftagel" dans le syndrome de l'oeil sec. Chisinau, 2005, pISBN 978-9975-118-06-4.
6. **LUPASCO T**. «Optiserum» dans la thérapie du syndrome de l'oeil rouge. Ukraine, 2010, p.5-7. ISSN 1759-8657
7. Lupasco V., Lupasco N., **LUPASCO T**. L'utilisation du «Vitrum Vision» dans les maladies de la rétine. Saint Petersburg, Russie, 2012
8. Lupasco V., Lupasco N., **LUPASCO T**, BULALA R., MORARITĂ V., TABACARI L., CHITIC V. Evaluation de l'efficacité de la pneumotonométrie automatisée dans le dépistage du glaucome. *Actualités en ophtalmologie* 2010, p. 54-55.

LANGUES ET INFORMATIQUE

Français	C1 (DALF C1)
Anglais	B2
Russe	C2
Roumain	langue maternelle
Informatique	Word, Excel, Internet, Access, PowerPoint

AUTHOR: Tatiana LUPASCO

TITLE: Comparative study of the terminal differentiation program of the corneal epithelium in controls and patients with keratoconus

THESIS SUPERVISOR: Francois MALECAZE

DATE AND PLACE OF DEFENSE: 25 March, 2019, Toulouse, France

ABSTRACT

The corneal epithelium and epidermis form a complex protective barrier against environmental aggressions. In the epidermis, the terminal differentiation program of keratinocytes is well known and largely provided by the stratum corneum, developed in the final stage of keratinocyte differentiation. In contrast, the differentiation of the corneal epithelial cells is yet poorly studied. Despite that, in some corneal disorders, the first manifestations appear in this tissue. Therefore, further research on the differentiation process of the corneal epithelial cells would significantly improve the early diagnosis and management of patients affected by corneal-related disorders like keratoconus. Keratoconus is a multifactorial corneal ectasia associated with numerous surface changes causing a gradual and irreversible degradation of vision.

The aim of my work was to characterize the terminal differentiation program of the corneal epithelium in controls *versus* patients with keratoconus.

Firstly, I analyzed the expression of three groups of genes involved in various steps of the corneal epidermal differentiation: 1) genes that encoded keratins, 2) genes that encoded junctional complex proteins and 3) genes that coded for components of the cornified envelope, a pericellular and highly resistant structure that replaces the plasma membrane of keratinocytes during the last step of their differentiation, by means of RT-qPCR, Western Blot and immunohistology. Previous studies demonstrated that many of these genes were shown to be expressed in the cornea; however no data was available for those encoding corneodesmosin, filaggrin, hornerin and keratins 1/10.

In parallel, I investigated the differential expression of the selected genes in the corneal epithelium in two cohorts of keratoconus patients (mild *versus* severe). I showed that the expression of keratin 16 was absent in the corneas of patients with keratoconus in comparison to controls. In line with this, I discovered that the expression and localization of several genes encoding cornified envelope components (such as involucrin, the Small Proline-Rich Proteins (SPRRs) and proteins of desmosomal plaques) was down-regulated and abnormal, respectively, in keratoconus. Surprisingly, cornified envelopes are not produced by the differentiated corneal epithelial cells. SPRRs have been reported to quench the reactive oxygen species *in vitro*, therefore we hypothesized that they might play a role in the corneal epithelium. Subsequently, I analyzed the expression of the main genes involved in the NRF2-pathway of oxidative stress protection such as the heme oxygenases 1 and 2, the nuclear factor erythroid 2-related factor 2, the lysyl oxidase, KEAP1, among others. Many of them were under-expressed in the keratoconus cornea epitheliums, finding that supports the involvement of oxidative stress in the progression of the disease.

My findings allowed, on one hand, the characterization of the differentiation program of corneal epithelial cells and, on the other hand, the better understanding of the pathophysiology of keratoconus by proposing the involvement of mechanical weakness and a deficit in the oxidative stress response. This could improve the management of the keratoconic patients and may provide new insights for its prevention and treatment in the future.

KEY WORD: corneal epithelium, epidermis, keratoconus, terminal differentiation, oxidative stress

LABORATORY: Epithelial Differentiation and Rheumatoid Autoimmunity Unit

U1056 INSERM-University of Toulouse 3 Paul Sabatier, Toulouse, France

AUTEUR: Tatiana LUPASCO

TITRE: Etude comparative du programme de différenciation terminale de l'épithélium de la cornée normale et des patients atteints de kératocône

DIRECTEUR DE THÈSE: François MALECAZE

LIEU ET DATE DE SOUTENANCE: Toulouse, le 25 mars 2019

RESUME :

L'épithélium cornéen, tout comme l'épiderme, forme une barrière complexe qui protège l'organisme contre les agressions de l'environnement. Dans l'épiderme, cette fonction est assurée en grande partie par la couche cornée qui correspond à l'étape finale, de mieux en mieux caractérisée, de la différenciation du kératinocyte. Par contre, le programme de différenciation de l'épithélium de la cornée est peu étudié. Pourtant, les premières manifestations de diverses pathologies cornéennes apparaissent au niveau de l'épithélium, et leur dépistage précoce pourrait modifier notablement leur prise en charge. Cela pourrait être le cas du kératocône, une ectasie cornéenne plurifactorielle et rare, associée à de nombreux remaniements de surface engendrant une dégradation progressive et irréversible de la vision.

L'objectif de mon travail de thèse a été de caractériser le programme de différenciation terminale de l'épithélium cornéen en situation normale et dans le cas du kératocône en prenant comme référence les gènes de différenciation tardive de l'épiderme.

Tout d'abord, j'ai analysé l'expression de 3 groupes de gènes représentatifs des étapes de la différenciation épidermique (gènes des kératines, des protéines des complexes jonctionnels et des composants de l'enveloppe cornée, une structure péricellulaire résistante qui remplace la membrane plasmique des kératinocytes épidermiques lors de l'étape ultime de leur différenciation) dans l'épithélium cornéen contrôle en utilisant des techniques de RT-qPCR, Western Blot et immunohistologie. J'ai montré que l'épithélium de la cornée exprime un grand nombre des gènes de l'épiderme, mais pas ceux de la cornéodesmosine, la filaggrine, l'hornerine et des kératines 1/10.

En parallèle, j'ai recherché les mêmes gènes dans l'épithélium de la cornée de deux cohortes de patients atteints de kératocône. J'ai montré que la kératine 16 est exprimée dans les cornées contrôles et disparaît dans le kératocône. Curieusement, de nombreux gènes codant pour les composants de l'enveloppe cornée sont exprimés dans l'épithélium cornéen comme ceux de l'involucrine, des Small Proline- Rich Proteins (SPRRs) et des protéines de la plaque desmosomale. De plus leur expression diminue dans l'épithélium cornéen kératoconique, avec une localisation subcellulaire différente pour l'involucrine. Pourtant, l'enveloppe cornée n'est pas produite par les cellules épithéliales différenciées de la cornée. Les protéines SPRRs étant aussi impliquées dans la détoxification des espèces réactives de l'oxygène *in vitro*, nous avons supposé qu'elles jouent ce rôle dans l'épithélium cornéen. Enfin, j'ai complété mes analyses avec l'étude des principaux éléments de la voie NRF2 de protection au stress oxydatif : hème oxygénase 1 et 2, nuclear factor erythroid 2-related factor 2, lysyl oxydase, KEAP1, etc. Plusieurs de ces gènes sont exprimés plus faiblement dans les cornées du kératocône par rapport aux cornées contrôles.

Ces résultats ont permis, d'une part, de caractériser le programme de différenciation des cellules épithéliales de la cornée et, d'autre part, de mieux comprendre la physiopathologie du kératocône en proposant l'implication d'un déficit de la réponse au stress oxydatif.

MOTS CLÉS: épithélium cornéen, épiderme, kératocône, différenciation terminale, stress oxydatif

LABORATOIRE: Unité Différenciation Épithéliale et Autoimmunité Rhumatoïde

U1056 INSERM-Université Toulouse 3 Paul Sabatier,

Toulouse, France