



**HAL**  
open science

## Contribution à l'étude du cycle de la cellule endothéliale cornéenne humaine

Aurélien Pipparelli

► **To cite this version:**

Aurélien Pipparelli. Contribution à l'étude du cycle de la cellule endothéliale cornéenne humaine. Médecine humaine et pathologie. Université Jean Monnet - Saint-Etienne, 2010. Français. NNT : 2010STET009T . tel-00677341

**HAL Id: tel-00677341**

**<https://theses.hal.science/tel-00677341>**

Submitted on 8 Mar 2012

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE JEAN MONNET DE SAINT-ETIENNE

FACULTE DE MEDECINE

Année 2010

**THESE**

Présentée pour l'obtention du titre de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JEAN MONNET**

Discipline : Biologie Médecine Santé

Spécialité : Biologie Moléculaire et Cellulaire

<p><b>CONTRIBUTION A L'ETUDE DU CYCLE DE LA CELLULE ENDOTHELIALE CORNEENNE HUMAINE</b></p>
--

Présentée et soutenue publiquement par

**Aurélien PIPPARELLI**

Le 20 octobre 2010

Directeur de thèse : **Pr. Philippe GAIN**

Co-directeur de thèse : **Pr. Gilles THURET**

**Membres du Jury :**

**Pr. Marc MURAINÉ (CHU Rouen)**

Rapporteur

**Pr. Christophe CHIQUET (CHU Grenoble)**

Rapporteur

**Pr. Philippe GAIN (CHU Saint-Etienne)**

Directeur de thèse

**Pr. Michel PEOC'H (CHU Saint-Etienne)**

Examineur

**Pr. Gilles THURET (CHU Saint-Etienne)**

Invité

*"Science sans conscience n'est que ruine de l'âme"*

François Rabelais  
Pantagruel (chapitre VIII, 1532)

## REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier en premier lieu le Pr Philippe Gain, directeur de cette thèse, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire. Je tiens également à lui exprimer toute ma reconnaissance pour ces quatre années de thèse que j'ai passées à ses côtés. Au cours de ces années, sa grande disponibilité, sa rigueur scientifique, son exigence infinie pour la perfection, son enthousiasme et ses précieux conseils m'ont permis de travailler dans les meilleures conditions. La confiance qu'il m'a accordée ainsi que nos nombreuses discussions m'ont permis de progresser et de mieux appréhender les différentes facettes du métier de chercheur et d'Attaché de Recherche Clinique. Soyez assuré, Professeur, de toute mon estime et de mon profond respect.

Je remercie le Pr Gilles Thuret, co-directeur de cette thèse pour son aide et ses précieux conseils scientifiques au cours de ces quatre années. Merci également pour son aide à la rédaction de cette thèse et des différents manuscrits. Sans lui je n'en serai pas là aujourd'hui. Travailler avec lui a été une riche expérience et un réel plaisir, je serai ravi de poursuivre cette collaboration débutée il y a quatre ans maintenant.

J'espère que cette thèse sera un remerciement suffisant au soutien et à la confiance sans cesse renouvelée dont tous les deux ont fait preuve à mon égard.

Je remercie également les autres membres du jury, le Pr Marc Muraine, le Pr Christophe Chiquet et le Pr Michel Peoc'h de m'avoir accordé leur temps et leur attention en jugeant ce travail et, tout particulièrement et par avance, pour leurs suggestions avisées durant la relecture de cette thèse ainsi que pendant la soutenance.

# SOMMAIRE

<b>RESUME</b> .....	<b>8</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>9</b>
<b>TABLE DES ILLUSTRATIONS</b> .....	<b>10</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS</b> .....	<b>13</b>
<b>PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	<b>17</b>
<b>I. INTRODUCTION</b> .....	<b>18</b>
<b>II. LE CYCLE CELLULAIRE</b> .....	<b>21</b>
II.1. Les phases du cycle cellulaire .....	22
II.1.1. L'interphase .....	23
II.1.1.1. La phase G <sub>1</sub> .....	23
II.1.1.2. Le point de restriction R .....	24
II.1.1.3. La phase S .....	25
II.1.1.4. La phase G <sub>2</sub> .....	25
II.1.2. La mitose ou phase M .....	25
II.1.3. La phase G <sub>0</sub> .....	27
II.1.4. Cinétique du cycle cellulaire .....	27
II.2. Contrôle du cycle cellulaire par les kinases cyclines-dépendantes (CDK) .....	29
II.2.1. Découverte et caractérisation des complexes CDKs/Cyclines .....	29
II.2.2. Description des CDKs .....	31
II.2.2.1. Structure et fonction .....	32
II.2.2.2. Les CDKs clés impliquées dans la régulation du cycle cellulaire .....	34
II.2.3. Les Cyclines .....	36
II.2.3.1. Les cyclines D .....	37
II.2.3.2. La cycline E .....	38
II.2.3.3. Les cyclines mitotiques .....	39
II.2.3.3.1 La cycline A .....	39
II.2.3.3.2 La cycline B .....	40
II.2.4. Régulation des complexes CDKs/Cyclines .....	42
II.2.4.1. Activation des CDKs .....	42
II.2.4.2. Régulation par les CDK Kinase Inhibitors .....	44
II.2.4.2.1 La famille INK4 .....	45

II.2.4.2.2 La famille CIP/KIP.....	46
II.2.4.3. Régulation par phosphorylations.....	49
II.2.4.3.1 Phosphorylations activatrices .....	49
II.2.4.3.2 Phosphorylations inhibitrices et déphosphorylation .....	50
a) Phosphorylations inhibitrices .....	50
b) Déphosphorylation.....	51
II.2.4.4. Localisation spatio-temporelle.....	53
II.3. Régulation moléculaire du cycle cellulaire .....	54
II.3.1. La transition $G_0/G_1$ .....	54
II.3.2. La progression en $G_1$ .....	56
II.3.3. La fin de $G_1$ , préparation à la transition $G_1/S$ .....	58
II.3.4. Inhibition de la re-réplication pendant les autres phases du cycle .....	59
II.3.5. La transition $G_1/S$ .....	60
II.3.6. La phase S .....	61
II.3.7. La phase M.....	62
II.3.7.1. Généralités .....	62
II.3.7.2. Les transitions $G_2/M$ et prophase/métaphase.....	64
II.3.7.3. Condensation des chromosomes.....	65
II.3.7.4. Le fuseau mitotique .....	66
II.3.7.5. Contrôle de l'attachement des chromatides aux microtubules.....	67
II.3.7.6. Contrôle de l'orientation du fuseau et transition anaphase/télophase .....	68
II.3.7.7. Séparation des chromatides et la transition métaphase/anaphase .....	69
II.3.7.8. La cytokinèse.....	71
II.4. Un cycle de destruction protéolytique .....	73
II.5. Le contrôle de l'état de l'ADN.....	76
II.6. Sénescence réplivative .....	79
II.6.1. Caractéristiques .....	79
II.6.2. Implication des CKIs .....	79
<b>III. CELLULES ENDOTHELIALES CORNEENNES HUMAINES NORMALES _____</b>	<b>82</b>
III.1. Absence de prolifération <i>in vivo</i> .....	82
III.1.1. Diminution de la densité cellulaire endothéliale avec l'âge et les traumatismes.....	83
III.1.2. Compensation de la perte cellulaire .....	85
III.1.3. Perte de la fonction endothéliale .....	88
III.2. Capacités prolifératives .....	89
III.2.1. Capacités prolifératives intrinsèques.....	89
III.2.2. Travaux initiaux de Joyce : arrêt en phase $G_1$ du cycle cellulaire.....	92
III.2.3. Différences inter-espèces .....	94
III.2.1. Différences selon l'âge et la topographie centrale ou périphérique .....	97

III.2.1.1. Modèles ex vivo .....	97
III.2.1.2. Modèles in vitro .....	99
III.2.1.3. Cellules endothéliales centrales versus périphériques .....	101
III.2.1.3.1 In vivo .....	101
III.2.1.3.2 In vitro .....	102
III.2.1.3.3 Ex vivo.....	103
<b>III.3. Mécanismes contribuant à l'inhibition proliférative <i>in vivo</i> .....</b>	<b>108</b>
III.3.1. Longueur des télomères .....	108
III.3.2. Facteurs de croissance.....	111
III.3.2.1. Implications de la PLC- $\gamma$ 1, de PI3K et de l'AMPc .....	114
III.3.2.1.1 La phospholipase C- $\gamma$ 1 : PLC- $\gamma$ 1 .....	114
III.3.2.1.2 La phosphatidylinositol 3-kinase : PI3K .....	116
III.3.2.1.3 L'adénosine monophosphate cyclique : AMPc.....	117
III.3.2.2. PTP1B inhibe l'action de l'EGF .....	119
III.3.3. TGF- $\beta$ 2 inhibe l'entrée en phase S.....	124
III.3.4. Inhibition de contact cellules/cellules .....	131
III.3.5. Rôles relatifs du TGF- $\beta$ 2 et de l'inhibition de contact.....	135
III.3.6. Implication de ZO-1 et ZONAB ? .....	137
<b>III.4. Sénescence des CE.....</b>	<b>141</b>
III.4.1. Caractéristiques .....	141
III.4.2. p53 .....	142
III.4.3. Les CKIs : acteurs majeurs de la sénescence répliquative des CE .....	144
III.4.3.1. p27 <sup>KIP1</sup> .....	145
III.4.3.1.1 Un inhibiteur impliqué dans l'arrêt de la prolifération .....	145
III.4.3.1.2 Régulation de l'ubiquitination/dégradation de p27 <sup>KIP1</sup> .....	148
III.4.3.2. Des différences d'expression selon l'âge .....	154
III.4.3.3. Relance de la prolifération par inhibition de p21 <sup>CIP1</sup> et p16 <sup>INK4a</sup> .....	157
III.5. Mécanismes de régulation de la prolifération des CE : tentative de synthèse .....	159

**PARTIE EXPERIMENTALE ..... 168**

<b>I. OBJECTIF DE CETTE THESE .....</b>	<b>169</b>
<b>II. ARTICLE 1 .....</b>	<b>171</b>
Cell cycle genes expression in adult human corneal endothelium.....	171
<b>III. ARTICLE 2 .....</b>	<b>172</b>
Original method for pan-corneal endothelial viability assessment. Application to pre-cut endothelial grafts by eye bank.....	172
<b>IV. CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>173</b>

<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>175</b>
<b>ANNEXES</b> .....	<b>215</b>
<b>I. CURRICULUM VITAE</b> .....	<b>216</b>
<b>II. LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS</b> .....	<b>222</b>
II.1. PUBLICATIONS .....	222
II.2. COMMUNICATIONS .....	223
<b>III. ARTICLES</b> .....	<b>227</b>
III.1. ARTICLE 1 .....	228
Ex vivo Gene Electrotransfer to the Endothelium of Organ-Cultured Human Corneas .....	228
III.2. ARTICLE 2 .....	241
Use of Poloxamers for Deswelling of Organ-Cultured Corneas .....	241
III.3. ARTICLE 3 .....	252
Adaptation des banques de cornées à la préparation et à l'évaluation des greffons cornéens adaptés aux nouvelles techniques de greffe .....	252
III.4. ARTICLE 4 .....	258
Starting the Zebrafish Pineal Circadian Clock with a Single Photic Transition .....	258

## RESUME

### CONTRIBUTION A L'ETUDE DU CYCLE DE LA CELLULE ENDOTHELIALE CORNEENNE HUMAINE

Les cellules endothéliales (CE), monocouche de cellules hexagonales jointives situées à la face interne de la cornée, assurent la transparence de ce tissu essentiel à la vision. Peu avant la naissance, ces CE perdent leur capacité proliférative en restant bloquées en phase G<sub>1</sub> du cycle cellulaire. Le non remplacement des cellules mortes est responsable de certaines pathologies cécitantes dont la cornea gutatta et les dystrophies bulleuses du pseudophaque sont les prototypes et comptent parmi les premières indications de greffe de cornée. Les mécanismes moléculaires impliqués dans l'arrêt de la prolifération de ces CE restent très partiellement expliqués. La première partie de cette thèse a pour objectif d'identifier si des changements d'expression transcriptionnelle des gènes régulateurs du cycle cellulaire interviennent au cours de l'organoculture (OC) et de la culture *in vitro*, afin de définir au mieux les cibles potentielles à inhiber ou celles à surexprimer pour re-déclencher une prolifération cellulaire contrôlée. Pour la première fois, nous avons mis en évidence des profils transcriptionnels variables en fonction de l'environnement des CE, avec une activation globale de l'expression des gènes en OC de routine et en culture primaire et l'expression accrue de gènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire en différents points comme DIRAS3, GADD45A, p15 p16, p18 et p19 ou impliqués dans la régulation du cycle des CE comme le complexe ubiquitine/protéasome (culines, APC...), laissant supposer que les freins antiprolifératifs sont encore plus complexes. Dans la seconde partie, nous avons développé une méthode d'analyse de la viabilité de l'endothélium pan-cornéenne afin d'évaluer au mieux la viabilité des cellules endothéliales sur les greffons. Nous avons développé un outil innovant de mesure combinant un triple marquage Hoechst/Ethidium/Calcéine AM à l'analyse pan-endothéliale permettant d'évaluer de définir la notion originale de densité en cellules viables d'une cornée. Cette technique peut être appliquée à l'analyse de n'importe quel procédé chirurgical ou non, susceptible d'altérer directement ou indirectement l'endothélium cornéen.

Mots Clés : Endothélium ; Cornée ; Humain ; Cycle cellulaire, Prolifération ; Viabilité cellulaire

## ABSTRACT

### CONTRIBUTION TO THE STUDY OF THE CYCLE OF HUMAN CORNEAL ENDOTHELIAL CELL

Corneal endothelial cells (EC) form a monolayer of hexagonal contiguous cells located at the inner surface of the cornea and are responsible for maintenance of its transparency, and therefore essential for vision. Just before birth, they lose their proliferative capacity and remain blocked in the G<sub>1</sub> phase of the cell cycle. The absence of cell replacement by mitosis induces is responsible for certain blinding diseases such as cornea gutatta and pseudophakic bullous keratopathy, two prototype endothelial diseases that are among the first indications of corneal graft. The molecular mechanisms involved in the non-proliferation of EC remain only partially explained. The first part of this thesis aimed to identify whether changes in transcriptional expression of cell cycle regulators genes occurred during organ culture (OC) and during *in vitro* culture, in order to better define the potential targets to inhibit or to overexpress necessary to trigger a controlled cell proliferation. For the first time we have highlighted variable transcriptional profiles depending on endothelial environment, with a global activation of gene expression in routine OC and in primary cultures, especially with an increased expression of genes involved in cell cycle arrest at different points like DIRAS3, GADD45, p15 p16, p18 and p19 or involved in cycle regulation as the ubiquitin/proteasome complex (Culines, APC ...), suggesting that the antiproliferative brakes are even more complex than previously reported. In a second part we developed an original method of pan-corneal endothelial viability assessment. This innovative measurement tool combines a triple Hoechst/Ethidium/Calcein-AM labeling with a pan-endothelial image analysis allowing to define the new concept of viable endothelial cell density, that represent the real viable cell pool of a cornea. This technique can be applied to the analysis of any procedure (surgical or not), likely to directly or indirectly alter the corneal endothelium.

Keywords: Endothelium; Cornea; Human; Cell cycle; Proliferation; Cell viability

## TABLE DES ILLUSTRATIONS

### FIGURES

Figure 1 : Les phases et les éléments majeurs du cycle de division cellulaire.....	23
Figure 2 : Evénements mitotiques.....	26
Figure 3: Les CDKs contrôlent le cycle cellulaire.....	34
Figure 4 : Implication des CDKs et de leurs cyclines associées au cours du cycle cellulaire.....	37
Figure 5: Localisation cellulaire de la cycline B1 au cours de l'interphase et de la mitose.....	41
Figure 6 : Activation de CDK2 par la Cycline A.....	43
Figure 7 : Illustration des voies de régulation des CDKs au cours du cycle cellulaire.....	44
Figure 8 : Représentation schématique de la régulation des protéines CIP/KIP.....	48
Figure 9 : Régulation de l'activité des complexes Cyclines/CDKs par CAK.....	49
Figure 10 : Activation/inactivation du complexe CDK1/Cycline B par phosphorylation.....	52
Figure 11 : Régulation de la transition $G_0/G_1$ .....	55
Figure 12 : Régulation de la progression en $G_1$ .....	57
Figure 13 : Mise en place des complexes pré-réplicatifs en fin de phase $G_1$ .....	58
Figure 14 : Mécanismes d'inhibition de la re-réplication pendant les phases S, $G_2$ et M.....	59
Figure 15 : Régulation de la transition $G_1/S$ .....	60
Figure 16 : Phase S, réplication de l'ADN.....	61
Figure 17 : Nouvelle nomenclature de la Mitose, s'appuyant sur les événements moléculaires.....	63
Figure 18 : Contrôle de la transition $G_2/M$ .....	65
Figure 19 : Régulation de la condensation de la chromatine.....	66
Figure 20 : Contrôle de l'attachement des chromatides aux microtubules.....	68
Figure 21 : Contrôle de l'orientation du fuseau mitotique.....	69
Figure 22 : Régulation de la séparation des chromatides au cours de l'anaphase.....	70
Figure 23 : Régulation de la cytokinèse.....	72
Figure 24 : Réactions enzymatiques principales de la protéolyse protéine spécifique ubiquitine dépendante.....	73
Figure 25 : Régulation du cycle cellulaire par la voie ubiquitine/protéasome.....	74
Figure 26 : Le contrôle de l'état de l'ADN et blocage en $G_1$ ou en $G_2$ .....	76
Figure 27 : Fonctions de p53 dans la réponse à l'endommagement de l'ADN.....	77
Figure 28 : Schéma synthétique représentant la régulation de la phase $G_1$ par les complexes Cycline/CDK et les CKIs.....	81
Figure 29 : DCE (cellules/mm <sup>2</sup> ) en fonction de l'âge.....	83
Figure 30 : Polymégéthisme et pléomorphisme des cellules endothéliales cornéennes humaines liés à l'âge.....	86
Figure 31 : Progression du cycle cellulaire des CE provenant de donneurs jeunes et âgés.....	98

Figure 32 : Différences liées à l'âge des CE in vitro en réponse aux stimuli mitogéniques.....	100
Figure 33 : Pourcentage moyen de CE centrales et périphériques MCM2 <sup>+</sup> cultivées à partir de donneurs jeunes et âgés.....	103
Figure 34 : Comparaison de la DCE périphérique et centrale dans une zone de lésion sur des cornées provenant de donneurs âgés ou jeunes.....	105
Figure 35 : Comparaison du pourcentage de CE MCM2 <sup>+</sup> périphériques et centrales dans une zone de lésion sur des cornées provenant de donneurs âgés ou jeunes.....	106
Figure 36 : Analyse histochimique de l'activité de SA-β-Gal dans les CE sur des cornées ex vivo.....	107
Figure 37 : Effet des inhibiteurs de la PKC et des oligonucléotides antisens PKC-α sur l'expression protéique de la cycline E.....	113
Figure 38 : Schéma récapitulatif de l'action de la PLC-γ1, de PIK3 et de l'AMPc dans la régulation du cycle cellulaire des CE cornéennes après stimulation par le FGF-2.....	118
Figure 39 : Localisation de PTP1B dans des CE cornéennes humaines ex vivo et in vitro.....	121
Figure 40 : Effet de l'inhibiteur à PTP1B sur l'entrée du cycle cellulaire des CE en réponse à une stimulation à l'EGF.....	122
Figure 41 : Action de PTP1B sur la régulation du cycle cellulaire des cellules endothéliales cornéennes après stimulation avec du FGF-2.....	123
Figure 42 : Effet du TGF-β1 et -β2 sur l'incorporation de BrdU par les CE cornéennes de lapin.....	125
Figure 43 : Effets du TGF-β2 exogène et du TGF-β2 de l'humeur aqueuse sur l'entrée en phase S des CE cornéennes de rat.....	126
Figure 44 : Effets différentiels du TGF-β2 sur la proliférations des CE de rat in vitro.....	128
Figure 45 : Action du TGF-β2 dans l'inhibition de la prolifération des CE cornéennes.....	130
Figure 46 : L'EDTA rompt les contacts intercellulaires dans la monocouche endothéliale.....	133
Figure 47 : L'EDTA favorise la division cellulaire des CE cornéennes humaines traitées avec des mitogènes.....	134
Figure 48 : Mécanismes supposés de régulation du cycle cellulaire par ZO-1 et ZONAB dans les cellules endothéliales cornéennes humaines.....	140
Figure 49 : Expression de p53 dans l'endothélium cornéen humain.....	143
Figure 50 : Nombre de CE marquées positivement pour p27 <sup>KIP1</sup> et PCNA dans le centre et la périphérie des cornées de souris.....	145
Figure 51 : Nombre de noyaux dans l'endothélium cornéen de souris sauvages et knockout pour p27 <sup>KIP1</sup> âgées de 12 semaines.....	146
Figure 52 : Augmentation du nombre relatif de CE de rat cultivées après traitement avec des oligonucléotides antisens p27 <sup>KIP1</sup> .....	147
Figure 53 : Nombre de cellules dans des cultures confluentes de CE humaines traitées avec un siRNA spécifique à p27 <sup>KIP1</sup> .....	147
Figure 54 : Voies de phosphorylation et de dégradation de p27 <sup>KIP1</sup> dans des CE cornéennes après stimulation avec du FGF-2.....	153
Figure 55 : Immunomarquages de p16 <sup>INK4a</sup> , p21 <sup>CIP1</sup> et p27 <sup>KIP1</sup> dans des CE cornéennes humaines in situ.....	154

Figure 56 : Analyse de l'expression protéique totale de Rb ainsi que de sa forme phosphorylée dans des CE humaines in vitro..... 155

Figure 57 : Exemple représentatif de l'effet du traitement avec deux siRNA anti p21<sup>CIP1</sup>+p16<sup>INK4a</sup> sur l'expression protéique de p21<sup>CIP1</sup> and p16<sup>INK4a</sup> dans des CE humaines in vitro..... 158

Figure 58 : Principaux mécanismes moléculaires connus régulant la prolifération des CE..... 162

## TABLEAUX

Tableau 1: Durées des phases du cycle cellulaire in vitro et in vivo de quelques types cellulaires différents. .... 28

Tableau 2: Propriétés et fonctions des Cyclines et CDKs connues. .... 33

Tableau 3: Propriétés des CKIs connues. .... 45

Tableau 4 : Expression des protéines du cycle cellulaire dans l'endothélium cornéen d'humain et de rat. .... 95

Tableau 5 : Statut prolifératif des CE chez différentes espèces. .... 96

Tableau 6 : Critique de la littérature. .... 163

## LISTE DES ABREVIATIONS

### A.

ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AMPc	Adénosine MonoPhosphate cyclique
Apaf-1	Apoptotic peptidase activating factor 1
APC	Anaphase Promoting Complex
ARF	ADP Ribosylation Factor
ARN	Acide RiboNucléique
ARNm	ARN messenger
ATM	Ataxia-Telangiectasia Mutated
ATP	Adénosine TriPhosphate
ATR	ATM and Rad3-related

### B,C.

BiiGC	Biologie, ingénierie et imagerie de la Greffe de Cornée
BrdU	Bromodeoxyuridine
CAK	CDK Activating Kinase
CDC	Cell Division Cycle
Cdh1	Cdc20 Homologue
CDK	Cyclin Dependant Kinase
Cdt1	Cdc10-dependant transcript 1
CE	Cellules Endothéliales
CHED	Corneal Hereditary Endothelial Deficiency
CIP/KIP	CDK Inhibiting Protein
CKI	CDK Inhibitors
COX-2	CycloOXygenase-2
CRM1	Chromosome Region Maintenance 1
CRS	Cytoplasmic Retention Signal
CTD	Carboxy-Terminal Domain

### D,E.

DCE	Densité Cellulaire Endothéliale
DDK	Dbf4 Dependent Kinase
Dlg	Discs large
EDTA	Ethylène Diamine Tetra Acétique
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	EGF Receptors
EGTA	Ethylene Glycol Tetraacetic Acid
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ERK	Extracellular signal Regulated Kinase

## **F,G.**

FCH	FER/CIP4-Homology
FGF	Fibroblast Growth Factor
FGFR	FGF Receptors
FHS	Fetal Human Serum
FISH	Fluorescence In Situ Hybridization
FITC	Fluorescéine IsoThioCyanate
GAP	GTPase Activating Protein
GDP	Guanosine DiPhosphate:
GTP	Guanosine TriPhosphate

## **H,I.**

HDAC	Histone DésACétylase
HECT	Homologous to the E6-AP Carboxyl Terminus
HGF	Hepatocyte Growth Factor
hTERT	human TElomerase Reverse Transcriptase
IGF	Insulin-like Growth Factor
IGFBP	Insulin-like Growth Factor Binding Protein
INCENP	Inner CENTromere Protein
INK	INHibitor of CDK
IP	Iodure de Propidium
IQGAP	IQ motif containing GAP homolog

## **K,L,M.**

kDa	kilo Dalton
KGF	Keratinocyte Growth Factor
KPC	KIP1 ubiquitination-promoting complex
LMB	Leptomycine B
M	Mitose
MAD2	Mitotic Arrest Deficient 2
MAGUK	Membrane-Associated GUanylate Kinases
MAP	Mitogen-Activated Protein
MAP	Microtubule Associated Proteins
MAT1	Ménage À Trois
MCAK	Mammalian Centromere-Associated Kinesin
MCM	Mini-Chromosome Maintenance
MDCK	Madin-Darby canine kidney
MDM2	Murine Double Minute 2
MEM	Minimum Essential Medium
MIK1	Mitotic Inhibitor Kinase 1
MP	Microscopie Photonique
MPF	Maturation Promoting Factor/M-phase Promoting Factor
MRLC	Myosin Regulatory Light Chain
MS	Microscopie Spéculaire

## **N,O.**

NEBD	Nuclear Envelope BreakDown
NGF	Nerve Growth Factor
OC	OrganoCulture
ORC	Origin Recognition Complex

## **P.**

PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PDGF-BB	Platelet-Derived Growth Factor-BB
PDZ	PSD95-Dlg-ZO-1
PGE2	Prostaglandine E2
PI	PhosphoInositide
PI3K	PhosphatidylInositol 3-Kinases
PIKK	PhosphoInositide 3-Kinase-like Kinase
PKA	Protéine Kinase A
PKC	Protéine Kinase C
PLC	PhosphoLipase C
Plk1	Polo like kinase
PNA	Peptide Nucleic Acid
Pol	DNA Polymerase
pRb	Retinoblastom protein
pré-RC	Complexe de pré-réplication
PSD95	PostSynaptic Density 95
PTP1B	Protéine Tyrosine Phosphatase 1B
PTEN	Phosphatase and TENSin homolog
PTP	Protéines Tyrosine Phosphatases

## **Q,R,S.**

Q-FISH	Quantitative Fluorescence In Situ Hybridization
Rb	Rétinoblastome
RFC	Replication Factor C
RPA	Replication Protein A
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerisation Chain Reaction
SA- $\beta$ -Gal	Senescence-Associated $\beta$ -Galactosidase
SCF	Skp1/Cullin/F-box protein
SIPS	Stress-Induced Premature Senescence
SMC	Structural Maintenance of Chromosomes
SOV	Sodium OrthoVadate
SVF	Sérum de Veau Fœtal

## **T,Z.**

TFIIH	Transcription Factor IIIH
TGF	Transforming Growth Factor
Tome-1	Trigger of mitotic entry
TRF	Terminal Restriction Fragments
TSP-1	ThromboSPondine de type 1
ZONAB	ZO-1-associated Nucleic Acid Binding protein
ZO-1	Zonula Occludens

# **PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE**

## I. INTRODUCTION

L'endothélium cornéen est l'objet de toutes les attentions de la part des ophtalmologistes depuis 150 ans, après que Theodor Leber (1840-1917) ait clairement démontré en 1873 son rôle clé dans la physiologie cornéenne. Couche cellulaire apparemment simple, au moins dans son aspect, sa fonction dans le maintien de la transparence est aussi importante dans la performance globale du système visuel que peut l'être la rétine pourtant hautement complexe et différenciée. Cependant son observation en clinique est restée très longtemps difficile ou impossible et son implication dans différentes pathologies longtemps méconnue. Ainsi, lorsqu'en 1910 Ernst Fuchs (1851-1955) a décrit la dystrophie cornéenne oedémateuse qui portera son nom, il n'a pas saisi que le *primum movens* était endothélial. Une évolution décisive a été apportée par Alfred Vogt (1879-1943) en 1920 avec la première description de l'observation de l'endothélium au biomicroscope par l'éclairage spéculaire, où l'image des cellules se reflète sur l'interface avec l'humeur aqueuse. La vulnérabilité de l'endothélium, affecté par de nombreux processus pathologiques différents et avec des possibilités de cicatrisation rapidement dépassées, a été rapidement reconnue témoignant déjà du statut non prolifératif des cellules endothéliales (CE) [1]. Cette particularité est au centre de notre travail de Thèse.

La prise en charge des pathologies endothéliales cornéennes comporte deux volets : le diagnostic et le traitement lui-même. Le diagnostic fait appel à l'observation au biomicroscope et au microscope spéculaire qui permet de déterminer la densité cellulaire endothéliale, les paramètres de régularité de taille (polymégéthisme) et de forme (polymorphisme) qui fournissent des indications sur le type de pathologie, son ancienneté, et la longévité prévisible de la transparence cornéenne. La mise en évidence d'images particulières (apparaissant le plus souvent noire en spéculaire, les « *dark spots* ») peut être pathognomoniques de certaines pathologies : dystrophie endothéliale de Fuchs principalement, plus exceptionnellement dystrophie polymorphe postérieure. Enfin, lorsque la transparence cornéenne est altérée, la microscopie confocale in vivo peut fournir des images de l'endothélium assez similaire à celle d'un spéculaire. L'absence de traitement étiologique des dystrophies endothéliales reflète notre ignorance des mécanismes primaires de ces affections. Jusqu'à présent le traitement curatif unique de cet ensemble de pathologies est la greffe de cornée qui apporte un endothélium sain. Depuis plus d'un siècle la greffe de cornée consiste à remplacer la totalité de l'épaisseur cornéenne (greffe dite perforante ou transfixiante). L'explosion récente des greffes endothéliales de tout type dont le principe

chirurgical avait été décrit par Charles Tillett en 1954 au Wilmer Eye institute (Baltimore USA) et dont les développements actuels ont été popularisés par Gerrit Melles à partir de 1998 (Rotterdam, Pays Bas), Mark Gorovoy (Fort Myers, Florida), Marc Terry (Devers Eye Institute, Portland, USA), et Francis Price (Indianapolis, USA) apporte en regain d'intérêt pour l'endothélium cornéen. L'avenir de la greffe de cornée paraît bien engagé dans le remplacement sélectif du tissu pathologique en préservant le reste de la structure cornéenne saine. Par contre, il est fort à parier que l'origine du greffon va évoluer : actuellement issue de la découpe d'une cornée de donneur, les progrès lents mais constant du « *bioengineering* » endothélial devrait pouvoir fournir des endothéliums allogéniques bioartificiels constitués de culture de cellules endothéliales sur un support transparent permettant son insertion dans l'œil du receveur. A coté de ces greffes endothéliales les greffes perforantes conservent toutes leurs lettres de noblesse pour de nombreuses situations. Elle reste également la technique de référence pour les nombreux centres qui n'ont pas accès à la chirurgie lamellaire.

La compréhension des mécanismes qui régissent la non-prolifération des CE humaines est donc un prérequis nécessaire à l'optimisation des conditions de conservation des greffons cornéens, à la culture de masse des cellules et probablement également aussi au traitement *in vivo* des stades précoces des pathologies endothéliales. Savoir déclencher et contrôler une prolifération permettrait d'une part d'améliorer l'endothélium des greffons de pleine épaisseur pour les kératoplasties perforantes et les greffons endothéliaux (plus de greffons disponibles et des greffons de meilleure qualité), de développer sans limite des greffons endothéliaux par bio-ingénierie tissulaire et d'autre part de favoriser *in vivo* l'augmentation de la densité cellulaire endothéliale. Il s'agit donc d'un des objectifs majeurs du laboratoire Biologie, ingénierie et imagerie de la Greffe de Cornée (BiiGC). Nous explorons, par plusieurs méthodes biologiques complémentaires, les gènes et les protéines qui contrôlent le cycle cellulaire, c'est-à-dire la machinerie qui bloque la capacité proliférative de ces cellules très différenciées. Lorsque nous aurons compris le fonctionnement des freins, nous pourrons proposer des méthodes pour les supprimer.

La première partie de cette thèse constitue une synthèse bibliographique d'une part des mécanismes généraux de contrôles du cycle cellulaire chez les mammifères et d'autre part des mécanismes spécifiques impliqués dans l'inhibition de la prolifération des cellules endothéliales cornéennes humaines. Seules trois équipes ont une production scientifique significative sur ce sujet : le laboratoire de NC Joyce au Schepens Eye Reserach Institute de Boston, USA ; le laboratoire de EP Kay au Doheny Eye Institute de Los Angeles ; et le

laboratoire de TY Kim au Département d'Ophtalmologie de l'Université de Kon Yang à Séoul, Corée. Leurs travaux sont résumés et intégrés dans un schéma d'ensemble des connaissances actuelles.

## II. LE CYCLE CELLULAIRE

Jusqu'au XIX<sup>ème</sup> siècle, les scientifiques n'avaient qu'une vague idée des éléments constituant les êtres vivants et de la façon dont ceux-ci pouvaient se développer et croître. En 1665, l'Anglais Robert Hooke avait bien décrit les unités microscopiques qu'il discernait. Il les nomma cellules, du latin *cellula* (petite chambre). À la fin des années 1830, deux Allemands, le botaniste Matthias Schleiden (1804–1881), puis le zoologiste Théodor Schwann (1810–1882), ont proposé la « théorie cellulaire » faisant de la cellule l'unité de base de tout organisme vivant. En 1858, l'Allemand Rudolf Virchow (1821–1902) a complété cette théorie en formulant le célèbre axiome en 1826 : « *omni cellula e cellula* » (toute cellule provient d'une cellule) conduisant au concept de multiplication cellulaire par division. L'œuf issu de la fécondation d'une cellule sexuelle femelle par un gamète mâle, et qui donne naissance à un embryon à partir duquel se construit, division après division, un organisme aussi complexe que l'homme, est devenu, à la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle, le symbole de ce processus vital.

La division cellulaire est le processus fondamental par lequel une cellule-mère donne deux cellules-filles identiques entre elles et à la cellule dont elles dérivent. C'est un processus essentiel au développement embryonnaire, bien entendu, mais également vital pendant toute la vie de l'organisme adulte. Ainsi, l'être humain adulte est constitué d'environ 10 000 milliards de cellules provenant toutes, par divisions cellulaires successives, d'une cellule initiale, le zygote. La division cellulaire a été découverte il y a plus de 150 ans, et a fait l'objet de très nombreuses études en raison de son caractère fondamental pour toute vie. En revanche sa régulation intracellulaire n'est connue que depuis quelques décennies, grâce aux travaux entrepris sur des modèles biologiques aussi variés que les levures, les embryons d'oursin, les ovocytes d'étoile de mer et d'amphibiens ou les cellules de mammifères en culture. En effet l'extrême conservation des gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire a permis des études croisées et des échanges d'outils moléculaires. La complémentarité d'approche et la convergence des résultats ont finalement abouti à l'établissement d'un modèle général de contrôle intracellulaire de la division. Tous ces travaux ont été couronnés par l'attribution en Octobre 2001 du Prix Nobel de Physiologie et de Médecine à trois acteurs essentiels du décryptage des mécanismes régulant le cycle cellulaire, les Britanniques Tim Hunt et Paul Nurse, et l'Américain Leyland Hartwell.

Ce mécanisme de division cellulaire est extrêmement complexe et est régulé par un grand nombre de protéines intervenant très transitoirement et dans un ordre précis, permettant

ainsi la succession précise des différentes étapes du cycle cellulaire. Ce mécanisme est hautement conservé à travers l'évolution et opèrent de la même manière chez tous les organismes eucaryotes.

Nous nous proposons dans cette partie, de décrire les principaux aspects fondamentaux qui régissent la progression du cycle cellulaire chez les êtres vivants.

## II.1. Les phases du cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est un événement universel permettant la division des cellules et ainsi, participe à la croissance et au développement des organismes vivants [2]. Les eucaryotes, de la levure à l'homme, ont des cycles de division cellulaire similaires. Le cycle cellulaire est constitué d'ensembles d'événements moléculaires et cellulaires orchestrés dans le temps et l'espace et qui doivent se réaliser suivant un ordre chronologique précis. Il permet ainsi le maintien d'une information génétique constante en quantité et en qualité au niveau des chromosomes malgré la duplication des cellules de génération en génération.

Chez les Eucaryotes, le cycle cellulaire est divisé en deux grandes étapes : l'interphase (**I**), phase de croissance cellulaire continue où les chromosomes ne sont pas visibles, et la mitose (**M**) (du mot grec *Mito* qui signifie « filet ») où les chromosomes, visibles et condensés, ségrégent pour donner deux cellules filles identiques. L'interphase est classiquement subdivisée en trois phases : **G<sub>1</sub>**, **S** et **G<sub>2</sub>** (**Figure 1**) [3, 4]. Même si des modèles descriptifs différents ont été proposés (modèle à 12 phases de Darzynkiewicz [5] et modèle à 2 phases de Smith [6]), le modèle commun du cycle cellulaire est celui d'un cycle en quatre phases de Howard [7] : G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> et M qui se succèdent dans un ordre immuable. Au cours de l'interphase, le noyau de la cellule est limité par une enveloppe nucléaire, alors que la mitose est caractérisée par la disparition de cette enveloppe et par l'apparition des chromosomes.

Ces phases se retrouvent dans la plupart des divisions cellulaires, à l'exception des premières divisions embryonnaires chez la Drosophile ou le Xénope, caractérisées par une succession rapide de phases S et M. Les quatre phases s'enchaînent de façon coordonnée, chaque phase ne pouvant commencer que lorsque la précédente s'est déroulée correctement. De nombreux mécanismes de contrôle (« *checkpoints* ») assurent une sorte de « contrôle qualité » à chaque étape et bloquent le déroulement du cycle lorsqu'une anomalie (endommagement de l'ADN, ADN non complètement répliqué, chromosomes non attachés au fuseau mitotique par exemple) est détectée [8, 9].

# INTERPHASE

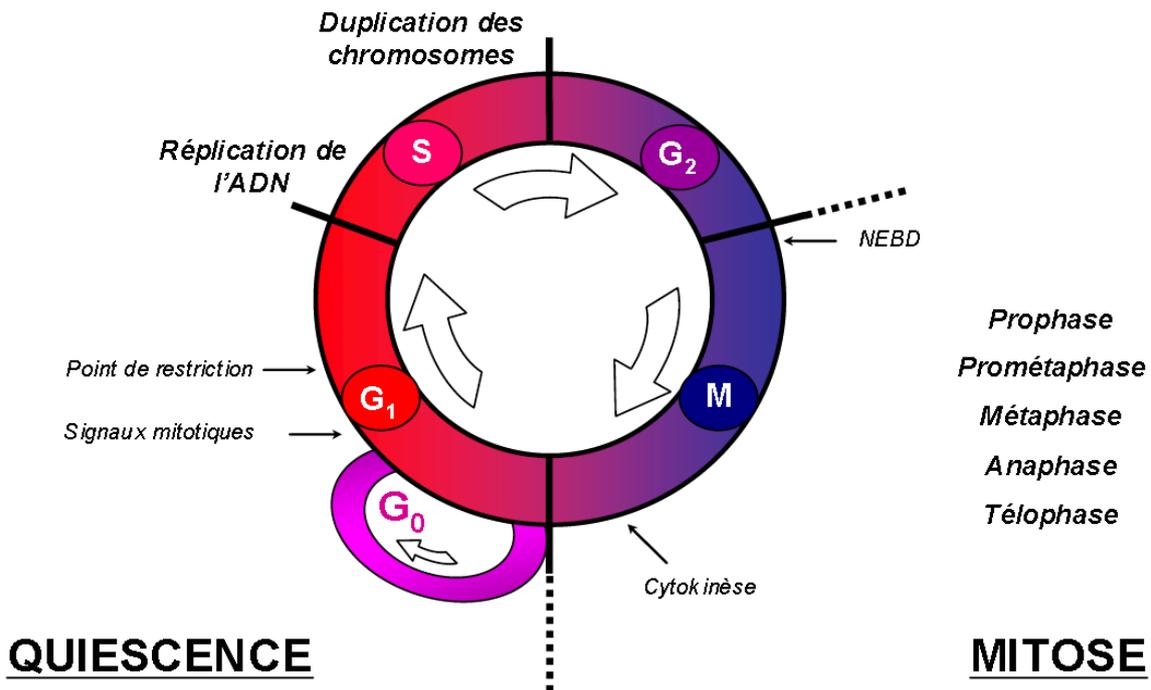


Figure 1 : Les phases et les éléments majeurs du cycle de division cellulaire.

Sous l'effet de signaux mitogènes, les cellules entament un cycle de division. L'interphase, constituée des phases G<sub>1</sub>, S et G<sub>2</sub>, permet à la cellule de répliquer son ADN et de dupliquer ses chromosomes afin de préparer l'étape de la mitose. Lorsque les cellules ne se divisent pas, elles sont dites en quiescence ou en phase G<sub>0</sub>. (NEBD : « Nuclear Envelope BreakDown »)

## *II.1.1. L'interphase*

Chez les Eucaryotes, l'interphase est subdivisée en trois phases : G<sub>1</sub>, S et G<sub>2</sub>.

### *II.1.1.1. La phase G<sub>1</sub>*

La phase G<sub>1</sub> (pour Gap 1, jonction 1), de durée variable, est définie comme la première phase traversée par la cellule après la division cellulaire. Par définition stricto sensu elle succède à la division cellulaire et précède la phase S. La phase G<sub>1</sub> est une phase au cours de laquelle la cellule choisit de proliférer, d'attendre ou de se différencier. Deux facteurs jouent un rôle prépondérant sur le comportement de la cellule lors de cette phase : la croissance et les facteurs environnementaux et physiologiques (disponibilité en nutriments, mitogènes, hormones, augmentation de masse cellulaire, lumière pour les cellules végétales). La croissance cellulaire est l'ensemble des mécanismes permettant à la cellule nouvellement née de gagner « une taille et un poids normal ». L'environnement de la cellule est primordial car c'est lui qui poussera ou non, par la balance entre facteurs de croissance et facteurs de différenciation, la cellule à se diviser. Ces facteurs n'influencent la cellule que pendant une période définie de la phase G<sub>1</sub>, de telle sorte que lorsque les conditions sont favorables, la

cellule s'engage irréversiblement dans le cycle de division. La perte de sensibilité aux facteurs environnementaux ainsi que l'irréversibilité de « l'induction » de la cellule dans la phase de synthèse de l'ADN définit le point de restriction R chez les eucaryotes supérieurs [10, 11] et point de transition START chez les levures [12]. Au-delà de cette transition, la cellule achève son cycle cellulaire indépendamment des facteurs exogènes [13]. L'identification des mécanismes moléculaires correspondant au point R est un sujet d'actualité.

#### *II.1.1.2. Le point de restriction R*

Une cellule ne peut entrer en cycle que sous l'effet de facteurs stimulateurs appelés mitogènes. Pendant la phase  $G_1$ , la cellule décide si elle continue à progresser dans le cycle cellulaire, ce qui aboutira à la division cellulaire, ou si elle quitte le cycle et entre alors dans un état de quiescence ( $G_0$ ) ou de différenciation. Les mécanismes qui contrôlent la croissance cellulaire et la différenciation dans les organismes multicellulaires semblent donc liés à la machinerie du cycle cellulaire présente en phase  $G_1$ .

Dès 1971, Temin a montré que des cellules de poulet deviennent indépendantes des signaux mitogènes extérieurs plusieurs heures avant d'entrer en phase S [14]. Cette notion a été reprise et développée plus tard par Pardee qui a introduit le terme de point de restriction (R) [10]. R est le moment de  $G_1$  après lequel les cellules peuvent proliférer indépendamment des stimuli extérieurs.

La progression en début de phase  $G_1$  des cellules qui sortent de mitose (cellules dites postmitotiques, pm) est rapidement interrompue si on enlève les facteurs de croissance du milieu de culture ou si on inhibe la synthèse protéique [15]. Néanmoins, au-delà d'un certain temps après la mitose (qui diffère selon le type de cellule, fibroblastique ou épithéliale par exemple) les cellules ne s'arrêtent plus, même si les facteurs mitogènes sont retirés du milieu, mais avancent et effectuent un cycle complet. On distingue donc les cellules dites  $G_1$ -pm (cellules postmitotiques arrêtées par la privation en facteurs de croissance) et les cellules dites  $G_1$ -ps (préphase S) qui sont capables d'initier une réplication de l'ADN en absence de facteurs mitogènes. La transition qui fait passer une cellule de la phase  $G_1$ -pm à la phase  $G_1$ -ps correspond au terme anglo-saxon *commitment* : c'est l'engagement irréversible de la cellule vers un cycle chromosomique complet. Cette transition correspond au point R dit de restriction.

### II.1.1.3. La phase S

La phase S est la phase de synthèse de l'ADN (réplication des chromosomes à l'identique). Le brin nouvellement synthétisé est exactement complémentaire à la matrice. Sa durée, peu variable, est principalement dépendante de la quantité d'ADN à répliquer et du nombre de sites de réplication actifs en parallèle. Ainsi observe-t-on une durée de phase S plus longue dans le cas de cellules polyploïdes (possédant du matériel chromosomique en excès). La synthèse de l'ADN est coordonnée avec celle des histones : les ARNm des histones sont synthétisés au cours de la phase S puis détruits immédiatement après la réplication. Cette phase se caractérise par l'arrêt de la synthèse des autres ARN.

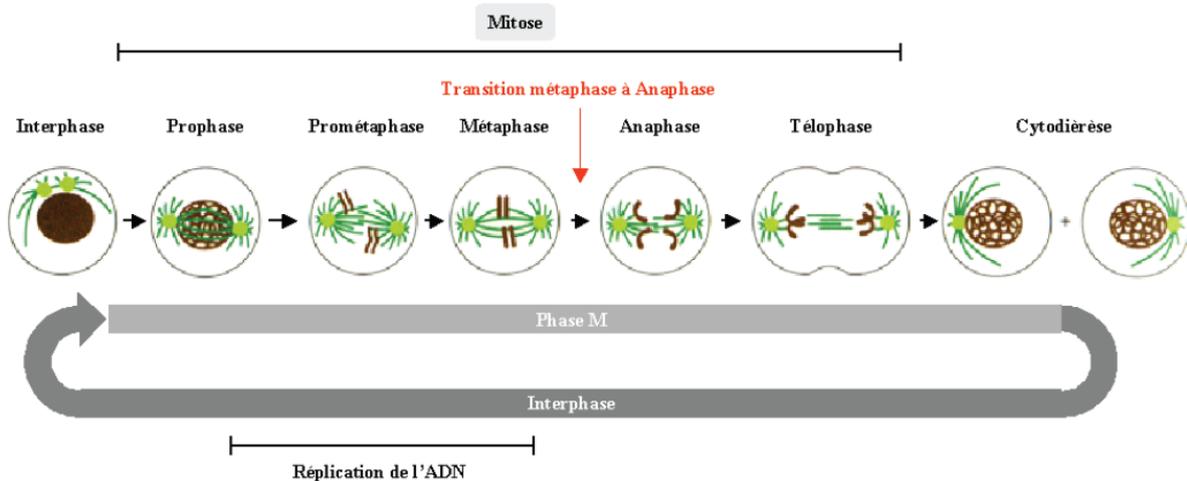
### II.1.1.4. La phase G<sub>2</sub>

La phase G<sub>2</sub> (pour gap 2) est une phase courte, d'une durée de 4 à 5 heures, débutant dès que la réplication de l'ADN est achevée. La cellule contient le double de la quantité habituelle d'ADN : c'est une cellule *tétraploïde*. Il s'agit d'une phase de « sécurité » au cours de laquelle la cellule a le temps de réparer d'éventuelles erreurs commises lors de la réplication de son ADN. Cette étape de transition permet à la cellule de se préparer à la division mitotique (augmentation de la masse cellulaire, synthèse des éléments nécessaires à la mitose). Un certain nombre de facteurs sont synthétisés en particulier les facteurs de condensation des chromosomes ou protéines SMC (« *Structural Maintenance of Chromosomes* »). Les protéines SMC rappellent, par leur structure, celle de la kinésine et de la myosine. Il s'agit de protéines mécano-chimiques de la chromatine (protéines motrices de la chromatine). L'activité d'un tel moteur provoque l'enroulement de la chromatine et permet sa condensation. Au cours de cette phase, il se produit aussi des phosphorylations des histones H1, qui interviendraient également dans la condensation des chromosomes.

### II.1.2. La mitose ou phase M

Il s'agit de la phase durant laquelle la cellule réalise sa division en deux cellules filles. Elle est classiquement découpée en cinq périodes : prophase, terminée par la rupture de l'enveloppe nucléaire (NEBD, « *Nuclear Envelope Breakdown* ») ; prométaphase ; métaphase ; anaphase et télophase. Brièvement, au cours de la mitose l'enveloppe nucléaire se désagrège, les chromosomes se condensent et deviennent visibles sous la forme d'entités indépendantes (prophase). Les deux organisateurs des microtubules, ou corps polaires, se déplacent pour se retrouver chacun d'un côté du noyau. Des faisceaux de microtubules se développent à partir des corps polaires pour former le fuseau mitotique. Quelques-uns de ces

microtubules s'attachent aux kinétochores des chromosomes qui, ainsi attachés, s'alignent alors sur la plaque métaphasique dans un plan situé à mi-chemin entre les corps polaires (prométaphase et métaphase). Lorsque tous les kinétochores sont attachés aux microtubules et alignés sur la plaque métaphasique, un signal est donné et l'anaphase débute. Les chromosomes commencent à se déplacer vers les pôles qui s'éloignent par ailleurs l'un de l'autre. Les chromosomes regroupés aux pôles cellulaires forment une masse compacte hyperchromatique. La reconstruction du noyau commence : l'enveloppe nucléaire se reforme (télophase). La cytokinèse achève la division de la cellule produisant deux cellules filles. A travers ce mécanisme, les deux cellules filles sont dotées des mêmes chromosomes que ceux de la cellule mère. Après la division, les cellules retournent en phase G<sub>1</sub> terminant ainsi le cycle cellulaire. Cette succession de phases est caractéristique de tous les eucaryotes (**Figure 2**).



**Figure 2 : Evénements mitotiques.**

La mitose étape de division cellulaire, est caractérisée par la condensation de l'ADN en chromosomes, la destruction de l'enveloppe nucléaire, la mise en place du fuseau mitotique pour permettre la ségrégation des chromosomes, et par la scission de la cellule en deux cellules filles identiques.

(Modifié d'après Alberts et al., 1994 [16])

### II.1.3. La phase $G_0$

On désigne généralement par  $G_0$ , la phase de quiescence survenant dans certaines conditions lors de la phase  $G_1$ . Sous l'effet de signaux anti-mitogènes ou suite à la disparition des agents mitogènes, les cellules peuvent quitter le cycle cellulaire et retourner en phase de quiescence  $G_0$ . La phase  $G_0$  est observée *in vitro* lorsque les facteurs de croissance sont supprimés du milieu de culture mais son existence est toujours contestée, certains préférant parler de « cellules arrêtées après suppression de sérum avec un contenu en ADN de phase  $G_1$  » [17]. Plus rarement, une phase  $G_0$  est observée en  $G_2$ . Il s'agit de cas particuliers lorsque la phase  $G_2$  est plus longue chez certains types cellulaires du système immunitaire comme les lymphocytes. Notons qu'il n'existe pas de marqueur précis de la phase  $G_0$  même si la statine, une protéine nucléaire de 57 kDa, a été proposée et est utilisée à cet effet [18, 19, 20].

### II.1.4. Cinétique du cycle cellulaire

La durée d'un cycle est très variable selon le type de cellule et l'organisme (chez l'homme, il existe plus de 200 types cellulaires). Les variations les plus importantes concernent la phase  $G_1$ . La durée d'un cycle est de huit minutes pour une cellule embryonnaire de drosophile et de 24 h pour une cellule somatique de mammifère. Chez la plupart des cellules de mammifère, un cycle dure entre 10 et 30 heures (**Tableau 1**).

Il est généralement admis que les phases S,  $G_2$  et M possèdent des durées fixes dans les cellules normales. Seule la durée de la phase  $G_1$  est très variable (e.g. 6,5 heures dans les fibroblastes humains *in vitro* et 33 heures dans l'épithélium rectal humain *in vivo*) [21, 22]. Dans le cas de cellules cancéreuses, les cinétiques sont beaucoup plus variables et peuvent être proches de la normale (carcinome épidermoïde humain) ou très différentes (carcinome basocellulaire avec une phase  $G_2/M$  très longue).

**Tableau 1: Durées des phases du cycle cellulaire *in vitro* et *in vivo* de quelques types cellulaires différents.**

La phase M est généralement considérée comme possédant une durée fixe de 1 à 3 heures suivant les espèces.

(D'après Wright et al., 1984 [21] et Baserga R, 1985 [22]).

Type cellulaire	Durée du cycle cellulaire (h)	Durée des phases du cycle cellulaire (h)		
		G1	S	G2/M
<b><i>In vitro</i></b>				
Fibroblastes humains	18,0	6,5	7,5	4,0
HeLa S3	21,0	8,0	9,5	3,5
3T3	19,0	8,0	7,0	4,0
<b><i>In vivo</i></b>				
<b><u>Homme</u></b>				
Epithélium de colon	25,0	9,0	14,0	2,0
Epithélium rectal	48,0	33,0	10,0	5,0
Epithélium stomacal	24,0	9,0	12,0	3,0
Cellules de la moelle osseuse	18,0	2,0	12,0	4,0
Carcinome basocellulaire	67,0	36,0	19,0	12,0
Carcinome épidermoïde	24,0	9,0	11,0	4,0
<b><u>Souris</u></b>				
Epithélium de colon	19,0	9,0	8,0	2,0
Cellules des alvéoles pulmonaires	71,0	45,0	22,0	4,0

## II.2. Contrôle du cycle cellulaire par les kinases cyclines-dépendantes (CDK)

La machine de contrôle du cycle cellulaire eucaryote est composée de complexes de protéines qui sont activés dans un ordre précis et qui déclenchent l'initialisation d'événements spécifiques, comme la réplication de l'ADN, la destruction de l'enveloppe nucléaire, la formation des fuseaux achromatiques et la ségrégation chromosomique [23].

Il existe des boucles de contrôle en rétroaction positive et négative reliant des récepteurs de signaux de prolifération et des protéines impliquées dans l'adhérence (intégrines, cadhérines), la transmission en cascades de signaux basés sur l'action de kinases et de phosphatases cytoplasmiques, des protéines de la famille des protéines poches (pocket proteins : pRb, p107 et p130), des **cyclines**, des kinases dépendantes de cyclines (**CDKs**), des protéines inhibitrices de CDK (**CKIs**), des facteurs de transcription (e. g. famille des E2Fs), des facteurs de régulation de la traduction et finalement les gènes eux-mêmes [23, 24]. Cette machinerie protéique est sujette à un contrôle précis qui assure que chaque événement est correctement réalisé dans une séquence ordonnée [25].

### II.2.1. Découverte et caractérisation des complexes CDKs/Cyclines

Même si les aspects morphologiques du cycle cellulaire étaient connus depuis longtemps, les événements moléculaires qui orchestrent et coordonnent les différentes phases n'ont été identifiés qu'à partir des années 70. L'idée que des déterminants moléculaires permettent d'induire certains événements et d'informer la cellule sur sa position dans le cycle cellulaire résulte de travaux réalisés avec des fusions de cellules [26-28]. Une première étude menée sur des ovocytes d'Amphibiens permet l'identification du MPF ou « *Maturation Promoting Factor* » [29, 30]. Une autre était centrée sur des cribles génétiques chez les levures *Saccharomyces cerevisiae* et *Schizosaccharomyces pombe* et conduisit à l'isolement du gène *cdc2* (« *cell division cycle* »).

Le MPF est une activité enzymatique présente dans le cytoplasme et capable d'induire l'entrée en méiose ou en mitose lorsqu'elle est micro-injectée respectivement dans un ovocyte ou une cellule. Cette activité MPF a été mise en évidence dans les ovocytes de différentes espèces [31-33], mais également dans des cellules d'embryons de xénope et de grenouille juste avant leur entrée en mitose [34, 35], dans des cellules de mammifères en culture [36] et dans les levures [37]. Comme le MPF régule aussi bien la méiose que la mitose, il fut renommé « *M-phase Promoting Factor* ». L'activité de ce facteur oscille durant le cycle cellulaire : il est maximal en mitose, disparaît en fin de division pour augmenter pendant

l'interphase suivante [35]. Il est indispensable pour l'entrée en phase M [38, 39], il est associé à une activité protéine kinase [40] et la synthèse et la dégradation de protéines participent à son contrôle [35, 41, 42]. Mais sa caractérisation biochimique ne fut permise que grâce aux études menées en parallèle sur la levure.

Des cribles génétiques réalisés chez la levure permirent l'isolement de souches mutantes dont certaines s'arrêtent en des points spécifiques du cycle cellulaire. Ces mutants furent appelés CDC pour « *Cell Division Cycle* » et correspondent à des mutations thermosensibles ( $cdc^{ts}$ ) [43]. Le premier crible fut réalisé par Hartwell chez la levure à bourgeon *S. cerevisiae* [44] et permit la caractérisation d'un gène important pour sa prolifération, le gène *cdc28* [45-47]. Sur le même principe, un crible était réalisé par Nurse sur la levure à fission *S. pombe*. Des mutants de type CDC furent également isolés ainsi que des mutants qui, au lieu de s'arrêter, rentraient en mitose avec une taille plus petite que la normale [48]. L'étude de ces mutants a notamment permis la caractérisation du gène *cdc2* [49, 50] qui est l'homologue fonctionnel du gène *cdc28* identifié chez *S. cerevisiae* [51] et un régulateur positif de l'entrée en mitose [45, 52]. Le gène *cdc2* fut ensuite caractérisé et code pour une protéine kinase d'environ 34 kDa, nécessaire pour la transition G<sub>2</sub>/M.

Purifié, le MPF est constitué d'un complexe de deux protéines, une de 34 kDa et l'autre de 40 à 60 kDa selon les organismes [53]. Comme un anticorps spécifique de CDC2 ou une colonne d'affinité avec une petite protéine de levure, p13<sup>SUC1</sup> qui se lie à CDC2 [54, 55] sont capables de précipiter la protéine de 34 kDa du MPF [56, 57], il a été démontré que la protéine de 34 kDa du MPF correspond à la protéine CDC2 de *S. pombe* et à CDC28 de *S. cerevisiae* [56-58]. La deuxième protéine du MPF a été identifiée comme une cycline : la cycline B [59, 60].

Les cyclines ont été isolées initialement dans les ovocytes d'oursin. Elles s'accumulent au cours du cycle et sont détruites en fin de mitose [61, 62], ce qui inactive le MPF [63, 64], alors que leur synthèse est nécessaire pour la transition G<sub>2</sub>/M [65]. La présence des cyclines dans le complexe MPF fut notamment démontrée par leur co-purification et leur co-précipitation avec CDC2 [59, 60, 66]. **La cycline étant la sous-unité régulatrice de la protéine kinase** [67-69], CDC2 fut alors renommée CDK1 pour « *Cyclin Dependent Kinase 1* » et les premiers modèles de régulation du MPF furent élaborés [64, 70]. Dans ces modèles, la cycline est un activateur du MPF qui doit s'accumuler pour permettre l'entrée en mitose, puis qui est dégradé pour la sortie de mitose. A la même époque, le complexe CDC2/cycline B fut isolé et caractérisé dans les cellules humaines [71], de xénope [72] et de drosophile [73] démontrant l'universalité du MPF dans le contrôle de la transition G<sub>2</sub>/M.

Depuis, des activités CDK proches de celle du MPF ont été identifiées chez tous les eucaryotes et régulent les différentes phases du cycle. Les CDKs ont alors été considérées comme des régulateurs universels du cycle cellulaire.

### **II.2.2. Description des CDKs**

Les kinases cyclines-dépendantes (« *Cyclin Dependent Kinases* », CDKs) forment une famille de protéines kinases qui jouent un rôle essentiel dans le déclenchement, le contrôle et la succession harmonieuse des différentes phases du cycle cellulaire. Contrairement aux cyclines, qui sont synthétisées et dégradées spécifiquement, les CDKs ont un niveau pratiquement constant durant les phases du cycle cellulaire [74, 75]. Il existe onze gènes codant pour les CDKs et 9 gènes codant pour des protéines CDK-like, qui ont une structure primaire similaire à celle ces CDKS mais qui n'ont pas de partenaires cyclines identifiés [76].

Les CDKs ont d'abord été décrits comme des régulateurs du cycle cellulaire lors des phases de transition G<sub>1</sub>/S et G<sub>2</sub>/M [77]. Par la suite, des complexes cyclines/CDKs ont été également identifiés comme des composants de la machinerie transcriptionnelle de l'ARN polymérase II [78]. Deux classes de CDKs ont été définies : CDK1, 2, 4, 6 sont dédiées au contrôle de la division cellulaire ; CDK8 et CDK9 sont essentiellement impliqués dans la transcription. Une CDK, CDK7, ne peut être facilement classée, elle est à la fois une kinase activatrice des CDKs du cycle cellulaire (CAK, *CDK Activating Kinase*, voir plus loin) et une composante du complexe transcriptionnel TFIIH (« *Transcription Factor IIH* ») [79].

### II.2.2.1. Structure et fonction

Les CDKs sont des kinases de type sérine/thréonine ayant dans leur extrémité NH<sub>2</sub> terminale une séquence xGxPxxxxREx (où x représente n'importe quel acide aminé). Il s'agit d'une région conservée qui correspond au domaine de liaison aux cyclines [80, 81]. Les CDKs sont actives uniquement sous forme d'un complexe entre une sous-unité catalytique (la CDK elle-même) et une sous-unité régulatrice (une cycline). D'après le séquençage du génome humain il existerait 13 CDKs et 25 cyclines, mais toutes les possibilités de formation de complexes CDK/cycline ainsi que leurs fonctions ne sont pas encore connues (**Tableau 2**).

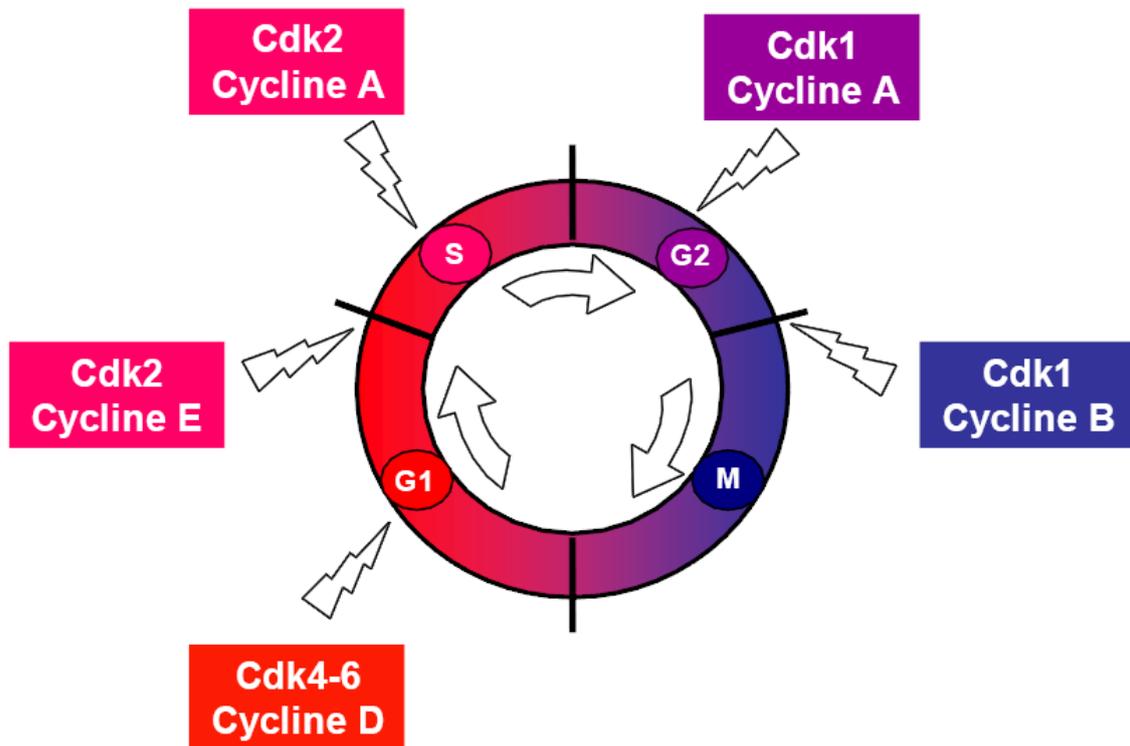
Elles ont pour activité de transférer le groupement -phosphate de l'adénosine triphosphate (ATP) sur une sérine ou une thréonine présente au niveau de protéines cibles, à condition que ces acides aminés soient inclus dans une séquence caractéristique dite consensus, spécifiquement reconnue par les kinases (ex : Ser/Thr-Pro-X-Arg/Lys). Cette phosphorylation entraîne une modification de conformation des protéines cibles conférant à ces dernières de nouvelles propriétés. Citons l'exemple du complexe CDK1/Cycline B, qui une fois activé provoque la phosphorylation de diverses protéines cibles (histones, condensines, lamines, protéines associées aux microtubules ou encore l'APC [« *Anaphase Promoting Complex* »]) et entraîne ainsi la rupture de l'enveloppe nucléaire, la condensation des chromosomes, l'assemblage du fuseau ou encore la ségrégation des chromosomes, étapes clefs de la transitions G<sub>2</sub>/M.

**Tableau 2: Propriétés et fonctions des Cyclines et CDKs connues.**

CTD : Carboxy-Terminal Domain ; pRb : protéine du rétinoblastome

(Modifié d'après Puri et al., 1999 [75])

<b>Protéine</b>	<b>Phase du cycle cellulaire</b>	<b>Fonction de la protéine</b>	<b>Régulation de l'activité</b>
<b><u>Cyclines</u></b>			
Cycline A	Progression de S jusqu'à M	Active CDK1 et CDK2	Transcriptionnelle et dégradation par la voie ubiquitine
Cycline B1	Progression vers M	Active CDK1	Transcriptionnelle et ubiquitine
Cycline B2	Progression vers M	?	Ubiquitine
Cycline C	G <sub>1</sub> ?	Active CDK8	?
Cycline D1, D2 et D3	G <sub>1</sub>	Active CDK4 et CDK6	Transcriptionnelle et protéolyse
Cycline E	Transition G <sub>1</sub> /S	Active CDK2	Transcriptionnelle et protéolyse
Cycline F	G <sub>2</sub> ou transition G <sub>2</sub> /M	Impliquée dans des processus d'ubiquitination	Transcriptionnelle
Cycline G	Ubiquitaire ?	Réparation de l'ADN ?	?
Cycline H	Ubiquitaire	Active CDK7	?
<b><u>CDKs</u></b>			
CDK1 (cdc2)	Progression vers M	Phosphorylation histone H1, laminines, etc.	Activée par Cyclines A et B
CDK2	Progression post point R/START et S	Association et phosphorylation de l'appareil de réplication de l'ADN. Phosphoryle pRb	Activée par Cyclines A et E
CDK3	G <sub>1</sub> ou post point R/START	?	?
CDK4	G <sub>1</sub>	Phosphoryle pRb	Activée par Cyclines D1, D2 et D3
CDK5	G <sub>0</sub> ?	Phosphoryle tau et des protéines des neurofilaments	Activée par p35
CDK6	G <sub>1</sub> (presque identique à CDK4)	Phosphoryle pRb	Activée par Cyclines D1, D2 et D3
CDK7	Ubiquitaire	Active les autres CDK et phosphoryle le CTD de l'ARN polymérase II	Activée par la présence du substrat ?
CDK8	G <sub>1</sub>	Phosphoryle le CTD de l'ARN polymérase II	Activée par Cycline C



**Figure 3: Les CDKs contrôlent le cycle cellulaire.**

CDK4 et CDK6, associées à des cyclines de type D, régulent le déroulement de la phase G<sub>1</sub>. Puis CDK2/cycline E prend le relais pour assurer la transition G<sub>1</sub>/S, suivie par CDK2/ cycline A qui assure le contrôle de la phase S. CDK1/cycline A intervient en G<sub>2</sub>, CDK1/cycline B régule la transition G<sub>2</sub>/M et l'entrée en mitose.

### II.2.2.2. Les CDKs clés impliquées dans la régulation du cycle cellulaire

Quatre CDKs clés, complexées à différentes cyclines, contrôlent la progression du cycle cellulaire (**Figure 3**).

- **CDK4** : Son gène est localisé sur le chromosome 12 en 12q13, dans la même région que CDK2 [82]. Ses partenaires régulateurs sont les cyclines D (D1, D2 et D3) [83]. Le complexe cycline D1/CDK4 devient actif comme kinase au milieu de la phase G<sub>1</sub>, avec une activité maximale à la transition G<sub>1</sub>/S, et reste détectable jusqu'à la mitose [84]. L'activité de la kinase cycline D/CDK4 n'est pas nécessaire tout au long du cycle mais seulement lors de la transition G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>. Cette activité est en partie régulée par la délocalisation de la cycline D entre le noyau et le cytoplasme. En effet, après avoir phosphorylé ses cibles, dont pRB, le complexe cycline D/CDK4 est activement exporté dans le cytoplasme, permettant d'arrêter l'activité kinase sur ses cibles nucléaires [85]. Ce complexe restera cytoplasmique jusqu'au prochain cycle. A la différence de la plupart des CDKs connues, CDK4 n'a pas d'activité kinase sur les histones H1.

- **CDK6** : Protéine de 40 kDa formant des complexes avec toutes les cyclines D. Elle a une activité kinase sur pRb. Dans les lymphocytes T, après stimulation par la phytohémagglutinine, cette activité se manifeste dès le milieu de la phase G<sub>1</sub> [86].
  - CDK4 et CDK6 sont activées séquentiellement pendant la phase G<sub>1</sub> [84, 86, 87]. Elles phosphorylent et inhibent la protéine Rb ce qui libère le facteur de transcription E2F et permet l'expression de gènes nécessaires pour la transition G<sub>1</sub>/S.
- **CDK2** : Son gène est localisé sur le chromosome 12 en 12q13 [82] et a une masse moléculaire de 33 kDa. CDK2 est activée à la transition G<sub>1</sub>/S et reste active jusqu'à la transition G<sub>2</sub>/M [88, 89]. Elle acquiert une activité kinase en association avec la cycline A ou E [82, 90]. L'activité kinase du complexe cycline E/CDK2 se manifeste dès la phase G<sub>1</sub>, atteint son maximum en début de phase S, puis disparaît [82, 90]. Cette kinase, en association avec la cycline E, est indispensable à la mise en route de la réplication de l'ADN [91]. Durant la phase S, la cycline E est remplacée dans ce complexe par la cycline A [92]. Le complexe cycline A/CDK2 développe une activité kinase dès la phase G<sub>1</sub> tardive jusqu'à la métaphase, quand la cycline A est détruite.
  - CDK2 régule l'entrée en phase S, mais participe également au contrôle de la duplication des centrosomes et de la réplication de l'ADN ainsi qu'à l'inhibition des facteurs de transcription qui ont agi en phase G<sub>1</sub>.
- **CDK1** (ou p34<sup>cdc2</sup>): Première CDK décrite chez l'homme. CDK1 est absente des cellules quiescentes. Dans les cellules qui prolifèrent, elle peut être détectée tout au long du cycle mitotique, mais son ARN messager (ARNm) varie au cours du cycle, avec un minimum en phase G<sub>1</sub> [93]. Dans de nombreux types cellulaires, la concentration de la protéine varie peu au cours de l'interphase mais dans les cellules lymphoïdes humaines, celle-ci suit les mêmes variations au cours du cycle cellulaire que celles de son ARNm [94]. L'activité enzymatique de CDK1 ne se manifeste que pendant une période très courte à la transition G<sub>2</sub>/M, entraînant le déclenchement de celle-ci. L'initiation de la mitose est dirigée de façon temporelle et spatiale par une cascade de phosphorylation de protéines qui aboutit à l'activation du complexe cycline B1/CDK1 [95].

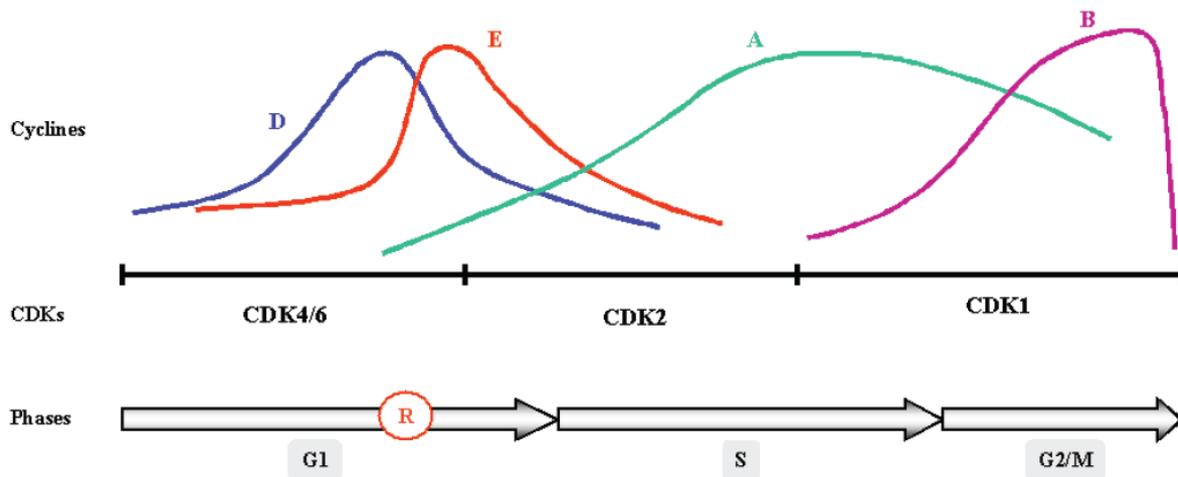
- CDK1 est activée en phase G<sub>2</sub> et à la transition G<sub>2</sub>/M. Elle contrôle notamment l'entrée en mitose, est nécessaire jusqu'en anaphase et phosphoryle de nombreux substrats dont l'APC, l'« *Anaphase Promoting Complex* ». Cette séquence permet ainsi la progression des cellules dans les différentes phases du cycle [96, 97].

Certaines CDKs sont impliquées dans des fonctions autres que la régulation du cycle cellulaire. Par exemple, CDK5, qui n'est pas activée par une cycline et possède des activateurs qui lui sont propres [98], est détectée active dans les neurones où elle aurait un rôle dans la phosphorylation de protéines comme celles des neurofilaments ou bien dans le trafic intracellulaire [99-101]. CDK8, CDK9 jouent un rôle essentiellement dans la transcription ainsi que CDK7 (en plus de son rôle d'activateur des autres CDKs du cycle cellulaire).

### II.2.3. Les Cyclines

Les cyclines sont une famille de protéines qui subissent des variations de leur taux au cours du cycle et qui partagent toutes un degré de similitude quant à leur composition en acides aminés. En effet, les cyclines sont définies par une région commune d'environ 100 acides aminés appelée « *cyclin box* » qui sert à lier et à activer les CDKs [102, 103]. On distingue d'une part les cyclines dites « *START* » ou G<sub>1</sub> qui atteignent leur pic d'expression en phase G<sub>1</sub> (cyclines D : D1, D2 et D3) ou à la transition G<sub>1</sub>/S (cycline E) et d'autre part les cyclines dites mitotiques (cyclines A et B) dont le pic d'expression se situe en G<sub>2</sub>/M [104] (**Figure 4**).

Ces deux types de cyclines varient dans leur structure générale : les cyclines mitotiques ont environ 200 acides aminés situés dans la partie N-terminale alors que les cyclines *START* s'étendent en C-terminal pour former une région riche en proline, acide glutamique, sérine et thréonine appelée « *PEST* ». Cette région *PEST* joue un rôle dans le renouvellement rapide de ces cyclines et leur confère une demi-vie très courte [105, 106].



**Figure 4 : Implication des CDKs et de leurs cyclines associées au cours du cycle cellulaire.**

Différentes CDKs régissent le cycle de division. Les cyclines, sous-unités régulatrices des CDKs, présentent une cinétique cyclique conditionnant le cycle cellulaire.

### II.2.3.1. Les cyclines D

Les cyclines de type D sont au nombre de trois et **sont les premières à apparaître lors d'une stimulation par des mitogènes**. Elles sont synthétisées tout au long de la stimulation tant que le facteur de croissance reste dans le milieu si bien que, dans ces conditions, les taux des cyclines D varient peu au cours du cycle, avec néanmoins un **pic d'expression en G<sub>1</sub>-S**. Inversement, dès que le mitogène est retiré du milieu, les cyclines D sont rapidement détruites, quelle que soit la position de la cellule dans le cycle [107] : si la cellule a dépassé le point de restriction R, leur destruction est sans effet ; si la cellule est en G<sub>1</sub>, la destruction des cyclines D empêche la cellule d'aller plus loin dans le cycle. Leur synthèse débute en début de G<sub>1</sub> et leur activité sur les kinases ne se fait qu'en milieu de G<sub>1</sub> et augmente au fur et à mesure que les cellules approchent de la transition G<sub>1</sub>-S [108, 109]. La surexpression de cycline dans des cellules normales accélère la phase G<sub>1</sub> [110]. **Les partenaires catalytiques majeurs des cyclines D sont CDK4 et CDK6** [108, 109, 111]. La fonction primaire des cyclines D est de stimuler la progression en phase G<sub>1</sub>. En dépit de leur similitude, les membres de la famille des cyclines D sont différemment exprimés selon la lignée cellulaire. Ainsi, la cycline D1 est absente des cellules de la lignée lymphoïde [112].

Lors de la phase G<sub>1</sub>, l'hyperphosphorylation complète de la protéine du rétinoblastome, pRb, entraînant la libération de E2F survient après l'action séquentielle des complexes cycline D/CDK4-6 et cycline E/CDK2 [113]. Plus spécifiquement, la fonction du complexe cycline D/CDK4 semble être la destruction de l'association de pRb avec une histone désacétylase (HDAC) annulant ainsi la répression des gènes cycline A et CDK1 par le complexe pRb/E2F [114, 115].

L'expression et la dégradation de la cycline D sont régulées par des cascades de signalisation convergentes initialisées par des récepteurs membranaires incluant des récepteurs tyrosine kinase, des cytokines, des protéines G et des protéines impliquées dans l'adhérence comme les intégrines et les cadhérines [110, 116]. Les mécanismes de contrôle de la dégradation de la cycline D sont mal connus. Cependant, on sait que la phosphorylation de la cycline D par la glycogène synthétase kinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) entraîne son exportation du noyau vers le cytoplasme où elle est dégradée par des systèmes à ubiquitines [117]. Ce système permet de réduire la demi-vie de la cycline D à 10 minutes, ce qui permet une régulation très rapide de son activité.

### *II.2.3.2. La cycline E*

La cycline E est une **protéine nucléaire** de 50 kD dont l'expression est **maximale en fin de phase G<sub>1</sub>**, après l'augmentation des cyclines D [105]. Elle agit en fin de phase G<sub>1</sub> en se complexant avec **CDK2** [118, 119]. Le complexe cycline E/CDK2 a une forte activité kinase juste avant l'entrée des cellules en phase S et **phosphoryle la protéine du rétinoblastome (pRb)** [91, 120]. La surexpression de la cycline E raccourcit la durée de la phase G<sub>1</sub>, diminue la taille de la cellule, diminue la dépendance aux facteurs de croissance et prolonge la durée de la phase S [121, 122]. **Des cellules fibroblastiques bloquées en phase G<sub>1</sub> débutent quand même la réplication de leur ADN quand la cycline E est surexprimée** [121]. Des anticorps dirigés contre la cycline E injectés dans des cellules en phase G<sub>1</sub> inhibent l'entrée en phase S [122]. Cette inhibition n'a pas lieu si l'injection se fait dans des cellules en phase S ce qui signifie que **la cycline E est indispensable à la transition G<sub>1</sub>/S**. Au cours de la phase S, l'expression de la cycline E diminue car elle est dégradée par le protéasome après action de l'ubiquitine [123].

Le complexe cycline E/CDK2 est capable de phosphoryler pRb, l'histone H1, la protéine p27<sup>KIP1</sup> inhibitrice de CDKs et pourrait probablement phosphoryler d'autres substrats [24]. Ce complexe contrôlerait également la formation des complexes de transcription en phosphorylant la protéine Cdc45 qui se fixe sur le complexe pré-répliatif (cf. [§ II.3.3](#)) permettant ainsi la liaison de l'ADN polymérase  $\alpha$  sur ce même complexe [124]. L'ADN polymérase  $\alpha$ , appelée aussi primase, joue un rôle essentiel dans l'initiation de la réplication. Elle appartient à la famille B des ADN polymérases et est composée de quatre sous-unités, dont la sous-unité primase de 49 kDa et la sous-unité catalytique de 180 kDa codée par le gène POLA1 en copie unique sur le chromosome X. Le rôle des deux autres sous-unités n'est à ce jour pas clairement défini. Pol $\alpha$  a tout d'abord été décrite comme étant la principale

réplicase, avant la découverte de Pol $\delta$  et Pol $\epsilon$ . Son implication dans la réplication de l'ADN a été étayée par sa forte activité dans les cellules se divisant rapidement, sa localisation nucléaire et son induction lorsque les cellules quiescentes entrent en prolifération. Son rôle de primase est désormais admis. En effet, la primase initie la réplication en synthétisant une amorce ARN d'une dizaine de ribonucléotides environ, puis son activité catalytique étend la synthèse sur 20 désoxynucléotides supplémentaires. Son recrutement n'est possible que si l'ADN a été déroulé et si le simple-brin est recouvert par la protéine RPA (*Replication Protein A*). Après synthèse de l'amorce ARN/ADN, le complexe RFC (*Replication Factor C*) charge le facteur de processivité PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) autour de l'ADN pour permettre l'élongation des amorces.

La dégradation de la cycline E est catalysée par le complexe SCF (SKP1, **Cullin-1**, F-box protein). C'est l'autophosphorylation préalable de la cycline E catalysée au sein du complexe cycline E/CDK2 lui-même qui permet sa protéolyse ubiquitine-dépendante lorsqu'elle se retrouve sous forme libre [125].

### II.2.3.3. Les cyclines mitotiques

Les cyclines mitotiques comprennent **la cycline A et la cycline B**. Elles possèdent une séquence d'acides aminés partiellement conservée (dénommée *destruction box*) située en partie N-terminale, indispensable à leur destruction rapide et soudaine spécifiquement pendant la mitose [126]. Cette destruction se fait par la voie de la protéolyse dépendante de l'ubiquitine [127]. Le taux des cyclines mitotiques augmente progressivement au cours des phases S et G<sub>2</sub> pour atteindre un **pic en mitose**. Les cyclines A et B interagissent toutes les deux avec la kinase **CDK1** pour déclencher la mitose et la dégradation de ces deux protéines est nécessaire pour que la cellule sorte de la mitose [65, 128]. La synthèse et la destruction de la cycline A ont toujours lieu en avance par rapport à la cycline B [67, 128].

#### II.2.3.3.1 La cycline A

La cycline A est une protéine de 60 kDa qui apparaît à la transition G<sub>1</sub>/S. C'est la première cycline qui a été clonée et séquencée [129]. Elle est située en position **nucléaire** [130]. Elle a d'abord été considérée comme une cycline mitotique ne jouant un rôle qu'à la transition G<sub>2</sub>/M, mais plusieurs expériences ont permis de démontrer que la cycline A agissait plus précocement dans le cycle cellulaire, étant détectée et activée dès la fin de la phase G<sub>1</sub> juste avant l'entrée en phase S [131]. L'activité kinase associée à la cycline A à la transition

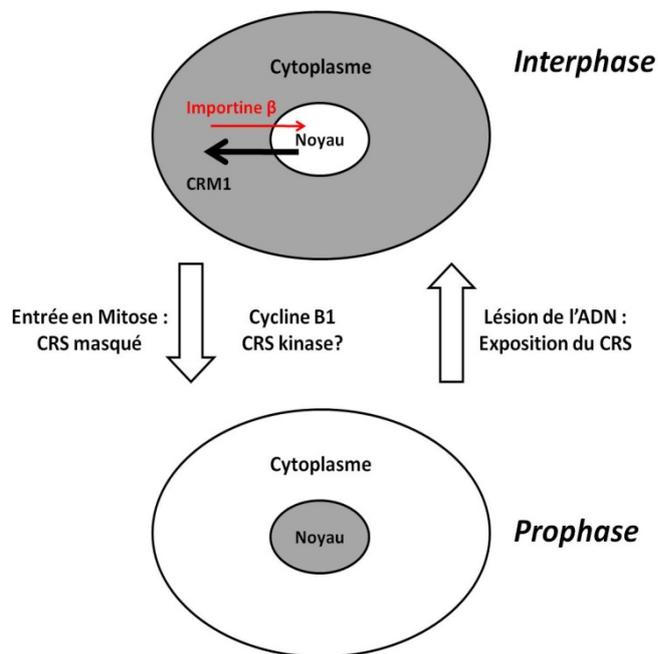
G<sub>1</sub>/S est celle de CDK2 et non pas CDK1 [132, 133]. La surexpression de la cycline A entraîne une entrée prématurée en phase S [134].

Les cyclines E et A sont nécessaires au passage en phase S mais ont des fonctions différentes. La cycline A serait utile pour débiter la réplication de l'ADN. **Le complexe cycline A/CDK2 se lie au facteur de transcription PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*, qui est une sous-unité de la polymérase de l'ADN intervenant dans la réplication et la réparation de l'ADN)** au niveau de certains sites de réplication de l'ADN et l'inhibition de la cycline A par des anticorps inhibe la synthèse de l'ADN dans des cellules humaines [135, 136].

#### *II.2.3.3.2 La cycline B*

Il existe trois cyclines B : B1, B2, B3. La cycline B1 est la mieux connue et joue un rôle important dans les mécanismes de déclenchement de la mitose. **La cycline B1 est cytoplasmique pendant l'interphase (en association avec les microtubules et les centrosomes) jusqu'à la fin de la prophase où elle est transférée brutalement dans le noyau alors que la cycline A reste nucléaire** [130, 137]. La cycline B1 est intéressante car c'est une des premières protéines du cycle dont la régulation est non seulement temporelle mais aussi spatiale (**Figure 5**). En effet, la cycline B1 circule continuellement entre le noyau et le cytoplasme pendant l'interphase [138-140]. Cependant, la cycline B1 s'accumule dans le cytoplasme car l'import nucléaire est contrebalancé par l'export nucléaire qui est plus rapide. En effet, **pendant l'interphase, le complexe cycline B1/CDK1 est maintenu dans le cytoplasme grâce à l'activité d'un facteur nucléaire d'exportation appelé CRM1 ou exportine**. En position N-terminale, la cycline B1 possède un signal dit de rétention cytoplasmique (CRS) qui correspond à une région de 42 acides aminés [137]. Si on injecte dans le noyau de cellules HeLa en phase G<sub>2</sub>, de la cycline B1 dépourvue du CRS, la protéine reste nucléaire. Le CRS est donc plus un signal d'export nucléaire qu'un signal de rétention cytoplasmique. Le CRS possède une région hydrophobe de 11 acides aminés hautement conservée parmi les cyclines de type B chez les mammifères. Dans cette région, il existe quatre résidus sérine qui, s'ils sont phosphorylés, empêchent la reconnaissance du CRS par CRM1. En conséquence, **c'est la phosphorylation de ces quatre résidus sérine qui stoppe la sortie de la cycline B1 du noyau en prophase**. Les protéines kinases qui phosphorylent la cycline B1 en CRS pour réguler sa rétention nucléaire restent à identifier.

Dès que la cycline B1 devient nucléaire, l'enveloppe nucléaire explose, signifiant que le complexe cycline B1/CDK1 agit comme une kinase des lamines nucléaires. La cycline B1 se lie alors à l'appareil mitotique, en particulier aux pôles du fuseau et à ses fibres principales. En début de métaphase, la cycline B1 s'associe transitoirement aux chromosomes condensés. Dès l'entrée en anaphase, la destruction de la cycline B1 s'opère par la voie de la polyubiquitination ce qui est indispensable à l'inactivation du complexe cycline B1/CDK1 et à la sortie de la mitose [126]. La destruction est initiée par l'APC (« *Anaphase Promoting Complex* ») ou cyclosome [141].



**Figure 5: Localisation cellulaire de la cycline B1 au cours de l'interphase et de la mitose.**

La cycline B1 a une localisation cytoplasmique jusqu'à la prophase (représentée en gris sur la figure). Il existe un va et-vient permanent de la cycline B1 entre le noyau et le cytoplasme mais l'import nucléaire (assuré par l'importine  $\beta$ ) est contrebalancé par l'export nucléaire (assuré par CRM1) qui est plus rapide si bien que la cycline B1 est cytoplasmique. À la prophase, la phosphorylation de quatre résidus serine dans le site appelé CRS de la cycline B1 empêche la reconnaissance de la cycline B1 par CRM1 si bien que la cycline B1 devient nucléaire.

## II.2.4. Régulation des complexes CDKs/Cyclines

Etant donné le rôle central des CDKs dans le contrôle du cycle cellulaire, leur activité est régulée à des niveaux variés à l'exception de leur quantité, constante au cours du cycle cellulaire [142-144]. Le premier niveau est lié à l'interaction de protéines partenaires positifs (les cyclines) ou négatifs (les CKI). Mais leur activité est également régulée par des modifications post-traductionnelles (phosphorylation déphosphorylation). Toutes ces régulations constituent un ensemble complexe et spécifique à chaque étape du cycle cellulaire. Ajoutée à d'autres mécanismes variés, **la régulation de l'activité des CDKs forme le cœur du système de contrôle du cycle cellulaire** [145].

### II.2.4.1. Activation des CDKs

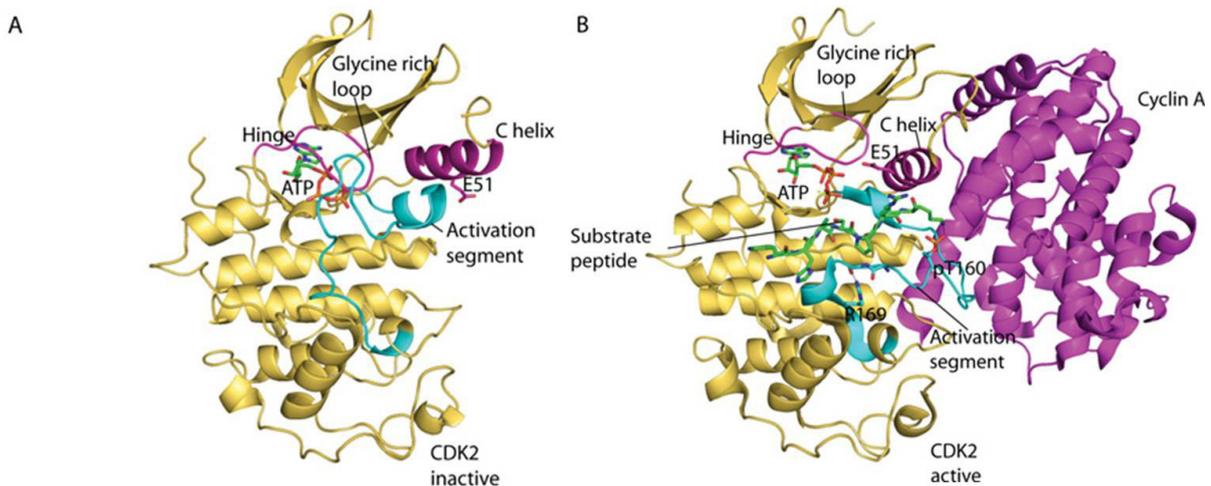
Les oscillations dans l'activité des CDKs pendant le cycle cellulaire sont liées en partie aux changements de quantités des cyclines dans la cellule, quantités qui sont régulées par un ensemble complexe de mécanismes actifs aussi bien au niveau de la transcription des gènes [146] que de la dégradation des protéines, et spécifiques pour chaque étape du cycle cellulaire. La cinétique d'expression caractéristique de chacune permet la régulation de l'activité des CDKs associées en des points précis du cycle cellulaire (**Figure 3** et **Figure 4**).

Les détails structuraux de l'activation des CDKs ont été compris après la détermination de la structure de CDK2 humaine [147]. Sa structure est proche de celle des autres Ser/Thr kinases avec un lobe amino-terminal de petite taille et un lobe carboxy-terminal plus large.

Les différences principales des CDKs avec les autres kinases sont d'une part la présence d'une large boucle flexible ou « *T loop* », appelée aussi « boucle d'activation », qui bloque la liaison du substrat au domaine carboxy-terminal, et d'autre part au fait que les résidus-clés du site catalytique ne sont pas dans une position correcte pour la réaction de phosphorylation. La CDK sous forme monomérique et hypophosphorylée est maintenue dans un état inactif par deux contraintes structurales : l'accès du site de liaison au substrat est bloqué par la boucle T et l'orientation des sites de liaison à l'ATP est telle que les phosphates de la molécule d'ATP utilisée lors de la phosphorylation du substrat sont très mal positionnés pour un transfert efficace. Pour être active la kinase doit subir de profonds changements de conformation [148, 149].

**Le changement structural principal est réalisé lors de l'association de la kinase à une cycline.** Cette association entraîne un retrait partiel de la boucle T qui permet aux ATP

d'adopter une position intermédiaire. Ainsi la boucle d'activation ne va plus obstruer le site de liaison du substrat et les résidus importants pour la phosphorylation du substrat vont être orientés dans une position plus favorable (**Figure 6**). La boucle d'activation présente une thréonine hautement conservée entre les CDKs (Thr161 sur CDK1, Thr160 sur CDK2 ; 172 chez la CDK4). Ce résidu va être phosphorylé par une kinase, la CAK (« *CDK Activating Kinase* »), ce qui va amener l'activité du complexe CDK/cycline à son maximum. Cette phosphorylation va en fait stabiliser l'interaction entre les deux sous-unités et placer la boucle d'activation dans la position la plus favorable pour la reconnaissance du substrat. Ce complexe est formé d'une cycline (H) et d'une CDK (7) [150]. Même si une même CAK peut phosphoryler plusieurs complexes cycline-CDK *in vitro*, il existerait un complexe CAK pour chaque complexe cycline/CDK [145]. L'activation du complexe cycline/CDK par le complexe CAK peut être inhibée par la présence d'une CDK Kinase Inhibitors (CKI) de type CIP/KIP.



**Figure 6 : Activation de CDK2 par la Cycline A.**  
**(A)** CDK2 sous forme inactive. **(B)** CDK2 est activée par association avec la cycline A.  
*(D'après Johnson LN, 2009 [151])*

### II.2.4.2. Régulation par les CDK Kinase Inhibitors

Les CDK Kinase Inhibitors (CKI), ou inhibiteurs des CDKs, sont des molécules qui s'associent aux complexes CDK/cycline afin d'inhiber leur activité (Figure 7) [152].

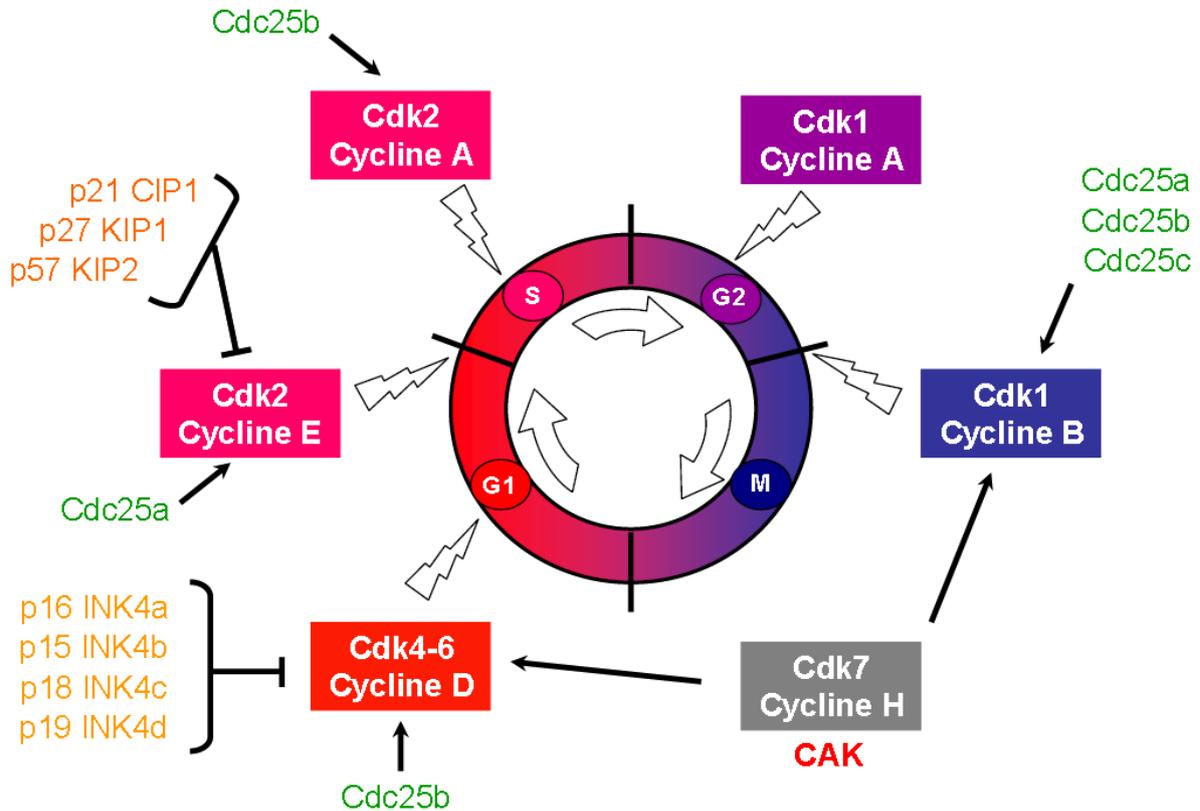


Figure 7 : Illustration des voies de régulation des CDKs au cours du cycle cellulaire.

Certaines protéines, telles les phosphatases Cdc25, sont responsables d'une régulation positive des CDKs, alors que d'autres éléments, appartenant à la famille des CKI inhibent l'activité des CDKs.

Deux grandes familles d'inhibiteurs des complexes cycline/CDK ont été décrites. La famille des inhibiteurs KIP/CIP (pour *CDK inhibiting protein*) est constituée des protéines p21<sup>WAF1/CIP1</sup> (p21), p27<sup>KIP1/ICK/PIC2</sup> (p27) et p57<sup>KIP2</sup>. Ces protéines partagent la propriété d'inhiber la plupart des complexes cycline/CDK. A l'opposé, les protéines de la famille INK4 (pour *INhibitor of CDK4*), p16<sup>INK4a/MTS1/CDKN2/CDK4I</sup> (p16), p15<sup>INK4b/MTS2</sup>, p18<sup>INK4c/INK6A</sup>, et p19<sup>INK4d/INK6B</sup> inhibent spécifiquement CDK4/6 [153]. Chacune de ces protéines est codée par un unique gène et forme le groupe des principaux régulateurs de la phosphorylation de la protéine du rétinoblastome (pRb). Leur liaison aux CDKs interfère avec la phosphorylation activatrice par la CAK [154]. Les propriétés de ces protéines sont résumées dans le Tableau 3.

**Tableau 3: Propriétés des CKIs connues.**

(D'après Puri et al., 1999 [75] et Roussel MF, 1999 [155])

Protéine	Emplacement du gène	Phase du cycle cellulaire concernée	Fonction de la protéine	Régulation de l'activité
<b><u>INK4</u></b>				
p15 <sup>INK4B</sup>	9p21	G <sub>1</sub>	Inhibe CDK4/6	Transcription TGF-β dépendante
p16 <sup>INK4A</sup>	9p21	G <sub>1</sub>	Inhibe CDK4/6	Transcription E2F dépendante
p18 <sup>INK4C</sup>	1p32	G <sub>1</sub>	Inhibe CDK4/6	Transcriptionnelle ?
p19 <sup>INK4D</sup>	19p13	G <sub>1</sub>	Inhibe CDK4/6	Transcriptionnelle ?
<b><u>CIP/KIP</u></b>				
p21 <sup>CIP1</sup>	6p21	G <sub>1</sub> et S	Inhibe CDK2/4/6 et PCNA	Transcriptionnelle (e.g. expression p53, TGF-β et/ou MyoD dépendante)
p27 <sup>KIP1</sup>	11p12-13	G <sub>1</sub>	Inhibe CDK2/4/6	Localisation et ubiquitination
p57 <sup>KIP2</sup>	11p15.5	G <sub>1</sub>	Inhibe CDK2/4/6	Transcriptionnelle

#### II.2.4.2.1 La famille INK4

La famille INK4 comprend actuellement quatre membres, p16<sup>INK4a</sup> [156], p15<sup>INK4b</sup> [157], p18<sup>INK4c</sup> [109] et p19<sup>INK4d</sup> [158] qui en se liant spécifiquement aux CDK4-6 empêchent leur activation par liaison aux cyclines D [159, 160].

La surexpression de p16<sup>INK4a</sup> entraîne un arrêt de la prolifération cellulaire [161]. **Des tests de liaison *in vitro*, ont montré sans équivoque que p15<sup>INK4b</sup> et p16<sup>INK4a</sup> sont des compétiteurs de la cycline D dans les complexes cycline D/CDK4-6 et prendraient sa place pour former des complexes p15<sup>INK4b</sup>-CDK4-6 ou p16<sup>INK4a</sup>-CDK4-6 [153].** La cycline D libre serait alors rapidement dégradée par les protéasomes ubiquitine-dépendants [155].

La présence de sites de liaison E2F dans la région promotrice du gène de p16<sup>INK4a</sup> semble signifier que l'expression de p16<sup>INK4a</sup> est E2F dépendante alors que l'expression de p15<sup>INK4b</sup> est TGF-β dépendante [157]. Il n'existe aucune preuve expérimentale du recyclage des CDK4/6 après leur liaison avec les INK4. Ces inhibiteurs pourraient donc servir de « corbeille » pour CDK4/6 en mettant ces CDKs hors-jeu pour le restant du cycle cellulaire [24]. p15<sup>INK4b</sup> serait l'effecteur de la régulation de l'activité de la cycline D/CDK4-6 par

TGF- $\beta$  alors que p16<sup>INK4a</sup> interviendrait plus tard pour inhiber l'activité du complexe cycline D/CDK4-6 et entraîner la destruction de la cycline D lors de la transition G<sub>1</sub>/S. Un autre niveau de régulation impliquerait une régulation croisée avec les inhibiteurs CIP/KIP.

#### *II.2.4.2.2 La famille CIP/KIP*

La famille CIP/KIP comprend trois membres (p21<sup>Cip1</sup>, p27<sup>KIP1</sup> et p57<sup>KIP2</sup>) qui forment de complexes ternaires avec les complexes cycline/CDK par liaison à leur composant cycline [153] ou sont capables de s'associer avec les cyclines seules sans pour autant inhiber la formation des complexes cycline/CDK [162].

La famille CIP/KIP a une action plus large car elle inhibe les complexes comprenant les cyclines A, B, D et E. Cette famille comprend trois membres : p21<sup>WAF1/CIP1</sup> [108, 163-165], p27<sup>KIP1</sup> [166-168] et p57<sup>KIP2</sup> [169, 170].

Ces inhibiteurs sont impliqués dans le contrôle de la transition G<sub>1</sub>/S en s'associant aux complexes CDK2/cycline E ou cycline A pour arrêter le cycle cellulaire. Dans certains types cellulaires, p21<sup>CIP1</sup> peut également induire un arrêt en phase G<sub>2</sub> [171-174]. Toutes les protéines de la famille CIP/KIP possèdent des motifs caractéristiques dans leur partie aminoterminal qui leur permettent de lier à la fois les cyclines et les CDKs [171, 175-178], et leur liaison aux CDKs diminue la phosphorylation du substrat puisqu'il ne peut plus interagir avec la kinase.

**De façon surprenante, p21<sup>CIP1</sup> et p27<sup>KIP1</sup> se fixent également sur CDK4 sans en inhiber l'activité kinase ; ils sont en fait nécessaires pour l'assemblage du complexe CDK4/cycline D et sa translocation dans le noyau [179].** Par contre ces deux protéines sont d'excellents inhibiteurs de CDK2/ cycline E. Elles peuvent servir de protéines chaperonnes pour la formation du complexe [180, 181]. L'apparition de p21<sup>CIP1</sup> et p27<sup>KIP1</sup> permet donc la formation des complexes CDK4/cyclines D, tout en retardant l'activation des complexes CDK2/cycline E. Enfin, CDK2/cycline E, en phosphorylant p27<sup>KIP1</sup>, conduit à son ubiquitination par Skp1/Skp2, et à sa destruction par le protéasome [182]. **Cette élimination de p27<sup>KIP1</sup> contribue à l'entrée en phase S.**

p21<sup>CIP1</sup>, la première des CKI à avoir été identifiée, possède de nombreuses fonctions. C'est un des effecteurs de p53 impliqué dans l'arrêt p53 dépendant induit par un dommage de l'ADN survenant lors de G<sub>1</sub> [108]. p21<sup>CIP1</sup>, comme p27<sup>KIP1</sup>, agirait en se liant à la cycline des complexes cycline/CDK (cycline D/CDK4-6 et cycline E/CDK2 [153], mais son effet inhibiteur est plus important sur le complexe cycline E/CDK2 [24]) et elle empêche

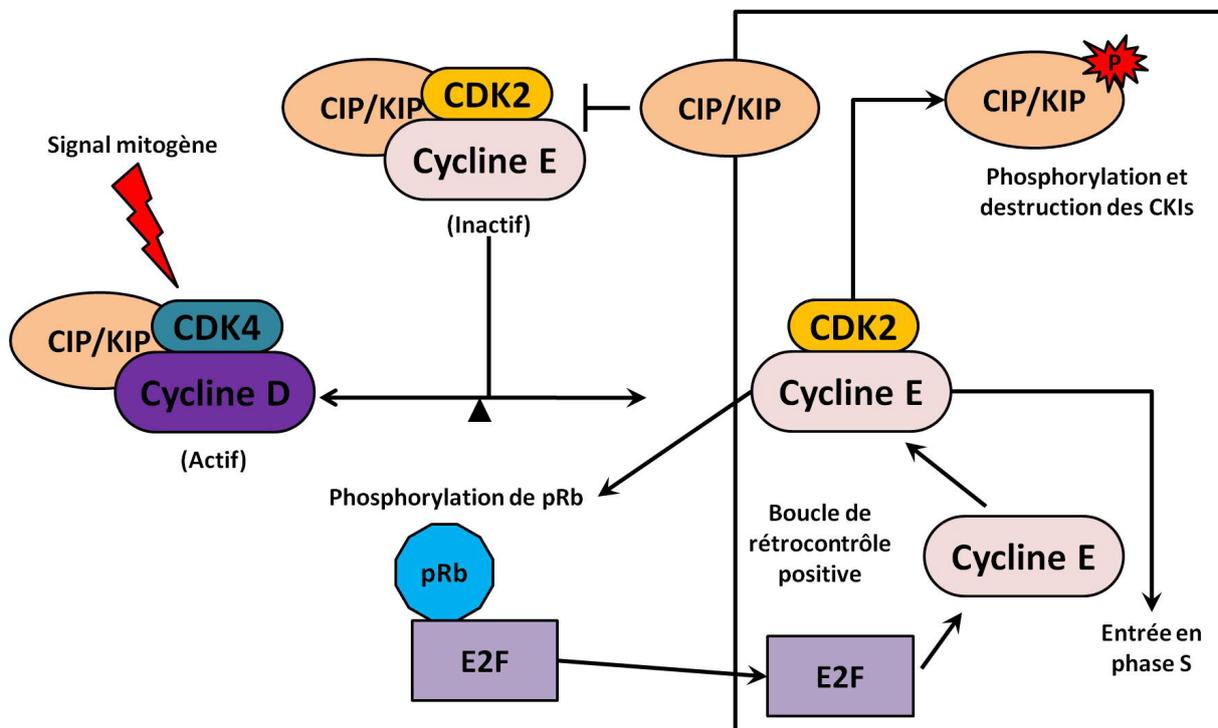
l'activation de la sous-unité CDK par phosphorylation [183]. En plus de ce rôle d'inhibiteur indirect sur l'activité des facteurs de transcription E2F par l'intermédiaire des complexes cycline/CDK, p21<sup>CIP1</sup> pourrait aussi agir directement sur ce facteur de transcription en se liant à lui [184].

La régulation de p21<sup>CIP1</sup> est plutôt transcriptionnelle, le promoteur de p21<sup>CIP1</sup> contenant notamment 2 sites de liaison à p53 [165, 185]. Cette expression serait aussi induite par des facteurs de différenciation dont la nature dépend du type cellulaire considéré, TGF- $\beta$  pour les kératinocytes, MyoD pour les cellules myoblastiques ou NGF (*Nerve Growth Factor*) pour les cellules de lignées adrénocorticales [165] ou encore lors de l'induction de la différenciation Ca<sup>2+</sup> dépendante chez les kératinocytes [162]. p21<sup>CIP1</sup> pourrait donc jouer un rôle central lors de l'induction de la différenciation [162, 165]

**p27<sup>KIP1</sup> a tout d'abord été identifié comme un inhibiteur de prolifération dans des cellules subissant une inhibition de contact ou traitées au TGF- $\beta$  [166].** In vitro, la quantité de p27<sup>KIP1</sup> exprimée dans les cellules en prolifération contribue à la durée de la phase G<sub>1</sub>. Plus la quantité de p27<sup>KIP1</sup> est importante, plus la phase G<sub>1</sub> est longue [186]. L'absence de p27<sup>KIP1</sup> rend les cellules insensibles aux facteurs anti-mitogènes en fin de phase G<sub>1</sub> [186]. Les interactions de p27<sup>KIP1</sup> et du complexe cycline E/CDK2 sont de deux types : (1) association forte et inhibition du complexe cycline E/CDK2 [187] ; (2) phosphorylation de p27<sup>KIP1</sup> sur le résidu Thr187 entraînant sa dégradation plus tard en phase G<sub>1</sub> par les voies ubiquitine dépendantes [187, 188]. Il semble que ce soit le mode de régulation principal de l'activité de p27<sup>KIP1</sup> [189]. Mais cette régulation, visiblement très complexe, impliquerait aussi à la fois un contrôle transcriptionnel, un contrôle traductionnel et un contrôle lié à la localisation de la protéine [185]. **Des études ont montré que p21<sup>CIP1</sup> et p27<sup>KIP1</sup> sont essentielles à l'association de la cycline D et de la CDK4/6 car stabilise la structure** (Cheng et al. 99).

Quand la cellule entre en cycle, p27<sup>KIP1</sup> est captée par les complexes cyclines D/CDK. La séquestration des molécules de p21<sup>CIP1</sup> et de p27<sup>KIP1</sup> libres par les complexes cycline D/CDK allège la contrainte des molécules CIP/KIP sur les complexes cycline E/CDK2 facilitant ainsi l'activation de ces derniers (**Figure 8**). Il y a une compétition entre les complexes cycline D/CDK et cycline E/CDK2 vis-à-vis des protéines CIP/KIP. Dès que le processus de séquestration de ces protéines abaisse le taux de p27<sup>KIP1</sup> « actif » en-dessous d'un seuil, le complexe cycline E/CDK2 facilite sa propre activation en phosphorylant p27<sup>KIP1</sup> en Thr187 déclenchant ainsi sa dégradation [187, 190]. Les molécules résiduelles de p27<sup>KIP1</sup>

et de  $p21^{CIP1}$  restent liées aux complexes cycline D/CDK tout au long des cycles successifs et le pool de ces molécules CIP/KIP liées est libéré quand les facteurs de croissance sont retirés du milieu inhibant ainsi les complexes cycline E/CDK et arrêtant la cellule en phase  $G_1$ . **Dans les cellules épithéliales de poumon de souris, le TGF- $\beta$  inhibe la synthèse de CDK4 [191] ce qui augmente le taux de  $p27^{KIP1}$  libre (qui n'est pas captée par les complexes cycline D/CDK4) qui va donc se fixer sur les complexes cycline E/CDK2 donnant lieu à un arrêt en  $G_1$  [167].** Ainsi la captation de  $p27^{KIP1}$  par les complexes cycline D/CDK4 permet de promouvoir l'activité kinase des complexes cycline E/CDK2 aidant à établir l'ordre d'activation.



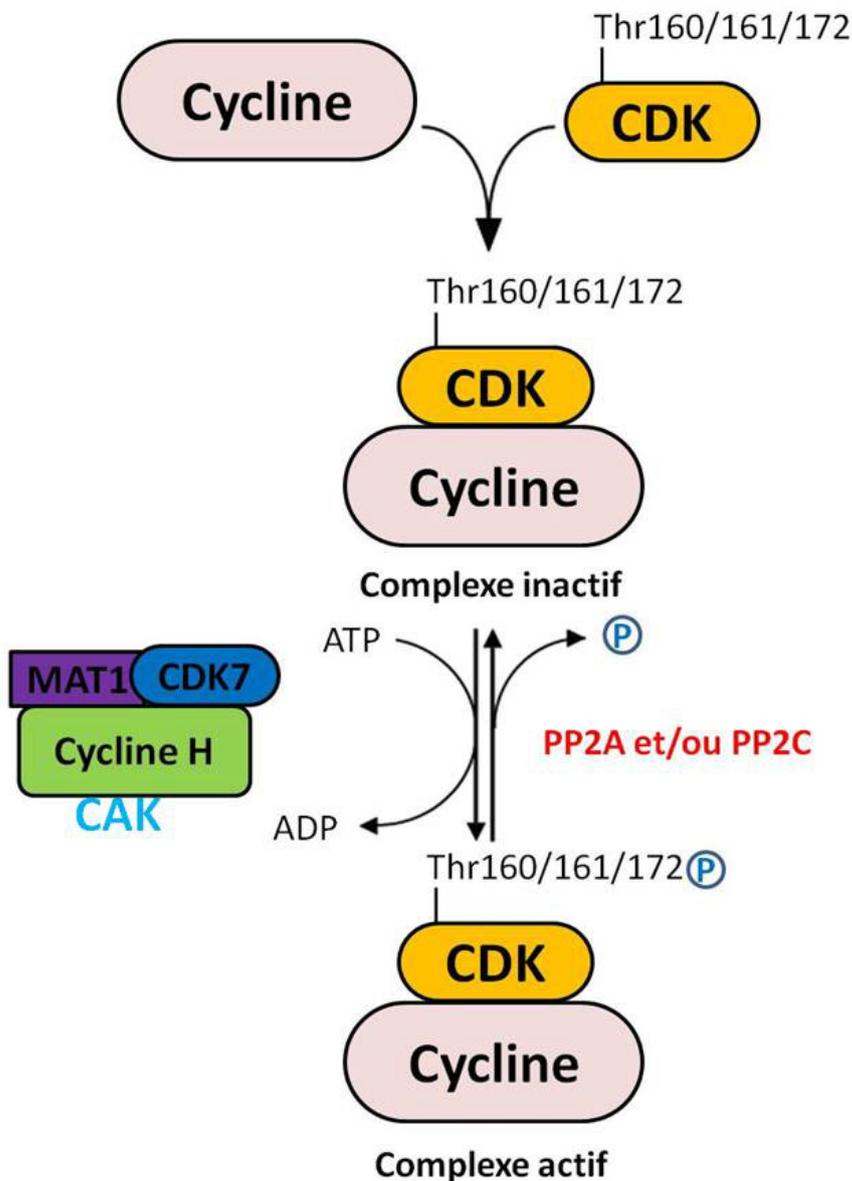
**Figure 8 : Représentation schématique de la régulation des protéines CIP/KIP.**

Après stimulation mitogénique, les complexes cycline D/CDK séquestrent les protéines CIP/KIP ce qui empêche ces dernières d'inhiber les complexes cycline E/CDK qui dès lors peuvent phosphoryler pRb. Les facteurs transcriptionnels de la famille E2F sont alors libérés et augmentent la transcription du gène de la cycline E. Les complexes cycline E/CDK phosphorylent alors les protéines CIP/KIP qui vont être détruites par le protéasome. Le cadre noir regroupe les molécules nécessaires à l'entrée en phase S.

### II.2.4.3. Régulation par phosphorylations

#### II.2.4.3.1 Phosphorylations activatrices

La formation du complexe CDK/cycline n'est pas suffisante pour la pleine activation de la kinase. Elle nécessite la phosphorylation d'un résidu adjacent au site catalytique : Thr161 sur CDK1, Thr160 sur CDK2 et Thr172 sur CDK4 [192-195]. Cette phosphorylation induit des changements dans la conformation de la protéine (cf. § II.2.2.1) et est catalysée par la CAK [147, 196, 197]. La déphosphorylation de ce résidu sera ensuite assurée par les phosphatases de la famille PP2C et/ou PP2A (**Figure 9**) [198-200].



**Figure 9 : Régulation de l'activité des complexes Cyclines/CDKs par CAK.**

La liaison d'une cycline sur une CDK va induire un premier changement de conformation du site catalytique. Puis, une fois formé, le complexe Cycline/CDK est phosphorylé sur un résidu thréonine (Thr161 sur CDK1, Thr160 sur CDK2 et Thr172 sur CDK4) conservée au niveau de la boucle d'activation de la kinase, par le complexe Cycline H/CDK7/MAT1 appelé CAK (« *CDK-Activating Kinase* »). Cette phosphorylation permet l'activation complète du complexe Cycline/CDK et est contrecarrée par l'action d'une Ser/Thr phosphatase, PP2A et/ou PP2C.

**L'activité de la CAK est constante au cours du cycle cellulaire et aucune régulation ne lui est connue** [201]. Chez les mammifères, cette phosphorylation requiert la liaison à la cycline, ce qui serait un moyen de moduler cette phosphorylation. Par contre chez les levures et dans les ovocytes de xénope [199], elle est réalisée avant la formation du complexe, ce qui signifie que des mécanismes additionnels de contrôle sont nécessaires pour réguler l'activité du complexe CDK/cycline. Dans certains cas, cette phosphorylation pourrait contribuer à stabiliser le complexe CDK/cycline [80, 202].

L'identité de la CAK varie suivant les espèces [203], mais chez les eucaryotes supérieurs (vertébrés et *Drosophila melanogaster*) c'est un complexe trimérique constitué : d'une protéine kinase de la famille des CDKs, CDK7 ; de la sous-unité régulatrice de CDK7, la cycline H ; et d'une troisième unité, MAT1 (« Ménage À Trois ») [204]. Il est important de noter que la CAK des vertébrés participe aussi à la régulation de la transcription puisqu'une partie des complexes CDK7/cycline H/MAT1 est liée à TFIIF, un multimère associé à l'ARN polymérase II. La CAK participerait alors à la régulation de l'activité de la polymérase. Par ailleurs, il a été montré que MAT1 induit un changement dans la spécificité de substrat du complexe CDK7/cycline H puisque sa présence favorise l'ARN polymérase II par rapport au complexe CDK/cycline. Ainsi cette protéine initialement décrite comme facteur d'assemblage du complexe CDK7/cycline H [205, 206] agirait également comme modulateur de la spécificité de substrat [207].

#### *II.2.4.3.2 Phosphorylations inhibitrices et déphosphorylation*

##### a) Phosphorylations inhibitrices

Alors que la phosphorylation activatrice des CDKs n'est pas régulée au cours du cycle cellulaire, deux phosphorylations inhibitrices jouent un rôle central dans la régulation de l'activité des CDKs. Elles sont toutes les deux localisées dans le site actif de la kinase [96, 148]. La tyrosine 15 est conservée dans toutes les CDKs majeures [192], alors que le deuxième site, thréonine 14, n'est présent que chez les eucaryotes supérieurs [208-210]. Tyr15 et Thr14 sont localisées à proximité du site de liaison de l'ATP et leur phosphorylation inhibe l'activité des CDKs en interférant avec l'ATP. La modulation du taux de phosphorylation sur ces deux sites est particulièrement importante pour l'activation du complexe CDK1/cycline B lors de l'entrée en mitose [208, 209], mais participe également au contrôle de l'activation des CDKs en G<sub>1</sub>/S et en phase S. Le statut de la phosphorylation sur Tyr15 et Thr14 est contrôlé par une balance entre l'activité de kinases inhibitrices et celle de

phosphatases activatrices (**Figure 10**). L'enzyme principale responsable de la phosphorylation sur Tyr15 est WEE1 dont des homologues ont été identifiés chez tous les eucaryotes. Dans les cellules en interphase, WEE1 phosphoryle CDK1 sur la tyrosine 15 afin d'empêcher l'activation du complexe avant l'entrée en mitose [211-213]. Une deuxième kinase, MIK1, dont le rôle est partiellement redondant avec celui de WEE1, phosphoryle également CDK1 sur Tyr15 chez la levure *S. pombe* [214, 215]. Les vertébrés possèdent une autre kinase, MYT1, impliquée dans la phosphorylation de la Thr14 mais aussi de Tyr15 sur CDK1 [216-218]. Elle appartient à la même famille que WEE1 et a la particularité d'être associée aux membranes [217, 218]. L'inhibition de CDK1/cycline B par MYT1 est réalisée à la fois par sa phosphorylation inhibitrice et par une interaction stable entre le complexe et la kinase ce qui le maintient dans le cytoplasme [219, 220].

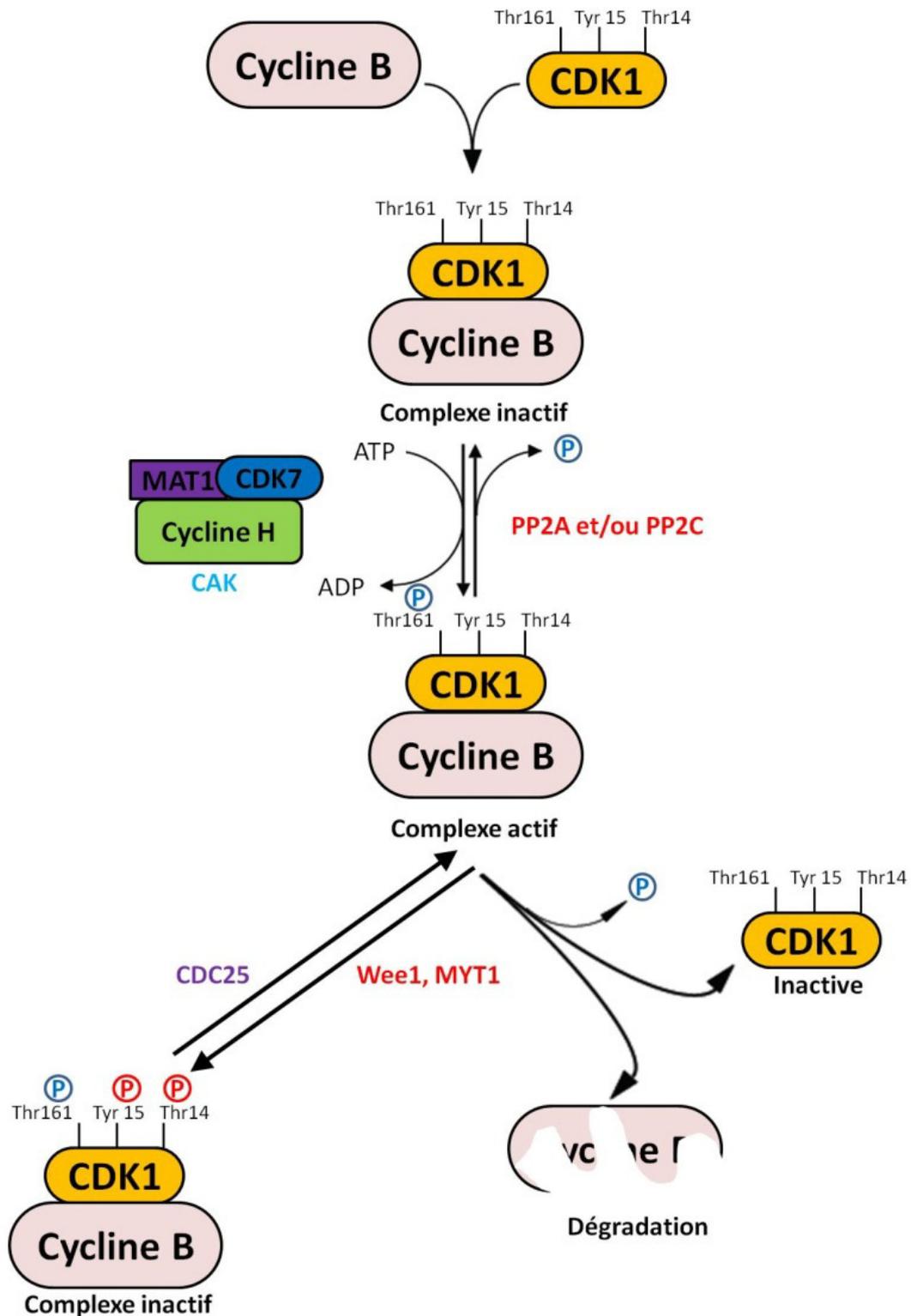
#### b) Déphosphorylation

Une déphosphorylation activatrice des résidus Tyr15 et Thr14 des CDKs est assurée par les phosphatases de la famille CDC25 (**Figure 10**).

La phosphatase CDC25C contrôle l'entrée en mitose en activant le complexe CDK1/cycline B.

Le gène de la protéine CDC25A est activé en phase G<sub>1</sub> suite à une stimulation mitogénique [221]. CDC25A est un facteur de régulation positif de la prolifération capable de diminuer la durée de la phase G<sub>1</sub> en agissant directement sur CDK2 [222]. La phosphatase CDC25A régule la transition G<sub>1</sub>/S et la progression en phase S en déphosphorylant les complexes CDK2/cycline E et CDK2/cycline A. Elle participerait également au contrôle de la transition G<sub>2</sub>/M.

Le point d'exécution de la phosphatase CDC25B est plus controversé puisqu'elle pourrait agir soit en phase G<sub>2</sub> et à la transition G<sub>2</sub>/M, soit en phase S. De même, sa ou ses cibles n'ont pas encore été clairement identifiées (**Figure 7**).



**Figure 10 : Activation/inactivation du complexe CDK1/Cycline B par phosphorylation.**

Une fois le complexe CDK1/cycline B formé, il subit différentes phosphorylations. La première est la phosphorylation par la CAK sur Thr161, ce qui active le complexe. Puis, ce sont les kinases Wee1 et MYT1 qui phosphorylent CDK1 sur Thr14 et Tyr15. Le complexe est alors inactif. Son activité est restaurée par l'action d'une phosphatase à double spécificité de la famille CDC25. Le complexe peut également être inactivé par la dégradation de la cycline puis par déphosphorylation de CDK1 sur la Thr161 par une phosphatase qui n'a pas encore été clairement identifiée (PP2A et/ou PP2C).

#### *II.2.4.4. Localisation spatio-temporelle*

La localisation des complexes cycline-CDK au cours du cycle cellulaire est un élément supplémentaire du contrôle de leur activité. Les mécanismes moléculaires engagés dans ce contrôle sont encore très mal connus [180, 223].

**La localisation intracellulaire des complexes CDK/cycline dépend de la cycline elle-même.** Les cyclines B et D et peut-être d'autres cyclines sont régulées par un contrôle qui les exporte du noyau. **Ce contrôle a été bien étudié pour la cycline B qui est exportée du noyau en interphase** (cf. [§ II.1.2.1](#)). La phosphorylation de la cycline B pendant la mitose inhibe son interaction avec les protéines d'exports et permet son accumulation dans le noyau [224]. De cette façon, la cellule s'assure que les complexes CDK/cycline B sont actifs seulement lors de la mitose et pas pendant les autres étapes du cycle cellulaire. Ceci empêche une entrée prématurée en mitose ou la possibilité que les complexes CDK/cyclin B active la phase S. **Une expression forcée de la cyclin B et de CDK1 dans le noyau en G<sub>1</sub> déclenche la phase S** [225].

Les CKI sont également contrôlés par leur exportation du noyau où ils vont agir comme inhibiteurs des CDKs. **L'enzyme AKT, une protéine kinase qui se trouve dans les voies de signalisation des facteurs de croissances, phosphoryle les CKIs et stimule leur exportation vers le cytoplasme : lieu de destruction par le protéasome après ubiquitination** [226].

### II.3. Régulation moléculaire du cycle cellulaire

Pour les organismes eucaryotes vivants, il est indispensable que les différentes phases du cycle cellulaire soient précisément coordonnées. Les phases doivent suivre un ordre correct, et une phase doit être terminée avant que la phase suivante ne démarre. Les erreurs de coordination peuvent conduire à des altérations chromosomiques. Des chromosomes ou des parties de chromosomes peuvent être perdus, réarrangés ou distribués de manière inéquitable entre les deux cellules filles. Ces types d'altérations chromosomiques sont souvent observés dans les cellules cancéreuses.

Pour assurer, d'une part, l'ordre immuable de la succession des quatre phases du cycle (régulation du cycle), et d'autre part, l'obtention de deux cellules filles rigoureusement identiques (surveillance de l'ADN), la cellule dispose de systèmes de régulation hautement perfectionnés.

#### II.3.1. La transition $G_0/G_1$

Il existe une grande variété de facteurs mitogènes [227] qui agissent, en général, par l'intermédiaire de récepteurs transmembranaires de type tyrosine kinases ou encore couplés à des protéines G. Les protéines G de type Rho, Ras sont souvent modifiées de façon post-traductionnelle par prénylation du côté C-terminal. Ces prénylations, catalysées par une farnésyl transférase et une géranylgeranyl transférase, sont essentielles pour le fonctionnement de la voie de signalisation qui comporte l'activation d'une cascade de protéine kinases, de type MAP (« *Mitogen-Activated Protein* »), telle Raf/MEK1, Erk1/2 ou bien PI3K/PDK1/AKT. **Ces cascades conduisent à la stimulation de la transcription de gènes essentiels pour l'entrée en division, en particulier les gènes codant pour les cyclines D et les CDKs.** L'oncogène Myc est également impliquée dans l'entrée en  $G_1$  et à sa progression. Myc forme un dimère avec la protéine Max, dimère qui active la transcription des gènes des cyclines D et E, de CDC25A, de CDK4, d'E2F (**Figure 11**) [228].

# Facteurs de croissances-Stimuli mitogènes

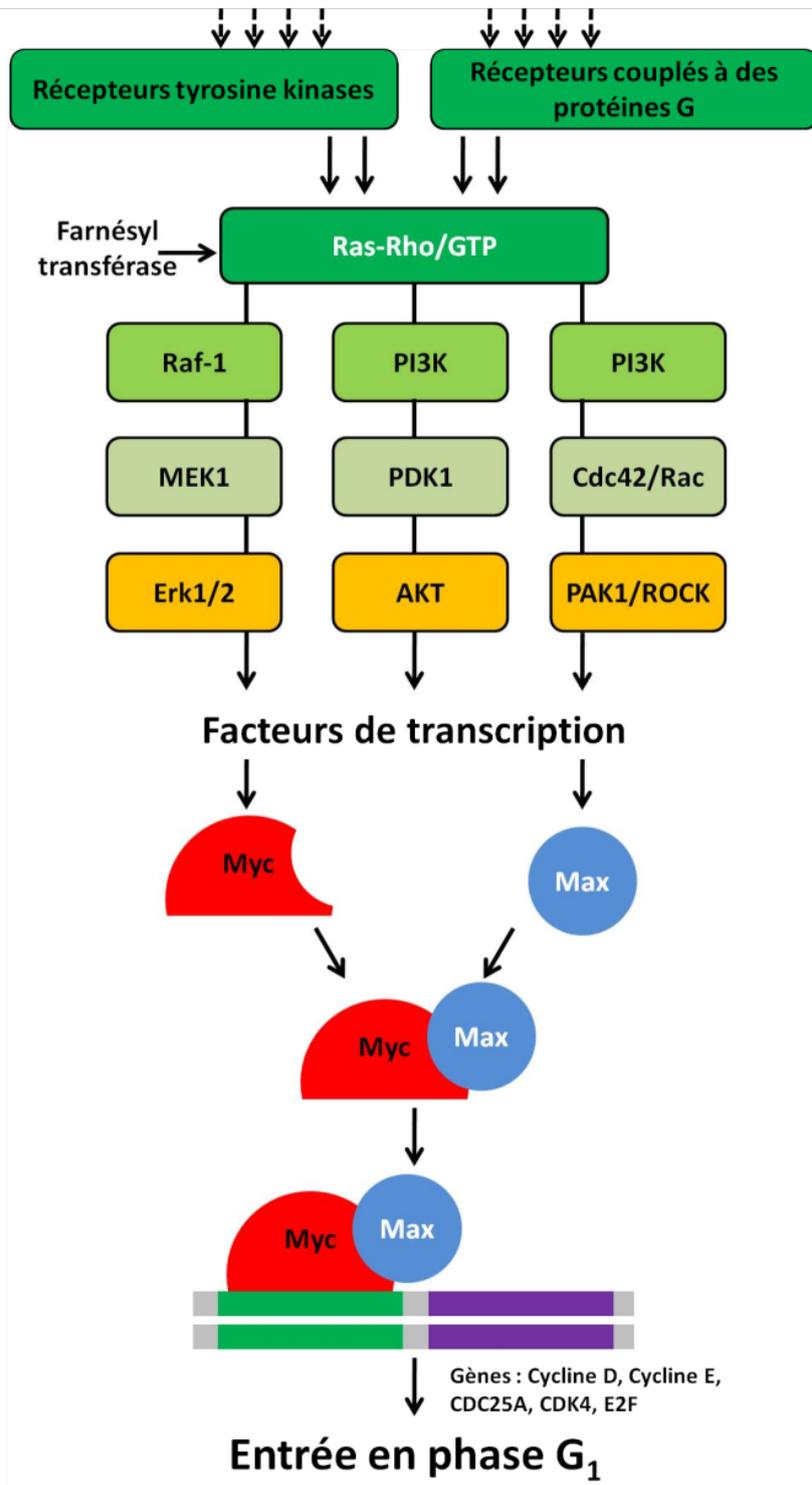


Figure 11 : Régulation de la transition G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>.

### II.3.2. La progression en G<sub>1</sub>

Le début du cycle cellulaire nécessite la transcription d'un certain nombre de gènes, tels ceux de la cycline D, p21<sup>CIP1</sup>, p27<sup>KIP1</sup> et des gènes sous le contrôle des facteurs de transcription de la famille E2F, comme la cycline E (Figure 12).

Les cellules sont maintenues en G<sub>1</sub> grâce aux protéines de la famille du rétinoblastome, pRb, p107 et p130 (« *pocket proteins* »). Ces suppresseurs de tumeurs bloquent le cycle cellulaire en s'associant avec E2F. En effet, en complexe avec pRb, les facteurs E2F, associés au co-facteur de transcription DP (« *Dimerization Partner* » [229], restent inactifs. La protéine du rétinoblastome est une sorte de gardienne moléculaire qui empêche la progression en phase G<sub>1</sub> [230].

Au début de G<sub>1</sub>, la cellule contient le complexe Cycline D/CDK4 qui, une fois activé initie la phosphorylation de pRb. **Phosphorylée, pRb libère E2F qui sert alors de facteur de transcription du gène de la cycline E** [161, 231]. La fonction essentielle de la Cycline D/CDK4 est donc d'activer, au début de la phase G<sub>1</sub>, la transcription du gène de la cycline E intervenant dans la phase suivante du cycle.

Après la synthèse de la Cycline E, le complexe Cycline E/CDK2 pourra se former. Or, ce nouveau complexe phosphoryle lui aussi pRb. **Il commande donc, par boucle de rétro-activation, l'amplification de la synthèse de sa propre cycline.** Lorsqu'elle est hyperphosphorylée, pRb libère le facteur E2F qui stimule alors la transcription du gène de la cycline suivante, la cycline A.

La famille E2F comporte des facteurs régulateurs de la transcription de plusieurs gènes requis pour la progression à travers le cycle cellulaire (par exemple les gènes codant pour la thymidine kinase ou pour les cyclines A ou E) ou impliqués dans la réplication de l'ADN (gènes codant par exemple pour l'ADN polymérase ou PCNA) [232-235]. **E2F1, E2F2 et E2F3 sont des activateurs transcriptionnels puissants contrôlés par pRb.** E2F4 et E2F5 sont des activateurs plus faibles contrôlés par p107 et p130.

Une fois la cellule passée en phase S, les membres de la famille E2F sont inactivés. **Les complexes cycline A/CDK2 (mais pas les complexes cycline E/CDK2 qui n'ont pas cette fonction) se lient aux membres de la famille E2F et phosphorylent DP, empêchant ainsi leur liaison à l'ADN** [236, 237].

On comprend pourquoi les inhibiteurs naturels des CDKs, des familles INK4 et CIP1/KIP, en maintenant pRb sous forme hypo-phosphorylée, donc liée à E2F, constituent des inhibiteurs puissants du cycle cellulaire. L'inactivation de ces inhibiteurs permet la progression de la cellule à travers la phase G<sub>1</sub> et la transition G<sub>1</sub>/S.

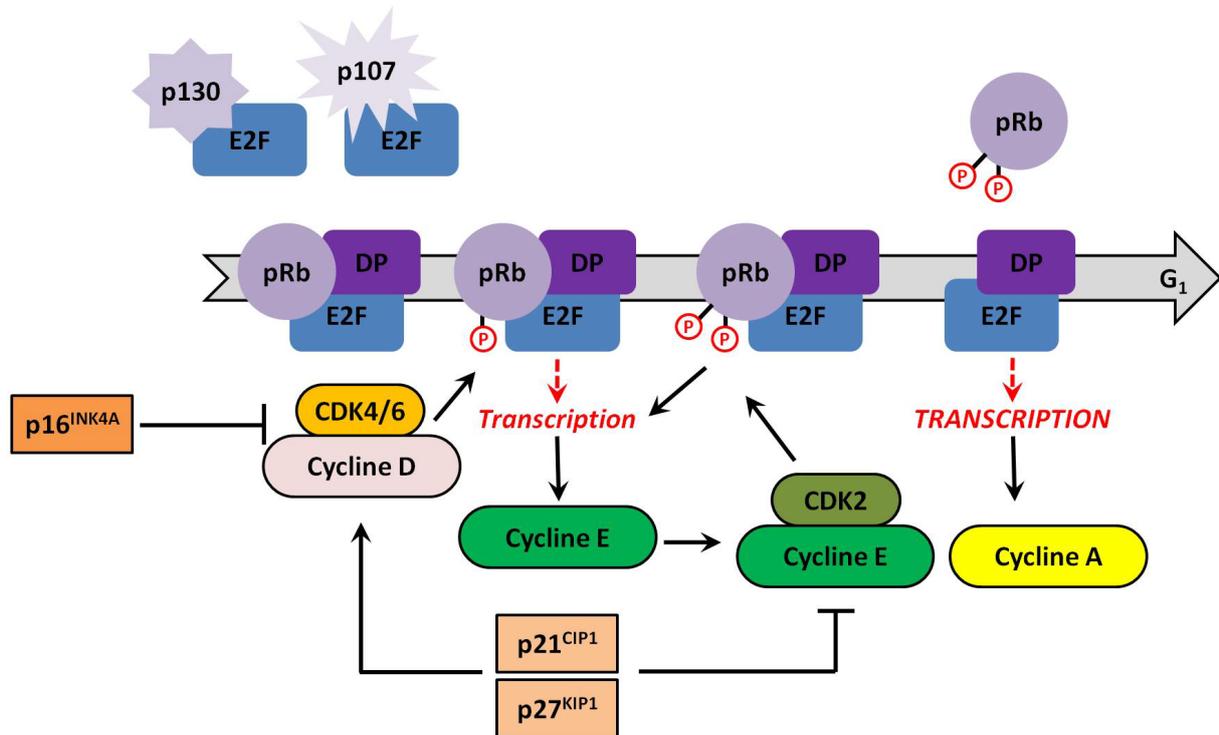


Figure 12 : Régulation de la progression en G<sub>1</sub>.

### II.3.3. La fin de $G_1$ , préparation à la transition $G_1/S$

La préparation à la transition  $G_1/S$  commence tout d'abord par l'assemblage d'un complexe pré-répliatif (pre-RC) (Figure 13). L'ORC (« *Origin Recognition Complex* »), un complexe de six sous-unités (Orc1-6), lie l'ATP, puis se fixe sur l'ADN au niveau des origines de réplication. L'ORC recrute ensuite deux facteurs essentiels, *cdc6* (une ATPase) et *Cdt1* (un facteur de transcription). Ces deux facteurs essentiels interviennent ultérieurement pour permettre l'accrochage des six protéines (MCM2-7) du complexe MCM (« *Mini-Chromosome Maintenance* »).

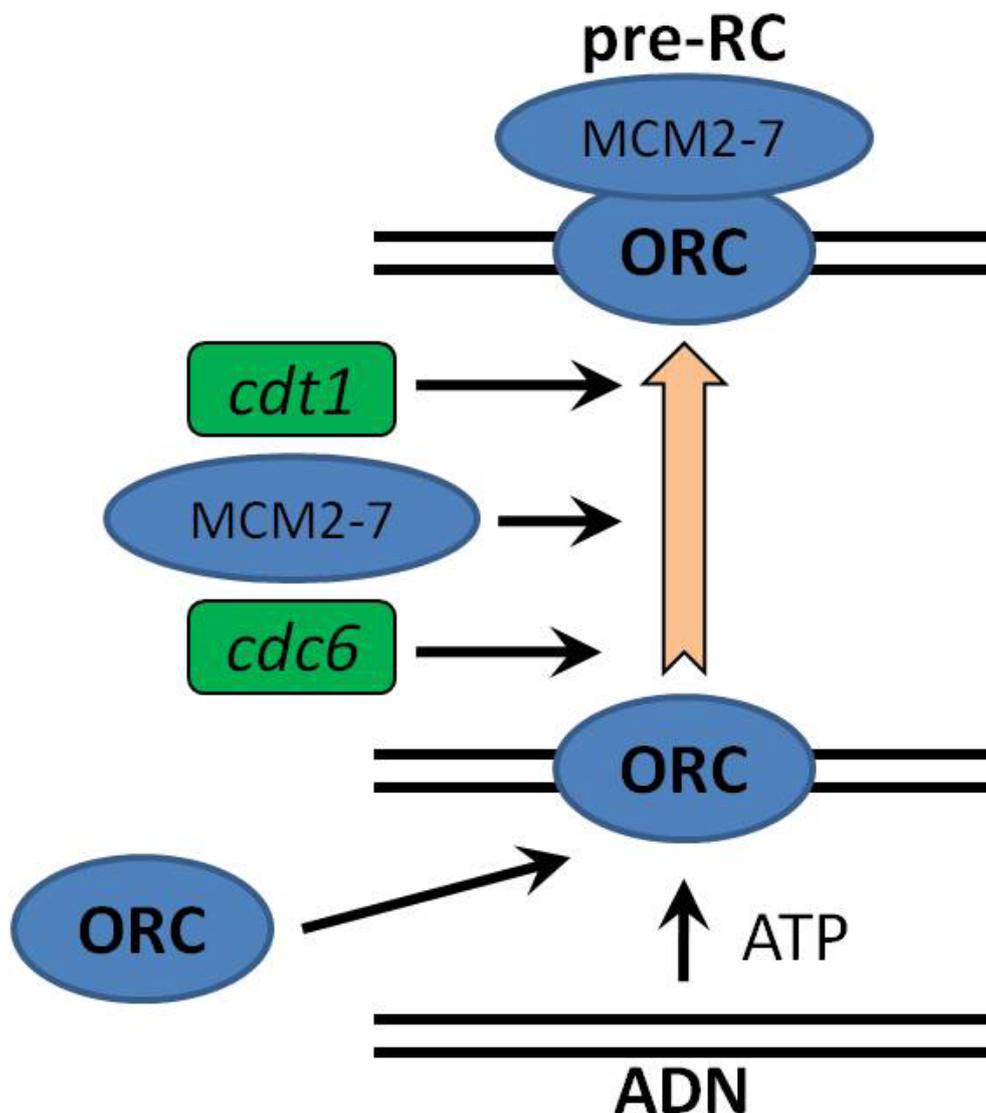


Figure 13 : Mise en place des complexes pré-répliatifs en fin de phase  $G_1$ .

### II.3.4. Inhibition de la re-réplication pendant les autres phases du cycle

Quatre mécanismes importants empêchent que plusieurs mécanismes réplicatifs se succèdent en phase S, G<sub>2</sub> et M (**Figure 14**).

Tout d'abord, les CDKs actives phosphorylent trois substrats, MCM, *cdc6* et ORC, empêchant ainsi la formation de nouveaux complexes pré-réplicatifs. La phosphorylation de *cdc6* par CDK2 l'inactive en provoquant sa dégradation ou son export hors du noyau. Par ailleurs *cdt1* est la cible de la géminine, un inhibiteur naturel de réplication qui apparaît dès le début de la phase S et qui reste présent pendant S, G<sub>2</sub> et M. Enfin la présence de l'enveloppe nucléaire contribue à l'inhibition de la re-réplication.

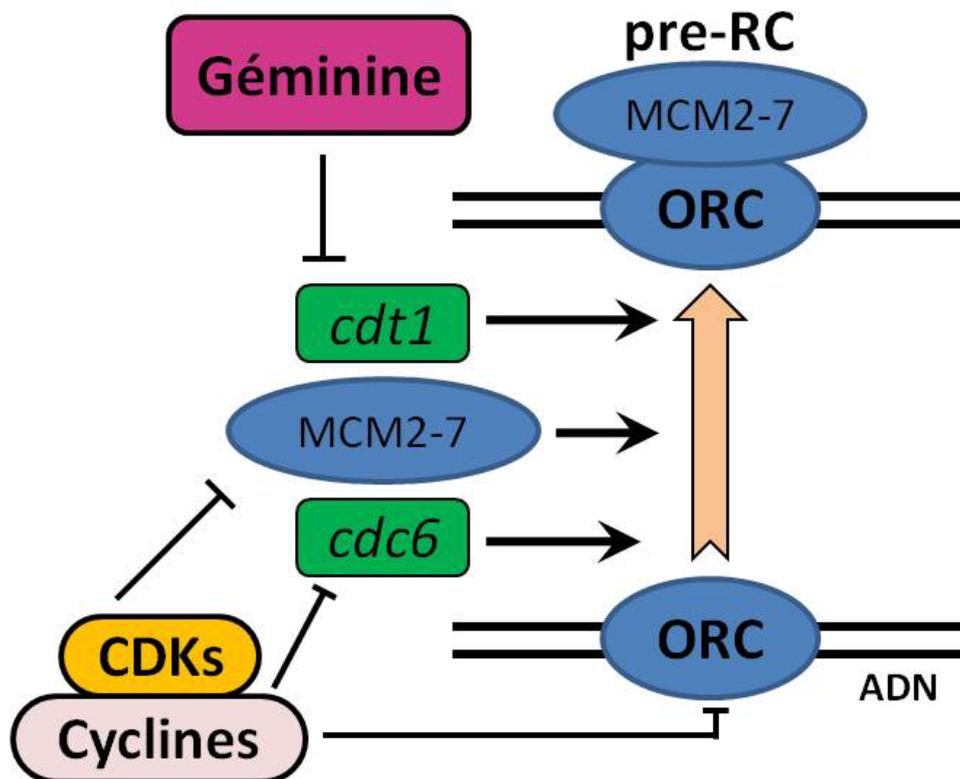


Figure 14 : Mécanismes d'inhibition de la re-réplication pendant les phases S, G<sub>2</sub> et M

### II.3.5. La transition G<sub>1</sub>/S

Plusieurs protéines et complexes protéiques doivent s'associer aux complexes pré-répliatifs afin que la synthèse d'ADN puisse commencer (Figure 15). La protéine MCM10/Dna43 se fixe tout d'abord au complexe pré-répliatif. La kinase cdc7 commence par activer le complexe pré-répliatif en fin de phase G<sub>1</sub>. La kinase CDK2/Cycline E intervient ensuite et le complexe peut alors fixer cdc45, un facteur essentiel qui permettra l'accrochage de l'ADN polymérase  $\alpha$ . L'activité CDK2 est indispensable pour l'association de cdc45 à la chromatine. Une ADN hélicase est alors activée au niveau des fourches de réplication, et les ADN polymérase peuvent commencer à agir. La topologie de l'ADN est maintenue par l'activité de plusieurs topoisomérases [238].

**L'assemblage de la machinerie de synthèse de l'ADN et l'initiation de son activité sont donc contrôlés par deux kinases, cdc7 et CDK2.** L'activité de cdc7 dépend de la présence transitoire de Dbf4, comme l'activité des CDKs dépend de la présence transitoire des cyclines. Le niveau de Dbf4 est maximal en phase S et est la résultante des activités de synthèses protéiques et de destructions protéolytiques. Cette régulation de cdc7/Dbf4 explique qu'on lui donne parfois le nom de DDK (*Dbf4-dependent kinase*) [239]. Cdc7/Dbf4 phosphoryle essentiellement les protéines MCM, en particulier MCM2. Le recrutement de CDK2 aux origines de répliations se fait grâce aux ORC et à cdc6. **L'activité CDK est indispensable à la réplication de l'ADN**, mais la plupart des substrats qui doivent être phosphorylés restent encore inconnus. CDK2/Cycline E phosphoryle p27<sup>KIP1</sup>, ce qui stimule son ubiquitination par Skp1/Skp2, et conduit à sa destruction par le protéasome, contribuant à la transition G<sub>1</sub>/S [182].

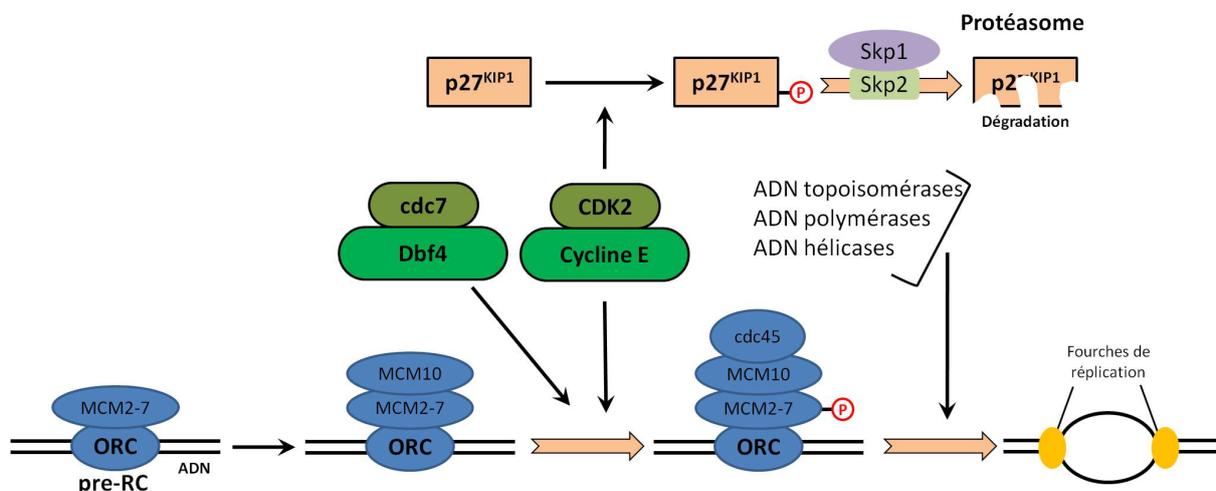
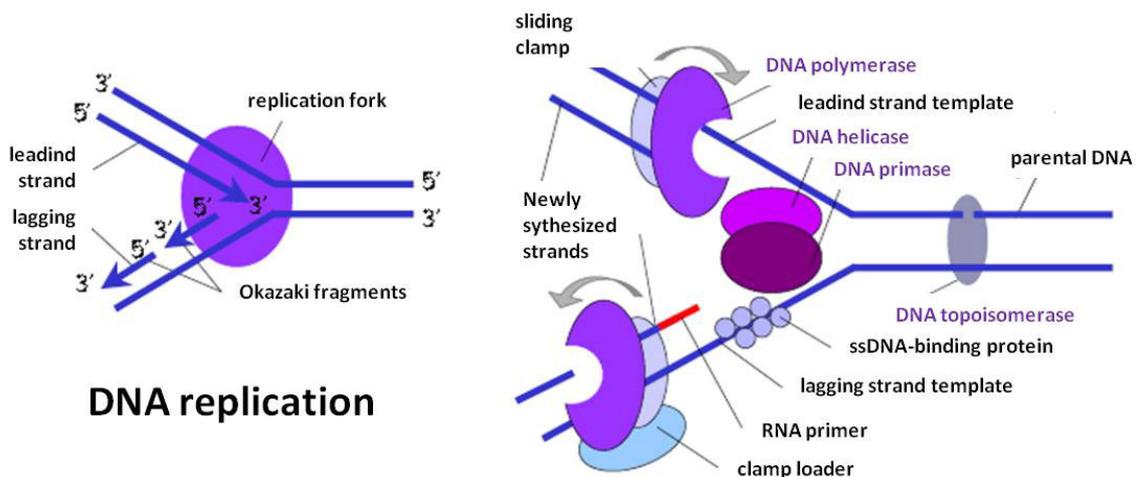


Figure 15 : Régulation de la transition G<sub>1</sub>/S.

### II.3.6. La phase S

Les mécanismes moléculaires de la réplication de l'ADN sont complexes et dépassent le cadre de ce chapitre. Nous ne les décrivons que très brièvement (**Figure 16**) [240].

La réplication de l'ADN est catalysée par l'ADN polymérase, une enzyme qui utilise un brin d'ADN comme base de synthèse (« template ») de l'autre brin par additions successives, sur l'extrémité 3', de nucléotides complémentaires fournis par les précurseurs dATP, dTTP, dGTP et dCTP. L'élongation de la chaîne d'ADN se fait donc dans le sens 5'→3'. Dans la cellule, la réplication de la molécule d'ADN double brin se fait dans une structure en forme de « Y », la fourche de réplication (« replication fork »). Celle-ci progresse graduellement le long de la double hélice parentale, générant deux doubles hélices filles derrière elle, formant les deux bras du « Y ». Chacune avance dans une direction chimique différente, 3'→5' et 5'→3'. L'ADN polymérase ne fonctionne que sur un des brins, dans le sens 5'→3' (« *leading strand* »). La synthèse de l'ADN sur l'autre brin (3'→5', « *lagging strand* ») fait donc appel à un autre mécanisme. En effet, sur ce brin, l'ADN polymérase produit de longues séries de fragments, les « fragments d'Okazaki », qui sont ensuite reliés les uns aux autres par une ADN ligase. Parmi les nombreuses protéines qui interviennent (au moins 27 au niveau de la fourche de réplication), mentionnons simplement l'ADN hélicase, qui déploie la double hélice et l'ADN primase qui produit les amorces pour les fragments d'Okazaki.



**Figure 16 : Phase S, réplication de l'ADN.**  
(Adapté de Alberts B., 2003 [240] et Meijer L., 2003 [179])

Les complexes cycline A/CDK2 et cycline B/CDK1 (aussi appelé le MPF : *meiosis promoting factor*) contrôlent la progression au travers de la partie du cycle cellulaire indépendante des facteurs extracellulaires.

La synthèse de la cycline A débute vers la point de restriction et l'activation du complexe cycline A/CDK2 est réalisée lors de la fin de la phase G<sub>1</sub> et atteint son maximum au début de la phase S.

**L'activité de cycline A/CDK2 est essentielle au bon déroulement de la phase S.** La quantité maximum de cycline A/CDK2 correspond au début de la réplication de l'ADN [241]. Il a été montré *in vitro* que le complexe cycline A/CDK2 contrôle l'activité des enzymes ADN polymérase après l'association des complexes de réplication, lors de l'initialisation de la réplication de l'ADN, probablement en phosphorylant des éléments du complexe de l'ADN polymérase dont le PCNA [242].

### II.3.7. La phase M

#### II.3.7.1. Généralités

La phase M comporte les phases classiques décrites essentiellement sur la base de la morphologie des chromosomes et de l'enveloppe nucléaire, phases décrites il y a plus de cent ans.

Une nouvelle nomenclature, s'appuyant sur les événements moléculaires qui contrôlent et accompagnent ces événements morphologiques, a été proposée [243] (**Figure 17**). **Elle comporte cinq transitions, chacune étant caractérisée par l'activité de protéines kinases bien particulières et par la succession de destructions protéolytiques de certains substrats :**

- **La transition 1** chevauche la fin de G<sub>2</sub> et la plus grande partie de la prophase. Elle est caractérisée par l'activité des kinases CDK/cycline A, Plk1, Aurora-A. **Pendant cette période CDK1/cycline B est inactive et cytoplasmique.**
- **La transition 2** est caractérisée par l'activation de CDK1/cycline B par CDC25 et sa translocation vers le noyau, suivie par la rupture de l'enveloppe nucléaire.
- **La transition 3** correspond bien à la prométaphase. Un certain nombre de critères comme l'attachement des kinétochores au fuseau, l'activation de l'« *Anaphase Promoting Complex* » (APC/cdc20) modulé par l'attachement des microtubules au kinétochore, doivent être satisfaits pour que la mitose se termine. La cycline A est détruite à ce stade, alors que la cycline B reste présente.

- **La transition 4.** Au cours de cette phase, les kinétochores étant tous reliés à des microtubules, *cdc20* n'est plus inhibée par MAD2 (« *Mitotic Arrest Deficient 2* »), et peut donc activer complètement l'activité de l'APC. L'APC peut donc s'attaquer d'une part à la securine, conduisant à la disjonction des chromatides, et, d'autre part, à la cycline B, permettant l'entrée en télophase [244].
- **La transition 5** est caractérisée par le fait que, la cycline B étant détruite, CDK1 est inactivée et une nouvelle enveloppe nucléaire peut se reformer. La cytokinèse a lieu, et la cellule se retrouve en interphase. Cdc20 est dégradée et remplacée par *cdh1* (ou *hct1*, « *fizzy-related protein* ») qui se lie à l'APC, permettant la dégradation de nouvelles protéines, telles Aurora-A et Tome-1. APC/*cdh1* reste présent dans la cellule jusqu'à l'entrée dans le prochain cycle de division.

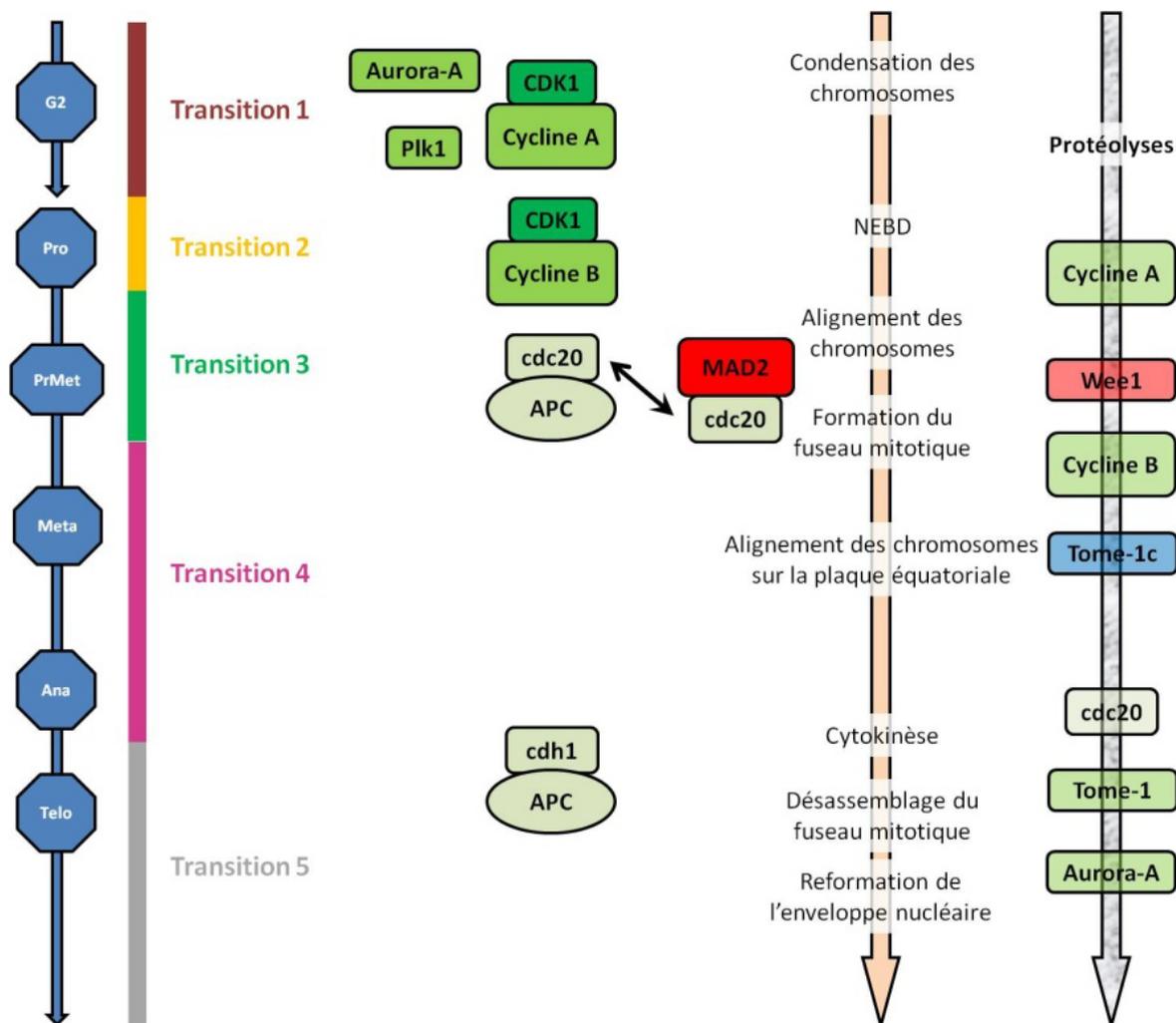


Figure 17 : Nouvelle nomenclature de la Mitose, s'appuyant sur les événements moléculaires.

### II.3.7.2. Les transitions G<sub>2</sub>/M et prophase/métaphase

La transition prophase/métaphase, souvent abusivement nommée transition G<sub>2</sub>/M, est contrôlée par la kinase CDK1/cycline B formant le MPF (*Maturation Promoting Factor*). En G<sub>2</sub> début de prophase, CDK1 est présente sous forme monomérique inactive. Puis, au fur et à mesure de la synthèse de cycline B, le complexe CDK1/cycline B s'accumule pour atteindre un niveau maximal en prophase. Le complexe cycline B/CDK1 s'assemble au fur et à mesure de la synthèse de la cycline B dans le cytoplasme mais n'est actif qu'après sa translocation dans le noyau durant la prophase de la phase M.

Tout au long des phases S et G<sub>2</sub>, le MPF est conservé dans le cytoplasme sous une forme inactive par la phosphorylation de CDK1 sur les résidus Thr14 et Tyr15 catalysée par la protéine kinase Wee1 (phosphorylation de Thr14) et Myt1 (phosphorylation à la fois de Thr14 et Tyr15). En revanche la Thr161, dont la phosphorylation est indispensable à l'activité de la kinase, est phosphorylée par CDK7/cycline H/Mat1 (CAK).

Quatre mécanismes sont responsables de l'activation du MPF lorsque la cellule est prête à entrer en phase M (**Figure 18**).

Tout d'abord les kinases inhibitrices Wee1 et Myt1 sont inactivées par phosphorylation par les kinases PKB/AKT et p90RSK. De plus, Tome-1 (« *trigger of mitotic entry* »), associé à Skp1, est responsable de la dégradation rapide de Wee1 par protéolyse en fin de G<sub>2</sub> ;

Parallèlement, les deux résidus inhibiteurs, Thr14 et Tyr15, sont déphosphorylés par les phosphatases CDC25. Les fonctions respectives de chacune des trois CDC25 n'ont pas encore été clairement établies. Il semblerait que CDC25B amorce l'activation de CDK1/cycline B. CDC25C est ensuite activée par phosphorylation par, d'une part, CDK1/cycline B, générant ainsi un système d'auto-amplification, et d'autre part, PLK1. CDC25A est stabilisée par phosphorylation par CDK1/cycline B.

La cycline B est phosphorylée par diverses kinases, ce qui est indispensable à l'interaction entre CDC25 et CDK1, donc à l'activation de la kinase.

**Le complexe CDK1/cycline B migre dans le noyau, où il trouve la plupart de ses substrats (lamines, nucléoline, condensine, par exemple).** Les interactions de la cycline B1 avec la cycline F et l'importine contrôlent la localisation nucléaire du complexe CDK1/cycline B.

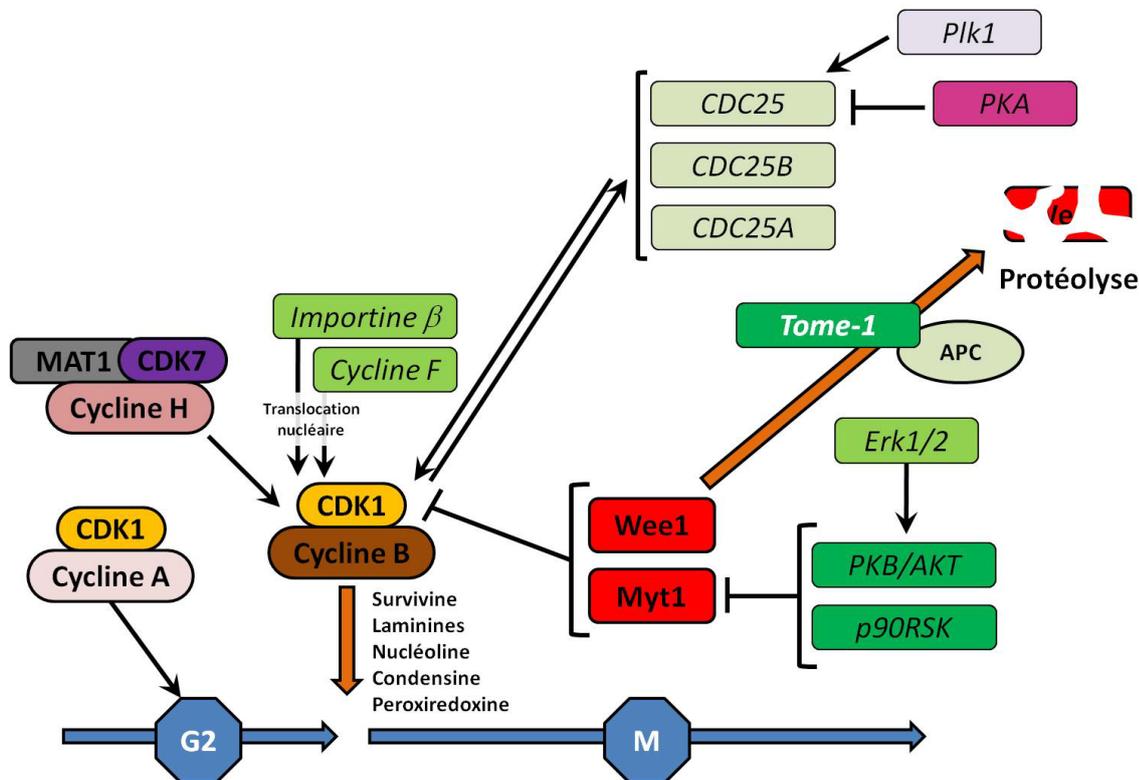


Figure 18 : Contrôle de la transition G<sub>2</sub>/M.

### II.3.7.3. Condensation des chromosomes

La condensation des chromosomes est parmi les premiers évènements morphologiques de la division qui aient été décrits (Figure 19). La condensine, un complexe constitué de 5 sous-unités, est le principal responsable du phénomène de condensation chromosomique. Ses sous-unités sont, chez l'homme, hCAP-C, hCAP-E, hCAP-D2, hCAP-G et hCAP-H. Elles sont très bien conservées chez les eucaryotes et ont une nomenclature complexe. La condensine conduit une seule réaction : le super-enroulement, ATP-dépendant, de la molécule d'ADN dans des conditions topologiques définies. L'activité CDK1/cycline B est indispensable pour le fonctionnement de la condensine et pour sa modification post-traductionnelle par SUMOylation\*. L'interaction topoisomérase II/CDK1 semble également

\* La SUMOylation est une modification post-traductionnelle aboutissant à la liaison covalente d'une ou plusieurs protéines SUMO sur une lysine acceptrice d'une protéine cible. A ce jour, quatre protéines SUMO ont été caractérisées (SUMO-1, -2, -3 et -4). Le processus de SUMOylation est très proche biochimiquement de celui de l'ubiquitination, notamment en impliquant une cascade similaire d'enzymes. En revanche, alors que l'ubiquitination entraîne principalement la dégradation de la protéine ciblée par le protéasome, la SUMOylation

être impliquée dans la condensation des chromosomes sans nécessiter pour autant l'activité catalytique de CDK1. Enfin la phosphorylation de l'histone H3 (et de CENP-A, son variant au niveau des centromères) par la kinase Aurora-B est également directement impliquée dans la condensation chromosomique. La déphosphorylation de l'histone H3 commence dès la sortie de métaphase et s'achève en télophase juste avant la décondensation visible de la chromatine.

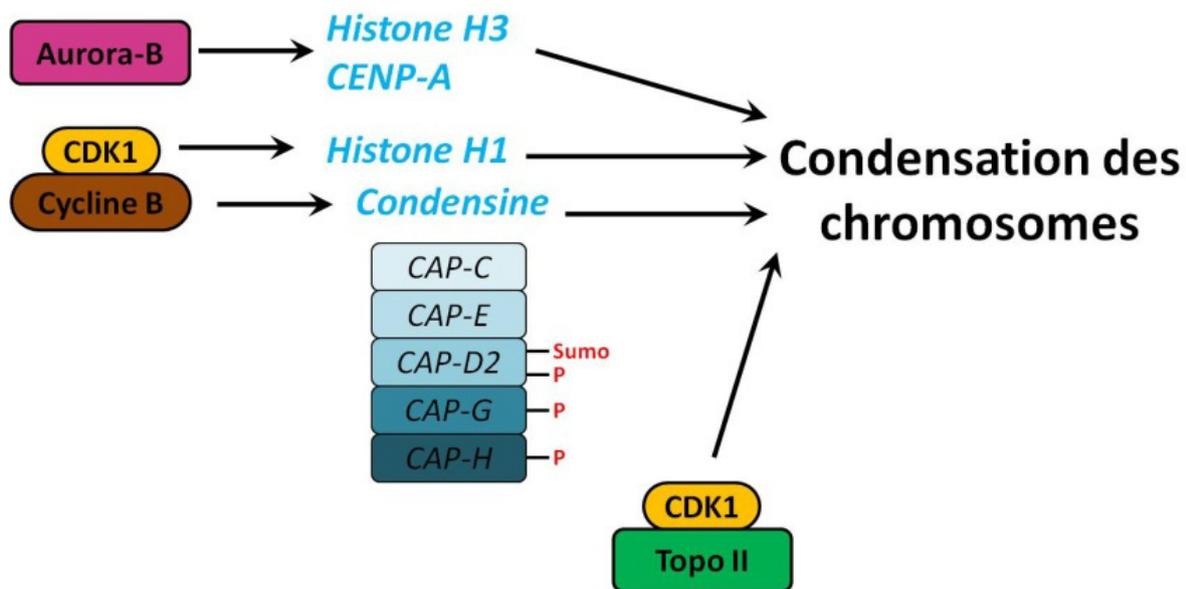


Figure 19 : Régulation de la condensation de la chromatine.

#### II.3.7.4. Le fuseau mitotique

Les microtubules sont des assemblages non covalents d'hétérodimères de tubuline  $\alpha$  et  $\beta$ . En fin de prophase on assiste à une redistribution spectaculaire de la tubuline intracellulaire qui s'organise en un fuseau de microtubules orientés perpendiculairement au futur plan de clivage. Les sous-unités des microtubules sont en fait dans un état d'« instabilité dynamique », c'est-à-dire constamment en polymérisation (« plus end ») et dépolymérisation (« minus end »). Ces deux états dépendent d'un grand nombre de facteurs (GTP/GDP, magnésium, température) et de protéines régulatrices. On distingue les protéines qui stabilisent les microtubules, les « *microtubule associated proteins* » (MAPs : MAP1, MAP2, MAP4) et les protéines qui déstabilisent les microtubules, stathmine (Op18), katanine, « *Mammalian Centromere-Associated Kinesin* » (MCAK), etc. Parmi les protéines motrices, Eg5, Klp2, Mklp1, CENP-E sont des « kinésines » actives du côté « plus » des microtubules, alors que HSET et la dynéine cytoplasmique sont des protéines motrices situées du côté « moins ». Les

---

semble plutôt réguler les propriétés biochimiques des protéines cibles (trafic intracellulaire, interaction protéique, interaction ADN-protéine, activité transcriptionnelle...). De plus, quelques exemples démontrent que la SUMOylation de certaines protéines antagonise leur ubiquitination.

microtubules sont par ailleurs la cible d'un grand nombre de molécules antimitotiques qui agissent soit en stabilisant soit en déstabilisant les microtubules.

Les microtubules se répartissent en un fuseau mitotique sous le contrôle des centrosomes dupliqués. Les chromosomes établissent une connexion avec les microtubules qui émanent des pôles du fuseau. Cette connexion se fait au cours de la rencontre entre les microtubules et une structure associée au chromosome appelée kinétochore. Tous les chromosomes doivent être attachés et correctement alignés avant de pouvoir être répartis en deux lots identiques. Les chromosomes s'organisent au centre du fuseau en une « plaque métaphasique » caractéristique. Puis, tirés par chacun des pôles du fuseau, les chromatides sœurs vont se diriger vers les pôles du fuseau et se répartir en deux lots identiques.

#### *II.3.7.5. Contrôle de l'attachement des chromatides aux microtubules*

Un système de contrôle (« *spindle assembly checkpoint* » ou « *mitotic checkpoint* ») permet la vérification de l'attachement des chromosomes au fuseau et empêche la cellule d'entrer en anaphase tant que tous les chromosomes ne sont pas correctement orientés en une plaque métaphasique (**Figure 20**) [245]. Le mécanisme fonctionne même lorsqu'un seul chromosome n'est pas à sa place. Ce système de contrôle couple les kinétochores non-attachés à l'APC, le complexe responsable de l'achèvement de la mitose. En résumé, Mad2, un élément sensible à l'attachement des microtubules au kinétochore, a pour propriété principale de séquestrer cdc20, la sous-unité adaptatrice de l'APC. L'interaction Mad2/cdc20 semble être régulée par les kinases des familles Bub, Plk1 et Aurora, sans que les détails de ces régulations soient bien connus. Dès que tous les kinétochores sont attachés aux microtubules, cdc20 est libéré de Mad2, et peut donc activer APC. L'entrée en anaphase peut alors avoir lieu.

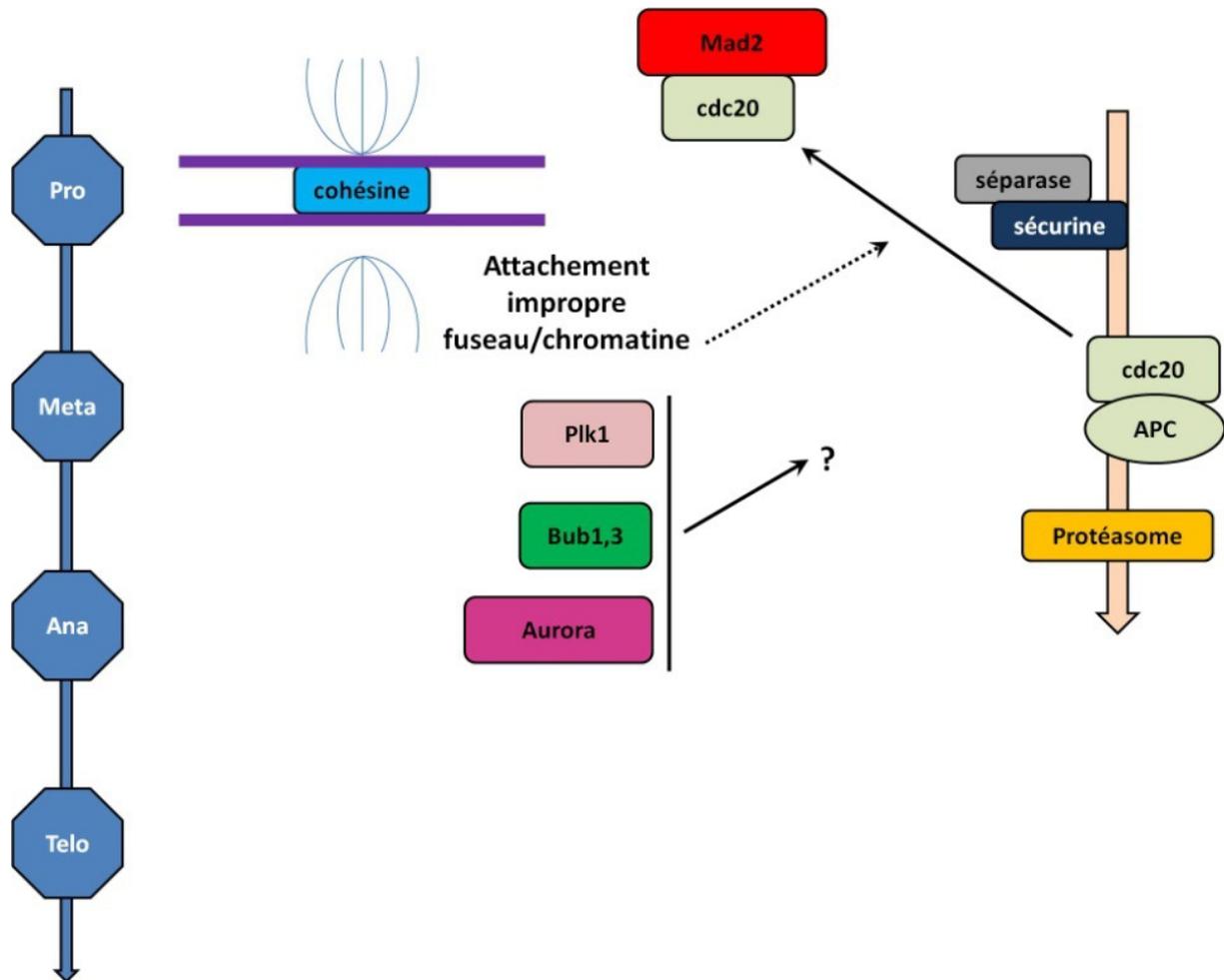


Figure 20 : Contrôle de l'attachement des chromatides aux microtubules.  
« spindle assembly checkpoint »

### II.3.7.6. Contrôle de l'orientation du fuseau et transition anaphase/télophase

La poursuite du cycle cellulaire en télophase dépend du « *mitotic exit network* », un groupe de protéines qui permet le relargage de la phosphatase Cdc14 (une protéine localisée en interphase dans le nucléole) et son activation. Cette phosphatase déphosphoryle et active cdh1, contre-balançant la phosphorylation et l'inactivation par CDK1/Cycline B. Cdh1 interagit alors avec APC. Le complexe APC/cdh1 actif permet la destruction sélective de certains substrats, permettant ainsi le passage en télophase et l'achèvement de la mitose.

Un système de contrôle (« *spindle orientation checkpoint* »), principalement connu chez la levure, permet la vérification de l'orientation correcte du fuseau [244]. Lorsque le fuseau n'est pas correctement orienté, le « *mitotic exit network* » est inhibé, la phosphatase cdc14 reste inactive, et, en conséquence, cdh1 reste phosphorylée et incapable d'activer APC. La cellule reste bloquée en anaphase (Figure 21).

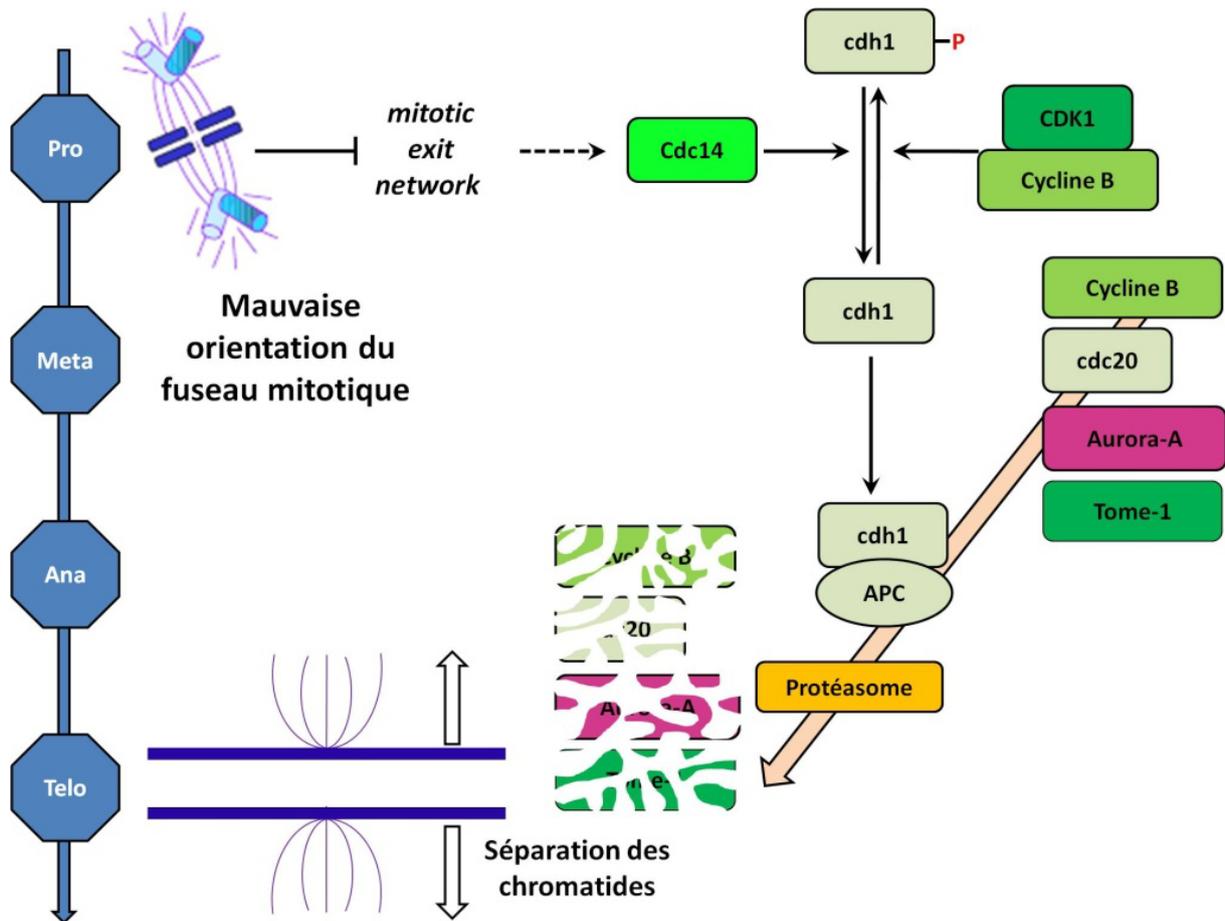


Figure 21 : Contrôle de l'orientation du fuseau mitotique.  
« spindle orientation checkpoint »

### II.3.7.7. Séparation des chromatides et la transition métaphase/anaphase

Après la réplication, les deux copies homologues du génome, les chromatides, restent associées grâce à des complexes protéiques connus sous le nom de cohésines. En métaphase la cohésine est phosphorylée par Plk1, elle devient alors sensible à la dégradation protéolytique. En début d'anaphase la cohésine est détruite par une caspase particulière, la séparase, elle-même phosphorylée, permettant ainsi la séparation des chromatides. Celles-ci sont tirées vers les pôles du fuseau par les microtubules, au niveau des kinétochores.

La séparase est maintenue sous forme inactive par association avec une autre protéine, la sécurine. L'APC (« Anaphase Promoting Complex ») ou cyclosome, un complexe d'au moins 11 sous-unités, présente une activité ubiquitine ligase lorsqu'il s'associe avec cdc20 [246]. Le complexe APC/cdc20 induit l'ubiquitination de la sécurine, conduisant à sa destruction protéolytique par le protéasome. C'est la destruction de la sécurine par le protéasome qui conduit donc à l'activation de la séparase. Une séparase active est ainsi libérée. Ceci conduit à la dissociation du complexe cohésine et à la séparation des chromatides.

Plusieurs phosphorylations essentielles sont impliquées dans ce processus de séparation des chromosomes. La phosphorylation de la cohésine (sous-unité Scc1) par la kinase Plk1 la rend particulièrement sensible à la séparase. La phosphorylation de l'APC par CDK1/cycline B contribue à son activation. Enfin, la séparase, quant à elle, doit également être phosphorylée par CDK1/cycline B pour devenir active (Figure 22).

Si APC/cdc20 conduit à la destruction de la sécurine, celle-ci n'est pas son unique substrat. En effet, le complexe est également en partie responsable de la destruction de la cycline B, un événement qui a plusieurs conséquences physiologiques importantes, dépendant toutes directement de la chute de l'activité CDK1 : la disparition du fuseau, le déclenchement de la cytokinèse, la transition vers la phase G<sub>1</sub> [244].

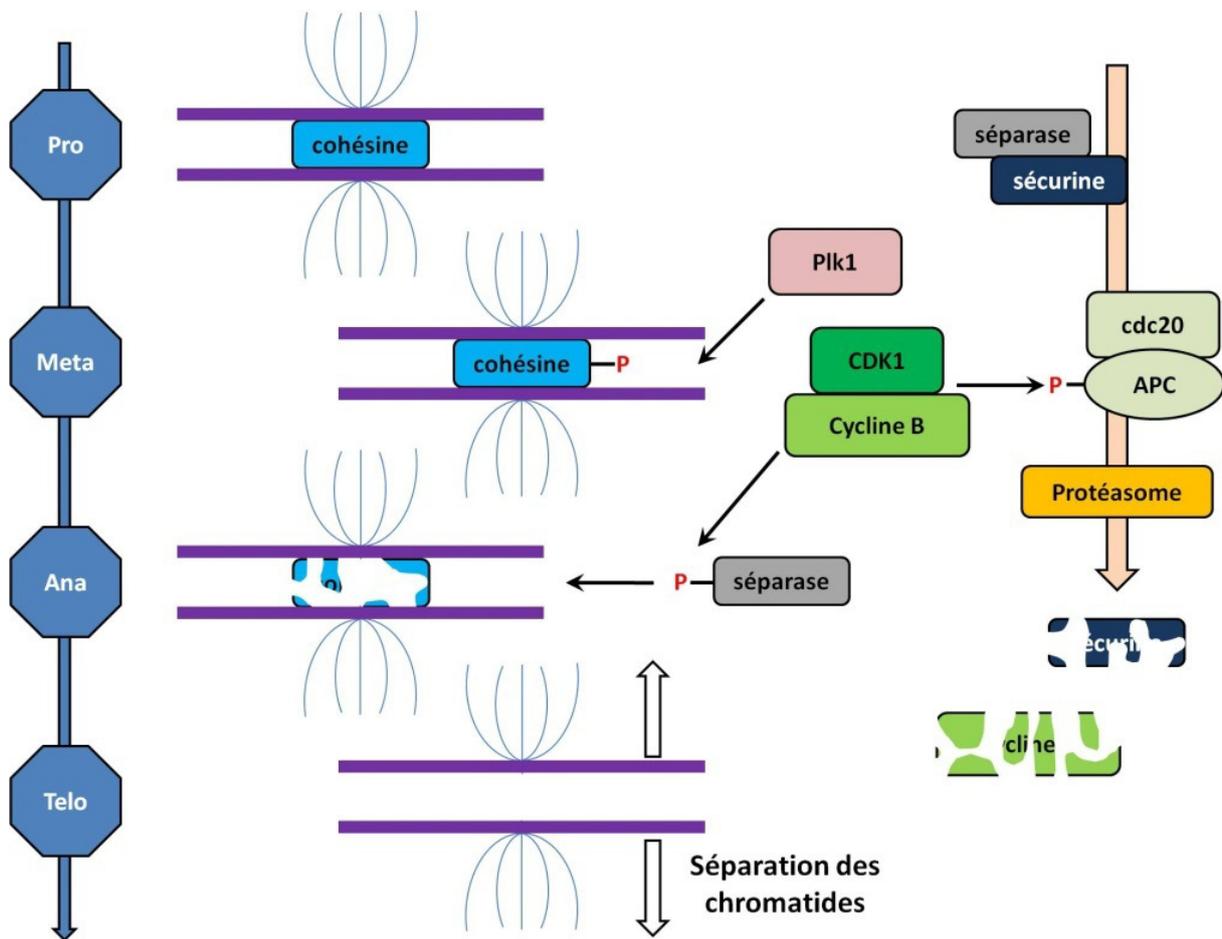


Figure 22 : Régulation de la séparation des chromatides au cours de l'anaphase.

### II.3.7.8. La cytokinèse

La cytokinèse est l'étape finale de la division qui conduit à l'individualisation des deux cellules-filles [247]. Elle est caractérisée par la mise en place d'un anneau contractile contenant de l'actine, de la myosine et d'autres protéines (**Figure 23**). L'anneau se contracte au niveau équatorial du fuseau mitotique en une zone dense (« *mid-body* »), où se chevauchent les microtubules émanant des deux pôles du fuseau. Il se referme ensuite entre les deux cellules-filles. L'anneau d'actomyosine se met en place au niveau du cortex équatorial de la cellule. La myosine constitue le moteur de cet anneau. Parmi les protéines associées à l'anneau contractile on trouve les septines, des protéines à domaine FCH (« *FER/CIP4-Homology* ») de type cdc15, les protéines de la famille IQGAP (« *IQ motif containing GAP homolog* ») et des GTPases des familles Rho, Rac et cdc42, la kinase citron. Leurs fonctions, leur régulation, l'ordre de succession de leur intervention et leur interdépendance restent encore très mal connus. De toute évidence la cytokinèse doit être parfaitement synchronisée avec le cycle nucléaire. Elle n'est possible que lorsque les deux lots de chromosomes sont répartis de façon symétrique entre les deux futures cellules-filles. Trois familles de kinases participent à ce contrôle, les CDKs, la kinase Plk1 et la kinase citron. L'inactivation de CDK1 est indispensable au déclenchement de la cytokinèse, car CDK1 inhibe la myosine en phosphorylant la chaîne légère de la myosine (« *MRLC, Myosin Regulatory Light Chain* »), mais probablement aussi d'autres substrats. Plk1 pourrait contribuer au déclenchement de la cytokinèse en participant à la destruction de la cycline B et donc à l'inactivation de CDK1. Le mécanisme d'action précis de la kinase citron n'est pas encore connu.

Certaines protéines migrent des centromères au centre du fuseau (« *midzone* ») en début d'anaphase. Collectivement appelées « *chromosomal passenger proteins* », elles comportent la protéine INCENP (« *inner centromere protein* »), les kinases Aurora-B et Plk1, la survivine et les kinésines, protéines motrices des microtubules. Ces protéines sont indispensables au déroulement de la cytokinèse. Cependant le couplage entre ces protéines et celles de l'anneau contractile reste globalement inconnu. La cytokinèse implique également le trafic intracellulaire, la sécrétion, et/ou le recyclage membranaire. Son achèvement est associé à une fusion de vésicules membranaires.

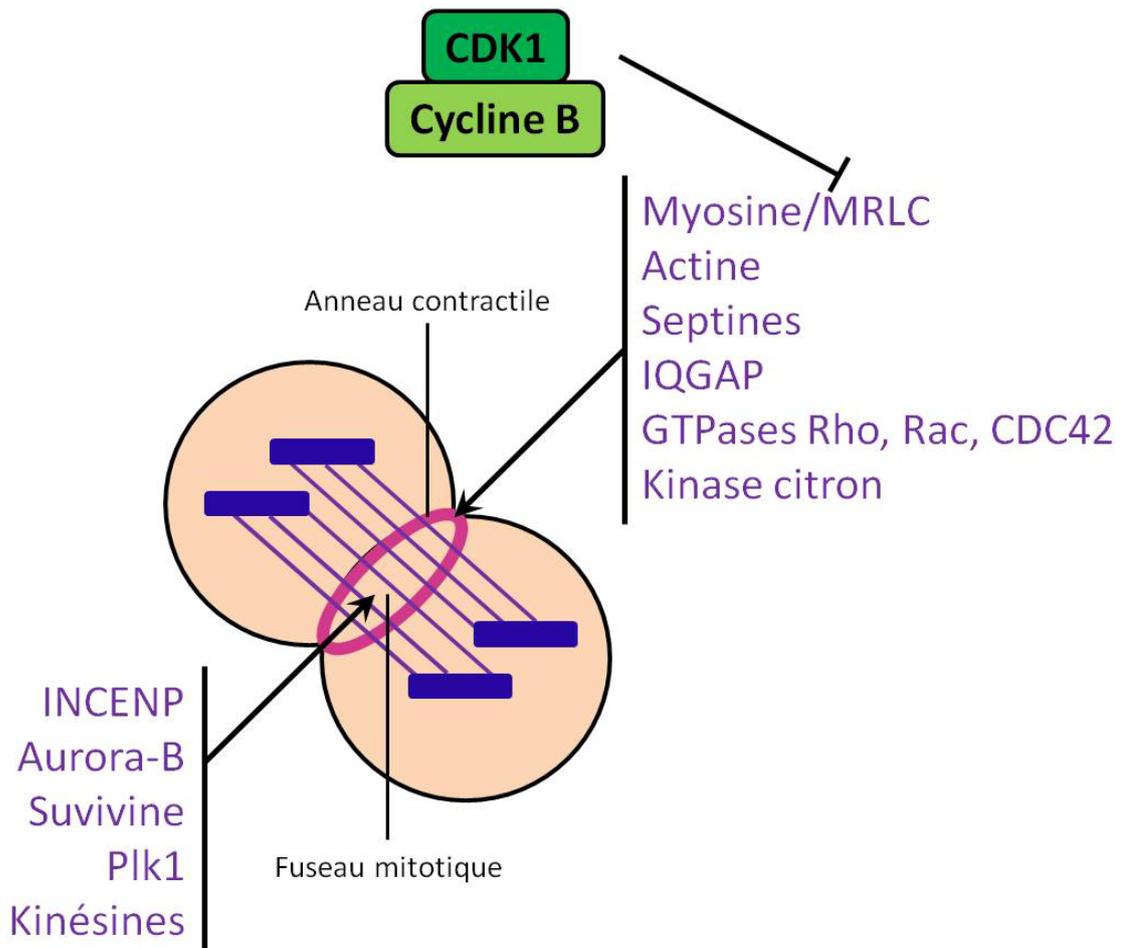
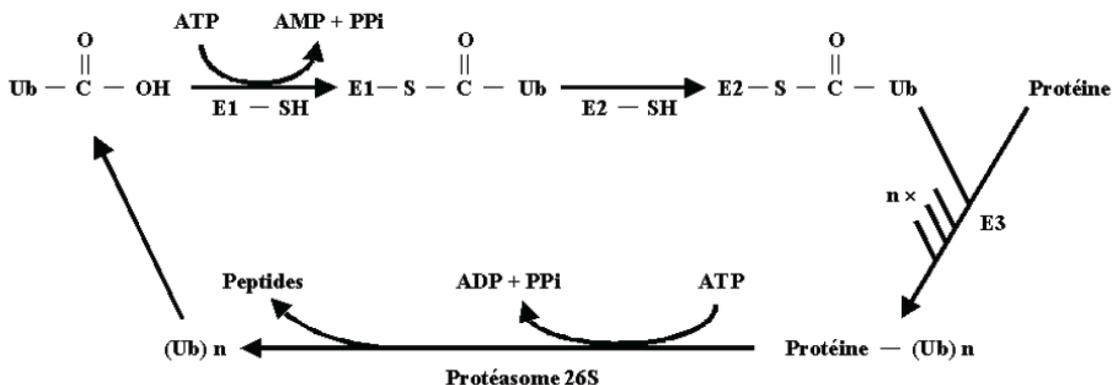


Figure 23 : Régulation de la cytokinèse.

## II.4. Un cycle de destruction protéolytique

Le cycle cellulaire peut être vu comme un cycle coordonné de synthèses, d'activations transitoires et de destructions protéolytiques [248]. La dégradation spécifique des protéines se fait par le protéasome, un complexe macromoléculaire d'au moins 44 sous-unités protéiques. Pour être pris en charge par les protéases du protéasome, la cible protéique à dégrader doit être **ubiquitinée**.

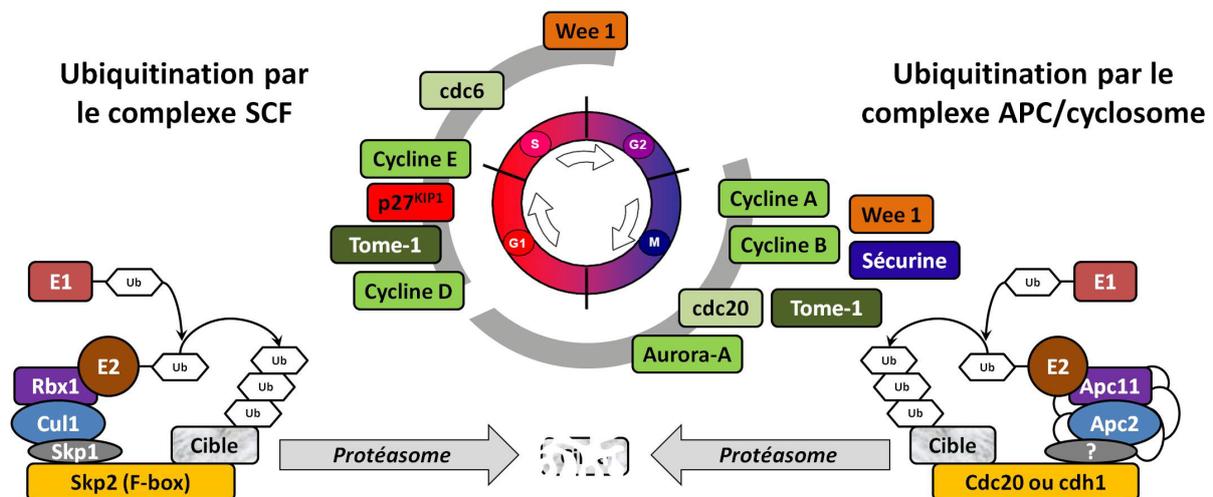
La dégradation spécifique des protéines *via* ce système implique deux étapes successives (**Figure 24**). Premièrement, une modification post-traductionnelle des protéines cibles consistant en une fixation covalente sur la chaîne latérale de certaines lysines de plusieurs molécules d'ubiquitine, un peptide signal de 8 kDa. Ensuite, les protéines conjuguées à l'ubiquitine sont reconnues par une protéase multicatalytique, le protéasome 26S. La machine enzymatique responsable de l'ubiquitination des protéines nécessite au moins deux entités catalytiques différentes, E1 (*ubiquitin activating enzyme*) et E2 (*ubiquitin-conjugating enzyme*). L'ubiquitine est initialement conjuguée à E1 par une liaison thioester entre son groupe carboxyle C-terminal et une chaîne cystéine dans le site actif de l'enzyme. La formation de ce lien nécessite une molécule d'ATP. Une réaction de trans-estérification passe alors l'ubiquitine activée vers un résidu cystéine du site actif de E2 qui peut alors transférer l'ubiquitine sur la protéine cible [249]. Ce modèle de base est suffisant *in vitro* mais une troisième enzyme, nommée E3 (*ubiquitin ligase*), est nécessaire à la catalyse de la poly-ubiquitination *in vivo*. C'est elle qui donne sa spécificité d'action au système. Une quatrième enzyme, E4, identifiée chez la levure [250], ne semble nécessaire qu'à l'élongation de chaînes d'ubiquitine dans certains cas précis, suggérant que le fonctionnement des voies protéolytiques ubiquitine dépendantes n'est pas encore complètement compris.



**Figure 24 : Réactions enzymatiques principales de la protéolyse protéine spécifique ubiquitine dépendante.** (D'après Hershko A., 1997 [251], Zachariae et al., 1999 [252] et Kornitzer et al., 2000 [249])

E3 regroupe sous le même nom une famille de complexes enzymatiques dont 4 membres sont actuellement connus [249] : APC, (*Anaphase Promoting Complex* aussi appelé *cyclosome*) activé par cdc20 ou par cdh1 [246], E3 $\alpha$ /E3 $\beta$ , protéines à domaines HECT («*Homologous to the E6-AP Carboxyl Terminus*») et SCF (*Skp1-Cdc53/cullin-F-box protein*) activé par la «*F-box protein*» Skp2 [248]. L'ubiquitination par SCF nécessite la phosphorylation du substrat, l'activité de l'APC est modulée par la phosphorylation du substrat et la présence de protéines ancillaires permettant la liaison au substrat, l'activité de HECT dépend aussi de protéines ancillaires et E3 $\beta$  est activée constitutivement à l'encontre de ces substrats spécifiques. **Cependant, seuls les complexes SCF et APC sont connus comme étant impliqués dans la dégradation de protéines de régulation du cycle cellulaire chez les mammifères.**

L'APC/cyclosome, actif de la fin de la phase G<sub>2</sub> au milieu de la phase G<sub>1</sub> et le complexe SCF, actif du milieu de la phase G<sub>1</sub> jusqu'au début de la phase G<sub>2</sub>, sont constitués de multiples sous-unités (**Figure 25**).



**Figure 25 : Régulation du cycle cellulaire par la voie ubiquitine/protéasome.**  
(Adapté de Nakayama et al., 2001 [248])

Il existe de nombreuses cibles des voies ubiquitines dépendantes parmi les protéines régulatrices de la prolifération cellulaire. La destruction de ces substrats est indispensable pour la progression du cycle. Les principaux substrats qu'ils ubiquitinent, et ainsi conduisent à la destruction, sont indiqués dans la **Figure 25**.

La protéine p27<sup>KIP1</sup> est détruite en fin de G<sub>1</sub>, permettant l'activation de CDK2. La destruction de la kinase Wee1, par l'intermédiaire de Tome-1, contribue à l'activation de CDK1/cycline B. La destruction de Tome-1, en fin de phase M, permet la réapparition de Wee1, et donc l'accumulation en G<sub>1</sub> de CDK2 inactive. La destruction de la sécurine est primordiale dans la transition métaphase/anaphase puisque sa destruction permet la libération de la séparase et la destruction du complexe cohésine. Depuis 1991, il est connu que la destruction de la cycline B (acteur principal du contrôle de la transition G<sub>2</sub>/M), qui permet l'inactivation de CDK1 et la poursuite du cycle cellulaire au-delà de la métaphase, est importante [126]. De même, p53, les facteurs de transcription c-jun et c-fos, c-myc, les  $\beta$ -caténines sont dégradés par le protéasome 26S [249].

Le SCF contrôle la dégradation de protéines lorsque celles-ci ont été phosphorylées sur des sites spécifiques. La cycline E est phosphorylée par autophosphorylation en Thr380 [125]. La cycline D1 est phosphorylée en Thr286 [117]. La protéine p27<sup>KIP1</sup>, inhibiteur de cycline E/CDK2 est phosphorylée en Thr187 par ce même complexe [253, 254]. Les autres substrats de SCF comprennent la  $\beta$ -caténine [255], E2F [256], p53, c-jun et c-fos, c-myc [249] et la cycline A [257].

L'APC/cyclosome intervient lui dans le contrôle de la fin du cycle cellulaire et participe à la dégradation des cyclines B à la fin de la phase M [141]. La spécificité de APC montre deux niveaux de régulation (i) les protéines associées à l'APC lui permettent de lier spécifiquement ses substrats. C'est la liaison de Hct1/Cdh1 qui permet à APC de dégrader la cycline B. L'activité de Hct1/Cdh1 est elle-même inhibée par phosphorylation suivant l'action de la kinase Cdc28 et la phosphatase Cdc14 [258]. (ii) Phosphorylation activatrice de APC par le complexe Cycline B-CDK1 [259].

## II.5. Le contrôle de l'état de l'ADN

Lorsque l'ADN est endommagé, des mécanismes complexes sont activés. Ils conduisent à un arrêt du cycle cellulaire et permettent à la cellule soit de réparer cet ADN endommagé, soit, si les dommages sont trop importants, d'enclencher un programme de mort cellulaire [260]. Plusieurs niveaux d'arrêts sont possibles. On parle ainsi des « G<sub>1</sub>/S checkpoint » lorsque l'entrée en phase S est bloquée jusqu'à réparation de l'ADN endommagé (blocage de CDK2) et de « G<sub>2</sub> DNA damage checkpoint », lorsque l'arrêt a lieu avant l'entrée en phase M (blocage de CDK1). Ils impliquent deux kinases appartenant à la famille des « phosphoinositide 3-kinase-like kinases » (PIKKs) : ATM (« *Ataxia Telangiectasia Mutated* ») et ATR (« *ATM- and Rad3-related* »). La kinase ATM [261] est activée en réponse aux radiations ionisantes et aux coupures double-brin, alors que les UV et les erreurs de réplifications activent plutôt la kinase ATR.

Schématiquement, les kinases ATM et ATR ont au moins deux types d'effets. Tout d'abord (Figure 26) elles phosphorylent et activent les kinases Chk2 et Chk1 qui, elles, phosphorylent et inactivent les phosphatases CDC25A et CDC25C. En conséquence, CDK2 et CDK1 restent inactives, et le cycle cellulaire est arrêté, respectivement, en G<sub>1</sub>/S et en G<sub>2</sub>/M.

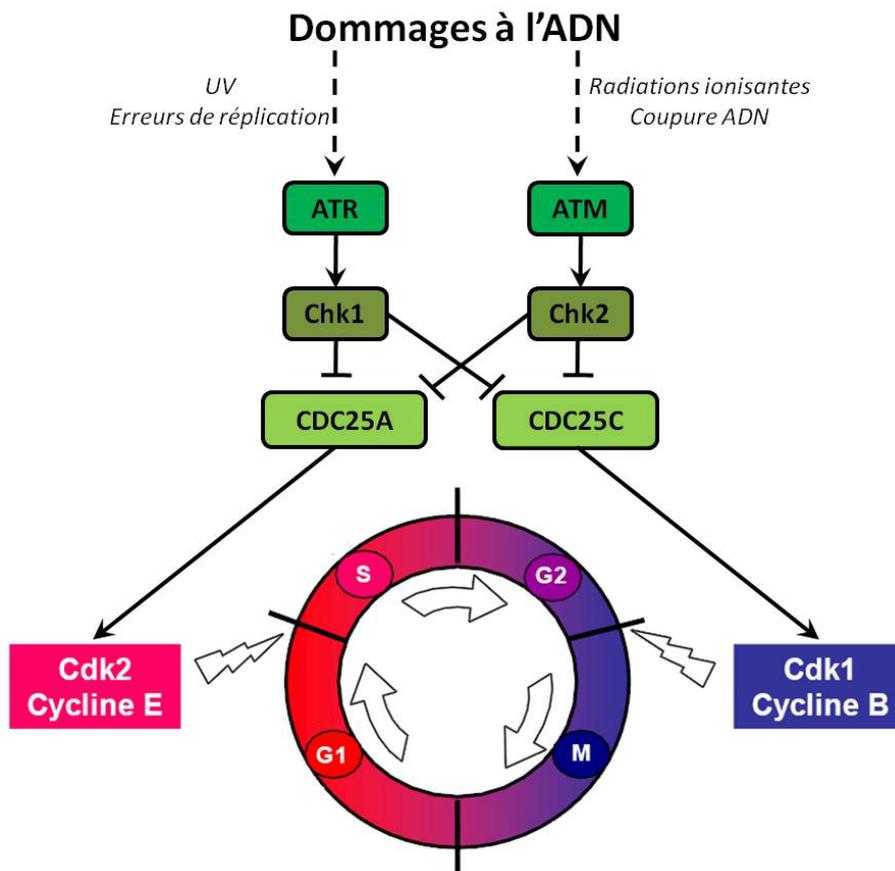


Figure 26 : Le contrôle de l'état de l'ADN et blocage en G<sub>1</sub> ou en G<sub>2</sub>.

Par ailleurs, ATM agit également par la voie p53-dépendante (**Figure 27**). Le suppresseur de tumeur p53 est un facteur de transcription activé sous l'effet de multiples facteurs (endommagement de l'ADN, hypoxie, choc thermique, par exemple). Il est responsable de l'induction d'un grand nombre de gènes conduisant à des réponses multiples et en particulier à un arrêt du cycle cellulaire ou au déclenchement de l'apoptose. Dans les conditions normales, p53 se fixe au facteur MDM2 (« *Murine Double Minute 2* », Hdm2 chez l'homme), ce qui conduit à sa dégradation et explique la faible abondance de p53 dans les cellules en bon état. En revanche, lorsque l'ADN est endommagé, trois mécanismes contribuent à une stabilisation très marquée de p53 et, en conséquence, à une forte augmentation de son activité transcriptionnelle. Tout d'abord, la kinase ATM est activée et phosphoryle MDM2, inhibant l'interaction MDM2/p53, ce qui libère et stabilise ainsi p53. Par ailleurs, ATM phosphoryle p53 (directement ou indirectement, par Chk2), renforçant sa stabilité. Enfin, p53 induit la transcription du locus ARF du locus INK4A. La protéine p14<sup>ARF</sup> se fixe sur MDM2 et induit sa dégradation rapide, renforçant encore davantage la stabilisation et l'accumulation de p53.

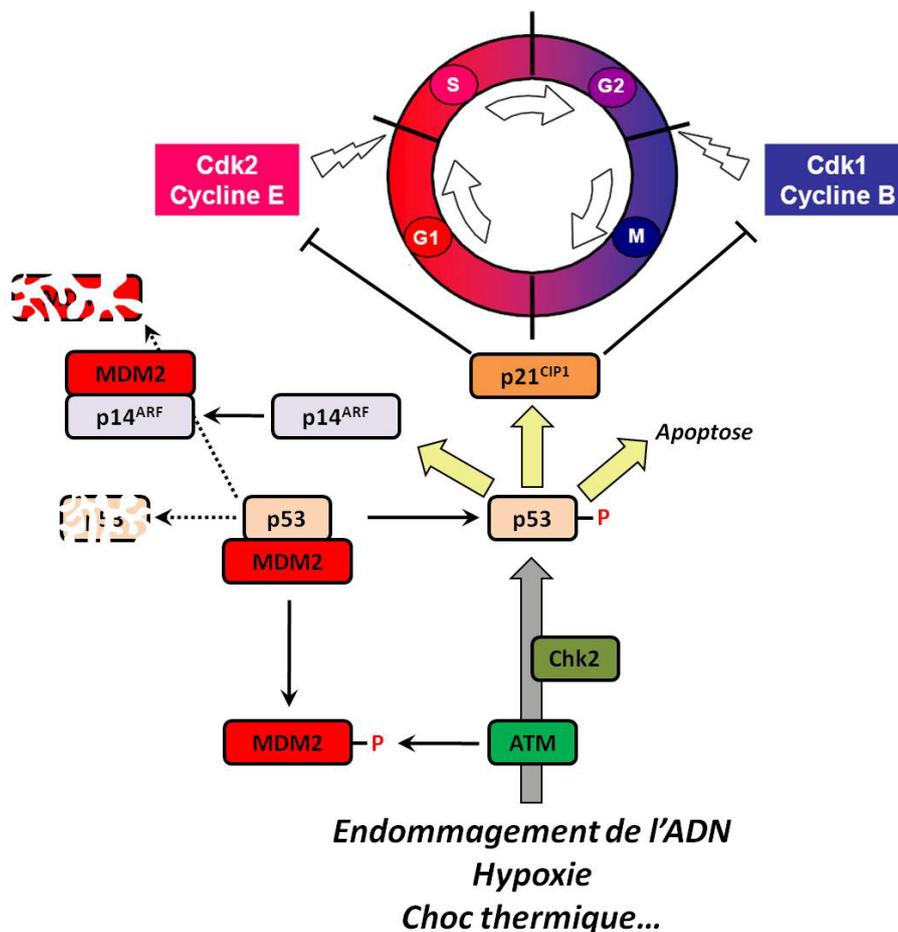


Figure 27 : Fonctions de p53 dans la réponse à l'endommagement de l'ADN.

Le facteur de transcription p53 induit la synthèse du CKI p21<sup>CIP1</sup> qui se lie aux kinases CDKs, et inhibe leur activité. L'arrêt de prolifération cellulaire en G<sub>1</sub> ou en G<sub>2</sub> provient essentiellement d'une induction de p21<sup>CIP1</sup>, et donc de l'inhibition de CDK2 ou de CDK1, respectivement.

Suite à des dommages à l'ADN induits par différents stress, les cellules ont la possibilité soit d'arrêter leur croissance, de réparer leur ADN ou d'entrer en apoptose [262]. Les facteurs de transcriptions p53 et E2F1 sont tous les deux impliqués dans ce processus de décision mais les mécanismes d'actions de ces deux protéines restent encore flous. Zhang *et al.* ont proposé, *via* une simulation informatique, un modèle cinétique à quatre modules dans le processus de décision en réponse à des dommages à l'ADN causés par des radiations ionisantes [263]. Dans ce modèle, les niveaux de p53 et d'E2F1 sont pulsatiles. Lors d'un dommage à l'ADN, p53 est le premier facteur de transcription à être activé induisant la synthèse de p21<sup>CIP1</sup> qui inactive E2F1 conduisant à l'arrêt du cycle cellulaire en phase G<sub>1</sub> [264]. Le choix entre survie et mort cellulaire est déterminé par le nombre de pulses de p53 dépendant de l'étendue des dommages à l'ADN. Lorsque les dommages sont réparables, l'inactivation de p53 et l'activation de E2F1 permet à la cellule de survivre et de ré-entrer en phase S. Si les dommages sont irréparables la coopération de p53 et d'E2F1 activés par les facteurs de croissance initie l'apoptose. E2F1 induit l'apoptose en initiant la surexpression de facteurs proapoptotiques (comme *Apaf-1*), des cofacteurs de p53 ainsi que les procaspases 3 et 9 [265-267]. Dans les cellules non stressées, E2F1 est activé pour promouvoir la prolifération cellulaire, tandis que la protéine AKT est activée pour inhiber l'activité de p53. En effet AKT induit la translocation nucléaire de MDM2 qui se fixe à p53 ce qui conduit à la dégradation du facteur de transcription alors que p53 peut indirectement inactiver AKT par PTEN («*Phosphatase and TENSin homolog*») [268, 269]. PTEN est un gène impliqué dans le contrôle tumoral, il participe à la régulation du cycle de division cellulaire en empêchant les cellules de se diviser trop rapidement et de façon incontrôlée. Il a une action antagoniste à PI3K «*Phosphatidylinositol 3-kinases*» un activateur d'AKT. Dans les cellules stressées, AKT est rapidement désactivé par p53. L'arrêt du cycle cellulaire induit par les pulses transitoires de p53 est outrepassé par l'activation d'E2F1 par les facteurs de croissances présents dans le milieu. p53 et E2F1 coopèrent alors dans le but d'initier l'apoptose.

## II.6. Sénescence réplivative

### II.6.1. Caractéristiques

La sénescence réplivative est un état cellulaire viable distinct de l'arrêt de croissance temporaire et de la vraie sénescence qui conduit à la mort cellulaire [270]. Des études réalisées par Hayflick dans les années 60 sur des cultures de fibroblastes diploïdes humains indiquaient qu'au début de leur durée de vie, les cellules proliféraient vigoureusement en réponse à des facteurs mitogéniques mais à l'approche de la fin de leur vie proliférative, elles devenaient de plus en plus réfractaires aux stimulations mitogéniques [271, 272]. Des passages répétés de cellules en culture démontraient une réduction de la densité cellulaire, une diminution du pic de densité du plateau de la phase croissance, un déclin du nombre de cellules synthétisant de l'ADN sur un temps défini et une augmentation graduelle du temps du cycle cellulaire [273-277]. Le nombre de cellules en sénescence réplivative augmentaient graduellement à chaque passage [276] et avait tendance à augmenter avec l'âge du donneur [274, 278]. Le taux spécifique d'entrée en sénescence réplivative ainsi que ses voies de transduction semblent différer entre les types de cellules et de tissus. Les descriptions réalisées par Hayflick ont également été observées dans d'autres types de cultures cellulaires ainsi qu'*in vivo* suggérant que la sénescence réplivative est une caractéristique de l'âge cellulaire [275, 278, 279].

### II.6.2. Implication des CKIs

Bien que les détails des voies conduisant à la sénescence réplivative ne soient pas clairement définis, certaines modifications cellulaires semblent importantes dans la médiation de cet arrêt comme l'augmentation de l'expression de p21<sup>CIP1</sup> et/ou p16<sup>INK4a</sup>. La protéine p21<sup>CIP1</sup> a été identifiée comme un inhibiteur de la synthèse d'ADN dans les cellules sénescences [280]. Cet inhibiteur joue un rôle dans la différenciation et la sénescence réplivative dans de nombreux types cellulaires [281] [282] [283]. Une diminution importante de l'expression de marqueurs de différenciation a été observée avec la baisse d'expression de p21<sup>CIP1</sup> chez des souris knockout pour ce gène [284]. Le taux relatif de la protéine p21 est augmenté de 10 à 20 fois dans les fibroblastes diploïdes humain en sénescence comparé à des cellules prolifératives de plus, les cellules dépourvues de p21<sup>CIP1</sup> peuvent temporairement sortir de sénescence [285]. Bien que p21<sup>CIP1</sup> soit connue pour être un médiateur de l'apoptose induite par p53, il semble que l'expression accrue de la protéine dans la sénescence réplivative soit p53-indépendante et ne conduit pas spécifiquement à l'apoptose [286].

Des études moléculaires ont démontré le rôle de p16<sup>INK4a</sup> dans le développement de la sénescence répliquative [287, 288]. Dans des cellules prolifératives, l'expression ectopique de p16<sup>INK4a</sup> [289, 290] ou l'introduction de p16<sup>INK4a</sup> dans ces cellules par une protéine de fusion [291] ou par des peptides TAT-p16<sup>INK4a</sup> [292] induit l'arrêt de la phase G<sub>1</sub> et le développement d'un phénotype de sénescence. Dans les cellules en sénescence répliquative ou dans lesquelles la sénescence a été induite par l'expression ectopique de p16<sup>INK4a</sup>, la capacité de proliférer peut être restaurée par traitement des cellules avec des peptides inhibiteurs [289], des oligonucléotides antisens [293, 294] ou par siRNA anti p16<sup>INK4a</sup> [295]. Bien que les cellules en culture aient été utilisées pour de nombreuses études de la fonction de p16<sup>INK4a</sup>, il est clair qu'il fonctionne de manière similaire *in vivo*. Dans des échantillons de rein humain, les niveaux d'ARNm et de protéines sont corrélés avec l'âge des donneurs. L'expression de Ki67 y est inversement corrélaté avec le niveau de la protéine p16<sup>INK4a</sup> [296].

Le CKI p27<sup>KIP1</sup> est connu comme médiateur de l'inhibition de contact et du TGF- $\beta$  et n'a pas été considéré jouant un rôle dans la sénescence répliquative [297]. Une nouvelle voie a été identifiée impliquant le suppresseur de tumeur PTEN qui inhibe PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) [298, 299]. L'activation constitutive de la sous unité régulatrice de PI3K, p85, est considérée être oncogénique [300]. La perte de PTEN est détectée dans de nombreux cancers humains. La surexpression de PTEN résulte dans la sur-régulation de p27<sup>KIP1</sup>, principalement due à sa stabilisation contre sa dégradation par la voie de l'ubiquitination/protéasome. Le traitement de cellules avec des inhibiteurs de PI3K accélère l'apparition de la sénescence et augmente les niveaux de p27<sup>KIP1</sup>, suggérant que ce CKI peut donc également jouer un rôle dans la médiation de la sénescence répliquative.



### III. CELLULES ENDOTHELIALES CORNEENNES HUMAINES NORMALES

#### III.1. Absence de prolifération *in vivo*

Des études réalisées, en microscopie optique et électronique à transmission, sur le développement embryonnaire oculaire chez les oiseaux [307] et les fœtus humain [1, 307-309] ont démontré que l'endothélium cornéen est issu de la migration de cellules mésenchymateuses localisées à la périphérie de la cornée présomptive. Ces cellules prolifèrent et migrent de façon centralisée dans le stroma primaire situé entre l'épithélium cornéen et le cristallin formant ainsi la monocouche endothéliale [310]. Ces mêmes études suggèrent que cette prolifération cesse dès la formation de contacts cellules-cellules [308, 309]. En 1979, Johnston *et al.* fournirent la preuve que les cellules mésenchymateuses formant l'endothélium cornéen dérivent de la crête neurale chez les oiseaux [311]. L'origine de l'endothélium cornéen humain issu de la crête neurale est fortement suggérée par des études d'immunolocalisation qui ont démontrées l'expression d'énolase neurones-spécifique, de la protéine S-100 et de N-CAM dans ces cellules [312-314].

Il est largement admis qu'une fois la monocouche endothéliale mature formée, ces cellules cessent de proliférer et de migrer et ce tout au long de leur durée de vie. L'avantage pour les performances du système visuel d'un tel phénomène reste encore un mystère. Il est également à noter qu'à l'exception des cellules basales épithéliales de la cornée, la plupart des cellules directement dans l'axe visuel ne se divisent pas normalement [315, 316]. Nous pouvons donc conjecturer que la prolifération des cellules endothéliales (CE) directement dans la trajectoire de la lumière doit en quelque sorte être désavantageux pour le maintien de l'acuité visuelle optimale. Nous verrons dans les sections suivantes (i) que les CE ne prolifèrent plus ou, en pratique, plus de manière significative *in vivo* après la formation de la monocouche endothéliale, (ii) que l'élargissement et la migration cellulaires sont les principaux moyens de réparation de l'endothélium et (iii) qu'une perte cellulaire excessive mène à la décompensation cornéenne oedémateuse et à une baisse irréversible de l'acuité visuelle.

### III.1.1. Diminution de la densité cellulaire endothéliale avec l'âge et les traumatismes

Des analyses de la densité cellulaire endothéliale (DCE) fournissent la preuve que, après la formation de la monocouche, l'endothélium cornéen humain ne peut normalement pas se régénérer *in vivo* à un taux suffisant pour remplacer les cellules mortes ou blessées. Murphy *et al.* ont constaté que le nombre de CE présent à la naissance est très semblable à celui mesuré au cours du deuxième trimestre du développement fœtal. La prolifération cellulaire cesserait donc du deuxième trimestre [317]. Durant le développement fœtal tardif et au cours de la petite enfance, la DCE diminue à un rythme relativement rapide en raison principalement de l'augmentation de la surface de la cornée [317-319]. La DCE continue ensuite à décroître tout au long de la vie adulte à un taux moyen de 0,3-0,6% par an [317, 320-325] (Figure 29).

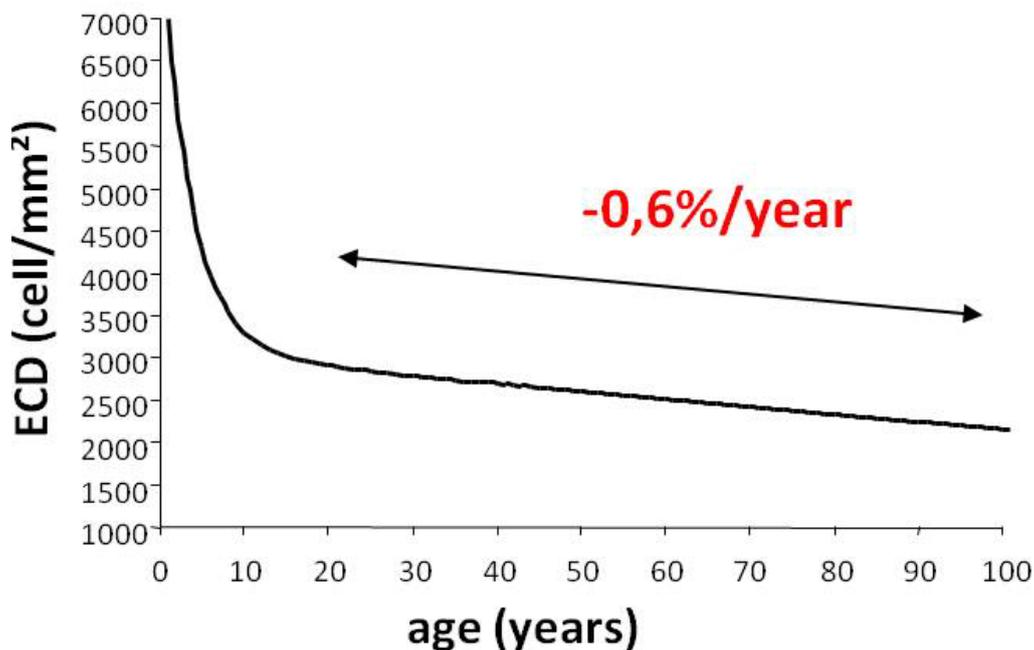


Figure 29 : DCE (cellules/mm<sup>2</sup>) en fonction de l'âge.

Une forte baisse de la DCE peut être observée au cours de la première décennie puis une diminution régulière d'environ 0,6% par an au cours du reste de la vie.

(D'après Bourne *et al.*, 1997 [322])

La DCE moyenne observée chez un nouveau né est d'environ 3500-4000 cellules/mm<sup>2</sup> alors que chez un adulte elle est de 2000 cellules/mm<sup>2</sup> en moyenne. Cette lente décroissance reste parfaitement compatible avec un fonctionnement satisfaisant du tissu même à un âge très avancé, puisque la DCE n'atteint pas le seuil critique de 300-500 cellules/mm<sup>2</sup> en deçà duquel l'hydratation cornéenne ne peut plus être régulée [326]. Les causes de cette perte cellulaire

avec le temps n'est pas encore pleinement élucidé mais des études suggèrent que la lumière induirait des dommages oxydatifs entraînant une apoptose et/ou nécrose de certaines CE [327] [328].

L'endothélium cornéen possède normalement une réserve suffisante de CE pour maintenir ses fonctions primordiales de barrière/pompe tout au long de la vie [329] : il n'existe pas de décompensation d'un endothélium normal du seul fait du vieillissement, même à un âge très avancé ; cependant les CE peuvent être altérées dans de nombreuses circonstances pathologiques : dystrophie primitive (dystrophie endothéliale de Fuchs, la plus fréquente des dystrophies endothéliales [330, 331] ; dystrophie polymorphe postérieure beaucoup plus rare ; CHED [« *Corneal Hereditary Endothelial Deficiency* »], dystrophie néonatale réellement exceptionnelle[332, 333]) ou dystrophie secondaire à un traumatisme accidentel (traumatisme externe, hypertonie oculaire aiguë ou subaiguë) ou chirurgical [334, 335]. Les greffes de cornée sont une autre situation non physiologique où la perte endothéliale reste accélérée durant toute la période post opératoire [336, 337] Dans toutes ces circonstances la perte en CE à un taux supérieure à la normale peut aboutir à un dysfonctionnement endothéliale après un délai variable, parfois seulement des années après la blessure originales [334, 337, 338]. D'autres situations s'accompagnent de modifications endothéliales mais n'aboutissent qu'exceptionnellement à une décompensation œdémateuse de la cornée : stress induit par certaines maladies systémiques comme le diabète [339, 340] les traitements chroniques pour le glaucome chronique à angle ouvert ou l'hypertonie modérée au long cours elle-même [341-345].

### III.1.2. Compensation de la perte cellulaire

Dans de nombreux types cellulaires, y compris les cellules épithéliales cornéennes [346, 347] et les kératocytes du stroma [315, 316], la division cellulaire contribue à la

**A RETENIR**

★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★

La perte des CE avec l'âge est compensée par une migration et un élargissement cellulaire conduisant à un polymégathisme et pléomorphisme des CE.

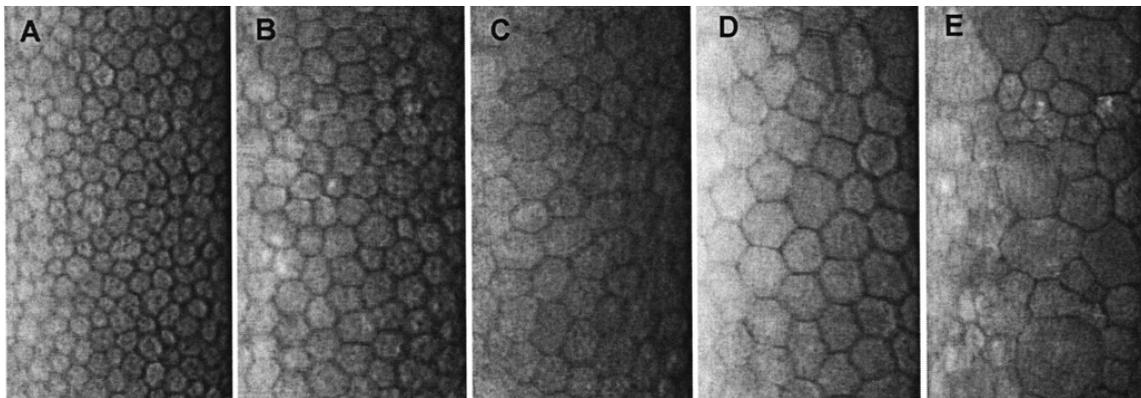
★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★

réparation des dommages subis par le tissu. A l'opposé, la division cellulaire, si elle a lieu, ne joue qu'un rôle tout à fait marginal *in vivo*, dans les mécanismes de réparation de l'endothélium cornéen mature. En microscopie spéculaire *in vivo* des images suggérant la possibilité de division de CE a été rapportée dans des circonstances très particulières par Laing en 1984 [348]. Différentes mesures en séries de la surface endothéliale ont été réalisées après une réaction de rejet sur une

greffe de cornée. Quelques images compatibles avec des mitoses ont été observées et, avec le temps, des clusters de plus petites cellules environnantes à ces CE « prolifératives ». Ces résultats suggéraient qu'une prolifération avait lieu dans les régions focales de l'endothélium et de ce fait augmentaient la DCE dans ces zones. Narthey *et al.* ont observées *ex vivo* des cellules binucléées en microscopie électronique à balayage dans des endothéliums cornéens humains normaux chez un adulte (65 ans ; délai post-mortem 12 heures) et un enfant (3 mois ; délai post-mortem 4 heures) [349]. Que ce soit dans l'endothélium adulte ou dans celui de l'enfant, une seule cellule binucléée était détectée. L'état binucléé peut-être expliqué par la division cellulaire [350]. Ce faible taux prolifératif indique que la division cellulaire complète *in vivo* dans l'endothélium cornéen humain est très rare et ne peut remplacer efficacement les cellules mortes ou endommagées. Des études *in vivo*, portant sur la réparation endothéliale de cornées de singes lésées, comparaient la contribution relative de la mitose et de la migration cellulaire à la guérison de ces cornées. Les résultats ont conduit à la conclusion que le nombre de mitoses était trop faible pour contribuer de manière significative à la compensation des lésions et que la migration des cellules était le principal moyen de guérison [351].

De nombreuses études sur la cicatrisation des plaies *in vivo* indiquent que, dans l'endothélium cornéen mature, la cicatrisation se fait principalement par élargissement et migration cellulaires. Lorsque seul un petit nombre de cellules ont été lésées, la guérison se produit uniquement par l'élargissement des cellules à proximité immédiate de la plaie. La réparation apparaît être initiée par une perte de contact cellules-cellules dans la zone de lésion. Les cellules, après élargissement, établissent à nouveau des contacts cellules-cellules matures.

Ce mécanisme de réparation ne provoque pas seulement l'élargissement de la cellule, mais aussi l'aplatissement des cellules impliquées dans le processus de réparation [352]. Les observations microscopiques ainsi que les analyses morphométriques de la morphologie des CE démontrent une augmentation de la taille cellulaire liée à l'âge [317, 320, 338, 353]. Différentes études ont démontré que l'élargissement cellulaire, plutôt que la division, est le mode prédominant de réparation des lésions. Comme conséquence à cette forme de réparation, il n'y a pas non seulement une augmentation de la taille des cellules avec l'âge (polymégéthisme) mais également une altération graduelle de la forme hexagonale caractéristique des CE vers une forme plus polygonale (pléo ou poly-morphisme) (Figure 30) [320, 322, 354-356].



**Figure 30 : Polymégéthisme et pléomorphisme des cellules endothéliales cornéennes liées à l'âge.** Micrographie spéculaire non contact TOPCON SP2000 (Topcon, Tokyo, Japon) chez des sujets de 20 ans (A), 35 ans (B), 50 ans (C), 70 ans (D). Endothélium pléomorphe chez un patient opéré 10 ans plus tôt de cataracte avec implant de chambre antérieure (E). *Courtesy : Prof.J. Maugery, CHU St Etienne.*

Dans le cas de lésions importantes, la réparation est le résultat coordonnée d'un élargissement des cellules adjacentes à la blessure ainsi que des cellules en proche périphérie. Honda *et al.* ont utilisé la microscopie spéculaire *in vivo* afin d'étudier les réparations de l'endothélium cornéen de chat suite à une importante lésion [357]. Il a été observé que les cellules s'élargissaient et s'allongeaient avant de migrer et de recouvrir la lésion. Sans perdre le contact avec les cellules voisines, les cellules élargies se contractaient et attiraient d'autres cellules dans la zone de la blessure. Cette forme de réparation a été désignée comme « diffusion » de la monocouche [358, 359].

La migration des cellules individuelles apparaît également contribuer à la repopulation des grandes plaies. Des études portant sur la cicatrisation, *in vivo*, de grandes lésions de l'endothélium cornéen de lapin ont révélé que la cicatrisation se faisait par migration cellulaire [360, 361]. De plus, des observations portant sur des cornées organocultivées lésées [362] ainsi que sur des modèles de culture cellulaire ont également indiquée que la migration

des cellules jouait un rôle primordiale dans la réparation endothéliale [359, 363, 364]. La diffusion de la monocouche ainsi que la migration cellulaire résulteraient des altérations, créées par la lésion, dans l'expression et l'organisation des éléments du cytosquelette tels que les filaments d'actine et les microtubules [359, 365-369]. La migration des cellules en réponse à une lésion est sérum indépendante [370].

En 2008, Lagali *et al.* ont démontré que les CE d'un patient ayant subi une kératoplastie transfixiante migraient et colonisaient le greffon [371]. Les CE de trente-cinq boutons cornéens explantés de patients ayant été greffés, suite principalement à un kératocône (n=22) ou à un œdème cornéen (n=12), avec des cornées provenant d'un donneur du sexe opposé et devant subir une nouvelle greffe étaient analysées par FISH (« *Fluorescence In Situ Hybridization* »). Cette technique ciblait les chromosomes sexuels permettant ainsi de faire la différence entre les cellules des donneurs et celles des receveurs. L'analyse des CE à partir de 35 boutons cornéens révélait 9 cas dans lesquels les CE des donneurs étaient complètement remplacées par celles du receveur, 24 cas dans lesquels les CE du donneur et du receveur coexistaient et 2 cas dans lesquels seules les CE provenant du donneur étaient présentes. Dans les cas de coexistence, la proportion de cellules provenant du donneur variait de 6 à 95%. La survie des CE des donneurs n'était pas corrélée avec l'âge de la greffe, la transparence cornéenne ni avec la pathologie initiale ayant entraîné la première greffe. La présence de CE provenant du receveur sur le greffon à long terme indique bien une migration cellulaire mais les CE du donneur ne sont pas totalement remplacées : un équilibre se forme sur le greffon entre les cellules du donneur et du receveur. La survie des CE du greffon est sujette à des facteurs interindividuels importants. Des facteurs tels que la réaction immunitaire, les complications postopératoires et certaines dystrophies présentes chez le receveur peuvent perturber cet équilibre et faire pencher la balance en faveur des CE du receveur ou du donneur.

### *III.1.3. Perte de la fonction endothéliale*

L'absence de capacité proliférative en réponse à la perte cellulaire rend l'endothélium vulnérable. Suite à une perte excessive de CE, l'endothélium ne peut plus répondre efficacement à sa fonction primaire : le maintien permanent du stroma cornéen dans un état de partiel déshydratation [338]. La « pompe » ionique endothéliale n'est plus en mesure d'assurer sa fonction de barrière aux fluides. Une réduction significative de la densité en pompes ATPase endothéliales a été observée dans des cornées atteintes de dystrophie de Fuchs comparativement à des kératopathies bulleuses (phaques et aphaques) possédant des endothéliums initialement normaux [372, 373]. Des études similaires réalisées sur des cultures cellulaires endothéliales cornéennes bovines ont démontrées que lorsque la DCE diminuait au dessous de 1000 cellules/mm<sup>2</sup>, le nombre de pompes ionique par CE augmentaient [374]. Les auteurs ont conclu, que cette augmentation du nombre de pompes dans les CE hypertrophiques ne compense pas la réduction du nombre total de cellules par unité de surface au sein de la monocouche et, par conséquent, conduit à une baisse globale de la capacité de pompage. Une baisse de l'activité de « pompe » de l'endothélium cornéen induit une hydratation du stroma, une désorganisation du collagène entraînant un œdème cornéen, une perte de la transparence cornéenne et une baisse irréversible de l'acuité visuelle.

## III.2. Capacités prolifératives

### III.2.1. Capacités prolifératives intrinsèques

Bien que les CE ne se divisent pas ou pas suffisamment pour remplacer les cellules perdues au cours de la vie, il est bien démontré que les CE adultes possèdent une capacité proliférative intrinsèque résiduelle.

Laing *et al.*, comme nous l'avons vu, ont observé, *in vivo*, en microscopie spéculaire quelques mitoses sur la monocouche endothéliale [348]. *In vitro* il est habituel de réussir à faire proliférer des CE. Les oncogènes viraux, tels que l'antigène SV40-large-T et

#### A RETENIR



La réparation de l'endothélium dans des cornées organocultivées se produit par migration et élargissement des cellules existantes mais pourrait également se faire par prolifération cellulaire.

Les CE cornéennes humaines possèdent une forte capacité répliquative intrinsèque résiduelle.



E6/E7 du papillomavirus humain, sont capables d'outrepasser les mécanismes normaux d'inhibition du cycle cellulaire et d'induire une prolifération non facteurs de croissance dépendants. Plusieurs équipes ont testé la capacité des CE à proliférer sous l'influence de ces oncogènes. Dans ces études, des CE cornéennes humaines sont cultivées puis transfectées avec des ADNc codant soit pour l'antigène large-T du virus simien SV40 [375-378] soit pour la protéine E6/E7 du papillomavirus [377]. Les CE humaines transfectées, exprimant l'oncogène, subissent alors plusieurs doublements de population avant de rentrer en

sénescence répliquative. Ces cellules, malgré leur statut prolifératif accru, conservent une morphologie normale [375, 378] ainsi que leur taux d'expression en ARNm des facteurs de croissances et de leurs récepteurs associés [376, 377]. Bednarz *et al.* ont également rapporté que des cultures cellulaires exprimant la protéine SV40-large-T pouvaient proliférer jusqu'à plus de 300 doublements de population fournissant ainsi des preuves préliminaires que les CE sont capables d'« immortalisation » [378].

Dans des CE de lapin *ex vivo* et *in vitro*, la surexpression de la protéine E2F2, responsable en partie de l'induction de l'entrée en phase S du cycle cellulaire, induit une prolifération cellulaire sans induire d'apoptose [379]. Les cornées de lapin, *ex vivo*, étaient transfectées avec un plasmide contenant l'ADNc de la protéine E2F2 avant d'être incubées durant différentes périodes dans 0,1% de sérum de veau foetal (concentration permettant de conserver la viabilité cellulaire sans induire de prolifération). Des immunomarquages,

confirmaient la présence de la protéine dans les CE avec une efficacité de transfection de 10 à 12%. Les tests de viabilités réalisés sur cornées *ex vivo* sur-exprimant E2F2 démontraient peu de mort cellulaire et ceux réalisés sur culture cellulaire confluyente ainsi que des tests TUNEL révélèrent une mortalité cellulaire de 27% des CE. La mort cellulaire ne semblait pas être due à l'apoptose. Des RT-PCR réalisées sur des échantillons endothéliaux obtenus 48 heures après transfection révélèrent la présence en forte expression des ARNm du marqueur de prolifération Ki67 (x5,1 *versus* témoins) et de la Cycline B1, marqueur de la phase G<sub>2</sub> du cycle (x2,3 *versus* témoins). Cette étude concluait que les CE de lapin étaient capables de proliférer après stimulation par E2F2, sans surmortalité.

Une étude similaire a été réalisée par McAlister *et al.* sur cornées humaines *ex vivo* [380]. Les cornées étaient incubées pendant 2 heures dans une solution d'adénovirus recombinants E1<sup>-</sup>/E3<sup>-</sup> dans lesquels était incorporé l'ADNc encodant la protéine E2F2 (AdUE) ou dans une solution d'adénovirus recombinants E1<sup>-</sup>/E3<sup>-</sup> nus (AdU). Les cornées étaient ensuite conservées en culture *ex vivo* pendant 3 semaines. Des tests TUNEL ne démontraient pas d'apoptose induite par la surexpression d'E2F2. La protéine était localisée dans les CE cornéennes avec une efficacité de transfection atteignant 60 à 75 %. Les protéines recombinantes étaient exprimées dans une proportion importante une semaine après exposition au virus puis celles-ci diminuaient par la suite. Une augmentation significative de la DCE était observée dans les cornées transfectées avec l'AdUE durant les 3 semaines post-traitement *versus* les cornées témoins. L'étude de l'incorporation de BrdU démontrait une augmentation significative du nombre de CE entrant en phase S du cycle après transduction de E2F2 démontrant une progression dans le cycle cellulaire. La surexpression du facteur de transcription E2F2 dans des CE cornéennes humaines non mitotiques est donc capable d'induire, à court terme, la progression dans le cycle cellulaire et une augmentation de la DCE.

Des cornées humaines (n=14 ; âge moyen : 72 ans ; 50-91 ans) organocultivées dans un milieu composé de MEM (« *Minimum Essential Medium* ») supplémenté avec 8% de sérum de veau fœtal (SVF) démontraient une activité proliférative [381]. Avant organoculture, les cornées ne présentaient pas de marquage positif à PCNA. Après trois jours d'organoculture, des CE périphériques isolées étaient détectées PCNA<sup>+</sup>. Après 21 jours de conservation, aucunes CE n'étaient marquées positivement. Cinq jours de déturgence suffisaient pour relancer une prolifération des CE périphériques. **Ces résultats indiquent que**

**dans des conditions appropriées, les CE cornéennes humaines adultes sont capables de proliférer.**

La survie des CE et les mécanismes de réparation de la monocouche ont été étudiés sur des cornées humaines (n=14 ; âge moyen : 69,1 ans ; 24-91 ans) prélevées après un délai post-mortem allant de 29 à 163 heures et organocultivées à 32°C dans un milieu contenant 8% de SVF [382]. Le dommage cellulaire était corrélé avec le délai post-mortem. Après un délai de 5 à 7 jours post-mortem avant organoculture, la plupart des CE présentaient des dommages structurels. Des analyses en microscopie sur coupes et à balayage démontraient que, au bout de 3 jours d'organoculture, l'endothélium recouvrait totalement la face postérieure de la cornée suggérant une prolifération cellulaire. Des marquages positifs des CE pour PCNA (dans toutes les cornées) et pour Ki67 (dans 9 cornées sur 14) confirmait ces résultats. Cette étude montre que les CE cornéennes humaines peuvent survivent jusqu'à 7 jour après le décès et peuvent proliférer dans certaines circonstances. **La réparation de l'endothélium dans des cornées organocultivées se produit par migration et élargissement des cellules mais également potentiellement par prolifération cellulaire.**

**Les résultats de ces études indiquent clairement que les cellules endothéliales cornéennes humaines possèdent une forte capacité répliquative intrinsèque.**

### III.2.2. Travaux initiaux de Joyce : arrêt en phase G<sub>1</sub> du cycle cellulaire

Joyce (Schepens Eye Research Institute, Boston, USA) a étudié le statut prolifératif des CE cornéennes humaines par une approche immunocytochimique en comparant

**A RETENIR**

★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★

Les CE cornéennes, *in vivo*, n'ont pas quitté le cycle cellulaire mais sont arrêtées en phase G<sub>1</sub>.

★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★

l'expression et la localisation de différentes protéines du le cycle cellulaire dans les CE cornéennes et les cellules épithéliales limbiques [383]. Des études antérieures avaient déjà démontré que l'épithélium limbique contenait des cellules basales du type « *stem like cells* » caractérisées par un cycle lent [384, 385]. Ces cellules, relativement indifférenciées, proliférant sous stimulation appropriée, servent de réservoir en cellules basales à

l'épithélium cornéen central ainsi qu'en cellules suprabasales qui forment la multicouche de l'épithélium limbique [386]. Le principal rôle de ces cellules basales limbiques est la réparation de l'épithélium cornéen [387, 388]. Dans l'épithélium cornéen central, les cellules basales ont la même capacité proliférative et servent à maintenir l'épaisseur de l'épithélium constant en remplaçant les cellules de surface perdues, en l'absence de grand traumatisme [389]. Les cellules suprabasales de la cornée centrale n'ont plus de capacité proliférative et sont différenciées [385, 390]. L'objectif de l'étude réalisée par Joyce *et al.* en 1996 était de déterminer le statut prolifératif des CE cornéennes humaines *in vivo* et de détecter des potentielles différences d'expression ou de localisation des protéines du cycle cellulaire en fonction de l'âge des donneurs des cornées. Des coupes transversales de cornées, issues de donneurs d'âge différents (6 semaines, 17, 27, 37, 53, 66 et 67 ans) et conservées à 4°C, étaient réalisées dans les 24 à 36 heures après la mort avant immunomarquage indirect. Les protéines du cycle étudiées étaient les cyclines D, E, A et B1 ; les CDKs p33<sup>cdk2</sup>, p34<sup>cdc2</sup> ; et KI67, un marqueur de prolifération cellulaire [391, 392]. Les résultats indiquaient que toutes les cellules épithéliales, cornéennes et limbiques, ainsi que les CE cornéennes exprimaient peu les protéines kinases p33<sup>cdk2</sup>, p34<sup>cdc2</sup> et la cycline B1. Un marquage positif pour KI67 était observé dans quelques cellules basales du centre et de la périphérie de l'épithélium cornéen et occasionnellement dans les cellules basales limbiques. Aucun marquage positif n'était observé dans les cellules épithéliales suprabasales centrales, les kératocytes et l'endothélium indiquant une absence de prolifération sous conditions normales *in vivo*. L'ensemble des marquages de la cycline D, E, A et de Ki67 ont permis de mettre en évidence la différenciation des cellules épithéliales suprabasales, un cycle cellulaire actif dans les

cellules basales de l'épithélium cornéen et un cycle ralenti dans les cellules basales limbiques. La comparaison d'expression de ces protéines, impliquées dans le cycle cellulaire, dans l'endothélium avec les autres types cellulaires de la cornée permettait d'affirmer que les CE possédaient un cycle cellulaire ralenti comparable à celui des cellules basales limbiques. De plus, aucune différence d'expression de ces protéines, liée à l'âge, n'était observée dans l'endothélium.

La capacité proliférative intrinsèque des CE cornéennes humaines a également été confirmée en 2000 par la même équipe par des études de cicatrisation endothéliale après lésion localisée [393] (cf. [§ III.2.4.1](#)) ou après traitement à l'EDTA (Ethylène diamine tétraacétique), un chélateur de calcium qui libère les cellules de l'inhibition de contact [394] (cf. [§ III.3.4](#)).

**Ces études princeps mettent en évidence que les CE cornéennes, *in vivo*, n'ont pas quitté le cycle cellulaire mais sont arrêtées en phase G<sub>1</sub>.**

### III.2.3. Différences inter-espèces

**Les observations *in vivo*, *ex vivo* et *in vitro* sur cultures cellulaires suggèrent que la capacité relative de prolifération des CE diffère selon les espèces.** En effet, les CE bovines [395], de lapins [396, 397] et de rats [398] poussent facilement en culture dès les années 70-80, alors qu'il est plus difficile de cultiver des CE provenant de chats [396], de singes [351] et d'humains [399], même si les techniques de culture se sont améliorées depuis.

Les CE du rat peuvent se multiplier *in vivo*. Une équipe a étudié les modalités de réparation de l'endothélium du rat Fisher suite à 3 types de traumatisme : thermique par cryodestruction transcornéenne, mécanique par une aiguille de 30 Gauges introduite à travers la chambre antérieure et chirurgical par autogreffe avec dénudation endothéliale [400]. Plusieurs moyens d'observation étaient utilisés : la microscopie spéculaire, la pachymétrie pour évaluer l'épaisseur cornéenne, une étude histologique avec coloration au Rouge Alizarine (colorant non vital révélant les contours cellulaires) et au bleu trypan (colorant vital des noyaux des cellules mortes) donnant des informations morphologiques, et une étude de l'incorporation de la thymidine tritiée indicateur de la synthèse d'ADN. Cette étude a montré la restitution d'une monocouche de CE avec rétablissement d'une DCE normale (quelques CE gardant une morphologie irrégulière) au bout de 7 jours pour les traumatismes thermique et mécanique et 14 jours à 3 mois en cas d'autogreffe. Seules 45% des CE autour de la zone lésée incorporaient la thymidine tritiée.

L'endothélium de lapin possède également la capacité de se régénérer. La régénération d'une monocouche de CE morphologiquement normale est possible en 10 jours après une cryodestruction transcornéenne détruisant 90% des cellules [396]. Des lésions mécaniques de l'endothélium cornéen de lapin sont rapidement réparées *in vivo* par prolifération des CE [396, 401, 402]

Chez le chien, l'endothélium est régénéré en 6 semaines après cryodestruction transcornéenne. Des mécanismes de mitoses, des transformations morphologiques avec élargissement cellulaire et des migrations des CE non endommagées ont été mis en évidence. Plus l'animal est jeune, plus ses capacités de multiplications sont efficaces [403]. D'autres espèces animales ont été étudiées telles que le chat et le primate qui de façon identique à l'homme ont un très faible pouvoir répliatif *in vivo*. Par contre *in vitro*, les CE peuvent se diviser [404]. La réparation endothéliale chez le chat, le singe et l'homme se fait principalement par migration et élargissement des CE [348, 396, 405, 406].

En 1996 Joyce a comparé en immunomarquage sur coupes les profils d'expression de certaines protéines du cycle cellulaire dans des CE de lapins et d'humains, à partir de cornées cryopréservées dès le prélèvement, afin d'expliquer les différences de capacité proliférative entre espèces [407]. Les immunolocalisations ciblaient les cyclines D, E, A, et B1 ; les kinases p<sup>34cdk4</sup>, p<sup>34cdc2</sup> ; Ki67 ainsi que les protéines impliquées dans la régulation de la transition G<sub>1</sub>/S comme pRB, E2F, p53 et le CKI p16<sup>INK4a</sup>. Des résultats similaires entre lapin/homme indiquaient que, comme chez l'homme, les CE de lapin étaient arrêtées en phase G<sub>1</sub> du cycle cellulaire (**Tableau 4**). La seule différence significative observée était la localisation subcellulaire de la cycline E. Chez le lapin cette protéine était localisée dans le cytoplasme alors qu'elle était localisée dans le noyau chez l'homme. Cette différence indiquerait que les CE humaines et de lapin sont arrêtés à différent stade de la phase G<sub>1</sub>. Bien que ces études n'aient pas identifié de différences significatives dans l'expression de ces protéines du cycle cellulaire entre les CE de lapin et humaines il existe cependant des différences importantes d'activités mitotiques entre les différentes espèces.

Cell cycle protein	Human endothelium	Rabbit endothelium
Ki67	—	—
Cyclin D	+ (Cytoplasmic)	+ (Cytoplasmic)
Cyclin E	+ (Nuclear) <sup>a</sup>	+ (Cytoplasmic)
Cyclin A	+ (Cytoplasmic)	+ (Cytoplasmic)
Cyclin B1	+ (Nuclear)	+ (Nuclear)
CDK4	+ (Cytoplasmic)	NT <sup>b</sup>
CDK2	+ (Nuclear)	NT
CDC2	+ (Cytoplasmic)	+ (Cytoplasmic)
pRb	+ (Nuclear)	+ (Nuclear)
E2F	+ (Nuclear/cytoplasmic)	+ (Nuclear/cytoplasmic)
p53	+ (Cytoplasmic)	+ (Cytoplasmic)
p16 <sup>INK4</sup>	+ (Cytoplasmic)	+ (Cytoplasmic)

**Tableau 4 : Expression des protéines du cycle cellulaire dans l'endothélium cornéen d'humain et de rat.**

(D'après Joyce NC, 2003 [324])

<sup>a</sup>Note cyclin E localization differs in human and rabbit endothelium.

<sup>b</sup>NT = not tested.

Les raisons de telles différences prolifératives inter-espèces n'ont pas encore été établies. Une explication possible est que la plupart des animaux de laboratoires sont jeunes et l'activité relative de prolifération de leurs CE peut être rapprochée à celle des nouveau-nés humains. Une baisse de la DCE liée à l'âge a pu être observée chez les singes [408], les chats [408, 409], les chiens [410], les lapins [411], les rats [412], et les souris [413] suggérant que comme les humains, la prolifération cellulaire ne peut compenser la perte des CE liée à l'âge dans ces espèces.

Le **Tableau 5** résume le statut prolifératif des CE chez différentes espèces étudiées.

**Tableau 5 : Statut prolifératif des CE chez différentes espèces.**

Chez l'homme une prolifération des cellules endothéliales peut être observée *ex vivo* après : lésion mécanique de l'endothélium, traitement à l'EDTA ou après stimulation par divers facteurs de croissance. Chez le lapin une prolifération *ex vivo* est observée lorsque les CE surexpriment le facteur de transcription E2F2.

Espèce	<i>In vivo</i>	<i>Ex vivo</i>	<i>In vitro</i>	Diminution en fonction de l'âge	Niveau de preuve	Commentaires
Souris	---	---	++++	Oui	Forte	Mauvais modèle d'étude pour l' <i>ex vivo</i> (cornée trop petite donc peu de cellules à analyser).
Rat	++++	?	++++	? mais $\searrow$ de la DCE	Forte pour l' <i>in vivo</i> et l' <i>in vitro</i> . Pas de données pour l' <i>ex vivo</i> .	
Lapin	+/-	+	++++	? mais $\searrow$ de la DCE	Faible pour l' <i>in vivo</i> (résultats contradictoires)	Des études complémentaires sont nécessaires afin de déterminer clairement le statut prolifératif des CE <i>in vivo</i>
Cochon	++++	+++	++++	?	Faible (peu d'études)	Mauvais modèle d'étude car prolifération <i>in vivo</i> .
Bovin	++++	+++	++++	?		Modèle difficilement utilisable pour des raisons éthiques et législatives (en France en tout cas)
Primate	---	?	++	?		
Chat	---	?	++	? mais $\searrow$ de la DCE		
Chien	++	?	?	? mais $\searrow$ de la DCE		
Humain	---	+	++	Oui	Forte	Etude difficile car peu de matériel biologique disponible

### III.2.1. Différences selon l'âge et la topographie centrale ou périphérique

Il est établi que, avec l'âge, la DCE décroît, le polymégéthisme et le pléomorphisme augmentent. Ces modifications reflètent la perte cellulaire liée à l'âge, non compensée, insuffisamment compensée par des divisions cellulaires. Différents facteurs interviennent dans le maintien de l'endothélium dans un état non répliatif. L'âge est l'un de ces facteurs. Outre la perte progressive des CE avec l'âge, une différence intrinsèque liée à l'âge peut être notée dans la capacité proliférative des CE. De plus, les CE centrales et périphériques ne possèdent pas la même capacité à proliférer.

#### III.2.1.1. Modèles *ex vivo*

Une étude réalisée par Senoo et Joyce en 2000 a comparé la capacité des CE, provenant de donneurs jeunes (<30 ans) et âgés (>50 ans), à entrer dans un cycle cellulaire complet [393]. Dix neuf cornées provenaient de jeunes donneurs (moyenne d'âge :  $19,3 \pm 6,4$  ;

3 mois-29 ans) et 40 de donneurs âgés (moyenne d'âge :  $64,9 \pm 8,8$  ; 50-81 ans). Après une lésion mécanique centrale calibrée de 2 mm de l'endothélium, les cornées étaient incubées *ex vivo*, face endothéliale au dessus, dans un milieu de culture contenant 10% de sérum de vœu fœtal (SVF), 20 ng/mL de facteur de croissance fibroblastique (*Fibroblast Growth Factor* : *FGF*) additionné ou non de 10 ng/mL de facteur de croissance épidermique (*Epidermal Growth Factor* : *EGF*). Les cornées étaient ensuite incubées à 37°C pendant des périodes variables avant évaluation de l'activité mitotique des CE. La lésion mécanique permettait aux CE voisines de s'affranchir de l'inhibition de contact et de migrer dans le lit de la lésion afin de compenser

la perte cellulaire. L'intégrité de la monocouche était maintenue sur le reste de la cornée permettant aux CE de conserver leur jonction cellules-cellules et donc une inhibition de contact créant de se fait un contrôle interne sur la prolifération. Un immunomarquage au BrdU était réalisé afin d'identifier les CE étant en phase S sur les endothéliums cornéens provenant des donneurs jeunes et âgés. Seules les cellules au voisinage de la lésion

#### A RETENIR

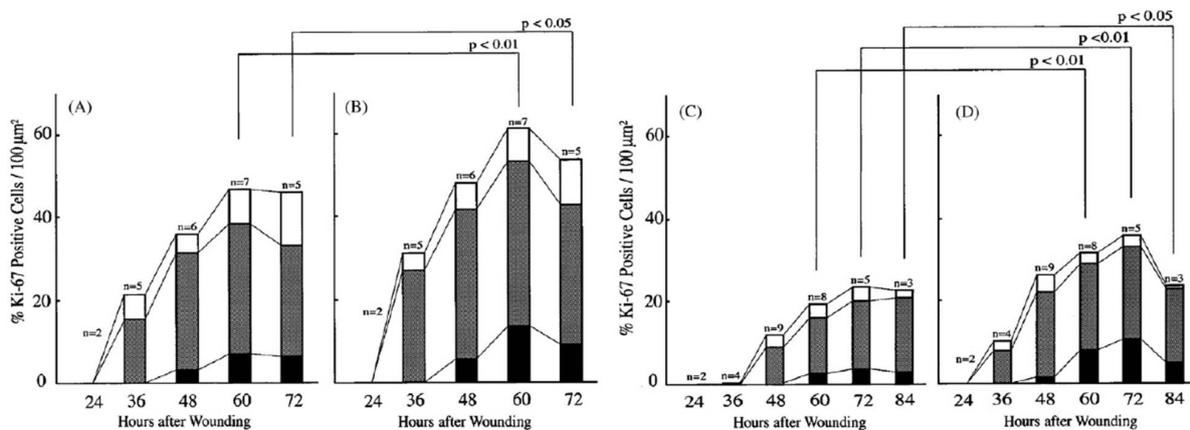


Les CE humaines périphériques conservent une forte compétence proliférative indépendamment de l'âge du donneur\*. Les CE centrales des cornées de donneurs âgés conservent une compétence répliatif mais le pourcentage de CE pouvant se répliquer est significativement inférieur par rapport aux CE périphériques ou aux CE centrales de donneurs jeunes. Cette diminution de la capacité proliférative est corrélée avec l'augmentation du nombre de CE sénescents.

\*Attention, l'âge max dans ces expérimentations étaient de 75 ans... Quid de nos donneurs européens de très grand âge, 85 ans et plus...



apparaissaient positives au marquage. Un second immunomarquage anti-Ki67 était réalisé afin de détecter les différents stades du cycle cellulaire dans lequel se trouvaient les CE. Cette protéine a en effet la particularité d'être exprimée à partir de la phase G<sub>1</sub> tardive et tout au long de la mitose et présente des patterns d'expression différents en fonction de la phase du cycle cellulaire [414, 415]. La quantification des CE Ki67 positives en phase G<sub>1</sub>, S/G<sub>2</sub> et M indiquait clairement que **les CE centrales des cornées quel que soit l'âge des donneurs étaient capables de progresser dans le cycle cellulaire mais aussi de le terminer** cependant des différences liées à l'âge étaient détectées dans la cinétique de progression du cycle (**Figure 31**).



**Figure 31 : Progression du cycle cellulaire des CE provenant de donneurs jeunes (<30 ans ; A et B) et âgés (>50 ans ; C et D).**

Corneae were incubated in 10% serum plus 20 ng/ml FGF alone (A, C) or the same medium supplemented with 10 ng/ml EGF (B, D). White bars=% of Ki67- positive cells in G<sub>1</sub>-phase; gray bars=% of Ki67-positive cells in S/G<sub>2</sub>-phase; black bars=% of Ki67-positive cells with M-phase patterns.

(D'après Senoo, T. et Joyce, N.C., 2000. [393])

Les CE de donneurs âgés qui traitées avec du SVF puis du FGF entraient dans le cycle plus lentement que les CE de donneurs jeunes. De même, beaucoup moins de CE des donneurs âgés entraient dans le cycle comparativement à celles obtenues à partir de donneurs jeunes. L'EGF n'avait que peu d'effet sur les CE de donneurs jeunes alors qu'il augmentait significativement le taux d'entrée en cycle cellulaire ainsi que le nombre de CE terminant le cycle chez les donneurs plus âgés. Lors de la réponse proliférative maximale, le nombre de CE entrées dans un cycle actif était de 46% à 60 heures chez les donneurs jeunes alors qu'il n'était que de 24% à 72 heures chez les donneurs plus âgés lorsque les CE étaient cultivées sans EGF. En présence du facteur de croissance, le pourcentage de cellules proliférative issues des donneurs jeunes et des plus âgés augmentait respectivement à 62% (à 60 heures) soit de 33% et à 36% (à 72 heures) soit approximativement de 50%.

Ces résultats concordaient avec ceux obtenus au préalable par Simonsen en 1981. L'incorporation de la thymidine tritiée dans l'endothélium de cinq donneurs adultes après

lésions endothéliale était étudiée [416]. Le plus grand nombre de noyaux radio-marqués étaient localisés en périphérie de la blessure et le plus grand nombre de CE marquées était observé chez le donneur le plus jeune (19 ans). Il est également à noter que des CE marquées étaient détectées chez le sujet le plus vieux (89 ans) indiquant que **les CE conservent tout de même une capacité proliférative indépendamment de l'âge.**

**Ces résultats indiquent que les CE provenant de donneurs âgés peuvent entrer et compléter le cycle cellulaire mais la phase G<sub>1</sub> apparaît être plus longue et ces CE nécessitent des stimuli mitogéniques plus importants que les CE des donneurs jeunes.**

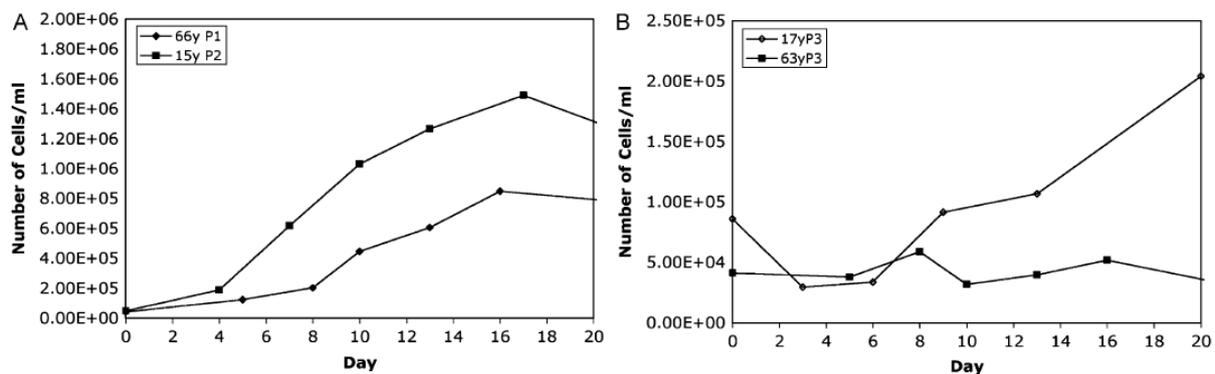
### *III.2.1.2. Modèles in vitro*

Des expériences de culture de CE humaines confirment l'existence d'une différence de capacité proliférative liée à l'âge [417]. Les CE d'embryons humains [418] et de nouveau-nés [419] sont facilement cultivables sur du long terme. Elles restent inaccessibles en pratique pour des raisons éthiques évidentes. Les CE issues de donneurs jeunes (<20 ans) prolifèrent plus facilement que celles obtenues à partir de donneurs plus âgés [399, 420]. En 1984, Nayak a testé la capacité des CE provenant d'anneaux cornéo-scléaux résidus post-trépanation issus de donneurs âgés de 1 à 57 ans, à proliférer en culture [421]. Seules douze cultures sur 31 avaient proliféré. L'âge moyen des donneurs avec cultures réussies était de 17,6±3,2 ans indiquant que les CE de jeunes donneurs avaient une capacité proliférative supérieure. Des résultats comparables ont été obtenus par Samples en 1991 qui utilisait des anneaux cornéo-scléaux de donneurs âgés de 3 mois à 37 ans comme source de CE [420].

Zhu et Joyce ont également observé ces mêmes différences de croissance liées à l'âge en culture cellulaire [422]. Des comptages directs étaient réalisés sur des cellules endothélialesensemencées à faible densité puis cultivées avec un milieu contenant différents facteurs de croissance. Le taux maximal de croissance était obtenu à partir d'un milieu de culture additionné de 8% de SVF, 5 ng/mL de facteur de croissance épidermique (*Epidermal Growth Factor : EGF*), 20 ng/mL de facteur de croissance nerveux (*Nerve Growth Factor : NGF*) et de 100 µg/mL d'extrait pituitaire. Pour le même nombre de cellulesensemencées, après culture, le nombre de cellules de donneurs jeunes (<30 ans ; n=27 ; moyenne : 17,5±7,0 ; 2-30 ans) étaient deux fois supérieurs à celui obtenu à partir de donneurs plus âgés (>50 ans ; n=56 ; moyenne : 64,0±6,8 ; 51-79 ans) (**Figure 32.A**). Comme observé dans les études *ex vivo*, les CE de donneurs âgés (>50 ans) entraînent en cycle plus lentement avec un taux de doublement moyen de 90,25±8,7 *versus* 45,25±13,6 heures pour les donneurs jeunes

(<30 ans) [423]. La culture cellulaire avec seulement 8% de SVF n'entraînait pas de différences significatives comparativement aux cultures additionnées de facteurs de croissance cependant le nombre de cellules obtenues au final était légèrement inférieur.

Des études ont également été menées afin d'évaluer l'effet de mitogènes, comme l'EGF et le PDGF-BB (*Platelet-Derived Growth Factor-BB*), sur la prolifération cellulaire endothéliale (**Figure 32.B**). Quand les CE sont cultivées en présence d'EGF ou de PDGF-BB seul, le nombre maximal de cellules obtenues en culture à partir de donneurs jeunes (<30 ans) et âgés (>50 ans) est inférieur à celui obtenu lorsque celles-ci sont stimulées avec de multiples facteurs de croissance ou avec du SVF seul. Ces résultats suggèrent que ces mitogènes seuls ne sont pas suffisants pour stimuler une prolifération cellulaire quel que soit l'âge des donneurs. Les CE des donneurs jeunes et âgés présentaient la même réponse relative à chaque mitogène ; cependant, le nombre de CE observé au pic de croissance était toujours plus faible dans les cultures réalisées à partir des donneurs âgés. Il a été également observé que la DCE moyenne, en culture, était plus faible pour les donneurs âgés ( $755\pm 287$  cellules/mm<sup>2</sup> pour les donneurs âgés *versus*  $2000\pm 340$  pour les donneurs jeunes) [423].



**Figure 32 : Différences liées à l'âge des CE *in vitro* en réponse aux stimuli mitogéniques.**

Graph in (A) shows representative cell counts from HCEC cultured in medium containing 8% FBS, 5 ng/ml EGF, 20 ng/ml NGF, and 100 µg/ml pituitary extract. Graph in (B) shows representative cell counts from cultures grown in 5 ng/ml EGF alone. Note the difference in the y-axis scale in (B) compared with that in (A), indicating the stronger mitogenic stimulation of the growth factor combination compared with EGF alone. (*Adapté d'après (A) Zhu et Joyce, 2004 [422] (B) Joyce et Zhu, 2004 [423]*).

**L'ensemble des résultats obtenus *ex vivo* et *in vitro* indiquent que : (1) peu de CE de donneurs âgés sont sensibles aux stimuli mitogéniques ; (2) la stimulation de ces mêmes CE avec de multiples mitogènes induit une réponse proliférative maximale ; et (3) les CE issues de donneurs âgés répondent plus lentement aux mitogènes que celles obtenues à partir de donneurs jeunes.**

### III.2.1.3. Cellules endothéliales centrales versus périphériques

#### III.2.1.3.1 *In vivo*

En 1984, une étude morphométrique conduit par Schimmelpennig démontrait une différence de DCE entre la périphérie et le centre de la cornée chez l'homme [424]. L'analyse de 19 cornées humaines (âge moyen :  $61 \pm 18$  ans ; 22-93 ans) *ex vivo* par comptage direct des noyaux révélait une différence de densité entre le centre et la périphérie de la cornée :  $2778 \pm 284$  noyaux/mm<sup>2</sup> au centre *versus*  $3632 \pm 592$  noyaux/mm<sup>2</sup> en périphérie. La coloration au rouge Alizarine de 22 cornées humaine (âge moyen :  $45 \pm 25$  ans ; 19-94 ans) démontrait une différence de DCE entre la périphérie ( $3696 \pm 721$  cellules/mm<sup>2</sup>) et le centre ( $2811 \pm 425$  cellules/mm<sup>2</sup>). Ces résultats étaient confirmés lors d'une étude observationnelle réalisée par microscopie spéculaire non contact sur 24 patients (âge moyen :  $29,3 \pm 7,1$  ans ; 19-50 ans) [425]. La DCE para-centrale ( $2887 \pm 213$  cellules/mm<sup>2</sup>) et périphérique ( $2993 \pm 229$  cellules/mm<sup>2</sup>) étaient supérieures respectivement de 5,8% ( $P < 0,01$ ) et 9,6% ( $P < 0,001$ ) par rapport à la DCE centrale ( $2730 \pm 224$  cellules/mm<sup>2</sup>). **Les DCE des différentes régions cornéennes diminuent avec l'âge cependant cette diminution est plus lente dans les régions périphériques suggérant que cette zone est peut être une zone de régénération cellulaire** [324]. Bednarz *et al.* ont démontré que le CE humaines *in vitro* provenant de la zone cornéenne centrale sont morphologiquement similaire aux CE *in vivo* et ne possèdent pas d'activité mitotique spontanée. Les CE cultivées à partir de la région périphérique ont des jonctions serrées moins jointives et prolifèrent activement par rapport aux CE *in vivo* [426]. Comme nous l'avons vu précédemment, l'endothélium est formé par la prolifération et la migration des cellules mésenchymateuses de la périphérie vers le centre de la cornée. La différence de DCE observée entre la périphérie et le centre de la cornée va dans le sens de ce développement. Nous pouvons supposer que les CE centrales représentent la portion de la population endothéliale totale qui ont migré plus loin et subi plus de doublement de population que les CE périphériques. Il apparait logique que la DCE périphérique soit supérieure à la centrale car la migration cellulaire cesse probablement dès que les jonctions intercellulaires se forment au centre de la cornée. Il est également très probable que la capacité proliférative globale des CE centrales est inférieure aux CE périphériques car ces cellules ont du subir plusieurs cycles de division avant la maturation de la monocouche et ont des capacités de prolifération moindre ou sont déjà rentrées en sénescence répliative.

### III.2.1.3.2 In vitro

En 2005, Konomi et Joyce ont comparé le potentiel de croissance en culture des CE centrales (diamètre de 6,75 mm) et périphériques (anneau de 6,75-9,5 mm de diamètre) provenant de donneurs jeunes (<30 ans ; n=4 ; âge moyen :  $25\pm 6,4$  ans ; 16-30 ans) et âgés (>50 ans ; n=4 ; âge moyen :  $64,3\pm 7,4$  ans ; 55-73 ans) [427]. Dans cette étude, un nombre égal de CE au passage 1 étaient repiquées à faible densité en présence de 8% de SVF et dénombrées à intervalle régulier durant 3 semaines. **Aussi bien les CE périphériques que centrales étaient capables de proliférer sans différences morphologiques entre les deux groupes.** Le temps de doublement des CE centrales était de 35 heures dans le groupe « jeune » et de 54 heures dans le groupe « âgé » et celui des CE périphériques étaient de 29 heures dans le groupe « jeune » et de 46 heures dans le groupe « âgé ». Aucune différence significative n'était observée entre les CE périphériques et centrales dans chaque groupe (jeune :  $P=0,515$  ; âgé :  $P=0,222$ ). Seule la durée du cycle des CE centrales était significativement allongée chez les donneurs âgés ( $P=0,0043$ ).

Des immunomarquages positifs pour MCM2 (*minichromosome maintenance 2*), utilisée comme marqueur de la prolifération [428, 429], étaient observées aussi bien dans **les cultures des CE périphériques que centrales des deux groupes indiquant qu'elles étaient capables de répliquer leur ADN.** Aucune différence significative de marquage n'était observé entre périphérie et centre dans chaque groupe (jeunes :  $P=0,929$  ; âgés :  $P=0,613$ ). Une différence significative était cependant notée entre le nombre de CE MCM2<sup>+</sup> entre les deux groupes : les CE (centrales ou périphériques) provenant de donneurs âgés exprimant moins MCM2 (**Figure 33**). **Ces résultats indiquent que les CE périphériques et centrales provenant de donneurs jeunes ou âgés conservent une capacité proliférative.**

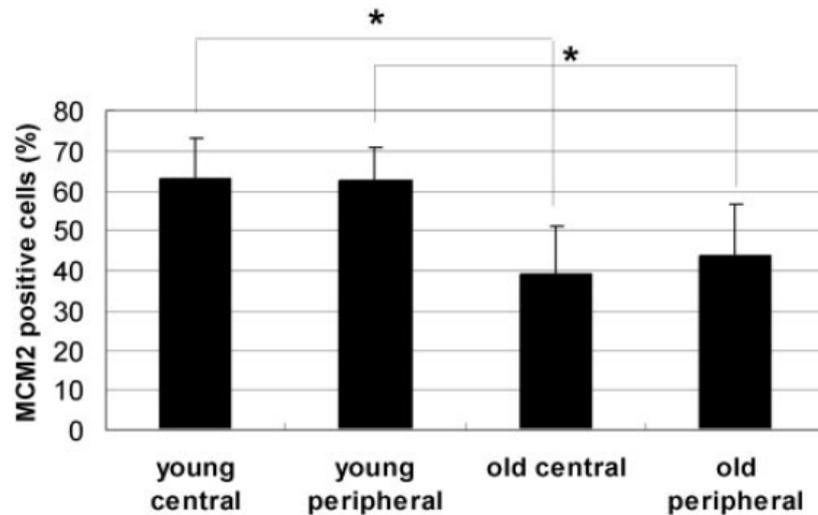


Figure 33 : Pourcentage moyen de CE centrales et périphériques MCM2<sup>+</sup> cultivées à partir de donneurs jeunes (<30 ans) et âgés (>50 ans). (n= 4 per age-group; \*P< 0.05). (D'après Konomi et al., 2005 [427]).

Même si aucune différence significative n'a été observée, dans cette étude prenant MCM2 comme marqueur [427], dans la capacité proliférative des CE périphériques *versus* centrales en culture, il a été constaté des différences liées à l'âge dans la capacité des CE à répondre aux stimuli mitogéniques. Ces résultats suggèrent que **seul un petit nombre de CE sont capables de proliférer chez les donneurs âgés. L'augmentation du temps de doublement de population des CE chez les donneurs âgés laisse supposer que ces cellules doivent être régulées différemment des cellules plus jeunes.**

### III.2.1.3.3 Ex vivo

En 2006 Mimura et Joyce ont également étudié les capacités prolifératives **et la sénescence** des CE humaines, *ex vivo*, en fonction de la topographie centrale ou périphérique ainsi qu'en fonction de l'âge [430]. Les cornées étaient découpées en quartier puis une lésion calibrée de 2 mm était réalisée par grattage de la périphérie vers le centre. Les quartiers étaient incubés pendant 24, 36, 48, 60, 72, 84 et 96 heures dans du milieu contenant 8% de SVF et additionné de facteurs de croissance. Les tissus étaient fixés et les CE immunomarquées sur montage à plat pour MCM2 comme marqueur de compétence répllicative. Le pourcentage de CE MCM2<sup>+</sup> dans l'endothélium lésé, central et périphérique était calculé à 12 heures d'intervalle entre 36 et 96 heures post-lésion. Les résultats étaient comparés entre région centrale et périphérique dans et entre les deux groupes d'âges. Les CE étaient également marquées par iodure de propidium (IP) afin de visualiser l'intégralité des noyaux. Dans les deux groupes d'âges (<30 ans [n=4 ; âge moyen : 15±2,6 ans ; 12-18 ans] et

>50 ans [n=4 ; âge moyen : 56,3±3,2 ans ; 53-59 ans]) les CE repeuplaient la lésion de manière temps-dépendant. Celles situées à proximité de la lésion commençaient à migrer après 24 heures d'incubation et continuaient leur migration et/ou leur prolifération jusqu'à atteindre la confluence entre 72 et 96 heures post-lésion. Les CE marquées à l'IP étaient dénombrées afin de comparer les DCE dans les zones centrales et périphériques aux abords de la lésion au cours du temps permettant ainsi de déterminer la capacité des CE à répondre à la blessure. Dans les cornées de donneurs âgés (**Figure 34.A**), la DCE moyenne augmentait de manière temps-dépendant. La DCE centrale atteignait un plateau 84 heures après la lésion alors que dans la zone périphérique le plateau était atteint à 72 heures, indiquant la guérison de la lésion et la reformation de la monocouche. Entre 36 et 96 heures post lésion, il était observé un plus grand nombre de cellules marquées à l'IP dans les régions périphériques que dans les régions centrales. Dans les cornées de donneurs plus jeunes (**Figure 34.B**), la DCE augmentait également avec le temps et le nombre de CE dans les deux zones atteignait un plateau environ 72 heures après la lésion. Contrairement aux cornées de donneurs âgés, aucune différence significative n'était observée dans la DCE centrale *versus* périphérique indiquant que les CE centrales et périphériques répondaient de manière similaire à la lésion. Aucune différence significative de DCE entre les deux groupes d'âge n'était observée en périphérie de la cornée. Bien qu'aucune différence de la DCE centrale entre les deux groupes n'ait été notée entre 36 et 60 heures post-lésion (P=0.058 et P=0.058), une différence était observée entre 48 et 72 heures (P= 0.0050 et P=0.0016, respectivement). Ces résultats indiquent que **les CE périphériques ont la capacité de répondre à une lésion indépendamment de l'âge du donneur alors que peu de CE dans la région centrale des cornées de donneurs âgés sont capables de répondre à la blessure**. Cependant, le nombre de comparaisons statistiques effectué sur ces petits échantillon n=4 dans chaque groupe) doit laisser prudent.

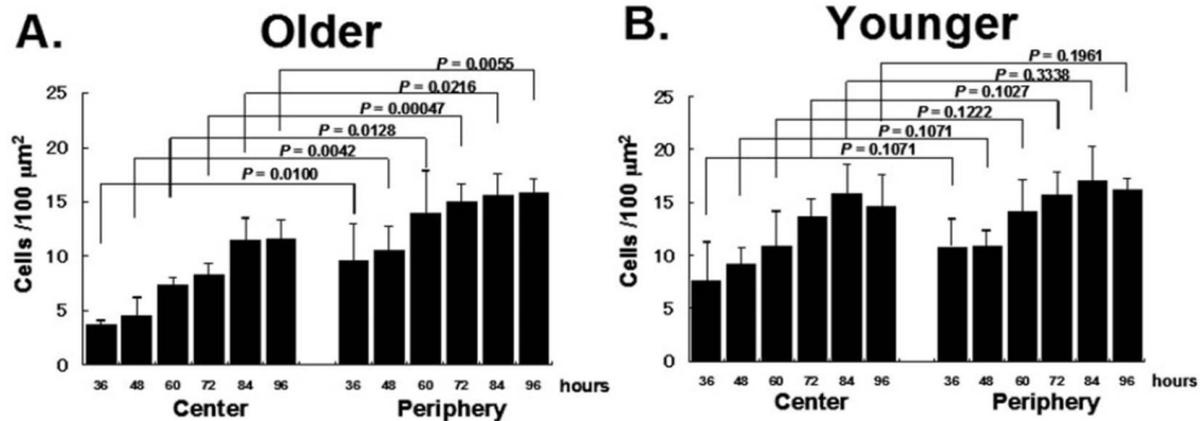


Figure 34 : Comparaison de la DCE périphérique et centrale dans une zone de lésion sur des cornées provenant de donneurs âgés (A) ou jeunes (B).

A scrape-wound was made in the endothelium of each corneal quarter. Tissue was then incubated in culture medium. The four corneal quarters were fixed at each time point and stained for PI. Three representative micrographs of the wound area in the central and peripheral cornea were used to calculate the density of PI-positive cells in a 100 μm<sup>2</sup> area. The number of cells from four different donors was averaged for each age group at each time point ( $n=4$ ). Data are presented as the mean±SD and are considered statistically significant at  $P<0.05$ .

(D'après Mimura et Joyce, 2006 [430])

La lésion de l'endothélium induit une perte de l'inhibition de contact et les CE sont alors capables de progresser en phase G<sub>1</sub> du cycle et de synthétiser MCM2. Vingt quatre heures après la lésion, peu de CE avaient migré vers la blessure et aucunes n'étaient marquées positivement pour MCM2. Avec le temps, une augmentation du nombre de CE migrantes était observée ainsi que le nombre de CE MCM2<sup>+</sup> indiquant que les CE commençaient à avoir une compétence répllicative. Les CE en dehors de la zone lésée restaient MCM2<sup>-</sup>. Dans les cornées provenant de donneurs âgés, le pourcentage de CE MCM2<sup>+</sup> dans les deux zones augmentait graduellement entre 36 et 72 heures post-lésion puis une diminution était observée (Figure 35.A). Cette baisse de CE MCM2<sup>+</sup> était corrélée avec la phase plateau observée dans la DCE. Il est connu que le niveau de MCM2 diminue rapidement lorsque les cellules arrêtent de se diviser et deviennent quiescente [431-433]. Le pourcentage de CE MCM2<sup>+</sup> était significativement supérieur dans la périphérie. Dans les cornées de jeunes donneurs, elles étaient observées aussi bien dans le centre que dans la périphérie. Une diminution du nombre de CE marquées avait lieu dans les deux zones à partir de 72 heures post-lésion comme observé dans le groupe plus âgé. Le pourcentage de CE positives était sensiblement supérieur en périphérie que dans le centre de la cornée à 36, 48 et 72 heures après la lésion (Figure 35.B). Le pourcentage de CE MCM2<sup>+</sup> aussi bien dans la région centrale que périphérique était supérieur chez les donneurs jeunes. L'ensemble de ces résultats confirme que **le potentiel réplcatif des CE périphériques est supérieur à celui des cellules centrales et ce, indépendamment de l'âge du donneur. La compétence répllicative de ces cellules diminue avec l'âge et particulièrement dans le centre de la cornée.**

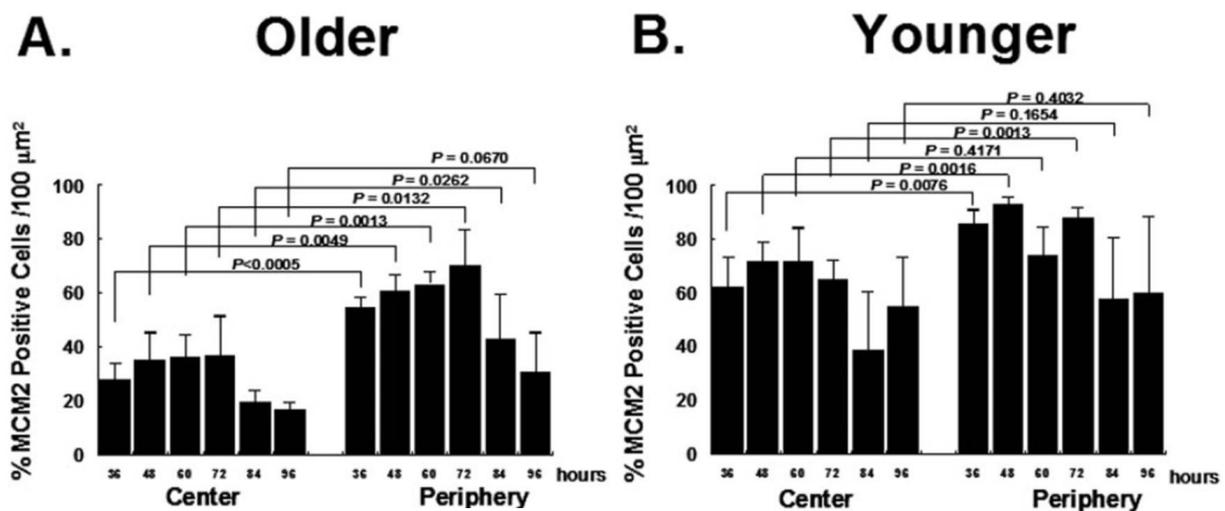
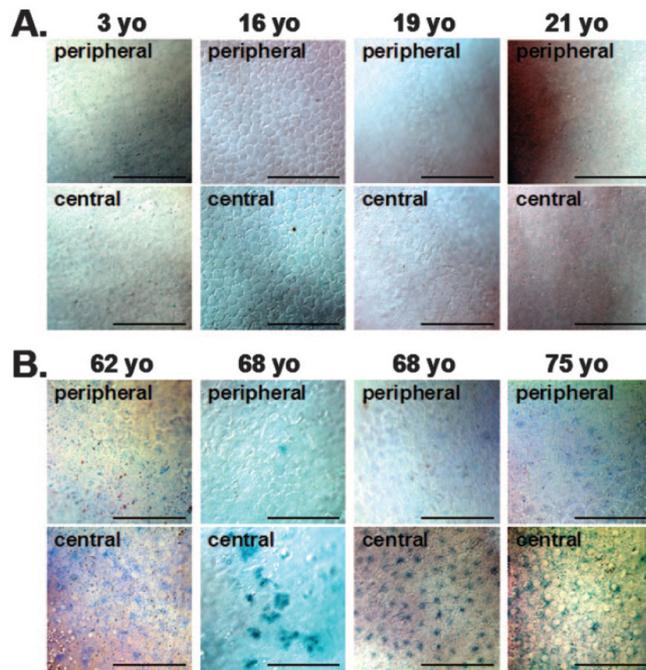


Figure 35 : Comparaison du pourcentage de CE MCM2<sup>+</sup> périphériques et centrales dans une zone de lésion sur des cornées provenant de donneurs âgés (A) ou jeunes (B).

Three representative micrographs of the central and peripheral wound areas were used to calculate the percentage of MCM2-positive cells in a 100  $\mu\text{m}^2$  area. The number of cells from four different donors was averaged at each age group and time point ( $n = 4$ ). Data are the mean $\pm$ SD and are considered statistically significant at  $P < 0.05$ .

(D'après Mimura et Joyce, 2006 [430])

L'activité de la  $\beta$ -Galactosidase à pH 6.0 (*senescence-associated  $\beta$ -galactosidase* : SA- $\beta$ -Gal) est considérée comme marqueur de sénescence cellulaire *in vitro* et *in vivo* [434, 435](la sénescence des CE cornéennes humaines est détaillée § III.4). Dans l'endothélium de donneurs jeunes *ex vivo* (<30 ans ;  $n=4$  ; âge moyen :  $14,8 \pm 8,1$  ans ; 3-21 ans), pratiquement aucune CE n'était SA- $\beta$ -Gal<sup>+</sup>. **Un fort marquage positif était observé dans les CE des donneurs âgés (>50 ans ;  $n=4$  ; âge moyen :  $68,3 \pm 5,3$  ans ; 62-75 ans) et plus particulièrement dans la région centrale de la cornée (Figure 36).** La détermination de l'intensité de la coloration mettait en évidence une sénescence augmentant de la périphérie jusqu'au centre des cornées âgées. Ces résultats étaient confirmés par Song *et al.* en 2008 [436]. Une augmentation de l'activité de la  $\beta$ -Galactosidase était corrélée avec l'augmentation de l'âge des donneurs ( $n=1$  pour chaque âge ; 9, 17, 23, 57, 65 et 67 ans).



**Figure 36 : Analyse histochimique de l'activité de SA-β-Gal dans les CE sur des cornées *ex vivo*.**

(A) In younger donors, there is no or occasional faint staining for SA-β-Gal. (B) By contrast, older donors demonstrated a generally low level of positive staining in the peripheral area and greatly increased staining in the central area. Scale bars, 100 μm.

(D'après Mimura et Joyce, 2006 [430])

Dans les cornées *ex vivo*, les CE humaines périphériques conservent une forte compétence proliférative indépendamment de l'âge du donneur<sup>†</sup>. Les CE centrales des cornées de donneurs âgés conservent une compétence répliquative mais le pourcentage de CE pouvant se répliquer est significativement inférieur par rapport aux CE périphériques ou aux CE centrales de donneurs jeunes. Cette diminution de la capacité proliférative est corrélée avec l'augmentation du nombre de CE sénescents.

<sup>†</sup> Attention, l'âge maximum dans ces expérimentations était de 75 ans... Quid de nos donateurs européens de très grand âge, 85 ans et plus...

### III.3. Mécanismes contribuant à l'inhibition proliférative *in vivo*

Bien qu'il existe des différences intrinsèques liées à l'âge dans la capacité proliférative des CE, celles-ci sont capables de répondre favorablement *in vitro* ou *ex vivo* à des stimuli mitogéniques. Il a été supposé que différents mécanismes, *in vivo*, étaient capables de maintenir l'endothélium cornéen en phase G<sub>1</sub> du cycle cellulaire. Différents facteurs contribuant à cette inhibition proliférative ont été identifiés : absence de stimulation mitogénique suffisante ; régulation négative par le TGF-β<sub>2</sub> (*Transforming-Growth-Factor-β*<sub>2</sub>) de l'humeur aqueuse ; forte inhibition de contact. D'autres hypothèses comme le raccourcissement des télomères ont également été explorées.

#### III.3.1. Longueur des télomères

Bien que la nomenclature reste confuse, il devient nécessaire d'établir une distinction entre deux formes de sénescence cellulaire : une sénescence répllicative et une sénescence prématurée induite par le stress.

##### A RETENIR



La sénescence caractéristique observée dans les CE n'est pas due à une sénescence répllicative causée par le raccourcissement critique des télomères mais est causée par une sénescence prématurée induite par le stress.



La sénescence répllicative résulte du raccourcissement successifs des télomères qui se produit au cours de la réplication de l'ADN [437]. La longueur des télomères et l'activité télomérase qui permet d'empêcher leur raccourcissement pourraient être génétiquement prédéterminées. Les télomères sont des structures spécifiques hautement conservées,

présentes à l'extrémité des chromosomes des cellules eucaryotes et consistantes en des motifs répétitifs hexamériques (TTAGGG). Ces séquences sont répétées plusieurs centaines de fois sur chaque chromosome humain [438]. Ils ont un rôle essentiel dans la structure et la fonction des chromosomes, notamment dans la stabilisation du chromosome pendant la réplication, potentiellement dans la prévention de recombinaisons chromosomiques aberrantes [439] et dans l'adhésion des chromosomes à la matrice nucléaire. Ils sont considérés comme l'horloge interne régulant les divisions cellulaires en déterminant le nombre maximum de mitose des cellules somatiques. Les télomères humains normaux peuvent atteindre jusqu'à 15 Kb de longueur et il a été observé que leurs longueurs raccourcissent progressivement de 50-100 pb à l'extrémité 5' de leur ADN lors de chaque division cellulaire dans les cellules somatiques [439-442]. Une fois que les télomères sont érodés jusqu'à une taille critique, le programme de

sénescence est activé et les cellules deviennent irréversiblement non prolifératives. Ce raccourcissement télomérique dépendant de la réplication de l'ADN est donc considéré comme le cœur de l'horloge mitotique qui aboutit à la sénescence cellulaire [443].

Les télomérases, enzymes transcriptases inverses spécialisées, assurent la synthèse et la croissance des télomères, chez l'humain et chez la plupart des autres organismes [444]. **Ces enzymes sont très actives surtout pour les cellules qui se divisent de nombreuses fois comme les cellules souches.** Ainsi, dans beaucoup de types cellulaires humains, la réplication de l'ADN et l'expression du gène TERT, codant la télomérase inverse transcriptase, sont réprimés, les télomères de ces cellules se raccourcissent donc progressivement à chaque division. Au contraire, dans les tissus à multiplication cellulaire intense, comme les cellules-souches ou les leucocytes, le gène TERT est exprimé et la longueur des télomères reste constante. Depuis quelques années, il a été démontré que l'introduction d'une activité télomérase (*via* le gène TERT) prolongeait la survie [445] de diverses cellules eucaryotes, comme par exemple les cellules de l'épithélium pigmenté rétinien (RPE-340), les fibroblastes cutanés, les cellules épithéliales cristalliniennes humaines ou encore les cellules épithéliales cornéennes humaines, toutes dépourvues d'activité télomérase endogène [442, 446, 447].

La sénescence prématurée induit par le stress (SIPS) est causée par l'exposition des cellules à certains stress environnementaux [448, 449]. La SIPS est considérée comme «prématurée» car les cellules perdent leur capacité proliférative avant l'épuisement des télomères. Ainsi, les cellules conservent un potentiel prolifératif basé sur la longueur des télomères mais arrêtent de se diviser en raison de mécanismes d'inhibition activée par le stress induit par les stimuli extérieurs.

En 1998, Egan a été le premier à étudier les télomères des CE humaines. [450]. La longueur des fragments de restriction terminaux (*TRF : terminal restriction fragments*) était comparée entre des CE et des cellules épithéliales provenant de donneurs âgés de 5 semaines à 84 ans. Les résultats indiquaient que les télomères des CE étaient en moyenne plus longs que ceux des cellules épithéliales. De plus, les CE transformées avec le proto-oncogène E6/E7 montraient une diminution de leurs télomères avec le doublement de population. **Aucune des cellules n'avait d'activité télomérase.** L'auteur concluait que les CE cornéennes de donneurs âgés avaient des télomères suffisamment longs pour permettre plusieurs cycles de division avant le début de la sénescence répllicative et que **le raccourcissement des télomères n'était pas en cause dans l'inhibition de la prolifération.** En 2007, Konomi et Joyce ont comparé la longueur relative des télomères dans les CE périphériques et centrales provenant

de donneurs jeunes (<30 ans) et âgés (>50 ans) afin d'identifier le type de sénescence retrouvé dans ces cellules [451]. Contrairement à Egan [450] qui ne mesuraient que la longueur des TRF sur l'ensemble des CE cette équipe utilisa une technique quantitative d'hybridation in situ à fluorescence (*quantitative fluorescence in situ hybridization : Q-FISH*). Cinq et six paires de cornées provenant respectivement de donneurs jeunes (<30 ans ; âge moyen : 17,8±8,2 ans ; 7-28 ans) et de donneurs âgés (>50 ans ; âge moyen : 71,2±3,4 ans ; 67-76 ans) étaient utilisées dans cette étude. Sur une cornée, les cellules de la zone centrale (0-6 mm) ainsi que de la zone périphérique (6-9,5 mm) étaient isolées, montées sur lame et marquées avec une sonde à acide nucléique peptidique (*peptide nucleic acid : PNA*) couplé à la fluorescéine isothiocyanate (FITC) se fixant spécifiquement sur les télomères. Sur la cornée sœur, la zone centrale et périphérique étaient directement marquées au PNA/FITC sans isolement des cellules. Aucune différence significative n'était observée entre les régions centrales et périphériques au sein de chaque groupe d'âge ou entre les deux groupes d'âge. Ces résultats indiquent que, comme pour l'étude réalisée par Egan, **le raccourcissement des télomères n'est pas en cause dans la sénescence des CE cornéennes humaines.**

Les travaux de Joyce NC *et al.* démontrent que **la sénescence caractéristique observée dans les CE n'est pas due à une sénescence répliquative causée par le raccourcissement critique des télomères mais est causée par une sénescence prématurée induit par le stress** [451]. Ces résultats confirment ceux obtenus lors d'études antérieures [450, 452, 453] démontrant que le statut non prolifératif des CE cornéennes humaines est causé par une SIPS. Plusieurs projets de recherche actuellement en cours ont pour objectif d'identifier la source de ce stress et de tester si la prévention ou un renversement possible des effets de ce stress peut conduire à une prolifération des CE.

### III.3.2. Facteurs de croissance

Des facteurs de croissance (FC) sont présents dans l'humeur aqueuse, au niveau de la membrane de Descemet et sont exprimés par les CE elles mêmes. Leurs concentrations sont faibles mais semblent être dépendantes de la méthode d'échantillonnage ainsi que la

**A RETENIR**

★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★

La limitation des capacités prolifératives des CE *in vivo* n'est pas due à leur incapacité intrinsèque à répondre à la stimulation des facteurs de croissance.

La protéine kinase C- $\alpha$  joue un rôle dans la prolifération des CE induit par le SVF.

★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★

sensibilité de la méthode utilisée. Les FC de l'humeur aqueuse sont : le FGF (*Fibroblast Growth Factor*) acide [454] et basique [454, 455] ; l'IGF-I et -II (*Insulin-like Growth Factor*) ; l'IGFBP (*Insulin-like Growth Factor Binding Protein*) [456] ; et l'HGF (*Hepatocyte Growth Factor*) [457]. L'EGF (*Epidermal Growth Factor*) et le TGF- $\alpha$  (*Transforming Growth Factor*) semblent être absent de l'humeur aqueuse ou ont des niveaux sous le

seuil de détection [458]. Les niveaux des FC dans l'humeur aqueuse peuvent augmenter significativement en réponse à une inflammation, une lésion des tissus ou à tout autre pathologie oculaire.

La membrane de Descemet, matrice extracellulaire formée par les CE, parait agir comme réservoir des FC, notamment pour le FGF. Des CE bovines en culture sécrètent une matrice extracellulaire qui favorise la croissance de différents types cellulaires comme les cellules du cortex surrénalien [459]. Schweigerer a démontré que les CE bovines expriment le gène codant pour le FGF basique et supposait que cette protéine pouvait agir comme un FC paracrine et autocrine [460]. Blake a utilisé cette matrice bovine comme support de prolifération à des CE cornéennes humaines provenant de donneurs jeunes et âgés [461]. Des études utilisant du radiomarquage dirigé contre le FGF acide et basique ont permis d'identifier spécifiquement les sites de liaisons de ces FC sur la membrane de Descemet sur des cornées humaines [462]. La liaison du FGF sur la membrane semble se faire par l'intermédiaire d'héparane sulfate car les sites de fixation du FGF sont sensibles à l'héparitinase. Des tests ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) ont été réalisés afin de démontrer que les CE humaines ne synthétisaient pas seulement du FGF-2 endogène dans l'humeur aqueuse mais le sécrétaient également dans la matrice extracellulaire [463]. Une activité mitogénique est observée dans des CE humaines *in vitro* après stimulation avec des extraits de la matrice extracellulaire et son activité était partiellement inhibée par un anti-

FGF-2 suggérant que la matrice associée au FGF-22 est bioactive [463]. Il a été démontré que l'isoforme de 18 kDa du FGF est principalement localisée dans le cytoplasme et la matrice extracellulaire alors que l'isoforme de 24 kDa est prédominant dans le noyau des cultures de CE de lapin [464]. Ces résultats suggèrent que les FC comme le FGF sont associés à la membrane de Descemet et pourraient stimuler une prolifération sous des conditions appropriées.

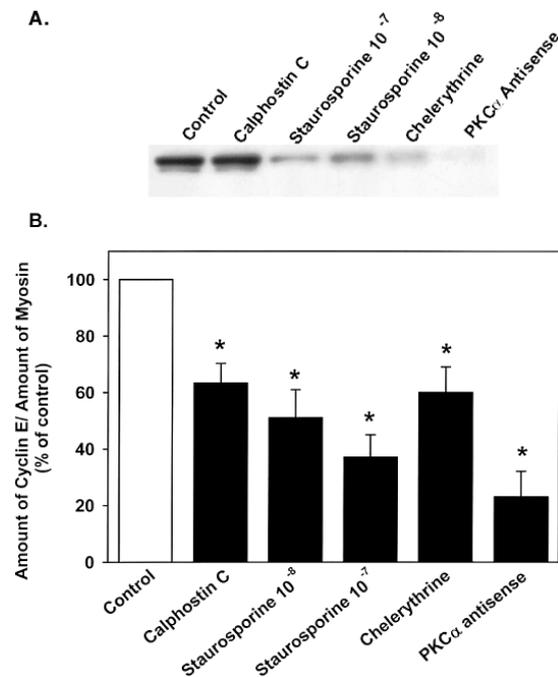
Les CE synthétisent de nombreux FC ainsi que leurs récepteurs associés. Différentes études ont démontrées que les CE humaines en culture exprimaient l'ARNm et/ou les protéines de l'EGF et son récepteur ; le FGF acide et basique ; les récepteurs du FGF-1 et -2 ; le TGF- $\beta$ 1 et - $\alpha$  ; l'HGF et son récepteur et le KGF (*Keratinocyte Growth Factor*) [376, 465-467]. La comparaison de cultures cellulaires entre des cellules prolifératives et des cellules en sénescences a montré une réduction du niveau relatif d'expression de certains FC tel que l'EGF et le TGF- $\beta$ 1 dans les cellules sénescences. Wilson a donc émis l'hypothèse que la diminution du taux de ces facteurs pourrait contribuer à l'état de sénescence observé dans ces cellules [465]. **La limitation des capacités prolifératives des CE *in vivo* n'est pas due à leur incapacité intrinsèque à répondre à la stimulation des FC** car celles-ci ont démontré une augmentation de la synthèse d'ADN en organoculture et surtout lorsque l'endothélium subit une lésion *ex vivo*. Par exemple, il a été démontré que la synthèse d'ADN augmentait dans les CE de cornées organocultivées après que celles-ci aient subi une lésion et en présence : de sérum fœtal humain (*Fetal Human Serum : FHS*) associé ou non à de l'EGF ou à de l'insuline [468]. L'EGF [469] et le basique FGF [470] ont également la capacité d'augmenter la synthèse d'ADN des CE dans des cornées de chat organocultivées [469] ou *in vivo* [470] après lésion de l'endothélium.

Peu d'informations sont disponibles concernant les signaux de transduction induits par les FC dans les CE cornéennes. Des cultures cellulaires de bovin, rat et lapin ont été utilisées comme modèle d'études en réponse aux mitogènes. Nous venons de voir que ces CE exprimaient des récepteurs pour de nombreux types de FC, tels que pour l'EGF et le FGF-2, et qu'elles proliféraient en réponses à ces facteurs aussi bien qu'avec du SVF. Des études réalisées sur des CE bovines *in vitro* ont fourni des informations de base concernant les premières étapes de transduction du signal conduisant à l'entrée dans le cycle cellulaire. La micro-injection de la protéine interférente dominante-mutante Ras (N17)<sup>‡</sup> dans des CE

---

<sup>‡</sup> Les protéines Ras sont des petites GTPases qui font partie de la famille des protéines G monomériques. Elles sont activées par les récepteurs membranaires des facteurs de croissance. Elles agissent sur plusieurs voies métaboliques par activation de kinases. Elles interviennent dans la régulation de la prolifération, de la

bovines bloquait la synthèse d'ADN généralement observée en réponse à une lésion indiquant que la protéine G doit jouer un rôle dans la transduction du signal qui conduit à l'entrée dans le cycle cellulaire [471]. L'addition de SVF augmentait l'expression des gènes précoces *c-fos* [472] et *c-jun* [473] prouvant qu'ils sont impliqués dans la prolifération. Des CE de rats *in vitro* ont été utilisées afin d'étudier le rôle de la protéine kinase C (PKC) dans la prolifération induite par le SVF [474]. L'incubation de ces CE avec des inhibiteurs de la PKC (staurosporine ; chélérythrine ; calphostine C) ou avec des oligonucléotides anti-sens de la PKC- $\alpha$  réduisait significativement la prolifération SVF-dépendante. Les inhibiteurs de la PKC ainsi que les oligonucléotides anti-sens diminuaient significativement l'expression de la cycline E qui est active durant la transition G<sub>1</sub>/S du cycle cellulaire (**Figure 37**). Ces résultats indiquent que la PKC et plus particulièrement **PKC- $\alpha$  joue un rôle dans la prolifération des CE induit par le SVF.**



**Figure 37 : Effet des inhibiteurs de la PKC et des oligonucléotides antisens PKC- $\alpha$  sur l'expression protéique de la cycline E.**

Serum-starved cultures of rat corneal endothelial cells were treated with the PKC inhibitors, calphostin C ( $10^8$ M), staurosporine ( $10^8$ M,  $10^7$ M), or chelerythrine ( $10^8$ M), or treated with PKC- $\alpha$  antisense oligonucleotide before serum stimulation. After 24 h, protein was extracted for Western blot analysis of cyclin E (A). Graph in (B) shows the densitometric analysis of cyclin E relative to a non-muscle myosin control. Results are the mean ( $\pm$ SD) from three independent experiments. \*P<0,05. (D'après Graham MA et al., 2000 [474])

différentiation et de la survie cellulaire ainsi que dans l'organisation du cytosquelette. Elles sont actives quand elles sont couplées au GTP (Guanosine TriPhosphate), et inactives quand elles sont couplées au GDP (Guanosine DiPhosphate). Deux sortes de protéines inactivent Ras en stimulant l'hydrolyse du GTP en GDP : la protéine Ras-GEF (pour G Exchange Factor), et les protéines GAP (pour GTPase Activating Protein).

### III.3.2.1. Implications de la PLC- $\gamma$ 1, de PI3K et de l'AMPc

Lors de la stimulation de CE de lapin en culture par du FGF-2, la phospholipase C- $\gamma$ 1 (PLC- $\gamma$ 1) [475, 476], la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) [476] et l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) [477] sont impliqués dans la voie de signalisation.

#### III.3.2.1.1 La phospholipase C- $\gamma$ 1 : PLC- $\gamma$ 1

Dans la cornée normale, le FGF-2 est un composant de la membrane de Descemet pouvant être nécessaire à la réparation de lésions [478-481]. Les actions biologiques du FGF-2 sont médiées par des récepteurs transmembranaires, possédant une activité tyrosine kinase,

situés à la surface des CE [482, 483]. Un des premiers événements cellulaires induits par la liaison du FGF-2 à son récepteur est la stimulation de la phospholipase C- $\gamma$ 1 (PLC- $\gamma$ 1) spécifique de la phosphoinositide (PI) [484, 485]. Une des activités cellulaires médiées par la PLC- $\gamma$ 1 active est une action mitogène dans de nombreux types cellulaires [485-487]. Il a été démontré que le FGF-2 induisait une association entre le domaine SH3 de la PLC- $\gamma$ 1 et la vinculine [476] et que cette enzyme associée avec le cytosquelette (vinculine et actine) jouait un rôle dans la mitogénèse [475].

#### A RETENIR



PLC- $\gamma$ 1 conduit à l'activation de la machinerie du cycle cellulaire induisant la prolifération cellulaire en stimulant la synthèse de CDK4 et facilitant sa translocation dans le noyau et en exportant vers le cytoplasme, site de destruction protéolytique, le CKI p27<sup>KIP1</sup>, un inhibiteur de la phase G<sub>1</sub>.

La voie de signalisation mitogénique par la PLC- $\gamma$ 1 ne doit pas être une voie majeure dans les CE cornéennes.



Il est important d'identifier les éléments spécifiques des mécanismes de régulation du cycle cellulaire après activation de molécules de signalisation en réponse aux facteurs de croissance. Plusieurs réseaux de signalisation semblent être cruciaux pour la progression G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> et la transition G<sub>2</sub>/M : (1) le mitogène active la cascade des MAP kinases ce qui entraîne l'activation de nombreux facteurs de transcriptions comme Elk-1, c-Ets-1 et c-Ets-2 [488, 489] ; (2) l'activation de la voie de signalisation PI3K/AKT qui inhibe p27<sup>KIP1</sup>, promouvant ainsi la transition G<sub>1</sub>/S du cycle cellulaire [490-492] ; (3) l'activation de la voie des MAP kinases et l'inhibition de p27<sup>KIP1</sup> sont nécessaires à l'entrée en phase S [493] ; (4) la régulation par la PKC qui semble agir sur la progression de la phase G<sub>1</sub> et au cours de la transition G<sub>2</sub>/M [494, 495].

La transduction des signaux extracellulaires mitogènes culmine dans l'expression et l'assemblage des différents complexes Cyclines/CDKs [149, 302]. Ces complexes sont séquentiellement formés, activés et inhibés par les CKIs. Ces étapes gouvernent la progression du cycle cellulaire. La surexpression des CKIs entraîne l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 [496, 497].

En 2002, Lee étudié l'implication de la PLC- $\gamma$ 1 comme médiateur à la prolifération des CE cornéennes de lapin en réponse à une stimulation par le FGF-2 [498]. Une exposition de longue durée des CE au FGF-2 est nécessaire pour activer la PLC et induire la prolifération cellulaire. Il existe une longue période de latence entre l'activation de l'enzyme et le début de la prolifération cellulaire : l'activité enzymatique maximale est atteinte 8 heures après stimulation alors que la prolifération n'est détectée que 24 heures après la stimulation. L'utilisation d'anticorps neutralisants anti- PLC- $\gamma$ 1, PLC- $\beta$ 1, ou PLC- $\delta$ 1 a démontré l'importance de la PLC- $\gamma$ 1 dans l'hydrolyse des phosphoinositides totales et dans la prolifération induite par le FGF-2. L'implication de la PLC- $\gamma$ 1 dans la régulation du cycle cellulaire a été déterminée en bloquant l'action du FGF-2 sur CDK4 et p27<sup>KIP1</sup>. FGF-2 stimule la synthèse de CDK4 et facilite son importation nucléaire alors qu'il facilite l'export nucléaire de p27<sup>KIP1</sup> vers le cytoplasme sans affecter sa synthèse. Les anticorps neutralisants anti-PLC- $\gamma$ 1 abolissent l'activité du FGF-2 sur la synthèse ainsi que sur la translocation de CDK4 et bloquent l'export nucléaire de p27<sup>KIP1</sup>. Cette étude démontre que **la PLC- $\gamma$ 1 conduit à l'activation de la prolifération cellulaire en stimulant la synthèse de CDK4 et facilitant sa translocation dans le noyau et en exportant vers le cytoplasme, site de sa destruction protéolytique, le CKI p27<sup>KIP1</sup>, un inhibiteur de la phase G<sub>1</sub>** [498]. La voie de signalisation mitogénique impliquant la PLC- $\gamma$ 1 représente environ 20% de la prolifération cellulaire induite par le FGF-2 : la cytochalasine B, qui rompt l'association de la PLC- $\gamma$ 1 avec le cytosquelette, inhibe la prolifération cellulaire induite par le FGF-2 d'environ 20% [475]. Des oligonucléotides antisens-PLC- $\gamma$ 1 entraîne une diminution d'environ 15% de la prolifération cellulaire après stimulation avec du FGF-2 [475]. Des anticorps neutralisants dirigés contre la PLC- $\gamma$ 1 bloquent l'activité de l'enzyme et la prolifération cellulaire de 20% [498]. L'ensemble de ces résultats obtenus à partir de CE de lapin suggèrent que **la voie de signalisation mitogénique par la PLC- $\gamma$ 1 ne doit pas être la voie principale dans les CE cornéennes.**

### III.3.2.1.2 La phosphatidylinositol 3-kinase : PI3K

L'activation de PI3K est nécessaire à la synthèse d'ADN en réponse à de nombreux mitogènes [499-502]. PI3K est également connu pour participer directement à la progression du cycle cellulaire par exemple dans les fibroblastes d'embryon de rat, où l'activation de

#### A RETENIR



PI3K est un médiateur du FGF-2 dans l'activation de la machinerie du cycle cellulaire. Il régule positivement l'expression de CDK4, facilite son importation et sa séquestration dans le noyau. Simultanément, PI3K régule négativement l'expression du CKI p27<sup>KIP1</sup> en facilitant sa dégradation au niveau cytoplasmique par protéolyse en régulant sa phosphorylation.



PI3K suffit à induire l'entrée de cellules quiescentes dans le cycle en activant les complexes Cyclines/CDKs de la phase G<sub>1</sub> et G<sub>1</sub>/S et promouvant ainsi la synthèse d'ADN [491]. Bien que l'importance de la voie PI3K dans la prolifération cellulaire soit bien établie, son rôle dans la régulation du cycle cellulaire n'est pas entièrement compris.

CDK4 et p27<sup>KIP1</sup> sont impliqués dans la voie de régulation du cycle cellulaire après stimulation avec du FGF-2 dans les CE cornéennes de lapin [498]. En utilisant le même

modèle, la même équipe a étudiée l'implication de PI3K dans la progression du cycle cellulaire des CE après stimulation au FGF-2 [503]. Le nombre de CE stimulées avec du FGF-2 commence à augmenter après 16 heures d'exposition et est maximal après 24 heures, suggérant que la prolifération cellulaire nécessite une exposition prolongée et continue des CE au FC. L'activité enzymatique de PI3K est stimulée par le FGF-2. La prolifération cellulaire est inhibée de manière concentration dépendante lors de l'ajout dans les cultures d'un inhibiteur spécifique de PI3K (LY294002) après stimulation des CE avec du FGF-2. **PI3K serait donc un médiateur du FGF-2 dans l'activation du cycle cellulaire. Comme PLC- $\gamma$ 1, il régule positivement l'expression de CDK4, facilite son importation et sa séquestration dans le noyau. Simultanément, PI3K régule négativement l'expression du CKI p27<sup>KIP1</sup> en facilitant sa dégradation au niveau cytoplasmique par protéolyse en régulant sa phosphorylation.** Des études utilisant des anti-mitogènes (TGF- $\beta$ 2 et AMPc) ont par ailleurs démontré qu'ils utilisaient également CDK4 et p27<sup>KIP1</sup> au cours de leur action [504, 505].

L'ensemble de ces résultats laisse supposer que, dans les CE cornéennes de lapin, CDK4 et p27<sup>KIP1</sup> sont deux acteurs clés dans l'inhibition proliférative et ce indépendamment de la diversité des voies de signalisation cytoplasmique.

### III.3.2.1.3 L'adénosine monophosphate cyclique : AMPc

Deux équipes ont proposé que le TGF- $\beta$ 2 (Joyce, USA) et l'AMPc (Kim, Corée) présents dans l'humeur aqueuse [398, 506, 507] jouaient un rôle clé dans le maintien des CE en phase G<sub>1</sub> du cycle cellulaire *in vivo* et *in vitro* [398, 504]. Le 8-bromoadénosine AMPc (8-

#### A RETENIR



L'AMPc est inhibe les effets de PI3K en présence de stimulation mitogénique.

PI3K et l'AMPc sont les principales molécules effectrices connues pour réguler la prolifération cellulaire des CE cornéennes de lapin en réponse à une stimulation mitogénique. La régulation négative de PI3K par l'AMPc doit jouer un rôle important dans le phénotype d'arrêt en phase G<sub>1</sub> des cellules endothéliales.



Br-AMPc), un analogue non hydrolysable et diffusible de l'AMPc, inhibe la prolifération cellulaire en régulant positivement p27<sup>KIP1</sup> : il bloque la phosphorylation de p27<sup>KIP1</sup> qui est nécessaire à son export nucléaire et à sa dégradation [504]. De plus, de nombreuses études dans d'autres type cellulaire ont reportées que l'AMPc inhibe la transition G<sub>1</sub>/S du cycle cellulaire en régulant négativement les CDK2 et 4, la Cycline D1 ou D3 et en régulant positivement p21<sup>CIP1</sup> ou p27<sup>KIP1</sup> [183, 508-512]. L'AMPc inhibe donc directement la progression du cycle cellulaire. Des études ont démontré que l'AMPc et

son effecteur, la protéine kinase A AMPc dépendante (PKA), étaient impliquées dans de nombreuses voies de signalisation [513-516].

Dans la continuité des travaux réalisés sur l'action de PI3K sur la régulation du cycle cellulaire des CE cornéennes de lapin, Lee a étudié le rôle régulateur de l'AMPc sur l'expression de CDK4 et p27<sup>KIP1</sup> [477]. Dans cette étude, le 8-Br-AMPc inhibait la voie de signalisation PI3K/AKT. Le 8-Br-AMPc et l'inhibiteur de PI3K (LY294002) déclenchaient de façon équivalente la stimulation de p27<sup>KIP1</sup> et l'inhibition de CDK4. Ils inhibaient également la prolifération cellulaire, la translocation nucléaire de CDK4 et la phosphorylation de p27<sup>KIP1</sup>. La régulation négative de PI3K par le 8-Br-AMPc était médiée par une inhibition directe de l'activité de PI3K, qui par la suite bloquait la phosphorylation des sites Ser473 et Thr308 d'AKT. Le 8-Br-AMPc induisait également un rapide turnover de la protéine AKT et une réduction importante de la demi-vie de CDK4.

**L'ensemble de ces données suggèrent que PI3K régule la progression du cycle cellulaire en modulant les niveaux protéique de CDK4 et de p27<sup>KIP1</sup> et que l'AMPc est capable d'inhiber les effets de cette kinase en présence de stimulation mitogénique. Un équilibre entre l'activité des effecteurs positifs (FGF-2 via la PLC- $\gamma$ 1 et PI3K) et l'activité des**

effecteurs négatifs (AMPc) est crucial pour les CE cornéennes *in vivo*. Ainsi, un équilibre entre ces effecteurs opposés est nécessaire pour l'endothélium cornéen, non seulement pour l'homéostasie, mais aussi pendant le processus de réparation des lésions. **PI3K et l'AMPc sont les principales molécules effectrices connues pour réguler la prolifération cellulaire des CE cornéennes de lapin en réponse à une stimulation mitogénique. La régulation négative de PI3K par l'AMPc doit jouer un rôle important dans le phénotype d'arrêt en phase G<sub>1</sub> des cellules endothéliales *in vivo*.** Notons que ces travaux réalisés chez le lapin n'ont pas d'équivalent chez l'homme.

La **Figure 38** résume l'implication de la PLC- $\gamma$ 1, de PI3K et de l'AMPc dans la régulation du cycle cellulaire des CE cornéennes après stimulation par le FGF-2.

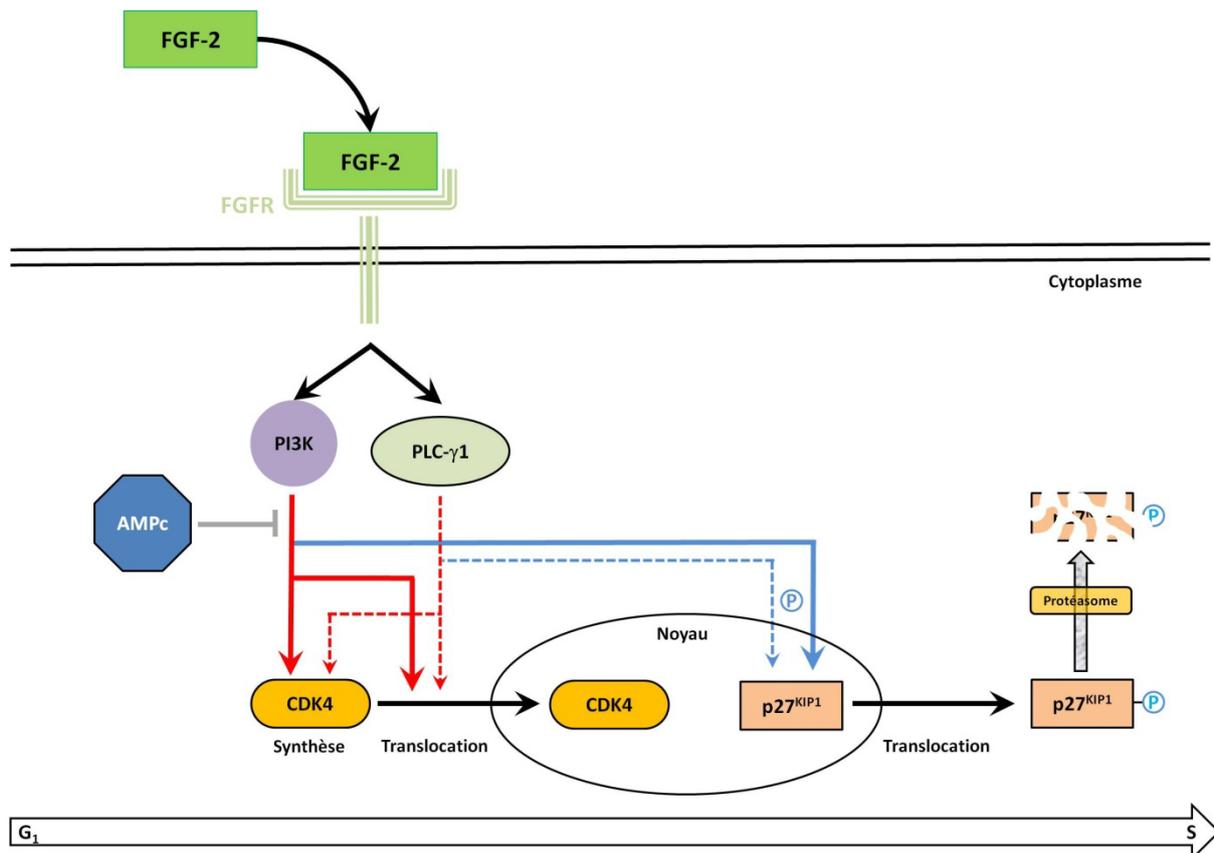


Figure 38 : Schéma récapitulatif de l'action de la PLC- $\gamma$ 1, de PI3K et de l'AMPc dans la régulation du cycle cellulaire des CE cornéennes après stimulation par le FGF-2.

### III.3.2.2. PTP1B inhibe l'action de l'EGF

L'EGF induit une prolifération des CE cornéennes chez le lapin [517], les bovins [395, 518], le chat [470, 519], les primates non humains [520, 521] et les hommes [420, 422, 461, 520] mais le niveau relatif de synthèse d'ADN et le nombre de CE qui se divisent en réponse

#### A RETENIR



PTP1B joue un rôle dans la régulation négative de la signalisation induite par l'EGF et aide à supprimer l'entrée du cycle cellulaire.

L'expression importante de PTP1B dans les CE de donneurs âgés suggère que la baisse de l'activité proliférative en réponse à l'EGF est due, au moins en partie, à l'augmentation de l'activité de PTP1B.



au stimulus est relativement faible, en particulier pour les CE provenant de donneurs humains âgés [422]. Bien que l'EGF soit connu pour stimuler la prolifération de ces CE il y a encore peu d'information concernant les mécanismes de régulation du signal.

Le récepteur à l'EGF (EGFR) est une protéine transmembranaire (1186 acides aminés) qui fait parti du groupe des récepteurs possédant une activité tyrosine kinase intrinsèque [522]. La phosphorylation réversible de la tyrosine aide à

la régulation de nombreux mécanismes cellulaires tels que la prolifération, la migration et la différenciation [523]. En réponse à la liaison d'un ligand, les résidus spécifiques tyrosine Tyr992 et Tyr1148 situés dans le domaine intracellulaire COOH-terminal de l'EGFR deviennent autophosphorylés. [524]. L'autophosphorylation de la tyrosine dans les récepteurs favorise la fixation directe de protéines de signalisation contenant des domaines de l'homologie 2 de Src (SH2) [524-527]. La liaison du ligand à l'EGFR peut induire l'activation d'un certain nombre de voies de signalisation comprenant la phospholipase C- $\gamma$  (PLC- $\gamma$ ), les cascades de la protéine kinase C (PKC) et ras conduisant à l'activation de MAP kinases différentes. Dès son activation par la fixation du ligand, l'EGFR est rapidement internalisé dans des endosomes, le domaine extracellulaire du récepteur se retrouvant dans les endosomes et son domaine intracellulaire s'étendant vers le cytoplasme. L'EGFR est encore actif dans l'endosome pendant plusieurs minutes avant soit d'être dégradé par les lysosomes soit d'être recyclé vers la membrane plasmique [528]. Le sort du récepteur ainsi que la sortie du processus de signalisation dépend d'une part de la poursuite de la fixation du ligand et d'autre part de son activité kinase intrinsèque [522, 529].

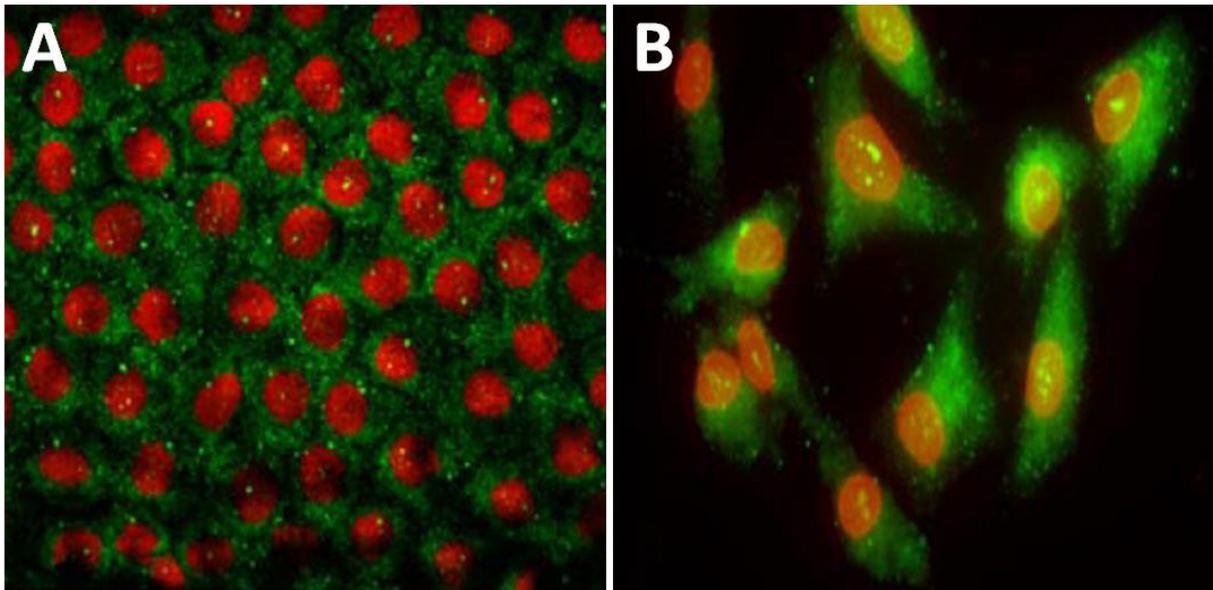
L'activité catalytique de nombreux récepteurs tyrosine kinases est fortement régulée par des protéines tyrosine phosphatases (PTPs), qui agissent comme des interrupteurs « on/off » des voies de signalisation [523, 530]. PTP1B contribue à la régulation de plusieurs

fonctions cellulaires notamment la prolifération. Cette protéine se lie à l'EGFR *in vitro* [524] et *in vivo* [531], interagit et déphosphoryle spécifiquement les résidus Tyr992 et Tyr1148 situés sur le domaine cytoplasmique du récepteur [524]. Des études indiquent qu'il existe une compétition pour la fixation de PTP1B sur ces sites. Le domaine SH2 ainsi que la PLC- $\gamma$  interagissent avec Tyr992 alors que la protéine activatrice de la GTPase Ras (GAP) interagit avec Tyr1148. Cette compétition de liaison démontre que PTP1B doit jouer un rôle dans la régulation du signal descendant de l'EGFR via la PLC- $\gamma$  et/ou GAP.

L'équipe de Joyce a montré l'expression de différents types de PTPs (PTP1B, SHP-1, SHP-2, PTP-mu et PTEN) dans les CE cornéennes de rat *ex vivo* et *in vitro* [532]. Lorsque des CE en culture, sans SVF, sont traitées avec un inhibiteur de phosphatase, le sodium orthovadate (SOV), le nombre de CE entrant en prolifération (Ki67<sup>+</sup>) augmente, **suggérant que les PTPs interviennent dans l'inhibition de la régulation du cycle cellulaire des CE cornéennes.**

La même équipe a démontré l'implication de PTP1B dans l'inhibition de la prolifération des CE cornéennes de rat *in vitro* [533]. L'expression des transcrits de PTP1B est similaire dans les CE confluentes et subconfluentes mais est 3 fois supérieure dans les CE non confluentes. En immunomarquage, PTP1B est localisée dans des structures vésiculaires situées sous les membranes plasmiques. Les récepteurs à l'EGF sont localisés au niveau des bordures intercellulaires mais 15 minutes après traitement à l'EGF ils se retrouvent majoritairement au niveau cytoplasmique. Le pic de phosphorylation de la Tyr992 de l'EGFR a lieu 5 minutes après la stimulation des CE avec de l'EGF et redescend rapidement à son niveau basal en 30 minutes. Dans des CE prétraitées avec un inhibiteur de l'activité de PTP1B (CinnGEL 2Me), le pic de phosphorylation de Tyr992 se produit 2 minutes après l'ajout d'EGF et reste à un niveau élevé 60 minutes après le traitement. Dix huit heures après l'ajout d'EGF, les cultures prétraitées au CinnGEL 2Me montre une augmentation de 1,7 fois du nombre de CE Ki67<sup>+</sup> comparé aux cultures contrôles. La comparaison des niveaux en ARNm et en protéines de PTP1B indique que PTP1B subit une régulation post-traductionnelle. La localisation de PTP1B dans des vésicules sous la membrane plasmique et l'internalisation de EGFR après stimulation par l'EGF suggèrent qu'il existe une interaction entre les deux protéines et que PTP1B régule l'activité du récepteur en agissant sur Tyr992. **PTP1B joue un rôle dans la régulation négative de la signalisation induite par l'EGF et aide à supprimer l'entrée dans le cycle cellulaire.**

La même équipe a étudié le rôle de PTP1B dans la régulation de l'entrée en prolifération des CE humaines, *ex vivo* et *in vitro*, en réponse à une stimulation avec de l'EGF chez des donneurs jeunes (<30 ans ; n=8 ; âge moyen : 9,1±8,5 ans ; 0-18 ans) et âgés (>50 ans ; n=10 ; âge moyen : 66,3±7,5 ans ; 55-78 ans) [534]. Des immunomarquages ont permis de localiser PTP1B dans le cytoplasme des CE en culture et sur cornée *ex vivo* montées à plat (**Figure 39**).

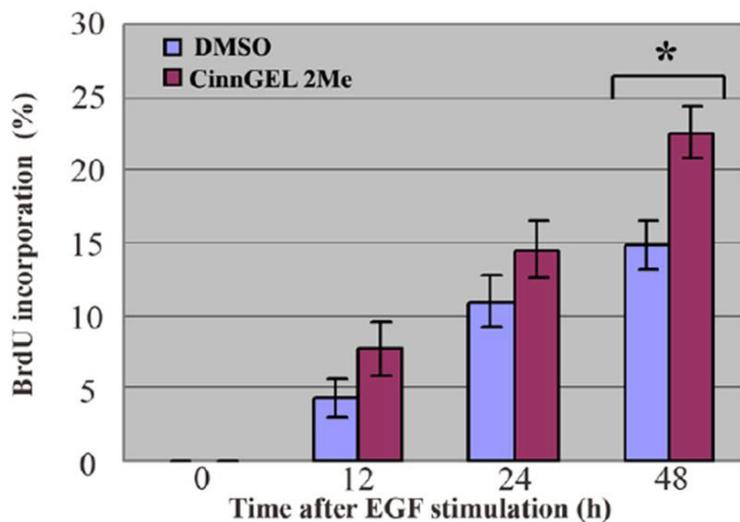


**Figure 39 : Localisation de PTP1B dans des CE cornéennes humaines *ex vivo* et *in vitro*.**

(A) Representative image of PTP1B (green) staining in the endothelium of a cornea obtained from a 59-year-old donor. PTP1B is localized in a punctate pattern mainly within the cytoplasm. Some punctate staining is also visible in nuclei (red). (B) PTP1B staining in subconfluent cells cultured from a 55-year-old donor results in a similar punctate pattern in the cytoplasm and nucleus. Image is an overlay from both the FITC and rhodamine channels. green: PTP1B. red: Propidium iodide. Original magnification: 40X.

(D'après Ishino et al., 2008 [534])

La présence de EGFR et de PTP1B dans les CE a été confirmée par Western Blot. Aucune différence significative n'était observée dans l'expression du récepteur à l'EGF en fonction de l'âge alors que l'expression de PTP1B était significativement supérieure dans les CE de donneurs âgés. Une pré-incubation des CE avec l'inhibiteur du PTP (CinnGEL 2Me) induisait une augmentation significative du nombre de CE incorporant le BrdU 48 heures après stimulation avec le FC (**Figure 40**).



**Figure 40 : Effet de l'inhibiteur à PTP1B sur l'entrée du cycle cellulaire des CE en réponse à une stimulation à l'EGF.**

Subconfluent cells were pre-incubated for 1 h in medium containing either DMSO alone or 25  $\mu$ M of the PTP1B inhibitor, CinnGEL 2Me, diluted in DMSO. Following this pre-incubation step, 25 ng/ml EGF was added to all cultures. Samples were taken for BrdU staining at 0, 12, 24, or 48 h after EGF addition.

Bar graph shows the average percent of BrdU-positive HCEC at each time point. Bars represent SEM. The asterisk indicates statistical significance at  $p=0.019$ . (D'après Ishino et al., 2008 [534])

Les immunomarquages précisent que PTP1B est localisé dans le réticulum endoplasmique, site connu d'interaction EGFR/PTP1B après stimulation par l'EGF. **L'expression importante de PTP1B mais pas de l'EGFR dans les CE de donneurs âgés suggère que la baisse de l'activité proliférative en réponse à l'EGF est due, au moins en partie, à l'augmentation de l'activité de PTP1B.** Le fait que l'inhibition de PTP1B augmente le nombre relatif de CE entrant en phase S du cycle indique que PTP1B est un régulateur négatif de la prolifération cellulaire induit par l'EGF. Il pourrait être possible d'augmenter les capacités prolifératives des CE cornéennes, notamment chez les personnes âgés, en inhibant l'activité de cette importante protéine tyrosine phosphatase.

La **Figure 41** schématise l'action de PTP1B sur la régulation du cycle cellulaire des CE cornéennes après stimulation avec de l'EGF.

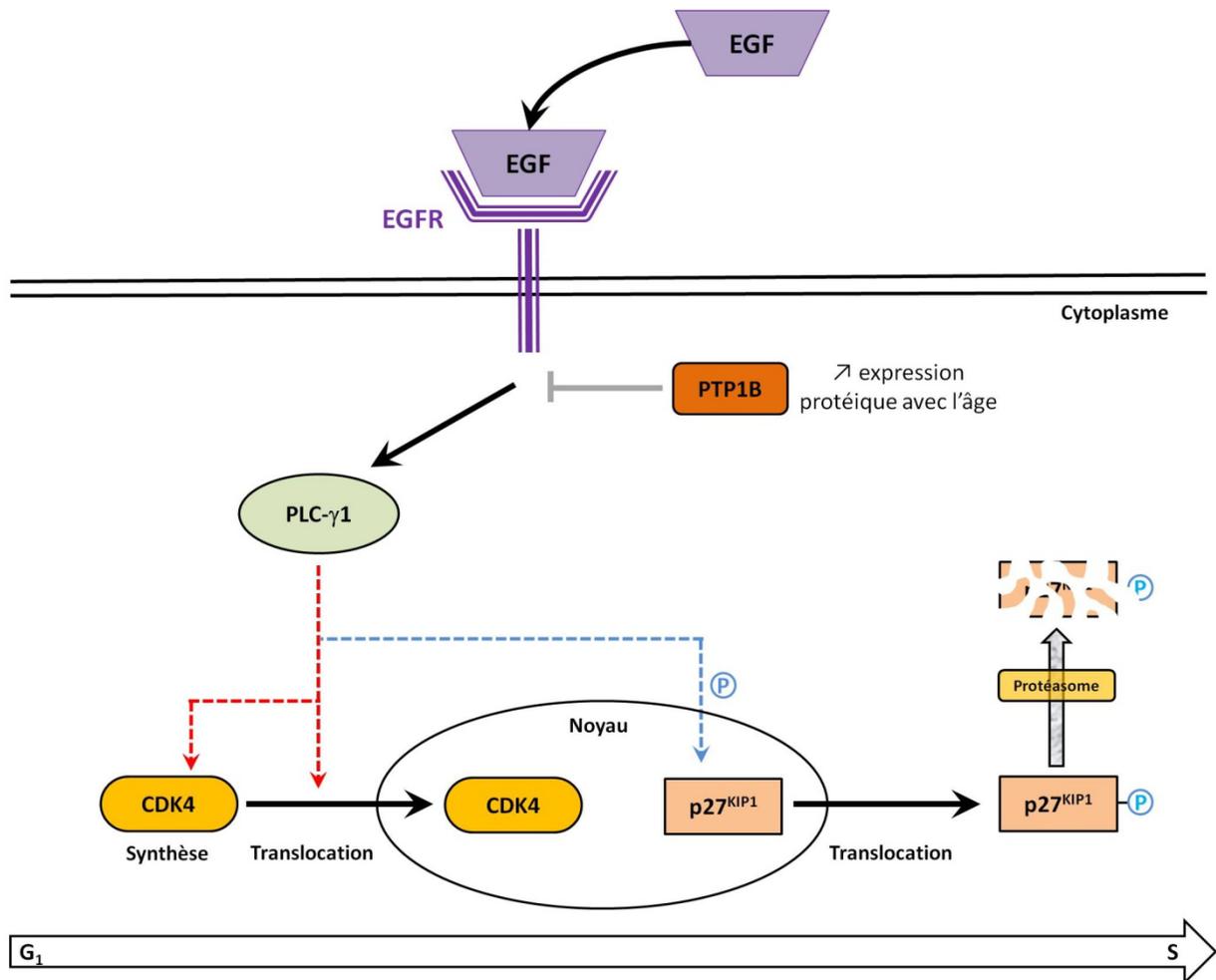


Figure 41 : Action de PTP1B sur la régulation du cycle cellulaire des cellules endothéliales cornéennes après stimulation avec du FGF-2.

### III.3.3. TGF- $\beta$ 2 inhibe l'entrée en phase S

La cytokine TGF- $\beta$  est un médiateur potentiel de l'arrêt en phase G<sub>1</sub> des CE. Il a été démontré que cette cytokine inhibe la transition G<sub>1</sub>/S du cycle cellulaire dans certains types cellulaires [167] ainsi que la prolifération *in vitro* des cellules épithéliales cristalliniennes

#### A RETENIR



Le TGF- $\beta$ 1 et - $\beta$ 2 sont capables de supprimer l'entrée en phase S et la synthèse d'ADN dans les CE cornéennes de rat. Il est particulièrement important de noter que le TGF- $\beta$ 2 activé dans l'humeur aqueuse supprime également l'entrée en phase S, indiquant que cette cytokine pourrait contribuer à l'arrêt en phase G<sub>1</sub> de l'endothélium cornéen *in vivo*.

Le TGF- $\beta$ 2 inhibe la transition G<sub>1</sub>/S des CE en bloquant la phosphorylation de p27<sup>KIP1</sup> et donc sa dégradation maintenant ainsi une forte concentration d'inhibiteur du cycle cellulaire.

Le TGF- $\beta$ 2 régule positivement l'expression de COX-2 et donc la production de PGE-2 et d'AMPc, conduisant à l'inhibition de la voie de signalisation PI3K/AKT activée par le FGF-2.

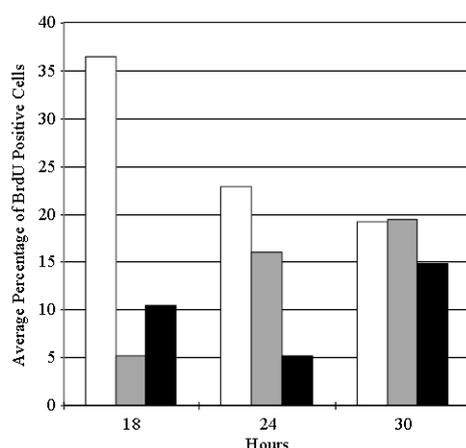


[535]. Les transcrits et la protéine du TGF- $\beta$ 1 sont exprimés dans les cultures de CE cornéennes humaines, il est donc possible que cette cytokine exerce son action de manière autocrine ou paracrine. La forme latente du TGF- $\beta$ 2, un puissant facteur immunosuppresseur, est présent en relative haute concentration dans l'humeur aqueuse [506, 536]. Bien que le mécanisme d'activation du TGF- $\beta$ 2 soit encore mal compris dans l'humeur aqueuse, il est connu que de nombreux mécanismes peuvent activer cette cytokine comme les traitements dénaturants, les radiations ionisantes ou une interaction avec la thrombospondine<sup>§</sup> [541-543]. Les CE doivent être capables d'activer le TGF- $\beta$  latent car des études ont démontré que des

CE bovines étaient capables de synthétiser de la thrombospondine et de l'incorporer dans leur matrice extracellulaire [544]. La fibrine, présente dans la chambre antérieure en réponse à des dommages ou à une inflammation, induit l'expression de thrombospondine [545] et l'activateur tissulaire du plasminogène [546] dans les CE bovines *in vitro*.

<sup>§</sup> La thrombospondine est une molécule d'adhésion cellulaire qui interagit *via* des domaines spécifiques avec un large éventail de composants de la matrice extracellulaire, notamment le fibrinogène, la fibrine, la fibronectine, le collagène et l'héparane sulfate protéoglycane. La thrombospondine de type 1 (TSP-1) est une protéine ubiquitaire synthétisée et sécrétée par un grand nombre de cellules d'origine épithéliale et mésenchymateuse et induit *in vitro* l'adhésion, la migration et la prolifération cellulaire. Son expression par les cellules vasculaires est régulée par les hormones et les cytokines et apparaît corrélée à des états physiopathologiques tels que la réparation tissulaire. Les niveaux de TSP-1 augmentent en réponse aux lésions et pendant le développement [537]. TSP-1 active le TGF- $\beta$  latent par interactions directes [538-540].

Joyce a suggéré dès 1997 que le TGF- $\beta$  devait être un facteur négatif *in vivo* aidant au maintien de l'arrêt en phase G<sub>1</sub> des CE. Pour que la transduction du signal ait lieu, les récepteurs de type I et les récepteurs de type II doivent être exprimés à la surface de la cellule [547, 548]. La fixation du ligand sur un récepteur de type II entraîne le recrutement du récepteur de type I et la formation d'un complexe récepteur type I-type II. La formation de ce complexe entraîne la phosphorylation du récepteur de type I par celui de type II et l'induction d'un signal intracellulaire. L'isoforme 2 du TGF- $\beta$  possède une faible affinité avec le récepteur de type II mais se lie facilement au récepteur de type III [549]. Ce dernier ne participe pas directement dans la transduction du signal mais coopère avec les récepteurs de type I et II en produisant un signal transmembranaire permettant de présenter le TGF- $\beta$ 2 au récepteur de type II. Des RT-PCR et des immunolocalisations ont révélé que les **CE humaines exprimaient les ARNm et les protéines de ces trois types de récepteurs** [550]. Des RT-PCR ont également démontré que les CE de lapin *in vitro* exprimaient ces trois types de récepteurs [551]. Ces résultats suggèrent que les CE peuvent être sensibles au TGF- $\beta$  et que cette cytokine joue un rôle dans l'arrêt de la prolifération cellulaire *in vivo*. Des études réalisées par cytométrie de flux et par marquage au BrdU ont été conduites afin de déterminer les effets du TGF- $\beta$ 1 et - $\beta$ 2 sur la progression du cycle cellulaire de culture endothéliales de lapin subconfluentes [551]. La cytométrie de flux a révélé que **les deux isoformes du TGF- $\beta$  induisaient une réduction dose-dépendante du pourcentage relatif de cellules en phase S/G<sub>2</sub> avec une augmentation concomitante de celles en phase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>**. L'étude réalisée par marquage au BrdU a démontré que les deux isoformes supprimaient l'entrée en phase S (**Figure 42**). Ces résultats indiquent donc que **les deux isoformes du TGF- $\beta$  inhibent la transition G<sub>1</sub>/S du cycle et que le TGF- $\beta$  est en partie responsable de l'arrêt des CE en phase G<sub>1</sub> *in vivo***.

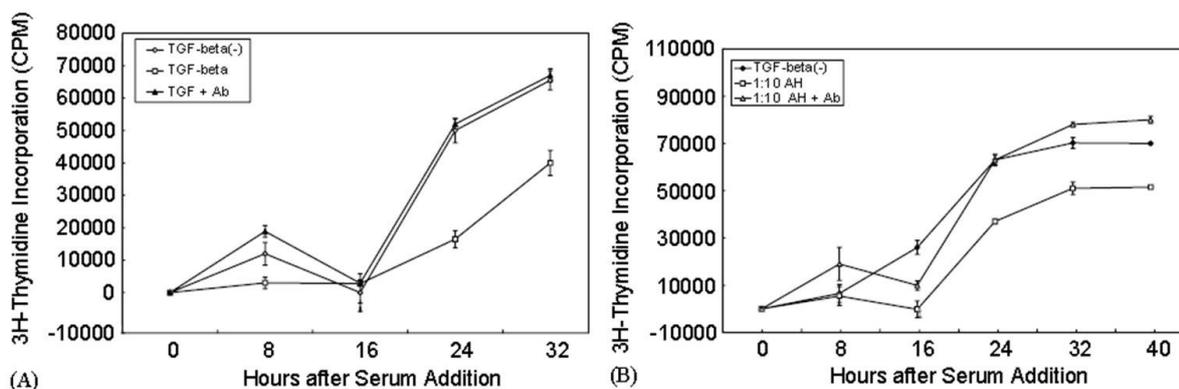


**Figure 42 : Effet du TGF- $\beta$ 1 et - $\beta$ 2 sur l'incorporation de BrdU par les CE cornéennes de lapin.**

Subconfluent, serum-starved cells were maintained in the presence of BrdU and incubated in medium containing 10% FBS plus 25 ng/ml FGF (white bars), medium containing FBS plus FGF and supplemented with either 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 (gray bars) or TGF- $\beta$ 2 (black bars). After 18, 24, and 30 h of incubation cells were immunostained for BrdU, counterstained with propidium iodide, and counted. Results are expressed as the average percent of BrdU positive cells in at least two separate experiments.

(D'après Harris DL and Joyce NC, 1999 [551])

Les effets du TGF- $\beta$ 2 exogène par rapport au TGF- $\beta$ 2 endogène présent en forte concentration dans l'humeur aqueuse a été étudié sur culture de CE de rat par mesure de l'incorporation de la thymidine tritiée [398]. **Le TGF- $\beta$ 2 supprime l'entrée en phase S (Figure 43.A).** Dans les CE contrôles, incubées avec 10% de SVF, l'incorporation de thymidine tritiée commence après 16 heures. L'addition de 5 ng/mL de TGF- $\beta$ 2 en présence de SVF diminue l'incorporation de la thymidine sans l'inhiber totalement. La spécificité de la réponse au TGF- $\beta$ 2 exogène a été démontrée par l'utilisation d'un anticorps anti TGF- $\beta$ 2 neutralisant. Des résultats similaires étaient obtenus avec l'humeur aqueuse de rat (Figure 43.B). L'humeur aqueuse était congelée-décongelée plusieurs fois pour activer le TGF- $\beta$ 2 latent puis diluée au 1/10. Ses effets étaient similaires au TGF- $\beta$ 2 exogène.



**Figure 43 : Effets du TGF- $\beta$ 2 exogène (A) et du TGF- $\beta$ 2 de l'humeur aqueuse (B) sur l'entrée en phase S des CE cornéennes de rat.**

In (A), subconfluent cells incubated in 10% FBS alone [TGF- $\beta$  (-)] incorporated tritiated thymidine beginning around 16 h after serum addition and incorporation peaked after about 32 h. Thymidine incorporation, expressed in counts per minute (CPM), was suppressed upon the addition of 5 ng/ml exogenous TGF- $\beta$  [TGF- $\beta$ ], but suppression was reversed when TGF- $\beta$  was incubated with neutralizing antibody prior to addition to the cultures [TGF+Ab]. In (B), rat aqueous humor diluted 1:10 [1:10 AH] suppressed thymidine incorporation compared to positive controls [TGF- $\beta$  (-)], but the suppression was reversed when the diluted aqueous humor was pre-incubated with TGF- $\beta$ 2 neutralizing antibody [1:10 AH+Ab].

(D'après Chen et al., 1999 [398])

**L'ensemble de ces résultats indiquent que le TGF- $\beta$ 1 et - $\beta$ 2 sont capables de supprimer l'entrée en phase S et la synthèse d'ADN dans les CE cornéennes de rat. Il est particulièrement important de noter que le TGF- $\beta$ 2 activé dans l'humeur aqueuse supprime également l'entrée en phase S, indiquant que cette cytokine pourrait contribuer à l'arrêt en phase G<sub>1</sub> de l'endothélium cornéen *in vivo*.**

Les travaux réalisés par Kim et Joyce sur des cultures de CE de lapin ont confirmé le rôle du TGF- $\beta$ 2 dans l'inhibition de la prolifération de l'endothélium cornéen [504, 505]. Il a été démontré que **la forme phosphorylée de p27<sup>KIP1</sup> était localisée dans le noyau des CE proliférantes.** Cette forme n'était pas détectée dans les cellules traitées au TGF- $\beta$ 2. La

cytokine induisait une baisse d'expression de CDK4 et prévenait la phosphorylation de p27<sup>KIP1</sup> qui est nécessaire à son export nucléaire afin d'être dégradé par la voie de l'ubiquitine/protéasome [187, 190, 254, 552]. **Le TGF-β2 inhibe la transition G<sub>1</sub>/S des CE en bloquant la phosphorylation de p27<sup>KIP1</sup> et donc sa dégradation maintenant ainsi une forte concentration d'inhibiteur du cycle cellulaire.**

Une étude réalisée sur des CE de rat en culture a mis en évidence que la réponse au TGF-β2 est dépendante de la concentration en SVF dans le milieu [553]. En absence de TGF-β2, une augmentation linéaire de l'incorporation de thymidine tritiée est constatée 16 heures après l'ajout de SVF. Le SVF induit la synthèse d'ADN de manière dose dépendante à des concentrations allant de 0,5 à 10% (**Figure 44.A**). L'addition de TGF-β2 à des cultures supplémentées avec 10% de SVF inhibe la prolifération de façon dose dépendante. L'amplitude de croissance est diminuée et le temps de passage de la phase G<sub>1</sub> est prolongé à 24 heures (**Figure 44.B**). Dans des CE cultivées avec 1% de sérum, le TGF-β2 (5 ng/mL) retarde l'entrée en phase S sans supprimer le taux de croissance (**Figure 44.C**). Dans des cultures sans SVF, la cytokine induit une croissance cellulaire à un niveau comparable à celle observée dans des cultures supplémentées avec 0,5% de SVF, c'est-à-dire faible (**Figure 44.D**). **L'ensemble de ces résultats montre que la réponse des CE au TGF-β2 exogène dépend de la concentration du SVF dans le milieu** et suggère qu'*in vivo* l'apport de facteurs de croissances sériques à travers une barrière hémato-oculaire altérée pourrait influencer la croissance des CE en modifiant leurs réponses au TGF-β2 de l'humeur aqueuse.

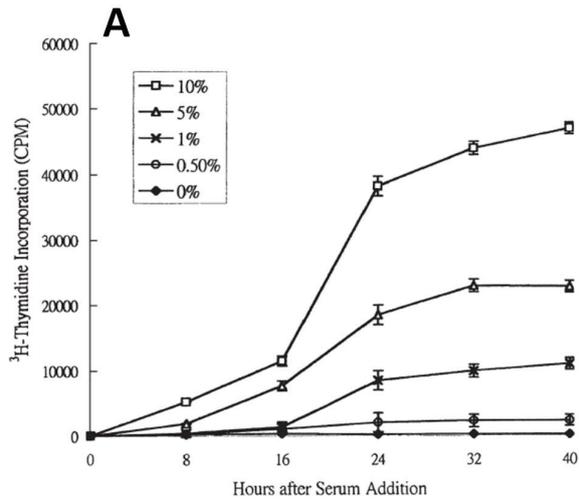


FIG. 1. The kinetics of S-phase entry of rat CE cells by  $[^3\text{H}]$ thymidine bioassay. Rat CE cells were cultured in medium containing 0% ( $\blacklozenge$ ), 0.5% ( $\circ$ ), 1% ( $\times$ ), 5% ( $\triangle$ ) and 10% ( $\square$ ) FBS. Values are the mean  $\pm$  S.E.M of three separate experiments conducted in quadruplicate.

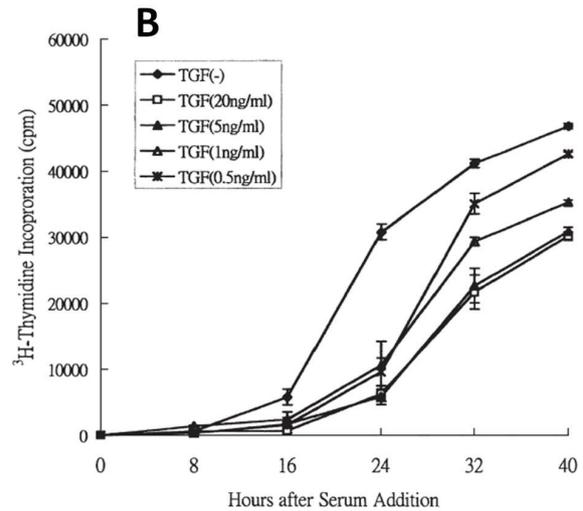


FIG. 2. TGF-2 dose-dependent suppression of  $[^3\text{H}]$ thymidine incorporation in rat CE cells. Rat CE cells were cultured in medium containing 10% FBS alone ( $\blacklozenge$ ) and in the same medium supplemented with 0.5  $\text{ng ml}^{-1}$  of TGF- $\beta$ 2 ( $\times$ ), 1  $\text{ng ml}^{-1}$  of TGF- $\beta$ 2 ( $\triangle$ ), 5  $\text{ng ml}^{-1}$  of TGF- $\beta$ 2 ( $\blacktriangle$ ) and 20  $\text{ng ml}^{-1}$  of TGF- $\beta$ 2 ( $\square$ ). Values for  $[^3\text{H}]$ thymidine are the mean  $\pm$  S.E.M of three separate experiments conducted in quadruplicate.

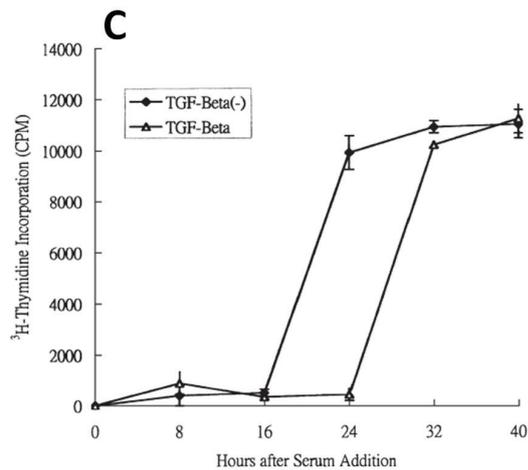


FIG. 3. Kinetics of  $[^3\text{H}]$ Thymidine incorporation of rat CE cells were altered upon addition of TGF- $\beta$ 2 to 1% serum, as determined by  $[^3\text{H}]$ thymidine bioassay. Rat CE cells were cultured in medium containing 1% FBS alone ( $\blacklozenge$ ) and in the same medium supplemented with 5  $\text{ng ml}^{-1}$  TGF- $\beta$ 2 ( $\triangle$ ). Values are the mean  $\pm$  S.E.M of three separate experiments conducted in quadruplicate.

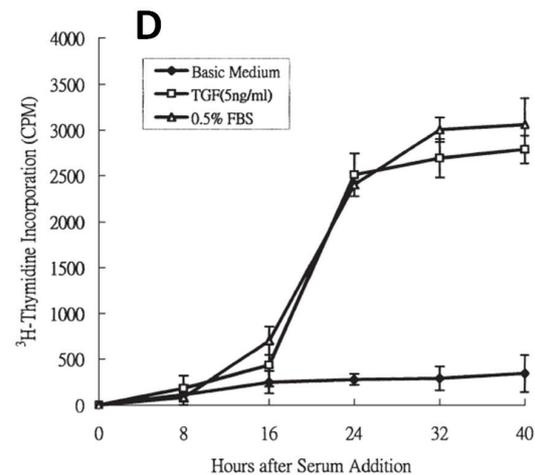


FIG. 4. The kinetics of S-phase entry of rat CE cells promoted with TGF- $\beta$ 2, as determined by  $[^3\text{H}]$ thymidine bioassay. Rat CE cells were cultured in medium containing no FBS ( $\blacklozenge$ ) and in the same medium supplemented with 5  $\text{ng ml}^{-1}$  TGF- $\beta$ 2 ( $\square$ ) or 0.5% FBS ( $\triangle$ ). Values are the mean  $\pm$  S.E.M of three separate experiments conducted in quadruplicate.

#### Figure 44 : Effets différentiels du TGF- $\beta$ 2 sur la proliférations des CE de rat *in vitro*.

(A) Kinetics of S-phase entry of rat endothelial cells by  $[^3\text{H}]$ thymidine bioassay (B) TGF- $\beta$ 2 dose-dependent suppression of  $[^3\text{H}]$ thymidine incorporation (G) Kinetics of  $[^3\text{H}]$ thymidine incorporation of rat endothelial cells were altered upon addition of TGF- $\beta$ 2 to 1% serum as determined by  $[^3\text{H}]$ thymidine bioassay (D) Kinetics of S-phase entry of rat endothelial cells promoted with TGF- $\beta$ 2 as determined by  $[^3\text{H}]$ thymidine bioassay.

(D'après Chen KH et al., 2002 [553])

**Le FGF-2 et le TGF- $\beta$ 2 sont tous les deux présents dans l'humeur aqueuse et ces deux cytokines, respectivement, active ou inhibe la prolifération cellulaire.** Les mécanismes intracellulaires par lesquels le TGF- $\beta$ 2 inhibe la réponse mitogénique induite par le FGF-2 sont encore mal connus. Lu a montré que le TGF- $\beta$ 2 et le FGF-2 ont des effets opposés sur la prolifération des CE bovines en culture et que le TGF- $\beta$ 2 pouvait outrepasser la prolifération induite par FGF-2 en augmentant l'expression de COX-2\*\* (« *cyclooxygenase-2* ») [556]. La surexpression de COX-2 réduit de façon significative la prolifération induite par FGF-2 alors que NS398, un inhibiteur spécifique à COX-2, annule l'effet du TGF- $\beta$ 2 sur la prolifération induite par FGF-2. La prostaglandine E2 (PGE-2), produit de COX-2, bloque la prolifération induite par FGF-2 [557]. Alors que FGF-2 stimule la prolifération cellulaire en activant la voie AKT, le TGF- $\beta$ 2 ainsi que PGE-2 inhibent cette voie de signalisation. De façon concomitante, l'AMPc inhibe également l'activation d'AKT par le FGF-2. La PGE-2 exogène diminue rapidement l'activation d'AKT induite par le FGF-2 et augmente le niveau intracellulaire d'AMPc dans les CE bovines conduisant à une baisse de la réponse au FGF-2 et donc de la prolifération. Le TGF- $\beta$ 2 via l'action de PGE-2 induit une baisse de la réponse proliférative induite par le FGF-2. **Le TGF- $\beta$ 2 doit réguler positivement l'expression de COX-2 et donc la production de PGE-2 et d'AMPc, conduisant à l'inhibition de la voie de signalisation PI3K/AKT activée par le FGF-2.**

La **Figure 45** résume le mode d'action du TGF- $\beta$ 2 dans l'inhibition de la prolifération des cellules endothéliales cornéennes.

---

\*\* La cyclooxygénase (COX), identifiée il y a 20 ans, est l'enzyme clé nécessaire à la conversion de l'acide arachidonique en prostanoïdes (prostaglandines, prostacyclines et thromboxanes.). Elle agit comme une dioxygénase et une peroxydase. Deux isoformes de la cyclooxygénase ont été identifiées : COX-1 et COX-2 [554]. Les "COX-1" font parties d'une famille d'enzymes constitutives de l'organisme, qui se trouvent dans une immense majorité des cellules, et impliquées dans de nombreux mécanismes. Les "COX-2" font parties d'une famille d'enzymes inductibles par de multiples facteurs pro-inflammatoires (cytokines, interférons...) [555]. Cette protéine est très conservée au cours de l'évolution : COX-2 humaine a une homologie de 86 à 89% avec la souris, le rat, le mouton, le bœuf, le cheval et le lapin. L'activité enzymatique de type "COX-2" est exprimée dans un nombre limité de type cellulaire (cellules endothéliales vasculaires, rénales et au niveau du système nerveux central).

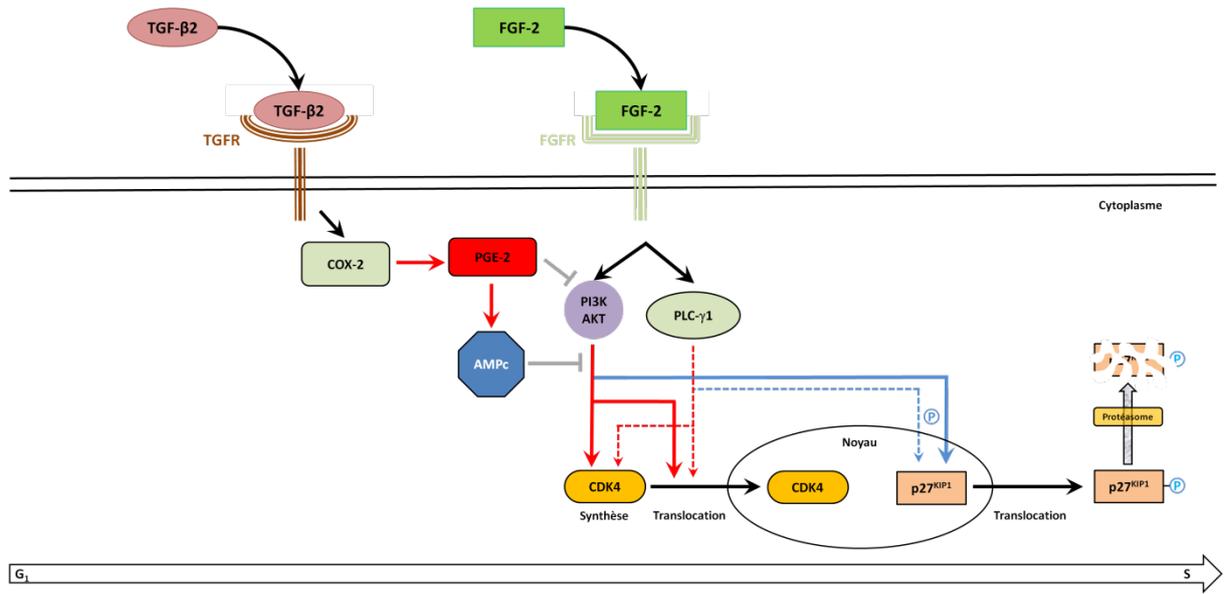


Figure 45 : Action du TGF-β2 dans l'inhibition de la prolifération des CE cornéennes.

### III.3.4. Inhibition de contact cellules/cellules

Les études classiques portant sur les cultures cellulaires monocouches ont clairement démontré que la prolifération cesse avec l'augmentation de la DCE et lorsque les cellules rentrent en contact les une avec les autres. L'inhibition de la prolifération contact-dépendant

#### A RETENIR



La formation de contacts intercellulaires forts est un facteur antiprolifératif significatif et est responsable, en grande partie, du total arrêt de la prolifération des cellules endothéliales cornéennes *in vivo*.



se produit lorsque « une forte densité cellulaire induit un arrêt du cycle dans lequel l'ADN génomique ne se réplique plus même en présence de facteurs de croissance » [558]. Des études ont démontré que la DCE n'était pas le facteur critique de la régulation de la prolifération de la monocouche ; cependant, le contact cellulaire médié par les interactions protéines-protéines était extrêmement important

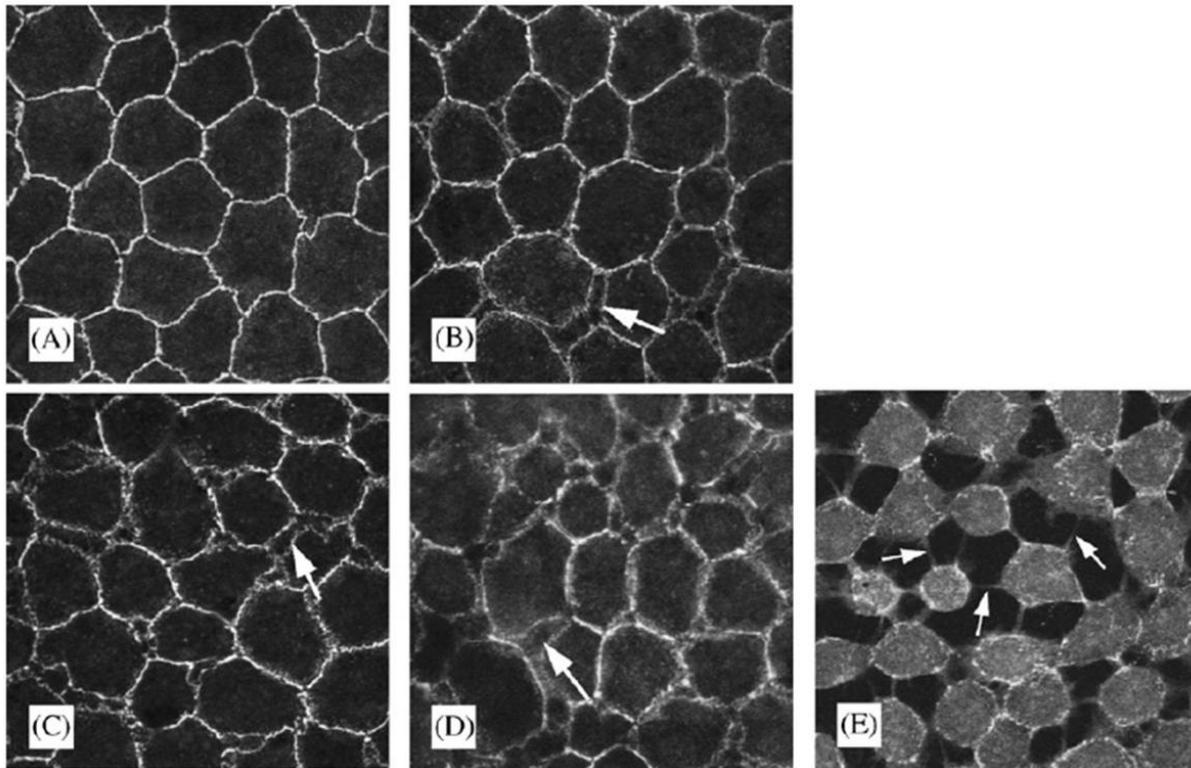
[559]. La prolifération est supprimée de façon réversible et de manière dose dépendante lorsqu'une fraction enrichie de membrane de CE vasculaires ou des vésicules membranaires dérivées de cellules apicales de surface sont ajoutées à des cultures de faible densité de cellules endothéliales vasculaires [560]. Cette inhibition a lieu même en présence de FC.

Depuis qu'il est connu que l'endothélium cornéen mature *in vivo* forme une monocouche non proliférative, l'hypothèse que les contacts intercellulaires puissent être responsables, au moins en partie, du maintien de cette non-réplication a été formulée. Les cellules mésenchymateuses situées à la périphérie de la cornée présomptive forment la monocouche endothéliale par migration et prolifération entre le stroma primaire et l'épithélium cristallinien. Si le contact cellulaire induit l'arrêt du cycle, il devrait y avoir une corrélation positive entre la formation des contacts cellulaires matures et l'arrêt de la prolifération. Afin de tester cette hypothèse, Joyce a observé la cinétique relative d'incorporation du BrdU dans la formation de la monocouche endothéliale cornéenne de rats nouveaux nés [561]. Les rats nouveaux nés sont considérés comme un excellent modèle puisque l'endothélium cornéen de rat n'est pas mature à la naissance [324, 561, 562]. Le nombre relatif de CE incorporant le BrdU diminue graduellement de 12 à 0% de la naissance au 13<sup>ème</sup> jour postnatal. Après ce délai, aucun marquage n'est observé. La stabilité de la monocouche est déterminée par l'immunolocalisation de protéines associées à la membrane connues pour être présentes dans des domaines spécifiques dans l'endothélium mature. Ces protéines incluaient ZO-1 (protéine associée aux jonctions serrées localisées sur les

membranes latérales), les pompes  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (localisées sur les membranes basolatérales) et la  $\beta 3$ -intégrine (localisées sur les membranes basales). Quatorze jours après la naissance, l'immunomarquage pour ces protéines est localisé sur l'ensemble de la membrane plasmique. Entre le 14<sup>ème</sup> et le 21<sup>ème</sup> jour, la localisation de chaque protéine commence à se restreindre aux domaines membranaires observés dans les endothéliums matures. De plus, l'immunomarquage du CKI p27<sup>KIP1</sup> est détecté dans l'endothélium un jour après la naissance alors qu'aucun marquage positif n'est observé pour p21<sup>CIP1</sup>. **La corrélation entre la diminution de la prolifération et l'augmentation de la stabilité de la monocouche suggère fortement que la formation de contacts intercellulaires est responsable, au moins en partie, à la perte de l'activité proliférative durant la formation de l'endothélium.** La diminution progressive de la prolifération au cours des deux premières semaines de vie des rats, devrait s'accompagner d'une expression des CKIs impliqués dans l'arrêt du cycle. **Sur les deux inhibiteurs testés, seul p27<sup>KIP1</sup> est exprimé après un jour postnatal, suggérant que cet inhibiteur, plutôt que p21<sup>CIP1</sup>, contribue à l'arrêt du cycle cellulaire au cours de la formation de l'endothélium.**

La prolifération, en présence de FC, des CE proches d'une lésion endothéliale alors que les plus éloignées n'ont aucune activité plaide également fortement en faveur d'un rôle des contacts intercellulaires dans le maintien de l'état quiescent. Le calcium est nécessaire au maintien de l'intégrité des jonctions cellulaires. Des études ont été réalisées sur des monocouches confluentes de différents types de cellules épithéliales traitées avec le chélateur de calcium EGTA (« *Ethylene Glycol Tetraacetic Acid* ») [563] ou par culture des cellules avec un milieu pauvre en calcium [564] permettant le relâchement des contacts intercellulaires. Plusieurs protéines associées à l'adhésion sont sensibles au calcium comme les cadhérines (protéines des jonctions d'adhérence) [565, 566], les occludines (protéines des jonctions serrées) [567], ZO-1 (protéines associées aux jonctions serrées) [568] et la connexine-43 (protéine gap-jonction) [569]. Plusieurs études anciennes [570-572] ont démontré que l'exposition de l'endothélium cornéen à un milieu dépourvu de calcium induisait la disruption des jonctions apicales, l'augmentation de la perfusion transendothéliale et un œdème de cornée. Ces effets sont réversibles en additionnant du calcium dans le milieu [570, 572] ou en exposant les CE à des ionophores qui libèrent le calcium intracellulaire [572]. Senoo et Joyce ont testé l'effet de l'EDTA, un chélateur de calcium/magnésium, additionné à des FC sur la prolifération des CE de cornées humaines (n=21 ; âge moyen : 65,1 ans ; 52-75 ans) organocultivées à 37°C [394]. La cornée prétraitée pendant 60 minutes avec

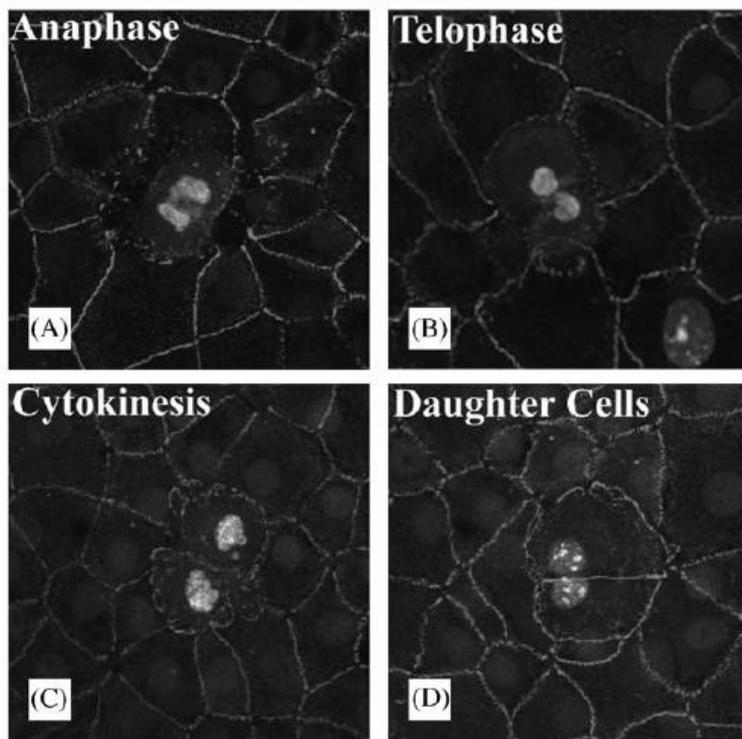
de l'EDTA sur sa face endothéliale, incubée pendant 24, 48, 72 ou 96 heures dans un milieu contenant 10% de SVF, 10 ng/mL d'EGF et 20 ng/mL de FGF est immunomarcqué pour Ki67. L'EDTA rompt les contacts intercellulaires de manière dose et temps dépendant (**Figure 46**). L'endothélium incubé dans le milieu mitogénique pendant 108 heures sans traitement à l'EDTA reste Ki67 négatif alors que le traitement à l'EDTA induit une prolifération de 16 à 18% des CE. L'analyse semi-quantitative du marquage de Ki67 indique que les CE entrent en mitose 48 heures après le traitement à l'EDTA. Le double marquage Ki67/ZO-1 objective la présence de figures mitotiques et la formation de cellules filles (**Figure 47**).



**Figure 46 : L'EDTA rompt les contacts intercellulaires dans la monocouche endothéliale.**

Corneas from a 68 year old donor were cut in quarters and incubated in Hank's balanced salt solution, pH 7.0, alone (A) or in the presence of 0.02 (B), 0.2 (C), or 2.0 mg/ml di-sodium EDTA (D) for 30 min (B, C, D), or in 2.0 mg/ml di-sodium EDTA for 60 min (E). Corneas were then immunostained for ZO-1 to visualize cell borders. In the absence of EDTA, cell borders appeared intact. Disruption of cell-cell contacts appeared as separations between cells (arrows). In (E), thin cytoplasmic strands were retained between cells in corneas incubated in 2.0 mg/ml EDTA for 60 min. Original magnification= $\times 100$ .

(D'après Senoo et al., 2000 [394])



**Figure 47 : L'EDTA favorise la division cellulaire des CE cornéennes humaines traitées avec des mitogènes.**

Corneas from a 52 year old donor were pre-incubated in medium containing 10% FBS, 10 ng/ml EGF, and 20 ng/ml FGF, then treated for 60 min in 0.2 mg/ml di-sodium EDTA in Hank's balanced salt solution, pH 7.0, and returned to mitogen-containing medium for 48 h. The endothelium was double-stained for ZO-1 (cell borders) and Ki67 (nuclei) to visualize cell borders and actively cycling cells, respectively. Confocal images reveal the presence of cells in the later phases of mitosis, as well as the formation of daughter cells within the endothelium. Original magnification: x100. (D'après Joyce NC, 2003 [324])

Patel et Bourne ont réalisé une étude comparable sur l'effet de l'EDTA sur la prolifération des CE cornéennes humaines *in vitro* (n=13 ; 15-68 ans) en fonction de la DCE [573]. La distribution des CE n'est pas uniforme sur tout l'endothélium avec un gradient de la périphérie (DCE élevée) vers le centre (DCE moins élevée) [425]. Contrairement aux résultats obtenus par Senoo et Joyce [394] l'EDTA n'induisait pas de réponse proliférative significative *in vitro* des CE cornéennes périphériques ou centrales. Ces différences de résultats peuvent en partie être expliquées par : (1) la différence d'âge des donneurs (plus jeunes dans l'étude de Patel et Bourne) ; (2) la méthode d'étude (*ex vivo* versus *in vitro*) ; (3) le faible échantillonnage utilisé dans l'étude de Patel et Bourne (de n=2 à n=4 par expérimentation) et (4) les forts écarts types observés dans les résultats de Patel et Bourne montrant une faible reproductibilité de leurs expérimentations. Cependant le taux prolifératif était supérieur dans les CE centrales où la DCE est la plus faible donc où les contacts intercellulaires sont les plus faibles montrant donc l'importance de l'inhibition de contact dans le statut prolifératif des CE cornéennes humaines.

**Les résultats de l'ensemble de ces études montrent que la formation de contacts intercellulaires forts est un facteur antiprolifératif significatif et est responsable, en grande partie, du total arrêt de la prolifération des CE cornéennes *in vivo*.**

### III.3.5. Rôles relatifs du TGF- $\beta$ 2 et de l'inhibition de contact

Après avoir démontré l'implication du TGF- $\beta$ 2 et de l'inhibition de contact dans les mécanismes antiprolifératifs Joyce a exploré leur contribution relative à l'arrêt du cycle durant la maturation de la monocouche endothéliale en utilisant comme modèle des rats

#### A RETENIR



L'inhibition de contact est importante dans l'arrêt de la prolifération cellulaire pendant la formation de la monocouche endothéliale et dans le maintien de celle-ci dans un état non réplicatif. Parmi les CKIs étudiés, p27<sup>KIP1</sup> semble être le médiateur le plus important de l'arrêt du cycle. Le TGF- $\beta$ 2 n'apparaît pas être un facteur majeur dans le déclenchement de l'inhibition de la prolifération au cours du développement endothélial. Cependant il doit jouer une fonction dans l'endothélium mature en maintenant la monocouche dans un état de non prolifération lors de la perte des jonctions intercellulaires dues à la mort des CE liée à l'âge ou à divers traumatismes.



néonataux ainsi que des cultures cellulaires endothéliales de rats [562]. Pour vérifier si le TGF- $\beta$  jouait un rôle dans l'inhibition de la prolifération au cours de la maturation endothéliale cette équipe a déterminé à quel moment les CE exprimaient les récepteurs de type I, II et III. Les immunolocalisations de ces trois récepteurs sur des cornées de rats ayant 1, 7, 14, 21 jours et de rats adultes âgés de 3 mois mettent en évidence une expression du récepteur de type III au 10<sup>ème</sup> jour après la naissance mais aucun marquage pour les récepteurs de type I et II avant le 21<sup>ème</sup> jour. Comme nous l'avons vu précédemment, les trois types de récepteurs doivent être exprimés pour que le signal induit par le TGF- $\beta$ 2 soit transmis. La prolifération endothéliale s'arrête au 13-14<sup>ème</sup> jour après la

naissance, le fait que les trois récepteurs ne sont pas exprimés avant le 21<sup>ème</sup> jour laisse penser que le TGF- $\beta$  ne joue pas un rôle significatif dans l'inhibition de la prolifération lors de la maturation de l'endothélium cornée chez le rat.

Afin d'étudier le rôle des CKIs dans l'arrêt du cycle lors de la formation de la monocouche, cette même équipe a étudié la cinétique des ARNm et l'expression protéique de p27<sup>KIP1</sup> par RT-PCR et immunolocalisation. L'expression de p21<sup>CIP1</sup> n'était pas évaluée, car il avait été démontré ce CKI n'était pas impliqué dans l'arrêt du cycle durant la maturation de l'endothélium. **Les immunomarquages confirmaient l'expression de p27<sup>KIP1</sup> à partir du jour un postnatal et tout au long de la formation de la monocouche.** Les analyses densitométriques des résultats de RT-PCR indiquaient que le taux relatif d'ARNm de p27<sup>KIP1</sup> était à un taux constant au jour 7 et 14 postnatal puis doublait au jour 14 pour maintenir ce taux constant chez le rat adulte. Les études ont été étendues aux cultures cellulaires afin de

comparer les effets du TGF- $\beta$ 2 et des contacts intercellulaires sur le taux d'ARNm et protéique de p27<sup>KIP1</sup> ainsi que du CKI p15<sup>INK4b</sup> par technique RT-PCR et western-blot. Ce CKI avait été choisi car il est l'équivalent de p16<sup>INK4a</sup> exprimé in vivo par les CE humaines [324, 407]. Le TGF- $\beta$ 2 a un faible effet sur les taux d'ARNm et des protéines de p27<sup>KIP1</sup> ou p15<sup>INK4b</sup>. Le taux protéique de p27<sup>KIP1</sup> est largement supérieur à celui détecté pour p15<sup>INK4b</sup>. Dans les cultures confluentes, le niveau protéique de p15<sup>INK4b</sup> était très supérieur à celui observé dans les cultures non confluentes. **Le taux protéique de p27<sup>KIP1</sup> est multiplié par 20 lorsque la formation de la monocouche atteint la confluence.**

**Ces résultats indiquent que l'inhibition de contact est importante dans l'arrêt de la prolifération cellulaire pendant la formation de la monocouche endothéliale et dans le maintien de celles-ci dans un état non répliatif. Parmi les CKIs étudiés, p27<sup>KIP1</sup> semble être le médiateur le plus important de l'arrêt du cycle. D'autre part, le TGF- $\beta$ 2 n'apparaît pas être un facteur majeur dans le déclenchement de l'inhibition de la prolifération au cours du développement endothélial. Cependant il doit jouer une fonction dans l'endothélium mature en maintenant la monocouche dans un état de non prolifération lors de la perte des jonctions intercellulaire dues à la mort des CE liée à l'âge ou à divers traumatismes.**

### III.3.6. Implication de ZO-1 et ZONAB ?

Les **jonctions serrées** scellent les cellules épithéliales et endothéliales entre elles. Elles ont été longtemps considérées comme de simples barrières séparant les deux compartiments membranaires apical et basolatéral, dont la composition en protéines et lipides est différente [574]. Des études montrent que diverses protéines impliquées dans la

#### A RETENIR



ZO-1 et ZONAB régulent la transition G<sub>1</sub>/S du cycle cellulaire des cellules épithéliales par deux mécanismes : en intervenant dans la séquestration de CDK4 au niveau nucléaire d'une part et en régulant la transcription de PCNA et de la Cycline D1 d'autre part.



transduction de signaux et le trafic membranaire sont associées aux jonctions serrées. Ces dernières servent de lieu d'intégration et de transmission de signaux nécessaires à la régulation de leur assemblage et à la polarisation cellulaire, mais aussi à la **modulation de l'expression des gènes requise pour la prolifération** et la différenciation cellulaires [575-577].

Les jonctions serrées sont composées de différents types de protéines membranaires aidant à l'adhésion intercellulaire et formant la membrane de diffusion. Les protéines membranaires interagissent avec la plaque cytoplasmique possédant différents types de protéines liées au cytosquelette d'actine [578-582]. ZO-1 (*zonula occludens*), une de ces protéines cytoplasmiques, fait partie de la famille des MAGUK (*membrane-associated guanylate kinases*) qui possède plusieurs domaines PDZ (*PSD95 [postsynaptic density 95]*, *Dlg [discs large]* et *ZO-1*), un domaine SH3 et un domaine homologue à la guanylate kinase retrouvé chez les levures [583-586]. Bien que ZO-1 soit spécifiquement associé aux jonctions serrées dans les cellules épithéliales [583], la protéine a été détectée dans le noyau pendant la prolifération cellulaire [587]. ZO-1 est sous exprimée dans les cellules tumorales de rein et pendant la réparation de l'endothélium cornéen après une lésion suggérant que le niveau d'expression de la protéine est liée au statut prolifératif des cellules [588, 589]. La stabilisation de l'expression de ZO-1 dans les cellules MDCK (*Madin-Darby canine kidney*) confluentes et l'augmentation de ses niveaux d'expression avec la densité cellulaire confirment ces observations [590, 591].

Balda et Matter ont identifié le facteur de transcription à boîte Y ZONAB (*ZO-1-associated nucleic acid binding protein*) qui se lie spécifiquement au domaine SH3 de ZO-1 et régule l'expression du proto-oncogène *erbB-2* de manière « densité cellulaire dépendante » [591]. **ZO-1 agit comme un inhibiteur de ZONAB en contrôlant son accumulation dans**

**le noyau par séquestration cytoplasmique. ZONAB est impliqué dans la régulation de la prolifération et la densité cellulaire de certaines cellules épithéliales** [592]. La réduction du niveau d'expression de ZONAB réduit le taux de prolifération ainsi que la densité cellulaire alors qu'une surexpression induisait la formation d'une monocouche avec une augmentation de la densité. Une augmentation prématurée de l'expression de ZO-1 provoque une diminution du niveau de ZONAB nucléaire ainsi qu'une réduction de la prolifération et dans les monocouches matures une baisse de la densité cellulaire. Ces observations suggèrent que ZONAB et ZO-1 font partie d'une voie par laquelle les jonctions serrées peuvent réguler la prolifération et la densité des cellules **épithéliales**. Il a été démontré que ZONAB interagit avec CDK4. La diminution de ZONAB nucléaire est accompagnée d'une diminution de CDK4 nucléaire et d'une réduction de l'hyperphosphorylation de la protéine du rétinoblastome pRb. **La régulation de l'accumulation nucléaire de CDK4 est une des voies par laquelle ZONAB et ZO-1 peuvent influencer sur la prolifération cellulaire.** L'augmentation de l'expression de ZO-1 et la réduction concomitante de ZONAB provoque une diminution de la prolifération et de la densité cellulaire alors qu'une surexpression de ZONAB provoque l'effet inverse. Des expériences réalisées sur des souris ont démontré le lien de CDK4 avec le nombre de cellules dans certains tissus [593] suggérant que la régulation de CDK4 par ZONAB et ZO-1 doit être importante dans la régulation de la densité cellulaire. L'inhibition de CDK4 par p16<sup>INK4a</sup> est suffisante pour réduire la densité cellulaire dans des monocouches matures de MDCK. CDK4 est un régulateur central de la prolifération cellulaire et son activité est hautement contrôlée par différentes protéines activatrices ou inhibitrices [593-596]. **ZONAB n'affecte pas directement l'activité enzymatique de CDK4 mais contrôle son accumulation nucléaire. ZONAB est sous-exprimée dans les cellules différenciées et surexprimée pendant la prolifération induisant une accumulation de la kinase dans le noyau à différents moments.** La distribution subcellulaire de ZONAB est régulée par le niveau d'expression de ZO-1 et la densité cellulaire [591]. La surexpression de ZO-1 dans des cellules confluentes ou non induit une diminution de ZONAB nucléaire. Le niveau de ZO-1 augmente avec la densité cellulaire et devient sous-exprimé quand la prolifération est nécessaire (lors d'une réparation de lésion par exemple) **suggérant que la surexpression de ZO-1 contribue à l'arrêt du cycle dans les monocouches matures.**

**ZO-1 inhibe ZONAB par séquestration cytoplasmique : ZONAB se lie à CDK4 et la séquestration cytoplasmique de ZONAB induit une diminution de CDK4 nucléaire.** La localisation de CDK4 est une des voies de régulation de la transition G<sub>1</sub>/S par ZO-1 et

ZONAB [592]. ZONAB est un facteur de transcription, il est tentant de supposer que ZONAB peut également affecter la prolifération des cellules en régulant l'expression des gènes du cycle cellulaire. **DbpA, l'homologue humain de ZONAB canin**, est surexprimé dans les tissus cancéreux [597, 598]. Sourisseau a démontré l'implication de ZONAB dans la régulation de la progression G<sub>1</sub>/S des cellules épithéliales mammaires ainsi que dans la surexpression de PCNA (*proliferative cell nuclear antigen*), un composant essentiel dans la machinerie de répllication de l'ADN, et de la Cycline D1, un régulateur clé de la transition G<sub>1</sub>/S [599]. Une surexpression de ZONAB dans les cellules induisait une augmentation des transcrits de PCNA et de la Cycline D1 suivie par un accroissement de leurs taux protéiques. **ZO-1 et ZONAB régulent la transition G<sub>1</sub>/S du cycle cellulaire des cellules épithéliales par deux mécanismes : en intervenant dans la séquestration de CDK4 au niveau nucléaire d'une part et en régulant la transcription de PCNA et de la Cycline D1 d'autre part.**

Aucune étude d'expression de ZONAB/DbpA n'a été réalisée sur des CE cornéennes. Nous ne pouvons donc que supposer que ZO-1 et ZONAB interviennent de la même façon sur ce type cellulaire même si des études ont démontrées que l'action de ZONAB dépend du type cellulaire [599]. Des études protéiques sur ZONAB et ZO-1 sont en cours au sein de notre laboratoire afin de déterminer leurs rôles dans la régulation du cycle cellulaire des CE cornéennes humaines.

Les mécanismes supposés de régulation par ZO-1 et ZONAB du cycle cellulaire dans les cellules endothéliales sont représentés sur la **Figure 48**.

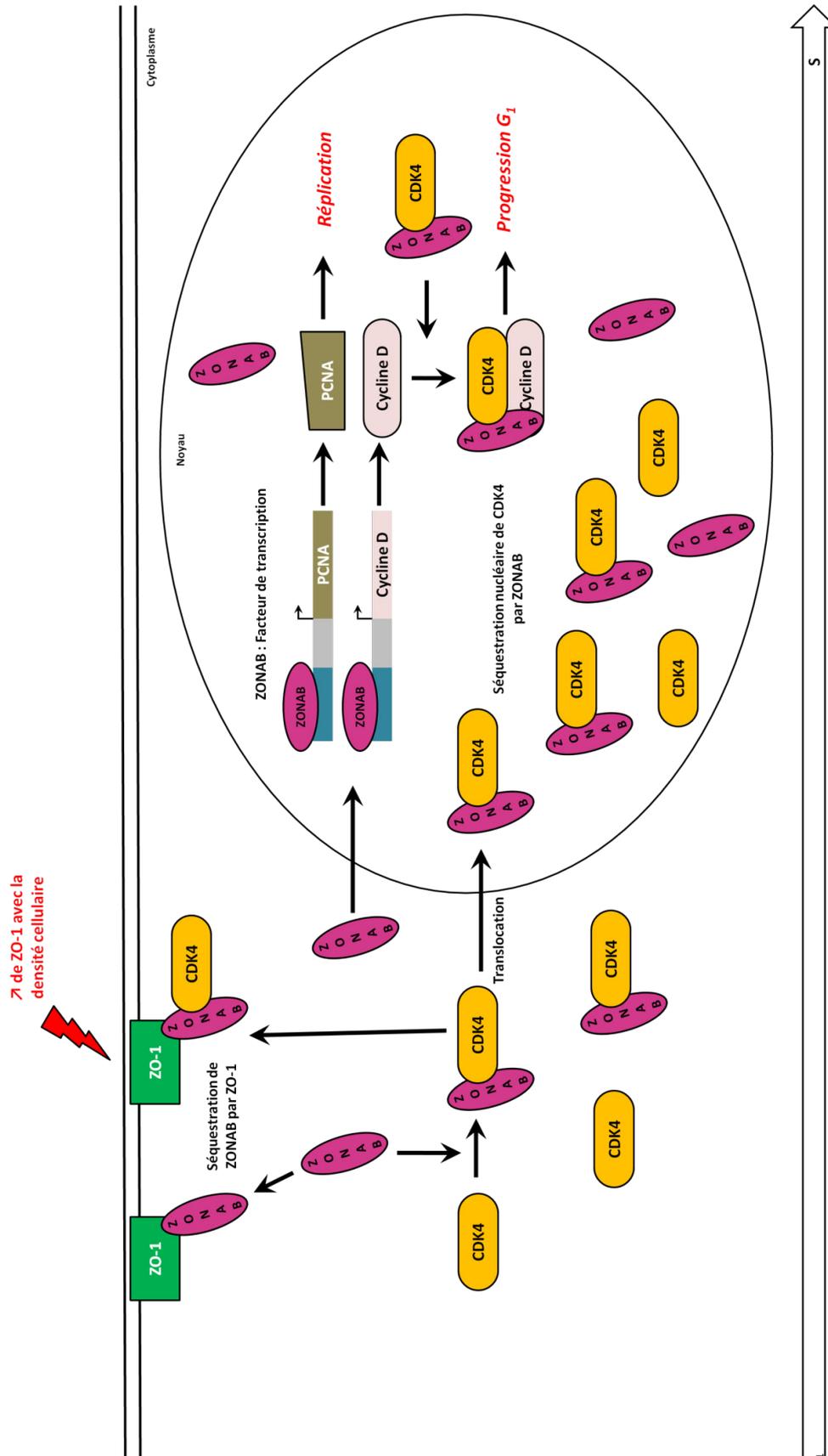


Figure 48 : Mécanismes supposés de régulation du cycle cellulaire par ZO-1 et ZONAB dans les cellules endothéliales cornéennes humaines.

### III.4. Sénescence des CE

La sénescence a été étudiée en utilisant comme modèle le vieillissement cellulaire *in vitro*. Les cellules étaient cultivées jusqu'à atteindre une sénescence répllicative, moment où les cellules ne peuvent plus proliférer même en présence de facteurs mitogéniques. Des observations de ces cellules ont démontrés des caractéristiques morphologiques spécifiques de la scénescence : un élargissement cellulaire [600] ; une augmentation de la vacuolisation [601, 602] ainsi que la présence de granules de lipofuscine [603]. Les cellules présentent également des modifications prolifératives comme : la présence de noyaux multiples [600] et/ou une quantité d'ADN supérieure à 2N [604] ; une augmentation du temps de doublement de population [605] ; une diminution de réponse aux mitogènes [606, 607] ; une diminution de leur capacité à réparer l'ADN endommagé [608, 609] ; une diminution de la longueur des télomères [610] ; une diminution de l'incorporation de thymidine tritiée [605, 611] ; une perte de méthylation de cytosine [612] ; une augmentation de l'expression protéique de p53 [613, 614] et une suppression de l'expression des gènes régulateurs de la transition G<sub>1</sub>/S [279, 615].

#### III.4.1. Caractéristiques

Certaines de ces caractéristiques liées à l'âge ont été observées dans les CE cornéennes. L'observation microscopique de grandes cellules multi-nucléées dans l'endothélium cornéen après réparation des plaies suggère que la guérison de l'endothélium se produit par coalescence des cellules plutôt que par division cellulaire [616-618]. Une autre explication est que certaines cellules de la population endothéliale deviennent sénescents et subissent une division amitotique dans laquelle l'ADN est dupliqué mais les CE ne complètent pas la cytotérièse produisant les deux cellules filles [324]. Des études sur les mécanismes de réparation de l'endothélium lésé de chat ont révélé un petit nombre de mitoses ainsi qu'une population de CE multi-nucléées qui suit la guérison des lésions, conduisant à la conclusion que la réparation endothéliale de chat se produit à la fois par division mitotique et amitotique [619, 620]. Une série d'études réalisées par Ikebe *et al.* démontre une augmentation liée à l'âge du nombre de CE polyploïdes contenant une quantité d'ADN supérieure à 4N et des CE multi-nucléées dans des endothéliums cornéens humains sains [621-623]. Une augmentation similaire de la quantité d'ADN est observée dans les CE après lésion de l'endothélium [623]. L'analyse morphologique de ces cellules indique que les CE polyploïdes et multi-nucléées ont des tailles supérieures et de formes plus irrégulières que les CE diploïdes normales. De ces études, il a été conclu que la perte de CE en raison du vieillissement ou de traumatismes est

compensée *in vivo* par l'augmentation de leur taille avec ou sans doublement de l'ADN nucléaire. Wilson et Lloyd ont reporté que les CE humaines maintenues en culture primaire pendant 47 à 78 jours étaient de grande taille, de forme irrégulière, vacuolées et parfois multi-nucléés alors que les CE maintenues pendant des périodes plus courtes (18 à 51 jours) étaient plus petits, plus uniforme et généralement mono-nucléées [465].

### III.4.2. p53

Comme nous l'avons vu, p53 inhibe la division cellulaire principalement par la voie du CKI p21<sup>CIP1</sup>, impliquant des protéines comme le complexe Cycline D/CDK4, la protéine du rétinoblastome (Rb), et la protéine E2F [624, 625]. Le CKI inhibe le complexe Cycline

D/CDK4 empêchant alors la dissociation du complexe E2F/Rb et bloquant ainsi la progression du cycle de la phase G<sub>1</sub> vers la phase S. p53 ne régule pas seulement la division cellulaire au cours du processus normal de vieillissement et de sénescence, mais est aussi impliqué dans les réponses liées aux dommages de l'ADN [285, 626] et au raccourcissement des télomères [439].

#### A RETENIR



p53 est exprimée aussi bien dans les CE de donneurs jeunes que plus âgées et est surexprimée dans les CE centrales par rapport aux cellules périphériques. L'ensemble de ces résultats démontrent que p53 est impliquée dans la sénescence réplivative des CE mais n'est pas un acteur majeur de la sénescence liée à l'âge observée dans ce type cellulaire.

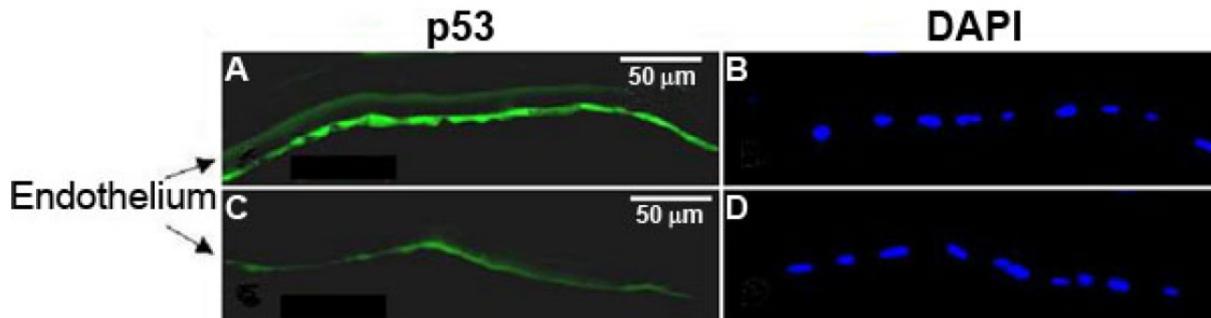


Whikehart *et al.* ont recherché s'il existait une corrélation entre la longueur des télomères et

le niveau d'expression protéique de p53 liée à l'âge dans des CE cornéennes bovines *in vitro* [452]. Il est connu que certains gènes régulateurs du cycle, comme p53 et p73 [627, 628], sont situés à proximité des télomères et que leur expression peut être influencée par la longueur de ces derniers [614, 626, 629]. Les résultats indiquent une relation inverse entre la longueur des télomères (qui raccourcissent) et l'expression protéique de p53 (qui augmente) avec le vieillissement cellulaire dans les CE cornéennes bovines *in vitro* ce qui peut expliquer, en partie, la sénescence réplivative de ces CE. Cependant ces résultats doivent être interprétés avec précaution. En effet, d'autres études ont démontrés que les télomères des CE humaines ne raccourcissaient pas avec le vieillissement cellulaire [450, 451] (cf. § III.3.1). Ces résultats n'étant donc pas applicables à l'homme Whikehart a étudié par la suite l'implication de p53 dans la sénescence réplivative des CE humaines *ex vivo* en fonction de leur topographie centrale ou périphérique [630]. Des analyses par RT-PCR ont démontrées la présence du transcrit p53 dans la région centrale (8 mm de diamètre) et périphérique (8-12 mm de

diamètre) des CE provenant de deux cornées issues du même donneur (âge ?). La présence de la protéine p53 était confirmée par Western Blot (n=2 pour le centre et n=4 pour la périphérie ; âge ?) ainsi que par immunolocalisation sur coupe (n=1 ; âge ?) (

**Figure 49).** La protéine p53 était exprimée approximativement 1,9 fois plus dans les CE centrales que dans les CE périphériques. Ces résultats confirment le fait que **les CE périphériques possèdent un potentiel réplcatif supérieur aux CE centrales.**



**Figure 49 : Expression de p53 dans l'endothélium cornéen humain.**

**A,B:** Central cornea. **C,D:** Peripheral cornea. Fluorescence for p53 is shown in green (**A,C**) and DAPI fluorescence is shown in blue (**B,D**). DAPI stains DNA and confirms that cells were present in both central and peripheral sections. These results show stronger staining for p53 in the central endothelium compared to the peripheral endothelium. All micrographs are representative of multiple sections of the cornea. The brightness, contrast, and exposure times were not adjusted between micrographs of central and peripheral tissue.

(D'après Paull AC. et Whikehart DR., 2005 [630])

Song *et al.* ont également étudié l'implication de la protéine p53 dans la sénescence réplcative des CE en fonction de l'âge sur des cornées *ex vivo* [436]. Des immunomarquages sur coupes de cornées fraîches provenant de donneurs âgés de 18, 33, 54 et 68 ans (n=1 à chaque fois) révélaiet la présence nucléaire de la protéine dans les CE quelque soit l'âge. Des RT-PCR confirmaient la présence des transcrits p53 dans les CE de cornées âgées de 20, 30, 40, 50 et 60 ans (n=3-4 pour chaque groupe). La PCR quantitative en temps réel ne démontrait aucune différence significative (P=0,430) dans l'expression des transcrits de p53 entre des donneurs jeunes ( $\leq 30$  ans ; n=14 ; âge moyen :  $24,9 \pm 4,1$  ans ; 19-30 ans) et des donneurs plus âgés ( $\geq 50$  ans ; n=13 ; âge moyen :  $55,8 \pm 3,8$  ans ; 50-61 ans).

**La protéine p53 est exprimée aussi bien dans les CE de donneurs jeunes que plus âgées et est surexprimée dans les CE centrales par rapport aux cellules périphériques. L'ensemble de ces résultats démontrent que p53 est impliqué dans la sénescence réplcative des CE mais n'est pas un acteur majeur de la sénescence liée à l'âge observée dans ce type cellulaire.**

### III.4.3. Les CKIs : acteurs majeurs de la sénescence réplivative des CE

Les modifications liées à l'âge de la réponse proliférative décrite par Hayflick dans les années 60 pour des fibroblastes sont étonnamment similaires chez les CE cornéennes humaines de donneurs âgés. Avec l'âge, les CE *in vivo* entrent dans un état de sénescence

réplivative dans laquelle elles deviendraient de plus en plus réfractaires aux stimuli mitogéniques.

Comme nous l'avons rappelé plus haut (cf. § II.6.3), l'état de sénescence réplivative est médié, au moins en partie, par les CKI. Or, les CE *in vivo* expriment p27<sup>KIP1</sup>, p16<sup>INK4a</sup> et p21<sup>CIP1</sup> [383, 407]. Par conséquent, il est possible qu'un ou plusieurs de ces inhibiteurs soient responsables de la diminution de la réactivité à la stimulation mitogénique observée chez les donneurs âgés. Afin de comprendre les

#### A RETENIR



L'activité proliférative, *in vivo*, des CE cornéennes humaines semble être régulée à deux niveaux : l'expression de certaines protéines régulatrices du cycle cellulaire, nécessaires à la progression du cycle est extrêmement bas (Cycline A) ou faible (CDK2 et CDK4) et à l'opposé, les inhibiteurs de la progression du cycle sont fortement exprimés comme p21<sup>CIP1</sup> et p27<sup>KIP1</sup>



mécanismes de contrôle de l'inhibition des capacités prolifératives des CE, Schönthal a étudié le niveau d'expression et d'activité des protéines régulatrices connues du cycle cellulaire [631]. Des cultures primaires de CE humaines et de lapin étaient transformées avec un adénovirus contenant l'antigène SV40-large-T. L'expression et l'activité des protéines régulatrices du cycle étaient par la suite analysées. Les cellules transformées montraient une forte augmentation de l'activité des CDKs. Cette augmentation était corrélée avec l'élévation du niveau d'expression de certaines sous-unités des CDKs comme la Cycline A, et dans de moindres mesures, la Cycline D, CDK2 et CDK4. **L'expression de deux CKIs, p21<sup>CIP1</sup> et p27<sup>KIP1</sup>, dont le niveau d'expression est important dans les cellules humaines mais pas dans celles de lapin, était fortement réduite dans les cellules transformées.** L'activité proliférative, *in vivo*, des CE cornéennes humaines semble être régulée à deux niveaux : l'expression de certaines protéines régulatrices du cycle cellulaire, nécessaires à la progression du cycle est extrêmement bas (Cycline A) ou faible (CDK2 et CDK4) et à l'opposé, les inhibiteurs de la progression du cycle sont fortement exprimés comme p21<sup>CIP1</sup> et p27<sup>KIP1</sup>. En conséquence, l'activité enzymatique des CDKs n'est pas détectable. L'inhibition proliférative est réversible : la transformation des cellules avec SV40-large-T induit une augmentation de l'expression de la Cycline A, de la Cycline D, de CDK2 et de

CDK4 alors que l'expression de p21<sup>CIP1</sup> et de p27<sup>KIP1</sup> est inhibée produisant une prolifération cellulaire.

### III.4.3.1. p27<sup>KIP1</sup>

#### III.4.3.1.1 Un inhibiteur impliqué dans l'arrêt de la prolifération

Le rôle de p27<sup>KIP1</sup> a été exploré en comparant ses niveaux relatifs de protéines dans des cultures confluentes et non confluentes. Dans les CE pleinement confluentes, le taux de protéine p27<sup>KIP1</sup> est multiplié par 20 par rapport aux CE subconfluentes de rat fournissant un

**A RETENIR**

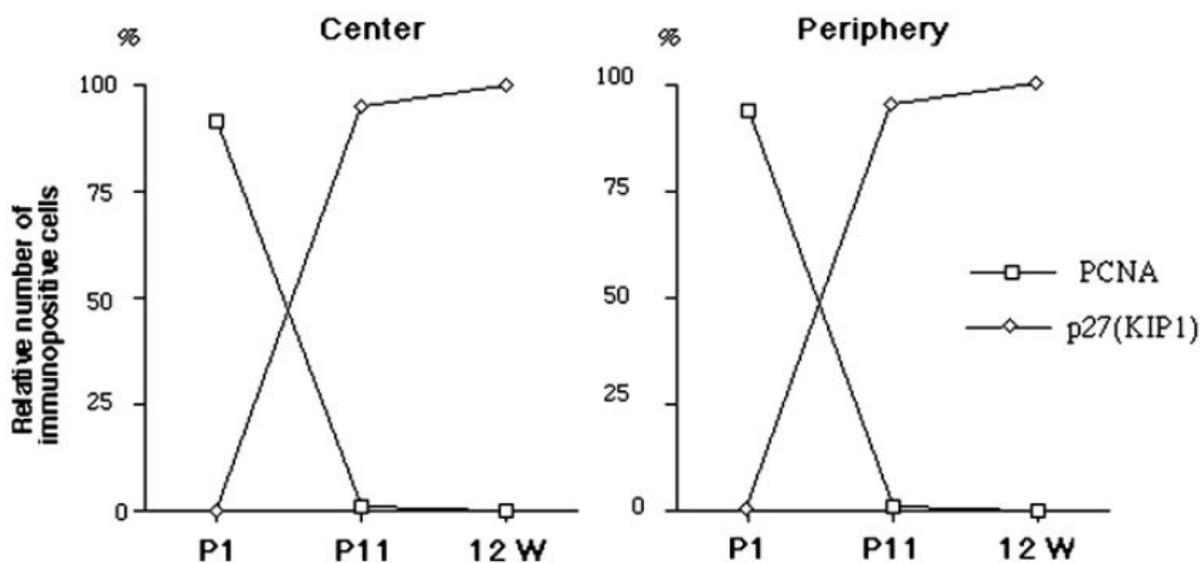
★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★

p27<sup>KIP1</sup> est un inhibiteur majeur de la prolifération des CE de rat cultivées à confluence et des CE humaines, *in vitro*, chez les donneurs très jeunes. Chez les plus âgés, il doit exister d'autres mécanismes

★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★

argument supplémentaire pour que p27<sup>KIP1</sup> intervienne dans l'arrêt du cycle cellulaire qui se produit lors de la formation de contacts intercellulaires matures [562]. Yoshida (Japon) a également démontré l'importance de p27<sup>KIP1</sup> dans la prolifération des CE lors du développement de l'endothélium cornéen chez les souris [632]. Un jour après la naissance, p27<sup>KIP1</sup> est très faiblement exprimé (immunomarquage) dans les CE *ex vivo* alors que celles-ci exprime fortement PCNA. A 11 jours et 12 semaines postnatales, p27<sup>KIP1</sup> est détecté dans de nombreuses CE alors que les CE

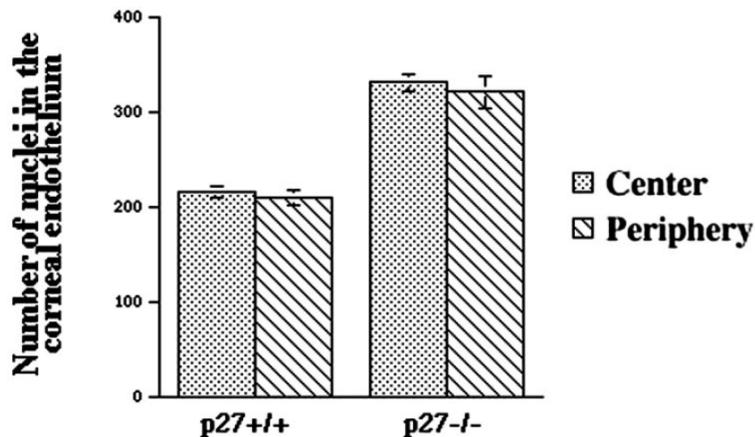
PCNA + sont rares au 11<sup>ème</sup> jour et absente à la semaine 12 (**Figure 50**).



**Figure 50 :** Nombre de CE marquées positivement pour p27<sup>KIP1</sup> et PCNA dans le centre et la périphérie des cornées de souris.

The number of cells positive for p27<sup>KIP1</sup> and PCNA relative to the number of nuclei stained with DAPI among the endothelial cells of the central (*left*) and peripheral (*right*) cornea at P1, P11, or 12 weeks (12w) after birth. (D'après Yoshida et al., 2004 [632])

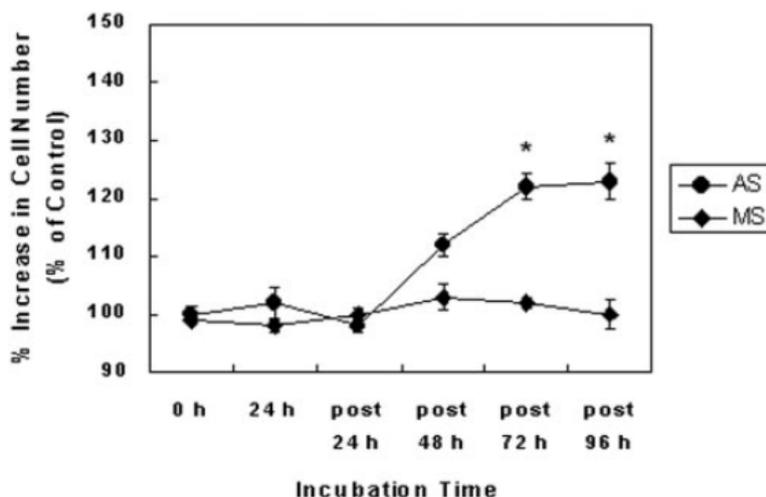
Chez des souris knockout pour le gène  $p27^{KIP1}$ , à 12 semaines postnatal, le nombre de noyaux dans l'endothélium est significativement supérieur à celui observé dans des souris sauvage que se soit au centre ou en périphérie de la cornée (**Figure 51**). Le nombre de CE marquée au BrdU est abondant chez des souris  $p27^{KIP1-/-}$  et faible chez les souris sauvages. Ces résultats suggèrent que  $p27^{KIP1}$  est impliqué dans la régulation de la prolifération de l'endothélium cornéen au cours du développement, chez le rat et la souris.



**Figure 51 : Nombre de noyaux dans l'endothélium cornéen de souris sauvages et knockout pour  $p27^{KIP1}$  âgées de 12 semaines.**

Microscopic fields of identical size (345.6 x 276.5  $\mu\text{m}$ ) were chosen at the center and periphery of the cornea. For the peripheral region, the same-sized microscopic field was chosen at a position so that the peripheral margin was 310  $\mu\text{m}$  from the iris root. Seven animals each were used for wild-type and  $p27^{KIP1-/-}$  mice.  $P < 0.0001$  for both center and peripheral cornea. (D'après Yoshida et al., 2004 [632])

L'importance de  $p27^{KIP1}$  dans l'inhibition de la prolifération a été encore démontrée par Kikuchi et Joyce pour les CE de rat par le fait que la réduction du taux de  $p27^{KIP1}$  par des oligonucléotides antisens favorise la reprise de la prolifération dans des cultures cellulaires pleinement confluentes [633]. Le niveau de protéine  $p27^{KIP1}$  est réduit après transfection avec des oligonucléotides antisens de manière temps dépendant et son marquage nucléaire diminue de façon significative. La diminution de  $p27^{KIP1}$  induit une augmentation des niveaux protéiques des Cyclines D1, E, A et B1. Toutes les cyclines sont alors localisées dans le noyau. Aucun changement n'est observé dans le niveau protéique de CDK2, CDK4,  $p21^{CIP1}$  et  $p15^{INK4b}$ . Dans les CE traitées avec les oligonucléotides antisens anti  $p27$ , le nombre de CE Ki67+ et incorporant le BrdU augmente avec le temps et se traduit par une augmentation du nombre de cellules (**Figure 52**). **Le traitement avec les oligonucléotides antisens  $p27^{KIP1}$  suivi d'une incubation avec 10% de FBS induit, *in vitro*, une diminution du niveau de  $p27^{KIP1}$  conduisant à une relance de la prolifération des cellules CE pourtant confluentes.**

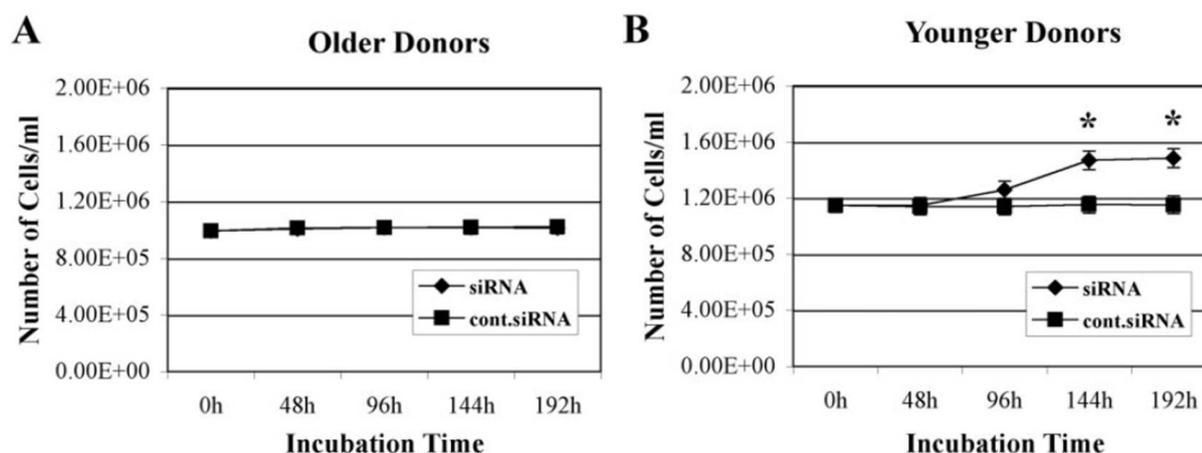


**Figure 52 : Augmentation du nombre relatif de CE de rat cultivées après traitement avec des oligonucléotides antisens p27<sup>KIP1</sup>.**

Confluent rat CEC were transfected for 0 or 24 hours with p27<sup>KIP1</sup> AS or MS oligos or with buffer containing no oligo or lipid and postincubated for 24, 48, 72, or 96 hours. DAPI-stained nuclei were counted in a masked fashion. Results are expressed as the mean ± SEM. \*P< 0.05.

(From Kikuchi et al., 2004 [633])

Kikuchi et Joyce ont également testé si p27<sup>KIP1</sup> jouait un rôle similaire dans les CE cornéennes humaines, en utilisant cette fois l'interférence ARN [634]. L'expression de la protéine p27<sup>KIP1</sup> est réduite de manière dose dépendante dans les CE humaines, cultivées jusqu'à confluence, après transfection avec des siRNA spécifiques. La réduction de p27<sup>KIP1</sup> est suffisante pour induire la prolifération (Ki67+ ou incorporant le BrdU) des CE provenant de donneurs jeunes (<30 ans ; n=5 ; âge moyen : 24,2±3,7 ; 19-28 ans). Ce traitement n'avait cependant pas d'effet sur les cellules issues de donneurs plus âgés (>60 ans ; n=6 ; âge moyen : 68,3±5,7 ; 60-75 ans) (Figure 53). Ces résultats suggèrent que p27<sup>KIP1</sup> est un inhibiteur majeur de la prolifération des CE de rat cultivées à confluence et des CE humaines, *in vitro*, chez les donneurs très jeunes. Chez les plus âgés, il doit exister d'autres mécanismes.



**Figure 53 : Nombre de cellules dans des cultures confluentes de CE humaines traitées avec un siRNA spécifique à p27<sup>KIP1</sup>.**

Confluent human corneal endothelial cells, cultured from five young (19, 22, 25, 27, and 28 years old) and six older donors (60, 64, 67, 72, 72, and 75 years old), were transfected for 48 hours with p27<sup>KIP1</sup> siRNA or nonsilencing siRNA (cont.), transferred to fresh culture medium, and counted at 0, 48, 96, 144, or 192 hours after incubation. No change from control levels was observed at any time point tested in HCECs of older donors. Results are expressed as the mean ± SD. \*P< 0.05.

(D'après Kikuchi et al., 2006 [634])

### III.4.3.1.2 Régulation de l'ubiquitination/dégradation de p27<sup>KIP1</sup>

Le CKI p27<sup>KIP1</sup> est un important régulateur de la progression de la phase G<sub>1</sub>. Il est fortement exprimé durant la phase G<sub>0</sub> du cycle cellulaire. Dans la voie de signalisation mitogénique, p27<sup>KIP1</sup> est dégradé par la machinerie ubiquitine/protéasome induisant la

#### A RETENIR



La phosphorylation de p27<sup>KIP1</sup> sur Ser10 est le principal mécanisme à la transition G<sub>1</sub>/S dans les CE cornéennes de lapin *in vitro* après stimulation avec du FGF-2.

Il existe deux voies distinctes de poly-ubiquitination de p27<sup>KIP1</sup> phosphorylé. pp27Thr187 est ubiquitiné dans le noyau par le complexe SCF<sup>Skp2</sup> durant la phase G<sub>1</sub> tardive alors que pp27Ser10 est ubiquitiné, après sa translocation dans le cytoplasme, par l'ubiquitine ligase E3 KPC durant la phase G<sub>1</sub> précoce du cycle cellulaire.



progression du cycle de la phase G<sub>1</sub> à la phase S [189, 635, 636]. Pour que p27<sup>KIP1</sup> soit dégradé, il est nécessaire qu'il soit phosphorylé au préalable. Il possède au moins quatre sites de phosphorylation connus : Thr187, Ser10, Thr157 et Thr198. Le complexe Cycline E/CDK2 est responsable de la phosphorylation de p27<sup>KIP1</sup> sur le résidu Thr187 [24, 503] alors qu'il a été démontré que PI3K/AKT phosphoryle le CKI sur les sites Ser10, Thr157 et Thr198 [637-639]. Le site Ser10 est

également phosphorylé par une sérine-thréonine kinase nucléaire humaine interagissant avec la stathmine (hKIS) [640].

La phosphorylation de p27<sup>KIP1</sup> au niveau de Ser10 (pp27Ser10) et de Thr187 (pp27Thr187) n'a pas la même cinétique et ces deux protéines phosphorylées représentent deux populations distinctes de p27<sup>KIP1</sup> dans la phase G<sub>1</sub> du cycle cellulaire [641]. Ces deux populations fonctionnent à différents stades de la phase G<sub>1</sub> en réponse à des signaux mitogéniques. **La phosphorylation de p27<sup>KIP1</sup> sur Ser10 est le principal mécanisme à la transition G<sub>1</sub>/S dans les CE cornéennes de lapin *in vitro* après stimulation avec du FGF-2.** Les différentes cinétiques impliquées dans la phosphorylation, l'ubiquitination et la dégradation de p27<sup>KIP1</sup> démontrent clairement que la phosphorylation du CKI sur Ser10 suivi de son ubiquitination et de sa dégradation est un événement précoce contrairement à ce qui est observé avec pp27Thr187 qui a lieu plus tardivement. Dans les CE, la phosphorylation de p27<sup>KIP1</sup> sur Ser10 a lieu dans l'heure suivant la stimulation au FGF-2. pp27Ser10 est alors immédiatement exporté du noyau, ubiquitiné et dégradé par le protéasome. Le processus en entier, depuis la phosphorylation de p27<sup>KIP1</sup> jusqu'à la dégradation de pp27Ser10 dans le

cytoplasme, se produit entre 1 et 16 heures après la stimulation au FGF-2. En revanche, la phosphorylation de p27<sup>KIP1</sup> sur Thr187 commence 8 heures après la stimulation par le FGF-2 et atteint son niveau maximum à 16 heures, période pendant laquelle pp27Thr187 est ubiquitiné. pp27Thr187 ubiquitiné est dégradé par le protéasome dans les 4 à 8 heures suivantes dans le noyau.

La polyubiquitination de pp27Thr187 avant destruction a été largement étudiée. pp27Thr187 est ubiquitiné par le complexe SCF<sup>Skp2</sup> (*Skp1-Cdc53/Cullin-F-box protein*) activé par la « F-box protein » Skp2 après liaison de la protéine phosphorylée [248, 253, 642]. Kamura a reporté l'existence d'une voie d'ubiquitination et de dégradation de p27<sup>KIP1</sup> phosphorylé indépendante de Skp2 au cours de la phase G<sub>1</sub> du cycle cellulaire impliquant le complexe KPC (*KIP1 ubiquitination-promoting complex*) composé de KPC1 et -2 [643]. Ce complexe contrôle la dégradation de la forme phosphorylée de p27<sup>KIP1</sup> après son exportation hors du noyau au cours de la phase G<sub>1</sub>. Ce contrôle indépendant du SCF<sup>Skp2</sup> agit donc sur pp27Ser10 du fait de la localisation cytoplasmique du CKI après sa phosphorylation. Kamura a proposé que la dégradation de p27<sup>KIP1</sup> phosphorylé est régulée par deux mécanismes distincts : une translocation couplée à une ubiquitination cytoplasmique par le KPC au cours de la phase G<sub>1</sub> et une ubiquitination nucléaire par le SCF<sup>Skp2</sup> au cours des phases S et G<sub>2</sub> du cycle cellulaire. Ces découvertes indiquent que la translocation couplée à une ubiquitination par le KPC est probablement utilisée par pp27Ser10 et que l'ubiquitination nucléaire par Skp2 est utilisée par pp27Thr187.

Parce qu'il n'avait pas été déterminé si les deux mécanismes régulant la dégradation de la protéine phosphorylée p27<sup>KIP1</sup> étaient impliqués dans les CE cornéennes de lapin *in vitro*, Lee et Kay ont étudié la dégradation de pp27Thr187 et pp27Ser10 médiée par les différents complexes ubiquitine ligase E3 et identifié le compartiment cellulaire où se produisait l'ubiquitination et la dégradation de ces deux populations de protéines suite à une stimulation par du FGF-2 [644]. Le profil d'expression des protéines p27<sup>KIP1</sup>, KPC1, KPC2, Skp1, Skp2 et Cul1 ainsi que leurs localisations subcellulaires étaient déterminés. Les CE étaient traitées avec du FGF-2 pendant 2 à 36 heures, les fractions nucléaires et cytoplasmiques étaient alors séparées. Lors de l'étude de la fraction nucléaire, une diminution graduelle du niveau protéique de p27<sup>KIP1</sup> était constatée après stimulation au FGF-2 pour atteindre son plus bas niveau 36 heures après la stimulation. L'expression cytoplasmique de p27<sup>KIP1</sup> augmentait après 2 heures de stimulation pour atteindre son niveau maximal après 8 heures d'incubation avec le FGF-2 ; par la suite, le niveau protéique diminuait jusqu'à ce que

la protéine soit à peine détectable dans le cytosol après 24 heures de stimulation. Les protéines, formant le complexe de l'ubiquitine ligase E3 (SCF<sup>Skp2</sup>) impliqué dans l'ubiquitination de pp27Thr187, Skp1, Skp2 et Cul1 étaient seulement observées dans la fraction nucléaire. L'expression de Skp2 était stimulée par le FGF-2 et atteignait son niveau maximal après 24 heures alors que Skp1 atteignait son niveau maximal après 12 heures de stimulation. L'expression de la Culine 1 était constante quelque soit le temps d'incubation des cellules avec du FGF-2. Quand des expériences similaires étaient réalisées sur le second système ubiquitine ligase E3 (KPC1 et -2), une expression cytoplasmique constante était observée en réponse à la stimulation par le FGF-2. Les protéines n'étaient pas détectées dans la fraction nucléaire confirmant les découvertes antérieures [643]. Ces résultats démontrent clairement la différence de localisation cellulaire des deux systèmes ubiquitine ligase E3 confirmant que le **KPC est cytoplasmique et que le SCF<sup>Skp2</sup> est nucléaire.**

L'association entre la forme phosphorylée de p27<sup>KIP1</sup> et le complexe ubiquitine ligase E3 est nécessaire pour sa poly-ubiquitination. Des immunoprécipitations étaient réalisées à l'aide des anticorps anti-pp27Thr187 et pp27Ser10 afin de déterminer si les deux formes de p27<sup>KIP1</sup> phosphorylées utilisent des systèmes ubiquitine ligase E3 différents. Le complexe immun nucléaire précipité avec l'anticorps anti- pp27Thr187 contenait les protéines composant le SCF<sup>Skp2</sup> : Skp2, Skp1 et Cul1. L'association de pp27Thr187 avec ces protéines était à son niveau maximum après 24 heures de stimulation avec du FGF-2. Aucune association n'était observée dans les cellules stimulées pendant 36 heures. La poly-ubiquitination de pp27Thr187 était maximale après 24 heures de stimulation au FGF-2. La précipitation du complexe immun de la fraction cytoplasmique avec l'anticorps anti-pp27Thr187 démontrait l'absence de Skp2, Skp1 et de Cul1 ainsi que l'absence de poly-ubiquitination de pp27Thr187. Ces résultats étaient attendus car les protéines du complexe ubiquitine ligase E3 nucléaire ne sont pas présentes dans le cytoplasme. Le complexe immun cytoplasmique précipité avec l'anticorps anti-pp27Ser10 contenait KPC1 et -2. La quantité protéique de KPC était maximale après 8 heures de stimulation au FGF-2, la quantité diminuait par la suite. Il est probable que la quantité limitée de pp27Ser10 est l'étape limitante ; pp27Ser10 est fortement diminué 16 heures après stimulation [641]. Une poly-ubiquitination de pp27Ser10 était observée avec un taux maximal après 8 heures de stimulation. La formation des complexes ubiquitine ligase E3 et la poly-ubiquitination de pp27Ser10 étaient simultanées. KPC1 et -2, des protéines ligases cytoplasmiques, n'étaient

pas détectés dans la fraction nucléaire après précipitation du complexe immunitaire avec l'anticorps anti-pp27Ser10.

La dégradation protéosomale de pp27Thr187 et pp27Ser10 ubiquitinés était confirmée par l'utilisation de MG132, un inhibiteur du protéasome 26S et de la cystéine protéase après traitement des CE avec du FGF-2. Le MG132 augmentait le niveau d'expression nucléaire et cytoplasmique de p27<sup>KIP1</sup> ainsi que de ses deux formes phosphorylées. L'inhibiteur n'altérait pas la localisation subcellulaire pp27Thr187 et pp27Ser10 qui étaient respectivement présents uniquement dans le noyau et dans le cytoplasme.

Bien que p27<sup>KIP1</sup> soit phosphorylé sur Thr187 et Ser10 au niveau du noyau, pp27Ser10 est par la suite exporté dans le cytoplasme. De la leptomyicine B (LMB), un inhibiteur de l'exportine CRM-1, était utilisé afin d'inhiber la translocation de pp27Ser10 hors du noyau. Le CKI phosphorylé sur Ser10 était fortement conservé dans le noyau alors que son niveau cytoplasmique était négligeable. La LMB n'altérait pas le profil d'expression de pp27Thr187. p27<sup>KIP1</sup> n'était pas détecté dans le cytoplasme alors qu'il était présent en quantité importante dans le noyau jusqu'à la 16<sup>ème</sup> heure de traitement avant de diminuer. Ce taux important observé à 16 heures était probablement dû à l'accumulation combinée de pp27Ser10 (dépendant de LMB) et de pp27Thr187. La réduction du niveau de p27<sup>KIP1</sup> dans le noyau des cellules traitées au LMB était la conséquence de la protéolyse de pp27Thr187.

L'incorporation de BrdU était étudiée afin de déterminer le taux de synthèse d'ADN des CE traitées avec du FGF-2 pendant 8, 16 ou 24 heures en présence ou non de MG132 et de LMB. L'incorporation augmentait de façon temps-dépendante. La synthèse d'ADN en présence de MG132 diminuait de 36% (à 8 heures) à 51% (à 24 heures) alors que la LMB démontrait une plus faible inhibition de la synthèse. Les CE traitées simultanément avec du FGF-2 et du LMB montraient une réduction de synthèse à 8 et 16 heures de 18 et 22% alors que les CE traitées pendant 24 heures avaient une réduction de 36% de l'incorporation de BrdU. Le retard de dégradation de pp27Thr187 et pp27Ser10 bloquait la progression du cycle cellulaire. Le niveau observé avec le MG132 doit être causé par l'inhibition de la dégradation de pp27Thr187 et pp27Ser10 alors que celui détecté avec le LMB est seulement causé par l'inhibition de la dégradation de pp27Ser10. La phosphorylation de p27<sup>KIP1</sup> sur Thr187 à 24 heures est responsable de la différence observée entre les deux inhibiteurs sur la progression du cycle cellulaire après stimulation au FGF-2. **Ces données confirment que pp27Ser10 constitue la population majeure de CKI phosphorylés durant la transition G<sub>1</sub>/S du cycle cellulaire**

L'ensemble de ces travaux démontrent qu'il existe deux voies distinctes de poly-ubiquitination de p27<sup>KIP1</sup> phosphorylé. pp27Thr187 est ubiquitiné dans le noyau par le complexe SCF<sup>Skp2</sup> durant la phase G<sub>1</sub> tardive alors que pp27Ser10 est ubiquitiné, après sa translocation dans le cytoplasme, par l'ubiquitine ligase E3 KPC durant la phase G<sub>1</sub> précoce du cycle cellulaire. La **Figure 54** résume les voies de phosphorylation et de dégradation de p27<sup>KIP1</sup> dans des CE cornéennes de lapin après stimulation avec du FGF-2.

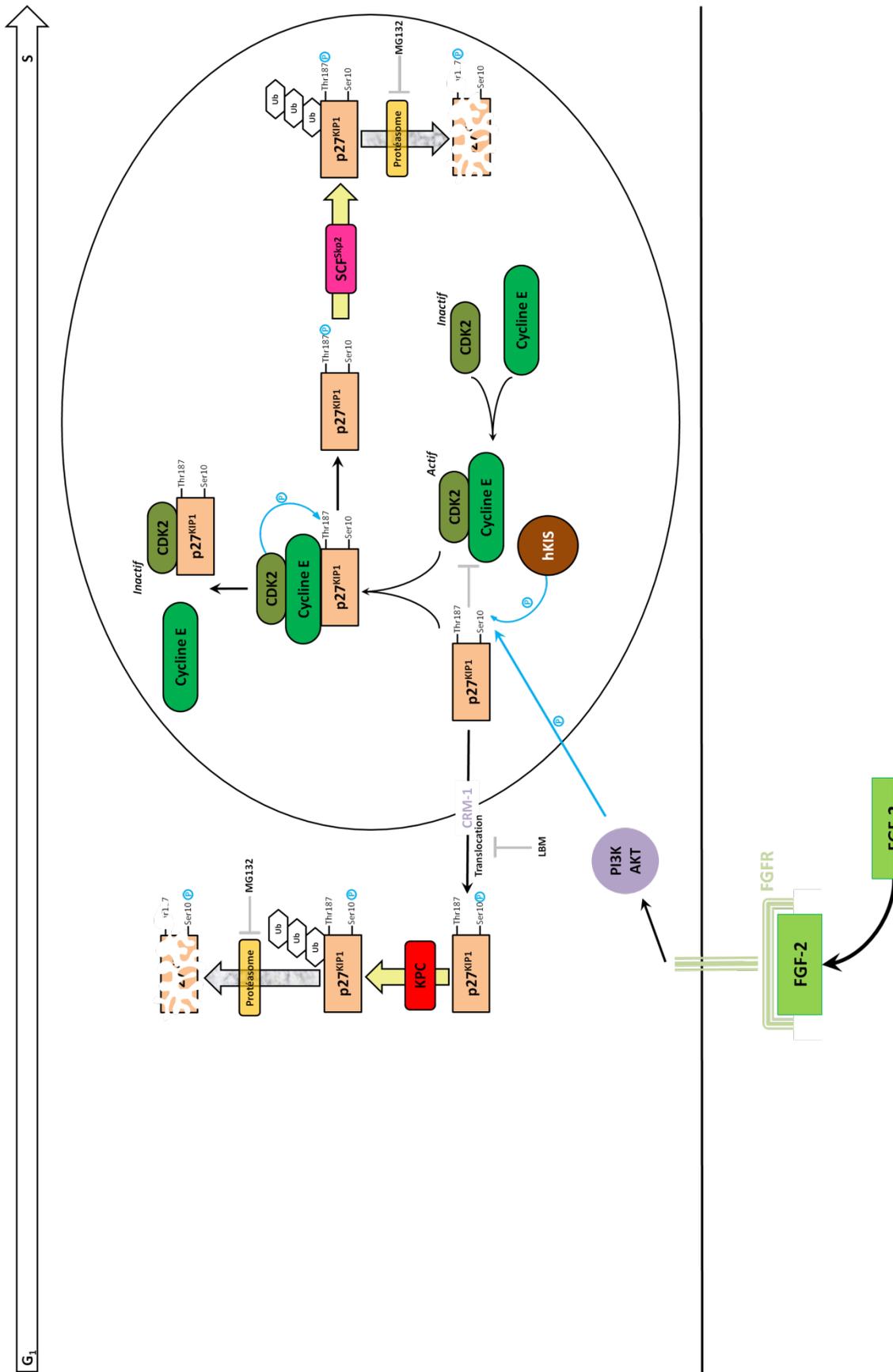


Figure 54 : Voies de phosphorylation et de dégradation de p27<sup>KIP1</sup> dans des CE cornéennes après stimulation avec du FGF-2.

### III.4.3.2. Des différences d'expression selon l'âge

En 2006, Enomoto et Joyce ont étudié l'implication des CKIs p16<sup>INK4a</sup>, p21<sup>CIP1</sup> et p27<sup>KIP1</sup> dans la sénescence répliquative des CE cornéennes humaines de donneurs jeunes (<30 ans ; n=13 ; âge moyen ; 17,5±5,9 ans ; 2-25 ans) et âgés (>50 ans ; n=13 ; âge moyen ; 62,6±7,4 ans ; 51-76 ans) [645]. Cette étude portait également sur la cinétique d'hyperphosphorylation de la protéine du rétinoblastome Rb régulateur clé du cycle cellulaire. Des immunomarquages sur coupes montraient l'expression nucléaire des protéines p16<sup>INK4a</sup>, p21<sup>CIP1</sup> et p27<sup>KIP1</sup> *in situ* quel que soit l'âge du donneur (Figure 55)

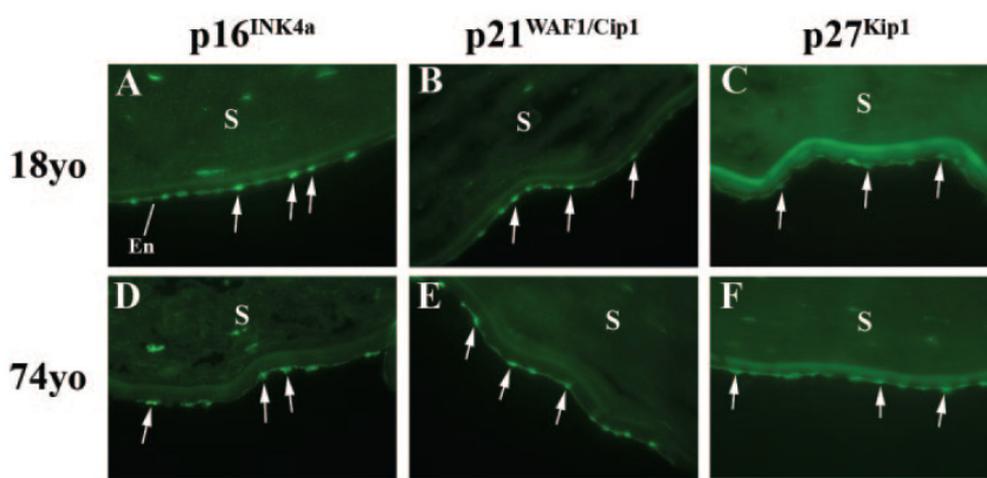


Figure 55 : Immunomarquages de p16<sup>INK4a</sup>, p21<sup>CIP1</sup> et p27<sup>KIP1</sup> dans des CE cornéennes humaines *in situ*.

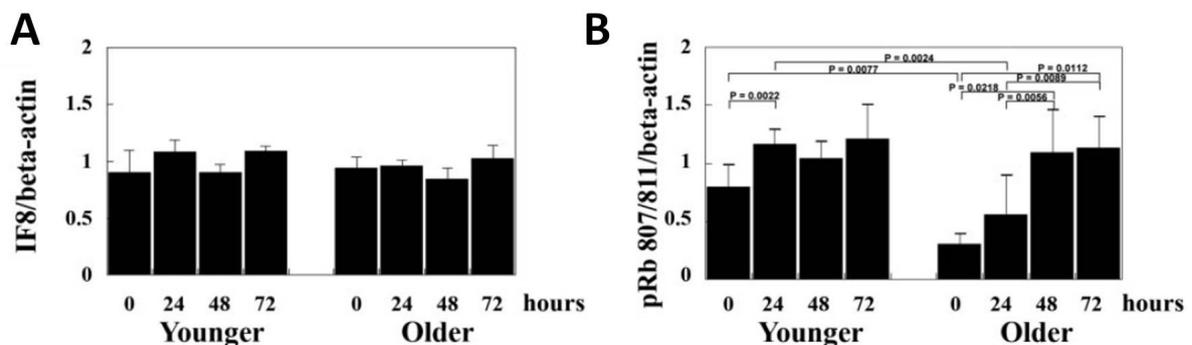
Fresh-frozen sections of human cornea from an 18-year-old (A–C) and a 74-year-old donor (D–F) were stained with antibodies for p16<sup>INK4a</sup> (A, D), p21<sup>CIP1</sup> (B, E), or p27<sup>KIP1</sup> (C, F). Positive staining for all three CKIs was clearly visible in endothelial nuclei from both donors. *Arrows*: positive staining in corneal endothelial cells. Anterior Descemet's membrane (DM) showed relatively strong autofluorescence in some sections. S, stroma; En, endothelium. Original magnification, X60.

(D'après Enomoto et al., 2006 [645])

En culture cellulaire primaire et au 4<sup>ème</sup> passage, p16<sup>INK4a</sup> et de p21<sup>CIP1</sup> étaient plus exprimés dans les CE des donneurs âgés. L'augmentation de l'expression de p16<sup>INK4a</sup> et p21<sup>CIP1</sup> est conforme aux résultats obtenus antérieurement dans des études portant sur la sénescence liée à l'âge dans d'autres types cellulaires [646, 647]. La constance des niveaux de ces CKIs dans les deux conditions de culture reflète une stabilité des transcrits et des protéines et suggère que, comme dans d'autres types cellulaires [594], ces deux CKIs doivent être impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire sur le long terme plutôt que dans le contrôle des réponses cellulaires à court terme. **L'expression de p16<sup>INK4a</sup> ainsi que p21<sup>CIP1</sup> augmente de façon âge-dépendant dans les CE humaines.**

Dans les cultures primaires, il n'y avait pas de différences d'expression de p27<sup>KIP1</sup> quel que soit l'âge des donneurs alors que le CKI était sous-exprimé dans les CE des donneurs âgés cultivées jusqu'au 4<sup>ème</sup> passage. Ce résultat indique une différence dans la réponse cellulaire à de multiples passages plutôt qu'une différence intrinsèque liée à l'âge dans l'expression de p27<sup>KIP1</sup>. Ce CKI est régulé à la fois au niveau traductionnel et par un turnover [635] permettant une régulation à court terme du cycle en réponse à diverses modifications de l'environnement comme par exemple à l'exposition au TGF- $\beta$  et à la formation de contacts intercellulaires [167, 648, 649].

Aucune différences liées à l'âge n'étaient observées, *in vitro*, par Western blot dans le niveau d'expression total de la protéine Rb. Seule la forme phosphorylée était exprimée en moindre quantité dans les CE de donneurs âgés (**Figure 56**).



**Figure 56 : Analyse de l'expression protéique totale de Rb ainsi que de sa forme phosphorylée dans des CE humaines *in vitro*.**

(A) Western blot analysis using mouse anti-human Rb (IF8) to demonstrate total Rb protein expression in subconfluent, passage-2 HCECs at 0, 24, 48, and 72 hours after growth factor addition. A similar level of total Rb protein expression was observed in all HCECs, regardless of donor age or time after growth factor addition. Bars, SD.

(B) Western blot analysis using rabbit anti-human Rb (Ser 807/811) demonstrate the kinetics of Rb hyperphosphorylation in the same samples of subconfluent HCECs as used in (A). A maximum increase in Rb hyperphosphorylation in HCECs from younger donors within 24 hours of growth factor addition was observed, whereas maximum hyperphosphorylation of Rb did not occur in HCECs from older donors until 48 hours after growth factor stimulation. Bars, SD. Probabilities demonstrate statistically significant differences.

(D'après Enomoto et al., 2006 [645])

Ser807/811 est l'un des quatre motifs sur Rb dont la phosphorylation est régulée par l'activité kinase cycline-dépendantes [650]. Parce que l'expression de p16<sup>INK4a</sup> et p21<sup>CIP1</sup> est augmentée dans CE de donneurs âgés, et que ces CKIs sont connus pour inhiber l'activité des complexes Cyclines/CDKs responsables de hyperphosphorylation de Rb, il est raisonnable de supposer que l'augmentation de l'expression de p16<sup>INK4a</sup> et p21<sup>CIP1</sup> contribue à la diminution de la réponse proliférative observée dans les CE de donneurs âgés. Bien que les données obtenues dans cette étude fournissent une preuve de la corrélation entre l'augmentation des niveaux d'expression de p16<sup>INK4a</sup> et p21<sup>CIP1</sup> avec diminution de la phosphorylation de Rb avec l'âge, aucune relation directe n'a été démontrée. D'autres études

fonctionnelles doivent être menées afin de déterminer précisément si une expression accrue de p16<sup>INK4a</sup> et p21<sup>CIP1</sup> est directement responsable de la diminution de l'hyperphosphorylation de Rb, conduisant à la diminution de la capacité proliférative des CE liée à l'âge.

Cette étude indique que les trois CKIs ainsi que Rb sont exprimés dans les CE humaines indépendamment de l'âge des donneurs. Les différences liées à l'âge dans l'expression de p16<sup>INK4a</sup> and p21<sup>CIP1</sup> et dans la cinétique d'hyperphosphorylation de Rb suggèrent que, en plus de l'activité normale de p27<sup>KIP1</sup> comme inhibiteur de prolifération, il y a une augmentation âge-dépendante dans le niveau de régulation du cycle cellulaire par p16<sup>INK4a</sup> and p21<sup>CIP1</sup>. Ce mécanisme moléculaire additionnel doit être responsable, au moins en partie, de la réduction de la réponse proliférative observée dans les cellules endothéliales des donneurs âgés.

L'expression des gènes p16<sup>INK4a</sup>, p21<sup>CIP1</sup> et p27<sup>KIP1</sup> liés à la sénescence des CE a été étudiée, par PCR quantitative en temps réel, sur cornées *ex vivo* provenant de donneurs jeunes ( $\leq 30$  ans ; n=14 ; âge moyen ; 24,9 $\pm$ 4,1 ans ; 19-30 ans) et plus âgés ( $\geq 50$  ans ; n=13 ; âge moyen ; 55,8 $\pm$ 3,8 ans ; 50-61 ans) par Song (Shandong Eye Institute, Qingdao, Chine). en 2008 [436]. Une augmentation des transcrits de p16<sup>INK4a</sup> liée à l'âge était observée alors que les niveaux de p21<sup>CIP1</sup> et p27<sup>KIP1</sup> restaient stables. Dans cette **p16<sup>INK4a</sup> semble jouer le rôle le plus important dans la sénescence des CE**. Ses différences d'expression liées à l'âge peuvent être utilisées comme indicateur de la sénescence accélérée des CE. Ces résultats confirment en partie ceux de Joyce obtenus à partir de culture primaire de CE. Joyce trouvait cependant une augmentation de l'expression protéique de p21<sup>CIP1</sup> avec l'âge alors que Song démontrait une expression constante des transcrits de ce CKI. Cette différence selon Song est due un stress induit par la culture. Cependant il ne faut pas oublier que le niveau de transcrits ne reflète pas toujours le niveau protéique. En effet différents mécanismes traductionnels et post-traductionnels interviennent dans la régulation des protéines.

**L'ensemble de ces travaux indiquent que, outre, les mécanismes qui maintiennent activement l'endothélium cornéen *in vivo* dans un état non répliatif, la capacité des CE à se diviser est âge-dépendant. L'endothélium cornéen de jeunes donneurs possède une grande population de CE pouvant proliférer dans des conditions normales de croissance mais avec l'âge, il y a une augmentation de la population cellulaire qui entre dans un état de sénescence répliatif. Le fait que les CE, même à partir de donneurs âgés, soient en mesure de se diviser en culture indique qu'au moins une sous-population de cellules conserve une capacité proliférative mais le nombre de cellules possédant cette capacité**

ainsi que leurs réponses aux stimuli mitogéniques est diminué. Cela indique clairement que le statut du cycle cellulaire des CE cornéennes n'est pas statique, mais change lentement avec l'âge du donneur. Bien que la cause spécifique de ce changement de statut prolifératif lié à l'âge ne soit pas encore identifiée, il apparaît que les CKIs jouent un rôle majeur et en particulier  $p16^{INK4a}$ .

#### III.4.3.3. Relance de la prolifération par inhibition de $p21^{CIP1}$ et $p16^{INK4a}$

Après avoir établi que les CE de donneurs âgés conservent une capacité proliférative, et que  $p27^{KIP1}$  n'est pas l'acteur principal de l'arrêt de la prolifération, Joyce et Harris ont déterminé l'implication de  $p21^{CIP1}$  et  $p16^{INK4a}$  dans l'inhibition de la phase  $G_1$  du cycle dans

**A RETENIR**

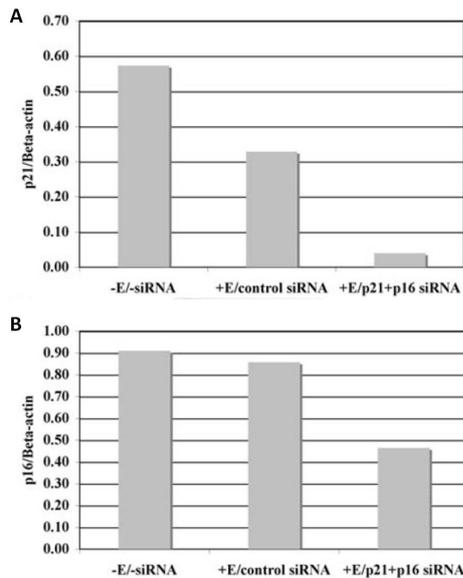
★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★

$p21^{CIP1}$  et  $p16^{INK4a}$  jouent un rôle important dans la régulation négative de la phase  $G_1$  du cycle des CE cornéennes des donneurs âgés. La diminution de leur expression par interférence ARN favorise la progression dans le cycle cellulaire et conduit à des divisions cellulaires.

★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★

les CE cornéennes humaines de donneurs âgés. *In vitro*, des CE donneurs âgés en moyenne de  $59,8 \pm 16,1$  ans ( $n=14$ ; 27-77 ans) étaient électroporées avec deux siRNA anti  $p21^{CIP1}+p16^{INK4a}$  simultanément puisqu'une expression importante de ces 2 CKIs avait été démontré dans cette tranche d'âge [645]. L'expression de ces deux protéines diminuait significativement (en WB) pendant au moins une semaine (**Figure 57**).

Les CE exposées aux deux siRNA et cultivées en présence de 8% de SVF proliféraient plus que les cultures contrôles exposées au siRNA non spécifique pendant les 11 jours de l'expérimentation (% de CE  $Ki67^+$  et nombre total de noyaux). Dans le groupe contrôle, 19% des CE étaient entrées dans le cycle cellulaire 1 jour après électroporation alors que 65% des cellules traitées par les siRNA  $p21^{CIP1}+p16^{INK4a}$  entraient en cycle ( $p=0,03$ ). Le pourcentage de cellules  $Ki67^+$  diminuait ensuite au cours du temps dans les deux groupes. Le nombre de CE dans les cultures traitées avec les siRNA  $p21^{CIP1}+p16^{INK4a}$  augmentait de 2,6 fois au cours du temps vs 1,1 fois dans le groupe contrôle, sans toutefois que la différence ne soit significative. Le traitement concomitant par les 2 siRNA réduisant aussi efficacement leurs niveaux protéiques respectifs, il n'est pas possible d'évaluer la relative contribution de  $p21^{CIP1}$  et  $p16^{INK4a}$  dans le processus d'inhibition.



**Figure 57 : Exemple représentatif de l'effet du traitement avec deux siRNA anti p21<sup>CIP1</sup>+p16<sup>INK4a</sup> sur l'expression protéique de p21<sup>CIP1</sup> and p16<sup>INK4a</sup> dans des CE humaines *in vitro*.**

(A) Densitometric analysis of the effect of p21+p16 siRNA treatment on p21Cip1 protein expression in non-electroporated HCEC (-E/-siRNA), in HCEC electroporated with Silencer negative control #1 siRNA (+E/control siRNA), and in HCEC electroporated with p21+p16 siRNA (+E/p21+p16 siRNA). (B) Densitometric analysis of the effect of p21+p16 siRNA treatment on p16INK4a protein expression under the same conditions as in A. Results are expressed relative to beta-actin.

(D'après Joyce NC. et Harris DL., 2010 [651])

**p21<sup>CIP1</sup> et p16<sup>INK4a</sup> jouent un rôle important dans la régulation négative de la phase G<sub>1</sub> du cycle des CE cornéennes des donneurs âgés. La diminution de leur expression par interférence ARN favorise la progression dans le cycle cellulaire et conduit à des divisions cellulaires.**

### III.5. Mécanismes de régulation de la prolifération des CE : tentative de synthèse

Les principaux mécanismes moléculaires connus régulant la prolifération des CE que nous venons de voir au cours de ce chapitre sont résumés par la **Figure 58**. Un tableau critique des principales références bibliographiques utilisées aux cours de cette thèse vous est également présenté **Tableau 6**.

Les facteurs de croissances EGF et FGF-2 en se couplant à leurs récepteurs spécifiques : EGFR et FGFR présents sur la membrane des CE humaines [Wilson SE, Department of Ophthalmology, Dallas, USA] induisent l'activation d'un certain nombre de voies de signalisation comprenant la phospholipase C- $\gamma$  (PLC- $\gamma$ 1) et la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) conduisant à la prolifération des CE. La protéine tyrosine phosphatase 1B (PTP1B), dont l'expression augmente avec l'âge, inhibe l'action de l'EGF. Le sodium orthovadate (SOV) inhibe cette protéine et permet de relancer la prolifération des CE de rat [Joyce NC, Schepens Eye Research Institute, Boston, USA]. La fixation de la cytokine TGF- $\beta$ 2 sur son récepteur TGFR présent à la surface des CE humaines induit une surexpression de la cyclooxygénase-2 (COX-2), de la prostaglandine E2 (PGE2) et de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) qui inhibent l'action de l'EGF et du TGF- $\beta$ 2 en agissant sur PI3K et sur la PLC- $\gamma$  [Joyce NC, Schepens Eye Research Institute, Boston, USA]. La PLC- $\gamma$ 1 et PI3K agissent de la même manière en phosphorylant le CKI p27<sup>KIP1</sup> qui sera exporté hors du noyau, ubiquitiné par le complexe KPC et dégradé en début de phase G<sub>1</sub>. La kinase nucléaire hKIS phosphoryle également p27<sup>KIP1</sup> conduisant à sa destruction. La PLC- $\gamma$ 1 et PI3K vont également stimuler la synthèse de CDK4 et sa translocation nucléaire [Kay EP, Doheny Eye Institute, Los Angeles, USA ; modèle utilisé : le lapin]. Des stimulations mitogéniques induisent la synthèse de cycline D qui se lie et active CDK4 nucléaire. Le complexe Cycline D1/CDK4 phosphoryle spécifiquement pRb induisant des altérations dans les interactions pRb/E2F activant ainsi E2F. Le facteur de transcription E2F libre stimule la synthèse de nombreuses protéines impliquées dans la prolifération cellulaire comme la cycline E. Cette protéine de régulation se lie et active CDK2. Le complexe Cycline E/CDK2 phosphoryle à son tour pRb créant un circuit d'autorégulation favorisant la progression vers la phase S. La régulation négative du cycle cellulaire est médiée, au moins en partie, par l'activité des CKI. p16<sup>INK4a</sup> se fixe spécifiquement sur les CDK4 libres prévenant ainsi leur liaison avec la cycline D et de ce fait leur activité kinase. Ils sont également en compétition

avec la cycline D pour se lier à CDK4 dans des complexes existants et ainsi dissocier les complexes Cycline D/CDK4.

p21<sup>CIP1</sup> et p27<sup>KIP1</sup> se fixent aux complexes Cycline D/CDK4 et Cycline E/CDK2 prévenant leur activation. En phase G<sub>1</sub> tardive, le complexe actif Cycline E/CDK2 phosphoryle p27<sup>KIP1</sup> induisant sa destruction nucléaire par le protéasome après avoir été ubiquitiné par le SCFSkp2 conduisant à la progression du cycle vers la phase S [Kay EP, Doheny Eye Institute, Los Angeles, USA ; modèle utilisé : le lapin]. L'utilisation d'oligonucléotides anti-sens ou de siRNA anti-p27<sup>KIP1</sup> entraîne une relance du cycle cellulaire dans les CE jeunes [Joyce NC, Schepens Eye Research Institute, Boston, USA ; modèle utilisé : rat (oligo) et humain (siRNA)]. L'action combinée de siRNA anti p21<sup>CIP1</sup> et p16<sup>INK4a</sup> induit une relance du cycle des CE humaines quel que soit l'âge [Joyce NC, Schepens Eye Research Institute, Boston, USA]. Nous pouvons supposer également que les protéines ZO-1 (« *zonula occludens* ») et ZONAB (« *ZO-1-associated nucleic acid binding protein* ») interviennent dans la régulation de la prolifération des CE comme il l'a été démontré dans les cellules épithéliales humaines. ZONAB d'une part se fixerait sur CDK4 et permettrait son accumulation nucléaire et d'autre part régulerait la transcription de la cycline D et de PCNA. ZO-1 inhiberait ZONAB et du même fait CDK4 par séquestration cytoplasmique lors de l'augmentation de la densité cellulaire [Balda MS, Institute of Ophthalmology, London, UK]. La rupture mécanique ou chimique des jonctions intercellulaires conduit à une diminution protéique de ZO-1 et à une relance de la prolifération cellulaire des CE humaines [Joyce NC, Schepens Eye Research Institute, Boston, USA].





**Tableau 6 : Critique de la littérature.**

H : Humain; R : Rat; L : Lapin; S : Souris

SERI = Schepens Eye Res Insitute ; AOS = Acta Ophthalmol. Scand; EER = Exp. Eye Res. ; MV = Molecular Vision

Auteur/Revue/Réf	Année	Equipe	Thème	Espèce	N (matériel bio de départ)	Principale technique	Principal résultat	Principale critique
Wilson/IOVS/[376]	1993	Dallas	Capacités prolifératives	H	Culture n=102	Transformation cellules avec SV40-L-T; RT-PCR; IF (SV40LT)	Capacités prolifératives intrinsèques	PCR sur facteurs de croissance, absence de WB... La présence du transcrit ne veut pas dire présence de la protéine et encore moins de sa fonctionnalité
Wilson/IOVS/[377]	1995	Dallas	Capacités prolifératives	H	Culture n=?	Transformation cellules avec SV40-L-T et oncoprotéines E6/E7. RT-PCR; IF (SV40LT); ICC (E6/E7); WB; Comptage	Capacités prolifératives intrinsèques	
Joyce/IOVS/[383]	1996	SERI	Expression des protéines du cycle et statut prolifératif	H	<i>in situ</i> n=?	ICC sur coupes (cyclines D/E/A/B1; p33cdk2; p34cdc2; Ki67)	Profil d'expression protéique des cellules endothéliales similaires aux cellules basales limbiques. Cellules endothéliales arrêtées en phase G1.	36 heures pm. Etude observationnelle
Joyce/IOVS/[407]	1996	SERI	Profil d'expression protéines du cycle lapin vs homme	L/H	<i>in situ</i> n=?	IF (Cyclines D/E/A/B1; p34 <sup>cdc2</sup> ; Ki67; pRb; p53; p16 <sup>INK4a</sup> ; E2F); RT-PCR	Absence marquage Ki67 (H+L). Cycline E localisée dans cytoplasme chez lapins et dans noyau chez hommes	Aucune info sur les donneurs ainsi que sur la reproductibilité des résultats.
Blake/IOVS/[461]	1997	Nouvelle Orléans	Effet de la MEC sur la prolifération	H	Culture n=10	Analyse des chromosomes, de la taille cellulaire et de la prolifération (essai colorimétrique) sous l'effet de différents facteurs de croissances et de substratum	MEC d'origine bovine +++ prolifération	Mesure de la prolifération indirecte. Aucune étude protéique notamment par ICC/IF sur les marqueurs de prolifération (Ki67; MCM2...)
Joyce/IOVS/[550]	1997	SERI	Récepteurs au TGF-β	H	n=8	ICC sur coupes (Récepteurs TGF-β I/II/III); RT-PCR	Expression des transcrits et des protéines des 3 types de récepteurs	Aucune données sur les cornées mis à part l'âge
Egan/IOVS/[450]	1998	Mayo/Dallas/Cleveland	Longueur des télomères	H	n=21	Mesure longueur des fragments de restriction terminaux	La longueur des télomères n'est pas la cause de l'arrêt de prolifération	

Auteur/Revue/Réf	Année	Equipe	Thème	Espèce	N (matériel bio de départ)	Principale technique	Principal résultat	Principale critique
Schontal/EER/[631]	1998	Los Angeles	Expression et activité des protéines régulatrices du cycle cellulaire	L/H	Culture n=?	Transformation cellules avec SV40-L-T; Activité kinase; WB	Prolifération cellulaire. Augmentation Cyclines A/D et CDK2/4. Diminution de p21 <sup>CIP1</sup> et p27 <sup>KIP1</sup> . Implication des ces protéines dans la régulation du cycle.	
Joyce/IOVS/[561]	1998	SERI	Profil d'expression protéines du cycle	R	<i>ex vivo</i> n=?	ICC (BrdU; p27KIP1; p21CIP1; connexine-43; ZO-1...)	p27 <sup>KIP1</sup> et p21 <sup>CIP1</sup> contribuent à l'inhibition proliférative	
Chen/IOVS/[398]	1999	SERI	TGF-β2	R	Culture n=? n=30 pour humeur aqueuse	Incorporation [ <sup>3</sup> H]Thymidine	TGF-β2 bloque l'entrée en phase S	
Graham/IOVS/[474]	2000	SERI	PKC	R	Culture n=?	WB; ICC; oligo antisens	PKCα/ε importants dans la prolifération	
Senoo/IOVS/[394]	2000	SERI/Japon	EDTA	H	<i>ex vivo</i> n=21 (2-3 par expérimentation)	ICC (ZO-1; Ki67)	EDTA induit prolifération	absence délai pm
Senoo/IOVS/[393]	2000	SERI/Japon	Cinétique du cycle cellulaire : donneurs jeunes vs. âgés	H	<i>ex vivo</i> n=59 (jeunes n=19; âgés n=40)	ICC (BrdU; Ki67)	Prolifération dans les 2 groupes mais âgés répondent plus lentement aux stimuli	Aucune information sur les donneurs (sauf l'âge), Variation de n=2 à n=9 par échantillon pour une même expérience
Kim/MV/[505]	2001	Corée/Los Angeles	Action du TGF-β2 sur l'expression de p27 <sup>KIP1</sup> et CDK4	L	Culture n=?	IF (p27 <sup>KIP1</sup> ; CDK4); WB	Expression de p27 <sup>KIP1</sup> et CDK4 DCE dépendant. TGF-β2 inhibe expression de CDK4 et prévient la phosphorylation de p27 <sup>KIP1</sup> (nécessaire à son exportation nucléaire pour être dégradé)	
Kim/IOVS/[504]	2001	Corée/Los Angeles	Rôle de p27 <sup>KIP1</sup>	L	Culture n=?	IF (Cyclines D1/E; CDK2/4; p21 <sup>CIP1</sup> ; p27 <sup>KIP1</sup> ); WB	TGF-β2 et l'AMPC inhibe l'entrée en phase S en bloquant la phosphorylation de p27 <sup>KIP1</sup>	
Chen/EER/[553]	2002	Taiwan	TGF-β2	R	Culture n=?	Incorporation [ <sup>3</sup> H]Thymidine	La réponse au TGF-β2 varie en fonction de la concentration en sérum dans le milieu	

Auteur/Revue/Réf	Année	Equipe	Thème	Espèce	N (matériel bio de départ)	Principale technique	Principal résultat	Principale critique
Lee/MV/[498]	2002	Corée/Los Angeles	PLC-γ1	L	Culture n=?	IF (PLC; CDK4; p27 <sup>KIP1</sup> ); WB	PLC-γ1 régule positivement l'expression de CDK4 et facilite son importation nucléaire et l'exportation de p27 <sup>KIP1</sup>	
Joyce/IOVS/[562]	2002	SERI	Inhibition de contact et TGF-β2	R	Culture + <i>ex vivo</i> n=?	ICC sur coupes (récepteurs TGF-β et p27 <sup>KIP1</sup> ); RT-PCR; WB	Inhibition de contact et réponse au TGF-β2 médiées par p27 <sup>KIP1</sup>	
Lee/IOVS/[503]	2003	Corée	PI3K	L	Culture n=?	IF (CDK4; p27 <sup>KIP1</sup> ); WB	PI3K régule positivement l'expression, facilite l'importation et la séquestration nucléaire de CDK4. Il régule négativement l'expression de p27 <sup>KIP1</sup> et facilite sa protéolyse en le phosphorylant	
Lee/IOVS/[477]	2003	Los Angeles	AMPC	L	Culture n=?	IF (AMPC; CDK4; p27 <sup>KIP1</sup> ); WB; Activité kinase	Inhibition de PI3K	
Motegi/AOS/[652]	2003	Japon	TGF-β	B	Culture n=?	WB; IP; Incorporation BrdU	TGF-β induit prolifération via PKC	Induction de prolifération OK mais avec 10% de FBS
Kikuchi/IOVS/[633]	2004	SERI/Japon	p27 <sup>KIP1</sup> oligonucléotides antisens	R	Culture n=?	ICC sur lames; WB	Induction de la prolifération	absence délai pm; n=?
Joyce/IOVS/[379]	2004	SERI/Londres	Surexpression E2F2	L	Culture + <i>ex vivo</i> n=?	ICC; Test de viabilité; TUNEL; RT-PCR	Induction de la prolifération	absence délai pm; n=?
Zhu/IOVS/[422]	2004	SERI	Réponse proliférative : donneurs jeunes vs. âgés	H	Culture n=27 (jeunes) et 56 (âgés)	ICC (ZO-1; Ki67); Comptage	Induction de la prolifération avec différents facteurs de croissance chez donneurs jeunes et âgés	délai décès-culture cellulaire : 2 à 13 jours (jeunes) et 1 à 12 jours (âgés)
Yoshida/IOVS/[632]	2004	Japon	Implication de p27 <sup>KIP1</sup> dans le développement et la prolifération de l'endothélium cornéen	S	n=7x2	ICC (p27 <sup>KIP1</sup> ; p57 <sup>KIP2</sup> ; PCNA; BrdU)	Augmentation de p27 <sup>KIP1</sup> au cours du développement de la cornée et diminution de PCNA. p27 <sup>KIP1</sup> impliqué dans l'inhibition proliférative	

Auteur/Revue/Réf	Année	Equipe	Thème	Espèce	N (matériel bio de départ)	Principale technique	Principal résultat	Principale critique
Chen/EER/[532]	2005	SERI	Effet du sodium orthovanadate sur les protéines tyrosine phosphatases	R	Culture + ex vivo n=?	ICC (ZO-1; Ki67); RT-PCR; WB	Implication des phosphatases dans l'intégrité des jonctions intercellulaires et dans la prolifération	
Konomi/IOVS/[427]	2005	SERI	Capacités prolifératives : centrales vs. périphériques (jeunes vs. âgés)	H	Culture n=8 (jeunes n=4; âgés n=4)	Comptage; ICC (MCM2)	Cellules périphériques et centrales peuvent proliférer	
McAlister/IOVS/[380]	2005	SERI/Londres	Surexpression E2F2	H	n=?	ICC (BrdU); Comptage DCE (spéculaire puis bleu trypan); TUNEL	Progression du cycle et augmentation DCE	Aucune information sur les donneurs
Enomoto/IOVS/[645]	2006	SERI	Différences liées à l'âge dans l'expression des CKIs et l'hyperphosphorylation de Rb	H	ex vivo n=1 pour chaque groupe Culture n=18 (jeunes) et n=22 (âgés) (n=4 à 8 par expérience et par groupe)	ICC sur coupes (p16 <sup>INK4a</sup> ; p21 <sup>CIP1</sup> ; p27 <sup>KIP1</sup> ); WB	Augmentation de l'expression de p16 <sup>INK4a</sup> et de p21 <sup>CIP1</sup> avec l'âge	ICC réalisée seulement sur une cornée de chaque groupe.
Mimura/IOVS/[430]	2006	SERI	Compétence répliquative et sénescence : centre vs. Périphérie (jeunes vs âgés)	H	ex vivo n=8 par groupe d'âge (n=4 par expériences)	ICC (MCM2); Activité SA-β-Gal	Cellules périphériques prolifération +++	
Kikuchi/IOVS/[634]	2006	SERI/Japon	p27 <sup>KIP1</sup> siRNA	H	Culture n=5 (jeunes) et n=6 (âgés)	ICC (ZO-1; p27 <sup>KIP1</sup> ); WB	Prolifération chez les jeunes mais pas chez les plus âgés	Aucune information sur les donneurs (sauf l'âge)
Konomi/MV/[451]	2007	SERI/Japon	Longueur des télomères : jeunes vs âgés et centrales vs périphériques	H	ex vivo n=10 (jeunes) n=12 (âgés)	Q-FISH (PNA : acides nucléiques peptidiques)	La longueur des télomères n'est pas la cause de l'arrêt de prolifération	

Auteur/Revue/Réf	Année	Equipe	Thème	Espèce	N (matériel bio de départ)	Principale technique	Principal résultat	Principale critique
Ishino/MV/[534]	2008	SERI/Japon	PTP1B	H	<i>ex vivo</i> et culture n=18	ICC (PTP1B); WB; Incorporation BrdU	Augmentation de PTP1B avec l'âge. PTP1B régulateur négatif de la prolifération cellulaire	
Joyce/IOVS/[651]	2010	SERI	p21 <sup>CIP1</sup> +p16 <sup>INK4a</sup> siRNA	H	Culture n=14	Test de viabilité cellulaire; WB; ICC (Ki67)	Reprise de la prolifération y compris les cellules provenant de donneurs âgés	Pourquoi avoir fait p16+p21 simultanément et ne pas avoir essayé les 2 siRNA séparément afin de déterminer la protéine exerçant la plus forte inhibition sur le cycle

# **PARTIE EXPERIMENTALE**

## I. OBJECTIF DE CETTE THESE

L'objectif principal de cette thèse était de comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans l'inhibition de la prolifération des CE. Comme nous l'avons vu, de nombreuses études portant seulement sur quelques protéines ont été réalisées sur culture cellulaire ou sur cornées *ex vivo*. Aucuns travaux réalisés jusqu'à présent ne se sont penchés sur l'expression des transcrits des gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire et spécifiquement sur ceux contrôlant la transition G<sub>1</sub>/S justifiant ainsi notre étude (**Article 1**). Notre objectif de recherche était de déterminer les principaux gènes de régulation du cycle cellulaire exprimés ou non exprimés par les CE normales dans des conditions physiologiques puis comparer ces niveaux d'expression « physiologiques » à ceux retrouvés dans plusieurs conditions : 1/ cornées dites « *in vivo* », obtenues au bloc opératoire durant une kératoplastie transfixiante juste après trépanation, servant de modèle de référence 2/ cornées post mortem dans les conditions et les délais habituels du prélèvement de cornée en Europe afin de déterminer si ce modèle beaucoup plus facile à obtenir que des CE « *in vivo* » peut servir de modèle d'étude de substitution 3/ cornées en organoculture (OC) conventionnelle dans le but de vérifier si cette conservation relance une prolifération cellulaire 4/ CE en culture primaire confluente *in vitro* afin de déterminer si ce modèle reflète effectivement le même profil d'expression des transcrits que l'« *in vivo* » 5/ CE cultivées non confluentes donc encore prolifératives dans le but d'identifier les gènes impliqués dans l'inhibition proliférative et 6/ lignée de CE immortalisée servant de contrôle positif de prolifération. **Ce travail avait pour objectif de déterminer si des changements d'expression transcriptionnelle des gènes du cycle cellulaire interviennent au cours de l'OC et de la culture *in vitro*, afin de définir au mieux les cibles potentielles à inhiber ou celles à surexprimer afin de déclencher une prolifération cellulaire contrôlée.**

D'autre part, cette thèse avait pour objectif secondaire de développer une méthode d'analyse de la viabilité de l'endothélium pan-cornéenne (**Article 2**). La DCE est le critère principal reconnu pour délivrer une cornée. Sa valeur seuil comprise entre 2000 à 2400 cellules/mm<sup>2</sup> [653, 654] a été déterminée empiriquement il y a de nombreuses années. Dans la routine des banques de cornée, la DCE est déterminée le plus souvent par l'analyse informatique d'images de microscopie spéculaire (MS) pour la conservation à +4°C [655, 656]

(USA principalement) et de microscopie photonique (MP) pour la conservation en organoculture [657-663]. Malgré la généralisation ces dernières années des logiciels de comptage, ce comptage de routine ne reflète qu'imparfaitement le capital endothélial pan-cornéen. En effet : 1/il est évident que seules les CE visibles peuvent être comptées, qu'elles soient spontanément visible en MS ou rendues visibles par préparation au chlorure de sodium (0,9%) ou au sucrose (1,8%) en MP [654]. Or les zones où les CE sont invisibles peuvent correspondre soit à des CE qui ont desquamé (dans les plis cornéens en particulier) [664], soit le plus souvent à une zone où les contours cellulaires restent non ou mal visibles spontanément ou après la préparation ; 2/la reconnaissance des contours des CE est souvent difficile et peut fausser le comptage, ceci malgré leur extrapolation informatique (pointage des centres des CE en MS) ou leur traçage (fermeture des bords en MP) [660] ; 3/enfin, le comptage est fait sur un très petit échantillon de CE (50 à 300 CE), soit moins de 1/1000 du capital endothélial pan cornéen chez l'adulte qui est compris entre 200 à 300 000 CE. Plusieurs méthodes expérimentales, destructives donc non utilisables en routine clinique, ont été proposées depuis le Rouge Alizarine de Sperling dans les années 1970 pour évaluer la qualité endothéliale lors de la conservation des cornées ou dans d'autres applications. **Aucune d'entre elle n'a combiné un triple marquage à une analyse d'image de la totalité de la surface endothéliale dans le but de mesurer de la viabilité endothéliale pan-cornéenne.**

## II. ARTICLE 1

# **Cell cycle genes expression in adult human corneal endothelium**

**Aurélien Pipparelli, Gilles Thuret, Simone Piselli, Michel Peoc'h,  
Sophie Acquart, Olivier Garraud, Philippe Gain**

***Soumission Invest Ophthalmol Vis Sci***

### III. ARTICLE 2

## **Original method for pan-corneal endothelial viability assessment. Application to precut endothelial grafts by eye bank**

**Aurélien Pipparelli, Gilles Thuret, David Toubeau, He Zhiguo, Simone Piselli, Michel Peoc'h, Sabine Lefevre, Marc Muraine, Philippe Gain**

***Soumission Invest Ophthalmol Vis Sci***

## IV. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'analyse de la littérature permet de constater que l'étude de la régulation du cycle cellulaire de la cellule endothéliale cornéenne a fait appel jusqu'à présent à l'observation d'un nombre limité d'acteurs décrits dans d'autres modèles cellulaires. Ainsi, le postulat d'arrêt en phase G<sub>1</sub> de ces cellules repose sur l'observation de moins d'une dizaine de protéines clés en immunocytochimie. Les travaux initiaux ont été complétés, tout en restant cantonnés à quelques protéines. Nous avons choisi une démarche différente en analysant « en une fois » plus d'une centaine de transcrits des gènes des protéines régulatrices du cycle cellulaire grâce à la technologie des biopuces à ADN. L'autre originalité repose sur le choix des cellules endothéliales soumises à ce screening. Les CE cornéennes humaines ont été mises dans des conditions expérimentales différentes, correspondant à des statuts prolifératifs très variables. La référence est une population de CE centrales saines confluentes et non prolifératives, issue de boutons cornéens de patients greffés pour kératocone, à l'autre extrême, la seule lignée endothéliale cornéenne humaine immortalisée, maintenue au laboratoire depuis 1998 (offerte par les Pr J Bednarz et K Engelmann, Hambourg). Pour la première fois, nous avons mis en évidence des profils transcriptionnels avec une activation globale de l'expression des gènes en organoculture de routine et en culture primaire et l'expression accrue de gènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire en différents points comme DIRAS 3, GADD45A, p15 p16, p18 et p19 ou impliqués dans la régulation du cycle cellulaire des CE comme le complexe ubiquitine/protéasome (culines, APC...), laissant supposer que les freins antiprolifératifs sont encore plus complexes.

En parallèle à ces travaux de génomique, nous avons développé un outil innovant de mesure du capital en cellules endothéliales viables. Cette technique combine un triple marquage Hoechst/Ethidium/calcéine AM à l'analyse pan-endothéliale permettant d'évaluer le capital de CE réellement viable sur les greffons. Cette technique peut être appliquée à l'analyse de n'importe quel procédé chirurgical ou non, susceptible d'altérer directement ou indirectement l'endothélium cornéen. Nous l'avons appliqué à la mesure de la toxicité de l'électrotransfert de gène dans l'endothélium de cornées humaines en organoculture puis à l'analyse de la survie endothéliale après découpe d'un greffon endothélial et envoi à distance.

Dans un futur proche, elle servira à déterminer la viabilité endothéliale après stimulation de la prolifération endothéliale *in situ*.

L'un des objectifs du laboratoire BiGC est la compréhension des mécanismes moléculaires intervenant dans l'inhibition de la prolifération des CE afin de pouvoir déclencher et contrôler la division de ces cellules. Il sera alors possible d'enrichir les greffons lors de l'étape de conservation à la banque, afin de diminuer la perte de greffons et de greffer des cornées à DCE très élevée, donc plus durables chez le receveur. La culture de masse de CE nécessaire au développement des greffons endothéliaux bio-artificiels deviendra également envisageable. Enfin, cela permettra de mieux comprendre la dystrophie de Fuchs pour proposer des stratégies de traitement des stades précoces. Dans cette optique, un troisième travail est en cours afin d'évaluer les effets d'une surexpression des cycline D1 et E1 sur la progression dans le cycle des CE. Ces deux protéines majeures interviennent dans la transition G<sub>1</sub>/S du cycle cellulaire. Nous supposons qu'une surexpression de ces cyclines induira une reprise du cycle cellulaire et relancera la prolifération des CE. Les clonages sont d'ors et déjà réalisés ainsi que l'optimisation de la transfection dans les CE *in vitro*. L'étude de l'impact proprement dit sur la prolifération des CE est en cours d'étude. Enfin, dans le cadre d'un postdoctorat, une collaboration débutera en novembre 2010 avec le laboratoire de Recherche sur la Cornée et le Cristallin, Hôpital Ophtalmique Universitaire Jules Gonin, Lausanne, (Dr François MAJO, MD, PhD ; Michaël NICOLAS, PhD). L'objectif est de faire exprimer le gène hTERT (« *human TElomerase Reverse Transcriptase* »), codant pour la télomérase, de façon transitoire et contrôlée dans les CE de greffons humains conservés en organoculture. L'utilisation d'un lentivirus non répliquatif, non intégratif et possédant un transgène inductible devrait permettre d'atteindre cet objectif. Les résultats attendus sont une limitation de la mort des CE par apoptose et le déclenchement d'une prolifération cellulaire transitoire capable d'augmenter le capital de CE.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Stocker FW. The endothelium of the cornea and its clinical implications. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1953;51:669-786.
2. Nurse P. A long twentieth century of the cell cycle and beyond. *Cell* 2000;100:71-78.
3. McCully EK, Robinow CF. Mitosis in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*: a comparative study with light and electron microscopy. *J Cell Sci* 1971;9:475-507.
4. Mitchison TJ, Salmon ED. Mitosis: a history of division. *Nat Cell Biol* 2001;3:E17-21.
5. Darzynkiewicz Z, Traganos F, Melamed MR. New cell cycle compartments identified by multiparameter flow cytometry. *Cytometry* 1980;1:98-108.
6. Smith JA. The cell cycle and related concepts in cell proliferation. *J Pathol* 1982;136:149-166.
7. Howard A, Pelc SR. Nuclear incorporation of P<sup>32</sup> as demonstrated by autoradiographs. *Expl Cell Res* 1951;2:178-187.
8. Pommier Y, Kohn KW. [Cell cycle and checkpoints in oncology: new therapeutic targets]. *Med Sci (Paris)* 2003;19:173-186.
9. Stewart ZA, Westfall MD, Pietenpol JA. Cell-cycle dysregulation and anticancer therapy. *Trends Pharmacol Sci* 2003;24:139-145.
10. Pardee AB. A restriction point for control of normal animal cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1974;71:1286-1290.
11. Pardee AB. Biochemical and molecular events regulating cell proliferation. *J Pathol* 1986;149:1-2.
12. Woollard A, Nurse P. G1 regulation and checkpoints operating around START in fission yeast. *Bioessays* 1995;17:481-490.
13. Planas-Silva MD, Weinberg RA. The restriction point and control of cell proliferation. *Curr Opin Cell Biol* 1997;9:768-772.
14. Temin HM. Stimulation by serum of multiplication of stationary chicken cells. *J Cell Physiol* 1971;78:161-170.
15. Zetterberg A, Larsson O, Wiman KG. What is the restriction point? *Curr Opin Cell Biol* 1995;7:835-842.
16. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. *Molecular biology of the cell*. 3<sup>rd</sup> edition.; 1994.
17. Cooper S. The continuum model and c-myc synthesis during the division cycle. *J Theor Biol* 1988;135:393-400.
18. Tsanaclis AM, Brem SS, Gately S, Schipper HM, Wang E. Statin immunolocalization in human brain tumors. Detection of noncycling cells using a novel marker of cell quiescence. *Cancer* 1991;68:786-792.

19. Pellicciari C, Mangiarotti R, Bottone MG, Danova M, Wang E. Identification of resting cells by dual-parameter flow cytometry of statin expression and DNA content. *Cytometry* 1995;21:329-337.
20. Mangiarotti R, Bottone MG, Danova M, Pellicciari C. Bivariate flow cytometric analysis of DNA content versus immunopositivity for ribonucleotide reductase M1 subunit in the cell cycle. *Cytometry* 1998;32:78-85.
21. Wright N, Alison M. *The biology of epithelial cell populations.*: Clarendon Press. Oxford.; 1984.
22. Baserga R. The biology of cell reproduction. *Harvard University Press* 1985.
23. Grana X, Reddy EP. Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, cyclin dependent kinases (CDKs), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs). *Oncogene* 1995;11:211-219.
24. Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 1999;13:1501-1512.
25. Lavia P, Jansen-Durr P. E2F target genes and cell-cycle checkpoint control. *Bioessays* 1999;21:221-230.
26. Rao PN, Johnson RT. Mammalian cell fusion: studies on the regulation of DNA synthesis and mitosis. *Nature* 1970;225:159-164.
27. Johnson RT, Rao PN. Mammalian cell fusion: induction of premature chromosome condensation in interphase nuclei. *Nature* 1970;226:717-722.
28. Johnson RT, Rao PN. Nucleo-cytoplasmic interactions in the achievement of nuclear synchrony in DNA synthesis and mitosis in multinucleate cells. *Biol Rev Camb Philos Soc* 1971;46:97-155.
29. Ecker RE, Smith LD. The nature and fate of *Rana pipiens* proteins synthesized during maturation and early cleavage. *Dev Biol* 1971;24:559-576.
30. Masui Y, Markert CL. Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *J Exp Zool* 1971;177:129-145.
31. Reynhout JK, Smith LD. Studies on the appearance and nature of a maturation-inducing factor in the cytoplasm of amphibian oocytes exposed to progesterone. *Dev Biol* 1974;38:394-400.
32. Kishimoto T, Kanatani H. Cytoplasmic factor responsible for germinal vesicle breakdown and meiotic maturation in starfish oocyte. *Nature* 1976;260:321-322.
33. Kishimoto T, Kuriyama R, Kondo H, Kanatani H. Generality of the action of various maturation-promoting factors. *Exp Cell Res* 1982;137:121-126.
34. Wasserman WJ, Smith LD. The cyclic behavior of a cytoplasmic factor controlling nuclear membrane breakdown. *J Cell Biol* 1978;78:R15-22.
35. Gerhart J, Wu M, Kirschner M. Cell cycle dynamics of an M-phase-specific cytoplasmic factor in *Xenopus laevis* oocytes and eggs. *J Cell Biol* 1984;98:1247-1255.
36. Sunkara PS, Wright DA, Rao PN. Mitotic factors from mammalian cells: a preliminary characterization. *J Supramol Struct* 1979;11:189-195.

37. Weintraub H, Buscaglia M, Ferrez M, Weiller S, Boulet A, Fabre F, Baulieu EE. [Demonstration of maturation promoting factor activity in *Saccharomyces cerevisiae*]. *C R Seances Acad Sci III* 1982;295:787-790.
38. Lohka MJ. Mitotic control by metaphase-promoting factor and cdc proteins. *J Cell Sci* 1989;92 ( Pt 2):131-135.
39. Doree M. Control of M-phase by maturation-promoting factor. *Curr Opin Cell Biol* 1990;2:269-273.
40. Maller J, Wu M, Gerhart JC. Changes in protein phosphorylation accompanying maturation of *Xenopus laevis* oocytes. *Dev Biol* 1977;58:295-312.
41. Picard A, Peaucellier G, le Bouffant F, Le Peuch C, Doree M. Role of protein synthesis and proteases in production and inactivation of maturation-promoting activity during meiotic maturation of starfish oocytes. *Dev Biol* 1985;109:311-320.
42. Labbe JC, Picard A, Karsenti E, Doree M. An M-phase-specific protein kinase of *Xenopus* oocytes: partial purification and possible mechanism of its periodic activation. *Dev Biol* 1988;127:157-169.
43. Hartwell LH, Culotti J, Pringle JR, Reid BJ. Genetic control of the cell division cycle in yeast. *Science* 1974;183:46-51.
44. Hartwell LH, Culotti J, Reid B. Genetic control of the cell-division cycle in yeast. I. Detection of mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1970;66:352-359.
45. Nasmyth KA, Reed SI. Isolation of genes by complementation in yeast: molecular cloning of a cell-cycle gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980;77:2119-2123.
46. Lorincz AT, Reed SI. Primary structure homology between the product of yeast cell division control gene CDC28 and vertebrate oncogenes. *Nature* 1984;307:183-185.
47. Reed SI, Hadwiger JA, Lorincz AT. Protein kinase activity associated with the product of the yeast cell division cycle gene CDC28. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985;82:4055-4059.
48. Nurse P. Genetic control of cell size at cell division in yeast. *Nature* 1975;256:547-551.
49. Nurse P. Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature* 1990;344:503-508.
50. Nasmyth K. A prize for proliferation. *Cell* 2001;107:689-701.
51. Beach D, Durkacz B, Nurse P. Functionally homologous cell cycle control genes in budding and fission yeast. *Nature* 1982;300:706-709.
52. Nurse P, Thuriaux P. Regulatory genes controlling mitosis in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* 1980;96:627-637.
53. Lohka MJ, Hayes MK, Maller JL. Purification of maturation-promoting factor, an intracellular regulator of early mitotic events. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85:3009-3013.
54. Hayles J, Beach D, Durkacz B, Nurse P. The fission yeast cell cycle control gene *cdc2*: isolation of a sequence *suc1* that suppresses *cdc2* mutant function. *Mol Gen Genet* 1986;202:291-293.

55. Brizuela L, Draetta G, Beach D. p13<sup>suc1</sup> acts in the fission yeast cell division cycle as a component of the p34<sup>cdc2</sup> protein kinase. *Embo J* 1987;6:3507-3514.
56. Gautier J, Norbury C, Lohka M, Nurse P, Maller J. Purified maturation-promoting factor contains the product of a *Xenopus* homolog of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2+*. *Cell* 1988;54:433-439.
57. Dunphy WG, Brizuela L, Beach D, Newport J. The *Xenopus cdc2* protein is a component of MPF, a cytoplasmic regulator of mitosis. *Cell* 1988;54:423-431.
58. Labbe JC, Lee MG, Nurse P, Picard A, Doree M. Activation at M-phase of a protein kinase encoded by a starfish homologue of the cell cycle control gene *cdc2+*. *Nature* 1988;335:251-254.
59. Labbe JC, Capony JP, Caput D, Cavadore JC, Derancourt J, Kaghad M, Lelias JM, Picard A, Doree M. MPF from starfish oocytes at first meiotic metaphase is a heterodimer containing one molecule of *cdc2* and one molecule of cyclin B. *Embo J* 1989;8:3053-3058.
60. Meijer L, Arion D, Golsteyn R, Pines J, Brizuela L, Hunt T, Beach D. Cyclin is a component of the sea urchin egg M-phase specific histone H1 kinase. *Embo J* 1989;8:2275-2282.
61. Evans T, Rosenthal ET, Youngblom J, Distel D, Hunt T. Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* 1983;33:389-396.
62. Pines J, Hunt T. Molecular cloning and characterization of the mRNA for cyclin from sea urchin eggs. *Embo J* 1987;6:2987-2995.
63. Murray AW, Solomon MJ, Kirschner MW. The role of cyclin synthesis and degradation in the control of maturation promoting factor activity. *Nature* 1989;339:280-286.
64. Murray AW, Kirschner MW. Cyclin synthesis drives the early embryonic cell cycle. *Nature* 1989;339:275-280.
65. Minshull J, Blow JJ, Hunt T. Translation of cyclin mRNA is necessary for extracts of activated *xenopus* eggs to enter mitosis. *Cell* 1989;56:947-956.
66. Draetta G, Luca F, Westendorf J, Brizuela L, Ruderman J, Beach D. Cdc2 protein kinase is complexed with both cyclin A and B: evidence for proteolytic inactivation of MPF. *Cell* 1989;56:829-838.
67. Minshull J, Pines J, Golsteyn R, Standart N, Mackie S, Colman A, Blow J, Ruderman JV, Wu M, Hunt T. The role of cyclin synthesis, modification and destruction in the control of cell division. *J Cell Sci Suppl* 1989;12:77-97.
68. Draetta G, Beach D. The mammalian *cdc2* protein kinase: mechanisms of regulation during the cell cycle. *J Cell Sci Suppl* 1989;12:21-27.
69. Doree M, Hunt T. From Cdc2 to Cdk1: when did the cell cycle kinase join its cyclin partner? *J Cell Sci* 2002;115:2461-2464.
70. Hunt T. Maturation promoting factor, cyclin and the control of M-phase. *Curr Opin Cell Biol* 1989;1:268-274.

71. Pines J, Hunter T. Isolation of a human cyclin cDNA: evidence for cyclin mRNA and protein regulation in the cell cycle and for interaction with p34cdc2. *Cell* 1989;58:833-846.
72. Gautier J, Maller JL. Cyclin B in *Xenopus* oocytes: implications for the mechanism of pre-MPF activation. *Embo J* 1991;10:177-182.
73. Lehner CF, O'Farrell PH. *Drosophila* cdc2 homologs: a functional homolog is coexpressed with a cognate variant. *Embo J* 1990;9:3573-3581.
74. Cavalla P, Schiffer D. Cell cycle and proliferation markers in neuroepithelial tumors. *Anticancer Res* 1997;17:4135-4143.
75. Puri P, Maclachlan T, Levrero M, Giordano A. The intrinsic cell cycle: from yeast to mammals., *In The Mol Basis Cell Cycle Growth Control*: Ed. G. Stein.; 1999:15-79.
76. Malumbres M, Barbacid M. Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem Sci* 2005;30:630-641.
77. Morgan DO. Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1997;13:261-291.
78. Bregman DB, Pestell RG, Kidd VJ. Cell cycle regulation and RNA polymerase II. *Front Biosci* 2000;5:D244-257.
79. Fisher RP. Secrets of a double agent: CDK7 in cell-cycle control and transcription. *J Cell Sci* 2005;118:5171-5180.
80. Ducommun B, Brambilla P, Felix MA, Franza BR, Jr., Karsenti E, Draetta G. cdc2 phosphorylation is required for its interaction with cyclin. *Embo J* 1991;10:3311-3319.
81. Endicott JA, Nurse P, Johnson LN. Mutational analysis supports a structural model for the cell cycle protein kinase p34. *Protein Eng* 1994;7:243-253.
82. Demetrick DJ, Zhang H, Beach DH. Chromosomal mapping of human CDK2, CDK4, and CDK5 cell cycle kinase genes. *Cytogenet Cell Genet* 1994;66:72-74.
83. Matsushime H, Ewen ME, Strom DK, Kato JY, Hanks SK, Roussel MF, Sherr CJ. Identification and properties of an atypical catalytic subunit (p34PSK-J3/cdk4) for mammalian D type G1 cyclins. *Cell* 1992;71:323-334.
84. Matsushime H, Quelle DE, Shurtleff SA, Shibuya M, Sherr CJ, Kato JY. D-type cyclin-dependent kinase activity in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 1994;14:2066-2076.
85. Gladden AB, Diehl JA. Location, location, location: the role of cyclin D1 nuclear localization in cancer. *J Cell Biochem* 2005;96:906-913.
86. Meyerson M, Harlow E. Identification of G1 kinase activity for cdk6, a novel cyclin D partner. *Mol Cell Biol* 1994;14:2077-2086.
87. Tsutsui T, Hesabi B, Moons DS, Pandolfi PP, Hansel KS, Koff A, Kiyokawa H. Targeted disruption of CDK4 delays cell cycle entry with enhanced p27(Kip1) activity. *Mol Cell Biol* 1999;19:7011-7019.
88. Pagano M, Pepperkok R, Lukas J, Baldin V, Ansorge W, Bartek J, Draetta G. Regulation of the cell cycle by the cdk2 protein kinase in cultured human fibroblasts. *J Cell Biol* 1993;121:101-111.

89. D'Angiolella V, Costanzo V, Gottesman ME, Avvedimento EV, Gautier J, Grieco D. Role for cyclin-dependent kinase 2 in mitosis exit. *Curr Biol* 2001;11:1221-1226.
90. Pines J, Hunter T. Human cyclin A is adenovirus E1A-associated protein p60 and behaves differently from cyclin B. *Nature* 1990;346:760-763.
91. Tsai LH, Lees E, Faha B, Harlow E, Riabowol K. The cdk2 kinase is required for the G1-to-S transition in mammalian cells. *Oncogene* 1993;8:1593-1602.
92. Lees E, Faha B, Dulic V, Reed SI, Harlow E. Cyclin E/cdk2 and cyclin A/cdk2 kinases associate with p107 and E2F in a temporally distinct manner. *Genes Dev* 1992;6:1874-1885.
93. Fisher RP, Morgan DO. A novel cyclin associates with MO15/CDK7 to form the CDK-activating kinase. *Cell* 1994;78:713-724.
94. Wolowiec D, Deviller P, Simonin D, Souchier C, Rimokh R, Benchaib M, Bryon PA, Ffrench M. Cdk1 is a marker of proliferation in human lymphoid cells. *Int J Cancer* 1995;61:381-388.
95. Ohi R, Gould KL. Regulating the onset of mitosis. *Curr Opin Cell Biol* 1999;11:267-273.
96. Lew DJ, Kornbluth S. Regulatory roles of cyclin dependent kinase phosphorylation in cell cycle control. *Curr Opin Cell Biol* 1996;8:795-804.
97. Fisher RP. CDKs and cyclins in transition(s). *Curr Opin Genet Dev* 1997;7:32-38.
98. Sharma P, Sharma M, Amin ND, Albers RW, Pant HC. Regulation of cyclin-dependent kinase 5 catalytic activity by phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:11156-11160.
99. Tang D, Wang JH. Cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) and neuron-specific Cdk5 activators. *Prog Cell Cycle Res* 1996;2:205-216.
100. Dhavan R, Tsai LH. A decade of CDK5. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2:749-759.
101. Smith DS, Tsai LH. Cdk5 behind the wheel: a role in trafficking and transport? *Trends Cell Biol* 2002;12:28-36.
102. Kobayashi H, Stewart E, Poon R, Adamczewski JP, Gannon J, Hunt T. Identification of the domains in cyclin A required for binding to, and activation of, p34cdc2 and p32cdk2 protein kinase subunits. *Mol Biol Cell* 1992;3:1279-1294.
103. Lees EM, Harlow E. Sequences within the conserved cyclin box of human cyclin A are sufficient for binding to and activation of cdc2 kinase. *Mol Cell Biol* 1993;13:1194-1201.
104. Pines J. Cyclins and their associated cyclin-dependent kinases in the human cell cycle. *Biochem Soc Trans* 1993;21:921-925.
105. Koff A, Cross F, Fisher A, Schumacher J, Leguellec K, Philippe M, Roberts JM. Human cyclin E, a new cyclin that interacts with two members of the CDC2 gene family. *Cell* 1991;66:1217-1228.
106. Lew DJ, Dulic V, Reed SI. Isolation of three novel human cyclins by rescue of G1 cyclin (Cln) function in yeast. *Cell* 1991;66:1197-1206.
107. Sherr CJ. G1 phase progression: cycling on cue. *Cell* 1994;79:551-555.

108. el-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 1993;75:817-825.
109. Guan KL, Jenkins CW, Li Y, Nichols MA, Wu X, O'Keefe CL, Matera AG, Xiong Y. Growth suppression by p18, a p16INK4/MTS1- and p14INK4B/MTS2-related CDK6 inhibitor, correlates with wild-type pRb function. *Genes Dev* 1994;8:2939-2952.
110. Lukas J, Bartkova J, Bartek J. Convergence of mitogenic signalling cascades from diverse classes of receptors at the cyclin D-cyclin-dependent kinase-pRb-controlled G1 checkpoint. *Mol Cell Biol* 1996;16:6917-6925.
111. Murray AW. Cell cycle. Sunburnt fission yeast. *Nature* 1993;363:302.
112. Ajchenbaum F, Ando K, DeCaprio JA, Griffin JD. Independent regulation of human D-type cyclin gene expression during G1 phase in primary human T lymphocytes. *J Biol Chem* 1993;268:4113-4119.
113. Lundberg AS, Weinberg RA. Functional inactivation of the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least two distinct cyclin-cdk complexes. *Mol Cell Biol* 1998;18:753-761.
114. Magnaghi-Jaulin L, Groisman R, Naguibneva I, Robin P, Lorain S, Le Villain JP, Troalen F, Trouche D, Harel-Bellan A. Retinoblastoma protein represses transcription by recruiting a histone deacetylase. *Nature* 1998;391:601-605.
115. Zhang HS, Gavin M, Dahiya A, Postigo AA, Ma D, Luo RX, Harbour JW, Dean DC. Exit from G1 and S phase of the cell cycle is regulated by repressor complexes containing HDAC-Rb-hSWI/SNF and Rb-hSWI/SNF. *Cell* 2000;101:79-89.
116. Aktas H, Cai H, Cooper GM. Ras links growth factor signaling to the cell cycle machinery via regulation of cyclin D1 and the Cdk inhibitor p27KIP1. *Mol Cell Biol* 1997;17:3850-3857.
117. Diehl JA, Zindy F, Sherr CJ. Inhibition of cyclin D1 phosphorylation on threonine-286 prevents its rapid degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev* 1997;11:957-972.
118. Dulic V, Lees E, Reed SI. Association of human cyclin E with a periodic G1-S phase protein kinase. *Science* 1992;257:1958-1961.
119. Koff A, Giordano A, Desai D, Yamashita K, Harper JW, Elledge S, Nishimoto T, Morgan DO, Franza BR, Roberts JM. Formation and activation of a cyclin E-cdk2 complex during the G1 phase of the human cell cycle. *Science* 1992;257:1689-1694.
120. Hatakeyama M, Brill JA, Fink GR, Weinberg RA. Collaboration of G1 cyclins in the functional inactivation of the retinoblastoma protein. *Genes Dev* 1994;8:1759-1771.
121. Resnitzky D, Gossen M, Bujard H, Reed SI. Acceleration of the G1/S phase transition by expression of cyclins D1 and E with an inducible system. *Mol Cell Biol* 1994;14:1669-1679.
122. Ohtsubo M, Theodoras AM, Schumacher J, Roberts JM, Pagano M. Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1-to-S phase transition. *Mol Cell Biol* 1995;15:2612-2624.
123. Won KA, Reed SI. Activation of cyclin E/CDK2 is coupled to site-specific autophosphorylation and ubiquitin-dependent degradation of cyclin E. *Embo J* 1996;15:4182-4193.

124. Bartek J, Lukas J. Pathways governing G1/S transition and their response to DNA damage. *FEBS Lett* 2001;490:117-122.
125. Clurman BE, Sheaff RJ, Thress K, Groudine M, Roberts JM. Turnover of cyclin E by the ubiquitin-proteasome pathway is regulated by cdk2 binding and cyclin phosphorylation. *Genes Dev* 1996;10:1979-1990.
126. Glotzer M, Murray AW, Kirschner MW. Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* 1991;349:132-138.
127. Sudakin V, Ganoth D, Dahan A, Heller H, Hershko J, Luca FC, Ruderman JV, Hershko A. The cyclosome, a large complex containing cyclin-selective ubiquitin ligase activity, targets cyclins for destruction at the end of mitosis. *Mol Biol Cell* 1995;6:185-197.
128. Roy LM, Swenson KI, Walker DH, Gabrielli BG, Li RS, Piwnica-Worms H, Maller JL. Activation of p34cdc2 kinase by cyclin A. *J Cell Biol* 1991;113:507-514.
129. Swenson KI, Farrell KM, Ruderman JV. The clam embryo protein cyclin A induces entry into M phase and the resumption of meiosis in *Xenopus* oocytes. *Cell* 1986;47:861-870.
130. Pines J, Hunter T. Human cyclins A and B1 are differentially located in the cell and undergo cell cycle-dependent nuclear transport. *J Cell Biol* 1991;115:1-17.
131. Carbonaro-Hall D, Williams R, Wu L, Warburton D, Zeichner-David M, MacDougall M, Tolo V, Hall F. G1 expression and multistage dynamics of cyclin A in human osteosarcoma cells. *Oncogene* 1993;8:1649-1659.
132. Elledge SJ, Richman R, Hall FL, Williams RT, Lodgson N, Harper JW. CDK2 encodes a 33-kDa cyclin A-associated protein kinase and is expressed before CDC2 in the cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:2907-2911.
133. Rosenblatt J, Gu Y, Morgan DO. Human cyclin-dependent kinase 2 is activated during the S and G2 phases of the cell cycle and associates with cyclin A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:2824-2828.
134. Rosenberg AR, Zindy F, Le Deist F, Mouly H, Metezeau P, Brechot C, Lamas E. Overexpression of human cyclin A advances entry into S phase. *Oncogene* 1995;10:1501-1509.
135. Pagano M, Pepperkok R, Verde F, Ansorge W, Draetta G. Cyclin A is required at two points in the human cell cycle. *Embo J* 1992;11:961-971.
136. Cardoso MC, Leonhardt H, Nadal-Ginard B. Reversal of terminal differentiation and control of DNA replication: cyclin A and Cdk2 specifically localize at subnuclear sites of DNA replication. *Cell* 1993;74:979-992.
137. Pines J, Hunter T. The differential localization of human cyclins A and B is due to a cytoplasmic retention signal in cyclin B. *Embo J* 1994;13:3772-3781.
138. Hagting A, Karlsson C, Clute P, Jackman M, Pines J. MPF localization is controlled by nuclear export. *Embo J* 1998;17:4127-4138.
139. Toyoshima F, Moriguchi T, Wada A, Fukuda M, Nishida E. Nuclear export of cyclin B1 and its possible role in the DNA damage-induced G2 checkpoint. *Embo J* 1998;17:2728-2735.

140. Hagting A, Jackman M, Simpson K, Pines J. Translocation of cyclin B1 to the nucleus at prophase requires a phosphorylation-dependent nuclear import signal. *Curr Biol* 1999;9:680-689.
141. King RW, Peters JM, Tugendreich S, Rolfe M, Hieter P, Kirschner MW. A 20S complex containing CDC27 and CDC16 catalyzes the mitosis-specific conjugation of ubiquitin to cyclin B. *Cell* 1995;81:279-288.
142. Simanis V, Nurse P. The cell cycle control gene *cdc2+* of fission yeast encodes a protein kinase potentially regulated by phosphorylation. *Cell* 1986;45:261-268.
143. Wittenberg C, Reed SI. Control of the yeast cell cycle is associated with assembly/disassembly of the Cdc28 protein kinase complex. *Cell* 1988;54:1061-1072.
144. Draetta G, Beach D. Activation of *cdc2* protein kinase during mitosis in human cells: cell cycle-dependent phosphorylation and subunit rearrangement. *Cell* 1988;54:17-26.
145. Morgan DO. Principles of CDK regulation. *Nature* 1995;374:131-134.
146. Breeden LL. Cyclin transcription: Timing is everything. *Curr Biol* 2000;10:R586-588.
147. De Bondt HL, Rosenblatt J, Jancarik J, Jones HD, Morgan DO, Kim SH. Crystal structure of cyclin-dependent kinase 2. *Nature* 1993;363:595-602.
148. Coleman TR, Dunphy WG. Cdc2 regulatory factors. *Curr Opin Cell Biol* 1994;6:877-882.
149. Pavletich NP. Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdks, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors. *J Mol Biol* 1999;287:821-828.
150. Fisher RP, Jin P, Chamberlin HM, Morgan DO. Alternative mechanisms of CAK assembly require an assembly factor or an activating kinase. *Cell* 1995;83:47-57.
151. Johnson LN. The regulation of protein phosphorylation. *Biochem Soc Trans* 2009;37:627-641.
152. Elledge SJ, Harper JW. Cdk inhibitors: on the threshold of checkpoints and development. *Curr Opin Cell Biol* 1994;6:847-852.
153. Hall M, Bates S, Peters G. Evidence for different modes of action of cyclin-dependent kinase inhibitors: p15 and p16 bind to kinases, p21 and p27 bind to cyclins. *Oncogene* 1995;11:1581-1588.
154. Aprelikova O, Xiong Y, Liu ET. Both p16 and p21 families of cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitors block the phosphorylation of cyclin-dependent kinases by the CDK-activating kinase. *J Biol Chem* 1995;270:18195-18197.
155. Roussel MF. The INK4 family of cell cycle inhibitors in cancer. *Oncogene* 1999;18:5311-5317.
156. Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 1993;366:704-707.
157. Hannon GJ, Beach D. p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature* 1994;371:257-261.
158. Hirai H, Roussel MF, Kato JY, Ashmun RA, Sherr CJ. Novel INK4 proteins, p19 and p18, are specific inhibitors of the cyclin D-dependent kinases CDK4 and CDK6. *Mol Cell Biol* 1995;15:2672-2681.

159. Brotherton DH, Dhanaraj V, Wick S, Brizuela L, Domaille PJ, Volyanik E, Xu X, Parisini E, Smith BO, Archer SJ, Serrano M, Brenner SL, Blundell TL, Laue ED. Crystal structure of the complex of the cyclin D-dependent kinase Cdk6 bound to the cell-cycle inhibitor p19INK4d. *Nature* 1998;395:244-250.
160. Russo AA, Tong L, Lee JO, Jeffrey PD, Pavletich NP. Structural basis for inhibition of the cyclin-dependent kinase Cdk6 by the tumour suppressor p16INK4a. *Nature* 1998;395:237-243.
161. Lukas J, Parry D, Aagaard L, Mann DJ, Bartkova J, Strauss M, Peters G, Bartek J. Retinoblastoma-protein-dependent cell-cycle inhibition by the tumour suppressor p16. *Nature* 1995;375:503-506.
162. Martinez LA, Chen Y, Fischer SM, Conti CJ. Coordinated changes in cell cycle machinery occur during keratinocyte terminal differentiation. *Oncogene* 1999;18:397-406.
163. Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 1993;75:805-816.
164. Harper JW, Elledge SJ, Keyomarsi K, Dynlacht B, Tsai LH, Zhang P, Dobrowolski S, Bai C, Connell-Crowley L, Swindell E, et al. Inhibition of cyclin-dependent kinases by p21. *Mol Biol Cell* 1995;6:387-400.
165. Boulaire J, Fotedar A, Fotedar R. The functions of the cdk-cyclin kinase inhibitor p21WAF1. *Pathol Biol (Paris)* 2000;48:190-202.
166. Polyak K, Lee MH, Erdjument-Bromage H, Koff A, Roberts JM, Tempst P, Massague J. Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell* 1994;78:59-66.
167. Polyak K, Kato JY, Solomon MJ, Sherr CJ, Massague J, Roberts JM, Koff A. p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev* 1994;8:9-22.
168. Toyoshima H, Hunter T. p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell* 1994;78:67-74.
169. Lee MH, Reynisdottir I, Massague J. Cloning of p57KIP2, a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution. *Genes Dev* 1995;9:639-649.
170. Matsuoka S, Edwards MC, Bai C, Parker S, Zhang P, Baldini A, Harper JW, Elledge SJ. p57KIP2, a structurally distinct member of the p21CIP1 Cdk inhibitor family, is a candidate tumor suppressor gene. *Genes Dev* 1995;9:650-662.
171. Goubin F, Ducommun B. Identification of binding domains on the p21Cip1 cyclin-dependent kinase inhibitor. *Oncogene* 1995;10:2281-2287.
172. Cayrol C, Knibiehler M, Ducommun B. p21 binding to PCNA causes G1 and G2 cell cycle arrest in p53-deficient cells. *Oncogene* 1998;16:311-320.
173. Niculescu AB, 3rd, Chen X, Smeets M, Hengst L, Prives C, Reed SI. Effects of p21(Cip1/Waf1) at both the G1/S and the G2/M cell cycle transitions: pRb is a critical determinant in blocking DNA replication and in preventing endoreduplication. *Mol Cell Biol* 1998;18:629-643.

174. Medema RH, Klompaker R, Smits VA, Rijksen G. p21waf1 can block cells at two points in the cell cycle, but does not interfere with processive DNA-replication or stress-activated kinases. *Oncogene* 1998;16:431-441.
175. Fotedar R, Fitzgerald P, Rousselle T, Cannella D, Doree M, Messier H, Fotedar A. p21 contains independent binding sites for cyclin and cdk2: both sites are required to inhibit cdk2 kinase activity. *Oncogene* 1996;12:2155-2164.
176. Chen J, Saha P, Kornbluth S, Dynlacht BD, Dutta A. Cyclin-binding motifs are essential for the function of p21CIP1. *Mol Cell Biol* 1996;16:4673-4682.
177. Lin J, Reichner C, Wu X, Levine AJ. Analysis of wild-type and mutant p21WAF-1 gene activities. *Mol Cell Biol* 1996;16:1786-1793.
178. Russo AA, Jeffrey PD, Patten AK, Massague J, Pavletich NP. Crystal structure of the p27Kip1 cyclin-dependent-kinase inhibitor bound to the cyclin A-Cdk2 complex. *Nature* 1996;382:325-331.
179. Meijer L. Le cycle de division cellulaire et sa régulation. *Oncologie* 2003;5:311-326.
180. Cheng M, Olivier P, Diehl JA, Fero M, Roussel MF, Roberts JM, Sherr CJ. The p21(Cip1) and p27(Kip1) CDK 'inhibitors' are essential activators of cyclin D-dependent kinases in murine fibroblasts. *Embo J* 1999;18:1571-1583.
181. LaBaer J, Garrett MD, Stevenson LF, Slingerland JM, Sandhu C, Chou HS, Fattaey A, Harlow E. New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors. *Genes Dev* 1997;11:847-862.
182. Bloom J, Pagano M. Deregulated degradation of the cdk inhibitor p27 and malignant transformation. *Semin Cancer Biol* 2003;13:41-47.
183. Kato JY, Matsuoka M, Polyak K, Massague J, Sherr CJ. Cyclic AMP-induced G1 phase arrest mediated by an inhibitor (p27Kip1) of cyclin-dependent kinase 4 activation. *Cell* 1994;79:487-496.
184. Delavaine L, La Thangue NB. Control of E2F activity by p21Waf1/Cip1. *Oncogene* 1999;18:5381-5392.
185. Vidal A, Koff A. Cell-cycle inhibitors: three families united by a common cause. *Gene* 2000;247:1-15.
186. Coats S, Flanagan WM, Nourse J, Roberts JM. Requirement of p27Kip1 for restriction point control of the fibroblast cell cycle. *Science* 1996;272:877-880.
187. Sheaff RJ, Groudine M, Gordon M, Roberts JM, Clurman BE. Cyclin E-CDK2 is a regulator of p27Kip1. *Genes Dev* 1997;11:1464-1478.
188. Xu X, Nakano T, Wick S, Dubay M, Brizuela L. Mechanism of Cdk2/Cyclin E inhibition by p27 and p27 phosphorylation. *Biochemistry* 1999;38:8713-8722.
189. Pagano M, Tam SW, Theodoras AM, Beer-Romero P, Del Sal G, Chau V, Yew PR, Draetta GF, Rolfe M. Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Science* 1995;269:682-685.
190. Vlach J, Hennecke S, Amati B. Phosphorylation-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Embo J* 1997;16:5334-5344.
191. Ewen ME, Sluss HK, Whitehouse LL, Livingston DM. TGF beta inhibition of Cdk4 synthesis is linked to cell cycle arrest. *Cell* 1993;74:1009-1020.

192. Gu Y, Rosenblatt J, Morgan DO. Cell cycle regulation of CDK2 activity by phosphorylation of Thr160 and Tyr15. *Embo J* 1992;11:3995-4005.
193. Solomon MJ, Lee T, Kirschner MW. Role of phosphorylation in p34cdc2 activation: identification of an activating kinase. *Mol Biol Cell* 1992;3:13-27.
194. Matsuoka M, Kato JY, Fisher RP, Morgan DO, Sherr CJ. Activation of cyclin-dependent kinase 4 (cdk4) by mouse MO15-associated kinase. *Mol Cell Biol* 1994;14:7265-7275.
195. Kato JY, Matsuoka M, Strom DK, Sherr CJ. Regulation of cyclin D-dependent kinase 4 (cdk4) by cdk4-activating kinase. *Mol Cell Biol* 1994;14:2713-2721.
196. Marcote MJ, Knighton DR, Basi G, Sowadski JM, Brambilla P, Draetta G, Taylor SS. A three-dimensional model of the Cdc2 protein kinase: localization of cyclin- and Suc1-binding regions and phosphorylation sites. *Mol Cell Biol* 1993;13:5122-5131.
197. Thuret JY, Valay JG, Faye G, Mann C. Civ1 (CAK in vivo), a novel Cdk-activating kinase. *Cell* 1996;86:565-576.
198. Lee TH, Turck C, Kirschner MW. Inhibition of cdc2 activation by INH/PP2A. *Mol Biol Cell* 1994;5:323-338.
199. De Smedt V, Poulhe R, Cayla X, Dessauge F, Karaiskou A, Jesus C, Ozon R. Thr-161 phosphorylation of monomeric Cdc2. Regulation by protein phosphatase 2C in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* 2002;277:28592-28600.
200. Cheng A, Kaldis P, Solomon MJ. Dephosphorylation of human cyclin-dependent kinases by protein phosphatase type 2C alpha and beta 2 isoforms. *J Biol Chem* 2000;275:34744-34749.
201. Murray AW, Marks D. Can sequencing shed light on cell cycling? *Nature* 2001;409:844-846.
202. Desai D, Wessling HC, Fisher RP, Morgan DO. Effects of phosphorylation by CAK on cyclin binding by CDC2 and CDK2. *Mol Cell Biol* 1995;15:345-350.
203. Kaldis P. The cdk-activating kinase (CAK): from yeast to mammals. *Cell Mol Life Sci* 1999;55:284-296.
204. Harper JW, Elledge SJ. The role of Cdk7 in CAK function, a retro-retrospective. *Genes Dev* 1998;12:285-289.
205. Tassan JP, Jaquenoud M, Fry AM, Frutiger S, Hughes GJ, Nigg EA. In vitro assembly of a functional human CDK7-cyclin H complex requires MAT1, a novel 36 kDa RING finger protein. *Embo J* 1995;14:5608-5617.
206. Devault A, Martinez AM, Fesquet D, Labbe JC, Morin N, Tassan JP, Nigg EA, Cavadore JC, Doree M. MAT1 ('menage a trois') a new RING finger protein subunit stabilizing cyclin H-cdk7 complexes in starfish and *Xenopus* CAK. *Embo J* 1995;14:5027-5036.
207. Yankulov KY, Bentley DL. Regulation of CDK7 substrate specificity by MAT1 and TFIIH. *Embo J* 1997;16:1638-1646.
208. Krek W, Nigg EA. Differential phosphorylation of vertebrate p34cdc2 kinase at the G1/S and G2/M transitions of the cell cycle: identification of major phosphorylation sites. *Embo J* 1991;10:305-316.

209. Krek W, Nigg EA. Mutations of p34cdc2 phosphorylation sites induce premature mitotic events in HeLa cells: evidence for a double block to p34cdc2 kinase activation in vertebrates. *Embo J* 1991;10:3331-3341.
210. Norbury C, Blow J, Nurse P. Regulatory phosphorylation of the p34cdc2 protein kinase in vertebrates. *Embo J* 1991;10:3321-3329.
211. Gould KL, Nurse P. Tyrosine phosphorylation of the fission yeast cdc2+ protein kinase regulates entry into mitosis. *Nature* 1989;342:39-45.
212. Parker LL, Atherton-Fessler S, Lee MS, Ogg S, Falk JL, Swenson KI, Piwnica-Worms H. Cyclin promotes the tyrosine phosphorylation of p34cdc2 in a wee1+ dependent manner. *Embo J* 1991;10:1255-1263.
213. McGowan CH, Russell P. Human Wee1 kinase inhibits cell division by phosphorylating p34cdc2 exclusively on Tyr15. *Embo J* 1993;12:75-85.
214. Lundgren K, Walworth N, Booher R, Dembski M, Kirschner M, Beach D. mik1 and wee1 cooperate in the inhibitory tyrosine phosphorylation of cdc2. *Cell* 1991;64:1111-1122.
215. Lee MS, Enoch T, Piwnica-Worms H. mik1+ encodes a tyrosine kinase that phosphorylates p34cdc2 on tyrosine 15. *J Biol Chem* 1994;269:30530-30537.
216. Kornbluth S, Sebastian B, Hunter T, Newport J. Membrane localization of the kinase which phosphorylates p34cdc2 on threonine 14. *Mol Biol Cell* 1994;5:273-282.
217. Mueller PR, Coleman TR, Kumagai A, Dunphy WG. Myt1: a membrane-associated inhibitory kinase that phosphorylates Cdc2 on both threonine-14 and tyrosine-15. *Science* 1995;270:86-90.
218. Liu F, Stanton JJ, Wu Z, Piwnica-Worms H. The human Myt1 kinase preferentially phosphorylates Cdc2 on threonine 14 and localizes to the endoplasmic reticulum and Golgi complex. *Mol Cell Biol* 1997;17:571-583.
219. Wells NJ, Watanabe N, Tokusumi T, Jiang W, Verdecia MA, Hunter T. The C-terminal domain of the Cdc2 inhibitory kinase Myt1 interacts with Cdc2 complexes and is required for inhibition of G(2)/M progression. *J Cell Sci* 1999;112 ( Pt 19):3361-3371.
220. Liu F, Rothblum-Oviatt C, Ryan CE, Piwnica-Worms H. Overproduction of human Myt1 kinase induces a G2 cell cycle delay by interfering with the intracellular trafficking of Cdc2-cyclin B1 complexes. *Mol Cell Biol* 1999;19:5113-5123.
221. Jinno S, Suto K, Nagata A, Igarashi M, Kanaoka Y, Nojima H, Okayama H. Cdc25A is a novel phosphatase functioning early in the cell cycle. *Embo J* 1994;13:1549-1556.
222. Sexl V, Diehl JA, Sherr CJ, Ashmun R, Beach D, Roussel MF. A rate limiting function of cdc25A for S phase entry inversely correlates with tyrosine dephosphorylation of Cdk2. *Oncogene* 1999;18:573-582.
223. Yang J, Kornbluth S. All aboard the cyclin train: subcellular trafficking of cyclins and their CDK partners. *Trends Cell Biol* 1999;9:207-210.
224. Yang J, Bardes ES, Moore JD, Brennan J, Powers MA, Kornbluth S. Control of cyclin B1 localization through regulated binding of the nuclear export factor CRM1. *Genes Dev* 1998;12:2131-2143.

225. Moore JD, Kirk JA, Hunt T. Unmasking the S-phase-promoting potential of cyclin B1. *Science* 2003;300:987-990.
226. Blain SW, Massague J. Breast cancer banishes p27 from nucleus. *Nat Med* 2002;8:1076-1078.
227. Jones SM, Kazlauskas A. Growth factor-dependent signaling and cell cycle progression. *Chem Rev* 2001;101:2413-2423.
228. Wanzel M, Herold S, Eilers M. Transcriptional repression by Myc. *Trends Cell Biol* 2003;13:146-150.
229. La Thangue NB. E2F and the molecular mechanisms of early cell-cycle control. *Biochem Soc Trans* 1996;24:54-59.
230. Withers DA, Harvey RC, Faust JB, Melnyk O, Carey K, Meeker TC. Characterization of a candidate bcl-1 gene. *Mol Cell Biol* 1991;11:4846-4853.
231. Suzuki-Takahashi I, Kitagawa M, Saijo M, Higashi H, Ogino H, Matsumoto H, Taya Y, Nishimura S, Okuyama A. The interactions of E2F with pRB and with p107 are regulated via the phosphorylation of pRB and p107 by a cyclin-dependent kinase. *Oncogene* 1995;10:1691-1698.
232. DeGregori J, Kowalik T, Nevins JR. Cellular targets for activation by the E2F1 transcription factor include DNA synthesis- and G1/S-regulatory genes. *Mol Cell Biol* 1995;15:4215-4224.
233. Leone G, DeGregori J, Yan Z, Jakoi L, Ishida S, Williams RS, Nevins JR. E2F3 activity is regulated during the cell cycle and is required for the induction of S phase. *Genes Dev* 1998;12:2120-2130.
234. Muller H, Moroni MC, Vigo E, Petersen BO, Bartek J, Helin K. Induction of S-phase entry by E2F transcription factors depends on their nuclear localization. *Mol Cell Biol* 1997;17:5508-5520.
235. Nevins JR, Leone G, DeGregori J, Jakoi L. Role of the Rb/E2F pathway in cell growth control. *J Cell Physiol* 1997;173:233-236.
236. Krek W, Xu G, Livingston DM. Cyclin A-kinase regulation of E2F-1 DNA binding function underlies suppression of an S phase checkpoint. *Cell* 1995;83:1149-1158.
237. Kubbutat MH, Jones SN, Vousden KH. Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* 1997;387:299-303.
238. Bell SP, Dutta A. DNA replication in eukaryotic cells. *Annu Rev Biochem* 2002;71:333-374.
239. Masai H, Arai K. Cdc7 kinase complex: a key regulator in the initiation of DNA replication. *J Cell Physiol* 2002;190:287-296.
240. Alberts B. DNA replication and recombination. *Nature* 2003;421:431-435.
241. Pines J. Four-dimensional control of the cell cycle. *Nat Cell Biol* 1999;1:E73-79.
242. Fotedar A, Cannella D, Fitzgerald P, Rousselle T, Gupta S, Doree M, Fotedar R. Role for cyclin A-dependent kinase in DNA replication in human S phase cell extracts. *J Biol Chem* 1996;271:31627-31637.
243. Pines J, Rieder CL. Re-staging mitosis: a contemporary view of mitotic progression. *Nat Cell Biol* 2001;3:E3-6.

244. Irniger S. Cyclin destruction in mitosis: a crucial task of Cdc20. *FEBS Lett* 2002;532:7-11.
245. Musacchio A, Hardwick KG. The spindle checkpoint: structural insights into dynamic signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3:731-741.
246. Peters JM. The anaphase-promoting complex: proteolysis in mitosis and beyond. *Mol Cell* 2002;9:931-943.
247. Guertin DA, Trautmann S, McCollum D. Cytokinesis in eukaryotes. *Microbiol Mol Biol Rev* 2002;66:155-178.
248. Nakayama KI, Hatakeyama S, Nakayama K. Regulation of the cell cycle at the G1-S transition by proteolysis of cyclin E and p27Kip1. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;282:853-860.
249. Kornitzer D, Ciechanover A. Modes of regulation of ubiquitin-mediated protein degradation. *J Cell Physiol* 2000;182:1-11.
250. Koegl M, Hoppe T, Schlenker S, Ulrich HD, Mayer TU, Jentsch S. A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell* 1999;96:635-644.
251. Hershko A. Roles of ubiquitin-mediated proteolysis in cell cycle control. *Curr Opin Cell Biol* 1997;9:788-799.
252. Zachariae W, Nasmyth K. Whose end is destruction: cell division and the anaphase-promoting complex. *Genes Dev* 1999;13:2039-2058.
253. Carrano AC, Eytan E, Hershko A, Pagano M. SKP2 is required for ubiquitin-mediated degradation of the CDK inhibitor p27. *Nat Cell Biol* 1999;1:193-199.
254. Montagnoli A, Fiore F, Eytan E, Carrano AC, Draetta GF, Hershko A, Pagano M. Ubiquitination of p27 is regulated by Cdk-dependent phosphorylation and trimeric complex formation. *Genes Dev* 1999;13:1181-1189.
255. Tyers M, Jorgensen P. Proteolysis and the cell cycle: with this RING I do thee destroy. *Curr Opin Genet Dev* 2000;10:54-64.
256. Marti A, Wirbelauer C, Scheffner M, Krek W. Interaction between ubiquitin-protein ligase SCFSKP2 and E2F-1 underlies the regulation of E2F-1 degradation. *Nat Cell Biol* 1999;1:14-19.
257. Yam CH, Ng RW, Siu WY, Lau AW, Poon RY. Regulation of cyclin A-Cdk2 by SCF component Skp1 and F-box protein Skp2. *Mol Cell Biol* 1999;19:635-645.
258. Jaspersen SL, Charles JF, Morgan DO. Inhibitory phosphorylation of the APC regulator Hct1 is controlled by the kinase Cdc28 and the phosphatase Cdc14. *Curr Biol* 1999;9:227-236.
259. Steinberg MS, McNutt PM. Cadherins and their connections: adhesion junctions have broader functions. *Curr Opin Cell Biol* 1999;11:554-560.
260. Friedberg EC. DNA damage and repair. *Nature* 2003;421:436-440.
261. Shiloh Y. ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat Rev Cancer* 2003;3:155-168.
262. Murray-Zmijewski F, Slee EA, Lu X. A complex barcode underlies the heterogeneous response of p53 to stress. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008;9:702-712.

263. Zhang XP, Liu F, Wang W. Coordination between cell cycle progression and cell fate decision by the p53 and E2F1 pathways in response to DNA damage. *J Biol Chem* 2010.
264. He G, Siddik ZH, Huang Z, Wang R, Koomen J, Kobayashi R, Khokhar AR, Kuang J. Induction of p21 by p53 following DNA damage inhibits both Cdk4 and Cdk2 activities. *Oncogene* 2005;24:2929-2943.
265. Moroni MC, Hickman ES, Lazzerini Denchi E, Caprara G, Colli E, Cecconi F, Muller H, Helin K. Apaf-1 is a transcriptional target for E2F and p53. *Nat Cell Biol* 2001;3:552-558.
266. Nahle Z, Polakoff J, Davuluri RV, McCurrach ME, Jacobson MD, Narita M, Zhang MQ, Lazebnik Y, Bar-Sagi D, Lowe SW. Direct coupling of the cell cycle and cell death machinery by E2F. *Nat Cell Biol* 2002;4:859-864.
267. Hershko T, Chaussepied M, Oren M, Ginsberg D. Novel link between E2F and p53: proapoptotic cofactors of p53 are transcriptionally upregulated by E2F. *Cell Death Differ* 2005;12:377-383.
268. Mayo LD, Dixon JE, Durden DL, Tonks NK, Donner DB. PTEN protects p53 from Mdm2 and sensitizes cancer cells to chemotherapy. *J Biol Chem* 2002;277:5484-5489.
269. Gottlieb TM, Leal JF, Seger R, Taya Y, Oren M. Cross-talk between Akt, p53 and Mdm2: possible implications for the regulation of apoptosis. *Oncogene* 2002;21:1299-1303.
270. Reddel RR. Genes involved in the control of cellular proliferative potential. *Ann N Y Acad Sci* 1998;854:8-19.
271. Hayflick L. The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. *Exp Cell Res* 1965;37:614-636.
272. Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 1961;25:585-621.
273. Campisi J. The biology of replicative senescence. *Eur J Cancer* 1997;33:703-709.
274. Campisi J. Replicative senescence: an old lives' tale? *Cell* 1996;84:497-500.
275. Cristofalo VJ, Pignolo RJ. Replicative senescence of human fibroblast-like cells in culture. *Physiol Rev* 1993;73:617-638.
276. Cristofalo VJ. Cellular biomarkers of aging. *Exp Gerontol* 1988;23:297-307.
277. Macieira-Coelho A, Ponten J, Philipson L. The division cycle and RNA-synthesis in diploid human cells at different passage levels in vitro. *Exp Cell Res* 1966;42:673-684.
278. Smith JR, Pereira-Smith OM. Replicative senescence: implications for in vivo aging and tumor suppression. *Science* 1996;273:63-67.
279. Wagner M, Hampel B, Bernhard D, Hala M, Zwerschke W, Jansen-Durr P. Replicative senescence of human endothelial cells in vitro involves G1 arrest, polyploidization and senescence-associated apoptosis. *Exp Gerontol* 2001;36:1327-1347.
280. Noda A, Ning Y, Venable SF, Pereira-Smith OM, Smith JR. Cloning of senescent cell-derived inhibitors of DNA synthesis using an expression screen. *Exp Cell Res* 1994;211:90-98.

281. Hasty P, Bradley A, Morris JH, Edmondson DG, Venuti JM, Olson EN, Klein WH. Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted mutation in the myogenin gene. *Nature* 1993;364:501-506.
282. Halevy O, Novitch BG, Spicer DB, Skapek SX, Rhee J, Hannon GJ, Beach D, Lassar AB. Correlation of terminal cell cycle arrest of skeletal muscle with induction of p21 by MyoD. *Science* 1995;267:1018-1021.
283. Parker SB, Eichele G, Zhang P, Rawls A, Sands AT, Bradley A, Olson EN, Harper JW, Elledge SJ. p53-independent expression of p21Cip1 in muscle and other terminally differentiating cells. *Science* 1995;267:1024-1027.
284. Missero C, Di Cunto F, Kiyokawa H, Koff A, Dotto GP. The absence of p21Cip1/WAF1 alters keratinocyte growth and differentiation and promotes ras-tumor progression. *Genes Dev* 1996;10:3065-3075.
285. Brown JP, Wei W, Sedivy JM. Bypass of senescence after disruption of p21CIP1/WAF1 gene in normal diploid human fibroblasts. *Science* 1997;277:831-834.
286. Katayose D, Wersto R, Cowan KH, Seth P. Effects of a recombinant adenovirus expressing WAF1/Cip1 on cell growth, cell cycle, and apoptosis. *Cell Growth Differ* 1995;6:1207-1212.
287. Zindy F, Quelle DE, Roussel MF, Sherr CJ. Expression of the p16INK4a tumor suppressor versus other INK4 family members during mouse development and aging. *Oncogene* 1997;15:203-211.
288. Dai CY, Enders GH. p16 INK4a can initiate an autonomous senescence program. *Oncogene* 2000;19:1613-1622.
289. McConnell BB, Starborg M, Brookes S, Peters G. Inhibitors of cyclin-dependent kinases induce features of replicative senescence in early passage human diploid fibroblasts. *Curr Biol* 1998;8:351-354.
290. Schreiber M, Muller WJ, Singh G, Graham FL. Comparison of the effectiveness of adenovirus vectors expressing cyclin kinase inhibitors p16INK4A, p18INK4C, p19INK4D, p21(WAF1/CIP1) and p27KIP1 in inducing cell cycle arrest, apoptosis and inhibition of tumorigenicity. *Oncogene* 1999;18:1663-1676.
291. Kato J, Matsushime H, Hiebert SW, Ewen ME, Sherr CJ. Direct binding of cyclin D to the retinoblastoma gene product (pRb) and pRb phosphorylation by the cyclin D-dependent kinase CDK4. *Genes Dev* 1993;7:331-342.
292. Gius DR, Ezhevsky SA, Becker-Hapak M, Nagahara H, Wei MC, Dowdy SF. Transduced p16INK4a peptides inhibit hypophosphorylation of the retinoblastoma protein and cell cycle progression prior to activation of Cdk2 complexes in late G1. *Cancer Res* 1999;59:2577-2580.
293. Nylandsted J, Rohde M, Bartek J, Strauss M. Expression of a p16INK4a-specific ribozyme downmodulates p16INK4a abundance and accelerates cell proliferation. *FEBS Lett* 1998;436:41-45.
294. Carnero A, Hudson JD, Price CM, Beach DH. p16INK4A and p19ARF act in overlapping pathways in cellular immortalization. *Nat Cell Biol* 2000;2:148-155.
295. Zhou HW, Lou SQ, Zhang K. Recovery of function in osteoarthritic chondrocytes induced by p16INK4a-specific siRNA in vitro. *Rheumatology (Oxford)* 2004;43:555-568.

296. Melk A, Schmidt BM, Takeuchi O, Sawitzki B, Rayner DC, Halloran PF. Expression of p16INK4a and other cell cycle regulator and senescence associated genes in aging human kidney. *Kidney Int* 2004;65:510-520.
297. Wong H, Riabowol K. Differential CDK-inhibitor gene expression in aging human diploid fibroblasts. *Exp Gerontol* 1996;31:311-325.
298. Bringold F, Serrano M. Tumor suppressors and oncogenes in cellular senescence. *Exp Gerontol* 2000;35:317-329.
299. Collado M, Medema RH, Garcia-Cao I, Dubuisson ML, Barradas M, Glassford J, Rivas C, Burgering BM, Serrano M, Lam EW. Inhibition of the phosphoinositide 3-kinase pathway induces a senescence-like arrest mediated by p27Kip1. *J Biol Chem* 2000;275:21960-21968.
300. Jimenez C, Jones DR, Rodriguez-Viciano P, Gonzalez-Garcia A, Leonardo E, Wennstrom S, von Kobbe C, Toran JL, L RB, Calvo V, Copin SG, Albar JP, Gaspar ML, Diez E, Marcos MA, Downward J, Martinez AC, Merida I, Carrera AC. Identification and characterization of a new oncogene derived from the regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase. *Embo J* 1998;17:743-753.
301. DeGregori J, Leone G, Miron A, Jakoi L, Nevins JR. Distinct roles for E2F proteins in cell growth control and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:7245-7250.
302. Sherr CJ. Mammalian G1 cyclins. *Cell* 1993;73:1059-1065.
303. Ewen ME, Sluss HK, Sherr CJ, Matsushime H, Kato J, Livingston DM. Functional interactions of the retinoblastoma protein with mammalian D-type cyclins. *Cell* 1993;73:487-497.
304. Lukas J, Petersen BO, Holm K, Bartek J, Helin K. Deregulated expression of E2F family members induces S-phase entry and overcomes p16INK4A-mediated growth suppression. *Mol Cell Biol* 1996;16:1047-1057.
305. Lees E. Cyclin dependent kinase regulation. *Curr Opin Cell Biol* 1995;7:773-780.
306. Mitra J, Dai CY, Somasundaram K, El-Deiry WS, Satyamoorthy K, Herlyn M, Enders GH. Induction of p21(WAF1/CIP1) and inhibition of Cdk2 mediated by the tumor suppressor p16(INK4a). *Mol Cell Biol* 1999;19:3916-3928.
307. Hay ED. Development of the vertebrate cornea. *Int Rev Cytol* 1980; 63:263-322.
308. Wulle KG, Lerche W. Electron microscopic observations of the early development of the human corneal endothelium and Descemet's membrane. *Ophthalmologica* 1969;157:451-461.
309. Wulle KG. Electron microscopy of the fetal development of the corneal endothelium and Descemet's membrane of the human eye. *Invest Ophthalmol* 1972;11:897-904.
310. Nuttall RP. DNA synthesis during the development of the chick cornea. *J Exp Zool* 1976;198:193-208.
311. Johnston MC, Noden DM, Hazelton RD, Coulombre JL, Coulombre AJ. Origins of avian ocular and periocular tissues. *Exp Eye Res* 1979;29:27-43.
312. Adamis AP, Molnar ML, Tripathi BJ, Emmerson MS, Stefansson K, Tripathi RC. Neuronal-specific enolase in human corneal endothelium and posterior keratocytes. *Exp Eye Res* 1985;41:665-668.

313. Hayashi K, Sueishi K, Tanaka K, Inomata H. Immunohistochemical evidence of the origin of human corneal endothelial cells and keratocytes. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1986;224:452-456.
314. Foets B, van den Oord J, Engelmann K, Missotten L. A comparative immunohistochemical study of human corneotrabecular tissue. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1992;230:269-274.
315. Zieske JD, Guimaraes SR, Hutcheon AE. Kinetics of keratocyte proliferation in response to epithelial debridement. *Exp Eye Res* 2001;72:33-39.
316. West-Mays JA, Dwivedi DJ. The keratocyte: corneal stromal cell with variable repair phenotypes. *Int J Biochem Cell Biol* 2006;38:1625-1631.
317. Murphy C, Alvarado J, Juster R, Maglio M. Prenatal and postnatal cellularity of the human corneal endothelium. A quantitative histologic study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1984;25:312-322.
318. Nucci P, Brancato R, Mets MB, Shevell SK. Normal endothelial cell density range in childhood. *Arch Ophthalmol* 1990;108:247-248.
319. Ko MK, Park WK, Lee JH, Chi JG. A histomorphometric study of corneal endothelial cells in normal human fetuses. *Exp Eye Res* 2001;72:403-409.
320. Laing RA, Sanstrom MM, Berrospi AR, Leibowitz HM. Changes in the corneal endothelium as a function of age. *Exp Eye Res* 1976;22:587-594.
321. Murphy C, Alvarado J, Juster R. Prenatal and postnatal growth of the human Descemet's membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1984;25:1402-1415.
322. Bourne WM, Nelson LR, Hodge DO. Central corneal endothelial cell changes over a ten-year period. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997;38:779-782.
323. Hollingsworth J, Perez-Gomez I, Mutalib HA, Efron N. A population study of the normal cornea using an in vivo, slit-scanning confocal microscope. *Optom Vis Sci* 2001;78:706-711.
324. Joyce NC. Proliferative capacity of the corneal endothelium. *Prog Retin Eye Res* 2003;22:359-389.
325. Joyce NC. Cell cycle status in human corneal endothelium. *Exp Eye Res* 2005;81:629-638.
326. Bodereau X, Pechereau A, Baikoff G. Cell density of the corneal endothelium after penetrating keratoplasty. A retrospective study by specular microscopy. *J Fr Ophtalmol* 1983;6:65-68.
327. Cho KS, Lee EH, Choi JS, Joo CK. Reactive oxygen species-induced apoptosis and necrosis in bovine corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40:911-919.
328. Koh SW, Waschek JA. Corneal endothelial cell survival in organ cultures under acute oxidative stress: effect of VIP. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:4085-4092.
329. Edelhauser HF. The resiliency of the corneal endothelium to refractive and intraocular surgery. *Cornea* 2000;19:263-273.
330. Borderie V, Baudrimont M, Bourcier T, Moldovan M, Touzeau O, Laroche L. Cornea guttata and Fuchs' dystrophy. *J Fr Ophtalmol* 1999;22:987-1002.

331. Borderie VM, Baudrimont M, Vallee A, Ereau TL, Gray F, Laroche L. Corneal endothelial cell apoptosis in patients with Fuchs' dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:2501-2505.
332. Kenyon KR, Maumenee AE. The histological and ultrastructural pathology of congenital hereditary corneal dystrophy: a case report. *Invest Ophthalmol* 1968;7:475-500.
333. Pearce WG, Tripathi RC, Morgan G. Congenital endothelial corneal dystrophy. Clinical, pathological, and genetic study. *Br J Ophthalmol* 1969;53:577-591.
334. Bourne WM, Nelson LR, Hodge DO. Continued endothelial cell loss ten years after lens implantation. *Ophthalmology* 1994;101:1014-1022; discussion 1022-1013.
335. Friberg TR, Guibord NM. Corneal endothelial cell loss after multiple vitreoretinal procedures and the use of silicone oil. *Ophthalmic Surg Lasers* 1999;30:528-534.
336. Bourne WM. Cellular changes in transplanted human corneas. *Cornea* 2001;20:560-569.
337. Bell KD, Campbell RJ, Bourne WM. Pathology of late endothelial failure: late endothelial failure of penetrating keratoplasty: study with light and electron microscopy. *Cornea* 2000;19:40-46.
338. Mishima S. Clinical investigations on the corneal endothelium-XXXVIII Edward Jackson Memorial Lecture. *Am J Ophthalmol* 1982;93:1-29.
339. Schultz RO, Matsuda M, Yee RW, Edelhauser HF, Schultz KJ. Corneal endothelial changes in type I and type II diabetes mellitus. *Am J Ophthalmol* 1984;98:401-410.
340. Meyer LA, Ubels JL, Edelhauser HF. Corneal endothelial morphology in the rat. Effects of aging, diabetes, and topical aldose reductase inhibitor treatment. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1988;29:940-948.
341. Bigar F, Witmer R. Corneal endothelial changes in primary acute angle-closure glaucoma. *Ophthalmology* 1982;89:596-599.
342. Sihota R, Sharma T, Agarwal HC. Intraoperative mitomycin C and the corneal endothelium. *Acta Ophthalmol Scand* 1998;76:80-82.
343. Konowal A, Morrison JC, Brown SV, Cooke DL, Maguire LJ, Verdier DV, Fraunfelder FT, Dennis RF, Epstein RJ. Irreversible corneal decompensation in patients treated with topical dorzolamide. *Am J Ophthalmol* 1999;127:403-406.
344. Lazaro Garcia C, Castillo Gomez A, Garcia Feijoo J, Macias Benitez JM, Garcia Sanchez J. Study of the corneal endothelium after glaucoma surgery. *Arch Soc Esp Oftalmol* 2000;75:75-80.
345. Wu SC, Jeng S, Huang SC, Lin SM. Corneal endothelial damage after neodymium:YAG laser iridotomy. *Ophthalmic Surg Lasers* 2000;31:411-416.
346. Chung EH, Hutcheon AE, Joyce NC, Zieske JD. Synchronization of the G1/S transition in response to corneal debridement. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40:1952-1958.
347. Zieske JD, Takahashi H, Hutcheon AE, Dalbone AC. Activation of epidermal growth factor receptor during corneal epithelial migration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:1346-1355.

348. Laing RA, Neubauer L, Oak SS, Kayne HL, Leibowitz HM. Evidence for mitosis in the adult corneal endothelium. *Ophthalmology* 1984;91:1129-1134.
349. Nartey IN, Sherrard ES, Ng W. Amitosis in human donor corneal endothelium--a serendipity? *Br J Ophthalmol* 1990;74:63.
350. Renard G, Pouliquen Y, Hirsch M. Regeneration of the human corneal endothelium. *Albrecht Von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol* 1981;215:341-348.
351. Matsubara M, Tanishima T. Wound-healing of corneal endothelium in monkey: an autoradiographic study. *Jpn J Ophthalmol* 1983;27:444-450.
352. Sherrard ES. The corneal endothelium in vivo: its response to mild trauma. *Exp Eye Res* 1976;22:347-357.
353. Svedbergh B, Bill A. Scanning electron microscopic studies of the corneal endothelium in man and monkeys. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 1972;50:321-336.
354. Suda T. Mosaic pattern changes in human corneal endothelium with age. *Jpn J Ophthalmol* 1984;28:331-338.
355. Yee RW, Matsuda M, Schultz RO, Edelhauser HF. Changes in the normal corneal endothelial cellular pattern as a function of age. *Curr Eye Res* 1985;4:671-678.
356. Carlson KH, Bourne WM, McLaren JW, Brubaker RF. Variations in human corneal endothelial cell morphology and permeability to fluorescein with age. *Exp Eye Res* 1988;47:27-41.
357. Honda H, Ogita Y, Higuchi S, Kani K. Cell movements in a living mammalian tissue: long-term observation of individual cells in wounded corneal endothelia of cats. *J Morphol* 1982;174:25-39.
358. Kaufman HE, Katz JI. Pathology of the corneal endothelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1977;16:265-268.
359. Joyce NC, Meklir B, Neufeld AH. In vitro pharmacologic separation of corneal endothelial migration and spreading responses. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990;31:1816-1826.
360. Matsuda M, Sawa M, Edelhauser HF, Bartels SP, Neufeld AH, Kenyon KR. Cellular migration and morphology in corneal endothelial wound repair. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1985;26:443-449.
361. Ichijima H, Petroll WM, Jester JV, Barry PA, Andrews PM, Dai M, Cavanagh HD. In vivo confocal microscopic studies of endothelial wound healing in rabbit cornea. *Cornea* 1993;12:369-378.
362. Gordon SR, Essner E, Rothstein H. In situ demonstration of actin in normal and injured ocular tissues using 7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazole phalloidin. *Cell Motil* 1982;2:343-354.
363. Joyce NC, Joyce SJ, Powell SM, Meklir B. EGF and PGE2: effects on corneal endothelial cell migration and monolayer spreading during wound repair in vitro. *Curr Eye Res* 1995;14:601-609.
364. Schilling-Schon A, Pleyer U, Hartmann C, Rieck PW. The role of endogenous growth factors to support corneal endothelial migration after wounding in vitro. *Exp Eye Res* 2000;71:583-589.

365. Olsen EG, Davanger M, Moen T. The role of microfilaments in the healing of the corneal endothelium. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 1985;63:104-108.
366. Gordon SR, Staley CA. Role of the cytoskeleton during injury-induced cell migration in corneal endothelium. *Cell Motil Cytoskeleton* 1990;16:47-57.
367. Mohay J, McLaughlin BJ. Corneal endothelial wound repair in normal and mitotically inhibited cultures. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1995;233:727-736.
368. Petroll WM, Jester JV, Barry-Lane P, Cavanagh HD. Assessment of f-actin organization and apical-basal polarity during in vivo cat endothelial wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995;36:2492-2502.
369. Gordon SR, Buxar RM. Inhibition of cytoskeletal reorganization stimulates actin and tubulin syntheses during injury-induced cell migration in the corneal endothelium. *J Cell Biochem* 1997;67:409-421.
370. Medin H, Davanger M. Endothelial repair of posterior corneal wounds in rabbits. Influence of foetal calf serum in the culture medium. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 1990;68:195-199.
371. Lagali N, Stenevi U, Claesson M, Fagerholm P, Hanson C, Weijdegard B. Survival of donor-derived cells in human corneal transplants. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50:2673-2678.
372. McCartney MD, Robertson DP, Wood TO, McLaughlin BJ. ATPase pump site density in human dysfunctional corneal endothelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1987;28:1955-1962.
373. McCartney MD, Wood TO, McLaughlin BJ. Immunohistochemical localization of ATPase in human dysfunctional corneal endothelium. *Curr Eye Res* 1987;6:1479-1486.
374. Crawford KM, Ernst SA, Meyer RF, MacCallum DK. NaK-ATPase pump sites in cultured bovine corneal endothelium of varying cell density at confluence. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995;36:1317-1326.
375. Feldman ST, Gjerset R, Gately D, Chien KR, Feramisco JR. Expression of SV40 virus large T antigen by recombinant adenoviruses activates proliferation of corneal endothelium in vitro. *J Clin Invest* 1993;91:1713-1720.
376. Wilson SE, Lloyd SA, He YG, McCash CS. Extended life of human corneal endothelial cells transfected with the SV40 large T antigen. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993;34:2112-2123.
377. Wilson SE, Weng J, Blair S, He YG, Lloyd S. Expression of E6/E7 or SV40 large T antigen-coding oncogenes in human corneal endothelial cells indicates regulated high-proliferative capacity. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995;36:32-40.
378. Bednarz J, Teifel M, Friedl P, Engelmann K. Immortalization of human corneal endothelial cells using electroporation protocol optimized for human corneal endothelial and human retinal pigment epithelial cells. *Acta Ophthalmol Scand* 2000;78:130-136.
379. Joyce NC, Harris DL, Mc Alister JC, Ali RR, Larkin DF. Effect of overexpressing the transcription factor E2F2 on cell cycle progression in rabbit corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:1340-1348.

380. McAlister JC, Joyce NC, Harris DL, Ali RR, Larkin DF. Induction of replication in human corneal endothelial cells by E2F2 transcription factor cDNA transfer. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46:3597-3603.
381. Gan L, Fagerholm P, Ekenbark S. Expression of proliferating cell nuclear antigen in corneas kept in long term culture. *Acta Ophthalmol Scand* 1998;76:308-313.
382. Slettedal JK, Lyberg T, Roger M, Beraki K, Ramstad H, Nicolaisen B. Regeneration with proliferation of the endothelium of cultured human donor corneas with extended postmortem time. *Cornea* 2008;27:212-219.
383. Joyce NC, Meklir B, Joyce SJ, Zieske JD. Cell cycle protein expression and proliferative status in human corneal cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996;37:645-655.
384. Cotsarelis G, Cheng SZ, Dong G, Sun TT, Lavker RM. Existence of slow-cycling limbal epithelial basal cells that can be preferentially stimulated to proliferate: implications on epithelial stem cells. *Cell* 1989;57:201-209.
385. Lavker RM, Dong G, Cheng SZ, Kudoh K, Cotsarelis G, Sun TT. Relative proliferative rates of limbal and corneal epithelia. Implications of corneal epithelial migration, circadian rhythm, and suprabasally located DNA-synthesizing keratinocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991;32:1864-1875.
386. Lehrer MS, Sun TT, Lavker RM. Strategies of epithelial repair: modulation of stem cell and transit amplifying cell proliferation. *J Cell Sci* 1998;111 ( Pt 19):2867-2875.
387. Thoft RA. The role of the limbus in ocular surface maintenance and repair. *Acta Ophthalmol Suppl* 1989;192:91-94.
388. Chung EH, DeGregorio PG, Wasson M, Zieske JD. Epithelial regeneration after limbus-to-limbus debridement. Expression of alpha-enolase in stem and transient amplifying cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995;36:1336-1343.
389. Majo F, Rochat A, Nicolas M, Jaoude GA, Barrandon Y. Oligopotent stem cells are distributed throughout the mammalian ocular surface. *Nature* 2008;456:250-254.
390. Francesconi CM, Hutcheon AE, Chung EH, Dalbone AC, Joyce NC, Zieske JD. Expression patterns of retinoblastoma and E2F family proteins during corneal development. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:1054-1062.
391. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 1983;31:13-20.
392. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 1984;133:1710-1715.
393. Senoo T, Joyce NC. Cell cycle kinetics in corneal endothelium from old and young donors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:660-667.
394. Senoo T, Obara Y, Joyce NC. EDTA: a promoter of proliferation in human corneal endothelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:2930-2935.
395. Savion N, Isaacs JD, Shuman MA, Gospodarowicz D. Proliferation and differentiation of bovine corneal endothelial cells in culture. *Metab Pediatr Syst Ophthalmol* 1982;6:305-320.

396. Van Horn DL, Sendele DD, Seideman S, Bucu PJ. Regenerative capacity of the corneal endothelium in rabbit and cat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1977;16:597-613.
397. Raymond GM, Jumblatt MM, Bartels SP, Neufeld AH. Rabbit corneal endothelial cells in vitro: effects of EGF. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1986;27:474-479.
398. Chen KH, Harris DL, Joyce NC. TGF-beta2 in aqueous humor suppresses S-phase entry in cultured corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40:2513-2519.
399. Baum JL, Niedra R, Davis C, Yue BYJT. Mass culture of human corneal endothelial cells. *Arch Ophthalmol* 1984;97:1136-1140.
400. Tuft SJ, Williams KA, Coster DJ. Endothelial repair in the rat cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1986;27:1199-1204.
401. Polack FM. Four-year retention of 3H thymidine by corneal endothelium. *Arch Ophthalmol* 1966;75:659-660.
402. Rotatori DS, Kerr NC, Raphael B, McLaughlin BJ, Shimizu R, Stern GA, Schultz GS. Elevation of transforming growth factor alpha in cat aqueous humor after corneal endothelial injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994;35:143-149.
403. Befanis PJ, Peiffer RL, Jr., Brown D. Endothelial repair of the canine cornea. *Am J Vet Res* 1981;42:590-595.
404. Engelmann K, Bohnke M, Friedl P. Isolation and long-term cultivation of human corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1988;29:1656-1662.
405. Van Horn DL, Hyndiuk RA. Endothelial wound repair in primate cornea. *Exp Eye Res* 1975;21:113-124.
406. Ling TL, Vannas A, Holden BA. Long-term changes in corneal endothelial morphology following wounding in the cat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1988;29:1407-1412.
407. Joyce NC, Navon SE, Roy S, Zieske JD. Expression of cell cycle-associated proteins in human and rabbit corneal endothelium in situ. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996;37:1566-1575.
408. Baroody RA, Bito LZ, DeRousseau CJ, Kaufman PL. Ocular development and aging. 1. Corneal endothelial changes in cats and in free-ranging and caged rhesus monkeys. *Exp Eye Res* 1987;45:607-622.
409. MacCallum DK, Bahn CF, Lillie JH, Meyer RF, Martonyi CL. Evidence for corneal endothelial cell hypertrophy during postnatal growth of the cat cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1983;24:247-250.
410. Gwin RM, Lerner I, Warren JK, Gum G. Decrease in canine corneal endothelial cell density and increase in corneal thickness as functions of age. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1982;22:267-271.
411. Doughty MJ. The cornea and corneal endothelium in the aged rabbit. *Optom Vis Sci* 1994;71:809-818.
412. Fitch KL, Nadakavukaren MJ, Richardson A. Age-related changes in the corneal endothelium of the rat. *Exp Gerontol* 1982;17:179-183.
413. Fitch KL, Nadakavukaren MJ. Age-related changes in the corneal endothelium of the mouse. *Exp Gerontol* 1986;21:31-35.

414. Kill IR. Localisation of the Ki-67 antigen within the nucleolus. Evidence for a fibrillar-deficient region of the dense fibrillar component. *J Cell Sci* 1996;109 ( Pt 6):1253-1263.
415. Starborg M, Gell K, Brundell E, Hoog C. The murine Ki-67 cell proliferation antigen accumulates in the nucleolar and heterochromatic regions of interphase cells and at the periphery of the mitotic chromosomes in a process essential for cell cycle progression. *J Cell Sci* 1996;109 ( Pt 1):143-153.
416. Simonsen AH, Sorensen KE, Sperling S. Thymidine incorporation by human corneal endothelium during organ culture. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 1981;59:110-118.
417. Chen KH, Azar D, Joyce NC. Transplantation of adult human corneal endothelium ex vivo: a morphologic study. *Cornea* 2001;20:731-737.
418. Hyldahl L. Primary cell cultures from human embryonic corneas. *J Cell Sci* 1984;66:343-351.
419. Insler MS, Lopez JG. Microcarrier cell culture of neonatal human corneal endothelium. *Curr Eye Res* 1990;9:23-30.
420. Samples JR, Binder PS, Nayak SK. Propagation of human corneal endothelium in vitro effect of growth factors. *Exp Eye Res* 1991;52:121-128.
421. Nayak SK, Binder PS. The growth of endothelium from human corneal rims in tissue culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1984;25:1213-1216.
422. Zhu C, Joyce NC. Proliferative response of corneal endothelial cells from young and older donors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:1743-1751.
423. Joyce NC, Zhu CC. Human corneal endothelial cell proliferation: potential for use in regenerative medicine. *Cornea* 2004;23:S8-S19.
424. Schimmelpfennig BH. Direct and indirect determination of nonuniform cell density distribution in human corneal endothelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1984;25:223-229.
425. Amann J, Holley GP, Lee SB, Edelhauser HF. Increased endothelial cell density in the paracentral and peripheral regions of the human cornea. *Am J Ophthalmol* 2003;135:584-590.
426. Bednarz J, Rodokanaki-von Schrenck A, Engelmann K. Different characteristics of endothelial cells from central and peripheral human cornea in primary culture and after subculture. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 1998;34:149-153.
427. Konomi K, Zhu C, Harris D, Joyce NC. Comparison of the proliferative capacity of human corneal endothelial cells from the central and peripheral areas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46:4086-4091.
428. Todorov IT, Werness BA, Wang HQ, Buddharaju LN, Todorova PD, Slocum HK, Brooks JS, Huberman JA. HsMCM2/BM28: a novel proliferation marker for human tumors and normal tissues. *Lab Invest* 1998;78:73-78.
429. Wharton SB, Chan KK, Anderson JR, Stoeber K, Williams GH. Replicative Mcm2 protein as a novel proliferation marker in oligodendrogliomas and its relationship to Ki67 labelling index, histological grade and prognosis. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2001;27:305-313.

430. Mimura T, Joyce NC. Replication competence and senescence in central and peripheral human corneal endothelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47:1387-1396.
431. Todorov IT, Attaran A, Kearsey SE. BM28, a human member of the MCM2-3-5 family, is displaced from chromatin during DNA replication. *J Cell Biol* 1995;129:1433-1445.
432. Stoeber K, Tlsty TD, Happerfield L, Thomas GA, Romanov S, Bobrow L, Williams ED, Williams GH. DNA replication licensing and human cell proliferation. *J Cell Sci* 2001;114:2027-2041.
433. Coverley D, Laman H, Laskey RA. Distinct roles for cyclins E and A during DNA replication complex assembly and activation. *Nat Cell Biol* 2002;4:523-528.
434. Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:9363-9367.
435. Sigal SH, Rajvanshi P, Gorla GR, Sokhi RP, Saxena R, Gebhard DR, Jr., Reid LM, Gupta S. Partial hepatectomy-induced polyploidy attenuates hepatocyte replication and activates cell aging events. *Am J Physiol* 1999;276:G1260-1272.
436. Song Z, Wang Y, Xie L, Zang X, Yin H. Expression of senescence-related genes in human corneal endothelial cells. *Mol Vis* 2008;14:161-170.
437. Wright WE, Shay JW. Telomere positional effects and the regulation of cellular senescence. *Trends Genet* 1992;8:193-197.
438. Calado RT, Young NS. Telomere diseases. *N Engl J Med* 2009;361:2353-2365.
439. Allsopp RC, Vaziri H, Patterson C, Goldstein S, Younglai EV, Futcher AB, Greider CW, Harley CB. Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:10114-10118.
440. Allshire RC, Dempster M, Hastie ND. Human telomeres contain at least three types of G-rich repeat distributed non-randomly. *Nucleic Acids Res* 1989;17:4611-4627.
441. De Lange T. Protection of mammalian telomeres. *Oncogene* 2002;21:532-540.
442. Huang XQ, Wang J, Liu JP, Feng H, Liu WB, Yan Q, Liu Y, Sun SM, Deng M, Gong L, Li DW. hTERT extends proliferative lifespan and prevents oxidative stress-induced apoptosis in human lens epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46:2503-2513.
443. Zakian VA, Runge K, Wang SS. How does the end begin? Formation and maintenance of telomeres in ciliates and yeast. *Trends Genet* 1990;6:12-16.
444. Greider CW, Blackburn EH. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell* 1985;43:405-413.
445. Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB, Harley CB, Shay JW, Lichtsteiner S, Wright WE. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 1998;279:349-352.
446. Yang J, Chang E, Cherry AM, Bangs CD, Oei Y, Bodnar A, Bronstein A, Chiu CP, Herron GS. Human endothelial cell life extension by telomerase expression. *J Biol Chem* 1999;274:26141-26148.
447. Jiang XR, Jimenez G, Chang E, Frolkis M, Kusler B, Sage M, Beeche M, Bodnar AG, Wahl GM, Tlsty TD, Chiu CP. Telomerase expression in human somatic cells does

- not induce changes associated with a transformed phenotype. *Nat Genet* 1999;21:111-114.
448. Ben-Porath I, Weinberg RA. When cells get stressed: an integrative view of cellular senescence. *J Clin Invest* 2004;113:8-13.
449. Ben-Porath I, Weinberg RA. The signals and pathways activating cellular senescence. *Int J Biochem Cell Biol* 2005;37:961-976.
450. Egan CA, Savre-Train I, Shay JW, Wilson SE, Bourne WM. Analysis of telomere lengths in human corneal endothelial cells from donors of different ages. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39:648-653.
451. Konomi K, Joyce NC. Age and topographical comparison of telomere lengths in human corneal endothelial cells. *Mol Vis* 2007;13:1251-1258.
452. Whikehart DR, Register SJ, Chang Q, Montgomery B. Relationship of telomeres and p53 in aging bovine corneal endothelial cell cultures. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:1070-1075.
453. Amano S. Transplantation of corneal endothelial cells. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi* 2002;106:805-835; discussion 836.
454. Schulz MW, Chamberlain CG, de Jongh RU, McAvoy JW. Acidic and basic FGF in ocular media and lens: implications for lens polarity and growth patterns. *Development* 1993;118:117-126.
455. Tripathi RC, Borisuth NS, Tripathi BJ. Detection, quantification, and significance of basic fibroblast growth factor in the aqueous humor of man, cat, dog and pig. *Exp Eye Res* 1992;54:447-454.
456. Arnold DR, Moshayedi P, Schoen TJ, Jones BE, Chader GJ, Waldbillig RJ. Distribution of IGF-I and -II, IGF binding proteins (IGFBPs) and IGFBP mRNA in ocular fluids and tissues: potential sites of synthesis of IGFBPs in aqueous and vitreous. *Exp Eye Res* 1993;56:555-565.
457. Araki-Sasaki K, Danjo S, Kawaguchi S, Hosohata J, Tano Y. Human hepatocyte growth factor (HGF) in the aqueous humor. *Jpn J Ophthalmol* 1997;41:409-413.
458. Van Setten GB, Fagerholm P, Philipson B, Schultz G. Growth factors and their receptors in the anterior chamber. Absence of epidermal growth factor and transforming growth factor alpha in human aqueous humor. *Ophthalmic Res* 1996;28:361-364.
459. Gospodarowicz D, Delgado D, Vlodavsky I. Permissive effect of the extracellular matrix on cell proliferation in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980;77:4094-4098.
460. Schweigerer L, Ferrara N, Haaparanta T, Neufeld G, Gospodarowicz D. Basic fibroblast growth factor: expression in cultured cells derived from corneal endothelium and lens epithelium. *Exp Eye Res* 1988;46:71-80.
461. Blake DA, Yu H, Young DL, Caldwell DR. Matrix stimulates the proliferation of human corneal endothelial cells in culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997;38:1119-1129.
462. Morton K, Hutchinson C, Jeanny JC, Karpouzas I, Pouliquen Y, Courtois Y. Colocalization of fibroblast growth factor binding sites with extracellular matrix components in normal and keratoconus corneas. *Curr Eye Res* 1989;8:975-987.

463. Rieck P, Oliver L, Engelmann K, Fuhrmann G, Hartmann C, Courtois Y. The role of exogenous/endogenous basic fibroblast growth factor (FGF2) and transforming growth factor beta (TGF beta-1) on human corneal endothelial cells proliferation in vitro. *Exp Cell Res* 1995;220:36-46.
464. Gu X, Kay EP. Distribution and putative roles of fibroblast growth factor-2 isoforms in corneal endothelial modulation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39:2252-2258.
465. Wilson SE, Lloyd SA. Epidermal growth factor and its receptor, basic fibroblast growth factor, transforming growth factor beta-1, and interleukin-1 alpha messenger RNA production in human corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991;32:2747-2756.
466. Wilson SE, Lloyd SA, He YG. Fibroblast growth factor-1 receptor messenger RNA expression in corneal cells. *Cornea* 1993;12:249-254.
467. Wilson SE, Schultz GS, Chegini N, Weng J, He YG. Epidermal growth factor, transforming growth factor alpha, transforming growth factor beta, acidic fibroblast growth factor, basic fibroblast growth factor, and interleukin-1 proteins in the cornea. *Exp Eye Res* 1994;59:63-71.
468. Schultz G, Cipolla L, Whitehouse A, Eiferman R, Woost P, Jumblatt M. Growth factors and corneal endothelial cells: III. Stimulation of adult human corneal endothelial cell mitosis in vitro by defined mitogenic agents. *Cornea* 1992;11:20-27.
469. Petroll WM, Jester JV, Bean J, Cavanagh HD. Labeling of cycling corneal endothelial cells during healing with a monoclonal antibody to the Ki67 antigen (MIB-1). *Cornea* 1999;18:98-108.
470. Raphael B, Kerr NC, Shimizu RW, Lass JH, Crouthamel KC, Glaser SR, Stern GA, McLaughlin BJ, Musch DC, Duzman E, et al. Enhanced healing of cat corneal endothelial wounds by epidermal growth factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993;34:2305-2312.
471. Sosnowski RG, Feldman S, Feramisco JR. Interference with endogenous ras function inhibits cellular responses to wounding. *J Cell Biol* 1993;121:113-119.
472. Feldman ST, Gately D, Schonthal A, Feramisco JR. Fos expression and growth regulation in bovine corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1992;33:3307-3314.
473. Nguyen V, Schonthal A, Feldman ST. Expression of c-jun proto-oncogene in corneal endothelium. *Exp Eye Res* 1994;59:335-341.
474. Graham MA, Rawe I, Dartt DA, Joyce NC. Protein kinase C regulation of corneal endothelial cell proliferation and cell cycle. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:4124-4132.
475. Gu X, Seong GJ, Lee YG, Kay EP. Fibroblast growth factor 2 uses distinct signaling pathways for cell proliferation and cell shape changes in corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996;37:2326-2334.
476. Kay EP, Park SY, Ko MK, Lee SC. Fibroblast growth factor 2 uses PLC-gamma1 for cell proliferation and PI3-kinase for alteration of cell shape and cell proliferation in corneal endothelial cells. *Mol Vis* 1998;4:22.

477. Lee HT, Kay EP. Regulatory role of cAMP on expression of Cdk4 and p27(Kip1) by inhibiting phosphatidylinositol 3-kinase in corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:3816-3825.
478. Vlodavsky I, Folkman J, Sullivan R, Fridman R, Ishai-Michaeli R, Sasse J, Klagsbrun M. Endothelial cell-derived basic fibroblast growth factor: synthesis and deposition into subendothelial extracellular matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84:2292-2296.
479. Landshman N, Belkin M, Ben-Hanan I, Ben-Chaim O, Assia E, Savion N. Regeneration of cat corneal endothelium induced in vivo by fibroblast growth factor. *Exp Eye Res* 1987;45:805-811.
480. Hyldahl L, Schofield PN, Engstrom W. Stimulatory effects of basic fibroblast growth factor on DNA synthesis in the human embryonic cornea. *Development* 1990;109:605-611.
481. Kay EP, Gu X, Smith RE. Corneal endothelial modulation: bFGF as direct mediator and corneal endothelium modulation factor as inducer. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994;35:2427-2435.
482. Ullrich A, Schlessinger J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 1990;61:203-212.
483. Klagsbrun M, Baird A. A dual receptor system is required for basic fibroblast growth factor activity. *Cell* 1991;67:229-231.
484. Suh PG, Ryu SH, Moon KH, Suh HW, Rhee SG. Cloning and sequence of multiple forms of phospholipase C. *Cell* 1988;54:161-169.
485. Rebecchi MJ, Pentylala SN. Structure, function, and control of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Physiol Rev* 2000;80:1291-1335.
486. Smith MR, Ryu SH, Suh PG, Rhee SG, Kung HF. S-phase induction and transformation of quiescent NIH 3T3 cells by microinjection of phospholipase C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86:3659-3663.
487. Smith MR, Liu YL, Matthews NT, Rhee SG, Sung WK, Kung HF. Phospholipase C-gamma 1 can induce DNA synthesis by a mechanism independent of its lipase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:6554-6558.
488. Marshall CJ. MAP kinase kinase kinase, MAP kinase kinase and MAP kinase. *Curr Opin Genet Dev* 1994;4:82-89.
489. Waskiewicz AJ, Cooper JA. Mitogen and stress response pathways: MAP kinase cascades and phosphatase regulation in mammals and yeast. *Curr Opin Cell Biol* 1995;7:798-805.
490. Kapeller R, Cantley LC. Phosphatidylinositol 3-kinase. *Bioessays* 1994;16:565-576.
491. Klippel A, Escobedo MA, Wachowicz MS, Apell G, Brown TW, Giedlin MA, Kavanaugh WM, Williams LT. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase is sufficient for cell cycle entry and promotes cellular changes characteristic of oncogenic transformation. *Mol Cell Biol* 1998;18:5699-5711.
492. Chakravarthy MV, Abraha TW, Schwartz RJ, Fiorotto ML, Booth FW. Insulin-like growth factor-I extends in vitro replicative life span of skeletal muscle satellite cells by enhancing G1/S cell cycle progression via the activation of phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signaling pathway. *J Biol Chem* 2000;275:35942-35952.

493. Rivard N, Boucher MJ, Asselin C, L'Allemain G. MAP kinase cascade is required for p27 downregulation and S phase entry in fibroblasts and epithelial cells. *Am J Physiol* 1999;277:C652-664.
494. Livneh E, Fishman DD. Linking protein kinase C to cell-cycle control. *Eur J Biochem* 1997;248:1-9.
495. Besson A, Yong VW. Involvement of p21(Waf1/Cip1) in protein kinase C alpha-induced cell cycle progression. *Mol Cell Biol* 2000;20:4580-4590.
496. Sherr CJ, Roberts JM. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* 1995;9:1149-1163.
497. Rivard N, L'Allemain G, Bartek J, Pouyssegur J. Abrogation of p27Kip1 by cDNA antisense suppresses quiescence (G0 state) in fibroblasts. *J Biol Chem* 1996;271:18337-18341.
498. Lee HT, Kim TY, Kay EP. Cdk4 and p27Kip1 play a role in PLC-gamma1-mediated mitogenic signaling pathway of 18 kDa FGF-2 in corneal endothelial cells. *Mol Vis* 2002;8:17-25.
499. Roche S, Koegl M, Courtneidge SA. The phosphatidylinositol 3-kinase alpha is required for DNA synthesis induced by some, but not all, growth factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:9185-9189.
500. Jones SM, Klinghoffer R, Prestwich GD, Toker A, Kazlauskas A. PDGF induces an early and a late wave of PI 3-kinase activity, and only the late wave is required for progression through G1. *Curr Biol* 1999;9:512-521.
501. Takeda K, Ichiki T, Tokunou T, Iino N, Takeshita A. 15-Deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 and thiazolidinediones activate the MEK/ERK pathway through phosphatidylinositol 3-kinase in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 2001;276:48950-48955.
502. Goncharova EA, Ammit AJ, Irani C, Carroll RG, Eszterhas AJ, Panettieri RA, Krymskaya VP. PI3K is required for proliferation and migration of human pulmonary vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002;283:L354-363.
503. Lee HT, Kay EP. Regulatory role of PI 3-kinase on expression of Cdk4 and p27, nuclear localization of Cdk4, and phosphorylation of p27 in corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:1521-1528.
504. Kim TY, Kim WI, Smith RE, Kay ED. Role of p27(Kip1) in cAMP- and TGF-beta2-mediated antiproliferation in rabbit corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:3142-3149.
505. Kim TY, Kim WI, Smith RE, Kay EP. Differential activity of TGF-beta2 on the expression of p27Kip1 and Cdk4 in actively cycling and contact inhibited rabbit corneal endothelial cells. *Mol Vis* 2001;7:261-270.
506. Jampel HD, Roche N, Stark WJ, Roberts AB. Transforming growth factor-beta in human aqueous humor. *Curr Eye Res* 1990;9:963-969.
507. Dalma-Weiszhausz J, Blumenkranz M, Hartzler M, Hernandez E. Intraocular extracellular cyclic nucleotide concentrations: the influence of vitreous surgery. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1993;231:184-186.

508. L'Allemain G, Lavoie JN, Rivard N, Baldin V, Pouyssegur J. Cyclin D1 expression is a major target of the cAMP-induced inhibition of cell cycle entry in fibroblasts. *Oncogene* 1997;14:1981-1990.
509. Fukumoto S, Koyama H, Hosoi M, Yamakawa K, Tanaka S, Morii H, Nishizawa Y. Distinct role of cAMP and cGMP in the cell cycle control of vascular smooth muscle cells: cGMP delays cell cycle transition through suppression of cyclin D1 and cyclin-dependent kinase 4 activation. *Circ Res* 1999;85:985-991.
510. Haddad MM, Xu W, Schwahn DJ, Liao F, Medrano EE. Activation of a cAMP pathway and induction of melanogenesis correlate with association of p16(INK4) and p27(KIP1) to CDKs, loss of E2F-binding activity, and premature senescence of human melanocytes. *Exp Cell Res* 1999;253:561-572.
511. Rao S, Gray-Bablin J, Herliczek TW, Keyomarsi K. The biphasic induction of p21 and p27 in breast cancer cells by modulators of cAMP is posttranscriptionally regulated and independent of the PKA pathway. *Exp Cell Res* 1999;252:211-223.
512. Naderi S, Gutzkow KB, Christoffersen J, Smeland EB, Blomhoff HK. cAMP-mediated growth inhibition of lymphoid cells in G1: rapid down-regulation of cyclin D3 at the level of translation. *Eur J Immunol* 2000;30:1757-1768.
513. Bornfeldt KE, Krebs EG. Crosstalk between protein kinase A and growth factor receptor signaling pathways in arterial smooth muscle. *Cell Signal* 1999;11:465-477.
514. Kim S, Jee K, Kim D, Koh H, Chung J. Cyclic AMP inhibits Akt activity by blocking the membrane localization of PDK1. *J Biol Chem* 2001;276:12864-12870.
515. Wang L, Liu F, Adamo ML. Cyclic AMP inhibits extracellular signal-regulated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathways by inhibiting Rap1. *J Biol Chem* 2001;276:37242-37249.
516. Schmitt JM, Stork PJ. PKA phosphorylation of Src mediates cAMP's inhibition of cell growth via Rap1. *Mol Cell* 2002;9:85-94.
517. Jumblatt MM, Matkin ED, Neufeld AH. Pharmacological regulation of morphology and mitosis in cultured rabbit corneal endothelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1988;29:586-593.
518. Woost PG, Jumblatt MM, Eiferman RA, Schultz GS. Growth factors and corneal endothelial cells: II. Characterization of epidermal growth factor receptor from bovine corneal endothelial cells. *Cornea* 1992;11:11-19.
519. Soltau JB, McLaughlin BJ. Effects of growth factors on wound healing in serum-deprived kitten corneal endothelial cell cultures. *Cornea* 1993;12:208-215.
520. Fabricant R, Salisbury JD, Berkowitz RA, Kaufman HE. Regenerative effects of epidermal growth factor after penetrating keratoplasty in primates. *Arch Ophthalmol* 1982;100:994-995.
521. Nayak SK, Samples JR, Deg JK, Binder PS. Growth characteristics of primate (baboon) corneal endothelium in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1986;27:607-611.
522. Wells A. EGF receptor. *Int J Biochem Cell Biol* 1999;31:637-643.
523. Tonks NK. PTP1B: from the sidelines to the front lines! *FEBS Lett* 2003;546:140-148.
524. Milarski KL, Zhu G, Pearl CG, McNamara DJ, Dobrusin EM, MacLean D, Thieme-Sefler A, Zhang ZY, Sawyer T, Decker SJ, et al. Sequence specificity in recognition of

- the epidermal growth factor receptor by protein tyrosine phosphatase 1B. *J Biol Chem* 1993;268:23634-23639.
525. Marshall CJ. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* 1995;80:179-185.
526. Alroy I, Yarden Y. The ErbB signaling network in embryogenesis and oncogenesis: signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions. *FEBS Lett* 1997;410:83-86.
527. Raab G, Klagsbrun M. Heparin-binding EGF-like growth factor. *Biochim Biophys Acta* 1997;1333:F179-199.
528. Baass PC, Di Guglielmo GM, Authier F, Posner BI, Bergeron JJ. Compartmentalized signal transduction by receptor tyrosine kinases. *Trends Cell Biol* 1995;5:465-470.
529. Miaczynska M, Pelkmans L, Zerial M. Not just a sink: endosomes in control of signal transduction. *Curr Opin Cell Biol* 2004;16:400-406.
530. Zhang ZY, Zhou B, Xie L. Modulation of protein kinase signaling by protein phosphatases and inhibitors. *Pharmacol Ther* 2002;93:307-317.
531. Liu F, Chernoff J. Protein tyrosine phosphatase 1B interacts with and is tyrosine phosphorylated by the epidermal growth factor receptor. *Biochem J* 1997;327 ( Pt 1):139-145.
532. Chen WL, Harris DL, Joyce NC. Effects of SOV-induced phosphatase inhibition and expression of protein tyrosine phosphatases in rat corneal endothelial cells. *Exp Eye Res* 2005;81:570-580.
533. Harris DL, Joyce NC. Protein tyrosine phosphatase, PTP1B, expression and activity in rat corneal endothelial cells. *Mol Vis* 2007;13:785-796.
534. Ishino Y, Zhu C, Harris DL, Joyce NC. Protein tyrosine phosphatase-1B (PTP1B) helps regulate EGF-induced stimulation of S-phase entry in human corneal endothelial cells. *Mol Vis* 2008;14:61-70.
535. Kurosaka D, Nagamoto T. Inhibitory effect of TGF-beta 2 in human aqueous humor on bovine lens epithelial cell proliferation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994;35:3408-3412.
536. Cousins SW, McCabe MM, Danielpour D, Streilein JW. Identification of transforming growth factor-beta as an immunosuppressive factor in aqueous humor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991;32:2201-2211.
537. Raugi GJ, Olerud JE, Gown AM. Thrombospondin in early human wound tissue. *J Invest Dermatol* 1987;89:551-554.
538. Schultz-Cherry S, Murphy-Ullrich JE. Thrombospondin causes activation of latent transforming growth factor-beta secreted by endothelial cells by a novel mechanism. *J Cell Biol* 1993;122:923-932.
539. Crawford SE, Stellmach V, Murphy-Ullrich JE, Ribeiro SM, Lawler J, Hynes RO, Boivin GP, Bouck N. Thrombospondin-1 is a major activator of TGF-beta1 in vivo. *Cell* 1998;93:1159-1170.
540. Murphy-Ullrich JE, Poczatek M. Activation of latent TGF-beta by thrombospondin-1: mechanisms and physiology. *Cytokine Growth Factor Rev* 2000;11:59-69.

541. Lyons RM, Gentry LE, Purchio AF, Moses HL. Mechanism of activation of latent recombinant transforming growth factor beta 1 by plasmin. *J Cell Biol* 1990;110:1361-1367.
542. Hiscott P, Seitz B, Schlotzer-Schrehardt U, Naumann GO. Immunolocalisation of thrombospondin 1 in human, bovine and rabbit cornea. *Cell Tissue Res* 1997;289:307-310.
543. Abe M, Oda N, Sato Y. Cell-associated activation of latent transforming growth factor-beta by calpain. *J Cell Physiol* 1998;174:186-193.
544. Munjal ID, Crawford DR, Blake DA, Sabet MD, Gordon SR. Thrombospondin: biosynthesis, distribution, and changes associated with wound repair in corneal endothelium. *Eur J Cell Biol* 1990;52:252-263.
545. Ramsby ML, Kreutzer DL. Fibrin induction of tissue plasminogen activator expression in corneal endothelial cells in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993;34:3207-3219.
546. Ramsby ML, Kreutzer DL. Fibrin induction of thrombospondin in corneal endothelial cells in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993;34:165-174.
547. Massague J. Receptors for the TGF-beta family. *Cell* 1992;69:1067-1070.
548. Wrana JL, Attisano L, Wieser R, Ventura F, Massague J. Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature* 1994;370:341-347.
549. Lopez-Casillas F, Wrana JL, Massague J. Betaglycan presents ligand to the TGF beta signaling receptor. *Cell* 1993;73:1435-1444.
550. Joyce NC, Zieske JD. Transforming growth factor-beta receptor expression in human cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997;38:1922-1928.
551. Harris DL, Joyce NC. Transforming growth factor-beta suppresses proliferation of rabbit corneal endothelial cells in vitro. *J Interferon Cytokine Res* 1999;19:327-334.
552. Muller D, Thieke K, Burgin A, Dickmanns A, Eilers M. Cyclin E-mediated elimination of p27 requires its interaction with the nuclear pore-associated protein mNPAP60. *Embo J* 2000;19:2168-2180.
553. Chen KH, Hsu WM, Lee SM. Differential effects of transforming growth factor-beta2 on corneal endothelial cell proliferation-A role of serum factors. *Exp Eye Res* 2002;75:61-67.
554. Xie WL, Chipman JG, Robertson DL, Erikson RL, Simmons DL. Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:2692-2696.
555. Hla T, Neilson K. Human cyclooxygenase-2 cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:7384-7388.
556. Lu J, Lu Z, Reinach P, Zhang J, Dai W, Lu L, Xu M. TGF-beta2 inhibits AKT activation and FGF-2-induced corneal endothelial cell proliferation. *Exp Cell Res* 2006;312:3631-3640.
557. Chen KH, Hsu WM, Chiang CC, Li YS. Transforming growth factor-beta2 inhibition of corneal endothelial proliferation mediated by prostaglandin. *Curr Eye Res* 2003;26:363-370.

558. Kato A, Takahashi H, Takahashi Y, Matsushime H. Inactivation of the cyclin D-dependent kinase in the rat fibroblast cell line, 3Y1, induced by contact inhibition. *J Biol Chem* 1997;272:8065-8070.
559. Schutz L, Mora PT. The need for direct cell contact in "contact" inhibition of cell division in culture. *J Cell Physiol* 1968;71:1-6.
560. Teitel JM. Specific inhibition of endothelial cell proliferation by isolated endothelial plasma membranes. *J Cell Physiol* 1986;128:329-336.
561. Joyce NC, Harris DL, Zieske JD. Mitotic inhibition of corneal endothelium in neonatal rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39:2572-2583.
562. Joyce NC, Harris DL, Mello DM. Mechanisms of mitotic inhibition in corneal endothelium: contact inhibition and TGF-beta2. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43:2152-2159.
563. Collares-Buzato CB, McEwan GT, Jepson MA, Simmons NL, Hirst BH. Paracellular barrier and junctional protein distribution depend on basolateral extracellular Ca<sup>2+</sup> in cultured epithelia. *Biochim Biophys Acta* 1994;1222:147-158.
564. Nigam SK, Rodriguez-Boulan E, Silver RB. Changes in intracellular calcium during the development of epithelial polarity and junctions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:6162-6166.
565. Nagar B, Overduin M, Ikura M, Rini JM. Structural basis of calcium-induced E-cadherin rigidification and dimerization. *Nature* 1996;380:360-364.
566. Pertz O, Bozic D, Koch AW, Fauser C, Brancaccio A, Engel J. A new crystal structure, Ca<sup>2+</sup> dependence and mutational analysis reveal molecular details of E-cadherin homoassociation. *Embo J* 1999;18:1738-1747.
567. McCarthy KM, Skare IB, Stankewich MC, Furuse M, Tsukita S, Rogers RA, Lynch RD, Schneeberger EE. Occludin is a functional component of the tight junction. *J Cell Sci* 1996;109 ( Pt 9):2287-2298.
568. Siliciano JD, Goodenough DA. Localization of the tight junction protein, ZO-1, is modulated by extracellular calcium and cell-cell contact in Madin-Darby canine kidney epithelial cells. *J Cell Biol* 1988;107:2389-2399.
569. Jongen WM, Fitzgerald DJ, Asamoto M, Piccoli C, Slaga TJ, Gros D, Takeichi M, Yamasaki H. Regulation of connexin 43-mediated gap junctional intercellular communication by Ca<sup>2+</sup> in mouse epidermal cells is controlled by E-cadherin. *J Cell Biol* 1991;114:545-555.
570. Kaye GI, Hoefle FB, Donn A. Studies on the cornea. 8. Reversibility of the effects of in vitro perfusion of the rabbit corneal endothelium with calcium-free medium. *Invest Ophthalmol* 1973;12:98-113.
571. Kaye GI, Mishima S, Cole JD, Kaye NW. Studies on the cornea. VII. Effects of perfusion with a Ca<sup>++</sup>-free medium on the corneal endothelium. *Invest Ophthalmol* 1968;7:53-66.
572. Stern ME, Edelhauser HF, Pederson HJ, Staats WD. Effects of ionophores X537a and A23187 and calcium-free medium on corneal endothelial morphology. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1981;20:497-508.
573. Patel SP, Bourne WM. Corneal endothelial cell proliferation: a function of cell density. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50:2742-2746.

574. Farquhar MG, Palade GE. Junctional complexes in various epithelia. *J Cell Biol* 1963;17:375-412.
575. Mitic LL, Anderson JM. Molecular architecture of tight junctions. *Annu Rev Physiol* 1998;60:121-142.
576. Stevenson BR, Keon BH. The tight junction: morphology to molecules. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1998;14:89-109.
577. Tsukita S, Furuse M, Itoh M. Structural and signalling molecules come together at tight junctions. *Curr Opin Cell Biol* 1999;11:628-633.
578. Cereijido M, Valdes J, Shoshani L, Contreras RG. Role of tight junctions in establishing and maintaining cell polarity. *Annu Rev Physiol* 1998;60:161-177.
579. Gonzalez-Mariscal L, Betanzos A, Avila-Flores A. MAGUK proteins: structure and role in the tight junction. *Semin Cell Dev Biol* 2000;11:315-324.
580. Zahraoui A, Louvard D, Galli T. Tight junction, a platform for trafficking and signaling protein complexes. *J Cell Biol* 2000;151:F31-36.
581. Tsukita S, Furuse M, Itoh M. Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2:285-293.
582. D'Atri F, Citi S. Molecular complexity of vertebrate tight junctions (Review). *Mol Membr Biol* 2002;19:103-112.
583. Stevenson BR, Siliciano JD, Mooseker MS, Goodenough DA. Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. *J Cell Biol* 1986;103:755-766.
584. Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Kitani-Yasuda T, Tsukita S. The 220-kD protein colocalizing with cadherins in non-epithelial cells is identical to ZO-1, a tight junction-associated protein in epithelial cells: cDNA cloning and immunoelectron microscopy. *J Cell Biol* 1993;121:491-502.
585. Willott E, Balda MS, Fanning AS, Jameson B, Van Itallie C, Anderson JM. The tight junction protein ZO-1 is homologous to the Drosophila discs-large tumor suppressor protein of septate junctions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:7834-7838.
586. Woods DF, Bryant PJ. ZO-1, DlgA and PSD-95/SAP90: homologous proteins in tight, septate and synaptic cell junctions. *Mech Dev* 1993;44:85-89.
587. Gottardi CJ, Arpin M, Fanning AS, Louvard D. The junction-associated protein, zonula occludens-1, localizes to the nucleus before the maturation and during the remodeling of cell-cell contacts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:10779-10784.
588. Hoover KB, Liao SY, Bryant PJ. Loss of the tight junction MAGUK ZO-1 in breast cancer: relationship to glandular differentiation and loss of heterozygosity. *Am J Pathol* 1998;153:1767-1773.
589. Cao Z, Wu HK, Bruce A, Wollenberg K, Panjwani N. Detection of differentially expressed genes in healing mouse corneas, using cDNA microarrays. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43:2897-2904.
590. Gumbiner B, Lowenkopf T, Apatira D. Identification of a 160-kDa polypeptide that binds to the tight junction protein ZO-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:3460-3464.

591. Balda MS, Matter K. The tight junction protein ZO-1 and an interacting transcription factor regulate ErbB-2 expression. *Embo J* 2000;19:2024-2033.
592. Balda MS, Garrett MD, Matter K. The ZO-1-associated Y-box factor ZONAB regulates epithelial cell proliferation and cell density. *J Cell Biol* 2003;160:423-432.
593. Malumbres M, Barbacid M. To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat Rev Cancer* 2001;1:222-231.
594. Serrano M. The tumor suppressor protein p16INK4a. *Exp Cell Res* 1997;237:7-13.
595. Ekholm SV, Reed SI. Regulation of G(1) cyclin-dependent kinases in the mammalian cell cycle. *Curr Opin Cell Biol* 2000;12:676-684.
596. Sherr CJ. The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. *Cancer Res* 2000;60:3689-3695.
597. Hayashi J, Kajino K, Umeda T, Takano S, Arakawa Y, Kudo M, Hino O. Somatic mutation and SNP in the promoter of dbpA and human hepatocarcinogenesis. *Int J Oncol* 2002;21:847-850.
598. Noya F, Chien WM, Wu X, Banerjee NS, Kappes JC, Broker TR, Chow LT. The promoter of the human proliferating cell nuclear antigen gene is not sufficient for cell cycle-dependent regulation in organotypic cultures of keratinocytes. *J Biol Chem* 2002;277:17271-17280.
599. Sourisseau T, Georgiadis A, Tsapara A, Ali RR, Pestell R, Matter K, Balda MS. Regulation of PCNA and cyclin D1 expression and epithelial morphogenesis by the ZO-1-regulated transcription factor ZONAB/DbpA. *Mol Cell Biol* 2006;26:2387-2398.
600. Kaji K, Matsuo M. Ageing of chick embryo fibroblasts in vitro. II. Relationship between cell proliferation and increased multinuclear cells. *Mech Ageing Dev* 1978;8:233-239.
601. Fine BS. Lipoidal degeneration of the retinal pigment epithelium. *Am J Ophthalmol* 1981;91:469-473.
602. Lee WR, Blass GE, Shaw DC. Age-related retinal vasculopathy. *Eye (Lond)* 1987;1 (Pt 2):296-303.
603. Delori FC, Goger DG, Dorey CK. Age-related accumulation and spatial distribution of lipofuscin in RPE of normal subjects. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:1855-1866.
604. Kaji K, Matsuo M. Aging of chick embryo fibroblasts in vitro. III. Polyploid cell accumulation. *Exp Cell Res* 1979;119:231-236.
605. Bruce SA, Deamond SF, Ts'o PO. In vitro senescence of Syrian hamster mesenchymal cells of fetal to aged adult origin. Inverse relationship between in vivo donor age and in vitro proliferative capacity. *Mech Ageing Dev* 1986;34:151-173.
606. Stein GH, Namba M, Corsaro CM. Relationship of finite proliferative lifespan, senescence, and quiescence in human cells. *J Cell Physiol* 1985;122:343-349.
607. Praeger B. In-vitro studies of aging. *Dermatol Clin* 1986;4:359-369.
608. Little JB. Relationship between DNA repair capacity and cellular aging. *Gerontology* 1976;22:28-55.

609. Hasegawa N, Hanaoka F, Yamada M. Increased unscheduled DNA synthesis in aged human diploid fibroblasts. *Mech Ageing Dev* 1984;25:297-305.
610. Vaziri H. Critical telomere shortening regulated by the ataxia-telangiectasia gene acts as a DNA damage signal leading to activation of p53 protein and limited life-span of human diploid fibroblasts. A review. *Biochemistry (Mosc)* 1997;62:1306-1310.
611. Cristofalo VJ. Thymidine labelling index as a criterion of aging in vitro. *Gerontology* 1976;22:9-27.
612. Holliday R. DNA methylation and epigenetic mechanisms. *Cell Biophys* 1989;15:15-20.
613. Bond JA, Wyllie FS, Wynford-Thomas D. Escape from senescence in human diploid fibroblasts induced directly by mutant p53. *Oncogene* 1994;9:1885-1889.
614. Kulju KS, Lehman JM. Increased p53 protein associated with aging in human diploid fibroblasts. *Exp Cell Res* 1995;217:336-345.
615. Pang JH, Chen KY. Global change of gene expression at late G1/S boundary may occur in human IMR-90 diploid fibroblasts during senescence. *J Cell Physiol* 1994;160:531-538.
616. Neubauer L, Laing RA, Leibowitz HM, Oak SS. Coalescence of endothelial cells in the traumatized cornea. I. Experimental observations in cryopreserved tissue. *Arch Ophthalmol* 1983;101:1787-1790.
617. Laing RA, Neubauer L, Leibowitz HM, Oak SS. Coalescence of endothelial cells in the traumatized cornea. II. Clinical observations. *Arch Ophthalmol* 1983;101:1712-1715.
618. Neubauer L, Baratz RS, Laing RA, Oak SS, Leibowitz HM. Coalescence of endothelial cells in the traumatized cornea. III. Correlation between specular and scanning electron microscopy. *Arch Ophthalmol* 1984;102:921-922.
619. Landshman N, Solomon A, Belkin M. Cell division in the healing of the corneal endothelium of cats. *Arch Ophthalmol* 1989;107:1804-1808.
620. Tuberville AW, McCartney MD, Boykins LG, McLaughlin BJ. A correlative electron microscopic and freeze-fracture examination of cat corneal endothelial wound repair. *Curr Eye Res* 1989;8:365-377.
621. Ikebe H, Takamatsu T, Itoi M, Fujita S. Cytofluorometric nuclear DNA determinations on human corneal endothelial cells. *Exp Eye Res* 1984;39:497-504.
622. Ikebe H, Takamatsu T, Itoi M, Fujita S. Age-dependent changes in nuclear DNA content and cell size of presumably normal human corneal endothelium. *Exp Eye Res* 1986;43:251-258.
623. Ikebe H, Takamatsu T, Itoi M, Fujita S. Changes in nuclear DNA content and cell size of injured human corneal endothelium. *Exp Eye Res* 1988;47:205-215.
624. Schafer KA. The cell cycle: a review. *Vet Pathol* 1998;35:461-478.
625. Prives C, Hall PA. The p53 pathway. *J Pathol* 1999;187:112-126.
626. Vaziri H, Benchimol S. From telomere loss to p53 induction and activation of a DNA-damage pathway at senescence: the telomere loss/DNA damage model of cell aging. *Exp Gerontol* 1996;31:295-301.

627. Levine AJ, Chang A, Dittmer D, Notterman DA, Silver A, Thorn K, Welsh D, Wu M. The p53 tumor suppressor gene. *J Lab Clin Med* 1994;123:817-823.
628. Kaghad M, Bonnet H, Yang A, Creancier L, Biscan JC, Valent A, Minty A, Chalon P, Lelias JM, Dumont X, Ferrara P, McKeon F, Caput D. Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell* 1997;90:809-819.
629. Sugrue MM, Shin DY, Lee SW, Aaronson SA. Wild-type p53 triggers a rapid senescence program in human tumor cells lacking functional p53. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:9648-9653.
630. Paull AC, Whikehart DR. Expression of the p53 family of proteins in central and peripheral human corneal endothelial cells. *Mol Vis* 2005;11:328-334.
631. Schonthal AH, Hwang JJ, Stevenson D, Trousdale MD. Expression and activity of cell cycle-regulatory proteins in normal and transformed corneal endothelial cells. *Exp Eye Res* 1999;68:531-539.
632. Yoshida K, Kase S, Nakayama K, Nagahama H, Harada T, Ikeda H, Harada C, Imaki J, Ohgami K, Shiratori K, Ilieva IB, Ohno S, Nishi S, Nakayama KI. Involvement of p27KIP1 in the proliferation of the developing corneal endothelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:2163-2167.
633. Kikuchi M, Harris DL, Obara Y, Senoo T, Joyce NC. p27kip1 Antisense-induced proliferative activity of rat corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:1763-1770.
634. Kikuchi M, Zhu C, Senoo T, Obara Y, Joyce NC. p27kip1 siRNA induces proliferation in corneal endothelial cells from young but not older donors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47:4803-4809.
635. Hengst L, Reed SI. Translational control of p27Kip1 accumulation during the cell cycle. *Science* 1996;271:1861-1864.
636. Shirane M, Harumiya Y, Ishida N, Hirai A, Miyamoto C, Hatakeyama S, Nakayama K, Kitagawa M. Down-regulation of p27(Kip1) by two mechanisms, ubiquitin-mediated degradation and proteolytic processing. *J Biol Chem* 1999;274:13886-13893.
637. Ishida N, Kitagawa M, Hatakeyama S, Nakayama K. Phosphorylation at serine 10, a major phosphorylation site of p27(Kip1), increases its protein stability. *J Biol Chem* 2000;275:25146-25154.
638. Liang J, Zubovitz J, Petrocelli T, Kotchetkov R, Connor MK, Han K, Lee JH, Ciarallo S, Catzavelos C, Beniston R, Franssen E, Slingerland JM. PKB/Akt phosphorylates p27, impairs nuclear import of p27 and opposes p27-mediated G1 arrest. *Nat Med* 2002;8:1153-1160.
639. Fujita N, Sato S, Katayama K, Tsuruo T. Akt-dependent phosphorylation of p27Kip1 promotes binding to 14-3-3 and cytoplasmic localization. *J Biol Chem* 2002;277:28706-28713.
640. Boehm M, Yoshimoto T, Crook MF, Nallamshetty S, True A, Nabel GJ, Nabel EG. A growth factor-dependent nuclear kinase phosphorylates p27(Kip1) and regulates cell cycle progression. *Embo J* 2002;21:3390-3401.

641. Lee JG, Kay EP. Two populations of p27 use differential kinetics to phosphorylate Ser-10 and Thr-187 via phosphatidylinositol 3-Kinase in response to fibroblast growth factor-2 stimulation. *J Biol Chem* 2007;282:6444-6454.
642. Ohta T, Michel JJ, Schottelius AJ, Xiong Y. ROC1, a homolog of APC11, represents a family of cullin partners with an associated ubiquitin ligase activity. *Mol Cell* 1999;3:535-541.
643. Kamura T, Hara T, Matsumoto M, Ishida N, Okumura F, Hatakeyama S, Yoshida M, Nakayama K, Nakayama KI. Cytoplasmic ubiquitin ligase KPC regulates proteolysis of p27(Kip1) at G1 phase. *Nat Cell Biol* 2004;6:1229-1235.
644. Lee JG, Kay EP. Involvement of two distinct ubiquitin E3 ligase systems for p27 degradation in corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49:189-196.
645. Enomoto K, Mimura T, Harris DL, Joyce NC. Age differences in cyclin-dependent kinase inhibitor expression and rb hyperphosphorylation in human corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47:4330-4340.
646. Sharpless NE. Ink4a/Arf links senescence and aging. *Exp Gerontol* 2004;39:1751-1759.
647. Famulski KS, Halloran PF. Molecular events in kidney ageing. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2005;14:243-248.
648. Reynisdottir I, Polyak K, Iavarone A, Massague J. Kip/Cip and Ink4 Cdk inhibitors cooperate to induce cell cycle arrest in response to TGF-beta. *Genes Dev* 1995;9:1831-1845.
649. Levenberg S, Yarden A, Kam Z, Geiger B. p27 is involved in N-cadherin-mediated contact inhibition of cell growth and S-phase entry. *Oncogene* 1999;18:869-876.
650. Driscoll B, T'Ang A, Hu YH, Yan CL, Fu Y, Luo Y, Wu KJ, Wen S, Shi XH, Barsky L, Weinberg K, Murphree AL, Fung YK. Discovery of a regulatory motif that controls the exposure of specific upstream cyclin-dependent kinase sites that determine both conformation and growth suppressing activity of pRb. *J Biol Chem* 1999;274:9463-9471.
651. Joyce NC, Harris DL. Decreasing expression of the G1-phase inhibitors, p21Cip1 and p16INK4a, promotes division of corneal endothelial cells from older donors. *Mol Vis* 2010;16:897-906.
652. Motegi Y, Usui T, Ishida K, Kato S, Yamashita H. Regulation of bovine corneal endothelial cell cycle by transforming growth factor-beta. *Acta Ophthalmol Scand* 2003;81:517-525.
653. Sugar J, Montoya M, Dontchev M, Tanner JP, Beck R, Gal R, Gallagher S, Gaster R, Heck E, Holland EJ, Kollman C, Malling J, Mannis MJ, Woody J. Donor risk factors for graft failure in the cornea donor study. *Cornea* 2009;28:981-985.
654. Pels E, Rijneveld WJ. Organ culture preservation for corneal tissue. Technical and quality aspects. *Dev Ophthalmol* 2009;43:31-46.
655. Lass JH, Gal RL, Ruedy KJ, Benetz BA, Beck RW, Baratz KH, Holland EJ, Kalajian A, Kollman C, Manning FJ, Mannis MJ, McCoy K, Montoya M, Stulting D, Xing D. An evaluation of image quality and accuracy of eye bank measurement of donor cornea endothelial cell density in the Specular Microscopy Ancillary Study. *Ophthalmology* 2005;112:431-440.

656. Benetz BA, Gal RL, Ruedy KJ, Rice C, Beck RW, Kalajian AD, Lass JH. Specular microscopy ancillary study methods for donor endothelial cell density determination of Cornea Donor Study images. *Curr Eye Res* 2006;31:319-327.
657. Gain P, Thuret G, Kodjikian L, Gavet Y, Turc PH, Theillere C, Acquart S, Le Petit JC, Maugery J, Campos L. Automated tri-image analysis of stored corneal endothelium. *Br J Ophthalmol* 2002;86:801-808.
658. Thuret G, Manissolle C, Acquart S, Garraud O, Campos-Guyotat L, Maugery J, Gain P. Urgent need for normalization of corneal graft quality controls in French eye banks. *Transplantation* 2004;78:1299-1302.
659. Deb-Joardar N, Thuret G, Racine GA, Pons D, Brun G, Parriaux O, Peoc'h M, Acquart S, Gain P. Standard microlithographic mosaics to assess endothelial cell counting methods by light microscopy in eye banks using organ culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47:4373-4377.
660. Deb-Joardar N, Thuret G, Zhao M, Acquart S, Peoc'h M, Garraud O, Gain P. Comparison of two semiautomated methods for evaluating endothelial cells of eye bank corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48:3077-3082.
661. Deb-Joardar N, Thuret G, Gavet Y, Acquart S, Garraud O, Egelhoffer H, Gain P. Reproducibility of endothelial assessment during corneal organ culture: comparison of a computer-assisted analyzer with manual methods. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48:2062-2067.
662. Thuret G, Deb-Joardar N, Manissolle C, Zhao M, Peoch M, Gain P, Gavet Y. Assessment of the human corneal endothelium: in vivo Topcon SP2000P specular microscope versus ex vivo sambacornea eye bank analyser. *Br J Ophthalmol* 2007;91:265-266.
663. Acquart S, Gain P, Zhao M, Gavet Y, Defreyn A, Piselli S, Garraud O, Thuret G. Endothelial morphometry by image analysis of corneas organ cultured at 31 degrees C. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51:1356-1364.
664. Gain P, Thuret G, Chiquet C, Dumollard JM, Mosnier JF, Burillon C, Delbosc B, Herve P, Campos L. Value of two mortality assessment techniques for organ cultured corneal endothelium: trypan blue versus TUNEL technique. *Br J Ophthalmol* 2002;86:306-310.

# **ANNEXES**

## I. CURRICULUM VITAE

Aurélien PIPPARELLI

Né le 10 novembre 1979 à Besançon (30 ans)

### **Adresse professionnelle**

Laboratoire "Biologie, Ingénierie et Imagerie de la Greffe de Cornée" (BiiGC)

Faculté de Médecine J. Lisfranc

15 rue Ambroise Paré

42023 Saint-Etienne Cedex 02

Tél : 04.77.42.14.25

E-mail : [aurelien.pipparelli@univ-st-etienne.fr](mailto:aurelien.pipparelli@univ-st-etienne.fr)

## EXPERIENCE PROFESSIONNELLE

---

### *Depuis septembre 2009*

#### **Attaché de Recherche Clinique dédié Ophtalmologie**

DRC du CHU de SAINT-ETIENNE, Service d'Ophtalmologie, Hôpital Nord.

### *Depuis octobre 2006*

#### **Doctorant en Biologie Moléculaire et Cellulaire.**

JE 2521 "Biologie, Ingénierie et Imagerie de la Greffe de Cornée" (BiiGC), Faculté de Médecine, Saint-Etienne, France.

Sujet de recherche : Cycle cellulaire de la cellule endothéliale cornéenne humaine.

### *Février- Août 2006*

#### **Stage de Master 2.**

CNRS FRE 3247 (anciennement UMR 7628) "Modèles en Biologie Cellulaire et Evolutive", Observatoire Océanologique de Banyuls sur Mer (OOB), UPMC, France.

Sujet de recherche : Expression tissulaire et caractérisation enzymatique de l'arylalkylamine-N-acétyl-transférase de roussette (*Scyliorhinus canicula*).

### *Juin- Août 2005*

#### **Stage de Master 1.**

CNRS FRE 3247 (anciennement UMR 7628) "Modèles en Biologie Cellulaire et Evolutive", Observatoire Océanologique de Banyuls sur Mer (OOB), UPMC, France.

Sujet de recherche : Etude de l'expression du gène codant l'arylalkylamine N-acétyltransférase-2 et de la mise en place de l'oscillateur circadien chez les embryons et les larves de poisson zèbre (*Danio rerio*).

### *Octobre 2004*

#### **Stage de Licence.**

Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France.

Sujet de recherche : Etude de l'influence de différents facteurs sur le développement in vitro de cellules nerveuses et musculaires (C2C12 et PC12) et de l'expression de protéines endogènes.

## CURSUS UNIVERSITAIRE & FORMATIONS

---

**2010 : Doctorat en Biologie Moléculaire et Cellulaire.**

Faculté de Médecine/Université Jean Monnet, Saint-Etienne, France.

**Formation d'Attaché de Recherche Clinique.**

Sup Santé, 8 quai André Lassagne 69001 Lyon.

**Formation théorique du Diplôme d'Enseignement Spécial d'Ophthalmologie (DES) Rhône-Alpes-Auvergne.**

**2006 : Master 2 de Physiologie et Neurosciences spécialité Physiologie et Biochimie Marine.** (Mention Bien, Major)

Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France.

**2005 : Master 1 de Physiologie et Neurosciences.**

Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France.

*Options :* Régulation et adaptation métabolique ; Physiologie des adaptations à l'environnement ; Physiopathologie des régulations cardio-vasculaires ; Bases physiologiques de la toxicité des médicaments ; Neurobiologie du comportement.

**2004 : Licence de Biologie Cellulaire et Physiologie spécialité Physiologie.**

Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France.

**2003 : DEUG Science et Technique spécialité Science de la Vie.**

Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France.

## COMPETENCES ACQUISES

---

### Recherche Fondamentale

- **Pratiques**

*Cultures cellulaires*

De cellules musculaires, nerveuses, lymphocytes, monocytes, plasmocytes, endothéliales cornéennes humaines et animales (lapin, rat ; veau, porc).

Ensemencement, suivi de la différenciation cellulaire, travail en milieu stérile et maintien des cultures sur plusieurs semaines, quantification assistée par ordinateur, suivi phénotypique, transfection, test MTT...

*Biologie moléculaire et Biochimie*

Extraction d'ARN, dosage par spectrophotométrie (protéines par la méthode de Bradford, acides nucléiques...), Reverse Transcription, PCR (Clean-up, Inverse, Nested, en Temps réel/Quantitative), Microarray, clonage, extraction ADN plasmidique (Mini, Midi, Maxi, Gigaprep), transfection, Blot (Western, Southern, Northern), siRNA, Hybridation in situ, chromatographie (en phase liquide et gazeuse), spectrométrie de masse.

*Immunologie*

RIA, ELISA, hémagglutination, cytofluorimétrie, immunomarquages sur cellules en cultures ou sur tissus.

*Bilans énergétiques*

Détermination de la prise alimentaire, dosages enzymatiques. Mesure de la dépense énergétique. Métabolisme cellulaire sur hépatocytes isolés et adipocytes.

### *Electrophysiologie*

Electrophysiologie réalisée sur cellules en cultures sur ovocytes ou sur explants de tissus nerveux, par des enregistrements intracellulaires à une ou deux électrodes ou des enregistrements en Patch clamp (en mode voltage imposé ou courant imposé). Traitement du signal, injection intracellulaire. Electrophysiologie chez l'homme en enregistrement multisite et potentiels évoqués.

### *Expérimentation sur l'animal*

Soins, manipulations, injections de drogues. Etudes comportementales chez le rat et apprentissage. Anesthésie, cathétérisme, dosages plasmiques, prélèvements d'organes, euthanasie.

### *Expérimentation chez l'homme*

Aspects éthiques et légaux de l'expérimentation humaine. Prélèvement d'organes humains (don du corps à la science). Tests olfactifs, auditifs, analyse sensorielle. Détermination de la V<sub>O2</sub> par step test et ergocycle. ECG, adaptation à l'hypoxie.

### *Informatique*

Logiciels : Office (Word, PowerPoint, Excel...); BLAST; Clustal; Cell<sup>^</sup>P; Graphpad Prism; ImageJ; Pdraw; Restriction Mapper; GEArray Expression Analysis Suite software (SuperArray Bioscience); 7500 Fast System Detection Software (SDS) version 1.2.3 (Applied Biosystems); U-Descartes...

Internet : Internet Explorer ; Mozilla Firefox ; Safari ; langage HTML...

### *Imagerie*

Acquisition : microscope photonique ; microscope à épifluorescence inversée ; microscope confocal ; microscope électronique à transmission/balayage ; microscope à contraste de phase ; vidéomicroscope. Multiple Images Acquisition (MIA). Extended Focus Images (EFI).

Analyse : Fluorochromes, fluorescence des marquages enzymatiques, FISH.

Analyse de gels.

Opérations sur une image : modifications d'histogramme, convolutions, morphologie mathématique, utilisations de la transformée de Fourier, étiquetage en composantes connexes, réhaussement du contraste local, correction de fond, réduction du bruit. Opérations entre images. Comptage, forme d'objets. Image binaire, algèbre de Boole, techniques de segmentation.

Image couleur, représentations RVB et HIS, diagrammes CIE. Représentations en 3 dimensions (3D). Décodage d'une image vidéo. Calibration d'une image en x, y et z. Programmation d'une application sous les logiciels ImageJ et Cell<sup>^</sup>P.

### *Administratifs*

Rédaction d'une demande de subvention (Grant: Fondation de l'Avenir 2007 ET7-468) et élaboration du budget.

Rédaction de bilan scientifique annuel pour expertise (Fondation de l'Avenir).

- **Théoriques**

- Physiologie*

- Couplage excitation-contraction musculaire ; Ajustements respiratoires et cardiovasculaires à l'exercice musculaire ; Métabolisme énergétique ; Ontogenèse des muscles squelettiques ; Ultra structure musculaire ; Thermogenèse musculaire.

- Physiopathologie des régulations cardio-vasculaires.

- Physiologie des adaptations à l'environnement ; Pathologies métaboliques (obésité/diabète).

- Physiologie/Physiopathologie/Toxicologie/Pharmacologie cutanée.

- Etude comportementale, métabolique et neuronale de la nutrition.

- Physiologie et écophysiologie des environnements extrêmes*

- Ambiances chaudes (milieux désertiques) et froides (milieux polaires) ; Hautes altitudes, microgravité ; Hypoxie ; Milieux souterrains et/ou confinés ; Milieux marins.

- Thermorégulation ; Ventilation.

- Plongée chez les mammifères, hyperbarie ; Vie en milieu polaire; Vie en milieux hypoxiques et réducteurs ; Osmorégulation.

- Neurobiologie*

- Transmission synaptique ; Electrogenèse ; Canaux ioniques ; Ontogenèse du système neuro-musculaire ; Neurogenèse ; Mort neuronale.

- Le code neuronal ; Neuromodulation des fonctions cognitives ; Neurobiologie de la mémoire ;

- Vision et cerveau ; Neurophysiologie de la nutrition.

- Endocrinologie*

- Régulation endocrine ; Endocrinologie moléculaire.

- Pharmacologie et toxicologie*

- Pharmaco et toxico-cinétique ; Interactions ligand-cible, Physiopathologie et pharmacologie des systèmes cardio-vasculaire et nerveux central.

- Immunologie*

- Système immunitaire ; Lymphopoïèse...

## Recherche Clinique

- **Pratiques**

- Coordination de 2 PHRC :

- x Essais comparatif de deux milieux de conservation des greffons cornéens : milieu de référence et nouveau milieu sans composant animal.

- Etude multicentrique prospective randomisée en double insu.

- Promoteur : CHU de Saint-Etienne, 42055 SAINT-ETIENNE Cedex 02.

- x Effet de la curarisation sur l'oculomotricité de l'enfant non strabique

- Etude thérapeutique multicentrique comparative randomisée.

- Promoteur : CHU de Saint-Etienne, 42055 SAINT-ETIENNE Cedex 02.

### Monitoring de différents essais cliniques :

x Etude GEFAL : Groupe d'Evaluation Français Avastin® versus Lucentis®  
Étude clinique thérapeutique (phase III), de non infériorité, multicentrique prospective randomisée en double insu.

Promoteur : Hospices Civils de Lyon 69229 LYON Cedex 02

x Intérêt de la corticothérapie en première intention, en injections intravitréennes lors des endophtalmies post-opératoires.

Etude multicentrique prospective randomisée en simple insu.

Promoteur : CHU de DIJON 21079 DIJON Cedex

x Apport de l'identification bactérienne moléculaire rapide par PCR en temps réel dans la prise en charge des endophtalmies aiguës postopératoires.

Etude multicentrique prospective.

Promoteur : CHU de GRENOBLE 38043 GRENOBLE Cedex 09

x Etude LT2345- PIII-12/08 : Efficacy and safety assessment of t2345 unpreserved eyedrops versus xalatan® in ocular hypertensive or glaucomatous patients.

Phase III study, international, multicentre, randomized, investigator-masked, 2 parallel groups, versus reference product, in 360 evaluable patients treated for 3 months.

Promoteur : Iris Pharma / Laboratoires Théa 63017 CLERMONT-FERRAND Cedex 2

x Protocole 192371-016-00 : Allergan Cyclosporine et KCA

Étude multicentrique, randomisée, double masquée, en groupes parallèles, visant à évaluer l'efficacité et l'innocuité d'une solution ophtalmique de cyclosporine à 0,010 % par comparaison avec son véhicule, administrée 4 fois par jour pendant 3 mois, suivie par une phase ouverte de 9 mois chez des patients atteints de kératoconjonctivite atopique.

Promoteur : Chiltern International 92200 NEUILLY SUR SEINE

#### • ***Théoriques***

Formation d'Attaché de Recherche Clinique.

Supsanté, 8 quai André Lassagne 69001 Lyon.

Formation théorique du Diplôme d'Enseignement Spécial d'Ophtalmologie (DES) Rhône-Alpes-Auvergne (40 modules de 4 heures sur 4 ans).

### **Langues**

---

- Anglais : niveau scientifique (lu, écrit, parlé)
- Espagnol : notions
- Allemand : notions

### **MEMBRE DE SOCIETES SAVANTES & CONSEILS SCIENTIFIQUES**

---

- CS IFR 143 IFRESIS (Institut Fédératif de Recherche en Sciences et Ingénierie de la Santé ; Université J. Monnet, Saint-Etienne) : depuis 2006
- Société Française d'Ophtalmologie (SFO) : depuis 2007
- European Eye Bank Association (EEBA) : depuis 2007
- Société de Biologie Cellulaire de France (SBCF) : depuis 2008
- Société d'Ophtalmologie de la Région Rhône-Alpes (SORA) : depuis 2009

## ACTIVITES D'ENSEIGNEMENT

---

- Responsable Universitaire de Formation à l'Institut de Formation en Soins Infirmiers (Croix Rouge) : depuis 2009
- Enseignement de l'Immunologie et de l'Infectiologie à l'Institut de Formation en Soins Infirmiers (Croix Rouge) : depuis 2009

## II. LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

### II.1. PUBLICATIONS

---

1. VUILLEUMIER R, BESSEAU L, BOEUF G, **PIPPARELLI A**, GOTHILF, Y, GEHRING, WG, KLEIN, DC, FALCÓN, J. *Starting the zebrafish pineal circadian clock with a single photic transition*. *Endocrinology*, 2006 ;147(5):2273-9.
2. THURET G, **PIPPARELLI A**. *Adaptation des banques de cornées à la préparation et à l'évaluation des greffons cornéens adaptés aux nouvelles techniques de greffe*. *Réflexions Ophtalmologiques*, 2007;108(12):25-29.
3. ZHAO M, THURET G, PISELLI S, **PIPPARELLI A**, ACQUART S, PEOC'H M, DUMOLLARD JM, GAIN P. *Use of poloxamers for deswelling of organ-cultured corneas*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2008;49(2):550-9.
4. HE Z, **PIPPARELLI A**, MANISSOLLE C, ACQUART S, GARRAUD O, GAIN P, THURET G. *Ex vivo gene electrotransfer to the endothelium of organ cultured human corneas*. *Ophthalmic Res*, 2010;43(1):43-55.
5. **PIPPARELLI A**, THURET G, PISELLI S, PEOC'H M, ACQUART S, GARRAUD O, GAIN P. *Cell cycle genes expression in human corneal endothelium*. (Soumission IOVS)
6. **PIPPARELLI A**, THURET G, TOUBEAU, He ZHIGUO, Simone PISELLI, Michel PEOC'H, Sabine LEFEVRE, Marc MURAINÉ, Philippe GAIN *Original method for pan-corneal endothelial viability assessment. Application to precut endothelial grafts by eye bank*. (Soumission IOVS)
7. ZHAO M, **PIPPARELLI A**, PISELLI S, ACQUART S, PEOC'H M, DUMOLLARD JM, GAIN P, THURET G. *Use of poloxamines for deswelling of organ-cultured corneas*. (En preparation)
8. **PIPPARELLI A**, THURET G, PISELLI S, PEOC'H M, ACQUART S, GARRAUD O, GAIN P. *Cyclin D1 and E1 overexpression in human corneal endothelium: cell cycle status*.(En preparation)
9. HE Z, **PIPPARELLI A**, PISELLI S, DUMOLLARD JM, PEOC'H M, GAIN P, THURET G. *Immunocytochemistry of cell cycle related proteins in endothelial cells of flat mounted human corneas*. (En preparation)
10. DUBAND S, **PIPPARELLI A**, CAMPOLMI N, PISELLI S, DUMOLLARD JM, PEOC'H M, ACQUART S, GARRAUD O, THURET G, GAIN P. *Selection and assessment of vital dyes to improve the quality control of the corneal endothelium of stored corneas*.

## II.2. COMMUNICATIONS

---

### Congrès nationaux :

1. VUILLEUMIER R, BESSEAU L, BŒUF G, **PIPPARELLI A**, FALCON J. *A single photic transition is sufficient to start the zebrafish circadian clocks*. Société Française de Biologie du Développement, Obernai (France), octobre 2005 (**oral**)
2. ZHAO M, **PIPPARELLI A**, PISELLI S, DUMOLLARD JM, PEOC'H M, ANSELME I, ACQUART S, CHAVARIN P, GARRAUD O, PRADES JM, THURET G, GAIN P. *Poloxamers : nouvelle famille de molécules pour la déturgescence des cornées en organoculture*. Société d'Ophtalmologie Rhône Alpes, Lyon, 9 mars 2007 (**oral**)
3. **PIPPARELLI A**, DUBAND S, ZHAO M, PISELLI S, MURAINÉ M, DUMOLLARD JM, PEOC'H M, PRADES JM, ACQUART S, THURET G, GAIN P. *Evaluation de la viabilité endothéliale pan-cornéenne par triple marquage Hoechst, Ethidium et Calcéine (HEC) et microscopie tridimensionnelle*. Journée de la Recherche de l'Ecole Doctorale Sciences Ingénierie Santé (ED SIS), Saint-Etienne, avril 2007 (**poster**)
4. **PIPPARELLI A\***, DUBAND S, ZHAO M, PISELLI S, MURAINÉ M, DUMOLLARD JM, PEOC'H M, PRADES JM, ACQUART S, THURET G, GAIN P. *Evaluation expérimentale de la viabilité endothéliale cornéenne par triple marquage Hoechst 33342, éthidium homodimère et calcéine-AM (HEC) : améliorations techniques par microscopie 3D*. Société Française d'Ophtalmologie, Paris, mai 2007 (**oral**)
5. ZHAO M, **PIPPARELLI A**, PISELLI S, DUMOLLARD JM, PEOC'H M, ANSELME I, ACQUART S, CHAVARIN P, GARRAUD O, PRADES JM, THURET G, GAIN P. *Analyses histologiques et ultra structurales des cornées humaines conservées en Corneamax et déturgées durant 48 heures dans les poloxamers*. Société Française d'Ophtalmologie, Paris, mai 2007 (**oral**)
6. ZHAO M, DEB-JOARDAR N, JOUBERT J, **PIPPARELLI A**, BRUN G, ACQUART S, CHAVARIN P, PEOC'H M, PRADES JM, MAUGERY J, THURET G, GAIN P. *Développement d'un dispositif de quantification de la transparence, du plissement et du gérontoxon pour les cornées conservées en organoculture*. Société Française d'Ophtalmologie, Paris, mai 2007 (**oral**)
7. CAMPOLMI N, DUBAND S, **PIPPARELLI A**, PISELLI S, DUMOLLARD JM, PEOC'H M, ACQUART S, GARRAUD O, THURET G, GAIN P. *Sélection et évaluation de colorants vitaux afin d'améliorer le contrôle-qualité endothélial des greffons cornéens conservés*. Société d'Ophtalmologie Rhône Alpes, Lyon, 4 avril 2008 (**oral**)
8. **PIPPARELLI A.\*** *Viabilité endothéliale cornéenne par triple marquage HEC en microscopie 3D*. 9ème journée Stéphanoise de cytométrie, 28 mai 2008 (**oral**)

9. **PIPPARELLI A.** *Viabilité endothéliale cornéenne par triple marquage HEC en microscopie 3D.* 9ème journée Stéphanoise de cytométrie, 28 mai 2008 (**poster**)
10. DUBAND S, CAMPOLMI N, **PIPPARELLI A**, PISELLI S, DUMOLLARD JM, PEOC'H M, ACQUART S, GARRAUD O, THURET G, GAIN P. *Sélection et évaluation de colorants vitaux afin d'améliorer le contrôle-qualité endothélial des greffons cornéens conservés.* Société Française d'Ophtalmologie, Paris, mai 2008 (**oral**)
11. HE Z, **PIPPARELLI A**, PISELLI S, DUMOLLARD JM, PEOC'H M, GAIN P, THURET G. *Mise au point d'immunomarquages de protéines de régulation du cycle cellulaire sur l'endothélium cornéen monté à plat.* Société Française d'Ophtalmologie, Paris, mai 2008 (**oral**)
12. **PIPPARELLI A**, ACQUART S, PISELLI S, TOUBEAU D, MURAINÉ M, PEOC'H M, MAUGERY P, THURET G, GAIN P. *Viabilité endothéliale totale des greffons endothélio-descemetique conservés et prédécoupés avant greffe postérieure.* Journée de la Recherche de l'Ecole Doctorale Sciences Ingénierie Santé (ED SIS), Saint-Etienne, avril 2009 (**poster**)
13. CAMPOLMI N, DUBAND S, **PIPPARELLI A**, PISELLI S, DUMOLLARD JM, PEOC'H M, ACQUART S, GARRAUD O, GAVET Y, THURET G, GAIN P. *Colorants azoïques pour colorer l'endothélium durant la conservation cornéenne. Expérimentation animale.* Société Française d'Ophtalmologie, Paris, mai 2009 (**oral**)
14. **PIPPARELLI A\***, THURET G, PISELLI S, PEOC'H M, ACQUART S, GARRAUD O, GAIN P. *Cell cycle gene expression in human corneal endothelial cells : study by microarrays and qRT-PCR.* Société Française d'Ophtalmologie, Paris, mai 2009 (**oral**)
15. MURAINÉ M, **PIPPARELLI A**, TOUBEAU D, THURET G, LEFEVRE S, VERA L, GAIN P. *Preparation and shipping of endothelial grafts by the eye bank: development and validation.* Société Française d'Ophtalmologie, Paris, mai 2009 (**oral**)
16. **PIPPARELLI A**, THURET G, PISELLI S, PEOC'H M, ACQUART S, GARRAUD O, GAIN P. *Cell cycle genes expression in human corneal endothelium: study by microarray and qRT-PCR.* Journée de la Recherche de l'Ecole Doctorale Sciences Ingénierie Santé (ED SIS), Saint-Etienne, avril 2009 (**poster**)
17. HE Z, THURET G, **PIPPARELLI A**, PISELLI S, DUMOLLARD JM, PEOC'H M, GAIN P. *Development of immunostaining of cell cycle related proteins in flat mounted corneal endothelium.* Journée de la Recherche de l'Ecole Doctorale Sciences Ingénierie Santé (ED SIS), Saint-Etienne, avril 2009 (**poster**)
18. **PIPPARELLI A\***, THURET G, HE Z, PISELLI S, MURAINÉ M, GAIN P. *Triple coloration Hoechst/Ethidium/Calcéine pour la détermination de la viabilité endothéliale des greffons après découpe lamellaire.* Société d'Ophtalmologie Rhône Alpes, Lyon, 23 avril 2009 (**oral, 2è prix de la meilleure communication**)

19. HE Z, PISELLI S, **PIPPARELLI A**, PEOC'H M, DUMOLLARD JM, GAIN P, THURET G. *Optimisation de l'immunohistochimie appliquée à l'endothélium cornéen humain monté à plat : étude de l'influence de température de fixation*. Société Française d'Ophthalmologie, Paris, mai 2010 (**oral**)

#### **Congrès internationaux :**

1. DEB-JOARDAR N, ZHAO M, JOUBERT J, **PIPPARELLI A**, BRUN G, ACQUART S, CHAVARIN P, PEOC'H M, PRADES JM, MAUGERY J, THURET G, GAIN P. *Development of an image analysis device to measure transparency, folding and gerontoxon of organ cultured corneas*. 19th annual meeting of the European Eye Bank Association, Bratislava, 19-20 janvier 2007 (**oral**)
2. ZHAO M, **PIPPARELLI A**, PISELLI S, DUMOLLARD JM, PEOC'H M, ANSELME I, ACQUART S, CHAVARIN P, GARRAUD O, PRADES JM, THURET G, GAIN P. *Histological and ultrastructural assessment of human corneas stored in corneamax and deswelled during 48 hours in poloxamers*. 19th annual meeting of the European Eye Bank Association, Bratislava, 19-20 janvier 2007 (**oral**)
3. THURET G, **PIPPARELLI A**, DUBAND S, PISELLI S, MURAINÉ M, PEOC'H M, ACQUART S, ZHAO M, PRADES JM, GAIN P. *Corneal graft endothelial viability assessment using the triple labeling Hoechst/Ethidium homodimer/Calcein-AM: technical improvements using 3D microscopy*. XIIIth conference of the European association for Vision and Eye Research (EVER), Portoroz, 3-6 oct 2007 (**oral**)
4. ZHAO M, DEB-JOARDAR N, JOUBERT J, **PIPPARELLI A**, ACQUART S, PEOC'H M, PRADES JM, MAUGERY J, THURET G, GAIN P. *Development of an image analysis device to measure transparency, folding and gerontoxon of organ cultured corneas*. XIIIth conference of the European association for Vision and Eye Research (EVER), Portoroz, 3-6 oct 2007 (**poster**)
5. **PIPPARELLI A\***, DUBAND S, PISELLI S, MURAINÉ M, PEOC'H M, ACQUART S, ZHAO M, HE Z, PRADES JM, THURET G, GAIN P. *Corneal graft endothelial viability assessment using the triple labeling Hoechst/Ethidium homodimer/Calcein-AM: technical improvements using 3D microscopy*. 20th annual meeting of the European Eye Bank Association, Munich, 18-19 janvier 2008 (**oral**)
6. THURET G, DUBAND S, CAMPOLMI N, **PIPPARELLI A**, PISELLI S, DUMOLLARD JM, PEOC'H M, ACQUART S, GARRAUD O, GAIN P. *Selection and assessment of vital dyes to improve the quality control of the corneal endothelium of stored corneas*. XIVth conference of the European association for Vision and Eye Research (EVER), Portoroz, 1-4 oct 2008 (**oral**)
7. HE Z, THURET G, **PIPPARELLI A**, PISELLI S, DUMOLLARD JM, PEOC'H M, GAIN P. *Development of immunostaining of cell cycle related proteins in flat mounted corneal endothelium*. XIVth conference of the European association for Vision and Eye Research (EVER), Portoroz, 1-4 oct 2008 (**poster, prix EVER du meilleur poster**)

8. THURET G, **PIPPARELLI A**, PISELLI S, PEOC'H M, ACQUART S, GARRAUD O, GAIN P. *Cell cycle gene expression in human corneal endothelial cells : study by microarrays and qRT-PCR*. XIVth conference of the European association for Vision and Eye Research (EVER), Portoroz, 1-4 oct 2008 (**poster**)
9. THURET G, DUBAND S, CAMPOLMI N, **PIPPARELLI A**, PISELLI S, DUMOLLARD JM, PEOC'H M, ACQUART S, GARRAUD O, GAIN P. *Selection and assessment of vital dyes to improve the quality control of the corneal endothelium of stored corneas*. 21th annual meeting of the European Eye Bank Association, Amsterdam, 23-24 janvier 2009 (**oral**)
10. HE Z, GAIN P, **PIPPARELLI A**, PISELLI S, DUMOLLARD JM, PEOC'H M, THURET G. *Development of immunostaining of cell cycle related proteins in flat mounted corneal endothelium*. 21th annual meeting of the European Eye Bank Association, Amsterdam, 23-24 janvier 2009 (**poster, prix EEBA du meilleur poster**)
11. **PIPPARELLI A**, MURAINÉ M, THURET G, TOUBEAU D, LEFEVRE S, PISELLI S, GAIN P. *Preparation and shipment of endothelial grafts by the eye bank: development and validation*. 22th annual meeting of the European Eye Bank Association, Barcelone, 22-23 janvier 2010 (**oral, 1er prix de la meilleure communication**)

---

\* présentée personnellement

### III. ARTICLES

II.1. ARTICLE 1 _____	228
Ex vivo Gene Electrotransfer to the Endothelium of Organ-Cultured Human Corneas _____	228
II.2. ARTICLE 2 _____	241
Use of Poloxamers for Deswelling of Organ-Cultured Corneas _____	241
II.3. ARTICLE 3 _____	252
Adaptation des banques de cornées à la préparation et à l'évaluation des greffons cornéens adaptés aux nouvelles techniques de greffe _____	252
II.4. ARTICLE 4 _____	258
Starting the Zebrafish Pineal Circadian Clock with a Single Photic Transition _____	258

### III.1. ARTICLE 1

## **Ex vivo Gene Electrotransfer to the Endothelium of Organ-Cultured Human Corneas**

**Zhiguo He, Aurélien Pipparelli, Chloé Manissolle, Sophie Acquart,  
Olivier Garraud, Philippe Gain, Gilles Thuret**

***Ophthalmic Res 2010;43:43-55***

# Ex vivo Gene Electrotransfer to the Endothelium of Organ Cultured Human Corneas

Zhiguo He<sup>a</sup> Aurélien Pipparelli<sup>a</sup> Chloé Manissolle<sup>a</sup> Sophie Acquart<sup>c</sup>  
Olivier Garraud<sup>c</sup> Philippe Gain<sup>a, b</sup> Gilles Thuret<sup>a, b</sup>

<sup>a</sup>Laboratory 'Biology, Engineering and Imaging of Corneal Grafts', JE2521, IFR143, Faculty of Medicine, <sup>b</sup>Ophthalmology Department, University Hospital of Saint-Etienne, and <sup>c</sup>Eye Bank, Etablissement Français du Sang Loire Auvergne, Saint-Etienne, France

## Key Words

Corneal endothelium · Corneal transplantation · Storage · Organ culture · Gene therapy · Gene transfer technique · Electroporation · Human

## Abstract

**Aims:** To describe an innovative device that allows gene electrotransfer to human corneal endothelial cells (EC) during storage in organ culture. **Methods:** Customized electrodes without endothelial contact were developed. Two plasmids containing the cytomegalovirus promoter and reporter genes [enhanced green fluorescent protein (eGFP) or beta-galactosidase ( $\beta$ -gal)] were electroporated in 2 series of human corneas with eight 1-Hz 100-ms pulses of 125 mA square current. Controls were exposed to naked DNA without electric pulses. eGFP-transduced corneas were used to determine the transgene expression kinetics, whereas  $\beta$ -gal measured transfection efficiency using image analysis tools. Overall, endothelial toxicity was determined by: (1) cytotoxicity tests using triple staining with Hoechst 33342, ethidium homodimer III, and calcein AM, 3 h and 3 and 14 days after electroporation on the series of 15 eGFP-transfected paired corneas; (2) anti-ZO-1 staining to assess tight junctions' in-

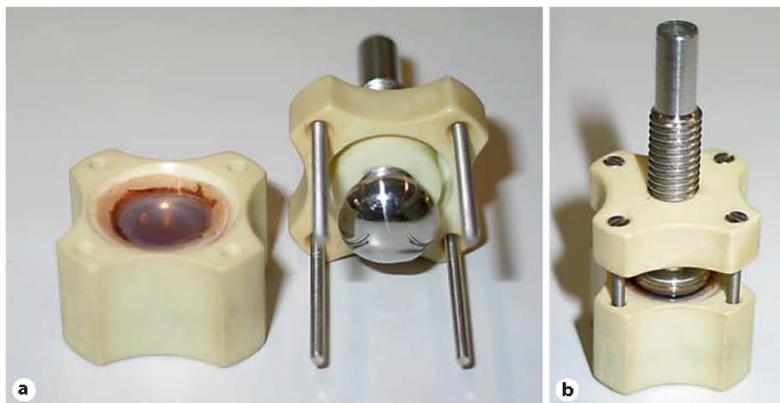
tegrity. **Results:** All electroporated corneas carried transfected ECs, whereas the controls carried none. eGFP expression was observed 3 h after electrotransfer, and was then present from days 1 to 28. Transfection efficiency determined on 63 corneas transfected with  $\beta$ -gal ranged from 0.1 to 54% of the transfected ECs (mean  $\pm$  SD:  $7 \pm 11\%$ , median: 2.9%) with significant reproducibility for paired corneas from the same donor. Electroporation produced low early EC death. Anti ZO-1 staining revealed no dramatic change in EC mosaic continuity, neither 1 and 3 nor 28 days after electroporation. **Conclusions:** Gene electrotransfer to the endothelium of organ-cultured human corneas with custom-designed electrodes allows rapid and easy EC transfection. However, further optimization is required to ensure reproducible results.

Copyright © 2009 S. Karger AG, Basel

## Introduction

Corneal preservation in organ culture (OC) for several weeks in a nutritive medium at 31–37°C facilitates the programming of transplantation as well as quality control and microbiological screening of graft tissue [1].

**Fig. 1.** Custom designed electrodes for ex vivo electroporation of human corneas. **a** The concave cathode touched the cornea (epithelial side), while the convex anode did not (endothelial side). **b** Device with a human cornea in place. The screw thread allowed adjustment of the inter-electrode gap to obtain 2 parallel surfaces 2.5 mm apart. The electrodes were sterilizable, thereby allowing organ culture preservation to be continued after electroporation.



Color version available online

termine the minimum time required to synthesize the neoprotein. After each observation, in a sterile Petri dish under a fluorescent microscope (Olympus IX81, Tokyo, Japan), the corneas were returned to their OC preservation medium. Three other corneas were observed at hours 24, 48 and 72 then days 7, 14 and 28 to determine transfection stability and the maximum duration of expression. For some corneas (chosen at random among the 10), at the end of the observation period the endothelium was covered for 15 minutes with a solution of bis-benzimidazole Hoechst 33342 (Sigma) of 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  concentration, to counterstain all nuclei. To determine whether the underlying stromal keratocytes were also transfected, a small part of the Descemet membrane was gently peeled off using micro-forceps under an operating microscope. The portion of denuded stroma, as well as the Descemet membrane fragment, were again observed under the fluorescent microscope.

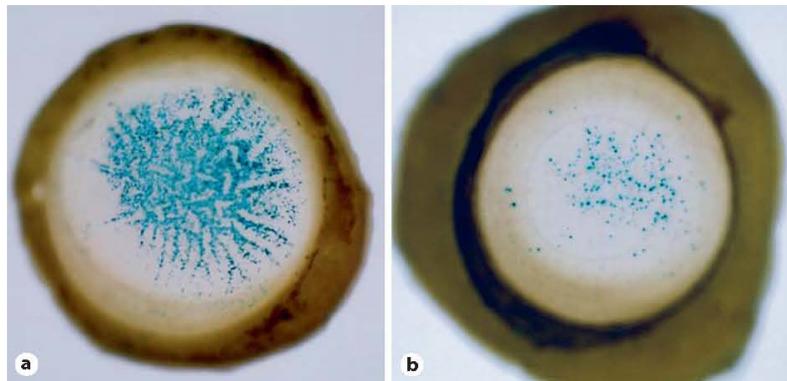
#### *Transfection with $\beta$ -Galactosidase: Measurement of Transfection Efficiency*

Sixty-three corneas transfected with the  $\beta$ -galactosidase gene served to determine mean transfection efficiency. Seven negative controls were performed. Efficiency was measured after 1 (n = 6), 3 (n = 31), 5 (n = 17) and 14 (n = 9) days. Corneas were fixed for 30 min in phosphate-buffered saline (PBS) containing 1% glutaraldehyde, then rinsed thrice in cold PBS containing 2 mM of  $\text{MgCl}_2$ . Corneas were then incubated for 30 min at 37°C in a solution containing 0.2% X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -galactosidase, Sigma), 10 mM sodium phosphate buffer (pH = 7.0), 150 mM NaCl, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 3.3 mM  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  and 3.3 mM  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ , which gave a blue coloration to the transfected ECs. After rinsing in distilled water, corneas were placed on a backlit table and photographed at low magnification. The digital images were analysed to determine the percentage of transfected ECs using the Scion Image analysis program for Windows (freeware available at [www.scioncorp.com](http://www.scioncorp.com)). The colour images were transformed into 256 shades of grey in an 8-bit greyscale bitmap and thresholded at a constant predefined level for all corneas. The percentage of transfected ECs corresponded to the ratio of X-Gal blue-stained surface area to the total endothelial surface area. EC nuclei were counterstained with Meyer's hematoxylin, and whole

corneas were flat mounted using a technique previously described [38] and observed under the microscope ( $\times 10$ ). ECD was determined by the Sambacornea corneal endothelial analyser by manually pointing to cells' nuclei.

#### *Epithelial and Endothelial Toxicity*

Overall cell toxicity was assessed at several levels. Epithelial changes were assessed on corneal cross-sections. Two pairs were observed 3 days after transfection, and 2 pairs after 28 days. Corneas were fixed in 10% formaldehyde, embedded in paraffin and 7  $\mu\text{m}$  cross sections were stained with hematein-eosin-safran. The epithelial layer was observed with a  $\times 40$  objective. Endothelial toxicity was assessed using a live/dead assay on a series of 15 pairs of corneas. ECD was assessed using the Sambacornea analyser 24 h before electroporation to verify comparability between electroporated and control corneas. One cornea of each pair was electroporated with eGFP using the same protocol, whereas the mate cornea (negative control) remained untreated. Five pairs were assessed 3 h after electroporation, 5 pairs after 3 days and 5 pairs after 14 days to evaluate acute, delayed and late toxicity, respectively. All corneas were then briefly checked under the fluorescent microscope for verification of eGFP expression. Corneas were rinsed in balanced salt solution (BSS) to eliminate the serum-containing OC medium, and then immediately incubated with Hoechst 33342 (H) (Sigma) (10  $\mu\text{M}$ ), ethidium homodimer III (E) (4  $\mu\text{M}$ ) and calcein AM (C) (2  $\mu\text{M}$ ) (both from Biotium, Hayward, Calif., USA) for 45 min at 31°C in the dark. After a brief rinse in BSS, they were flat mounted using 4 radial cuts and fluorescent mounting medium (DakoCytomation Glostrup, Denmark). Images of the 3 channels were analysed using the Cell P image analysis software (Olympus Soft Imaging System, Berlin, Germany) after appropriate calibration. Briefly, instant EC death was defined as the ratio of E+ nuclei (dead cells with permeable damaged membranes, unable to exclude the intercalating agent) to the total of (H+ and E+) nuclei. It was measured in a region of interest (ROI) located in the central field of all corneas, taking account of at least 1,000 nuclei. ECD was calculated as the ratio of the total number of nuclei (H+ and E+) to the ROI area. The area of live cells exhibiting metabolic activity (esterase activity able to esterify the non-fluorescent calcein AM into a bright fluorescent



**Fig. 2.** Representative example of 2 corneas transduced with  $\beta$ -galactosidase gene showing high (**a**; 28.6% of cells, ECD = 2,180 cells/mm<sup>2</sup>) and low levels of transfection (**b**; 0.8% of cells, ECD = 1,831 cells/mm<sup>2</sup>). Such images were analysed to determine transfection efficiency.

substrate) was determined in the same central zone, in an ROI of approximately 5 mm<sup>2</sup> similar for all the corneas. We used a simple algorithm to delineate and measure the area of intense fluorescence after thresholding. Viability was expressed as the ratio of the fluorescent area to the whole of the ROI. Paired data were compared using the Wilcoxon non-parametric test, with  $p < 0.05$  considered as significant. Complementary to the previous tests, apical tight junction integrity of ECs was assessed on 6 pairs of corneas (2 after 1 day, 2 after 3 days, and 2 after 28 days) using immunostaining of the occludin protein (anti-ZO-1 antibody) using a protocol described elsewhere [39]. For the 30 corneas assessed with the live/dead assay, the presence of possible corneal opacities was checked by observation of corneas placed on a backlit chart, before exposure to the live/dead assay reagents, using a method previously described [40, 41].

## Results

All the corneas subjected to electroporation expressed the protein of interest, whether eGFP or  $\beta$ -gal. The transfected ECs were randomly and more or less homogeneously spread over the entire surface of the endothelium, in the centre as well as in the periphery. In several corneas, distribution tended to follow the top of the Descemet folds (fig. 2a). The transduced cells were isolated or were arranged in small groups. No expression was observed in the endothelium of the negative control corneas exposed to naked DNA only (see below).

### Enhanced Green Fluorescent Protein

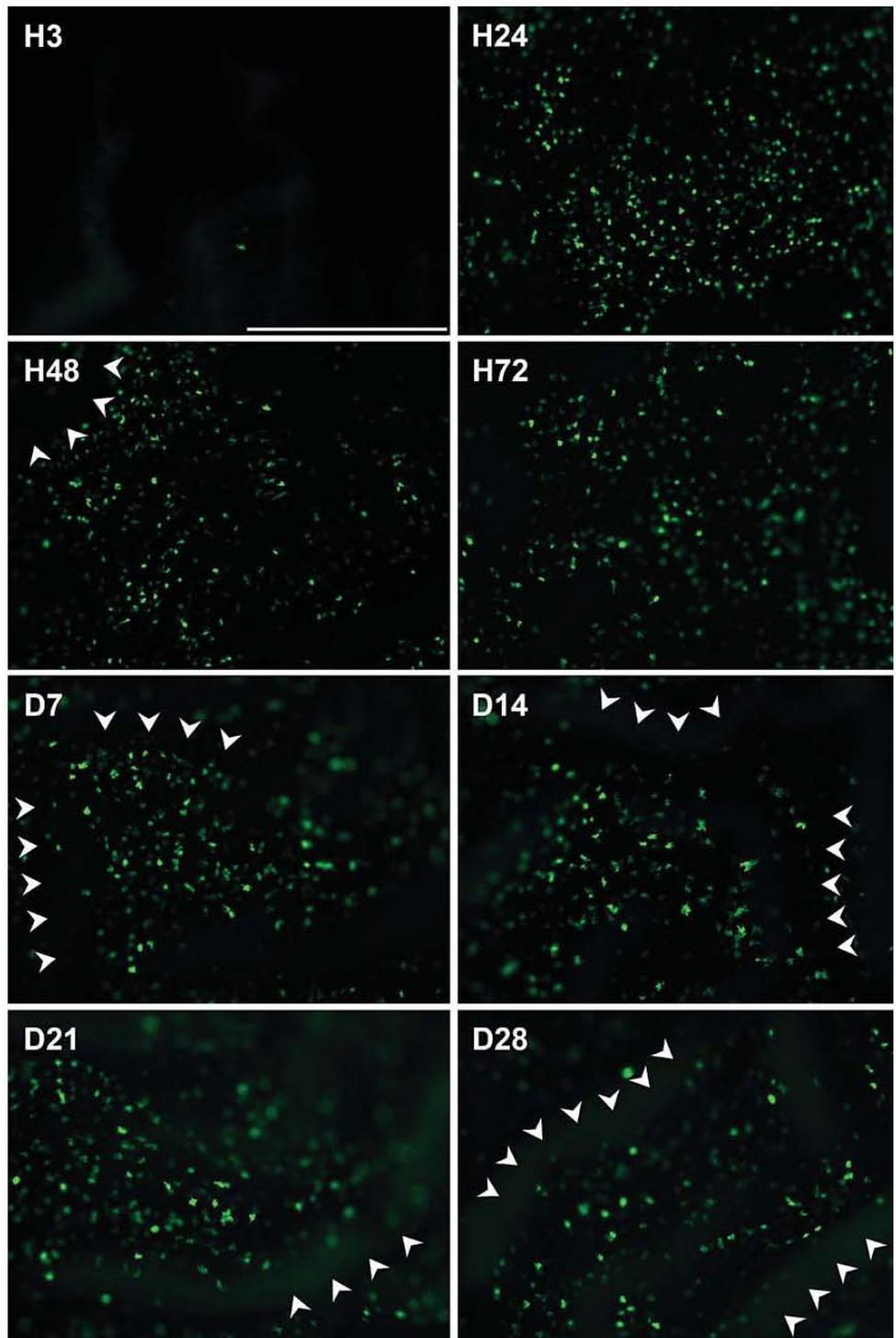
Expression of eGFP was detected from the third hour after electroporation. After 24 h, the number of positive cells dramatically increased and remained stable until day 28 (fig. 3). As was observed with  $\beta$ -gal, distribution tended to follow the top of the Descemet folds, and was

mostly absent from the bottom. The location of the neo-protein was most often in both the nucleus and cytoplasm. Homogeneous staining of the cytoplasm made it possible to distinguish the morphology of the transfected cells with their irregular lateral cytoplasmic expansions (fig. 4). Transfection was strictly limited to the endothelium with no fluorescence detectable in the stromal keratocytes after ablation of the endothelium or in epithelial cells (fig. 5).

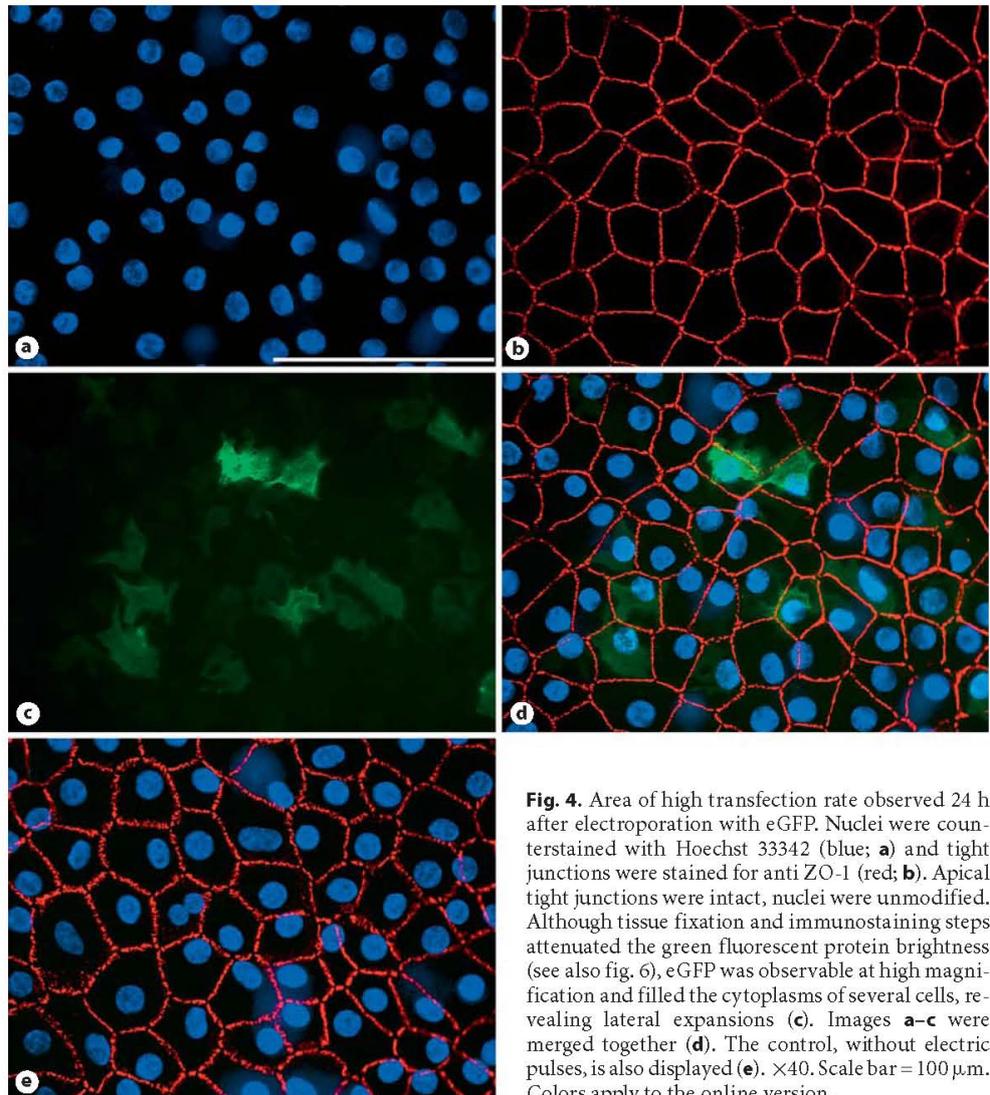
### $\beta$ -gal

Expression peaked at 3 days after electrotransfer, and was still detectable in some ECs 14 days after transfection. Efficiency ranged from 0.1 to 54% of ECs, with a median of 2.9 and a mean of 7.1 (SD: 11.0; fig. 2). Details of efficiency according to time are presented in table 1. For the 7 control corneas, the thresholding method of image analysis showed, as expected, 0% efficiency. Inter-corneal efficiency varied greatly, but there was significant reproducibility between the corneas from the same donor observed after the same post-electroporation period (Pearson's correlation coefficient,  $r = 0.72$ ,  $p < 0.001$ ). Median overall efficiencies (expressed as median, mean  $\pm$

**Fig. 3.** Representative example of the centre of the same cornea observed at hours (H) 3, 24, 48 and 72 then at days (D) 7, 14, 21 and 28 after electroporation with the eGFP transgene. First positive cells appeared after 3 h. The maximal expression (intensity and number of positive cells) was observed between H24 and H72, then expression was continuously observed until at least D28. Fold bottoms are indicated by arrowheads.  $\times 4$ . Scale bar = 1 mm.



3



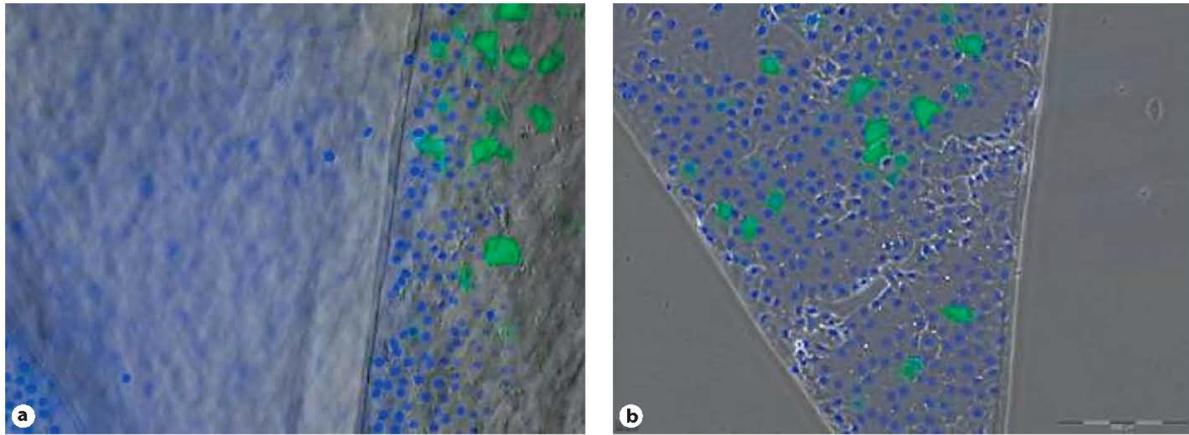
Color version available online

**Fig. 4.** Area of high transfection rate observed 24 h after electroporation with eGFP. Nuclei were counterstained with Hoechst 33342 (blue; **a**) and tight junctions were stained for anti ZO-1 (red; **b**). Apical tight junctions were intact, nuclei were unmodified. Although tissue fixation and immunostaining steps attenuated the green fluorescent protein brightness (see also fig. 6), eGFP was observable at high magnification and filled the cytoplasm of several cells, revealing lateral expansions (**c**). Images **a-c** were merged together (**d**). The control, without electric pulses, is also displayed (**e**).  $\times 40$ . Scale bar = 100  $\mu\text{m}$ . Colors apply to the online version.

SD, range) for the 24 paired corneas available were 2.6 (mean  $\pm$  SD: 5.4  $\pm$  8.4, range: 0.1–31.3%) for the right corneas and 1.5 (mean  $\pm$  SD: 6.7  $\pm$  9.8, range: 0.1–33.6) for the left corneas ( $p = 0.530$ ). At transfection, the mean ECD of the 63 corneas was 2,043  $\pm$  571 cells/mm<sup>2</sup> (range: 870–3,002, median: 1,968). Transfection efficiency seemed to be uncorrelated with ECD ( $p = 0.056$ ), donor age ( $p = 0.435$ ) or cornea preservation time prior to electroporation ( $p = 0.095$ ).

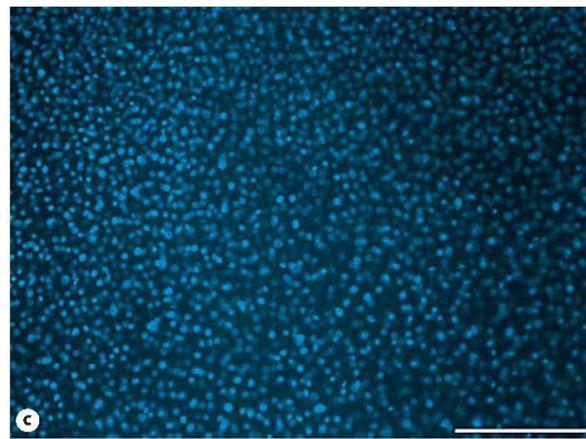
#### Toxicity

Compared with the paired control corneas, the epithelium of several electroporated corneas presented fewer cell layers and several shrunk basal cells, be it after 3 or 28 days. Epithelial modifications seemed unrelated to endothelial transfection efficiency. Despite these features, no complete epithelial desquamation was observed at any time point (fig. 6).



Color version available online

**Fig. 5.** Restriction of transgene expression in the endothelium. Composite image: phase contrast, eGFP, Hoechst (**a, b**), and only eGFP + Hoechst (**c**). **a** Cornea observed 3 days after electroporation with the eGFP gene. Observation of an area where the endothelium was peeled off using micro-forceps under an operating microscope. Although the eGFP+ ECs were easily visible, non-underlying keratocyte expressed the transgene. **b** The peeled Desmet membrane fragment was flat mounted. It too contained eGFP+ ECs. There are several artefactual small areas without cells, due to tissue manipulation under the microscope.  $\times 10$ . **c** En face view of epithelial layers. Epithelial cell nuclei of the different layers were visible using a non-confocal microscope. No eGFP+ cells were detected.  $\times 10$ . Scale bar = 200  $\mu\text{m}$ .

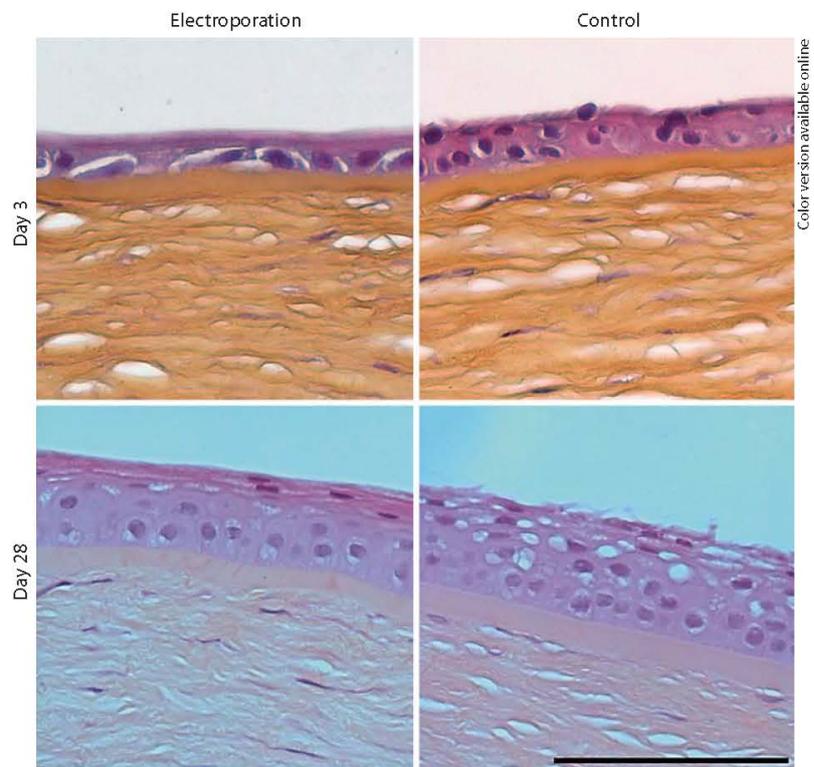


Occasionally, in the series of corneas electroporated with  $\beta$ -gal, a few corneas presented localized major endothelial damage due to accidental contact with the electrode (in both the control and the electroporated groups). EC toxicity and viability are expressed in table 2. All electroporated corneas carried eGFP positive ECs. Although comparisons did not reach the level of significance, acute cytotoxicity involving a limited number of cells seemed to occur after 3 h. This phenomenon was observed to persist at day 3. After 2 weeks, only the consequences of the initial cell damage were observed. At the 3 time points, the area covered by metabolically active cells tended to be slightly lower in electroporated corneas than in paired control corneas. ZO-1 immunostaining did not reveal dramatic changes within the apical tight junction system at any time point (fig. 7). Polymorphism and polymerge-

**Table 1.** Efficiency of transfection according to time after gene electrotransfer

Days after electro-poration (corneas)	Mean $\pm$ SD	Min.	Max.	Median
1 (n = 6)	7.7 $\pm$ 10.8	0.4	28.6	4.2
3 (n = 31)	11.1 $\pm$ 13.8	0.1	54.4	4.2
5 (n = 17)	2.8 $\pm$ 4.0	0.1	13.4	0.8
14 (n = 9)	0.6 $\pm$ 1.0	0.1	2.8	0.1

Efficiency was determined using image analysis of 63 corneas transfected with the  $\beta$ -gal gene, and expressed as a percent of blue-stained surface area to total endothelial surface area.



**Fig. 6.** Cross sections of corneal epithelium and anterior stroma 3 and 28 days after electroporation. Representative example of 2 pairs of corneas. Minor modifications of epithelial layers were observed after electroporation. Hematein-eosin-safran.  $\times 40$ . Scale bar = 100  $\mu\text{m}$ .

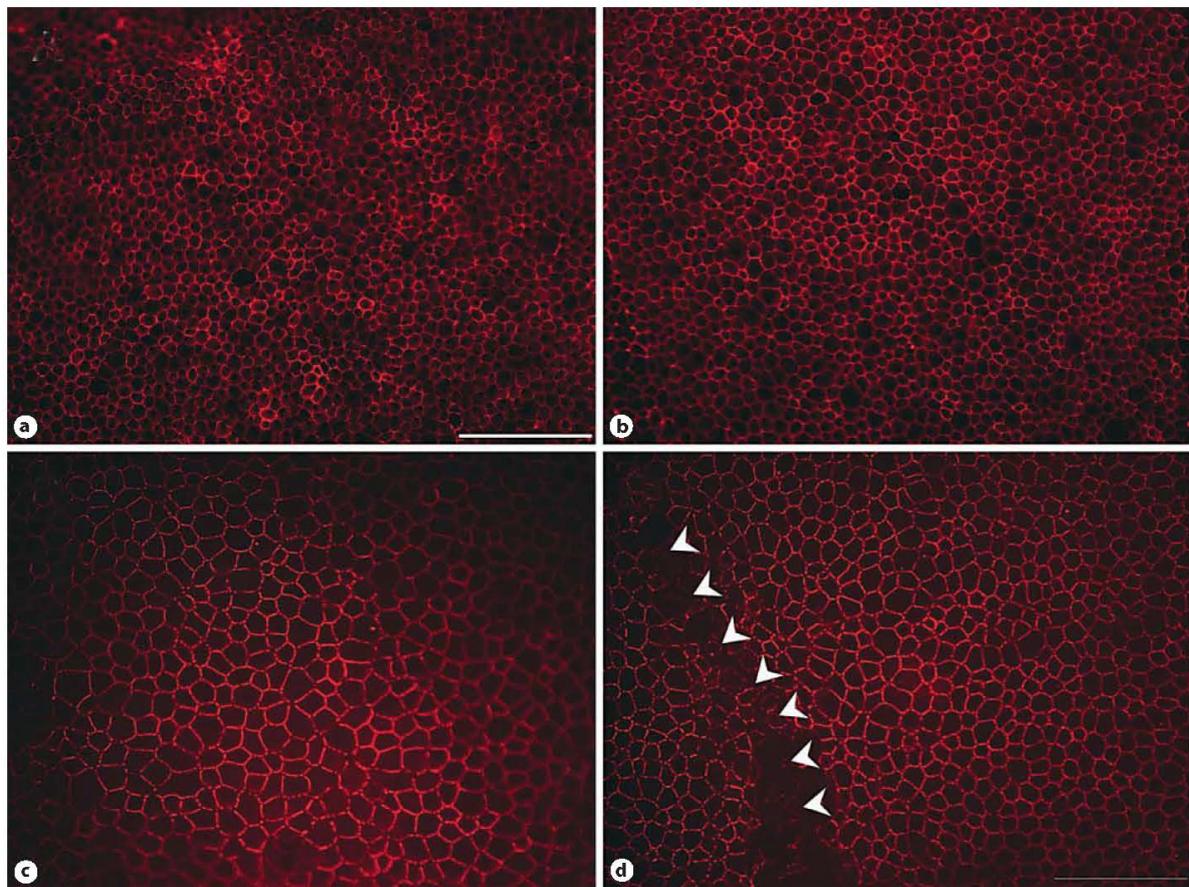
thism sometimes appeared greater, but overall endothelial integrity was preserved. No electroporated cornea displayed any stromal opacity (data not shown).

### Discussion

Our system enables efficient gene electrotransfer to the endothelium of human corneas in OC storage. Electroporation offers a gene transfection rate to corneal endothelium *ex vivo* that is lower than for viral vectors, but higher than for several chemical vectors. This ultra-fast technique, unlike viral and other physicochemical methods, does not require prolonged incubation out of the graft tissue preservation medium. The medium of incubation is similar to that used for routine OC containing 2% fetal calf serum (FCS). Considering the possibility of future clinical application, we chose to respect the standard conditions of OC, and not to increase the percentage of FCS in particular, in contrast to other techniques which, for human corneas, necessitate incubation in me-

dium supplemented with 10% FCS or a cocktail of growth factors [12, 15, 18, 21, 22]. These characteristics also constitute advantages over other methods for laboratory research work where the effects of FCS growth factors are undesirable.

Corneal storage in OC makes it possible to maintain the metabolic activities of ECs [1]. This explains the speed of translation of the neoproteins, from the third hour after electrotransfer, unlike low-temperature preservation at  $+4^{\circ}\text{C}$  [42]. These transgene expression kinetics are comparable to those obtained in animals after electroporation of corneal epithelial cells [43] or of stromal keratocytes [43, 44]. These kinetics are also characteristic of the CMV immediate early promoter used for our plasmids [43, 45]. This powerful promoter may also be partially responsible for the transient expression of some proteins of interest [46]. This phenomenon has been ascribed to silencing of the viral-derived promoter by methylation [47]. Blair-Parks et al. [43] have also shown in mouse corneas that this promoter and enhancer is well suited to short-term expression studies, but is not the



Color version available online

**Fig. 7.** Anti ZO-1 immunostaining of 2 pairs of corneas, 1 (**a, b**) and 28 (**c, d**) days after electroporation: **a** and **c** were electroporated, **b** and **d** were control corneas. The fixation and immunostaining protocol considerably attenuated eGFP fluorescence, which explains why few transfected cells were visible at this magnification ( $\times 10$ ). Only minor changes were observed after elec-

trporation, mainly consisting of an increase in cell polymegethism and polymorphism. Folds, seen in both electroporated and control corneas, were only consequences of storage in organ culture. An example is shown in **d** (arrowheads), although this is a control cornea. Scale bar = 200  $\mu\text{m}$  (for all images).

technique of choice for long-term expression. The use of other promoters should allow determination of the maximum expression time possible in the endothelium after electroporation. Nevertheless, we observed longer expression of the eGFP protein, although both genes had the same CMV promoter. The apparently variable expression of both transgenes may be due to the more sensitive detection method (high fluorescence of eGFP vs. enzymatic method for  $\beta$ -gal).

In any case, if short time expression of transgenes restricts its clinical use to acute treatments, this apparent

drawback should be regarded with particular interest in the field of organ culture. Indeed, it could turn out to be an advantage, especially if the purpose of the transfection is to alter the proliferative capacity of EC during storage only in order to provide graft with an enriched endothelium without prolonged effect in the recipient eye.

The non-hexagonal appearance of the transfected cells was due to the homogeneous staining of their cytoplasm, which revealed irregular basal cell expansions previously described for normal cells [48]. Similar features were also described in murine corneal ECs with lentiviral transfec-

**Table 2.** Cytotoxicity of eGFP gene electrotransfer

	ECD before electroporation <sup>a</sup> (Sambacornea analyser), cells/mm <sup>2</sup>	ECD after electroporation <sup>a</sup> (counting of nuclei), cells/mm <sup>2</sup>	Cell death (ethidium homodimer III), %	Area of viable cells (calcein+ cells), %
<i>Hour 3 (n = 5)</i>				
Control	2,377 ± 186	2,103 ± 349	0.4 ± 0.5	79.1 ± 16.0
Transfected	2,434 ± 196	2,150 ± 597	3.5 ± 3.6	74.5 ± 12.5
p	0.345	0.686	0.144	0.345
<i>Day 3 (n = 5)</i>				
Control	2,818 ± 385	2,128 ± 442	0.7 ± 1.2	86.5 ± 6.4
Transfected	2,795 ± 202	1,831 ± 374	2.1 ± 2.3	77.9 ± 12.9
p	0.500	0.080	0.345	0.225
<i>Day 14 (n = 5)</i>				
Control	1,813 ± 422	1,420 ± 237	1.4 ± 1.4	87.0 ± 7.5
Transfected	1,786 ± 511	1,306 ± 302	0.8 ± 0.9	75.0 ± 8.3
p	0.686	0.345	0.686	0.080

Data assessed using triple labelling with Hoechst 33342, ethidium homodimer III and calcein-AM, on 15 corneas, 3 h, 3 days and 14 days after electroporation. Negative controls were 15 untreated paired corneas. Results presented as means ± SD.

<sup>a</sup> ECDs before and after transfection were not measured by the same method. This likely explains an apparent overestimation of cell loss. However, the same bias existed for all corneas.

tion methods [49]. This appearance naturally differed from the typically hexagonal appearance of ECs when their apical surface is observed after alizarin red staining. Generally speaking, electroporation still causes reticence due to fears of high toxicity, but its toxicity in the human corneal endothelium seems acceptable with our parameters. Epithelial changes may be neglected for the applications envisaged by us (endothelial gene therapy or as a tool for studying corneal endothelial biology). The apical junction integrity of the endothelium is preserved. The endothelial survival rate remains acceptable. Initial cell loss probably occurs, but with no excess mortality thereafter.

Although methods to quantify expression of a reporter gene in the corneal endothelium vary widely in the literature and make comparisons very difficult, our mean transfection efficiency of 7.1% was satisfactory considering the stringent experimental conditions, with minimal changes to the normal course of OC. Notably, we obtained microscopic appearances comparable to that described by Collins et al. [50]. Based on simple image observation, the authors reported that nearly all ECs expressed the transgene in rabbit corneas, whereas our study obtained a maximum score of only 54.4% after im-

age analysis. Our quantification technique, which is fully reproducible, precisely measured the endothelial surface area actually transfected (blue) and thus made it possible, given the ECD, to deduce the number of ECs actually transfected. We chose a particularly 'severe' threshold because it is a well-known fact that  $\beta$ -gal staining tends to overlap cell borders and could have led to overestimation of the number of transfected cells when measuring the blue areas. Despite these reservations about quantification methods, our system achieved transfection efficiency comparable to most non-viral vectors assessed on human corneas to date [20, 51] and close to that of some viral vectors, particularly adeno-associated viruses and herpes [14], but without their drawbacks. The very high levels (up to 54%) occasionally obtained in our study nevertheless remain lower than those obtained in humans using adenoviral vectors [12, 15]. The relatively low mean rate is fully compatible with certain therapeutic applications, in particular the controlled activation of endothelial mitosis intended to increase ECD transiently in an effort to augment the graft reserve before transplantation in the recipient. The fact that even a low transfection rate can be of interest for some applications has been underlined by Dannowski et al. [52]. This type of application is well suited to transient transgene expression because an increase in ECD over a brief period may be sufficient. Moreover, such a transient expression is also likely to facilitate its acceptance by the scientific and medical community with a view to clinical application.

Transfection efficiency varied greatly from cornea to cornea, indicating that the method requires optimization. Three factors may explain the variation: (1) EC area (which is inversely proportional to ECD). The electrical principles governing electroporation mean that efficiency depends on cell size, the smallest cells being harder to permeabilize [53]. In our series, use of identical current parameters for all corneas should have caused lower efficiency in those with the smallest ECs (and highest ECDs). We could not obtain confirmation of this, probably due to the influence of cofactors. However, the good reproducibility for both corneas from a single donor, which typically have comparable endothelia, shows that the intrinsic quality of the endothelium is one of the main factors influencing transfection efficiency. This may be improved by adapting the electrical parameters (increase in intensity and/or number of pulses) to the endothelium. (2) Stromal hydration, which alters total corneal thickness, is also able to affect the passage of the electric current and to cause transfection efficiency to vary. Stromal hydration is itself multifactorial, depending on corneal

surface quality, preservation time, intrinsic quality of the stromal collagen, and composition of the preservation medium. (3) Adaptation of electric parameters to corneal thickness merits assessment. Changes in stromal hydration during preservation ultimately cause endothelial folds that may alter local resistance to current passage (creating paths of least resistance, for example). Reduction of corneal thickness by incubation in hyperosmolar deswelling medium, which is routinely performed at the end of preservation in cornea banks, reduces the extent of stromal folding and may help to assess this hypothesis.

During this first study, we elected to use fixed parameters for the solution containing the plasmid (NaCl 0.9%) and for the electric current. Given the scarcity of human corneas for scientific use (also reported by other authors in the same field of interest [15]) and the multiple parameters relative to donors and storage, it was not possible to obtain a large series of corneas with reproducible EC characteristics. Lack of corneas prevented the use of different combinations of electric parameters in the first attempt. It has been demonstrated for other tissues [53–55] that adapting the buffer and current parameters may considerably increase transfection efficiency. We are continuing our research, having changed the composition of the buffer containing the plasmid (osmolarity, electric charge and ionic species) and the electric pulse train in order to optimize gene electrotransfer.

In any case, gene electrotransfer may enable alteration of graft tissue during preservation with at least 3 aims: (1)

immunomodulation, to minimize the endothelial consequences of graft rejection, as has already been proposed with other transfection methods [12, 21, 56–60]; (2) transfection of apoptosis-resistant genes such as Bcl-xL or HO-1 [49, 61] to minimize EC loss during OC preservation in order to deliver more corneas with higher ECD; (3) triggering of transient EC multiplication by altering the cell cycle, or making cells secrete growth factors to create an autoamplification loop [52], in order to repopulate low-ECD corneas or even to provide ‘super quality’ corneas with very high ECD likely to prolong graft survival. For all these applications, electroporation is also likely to be the less immunogenic method, a drawback often encountered with viral vectors, but also with non-viral ones.

Although far less efficient than adenoviral vectors, our electroporation device permits simple ex vivo transfection of the human corneal endothelium with a transfection rate comparable with most non-viral vectors, and is thus useful for selected applications. Furthermore, optimizations may be possible to enhance its efficacy and reproducibility.

#### Acknowledgements

The authors thank Ms. Simone Piselli for technical help; Prof. Jean Michel Prades for supplying scientific human corneas; Ms. Anne-Cécile Durieux and Mr. Régis Bonnefoy for their kind help with adaptation of electric parameters; and Mr. Denis Liotier for the design of the electrodes.

#### References

- ▶ 1 Pels L: Organ culture: The method of choice for preservation of human donor corneas. *Br J Ophthalmol* 1997;81:523–525.
- ▶ 2 Pels E, Schuchard Y: Organ-culture preservation of human corneas. *Doc Ophthalmol* 1983;56:147–153.
- ▶ 3 Bourne WM: Chronic endothelial cell loss in transplanted corneas. *Cornea* 1983;2:289–294.
- ▶ 4 Bourne WM: Cellular changes in transplanted human corneas. *Cornea* 2001;20:560–569.
- ▶ 5 Thuret G, Chiquet C, Bernal F, Acquart S, Romanet JP, Mouillon M, Hegelhoff H, Burillon C, Damour O, Maugery J, Armitage WJ, Gain P: Prospective, randomized clinical and endothelial evaluation of 2 storage times for cornea donor tissue in organ culture at 31 degrees c. *Arch Ophthalmol* 2003; 121:442–450.
- ▶ 6 Jun AS, Liu SH, Koo EH, Do DV, Stark WJ, Gottsch JD: Microarray analysis of gene expression in human donor corneas. *Arch Ophthalmol* 2001;119:1629–1634.
- ▶ 7 Sakai R, Kinouchi T, Kawamoto S, Dana MR, Hamamoto T, Tsuru T, Okubo K, Yamagami S: Construction of human corneal endothelial cDNA library and identification of novel active genes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43:1749–1756.
- ▶ 8 Gottsch JD, Bowers AL, Margulies EH, Seitzman GD, Kim SW, Saha S, Jun AS, Stark WJ, Liu SH: Serial analysis of gene expression in the corneal endothelium of fuchs’ dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44:594–599.
- ▶ 9 Gottsch JD, Seitzman GD, Margulies EH, Bowers AL, Michels AJ, Saha S, Jun AS, Stark WJ, Liu SH: Gene expression in donor corneal endothelium. *Arch Ophthalmol* 2003; 121:252–258.
- ▶ 10 Yamagami H, Yamagami S, Inoki T, Amano S, Miyata K: The effects of proinflammatory cytokines on cytokine-chemokine gene expression profiles in the human corneal endothelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44: 514–520.
- ▶ 11 Hoffmann F, Junghans C: [gene therapy in corneal diseases]. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 2003;220:731–737.
- ▶ 12 Oral HB, Larkin DF, Fehervari Z, Byrnes AP, Rankin AM, Haskard DO, Wood MJ, Dallman MJ, George AJ: Ex vivo adenovirus-mediated gene transfer and immunomodulatory protein production in human cornea. *Gene Ther* 1997;4:639–647.

- ▶ 13 Wang X, Appukuttan B, Ott S, Patel R, Irvine J, Song J, Park JH, Smith R, Stout JT: Efficient and sustained transgene expression in human corneal cells mediated by a lentiviral vector. *Gene Ther* 2000;7:196–200.
- ▶ 14 Hudde T, Rayner SA, De Alwis M, Thrasher AJ, Smith J, Coffin RS, George AJ, Larkin DF: Adeno-associated and herpes simplex viruses as vectors for gene transfer to the corneal endothelium. *Cornea* 2000;19:369–373.
- ▶ 15 Jessup CF, Brereton HM, Coster DJ, Williams KA: In vitro adenovirus mediated gene transfer to the human cornea. *Br J Ophthalmol* 2005;89:658–661.
- ▶ 16 Beutelspacher SC, Ardjomand N, Tan PH, Patton GS, Larkin DF, George AJ, McClure MO: Comparison of hiv-1 and eiaiv-based lentiviral vectors in corneal transduction. *Exp Eye Res* 2005;80:787–794.
- ▶ 17 McAllister JC, Joyce NC, Harris DL, Ali RR, Larkin DF: Induction of replication in human corneal endothelial cells by e2f2 transcription factor cDNA transfer. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46:3597–3603.
- ▶ 18 Lai L, Lin K, Foulks G, Ma L, Xiao X, Chen K: Highly efficient ex vivo gene delivery into human corneal endothelial cells by recombinant adeno-associated virus. *Curr Eye Res* 2005;30:213–219.
- ▶ 19 Parker DG, Kaufmann C, Brereton HM, Anson DS, Francis-Staite L, Jessup CF, Marshall K, Tan C, Koldej R, Coster DJ, Williams KA: Lentivirus-mediated gene transfer to the rat, ovine and human cornea. *Gene Ther* 2007;14:760–767.
- ▶ 20 Hudde T, Rayner SA, Comer RM, Weber M, Isaacs JD, Waldmann H, Larkin DF, George AJ: Activated polyamidoamine dendrimers, a non-viral vector for gene transfer to the corneal endothelium. *Gene Ther* 1999;6:939–943.
- ▶ 21 Tan PH, King WJ, Chen D, Awad HM, Mackett M, Lechler RI, Larkin DF, George AJ: Transferrin receptor-mediated gene transfer to the corneal endothelium. *Transplantation* 2001;71:552–560.
- ▶ 22 Tan PH, Manunta M, Ardjomand N, Xue SA, Larkin DF, Haskard DO, Taylor KM, George AJ: Antibody targeted gene transfer to endothelium. *J Gene Med* 2003;5:311–323.
- ▶ 23 Sukharev SI, Klenchin VA, Serov SM, Chernomordik LV, Chizmadzhev Yu A: Electroporation and electrophoretic DNA transfer into cells. The effect of DNA interaction with electropores. *Biophys J* 1992;63:1320–1327.
- ▶ 24 Wolf H, Rols MP, Boldt E, Neumann E, Teissie J: Control by pulse parameters of electric field-mediated gene transfer in mammalian cells. *Biophys J* 1994;66:524–531.
- ▶ 25 Golzio M, Teissie J, Rols MP: Cell synchronization effect on mammalian cell permeabilization and gene delivery by electric field. *Biochim Biophys Acta* 2002;1563:23–28.
- ▶ 26 Andre F, Mir LM: DNA electrotransfer: Its principles and an updated review of its therapeutic applications. *Gene Ther* 2004;11 (suppl 1):S33–S42.
- ▶ 27 Mir LM, Bureau MF, Gehl J, Rangara R, Rouy D, Caillaud JM, Delaere P, Branellec D, Schwartz B, Scherman D: High-efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:4262–4267.
- ▶ 28 Durieux A, Bonnefoy R, Manissolle C, Freysenet D: High-efficiency gene electrotransfer into skeletal muscle: Description and physiological applicability of a new pulse generator. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;296:443.
- ▶ 29 Suzuki T, Shin BC, Fujikura K, Matsuzaki T, Takata K: Direct gene transfer into rat liver cells by in vivo electroporation. *FEBS Lett* 1998;425:436–440.
- ▶ 30 Harrison RL, Byrne BJ, Tung L: Electroporation-mediated gene transfer in cardiac tissue. *FEBS Lett* 1998;435:1–5.
- ▶ 31 Oshima Y, Sakamoto T, Yamanaka I, Nishi T, Ishibashi T, Inomata H: Targeted gene transfer to corneal endothelium in vivo by electric pulse. *Gene Ther* 1998;5:1347–1354.
- ▶ 32 Sakamoto T, Oshima Y, Nakagawa K, Ishibashi T, Inomata H, Sueishi K: Target gene transfer of tissue plasminogen activator to cornea by electric pulse inhibits intracamerular fibrin formation and corneal cloudiness. *Hum Gene Ther* 1999;10:2551–2557.
- ▶ 33 Bednarz J, Teifel M, Friedl P, Engelmann K: Immortalization of human corneal endothelial cells using electroporation protocol optimized for human corneal endothelial and human retinal pigment epithelial cells. *Acta Ophthalmol Scand* 2000;78:130–136.
- ▶ 34 Gain P, Thuret G, Kodjikian L, Gavet Y, Turc PH, Theillere C, Acquart S, Le Petit JC, Maugery J, Campos L: Automated tri-image analysis of stored corneal endothelium. *Br J Ophthalmol* 2002;86:801–808.
- ▶ 35 Deb-Joardar N, Thuret G, Gavet Y, Acquart S, Garraud O, Egelhoffer H, Gain P: Reproducibility of endothelial assessment during corneal organ culture: Comparison of a computer-assisted analyzer with manual methods. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48:2062–2067.
- ▶ 36 Deb-Joardar N, Thuret G, Racine GA, Pons D, Brun G, Parriaux O, Peoc'h M, Acquart S, Gain P: Standard microlithographic mosaics to assess endothelial cell counting methods by light microscopy in eye banks using organ culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47:4373–4377.
- ▶ 37 Deb-Joardar N, Thuret G, Zhao M, Acquart S, Peoc'h M, Garraud O, Gain P: Comparison of two semiautomated methods for evaluating endothelial cells of eye bank corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48:3077–3082.
- ▶ 38 Gain P, Thuret G, Chiquet C, Dumollard JM, Mosnier JF, Burillon C, Delbosc B, Herve P, Campos L: Value of two mortality assessment techniques for organ cultured corneal endothelium: Trypan blue versus tunel technique. *Br J Ophthalmol* 2002;86:306–310.
- ▶ 39 Crewe JM, Armitage WJ: Integrity of epithelium and endothelium in organ-cultured human corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:1757–1761.
- ▶ 40 Thuret G, Manissolle C, Campos-Guyotat L, Guyotat D, Gain P: Animal compound-free medium and poloxamer for human corneal organ culture and deswelling. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46:816–822.
- ▶ 41 Zhao M, Thuret G, Piselli S, Pipparelli A, Acquart S, Peoc'h M, Dumollard JM, Gain P: Use of poloxamers for deswelling of organ-cultured corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49:550–559.
- ▶ 42 Qian Y, Leong FL, Kazlauskas A, Dana MR: Ex vivo adenovirus-mediated gene transfer to corneal graft endothelial cells in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:2187–2193.
- ▶ 43 Blair-Parks K, Weston BC, Dean DA: High-level gene transfer to the cornea using electroporation. *J Gene Med* 2002;4:92–100.
- ▶ 44 Oshima Y, Sakamoto T, Hisatomi T, Tsutsumi C, Sassa Y, Ishibashi T, Inomata H: Targeted gene transfer to corneal stroma in vivo by electric pulses. *Exp Eye Res* 2002;74:191–198.
- ▶ 45 Doll RF, Crandall JE, Dyer CA, Aucoin JM, Smith FI: Comparison of promoter strengths on gene delivery into mammalian brain cells using aav vectors. *Gene Ther* 1996;3:437–447.
- ▶ 46 Yew NS: Controlling the kinetics of transgene expression by plasmid design. *Adv Drug Deliv Rev* 2005;57:769–780.
- ▶ 47 Prosch S, Stein J, Staak K, Liebenthal C, Volk HD, Kruger DH: Inactivation of the very strong hcmv immediate early promoter by DNA cpg methylation in vitro. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1996;377:195–201.
- ▶ 48 Ringvold A, Davanger M, Olsen EG: On the spatial organization of the cornea endothelium. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 1984;62:911–918.
- ▶ 49 Barcia RR, Dana MR, Kazlauskas A: Corneal graft rejection is accompanied by apoptosis of the endothelium and is prevented by gene therapy with bcl-xl. *Am J Transplant* 2007;7:2082–2089.
- ▶ 50 Collins L, Fabre JW: A synthetic peptide vector system for optimal gene delivery to corneal endothelium. *J Gene Med* 2004;6:185–194.
- ▶ 51 Nguyen TH, Murakami A, Fujiki K, Kanai A: Transferrin-polyethylenimine conjugate, fuge6 and transit-it as nonviral vectors for gene transfer to the corneal endothelium. *Jpn J Ophthalmol* 2002;46:140–146.
- ▶ 52 Dannowski H, Bednarz J, Reszka R, Engelmann K, Pleyer U: Lipid-mediated gene transfer of acidic fibroblast growth factor into human corneal endothelial cells. *Exp Eye Res* 2005;80:93–101.
- ▶ 53 Gehl J: Electroporation: Theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research. *Acta Physiol Scand* 2003;177:437–447.

- ▶ 54 Gehl J, Mir LM: Determination of optimal parameters for in vivo gene transfer by electroporation, using a rapid in vivo test for cell permeabilization. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;261:377–380.
- ▶ 55 Kotnik T, Pucihar G, Rebersek M, Miklavcic D, Mir LM: Role of pulse shape in cell membrane electroporation. *Biochim Biophys Acta* 2003;1614:193–200.
- ▶ 56 Pleyer U, Bertelmann E, Rieck P, Hartmann C, Volk HD, Ritter T: Survival of corneal allografts following adenovirus-mediated gene transfer of interleukin-4. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2000;238:531–536.
- ▶ 57 Klebe S, Sykes PJ, Coster DJ, Krishnan R, Williams KA: Prolongation of sheep corneal allograft survival by ex vivo transfer of the gene encoding interleukin-10. *Transplantation* 2001;71:1214–1220.
- ▶ 58 Rayner SA, Larkin DF, George AJ: Tnf receptor secretion after ex vivo adenoviral gene transfer to cornea and effect on in vivo graft survival. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:1568–1573.
- ▶ 59 Bertelmann E, Ritter T, Vogt K, Reszka R, Hartmann C, Pleyer U: Efficiency of cytokine gene transfer in corneal endothelial cells and organ-cultured corneas mediated by liposomal vehicles and recombinant adenovirus. *Ophthalmic Res* 2003;35:117–124.
- ▶ 60 Gong N, Pleyer U, Yang J, Vogt K, Hill M, Anegón I, Volk HD, Ritter T: Influence of local and systemic ctla4ig gene transfer on corneal allograft survival. *J Gene Med* 2006;8:459–467.
- ▶ 61 Gong N, Ecke I, Mergler S, Yang J, Metzner S, Schu S, Volk HD, Pleyer U, Ritter T: Gene transfer of cyto-protective molecules in corneal endothelial cells and cultured corneas: Analysis of protective effects in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;357:302–307.

III.2. ARTICLE 2

**Use of Poloxamers for Deswelling of  
Organ-Cultured Corneas**

**Min Zhao, Gilles Thuret, Simone Piselli, Aurelien Pipparelli, Sophie Acquart,  
Michel Peoc'h, Jean-Marc Dumollard, and Philippe Gain**

***Invest Ophthalmol Vis Sci 2008;49:550-559***

# Use of Poloxamers for Deswelling of Organ-Cultured Corneas

Min Zhao,<sup>1,2</sup> Gilles Thuret,<sup>1,2</sup> Simone Piselli,<sup>1</sup> Aurelien Pipparelli,<sup>1</sup> Sophie Acquart,<sup>3</sup> Michel Peoc'h,<sup>1</sup> Jean-Marc Dumollard,<sup>1</sup> and Philippe Gain<sup>1,2</sup>

**PURPOSE.** Dextran T500, routinely used as a deswelling supplement in organ culture (OC), has been suspected of being toxic to corneal endothelial cells (ECs). This study was conducted to evaluate the innovative use of poloxamers compared with dextran for deswelling OC corneas.

**METHODS.** Five poloxamers (P124, P188, P237, P338, and P407) were dissolved respectively in a standard OC medium to reach 350 mOsmol/kg. In vitro cytotoxicity of these media was tested by MTT assay on human corneal epithelial and endothelial cell lines and on primary human corneal fibroblasts. Paired human corneas stored in OC for at least 21 days were assigned for 48 hours to a poloxamer medium or to a standard deswelling medium containing 5% dextran T500. Corneal EC density, morphometry, visualization, mortality, stromal thickness, transparency, and folding were evaluated before and after deswelling. Corneas were finally cut into three parts for histologic and ultrastructural observation.

**RESULTS.** Besides similar corneal transparency improvement and thickness deswelling, poloxamers (except P124) reduced EC loss and facilitated endothelial visualization, but improved stromal folding less than dextran. The similar ultrastructures observed in the two groups were epithelial shedding, normal collagen fiber diameter and organization, uptake of deswelling agents by ECs, vacuolization but normal organelles in ECs and keratocytes, and endothelial surface modifications.

**CONCLUSIONS.** P188, P237, P338, and P407 performed similarly in preserving ECs, improving EC visualization, deswelling corneal stroma and inducing moderate injuries to corneal ultrastructure. They appear superior to dextran for corneal deswelling in OC. (*Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008;49:550-559) DOI: 10.1167/IOVS.07-1037

Organ culture (OC) is the most common corneal storage method in Europe, used for more than two-thirds of donor corneas.<sup>1,2</sup> The extended storage time of 4 to 5 weeks facilitates graft quality and safety controls in eye banks and operation scheduling. However, all OC media have the drawback of triggering rapid stromal swelling, resulting in doubled corneal thickness, reduced corneal transparency, and in-

creased stromal and Descemet's membrane folding.<sup>3,4</sup> To facilitate suturing and accelerate postoperative visual recovery, the cornea must be thinned before surgery by immersion in the same OC medium supplemented with a water-soluble macromolecule that produces colloid osmotic pressure to extract excess water accumulated in the stroma.

Dextrans are polyglucose biopolymers of 1000 to 2000 kDa that have a high affinity for water because of their abundant hydrophilic hydroxyl groups. Technical (T) dextrans are high-purity dextran fractions with selected average molecular weights. Dextran T250 and T500 (500 kDa) were first introduced by Sperling<sup>5</sup> in 1979, and T500 is to date the only macromolecule routinely used for corneal deswelling. Initially thought usable throughout corneal storage,<sup>6</sup> dextran was in practice rapidly restricted to the final 48 to 72 hours of storage. However, the initially described<sup>6-8</sup> innocuous effect of dextran-containing media on corneal endothelial cells (ECs) has been questioned. An average of 8.4% EC loss was reported after 1 to 4 days of deswelling in an OC medium supplemented with 5% dextran T500.<sup>3</sup> We have reported a 15% cell loss after 2 days of deswelling in commercial media containing 5% dextran T500,<sup>4</sup> a result consistent with that of Rieger et al.<sup>9</sup> in similar conditions using a home-made medium containing 5% dextran T500.<sup>9</sup> Daily EC loss in dextran-containing media consequently appears much higher than average daily EC loss of 0.9% in dextran-free media used in the first phase of OC.<sup>4</sup>

Two other macromolecules have more recently been evaluated for corneal deswelling to replace dextran in OC. Hydroxyethyl starch (HES) 130 and 450, vegetable-origin polysaccharides initially used for plasma expansion, have been assessed ex vivo in pig and human corneas.<sup>10-12</sup> HES130 has been assessed as a supplement throughout OC. It restricts water accumulation during long-term storage, making pregraft deswelling unnecessary. Its effect on ECs, however, has not been directly compared with dextran. No clinical application has yet been reported. The second macromolecule assessed belongs to the poloxamer family. Poloxamers are synthetic nonionic triblock copolymers comprising a central hydrophobic polyoxypropylene molecule flanked on each side by a hydrophilic chain of polyoxyethylene. They were introduced in the 1950s by BASF (Ludwigshafen, Germany). Their molecular weights range from 2,000 to 18,000. The physicochemical characteristics of different poloxamers depend on the proportion and the size of both subunits, as well as on their concentration in the solution. In the pharmaceutical field, poloxamers, per se, have therapeutic properties used to treat vaso-occlusive crisis of sickle cell disease,<sup>13</sup> but they are mostly used simply as drug excipients. In ophthalmology, poloxamers have been proposed for inclusion in the formulation of certain eye drops to improve their pharmacokinetic properties.<sup>14-16</sup> They are also used as an antiadhesive agent against bacteria in contact lens-cleaning solutions.<sup>17</sup> Poloxamer hydrogel has been assessed as a well-tolerated injectable intraocular lens in the rabbit.<sup>18</sup> Findings in our study of an animal compound-free (ACF) medium combined with poloxamer 188 for corneal deswelling suggest that it is superior to the standard fetal calf serum (FCS) medium containing dextran T500 in preserving

From the <sup>1</sup>Corneal Graft Biology, Imaging and Engineering Laboratory, Faculty of Medicine, University Jean Monnet, Saint-Etienne, France; and the <sup>3</sup>French Blood Center/Eye Bank of Saint-Etienne, Saint-Etienne, France.

<sup>2</sup>Contributed equally to the work and therefore should be considered equivalent authors.

Submitted for publication August 10, 2007; revised October 19, 2007; accepted December 14, 2007.

Disclosure: M. Zhao, None, G. Thuret, P. S. Piselli, None, A. Pipparelli, None, S. Acquart, None, M. Peoc'h, None, J.-M. Dumollard, None, P. Gain, P

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. This article must therefore be marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. §1734 solely to indicate this fact.

Corresponding author: Gilles Thuret, Service d'Ophthalmologie (pavillon 50A), CHRU de Bellevue, 25 Boulevard Pasteur, F 42055 Saint-Etienne Cedex 2, France; gilles.thuret@univ-st-etienne.fr.

EC viability during deswelling.<sup>4</sup> A clinical trial comparing these media is ongoing. Nevertheless, the aforementioned study was not designed solely to assess the effect of poloxamer independently of ACEF.

Consequently, the purpose of the present study was to assess the innovative use of five poloxamers for human corneal deswelling in OC by comparison with dextran T500, with a standard OC medium containing 2% FCS. Compared with dextran, four of the five poloxamers assessed were found superior in reducing EC loss and had similar efficacy in corneal deswelling and a comparable effect on corneal ultrastructure.

## MATERIALS AND METHODS

### Poloxamers and OC Media

Five pharmaceutical-grade poloxamers were obtained from BASF: P124 (Pluronic F87, molecular weight [MW] 2200), P188 (Lutrol F68, MW 8400), P237 (Pluronic F87, MW 7959), P338 (Pluronic F108, MW 14,600), and P407 (Lutrol F127, MW 12,600). CorneaMax (Eurobio, Les Ulis, France) is a commercial OC medium based on HEPES-buffered Iscove's modified Dulbecco's medium containing sodium bicarbonate, 2% FCS, amino acids, penicillin-streptomycin, and phenol red. Its mean pH is 7.25 (range, 7.0–7.5), and its osmolality is 320 mOsmol/kg (range, 300–340). CorneaJet (Eurobio) is a commercial deswelling medium with the same composition as CorneaMax but supplemented with 5% dextran T500. These media are widely and routinely used in France and Europe.

### In Vitro Experiments

#### Establishment of Concentration/Osmolality Curves.

For each poloxamer, two series of 10%, 5%, 2.5%, and 1.25% (wt/vol) dilutions in CorneaMax were performed: one nonfiltered and the other after sterilizing filtration through a 0.22- $\mu$ m filter (Millipore, Bedford, MA) to assess a possible phenomenon of adsorption in the filter membrane. The osmolalities of these solutions were measured in duplicate (Advanced Model 2020 Osmometer; Radiometer, Copenhagen, Denmark). To investigate the stability of solutions in different storage conditions, each solution underwent four series of measurements: immediately after preparation at room temperature, after 1 week of storage at +31°C, and after 1 month of storage at +4°C and at -20°C. A target osmolality of 350 mOsmol/kg was decided—that is, 10% below the highest osmolality that ECs are known to resist.<sup>19</sup> The curves allowed us to determine the experimental concentration used for each poloxamer in this study.

**In Vitro Cytotoxicity Assays on Three Corneal Cell Types.** The human corneal endothelial cell line obtained after transfection with simian virus 40 was a kind gift of Katrin Engelmann and Jürgen Bednarz of the University of Hamburg (Germany).<sup>20</sup> The cells were grown at +37°C in a humidified atmosphere of air and 5% CO<sub>2</sub> in a medium F99<sup>21</sup> consisting of M199/F12 (1:1) (Sigma-Aldrich, St-Quentin Fallavier, France), 10% FCS (Eurobio), 2 mg/mL glutamine (Eurobio), 3 mg/mL chondroitin sulfate (Sigma-Aldrich), 20  $\mu$ g/mL ascorbic acid (Sigma-Aldrich), 20  $\mu$ g/mL insulin (Sigma-Aldrich), and 0.5% penicillin-streptomycin (Sigma-Aldrich). The human corneal epithelial cell line transformed with simian virus 40 (ATCC/CRL11135) was cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium/F12 (1:1) (Sigma-Aldrich) supplemented with 5% FCS, 5  $\mu$ g/mL insulin, 0.1  $\mu$ g/mL cholera toxin (Sigma-Aldrich), 0.5% penicillin-streptomycin, 2.5  $\mu$ g/mL amphotericin B (Sigma-Aldrich), 5 ng/mL epithelium growth factor (Sigma-Aldrich), and 0.5% dimethyl sulfoxide. Primary human corneal fibroblast cultures were established from donor corneas obtained from the local eye bank. Briefly, an 8-mm diameter corneal button was punched out, and the Descemet's membrane with attached endothelium was stripped off. The epithelium was also fully removed by alcohol treatment and scraping. The naked residual stroma was then cut into small pieces and treated with 0.2% collagenase B (Roche Diagnostics, Meylan, France) for 3 hours at +37°C. After centrifuga-

tion, the pellet of keratocytes was resuspended in F99 previously described and further subcultured.

The 3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay was used to test the cytotoxicity on the aforementioned cell culture types of five poloxamer solutions of 350 mOsmol/kg, CorneaMax and CorneaJet. Controls consisted of each type of cells cultured in their basal medium. Cells were plated at  $1 \times 10^5$  cells/100  $\mu$ L/well in 96-well tissue culture plates (BD-Falcon, Bedford, MA). After incubation at +37°C overnight, the culture media were replaced by the test solutions (100  $\mu$ L). Cells were then incubated for 24, 48, and 72 hours. After the exposure period, 10  $\mu$ L MTT reagent (MTT Kit; Roche) were added to each well and incubated at 37°C for 4 hours. Formazan was solubilized by adding 100  $\mu$ L of solubilization solution and incubated overnight at +37°C. The optical densities were measured at 570 nm with a spectrophotometer (Thermo Labsystems, Helsinki, Finland). The result was described as percent viability expressed as optical density in the presence of test solution as a percentage of that in the control. Experiments were performed in triplicate and on three wells for each measurement.

### Ex Vivo Comparative Experiments on Human Corneas: Dextran T500 versus Poloxamers

**Organ Culture.** The use of human corneas adhered to the tenets of the Declaration of Helsinki. Twenty pairs of human scientific corneas were obtained either from the Saint-Etienne Eye Bank (corneas unsuitable for transplantation for reasons other than endothelial deficiency) or procured from the anatomy laboratory of the Saint-Etienne Faculty of Medicine (cadavers donated to science). Donors were 11 women and 9 men aged  $74 \pm 13$  years (range, 48–91), postmortem time of  $22 \pm 16$  hours (range, 4–66) and storage time of  $23 \pm 3$  days (range, 21–32). A Kruskal-Wallis test showed that the characteristics of the five groups did not differ (data not shown).

All corneas were stored in CorneaMax for at least 21 days (average storage time in France) at +31°C in a dry incubator, as per the storage procedure routinely used by eye banks. At the end of OC, endothelial quality was assessed (see below). Only pairs of corneas with an end-of-storage endothelial cell density (ECD) of more than 2000 cells/mm<sup>2</sup> were included in the present study. These were then randomly transferred either to CorneaJet or to the poloxamer medium (CorneaMax+poloxamer) for 48 hours of deswelling. This deswelling time was chosen because it is the one most frequently reported by European eye banks.<sup>1,2</sup> P124 was highly toxic to all three cell types in vitro (see results) and so was not assessed on human corneas. Endothelial quality, corneal central thickness (CCT), stromal transparency, and Descemet's membrane folding in the two groups were compared before and after deswelling. Histology and ultrastructure were observed after deswelling.

Five additional pairs of corneas were stored in similar conditions and the endothelium assessed in the same way. They were then returned to a new bottle of CorneaMax (i.e., without dextran or poloxamer) for 48 hours, and the endothelium was again assessed. This group served as a control without deswelling. It simultaneously assessed the impact on ECD of handling and of using two cell visualization methods. These corneas were retrieved from two women and three men aged  $79 \pm 8$  years (range, 67–87), postmortem time of  $11 \pm 8$  hours (range, 5–24), and storage time of  $21 \pm 2$  days (range, 20–24).

**EC Mortality, Visibility, ECD and Morphometry.** The endothelium was assessed by a standard technique used in eye banks.<sup>1,2</sup> After a brief rinse in balanced salt solution (Alcon, Rueil Malmaison, France), the endothelial side was covered with 0.4% trypan blue solution (Sigma-Aldrich) during 1 minute to assess instantaneous cell death. After rinsing with 0.9% NaCl (Sigma-Aldrich) to eliminate the dye, the endothelium was covered with saline during 4 minutes to render the intercellular spaces visible. The endothelium was then observed using a direct light microscope (Leica; DMLB, Wetzlar, Germany) equipped with a  $\times 10$  long-working-distance objective and a

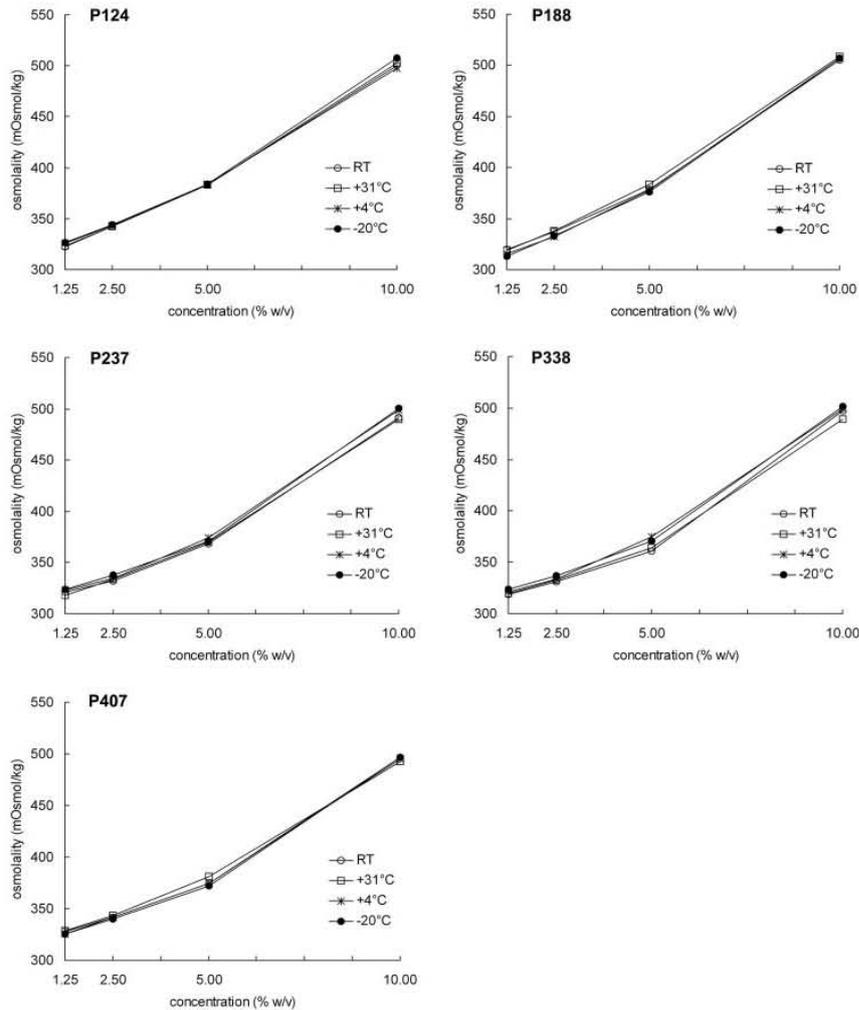


FIGURE 1. Concentration/osmolality curves of the five poloxamers after ex-temperaneous preparation at room temperature and three storage conditions: +31°C during 1 week, and +4°C and -20°C during 1 month. Dots are the mean of the four measurements. All standard deviations (not represented) were below 10 mOsmol/kg. RT, room temperature.

CCD camera (SC 75 CE mono CCD; Sony, Tokyo, Japan). Eight non-overlapping fields ( $1245 \times 950 \mu\text{m}$ ) were captured randomly within the 8-mm central cornea. Irrespective of apparent ECD, the best three images in terms of overall image quality were chosen. EC visualization, a critical parameter in endothelial quality assessment, was graded using a three-level score (good, average, or poor) described elsewhere<sup>22</sup> and took account of cell borders, background noise, and the surface area of visible ECs. As ECs are rarely visible in saline after deswelling in dextran,<sup>4</sup> we stained the cell membranes of corneas in both groups with 4% alizarin red<sup>23</sup> (Sigma-Aldrich) to analyze the postdeswelling EC parameters. ECD and morphometry (coefficient of variation [CV] of cell area and hexagonal cell percentage) were determined with an endothelial analyzer (Sambacornea; Sambatechnologies, Meylan, France)<sup>24–27</sup> on at least 300 cells.

**CCT, Transparency, and Folding.** These three parameters were assessed at the same time point as endothelial evaluation. CCT (mean of 10 measurements) was measured with an ultrasonic pachymeter (AL-2000; Tomey, Tokyo, Japan). Corneal transparency and folding were evaluated according to a protocol described elsewhere.<sup>4</sup> Briefly, the paired corneas were photographed side by side on a backlit chart formed by eight black lines. Three masked observers scored the two parameters according to a two-level system (transparency, good or mediocre; folding, minimal, or high).

**Histology and Electron Microscopy.** After the final endothelial and stromal assessment (lasting <15 minutes), the corneas were cut into three parts for examination by histology, transmission electron microscopy (TEM), and scanning electron microscopy (SEM). The OC corneas served as the control before deswelling.

**Histology.** Specimens were fixed in 10% formalin in PBS, dehydrated in increasing concentrations of ethanol, cleared with a methylcyclohexane solution, infiltrated with paraffin, and embedded in a paraffin block for sectioning. Semithin cross-sections were then cut and stained with hematein-eosin-safran according to routine protocol. Photographs were taken with an inverted fluorescence microscope (IX81; Olympus, Tokyo, Japan). For each specimen, epithelial thickness measurement (30 measurements) and keratocyte enumeration per 500- $\mu\text{m}$  length of full-thickness cross-section were conducted on three images ( $\times 40$  objective, Cell<sup>F</sup> imaging software; Olympus).

**Transmission Electron Microscopy.** Specimens were fixed in 1% glutaraldehyde/0.5% paraformaldehyde in 0.1 M mono Na/diK buffer (pH 7.4), postfixed in 1% osmium tetroxide in 0.1 M cacodylate buffer for 1 hour, dehydrated in a graded series of ethanol and embedded in Epon resin. Ultrathin (90 nm) sections were cut and stained with uranyl acetate and lead citrate. Photographs of endothelium, keratocyte, and posterior collagen fibers were taken with a transmis-

sion electron microscope (model H-800; Hitachi, Tokyo, Japan) equipped with a CCD camera (XR40; AMT, Danvers, MA). In addition to morphologic observations, quantitative analyses of endothelial thickness (10 measurements), density, and diameter of posterior collagen fibers (at least 50 fibers taken into account), and interfibrillar distance (60 measurements) were conducted with the imaging software (CellF; Olympus).

**Scanning Electron Microscopy.** Specimens were fixed in 2% glutaraldehyde in a 0.1 M cacodylate buffer, dehydrated in acetate, and critical-point dried with carbon dioxide used as the transitional fluid. The preparations were then adhered to carbon stubs with the endothelial side uppermost and coated with a thin layer of palladium in a sputter coater (model SC 7620; Polaron, Watford, UK) before being examined and photographed with a scanning electron microscope (model S3000N; Hitachi) operating at 5 kV. Digital images were analyzed by three masked observers who graded the number of microvilli, cilia, intercellular interdigitations, and damaged cells according to a two-level score (low-high).

### Statistical Analysis

Unless otherwise indicated, data are expressed as the mean  $\pm$  SD. The quantitative variables were compared by a paired Student's *t*-test in the case of normal distribution and otherwise by a Wilcoxon nonparametric test. The quality scores were compared by the  $\chi^2$  or the Fisher exact test in  $2 \times 2$  grids. Considering the small number of pairs (five) for each poloxamer and that all poloxamers except for P124 tended to behave similarly, only statistics for the global poloxamer family were generated. To clarify the results, details are also given for each poloxamer independently, without statistics. Commercial software (SPSS ver. 11.3; for Windows; SPSS Inc, Chicago, IL) was used, and  $P < 0.05$  was deemed significant.

## RESULTS

### Concentration–Osmolality Curves

Osmolality increased with the concentration of poloxamer in the solution. The first part of each curve was almost linear (Fig. 1). Filtration did not influence osmolality, and there was no significant difference between the freshly prepared mixture and that in different storage conditions. The concentration of each poloxamer was accordingly determined as 350 mOsm/kg: P124 at 3%; P188, P237, and P407 at 3.5%; and P338 at 4%.

### In Vitro Cell Toxicity Assays

P124 was highly toxic to the three cell types, with viability decreasing to 6% after only 24 hours of exposure. No toxicity was observed with CorneaMax. No toxicity was observed with the four other poloxamers, whatever the cell type and incubation time. Keratocyte viability decreased to 70% after 48 hours of exposure in CorneaJet, whereas no toxicity was observed in endothelial or epithelial cell lines (Fig. 2).

### Ex Vivo Comparative Experiments on Human Corneas: Dextran T500 versus Poloxamers

**Corneal Endothelium. Endothelial Cell Density.** A significant difference of 109 cells/mm<sup>2</sup> (95% confidence interval [CI<sub>95</sub>] 49–170) in favor of the poloxamer group was observed after deswelling, though there was accidentally a slightly higher count of 62 cells (CI<sub>95</sub> 22–102) in the dextran group before deswelling. Poloxamers induced significantly less EC loss than dextran ( $9.7 \pm 3.4$  vs.  $16.1 \pm 3.2$ ;  $P < 0.001$ ; Table 1). Ninety percent (18/20) of corneas in the poloxamer group retained an ECD higher than the delivery threshold of 2000 cells/mm<sup>2</sup>, against 70% (14/20) of those in the dextran group ( $P = 0.235$ ). All four poloxamers tended to behave identically.

## Deswelling of Organ-Cultured Corneas 553

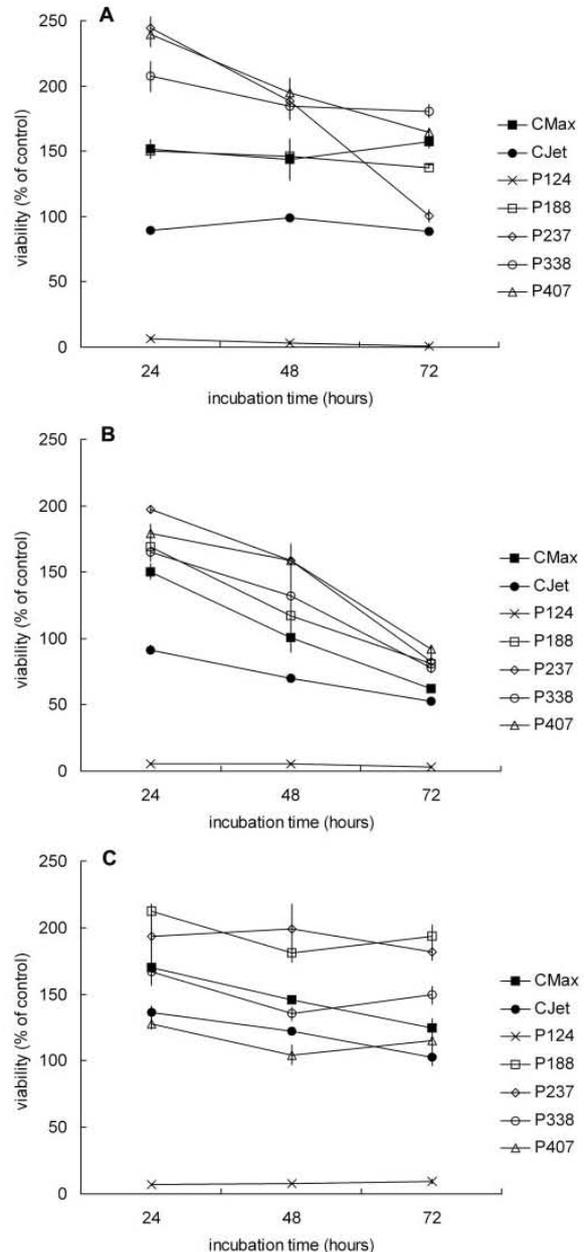


FIGURE 2. An in vitro viability test (MTT assay) lasting 3 days. Results are expressed as a percentage of the control, consisting of cells cultured in their respective recommended in vitro media. (A) Corneal endothelial cell line; (B) wild-type keratocytes; (C) corneal epithelial cell line. The data are expressed as the mean result of experiments performed in triplicate. Error bars are the SD (those not depicted are too small to be shown). CMax, CorneaMax; CJet, CorneaJet.

**Morphometry.** Before deswelling, cell-area CV and hexagonal cell percentage were comparable between the two groups. After deswelling, the CV was significantly lower in the poloxamer group, whereas the hexagonal cell percentage was slightly higher in the dextran group (Table 1).

TABLE 1. Corneal Endothelial and Stromal Assessment before and after 48 Hours of Deswelling in Dextran versus Poloxamers

Time Point/Parameter	A		B		C		D		E		
	Dextran (n = 20)	Poloxamers (n = 20)	P	Dextran (n = 5)	P188 (n = 5)	Dextran (n = 5)	P237 (n = 5)	Dextran (n = 5)	P338 (n = 5)	Dextran (n = 5)	P407 (n = 5)
<b>Before deswelling</b>											
ECD (cells/mm <sup>2</sup> )	2588 ± 247	2526 ± 224	0.010	2660 ± 285	2584 ± 203	2528 ± 200	2463 ± 156	2622 ± 201	2590 ± 248	2541 ± 335	2468 ± 305
CV (%)	23.0 ± 3.3	23.8 ± 3.2	0.350	22.8 ± 4.4	24.4 ± 4.9	22.2 ± 2.2	22.5 ± 3.8	24.5 ± 3.0	23.9 ± 1.8	22.3 ± 3.7	24.3 ± 1.8
Hexagonal cells (%)	51.8 ± 5.0	49.9 ± 6.2	0.156	50.2 ± 5.0	49.4 ± 7.0	49.3 ± 2.9	48.1 ± 6.2	52.3 ± 6.4	50.6 ± 6.0	55.4 ± 3.9	51.3 ± 7.3
Mortality (%)	0.12 ± 0.15	0.15 ± 0.17	0.507	0.04 ± 0.07	0.08 ± 0.16	0.08 ± 0.08	0.09 ± 0.09	0.27 ± 0.21	0.25 ± 0.19	0.10 ± 0.10	0.18 ± 0.21
EC visibility (G/A/P) (n)	6/12/2	6/12/2	1	3/2/0	3/2/0	1/3/1	1/3/1	1/4/0	1/4/0	1/3/1	1/3/1
CCT (µm)	1178 ± 147	1165 ± 147	0.341	1185 ± 162	1183 ± 171	1171 ± 144	1120 ± 144	1174 ± 148	1169 ± 118	1181 ± 184	1187 ± 187
Transparency (G/M) (n)	2/18	2/18	1	0/5	0/5	1/4	1/4	0/5	0/5	1/4	1/4
Folding (M/H) (n)	0/20	0/20	1	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
<b>After deswelling</b>											
ECD (cells/mm <sup>2</sup> )	2172 ± 231	2281 ± 216	0.002	2214 ± 287	2280 ± 243	2158 ± 182	2245 ± 233	2157 ± 108	2376 ± 181	2159 ± 350	2225 ± 243
CV (%)	31.2 ± 3.0	28.0 ± 4.4	0.002	30.9 ± 2.2	28.5 ± 6.7	30.7 ± 4.0	27.2 ± 2.9	31.1 ± 2.4	28.2 ± 3.9	32.4 ± 3.7	28.2 ± 4.7
Hexagonal cells (%)	46.8 ± 3.5	44.9 ± 3.3	0.048	46.3 ± 3.8	46.5 ± 4.3	47.4 ± 4.0	42.8 ± 1.3	46.9 ± 3.7	46.0 ± 2.8	46.6 ± 3.3	44.2 ± 3.6
Mortality (%)	0.03 ± 0.06	0.05 ± 0.08	0.091	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.03 ± 0.06	0.03 ± 0.07	0.00 ± 0.00	0.07 ± 0.09	0.08 ± 0.10	0.09 ± 0.10
EC visibility (G/A/P) (n)	1/1/18	8/5/7	<0.01	0/0/5	3/2/0	0/1/4	1/1/3	0/0/5	2/2/1	1/0/4	2/0/3
CCT (µm)	611 ± 58	672 ± 96	0.004	610 ± 28	627 ± 65	611 ± 61	642 ± 72	608 ± 54	629 ± 67	615 ± 93	787 ± 88
Transparency (G/M) (n)	18/2	18/2	1	5/0	4/1	5/0	5/0	4/1	4/1	4/1	5/0
Folding (M/H) (n)	18/2	4/16	<0.01	5/0	1/4	4/1	1/4	5/0	1/4	4/1	0/5
EC loss (%)	16.1 ± 3.2	9.7 ± 3.4	<0.001	16.9 ± 2.1	11.9 ± 2.8	14.6 ± 1.2	9.0 ± 3.8	17.6 ± 4.0	8.1 ± 4.3	15.3 ± 4.5	9.7 ± 2.2
Thickness reduction (%)	47.7 ± 5.6	41.9 ± 8.1	0.002	48.0 ± 5.4	46.6 ± 3.6	47.4 ± 6.8	42.2 ± 7.4	47.5 ± 8.3	45.6 ± 9.2	47.9 ± 2.5	33.2 ± 4.6

A, all four poloxamers analyzed together; B, C, D, E, details for each poloxamer without statistics, given that data had already been analyzed. Quantitative data are expressed as the mean ± SD. Qualitative data are expressed as the number. ECD, endothelial cell density; CV, coefficient of variation of cell area; Mortality, instantaneous EC mortality using 0.4% trypan blue; G/A/P, good/average/poor; CCT, central corneal thickness; G/M, good/mediocre; M/H, minimal/high.

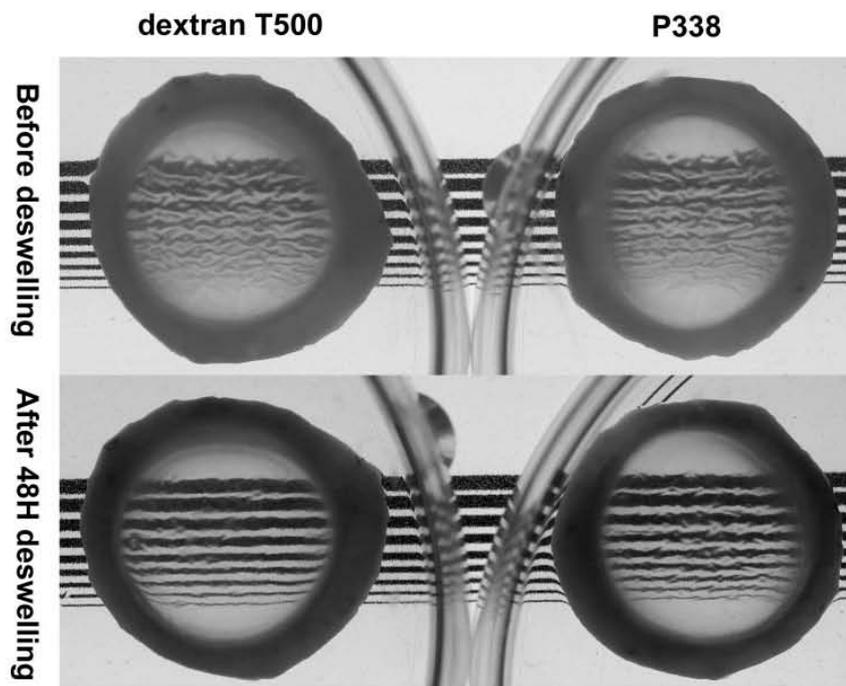


FIGURE 3. Stroma transparency and Descemet's membrane folding of the same paired corneas before and after deswelling: example of dextran T500 versus P338. Transparency and folding were comparable before deswelling (*top*). After deswelling, transparency improved and was comparable between the two corneas. However, folding improved more markedly in dextran than in the P338 medium (*bottom*). P188, P237, and P407 behaved in the same way.

**EC Mortality.** Instantaneous cell death was comparable between the two groups before and after deswelling (Table 1).

**Endothelial Visibility.** Before deswelling, cell visibility was comparable between the two groups. After deswelling, it was markedly better in the poloxamer group (Table 1). Notably, the endothelium was invisible in 65% (13/20) of corneas in the dextran group, whereas it was always visible with the poloxamers (20/20). Of the seven visible endothelia in the dextran group, five were graded as poor, one as average, and one as good.

**Corneal Stroma. Central Corneal Thickness.** Before deswelling, CCT was comparable between the two groups. After deswelling, corneas in poloxamer were significantly thicker

than in dextran, but the difference was only  $61 \mu\text{m}$  ( $CI_{95}$  26–96). All poloxamers tended to behave similarly except for P407, which appeared less efficient (Table 1).

**Transparency and Folding.** Before deswelling, transparency and folding were comparable between the two groups. After deswelling, transparency improved and remained comparable in the two groups (Table 1). Folding improved more markedly in the dextran group (Fig. 3).

#### Histology and Electron Microscopy

Of the 20 pairs of corneas, 14 were processed for histology and electron microscopy (four each for P188 and P237,

TABLE 2. Histologic and Ultrastructural Examination of Corneas Deswollen in Dextran versus Poloxamers

Technique/Parameter	Dextran ( <i>n</i> = 14)	Poloxamers ( <i>n</i> = 14)	<i>P</i>
<b>Histology</b>			
Epithelial thickness ( $\mu\text{m}$ ) <sup>*</sup>	20 ± 8	23 ± 9	0.328
Number of keratocytes ( <i>n</i> /500 $\mu\text{m}$ )	126 ± 16	129 ± 15	0.220
<b>TEM</b>			
EC thickness ( $\mu\text{m}$ )	3.20 ± 1.15	3.61 ± 1.44	0.314
Density of collagen fibers ( <i>n</i> / $\mu\text{m}^2$ )	425 ± 86	368 ± 119	0.099
Diameter of collagen fibers (nm)	28.7 ± 2.6	29.7 ± 4.0	0.345
Interfibrillar distance (nm)	54.4 ± 4.4	59.0 ± 8.2	0.075
<b>SEM</b>			
Microvilli (L/H) ( <i>n</i> )	11/3	12/2	1
Cilia (L/H) ( <i>n</i> )	7/7	9/5	0.445
Intercellular interdigitations (L/H) ( <i>n</i> )	7/7	10/4	0.246
Damaged cells (L/H) ( <i>n</i> )	12/2	14/0	0.481

Quantitative data are expressed as the mean ± SD. Qualitative data are expressed as the number. TEM, transmission electron microscopy; SEM, scanning electron microscopy; EC, endothelial cell; L/H, low/high.

<sup>\*</sup> *n* = 12 in dextran and poloxamer groups for epithelial thickness analysis.

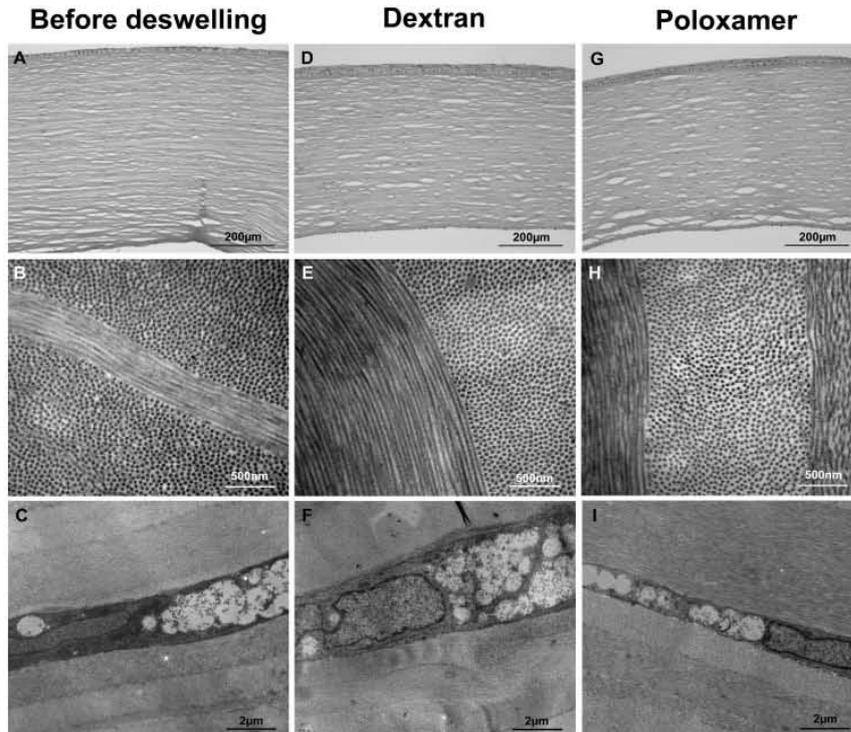


FIGURE 4. Light micrographs (hematein-eosin-safran staining) of corneal cross-sections (A, D, G) and transmission electron images (B, C, E, F, H, I) of corneal posterior stroma and keratocytes. The corneal epithelium showed one to four cell layers before (A) and after deswelling in dextran (D) and poloxamer (G). Stromal thickness reduced after deswelling. The posterior collagen fibers had uniform diameter and normal organization before (B) and after deswelling (E, H). The keratocytes contained normal organelles and numerous vacuoles before (C) and after deswelling (F, I). Original magnifications: (A, D, G)  $\times 10$ ; (B, E, H)  $\times 40,000$ ; (C, F, I)  $\times 10,000$ .

three each for P338 and P407). Controls consisted of 3 OC corneas without deswelling. Considering the small number for each poloxamer, details are given only for the 14 pairs together (Table 2).

**Histology. Epithelium.** One pair in P338 and one in P407 lost their epithelia during cross-sectioning. Consequently 12 pairs of corneas were available. Epithelial shedding was observed in both groups. The central epithelium contained one to four layers (Fig. 4). There was no difference in epithelial thickness between the two groups (Table 2). The mean thickness of the epithelia of the control corneas was  $20 \pm 3 \mu\text{m}$ .

**Stroma.** Collagen fiber organization was of similar appearance in both groups. Keratocytes were long, slender, tapering profiles (Fig. 4). There was no difference in the number of keratocytes per 500- $\mu\text{m}$  length of cross section between the two groups (Table 2). The number of keratocytes in control corneas was  $131 \pm 16$ .

**Transmission Electron Microscopy. Endothelium.** The EC before deswelling measured  $5.28 \pm 1.53 \mu\text{m}$ . After deswelling, EC thickness decreased and was similar in both groups (Table 2). Many cytoplasmic vacuoles were present in the ECs, some of which contained dense materials that were not observed before deswelling. The nuclei, organelles and intercellular junctions appeared intact. Very few of the ECs showed severe injuries, such as lysed organelles and damaged cytoplasm membrane (Fig. 5).

**Posterior Collagen.** The posterior collagen fibers in both groups appeared to have uniform diameter and normal organization after deswelling (Fig. 4). The diameter and density of collagen fibers were comparable in the two groups (Table 2). Collagen fiber density correlated with interfibrillar distance ( $r = 0.956$ ,  $P < 0.001$ ).

**Keratocyte.** Keratocyte profiles in the posterior stroma were broad in shape and showed irregular and indented nuclei surrounded by many organelles. Before and after deswelling, a

large number of vacuoles were present in the keratocytes. No dense material was observed after deswelling (Fig. 4).

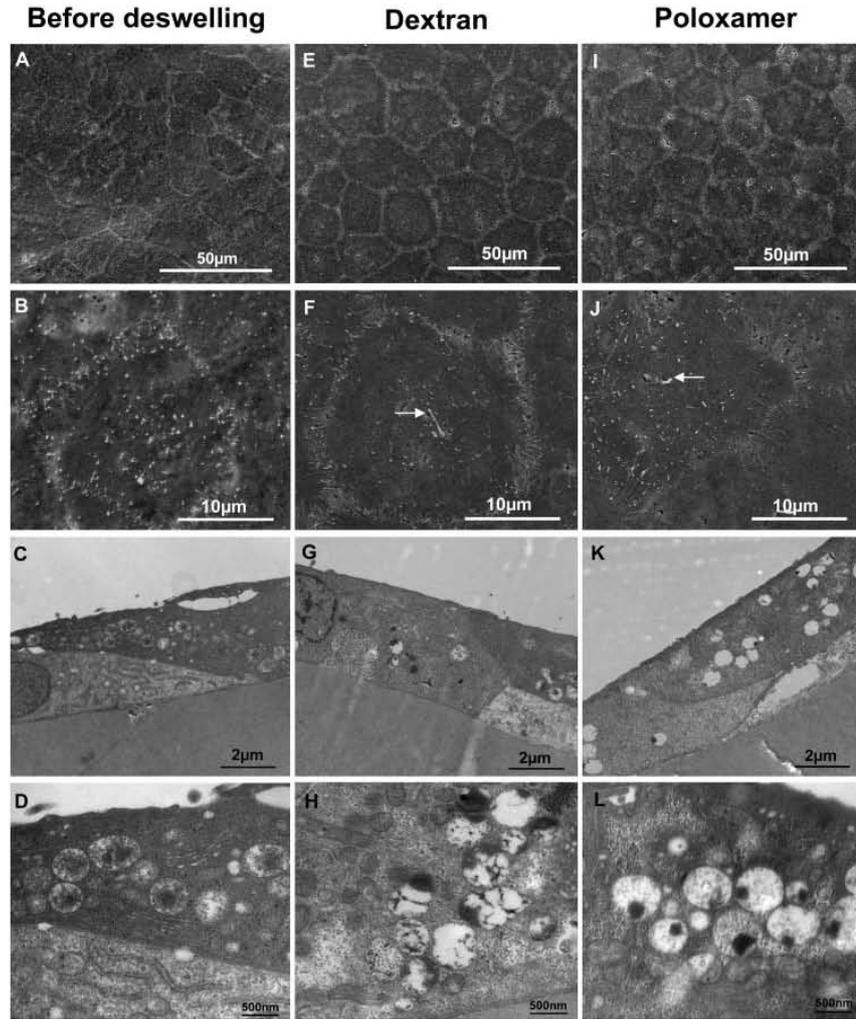
**Scanning Electron Microscopy.** We observed a polygonal pattern of EC mosaic after deswelling in the two experimental groups and the controls without deswelling. The cell surface was flat after deswelling and flanked with elongated microvilli and cilia. Sometimes, two or three cilia were present on one EC surface, irrespective of the macromolecule used. The intercellular interdigitations were elaborate in all groups before deswelling. Lysed cells seemed more frequent in the dextran group than in the poloxamer group (not significant) (Table 2, Fig. 5).

#### Control Group for Endothelial Assessment without Deswelling

A mean difference in ECD of  $6.4\% \pm 0.9\%$  was observed between the two cell counts (from  $2216 \pm 343$  to  $1983 \pm 338$ ,  $P = 0.005$ ). CV increased from 24.0% to 27.7% ( $P = 0.017$ ), while hexagonal cell percentage decreased from 51.5% to 44.3% ( $P = 0.028$ ).

#### DISCUSSION

Poloxamers with a safety profile are widely used for pharmaceutical and medical applications, and their biocompatibility has been proven.<sup>18,28,29</sup> Despite various ophthalmic applications,<sup>15-18,29</sup> they have never been used for eye banking except for P188 in two ex vivo studies: first in OC<sup>4</sup> and then in hypothermic storage.<sup>30</sup> In the present study, we investigated the efficacy and tolerance of five poloxamers for deswelling human corneas during 48 hours after prolonged storage in an OC medium containing 2% FCS that is widely used throughout Europe. The inclusion of paired human corneas of quality comparable to those actually grafted allowed a strict compar-



**FIGURE 5.** Scanning (A, B, E, F, I, J) and transmission (C, D, G, H, K, L) electron micrographs of corneal endothelium. (A, B) The endothelial surface before deswelling was undulating and showed a polygonal pattern of ECs. Prominent microvilli, cilia, and interdigitated apical flaps of cell borders were seen. (C, D) The ECs contained numerous vacuoles and swollen mitochondria. (E, F, I, J) After deswelling in dextran and poloxamer, the endothelial surface became flat, and the ECs maintained their polygonal pattern. The appearance of microvilli, cilia, and intercellular interdigitations was similar to that before deswelling. (G, H, K, L) Some vacuoles in ECs contained dense materials that were not observed before deswelling. Original magnifications: (A, E, I)  $\times 800$ ; (B, F, J)  $\times 3,500$ ; (C, G, K)  $\times 10,000$ ; (D, H, L)  $\times 30,000$ . Arrows: primary cilia.

ison of these macromolecules with the reference molecule, dextran T500.

Apart from P124, which proved toxic, we identified an effect that was common to the remaining four poloxamers. They exert sufficient osmotic colloid pressure to deswell corneas significantly and increase corneal transparency while better preserving the ECs, nearly halving cell loss compared with dextran. Further, our study again confirms the toxicity of 48 hours of deswelling in 5% dextran T500<sup>4,31</sup> on corneal ECs after prolonged OC storage. There seemed to be minor differences among the poloxamers in their ability to reverse stromal edema. P188 and P338 appeared to promote the deswelling more efficiently. The water-retention capability of poloxamers depends on the length of hydrophilic polyoxyethylene chains as well as on the polyoxyethylene-polyoxypropylene proportion, described as the hydrophilic-lipophilic balance. P188 and 338 have a higher hydrophilic-lipophilic balance, which may explain their apparently greater efficacy in corneal deswelling.

Poloxamers have another advantage over dextran: they allow better EC visualization with 0.9% NaCl incubation. Endothelial visualization is essential for corneal EC assessment during OC,<sup>22</sup> and it is well known that endothelial visualization after incubation with NaCl is not possible for cornea in dex-

tran-containing medium, probably because of its high viscosity.<sup>4</sup> Eye banks that now assess corneas during or after deswelling in dextran have to use hypotonic solution to obtain satisfactory endothelial delineation. Endothelial visibility after deswelling in poloxamer is therefore an advance in graft quality control, allowing a final endothelial evaluation at that point to measure more accurately the actual ECD provided to the recipient.

Reduction of folding, a parameter rarely assessed to date, probably because of the lack of a measurement method, seemed disappointing with the poloxamers. One explanation is that poloxamers are surfactants that cause the medium to spread in a thin layer over the endothelial surface and thus highlight the folds, whereas the viscous dextran medium covers the folds, rendering the surface smooth and the folding artificially less visible. Nevertheless, this does not seem to affect graft quality, given the improved transparency and reduced corneal thickness after deswelling.

The morphologic study showed similar structural behavior in the two groups. Uptake of macromolecules by ECs, vacuolization in ECs and keratocytes, and shedding of epithelial cells observed in the poloxamer group have previously been described in corneas deswollen in dextran and do not appear

prohibitive for graft quality.<sup>3,32</sup> Because the accumulation of deswelling agents in the cornea is time dependent<sup>3,7,31</sup> and dynamic from surface to stroma,<sup>31</sup> the 48-hour deswelling time used in our study prevents their further accumulation in the cornea, thus substantially limiting their toxicity. The collagen fiber density obtained in our study was lower than that reported by Muller et al.<sup>33</sup> In this study, we examined only the posterior stroma of corneas deswollen for 48 hours after prolonged OC, whereas Muller et al. evaluated the whole stroma of corneas preserved for at least 7 days in a dextran-containing medium without previous storage in dextran-free medium. Because corneal swelling and deswelling occur mainly in the posterior stroma,<sup>33,34</sup> the different swelling state of the stroma in the two studies may explain our differing results. Elongated primary cilia and numerous microvilli were observed on human corneal endothelium after OC storage,<sup>35</sup> compared with the few microvilli and very occasional cilia reported in fresh corneas.<sup>36,37</sup> Further, we found prominent surface structures after deswelling. Primary cilium is probably a ubiquitous component of every EC.<sup>38</sup> Its appearance and retraction seem to be dynamic and are perhaps associated with transendothelial fluid flow or with chemical or osmotic regulation of ECs.<sup>39</sup> The presence of numerous microvilli has been attributed to stress.<sup>39-41</sup> Our finding therefore probably reflects the active metabolic state of corneal ECs in deswelling media. The elaborate intercellular interdigitations observed during OC were illustrated by Doughman et al.<sup>42</sup> in their early electron microscopic study of human corneas stored in OC. The same image was also shown in human cornea after exposure to a nontoxic indocyanine green dye<sup>43</sup> and in rabbit cornea after incubation in phosphate-buffered solution.<sup>39</sup> The authors did not explain this cell-border modification. Possible hypotheses are active metabolic pump function<sup>44</sup> or environmental stress.

For the first time, we reveal that there may be a large difference in ECD between a count using NaCl combined with trypan blue and one using alizarin red 48 hours later. The possible link between EC loss and endothelial counting in OC has been investigated only by Sperling,<sup>45</sup> who suggested that trypan blue and 0.45% and 0.9% NaCl were atraumatic. However, in his study a smaller number of ECs were counted, with a manual method. Van Dooren et al.<sup>46</sup> showed that exposure of corneal endothelium to 0.1% trypan blue for less than 30 minutes was not harmful to the ECs. Although our experiment used a higher concentration of dye, the endothelium was exposed for only 1 minute, which seems unlikely in itself to induce 6.4% EC loss. The cell loss observed may be related to different endothelial visualization induced by NaCl or alizarin red during EC counting and/or to actual toxicity of corneal handling, exposure to NaCl and trypan blue, oxidative stress, and several minutes of microscope lighting. Further studies are required. Whatever the explanation, this finding implies that actual cell loss induced exclusively by poloxamers or dextran should be lower than that observed.

In conclusion, during OC at +31°C in medium containing 2% FCS, P188, P237, P338, and P407 at 350 mOsmol/kg appeared superior to 5% dextran T500 for human corneal deswelling in the last 48 hours before grafting, in their ability to preserve the ECs and improve EC visibility after deswelling. These poloxamers were equally effective in deswelling the cornea and increasing stromal transparency. The poloxamers induced moderate morphologic injuries similar to those observed in the dextran group. Of our four candidates, P188 and P338 are likely to be more efficient for corneal deswelling. Our study, combining in vitro and ex vivo experiments on human corneas, provides a reasonable level of confidence to allow advancement to a clinical trial.

## Acknowledgments

The authors thank Isabelle Anselme, Electron Microscopy Center (Saint-Etienne University) and Samar Salloum, Biochemistry Department (Saint-Etienne University Hospital) for technical assistance.

## References

1. EEBA. *European Eye Bank Association Directory*. 15th ed. Amsterdam, The Netherlands; 2007.
2. EEBA. *European Eye Bank Association Directory*. 14th ed. Amsterdam, The Netherlands; 2006.
3. Borderie VM, Baudrimont M, Lopez M, Carvajal S, Laroche L. Evaluation of the deswelling period in dextran-containing medium after corneal organ culture. *Cornea*. 1997;16:215-223.
4. Thuret G, Manissolle C, Campos-Guyotat L, Guyotat D, Gain P. Animal compound-free medium and poloxamer for human corneal organ culture and deswelling. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005;46:816-822.
5. Sperling S. Human corneal endothelium in organ culture: the influence of temperature and medium of incubation. *Acta Ophthalmol (Copenh)*. 1979;57:269-276.
6. Pels E, Schuchard Y. The effects of high molecular weight dextran on the preservation of human corneas. *Cornea*. 1984;3:219-227.
7. van der Want HJ, Pels E, Schuchard Y, Olesen B, Sperling S. Electron microscopy of cultured human corneas: osmotic hydration and the use of a dextran fraction (dextran T 500) in organ culture. *Arch Ophthalmol*. 1983;101:1920-1926.
8. Salla S, Redbrake C, Becker J, Reim M. Remarks on the vitality of the human cornea after organ culture. *Cornea*. 1995;14:502-508.
9. Rieger R, Jaroszewski J, Jaeckel C, Hartmann C, Rieck P. Endothelial cell loss during storage of donor corneas in culture media containing dextrane. *15th conference of the European Eye Bank Association*. Bruxelles, Belgium; 2003.
10. Reim M, Hesse R, Pietruschka G. The metabolism of organ cultures of cornea in TC 199 with added dextran 500 or hydroxyethyl starch 450. *Klin Monatsbl Augenheilkd*. 1990;196:76-80.
11. Reim M, Pantenburg FJ, Ziegler CD. Effect of serum and osmotically active substances on metabolism in 262 tissue cultures of pig's corneas: improved preservation of donor tissue for keratoplasty. *Klin Monatsbl Augenheilkd*. 2001;218:95-101.
12. Redbrake C, Kompa S, Altmann G, Reim M, Arend O. HES 130 as a continuous supplement for organ culture of human corneas (in German)? *Ophthalmologe*. 2006;103:43-47.
13. Cheung AT, Chan MS, Ramanujam S, et al. Effects of poloxamer 188 treatment on sickle cell vaso-occlusive crisis: computer-assisted intravital microscopy study. *J Invest Med*. 2004;52:402-406.
14. Chetoni P, Panichi L, Burgalassi S, Benelli U, Saettoni MF. Pharmacokinetics and anti-inflammatory activity in rabbits of a novel indomethacin ophthalmic solution. *J Ocul Pharmacol Ther*. 2000;16:363-372.
15. Pepic I, Jalsenjak N, Jalsenjak I. Micellar solutions of triblock copolymer surfactants with pilocarpine. *Int J Pharm*. 2004;272:57-64.
16. Kim EY, Gao ZG, Park JS, Li H, Han K. rhEGF/HP-beta-CD complex in poloxamer gel for ophthalmic delivery. *Int J Pharm*. 2002;233:159-167.
17. Portoles M, Refojo MF, Leong FL. Poloxamer 407 as a bacterial adhesive for hydrogel contact lenses. *J Biomed Mater Res*. 1994;28:303-309.
18. Kwon JW, Han YK, Lee WJ, et al. Biocompatibility of poloxamer hydrogel as an injectable intraocular lens: a pilot study. *J Cataract Refract Surg*. 2005;31:607-613.
19. Edelhofer HF, Hanneken AM, Pederson HJ, Van Horn DL. Osmotic tolerance of rabbit and human corneal endothelium. *Arch Ophthalmol*. 1981;99:1281-1287.
20. Aboalchamat B, Engelmann K, Bohnke M, Egli P, Bednarz J. Morphological and functional analysis of immortalized human corneal endothelial cells after transplantation. *Exp Eye Res*. 1999;69:547-553.

21. Engelmann K, Friedl P. Optimization of culture conditions for human corneal endothelial cells. *In Vitro Cell Dev Biol.* 1989;25:1065-1072.
22. Thuret G, Manissolle C, Herrag S, et al. Controlled study of the influence of storage medium type on endothelial assessment during corneal organ culture. *Br J Ophthalmol.* 2004;88:579-581.
23. Taylor MJ, Hunt CJ. Dual staining of corneal endothelium with trypan blue and alizarin red S: importance of pH for the dye-lake reaction. *Br J Ophthalmol.* 1981;65:815-819.
24. Gain P, Thuret G, Kodjikian L, et al. Automated tri-image analysis of stored corneal endothelium. *Br J Ophthalmol.* 2002;86:801-808.
25. Deb-Joardar N, Thuret G, Racine GA, et al. Standard microlithographic mosaics to assess endothelial cell counting methods by light microscopy in eye banks using organ culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006;47:4373-4377.
26. Deb-Joardar N, Thuret G, Gavet Y, et al. Reproducibility of endothelial assessment during corneal organ culture: comparison of a computer-assisted analyzer with manual methods. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007;48:2062-2067.
27. Deb-Joardar N, Thuret G, Zhao M, et al. Comparison of two semiautomated methods for evaluating endothelial cells of eye bank corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007;48:3077-3082.
28. Grindel JM, Jaworski T, Piraner O, Emanuele RM, Balasubramanian M. Distribution, metabolism, and excretion of a novel surface-active agent, purified poloxamer 188, in rats, dogs, and humans. *J Pharm Sci.* 2002;91:1936-1947.
29. Han YK, Kwon JW, Kim JS, et al. In vitro and in vivo study of lens refilling with poloxamer hydrogel. *Br J Ophthalmol.* 2003;87:1399-1402.
30. Steinhardt RA, Alderton JM. Poloxamer 188 enhances endothelial cell survival in bovine corneas in cold storage. *Cornea.* 2006;25:839-844.
31. Redbrake C, Salla S, Nilius R, Becker J, Reim M. A histochemical study of the distribution of dextran 500 in human corneas during organ culture. *Curr Eye Res.* 1997;16:405-411.
32. Crewe JM, Armitage WJ. Integrity of epithelium and endothelium in organ-cultured human corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001;42:1757-1761.
33. Muller LJ, Pels E, Vrensen GF. The effects of organ-culture on the density of keratocytes and collagen fibers in human corneas. *Cornea.* 2001;20:86-95.
34. Edelhauser HF. The balance between corneal transparency and edema: the Proctor Lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006;47:1754-1767.
35. Franco Benito M, Riano Granero M, Alfonso Sanchez J, et al. Cambios endoteliales en corneas procedentes de banco de ojos: estudio con microscopio electronico de barrido. *Arch Soc Esp Ophthalmol.* 1987;52:475-482.
36. Murphy C, Alvarado J, Juster R, Maglio M. Prenatal and postnatal cellularity of the human corneal endothelium: a quantitative histologic study. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1984;25:312-322.
37. Davies PD, Kirkham JB, Villanueva S. Surface ultrastructure of human donor corneal endothelium. *Trans Ophthalmol Soc UK.* 1976;96:96-104.
38. Gallagher BC. Primary cilia of the corneal endothelium. *Am J Anat.* 1980;159:475-484.
39. Doughty MJ. Changes in cell surface primary cilia and microvilli concurrent with measurements of fluid flow across the rabbit corneal endothelium ex vivo. *Tissue Cell.* 1998;30:634-643.
40. Sherrard ES. Interpretation of some specular microscopic images of insulted corneal endothelium by scanning electron microscopy. *Exp Eye Res.* 1984;39:685-699.
41. Nakaizumi H, Oishi T. Electron microscopic observation of the corneal endothelial cells after injection of antibiotics into the anterior chamber [in Japanese]. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi.* 1981;85:1104-1112.
42. Doughman DJ, Van Horn D, Harris JE, et al. Endothelium of the human organ cultured cornea: an electron microscopic study. *Trans Am Ophthalmol Soc.* 1973;71:304-324.
43. Holley GP, Alam A, Kiri A, Edelhauser HF. Effect of indocyanine green intraocular stain on human and rabbit corneal endothelial structure and viability: an in vitro study. *J Cataract Refract Surg.* 2002;28:1027-1033.
44. Green K. Corneal endothelial structure and function under normal and toxic conditions. *Cell Biol Rev.* 1991;25:169-207, 231-233.
45. Sperling S. Evaluation of the endothelium of human donor corneas by induced dilation of intercellular spaces and trypan blue. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 1986;224:428-434.
46. van Dooren BT, Beekhuis WH, Pels E. Biocompatibility of trypan blue with human corneal cells. *Arch Ophthalmol.* 2004;122:736-742.

### III.3. ARTICLE 3

## **Adaptation des banques de cornées à la préparation et à l'évaluation des greffons cornéens adaptés aux nouvelles techniques de greffe**

Gilles Thuret, Aurélien Pipparelli

*RéfleXions Ophtalmologiques 2007;108:25-29*

## Adaptation des banques de cornées à la préparation et à l'évaluation des greffons cornéens adaptés aux nouvelles techniques de greffe

GILLES THURET ET AURÉLIEN PIPPARELLI

Service d'ophtalmologie et Equipe d'Accueil «Biologie, Imagerie et Ingénierie de la Greffe de Cornée» BIIGC  
CHU de Saint-Etienne

Les 20 banques de cornées françaises réalisent au quotidien un travail exemplaire de conservation, d'évaluation et de cession des greffons cornéens partout sur le territoire. Le développement des greffes lamellaires nécessite des aménagements au fur et à mesure de l'apparition des techniques chirurgicales. Les banques de cornées vont progressivement faire évoluer leurs pratiques pour fournir les greffons les plus adaptés à chaque indication.

directement mesurables avant et après greffe. Ceux-ci permettent d'évaluer précisément la qualité du greffon. Ces paramètres conditionnent directement la transparence chez le receveur et la survie du greffon dans le temps. Parmi eux, deux paramètres sont primordiaux : la transparence au moment de la délivrance et la densité cellulaire endothéliale (DCE, exprimée en cellules/mm<sup>2</sup>).

### Introduction

Le renouveau, depuis quelques années, dans les techniques de greffes cornéennes lamellaires antérieures et l'apparition, plus récente encore, des greffes lamellaires postérieures, dite greffes endothéliales vont modifier le fonctionnement des banques de cornées françaises, comme elles ont commencé à le faire dans quelques centres pionniers. Rappelons que d'ors et déjà, la validation de tous les greffons est drastique et comprend un versant « sécurité microbiologique », sur lequel nous ne reviendrons pas dans cet article puisque les nouvelles techniques de greffe n'ont pas d'incidence sur cet aspect, et un versant « évaluation de la qualité du tissu » que nous développons ici. Les greffes lamellaires vont modifier dans un futur proche principalement deux aspects dans la pratique de toutes les banques de cornées. Dans un premier temps elles devront mettre en place des méthodes d'évaluation et de sélection des greffons en fonction du type de découpe envisagée. Dans un second temps, les banques pourraient fournir des cornées prédécoupées.

### Evaluation de la qualité des greffons

La greffe de cornée présente une opportunité pratiquement unique dans le monde de la transplantation. Du fait de sa transparence et de sa structure tissulaire relativement simple, elle présente en effet un nombre important de paramètres

### ■ Qualité endothéliale

La qualité intrinsèque d'un greffon est définie principalement par la DCE et dans une moindre mesure par la morphométrie (régularité de taille et de forme) des cellules endothéliales (CE). Elle conditionne en grande partie la survie du greffon dans le temps. Le grand recul acquis avec les receveurs de greffes perforantes a permis de démontrer sans équivoque qu'une perte endothéliale inexorable se produisait tout au long de la période postopératoire, à un rythme variable selon le délai (très rapide durant les premiers mois, rapide pendant les premières années puis beaucoup plus lent même en l'absence d'événements intercurrents) et selon l'indication chirurgicale (moindre chez le kératocône et le Fuchs, majeure dans les dystrophies bulleuses par exemple). La survenue de deux événements intercurrents (rejet et hypertonie) accélère encore cette perte cellulaire qui conduit souvent à terme à la perte de transparence par épuisement endothélial tardif. A ce stade la seule solution est le changement de greffon. Plusieurs études démontrent clairement que la DCE au moment de la greffe conditionne la survie dans le temps, les greffons les plus riches initialement étant ceux qui ont la plus grande probabilité de survie prolongée voire très prolongée.

Le problème semble encore plus aigu pour les greffes endothéliales puisque jusqu'à présent, toutes les techniques de découpes postérieures mécanisées ou manuelles, toutes les techniques d'introduction du greffon dans la chambre antérieure sont suspectées, plus ou moins fortement, de majorer le traumatisme endothélial par rapport à une greffe perforante. Le recul de la plupart des séries est encore limité et le nombre

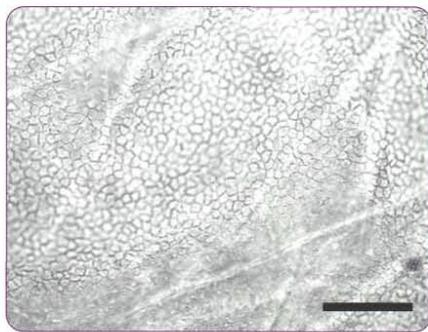


Figure 1 : Visualisation de l'endothélium d'un greffon sous microscope optique après 4 minutes d'exposition au NaCl 0,9%. Cette photo illustre la difficile tâche des banques de cornées pour déterminer la densité cellulaire endothéliale : les cellules n'ont pas toutes des contours bien définis, ne sont pas visibles dans tout le champ et le bruit de fond de l'image est important. (objectif x10. Barre = 200 µm)

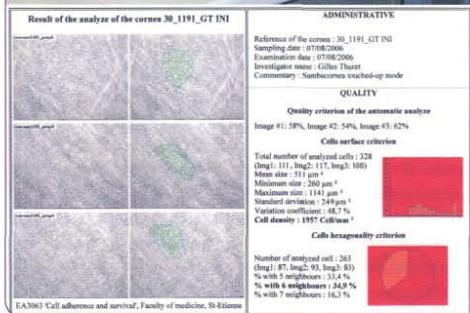
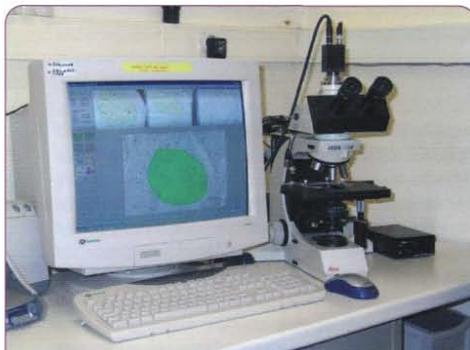


Figure 2 : Analyseur endothélial. Un microscope optique est équipé d'une caméra numérique. Les images endothéliales sont analysées par un logiciel dédié qui reconnaît les contours des cellules. La densité cellulaire endothéliale ainsi que la morphométrie cellulaire (coefficient de variation de la surface et pourcentage de cellules ayant 5, 6 et 7 voisins) servent à valider ou exclure le greffon.

de patients modeste. Les premières séries publiées font état de pertes endothéliales qui peuvent, dans certains cas, paraître modérées, comparables à celles de la greffe perforante mais qui demandent à être confirmées par d'autres séries et, parfois, avec une méthodologie plus adaptée (prise des photos et évaluation à l'aveugle de la technique de greffe au minimum, mesures de DCE par un comité de lecture indépendant au mieux).

Dans d'autres séries présentées lors de congrès internationaux, la perte endothéliale constatée paraît beaucoup plus importante que dans des séries de KP réalisées pour des receveurs similaires (Fuchs, Bulleuse du pseudophaque).

Enfin certains rapports publiés attestent malgré tout de cette perte endothéliale importante<sup>(1,2)</sup>. Les nombreux autres avantages présentés par les greffes endothéliales (meilleur respect de l'architecture cornéenne, astigmatisme réduit, récupération rapide, possibilité de greffe aisée, probable réduction des rejets) ne remettent pas en question cet aspect mais semble indiquer, côté banque, la **nécessité de sélectionner pour la greffe endothéliale les greffons les plus riches en CE (mais quel seuil ?)**.

Rappelons que les CE ne sont pas visibles spontanément au cours de la conservation des greffons en organoculture. Elles sont rendues visibles temporairement par exposition courte dans du chlorure de sodium isotonique (0,9%) qui, par effet osmotique dilate les espaces intercellulaires et fait apparaître les cellules sous un simple microscope optique (Figure 1).

L'observation des CE permet alors de déterminer la DCE par comptage d'un petit échantillon (quelques centaines de CE sur les 300 000 que contient une cornée) et en l'extrapolant. Depuis quelques années un accent particulier a été mis sur la nécessité de fiabiliser ce comptage dont le résultat est primordial pour qualifier ou détruire un greffon<sup>(3,4)</sup>.

Un seuil (2000 cellules/mm<sup>2</sup>) a été fixé empiriquement il y a près de 20 ans pour valider une cornée pour la greffe perforante. Il correspondait au meilleur rapport entre résultat clinique satisfaisant d'un côté et taux de destruction acceptable par les banques de l'autre. Abaisser le seuil reviendrait à faire courir le risque d'échec endothélial précoce. L'augmenter ferait courir le risque de pénurie de greffons par excès de destruction à la banque. On comprend l'importance de compter les CE avec une méthode calibrée, précise et reproductible (en un mot : validée).

Nous militons depuis plusieurs années, avec d'autres équipes, pour l'utilisation d'outils modernes d'imagerie (microscope + caméra numérique) et d'analyse d'image (logiciels dédiés)<sup>(5-11)</sup> (Figure 2). Ces analyseurs endothéliaux tendent à se généraliser aux dépens des comptages manuels. Ils contribuent de plus fortement à améliorer la traçabilité des analyses. Si une analyse endothéliale fiable est un pré requis indispensable pour valider les greffons perforants, son

importance paraît encore plus grande pour les greffons lamellaires postérieurs. L'utilisation d'un analyseur endothélial semble s'imposer pour les banques qui fournissent ou vont fournir des greffons endothéliaux.

#### ■ Evaluation expérimentale des méthodes de découpe postérieure

Des procédures d'évaluation *ex vivo* des différentes méthodes de découpe peuvent être réalisées avant de diffuser plus largement les techniques chirurgicales. Il est en effet possible de mesurer expérimentalement la toxicité endothéliale des manipulations imposées à la cornée en utilisant plusieurs techniques complémentaires. La DCE peut être précisément déterminée après coloration endothéliale au rouge alizarine, pour peu que l'on utilise un analyseur validé. Le comptage endothélial permet d'identifier les zones cellulaires franchement altérées mais ne donne aucune indication sur la viabilité cellulaire.

Notre laboratoire a récemment utilisé un test de viabilité cellulaire courant en biologie cellulaire pour l'adapter à l'étude de la totalité de la surface endothéliale d'un greffon. Cette triple coloration (Calceïne-Ethidium homodimère-Hoechst) permet de dénombrer l'ensemble des cellules (Hoechst +) et de distinguer les cellules mortes (Ethidium +) des cellules viables (Calceïne+). Elle permet également de mettre en évidence une population de cellules probablement lésées et vouées à la mort (Calceïne-/Ethidium-) (Figure 3).

La technique est simple et reproductible et a été optimisée par l'utilisation d'un microscope 3D et l'analyse d'image<sup>(12)</sup>. Cette analyse expérimentale (le greffon est détruit par la technique) permet ainsi d'évaluer très précisément le capital cellulaire endothélial réel du greffon prêt à l'emploi. Réalisée sur un nombre suffisant de greffons et en comparant, pour les deux cornées d'un même donneur, cornée découpée et cornée non découpée, elle permettra de connaître les effets délétères de chaque type de découpe pour orienter les choix chirurgicaux.

Une approche identique pourrait également parfaitement être réalisée pour évaluer ce capital restant après introduction du greffon dans la chambre antérieure, en mimant une chirurgie sur un œil animal, puis en ouvrant la chambre antérieure pour retirer le greffon et l'analyser immédiatement. Ces approches expérimentales visent à déterminer le **capital endothélial réellement greffé**. Elles devraient pouvoir expliquer une grande partie de la perte cellulaire mesurée en postopératoire précoce par la plupart des greffeurs actuels.

#### ■ Transparence

La transparence est évidemment la première caractéristique de la cornée. La délivrance d'un greffon « clair » est la priorité numéro 1. Cette nécessité d'évaluation n'est pas spécifi-

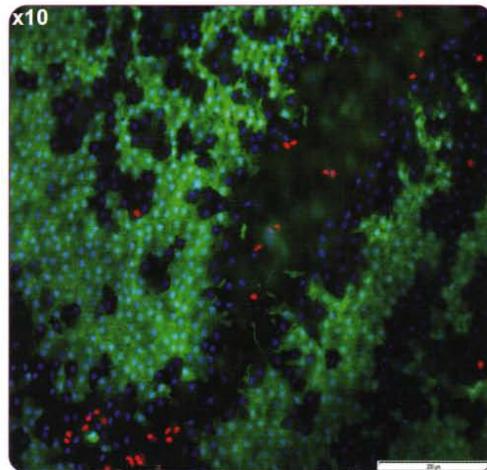


Figure 3 : Triple coloration endothéliale par Hoechst (bleu), Ethidium homodimère (rouge) et Calceïne (vert) d'un greffon ayant eu une découpe lamellaire postérieure. Tous les noyaux sont colorés en bleu. Les cellules vertes (C+) sont des cellules vivantes ayant une activité métabolique normale. Les cellules mortes ont un noyau rouge (E+) et n'ont pas d'activité métabolique (C-). Les cellules H+C-E- sont probablement déjà fortement lésées.

quement liée à l'émergence des nouvelles greffes lamellaires mais fait de toute façon partie des challenges à relever par les banques pour les années à venir. Elle pourrait également participer à la sélection des greffons, en permettant de réserver pour la greffe endothéliale les greffons à endothélium sain mais présentant des anomalies de transparence.

En pratique cependant, le contrôle de cette transparence pose plus de difficulté qu'il ne paraît. Plusieurs obstacles existent. L'évaluation au moment du prélèvement est peu fiable du fait des modifications post mortem non spécifiques : œdème épithélial de refroidissement, plis endothéliaux d'hypotonie, abrasions épithéliales mécaniques sans conséquence mais dégradant l'aspect du tissu sur le cadavre... Ce contrôle à la morgue permet d'éliminer uniquement les plus grosses anomalies, les préleveurs ayant d'ailleurs plutôt la consigne de prélever par excès pour ne pas se priver de cornées qui au final se révéleront parfaites. En France, le prélèvement exclusif de la collerette cornéosclérale et non du globe oculaire ne permet pas un contrôle à la lampe à fente comme cela se fait dans les banques de cornées de plusieurs autres pays européens (en particulier Pays Bas et Royaume Unis) lors de la réception des prélèvements. L'observation à la lampe à fente de la cornée immergée dans son milieu de conservation est très difficile car d'une part, le flacon commercialisé par le seul fournisseur français n'est pas adapté pour cette observation

et car d'autre part, le milieu contient un indicateur de pH coloré (rouge phénol). La troisième difficulté est de toute façon liée à l'expertise nécessaire pour reconnaître les anomalies cornéennes susceptibles d'influencer la transparence après greffe.

Au total et en pratique courante, la détection des anomalies de transparence se fait de manière subjective, à l'œil nu du technicien qui « mire » le greffon cornéen au travers du flacon. Aucune donnée quantitative n'est disponible. Le contrôle ultime est réalisé au bloc opératoire par le chirurgien. Les anomalies qu'il est souhaitable de détecter ne sont pas exceptionnelles : petites taches centrales sous épithéliales, dystrophies stromales aux stades initiaux, dystrophie crocodile sénile prononcée, séquelles de kératites (kératite en arbre mort des kératite de l'enfance, kératite interstitielle, petite disciforme métra herpétique...), incisions de kératotomies radiaires en sont les principales. Même si rares sont les cas rapportés dans la littérature, chaque équipe possède quelques exemples de greffes réalisées avec des greffons porteurs d'anomalies ayant échappées à tous les contrôles. Quelques solutions expérimentales ont été proposées dans la littérature au cours de la dernière décennie mais aucune n'a connu de développement concret. Notre équipe a développé un dispositif simple, spécifiquement adapté pour la quantification de la transparence des cornées conservées dans les banques (Figure 4). Ce dispositif, en cours de validation dans la banque de cornée de Saint-Etienne (Etablissement Français du Sang

Auvergne/Loire), est basé sur l'analyse d'image d'une mire spécifique visualisée à travers le greffon (13). Il fournit une évaluation objective et reproductible de la transparence ainsi que des mesures précises utiles pour par exemple sélectionner les collerettes suffisamment larges pour être fixées sur une chambre artificielle de découpe. Il offre d'autre part une traçabilité indispensable dans les banques. Il devrait permettre de détecter les anomalies citées ci-dessus et de **classer les cornées pour faciliter leur sélection en fonction des indications et des techniques envisagées**. Il sera alors facile de réserver celles qui sont objectivement les moins transparentes pour les greffes endothéliales.

### Sélection des greffons en fonction des techniques, des indications et des receveurs

Le perfectionnement des méthodes d'analyse des greffons cornéens devrait permettre dans un avenir assez proche une véritable sélection des cornées pour les orienter vers des receveurs particuliers en fonction de l'indication chirurgicale et du type de greffe envisagée, perforante, lamellaire antérieure ou postérieure. Les cornées à large collerette sont certaines de pouvoir bien être fixée sur les chambres artificielles de découpe. Les cornées ayant l'endothélium le plus riche pourraient être sélectionnées en priorité pour les greffes endothéliales de même que celles présentant un endothélium sain mais un défaut de transparence.

A l'opposé, la transparence devient le seul critère à prendre en compte pour les greffes lamellaires antérieures. Un endothélium ayant une DCE inférieure à 2000 cell/mm<sup>2</sup> peut être réservé à cette découpe permettant ainsi d'utiliser des greffons habituellement détruits car inaptes à la greffe perforante. Il faut cependant prévoir alors un greffon de secours... en cas de perforation Descemetique lors de la préparation du lit receveur. Certains auteurs ont même présenté l'utilisation de la même cornée pour greffer 2 patients en lamellaire antérieure et postérieure. Les greffons destinés à la greffe perforante doivent, quant à eux, avoir toutes les qualités à la fois !

Il apparaît évident à travers ces exemples que la cohabitation des 3 types de greffe dans un même centre oblige à repenser l'organisation de la banque de cornée, non seulement en terme d'expertise des greffons, de sélection mais aussi en terme de distribution aux chirurgiens.

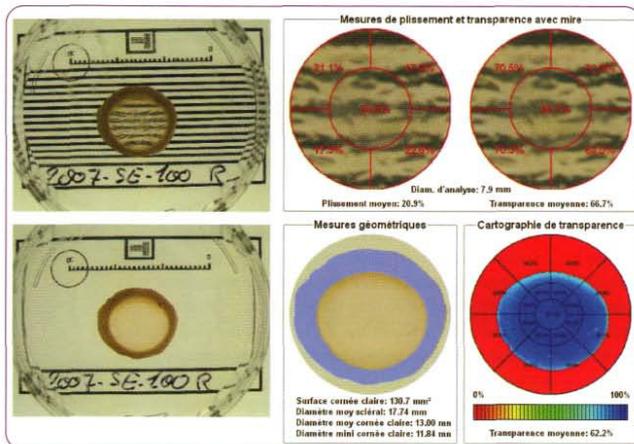


Figure 4 : Exemple de rapport d'analyse de la transparence d'un greffon par analyse d'image combinant l'analyse d'une image de la cornée photographiée sur une mire calibrée et rétro éclairée et celle d'une image sans mire. Le logiciel, en cours de validation dans un Projet Hospitalier de Recherche au CHU de Saint-Etienne (Pr P Gain, Pr J Maugery) permet de quantifier objectivement transparence et plissement (données en unité arbitraire) dans le centre de la cornée. Il fournit le diamètre de la scière et détecte le gérontoxon.

## ● ● ● ● ● Découpes cornéennes à la banque de cornée

Ce dernier aspect dans l'adaptation des banques aux greffes lamellaires appartient à un futur plus lointain. La délivrance en routine de greffons prédécoupés nécessitera en effet de franchir plusieurs obstacles scientifiques, médicaux et administratifs. Les objectifs de ces découpes sont multiples : stabiliser et standardiser les techniques, évaluer la qualité de la découpe elle-même et du tissu après découpe, fournir des greffons « ready to graft », de qualité connue, à tous les chirurgiens pour permettre, si cela s'avérait souhaitable, de diffuser ces techniques à des centres chirurgicaux dépourvus de dispositifs de découpe onéreux (chambres artificielles, microkératomes, instrumentation spécifique).

La découpe pour greffe lamellaire antérieure pose en théorie peu de problème et pourrait être envisagée à la banque à l'épaisseur souhaitée. Il faudra cependant déterminer expérimentalement les conditions optimales de découpe (greffon libre ou repositionner dans son lit cornéen résiduel), de délai entre découpe et greffe et de milieu de conservation. En effet, une section horizontale dans le stroma s'accompagne obligatoirement d'un œdème plus important si le greffon est immergé de nouveau dans son milieu que s'il est greffé immédiatement. En cas de greffon de pleine épaisseur dont seule l'endothéliodescemet est retirée, la réalisation de la manœuvre à la banque de cornée présente moins d'intérêt car le geste est de réalisation aisée au bloc opératoire.

La préparation de greffons endothéliaux représente un véritable défi pour les banques. Il faut là encore trouver la meilleure

technique de découpe ou de dissection. Cette technique devra probablement être un compromis entre finesse du stroma résiduel pour éviter les interfaces délétères et préservation endothéliale maximale. Là encore, tout reste à inventer. Il semble possible de préserver un greffon endothélial quelques jours en organoculture mais l'impact réel d'une découpe suivie d'une conservation, d'un transport et d'une greffe devra être évalué précisément avant que la technique ne puisse être diffusée.

Enfin, pour conclure il faut envisager, à bien plus longue échéance cette fois, la possibilité de distribuer des greffons endothéliaux prédécoupés et dont l'endothélium aura en plus été enrichi par des techniques de biologie cellulaire de relance contrôlée du cycle cellulaire endothélial...

En pratique, les banques répondent à un cahier des charges déjà extrêmement lourd et nos demandes chirurgicales doivent rester raisonnables. Tout changement de pratique impose de modifier les « procédés » en vigueur dans la banque, de les soumettre à l'autorité de santé compétente (AFSSAPS) pour être validés. Aussi convient-il certainement de ne proposer que les protocoles ayant déjà été bien évalués en amont au cours de travaux de recherche et/ou rapportés dans des essais de bon niveau de preuve. De façon concrète, la préparation spécifique de greffons prédécoupés pour greffe lamellaire devra très probablement d'abord être validés dans quelques centres pilotes ayant la maîtrise de l'ensemble des éléments, depuis le prélèvement jusqu'au suivi des premiers patients greffés. Il nous paraît indispensable de trouver le bon équilibre entre immobilisme et précipitation. Il existe des précédents en ophtalmologie (LCA et dystrophies bulleuses, encore dans le trio de tête des indications de greffe cornéenne en France) pour nous inciter à la prudence. ■

## RÉFÉRENCES

1. Terry MA, Wall JM, Hoar KL, Ousley PI. A prospective study of endothelial cell loss during the 2 years after deep lamellar endothelial keratoplasty. *Ophthalmology*. 2007;114:631-39.
2. Mearza AA, Qureshi MA, Rostron CK. Experience and 12-month results of descemet-stripping endothelial keratoplasty (DSEK) with a small-incision technique. *Cornea*. 2007;26:279-83.
3. Thuret G, Manissolle C, Acquart S, Petit JC, Maugery J, Campos-Guyotat L, Doughty MJ, Gain P. Is manual counting of corneal endothelial cell density in eye banks still acceptable? The French experience. *Br J Ophthalmol*. 2003;87:1481-1486.
4. Thuret G, Manissolle C, Acquart S, Garraud O, Campos-Guyotat L, Maugery J, Gain P. Urgent need for normalization of corneal graft quality controls in French eye banks. *Transplantation*. 2004;78:1299-1302.
5. Gain P, Thuret G, Kodjikian L, Gavet Y, Turc PH, Theillere C, Acquart S, Le Petit JC, Maugery J, Campos L. Automated tri-image analysis of stored corneal endothelium. *Br J Ophthalmol*. 2002;86:801-8.
6. Ruggeri A, Grisan E, Jaroszewski J. A new system for the automatic estimation of endothelial cell density in donor corneas. *Br J Ophthalmol*. 2005;89:306-311.
7. Deb-Joardar N, Thuret G, Racine GA, Pons D, Brun G, Parriaux O, Peoc'h M, Acquart S, Gain P. Standard microlithographic mosaics to assess endothelial cell counting methods by light microscopy in eye banks using organ culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006;47:4373-7.
8. Deb-Joardar N, Thuret G, Gavet Y, Acquart S, Garraud O, Egelhoffer H, Gain P. Reproducibility of endothelial assessment during corneal organ culture: comparison of a computer-assisted analyzer with manual methods. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007;48:2062-7.
9. Ruggeri A, Grisan E, Schroeter J. Evaluation of repeatability for the automatic estimation of endothelial cell density in donor corneas. *Br J Ophthalmol*. 2007;91:1213-5.
10. Deb-Joardar N, Thuret G, Zhao M, Acquart S, Peoc'h M, Garraud O, Gain P. Comparison of two semiautomated methods for evaluating endothelial cells of eye bank corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007;48:3077-82.
11. Hirneiss C, Schumann RG, Gruterich M, Welge-Lüssen UC, Kampik A, Neubauer AS. Endothelial cell density in donor corneas: a comparison of automatic software programs with manual counting. *Cornea*. 2007;26:80-83.
12. Pipparelli A, Duband S, Zhao M, Piselli S, Muraine M, Dumollard JM, Peoc'h M, Prades J, Acquart S, Thuret G, Gain P. Evaluation expérimentale de la viabilité endothéliale cornéenne par triple marquage Hoechst 33342, éthidium homodimère et calcéine-AM (HEC) : améliorations techniques par microscopie 3D. *Communication orale*. Société Française d'Ophtalmologie Paris, 2007.
13. Deb-Joardar N, Thuret G, Gavet Y, Zhao M, Manissolle C, Acquart S, Garraud O, Pinali JC, Maugery J, Gain P. Back lit chart to simply assess the transparency and folding of corneas during organ culture. *Oral communication XVIIIth annual meeting of the European Eye Bank Association Venice, Italy, EEBA, 2006, p. 41*

#### III.4. ARTICLE 4

## **Starting the Zebrafish Pineal Circadian Clock with a Single Photic Transition**

**Robin Vuilleumier, Laurence Besseau, Gilles Boeuf, Aurélien Pipparelli, Yoav Gothilf, Walter G. Gehring, David C Klein and Jack Falcón**

***Endocrinology 2006;147:2273-2279***

## Starting the Zebrafish Pineal Circadian Clock with a Single Photic Transition

Robin Vuilleumier, Laurence Besseau, Gilles Boeuf, Aurélien Piparelli, Yoav Gothilf, Walter G. Gehring, David C. Klein, and Jack Falcón

Laboratoire Aragó (R.V., L.B., G.B., A.P., J.F.), Observatoire Océanologique de Banyuls, Centre National de la Recherche Scientifique Unité Mixte de Recherche 7628, Université de Paris VI, 66651 Banyuls/Mer-Cédex, France; Biozentrum (R.V., W.G.G.), University of Basel, Cell and Developmental Biology, Basel 4056, Switzerland; Section on Neuroendocrinology (D.C.K.), Office of the Scientific Director, National Institute of Child Health and Human Development, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland 20892-4480; and Department of Zoology (Y.G.), The George S. Wise Faculty of Life Sciences, Tel Aviv University, Tel Aviv 69978, Israel

The issue of what starts the circadian clock ticking was addressed by studying the developmental appearance of the daily rhythm in the expression of two genes in the zebrafish pineal gland that are part of the circadian clock system. One encodes the photopigment exorhodopsin and the other the melatonin synthesizing enzyme arylalkylamine *N*-acetyltransferase (AANAT2). Significant daily rhythms in AANAT2 mRNA abundance were detectable for several days after fertilization in animals maintained in a normal or reversed lighting cycle providing 12 h of light and 12 h of dark. In contrast, these rhythms do not develop if animals are maintained in

constant lighting or constant darkness from fertilization. In contrast to exorhodopsin, rhythmicity of AANAT2 can be initiated by a pulse of light against a background of constant darkness, by a pulse of darkness against a background of constant lighting, or by single light-to-dark or dark-to-light transitions. Accordingly, these studies indicate that circadian clock function in the zebrafish pineal gland can be initiated by minimal photic cues, and that single photic transitions can be used as an experimental tool to dissect the mechanism that starts the circadian clock in the pineal gland. (*Endocrinology* 147: 2273–2279, 2006)

LIFE ON EARTH is characterized by a 24-h pattern of activity, reflecting the solar day. In essentially all forms, these rhythms are not directly controlled by the light/dark cycle, but reflect the action of an endogenous timing mechanism—the circadian clock—which exhibits an approximately 24-h period. In addition, mechanisms exist through which the environmental lighting cycle synchronizes circadian rhythms with light-to-dark and dark-to-light transitions.

In contrast to the significant progress made in understanding the molecular basis of circadian clocks and how light acts on the clock (1, 2), scant progress has been made in understanding the fundamental question of what initially starts the clock—ticking—as defined by producing a coordinated output signal—and whether a photic perturbation is required. This issue is of interest and importance in view of the fundamental role that circadian rhythms play in biology.

The question of whether the vertebrate circadian clock function develops autonomously or requires an external trigger has been investigated in zebrafish, at the molecular, physiological, and behavioral levels. This has generated conflicting results. For example, studies on the transcription factor *zPer3*, a component of the circadian clock machinery, are at odds: expression was reported to oscillate under constant

darkness (DD) by one group (3) but not by another using transgenic embryos expressing luciferase under control of the *zPer3* promoter (4). It is clear that conclusions regarding clock function cannot be based on observations of *zPer3* expression alone because *zPer3* is just one among other components of the clock machinery; accordingly, it may not be a reliable indicator of the functional state of the clock. Other approaches in which physiological and behavioral endpoints have been used are also problematical because the endpoints are a reflection of factors other than clock development, including downstream processes and the mechanisms linking the two (5, 6). Accordingly, studies using these systems may not provide an entirely reliable indication of clock function.

An experimental approach that circumvents these limitations is the measurement of arylalkylamine *N*-acetyltransferase (AANAT2) mRNA in the fish pineal organ. The pineal organ is generally considered a master circadian clock in fish and is of special experimental value because each pinealocyte contains all elements of a circadian system—a photoreceptor, a clock, and an output (7), *i.e.* mRNA encoded by the zebrafish (*zf*)AANAT2 gene. *Aanat* encodes the next-to-last enzyme in vertebrate melatonin synthesis and *zfAANAT2* expression in the adult is controlled by integral elements of the molecular circadian clock, thereby providing a reliable marker of clock function (8–11). In addition, measurement of *zfAANAT2* mRNA, is superior to the measurement of melatonin release from intact embryonic zebrafish, which has been used to study clock function (5), because melatonin synthesis is regulated not only by the clock, but also by a

First Published Online February 23, 2006

Abbreviations: AANAT2, Arylalkylamine *N*-acetyltransferase; DD, constant darkness; dpf, days post fertilization; ExR, exorhodopsin; LD, light/dark; LL, constant light; zf, zebrafish.

*Endocrinology* is published monthly by The Endocrine Society (<http://www.endo-society.org>), the foremost professional society serving the endocrine community.

down-stream gating mechanism through which light acts to rapidly switch off melatonin production, without necessarily having immediate effects on clock function. As a result, it is not possible to study clock function in constant light, because light masks the output. However, measurement of *zfANAT2* mRNA eliminates this limitation because light does not have an immediate effect on this parameter.

In the current study, we have examined the relationship between lighting and the rhythmic expression of *zfANAT2* and of another clock-related gene, *exorhodopsin (ExR)*, which encodes the photopigment thought to mediate photic control of the pineal clock (12). Our experiments addressed the issue of whether minimal photic perturbations can initiate circadian expression of each of these genes in the embryonic zebrafish pineal gland. Previous studies raised this possibility, because *zfANAT2* mRNA transiently increased after exposure to a single 1-h light pulse against a background of constant darkness (12). The nature of the controlling mechanism was investigated here, to determine whether this increase was a transient one-time response to the light pulse (13) or represented the initiation of a circadian rhythm. The results establish that circadian rhythmicity is initiated by a single light pulse and extend this finding by revealing that rhythmicity can also be initiated by a single dark pulse or by single photic transitions (light-to-dark: L→D, or dark-to-light: D→L). Moreover, our findings indicate that clock function is initiated before the retina can detect light and at a time when the pinealocyte is anatomically immature.

## Materials and Methods

### Animals

Adult zebrafish were kept at 28.5°C on a light/dark (LD) cycle (12 h light, 12 h dark). Light was provided by fluorescent lamps ( $\lambda = 400\text{--}700$  nm; Nominal TX Universal aquarium lamps (IRC70-Lumen/W70), Actizoo, Beaufort La Vallée, France); the intensity at tank level was 5000 lux. Fertilized eggs were usually obtained in the morning shortly after lights on. They were incubated at the same temperature and under the indicated photoperiodic conditions (see *Results* and figure legends). Embryos were collected at different developmental stages. Dark samples were maintained in the dark until time of collection; dim red light used for night collections was provided by 230V/15W red bulbs (PF712E; Philips, Suresnes, France), with an intensity not exceeding 6 lux at the level of the embryos.

For the whole-mount *in situ* hybridization, pigmentation of the embryos was prevented by addition of 0.2 mM phenylthiourea to the egg water at 24 h post fertilization (hpf).

Animal experimentation was conducted in accord with accepted standards of humane animal care (principles set out in the Declaration of Helsinki).

### Whole-mount *in situ* hybridization

At the end of the incubation time, embryos were fixed overnight in 4% paraformaldehyde in PBS at 4°C, transferred to 100% methanol, and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Whole-mount *in situ* hybridization was performed using commercially available kits according to the manufacturer's instructions (Roche, Meylan, France) (11, 14). Sense and antisense digoxigenin-labeled *zfANAT2* riboprobes corresponding to a 900-bp cDNA of *zfANAT2* (GenBank accession no. AF124756) were generated as described (11). The digoxigenin-labeled *zfExR* probes were generated from a fragment corresponding to bp 28–602 from *zfExR* (GenBank accession no. AB025312) inserted in the Topo vector (Invitrogen, Meylan, France). All probes (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) were hybridized at a temperature of 68°C, and detection was performed using alkaline phosphatase-conjugated antidigoxigenin an-

tibodies, and using alkaline phosphatase substrate (Roche, Meylan, France). For each embryo, intensity of the staining was submitted to triple evaluation by three independent observers, within a scale of 0 (no staining at all) to 4 (highest signal intensity) (3). Preliminary studies indicated that densitometry measurements on black and white photomicrographs gave similar results as also shown elsewhere (11).

Statistics and data plotting were performed using the Instat-3 and PRISM-4 softwares (GraphPad). Each time point included five to 10 individuals, and all embryos from a given experiment were treated simultaneously. Data are presented as the mean  $\pm$  SEM; they were analyzed by one-way or two-way ANOVA. One-way-ANOVA was followed, when significant, by Tukey's *post hoc* comparison of means (for convenience, only a comparison of the higher and lower means are reported in the legend of the figures). Experiments were repeated at least twice, each on different days. Pictures were obtained using a C-35AD-2 Olympus camera on a BH-2 Olympus microscope (Rungis, France).

### Electron microscopy

Embryos and larvae were sampled at 22, 48, and 72 hpf and 11 d post fertilization (dpf), and fixed for 2 h in 4% glutaraldehyde/2% paraformaldehyde, in 0.1 M phosphate buffer (PB) pH 7.4. After a brief rinsing in PB, they were postfixed in 1% osmium tetroxide for 1 h at room temperature. After rinsing in PB, all specimens were dehydrated in a graded ethanol series and embedded in araldite. Ultra-thin (50–70 nm thick) sections made on the pineal area were stained with 7% uranyl acetate in methanol, and contrasted with lead citrate (15). Sections were viewed and photographed on a Hitachi 7500 transmission electron microscope (Elescience, Verrières, France).

## Results

### Appearance of photoreceptor characteristics in developing pinealocytes

The embryonic pineal organ expresses *ZfExR* starting at 18 hpf (Fig. 1A). The area of *ExR* expression becomes larger at 24 hpf (Fig. 1B). Expression is limited to the pineal organ until 72 hpf (Fig. 1, C–E); at 96 hpf weak expression occurs in the ventral retina (Fig. 1F) at the level of the photoreceptor layer (Fig. 1, G and H).

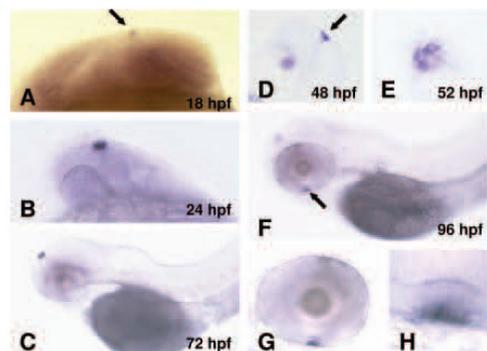


FIG. 1. Localization of *ExR* expression in the developing zebrafish embryo. *ExR* mRNA was visualized using *in situ* hybridization as indicated in *Materials and Methods*. A–E, With the antisense probe, a specific expression is evidenced in the pineal organ, which appears as a spot located dorsally of the embryo's head as early as 18 hpf (arrow in A). At higher stages, i.e. from 24 (B) to 72 (C) hpf, the spot appears located dorsally (D) in the midline of the head, between the eyes. E, Dorsal view of an embryo's pineal spot at 52 hpf; a few individual labeled cells are seen. F–H, At later stages, some expression also appears in the ventral retina as shown by the arrow in F. G and H, Higher magnifications of the labeled retina in F. The yolk in C and F shows weak nonspecific staining.

Electron microscopic examination revealed that the initial *zfExR* expression (18 hpf) is accompanied by the appearance of two defining structural characteristics of photoreceptors, centrosomes and  $[2 \times 9 + 0]$  ciliary structures (Fig. 2A); a third feature of photoreceptors, the extensive infoldings of plasma membranes, first becomes obvious at 48 hpf (Fig. 2B).

*Rhythmic expression of zfExR and zfaANAT2 develops in LD but not in constant light (LL) and DD*

*zfExR* and *zfaANAT2* mRNAs were studied in parallel as a function of environmental lighting. Daily rhythms in both were detected in LD, but were only statistically significant for *zfaANAT2*; rhythmic changes in these mRNAs were not apparent in LL or DD (Fig. 3).

*Circadian rhythmicity of zfaANAT2 is maintained following LD cycles or a single dark pulse*

*zfaANAT2* was expressed rhythmically for at least 24 h in LL, if animals were first exposed to either two 12:12 LD (not shown) or two DL (Fig. 4) cycles. It was also found that rhythmicity was induced in LL after a single dark pulse applied at 24 hpf, and that the phase of the circadian rhythm was a function of pulse duration (Fig. 5). The finding that the *zfaANAT2* mRNA rhythm persists for two cycles, and with similar amplitude, strengthens the idea that this represents

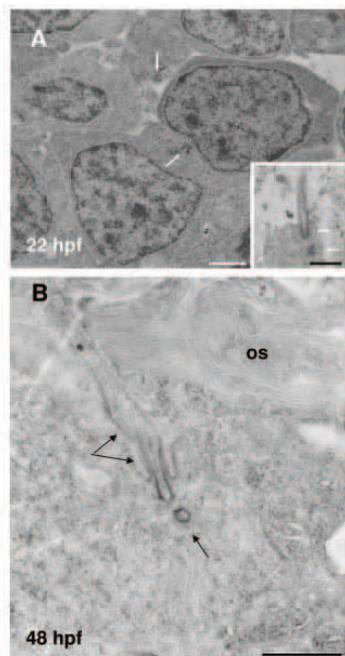


FIG. 2. Ultrastructure of zebrafish pineal photoreceptor cells at early stages of development. A, At 22 hpf, the pineal cells show little signs of differentiation, except the cilia of the  $9 \times 2 + 0$  type and the associated centrosome (arrows and inset). B, At 48 hpf, photoreceptors are fully differentiated, and the well developed outer segment (OS) arises from the cilia (arrows). Bars, 1  $\mu$ m.

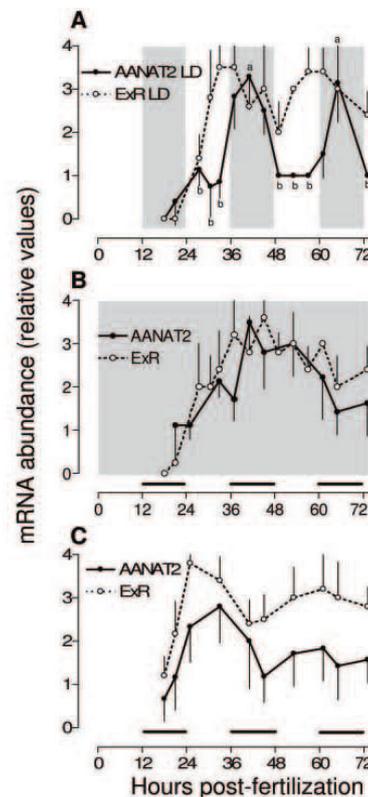


FIG. 3. *zfExR* and *zfaANAT2* mRNA abundance under LD, DD, and LL conditions. Embryos were kept at 28.5 C under either a 12:12 LD cycle (A), DD (B) or LL (C). The gray boxes correspond to the dark phases (which are the same as those of the embryos genitors in A). The black bars at the bottom (in B and C) indicate the subjective dark phases (dark phases of the genitors). Embryos were collected at the times indicated and processed for the *in situ* hybridization; mRNA abundance was estimated as indicated in *Materials and Methods*. Mean  $\pm$  SEM (n = 7–10). Zero in the abscissa corresponds to 0800 h (time of fertilization). One-way ANOVA indicated that *AANAT2* mRNA abundance did not vary significantly under DD or LL. However, significant changes occurred under LD ( $P < 0.0003$ ); a, significantly different from b (Tukey's *post hoc* comparison of means,  $P < 0.05$ ). Differences in *ExR* mRNA abundance were not statistically significant under any of the conditions tested. Similar results were obtained in two other experiments.

a true circadian rhythm, rather than a one-time transient response.

*Photoc pulses initiate circadian rhythmicity of zfaANAT2*

The above experiment used a dark pulse against an LL background. Similarly, a light pulse (1–8 h) against a DD background induced circadian expression of *zfaANAT2* (Fig. 6); the phases of the subsequent oscillations were similar, independent of the pulse duration. However, variations induced by the 1-h pulse were not significant and of lower amplitude than those obtained with the 2- or 8-h pulses.

Conversely, the appearance of the peak in *AANAT* mRNA abundance depended on the time at which the pulse was

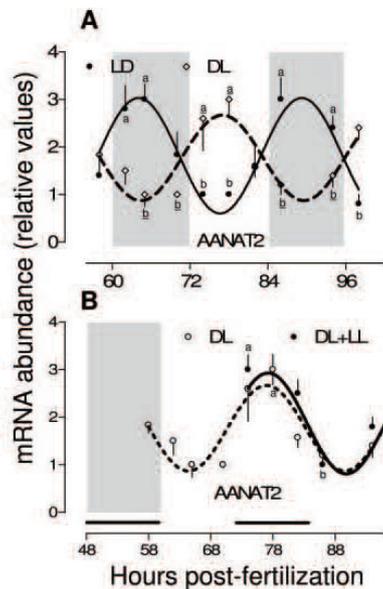


FIG. 4. zfAANAT2 mRNA abundance under a reversed DL cycle (A) followed by constant light (B). A, Embryos were placed under a LD cycle (controls; *solid line*) or a reversed DL cycle (DL; *dashed line*) from fertilization. B, An initial DL cycle was followed by LL at 60 hpf (*solid line*); the controls (*dashed line*) were maintained under DL (same as DL cycle in A). The gray panels correspond to the dark phases. Embryos were collected at the times indicated and processed as in Fig. 3. Mean  $\pm$  SEM ( $n = 7-10$ ). The data fitted a sinusoid; in each curve the variations in mRNA abundance were statistically significant (one-way ANOVA:  $P < 0.005$  or below). a, Significantly different from b; a, significantly different from b (Tukey's *post hoc* comparison of means,  $P < 0.05$ ). Similar results were obtained in two other experiments.

applied. Thus, 4-h pulses of light applied at successive points during the 20- to 46-hpf period induced corresponding delays in peak appearance (Fig. 7).

#### Single photic transitions (D→L or L→D) initiate circadian rhythmicity of zfAANAT2

The above photic perturbations involve two photic transitions, L→D at the start and D→L at the end of the dark pulse. It was also found that a single cue initiated clock function when the D→L transition occurred at 21 hpf or later (Fig. 8, A–E). In a reversed experiment, embryos were raised under LL and then switched to DD; this initiated circadian oscillations when the L→D transition occurred at 21 hpf or later (Fig. 8A'–E').

#### zfExR expression is not circadian

The expression of zfExR was examined in all the experiments described above. However, statistically significant rhythmic expression of zfExR did not occur.

### Discussion

One of the advances of this study is finding that elements of the three functional components of circadian clock system

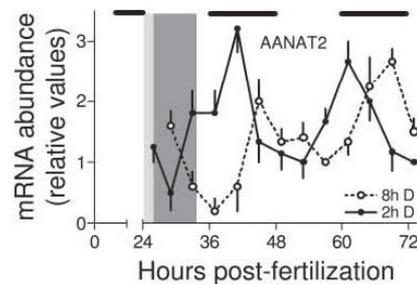
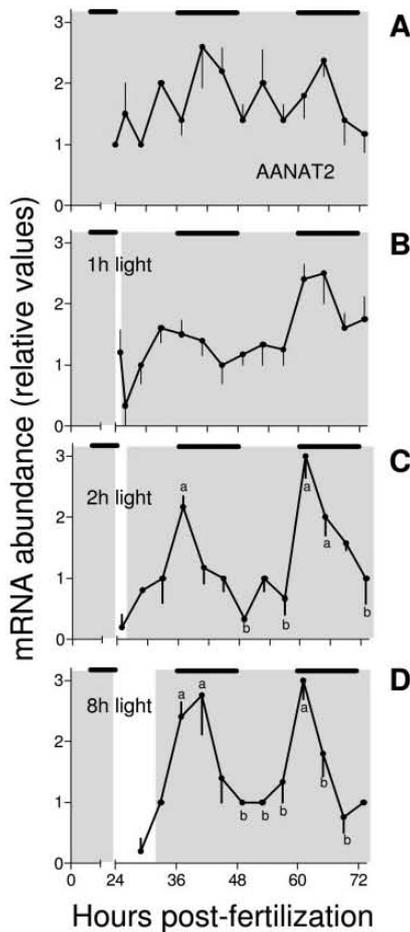


FIG. 5. Effects of dark stimuli of different durations on zfAANAT2 mRNA abundance in embryos maintained under LL. Embryos were maintained under LL from fertilization; a dark stimulus of 2 (*light gray, solid line*) or 8 h (*dark gray, dashed line*) duration was applied at 24 hpf, as indicated. Embryos were then processed as indicated in Fig. 3. The *black bars at the top* of each column indicate the subjective dark phases (dark phases of the genitors). Mean  $\pm$  SEM ( $n = 7-10$ ). In each curve, the observed variations in mRNA abundance were statistically significant as indicated by the one-way ANOVA analysis ( $P < 0.005$ ); Tukey's *post hoc* comparison of individual means indicated that peak and nadir values differed from each other ( $P < 0.05$ ). Pulse duration affected significantly the shape of the oscillations, as indicated by a two-way ANOVA comparison of the data ( $P < 0.0008$ ). The 0 in the abscissa indicates time of fertilization (0800 h). Similar results were obtained in a second experiment.

in the zebrafish pineal organ—photodetection, clock function and output—appear to be in place at the end of 1 dpf. This is coincident with the appearance of the first pinealofugal nerve fibers (19 hpf) (16). It is of interest to note that at this point in development, pinealocytes appear to be anatomically immature compared with those observed d 2 (this study) or 6 dpf (17). At 24 hpf they lack the defining feature that characterizes the adult pinealocyte—distinct photoreceptor outer segments—while containing the characteristic  $2 \times 9 + 0$  cilia from which the outer segments develop (17–19). The expression of zfExR at 1 dpf is likely to explain pinealocyte photosensitivity at this stage. Accordingly, it appears that at 1 dpf, when the pinealocyte is not anatomically mature, it is fully capable of functioning as a complete circadian system, capable of responding to light. The interpretation that at this stage of development light acts indirectly on the pineal gland through another structure is less attractive because it assumes a developmental extrinsic→intrinsic switch in how light regulates the pineal circadian clock.

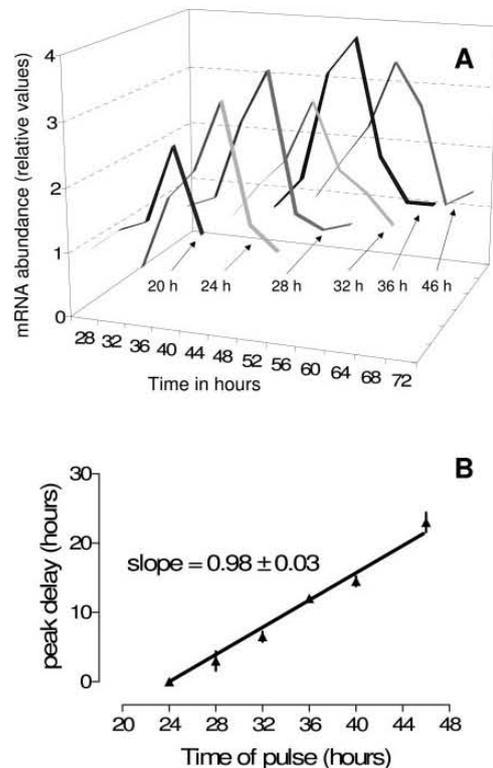
Our results also provide additional support to the view that fish pineal photoreceptors develop before retinal photoreceptors (20). Specifically, at 24 and 48 hpf, photoreceptor features were not evident in the zebrafish retina (data not shown). The first rudiments of retinal photoreceptor outer segments are not observable before 54 hpf (21), whereas the initial retinal expression of an opsin gene is not seen before 40 hpf (22). It is, however, not impossible that other pigments function during this period of time in the retina. We also detected zfExR expression at 4 dpf in the ventral retina, as has been described for *Aanat2* (detectable at 3 dpf) (11), indicating that retinal zfExR expression is developmentally transient (11). In contrast to the 4 dpf retinal expression of zfExR, pineal expression was detectable at 24 hpf, when structural features of photoreceptors were also apparent. Earlier development of pineal photoreceptors relative to that



**FIG. 6.** Effects of light pulses of different duration on AANAT2 mRNA abundance in embryos maintained under constant darkness (DD). Embryos were maintained under DD (A) from fertilization and a light pulse of 1 (B), 2 (C) or 8 (D) h was applied at 24 hpf, as indicated. They were then processed as indicated in Fig. 3. The *black bars* at the top indicate the subjective dark phases (dark phases of the genitors). The *gray panels* indicate darkness for the embryos. Mean  $\pm$  SEM ( $n = 7-10$ ). The 0 in the abscissa indicates time of fertilization (0800 h). One-way ANOVA indicated that the variations in mRNA abundance were statistically significant only in C (2-h light pulse) and D (8-h light pulse) ( $P < 0.0001$ ). a, Significantly different from b (Tukey's *post hoc* comparison of means,  $P < 0.05$ ). Two-way ANOVA indicated that the 2-h and 8-h light pulses curves were significantly different from the DD curves ( $P < 0.01$ ), but the duration of the pulse (2 h vs. 8 h) had no significant effect ( $P < 0.7$ ). Similar results were obtained in another experiment.

of retinal photoreceptors is intriguing, because similar transcription factors control expression of the same or closely related genes in each tissue. It will be of interest to determine the molecular basis of this temporal difference.

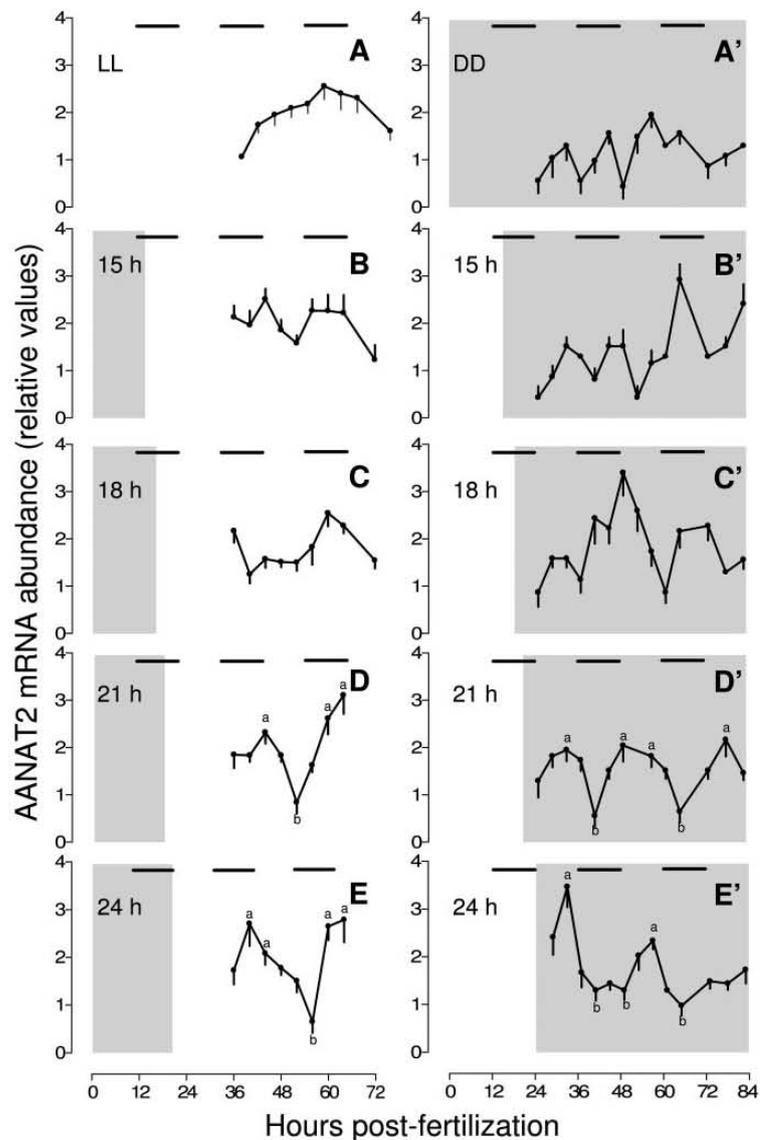
Previous observations have been interpreted to indicate that the nocturnal increase in *zfaANAT2* mRNA abundance is itself triggered by light-induced expression of *zfpPer2* (13). If this were the only condition, however, one would expect



**FIG. 7.** Effects of light pulses applied at different post-fertilization times on the circadian expression of AANAT2 mRNA abundance in embryos maintained under DD. A, Embryos were maintained under DD from fertilization. A 4-h light pulse was applied at 24, 28, 32, 36, 40, or 46 hpf as indicated; embryos were collected shortly after at different time intervals and processed as indicated in Fig. 3. Mean  $\pm$  SEM ( $n = 5-10$ ); *error bars* are not shown for clarity of the graph. ANOVA indicated that the variations in mRNA abundance differ significantly in all curves ( $P < 0.0001$ ); in each curve, Tukey's *post hoc* comparison of means indicated that the peak values were different from the nadir values ( $P < 0.001$ ). B, Data are replotted from those presented in A. There is strict correlation between the times at which the light pulses are applied (abscissa) and the corresponding phase delays in peak appearance reported in the ordinates (time of peak appearance minus time of peak obtained with the first pulse of light).

an increase in *zfaANAT2* expression to occur under LL once the pineal becomes activated, *i.e.* between 18 and 24 hpf. This was not observed, *i.e.* neither a surge, nor endogenous oscillations in *Aanat2* expression, was observed in embryos raised under LL from birth. Accordingly, it would appear more accurate to conclude that the embryos also needed to experience both dark and a photic transition. This is supported by the finding that circadian oscillations in *zfaANAT2* expression occurred under LL provided the embryos were previously exposed to an LD or DL cycle. Moreover, a single transition from DD to LL, or LL to DD, initiated circadian oscillations in *zfaANAT2*, providing that this transition occurred at 21 hpf or later. This is consistent with the proposal that exposure to both light and darkness is necessary to initiate pineal clock function. However, it is not yet clear

FIG. 8. Effects of dark-to-light and light-to-dark transitions on AANAT2 mRNA abundance. A–E, Embryos were maintained under constant light from fertilization (A: LL), or first exposed to darkness for 15 (B), 18 (C), 21 (D), or 24 (E) hours, before being released under LL. A'–E', Embryos were first placed under constant darkness (A', DD) from fertilization or exposed to light for 15 (B'), 18 (C'), 21 (D'), or 24 (E') hours before being released under DD. They were then processed as indicated in Fig. 3. The *black bars* at the top of graph indicate the dark phases of the genitors, and the *gray boxes* indicate darkness for the embryos. Mean  $\pm$  SEM ( $n = 7$ –10). Two-way ANOVA indicated that the curves in D and E were not different from each other, but differed from the others (A–C) ( $P < 0.0001$ ). Similarly, the curves in D' and E' were not different from each other, but differed from the A'–C' curves ( $P < 0.0001$ ). a, Significantly different from b (Tukey's *post hoc* comparison of means,  $P < 0.05$ ). The 0 in the abscissa indicates time of fertilization (0800 h). Similar results were obtained in an independent experiment.



whether this initiation of pineal clock function reflects the start of the circadian clocks in individual pinealocytes or the synchronization of active clocks in these cells, or both.

Synchronization of the clocks in individual pinealocytes may involve light-dependent induction of *zfpPer2* (13), and dark-dependent induction of a yet-unknown factor, both of which could interact with components of the transcriptional/translational feedback loop that constitutes the circadian clock (23, 24). From the effects of dark pulses under LL and light pulses under DD, it appears that the timing of light onset, not duration, determines the phase of the resulting circadian rhythm.

The results of these studies provide clear indication that

*zfaANAT2* is under circadian control. This is likely to reflect the presence of E-Box elements (8), which mediate circadian control of many genes through interactions with protein components of the clock (25–27). The mechanism underlying the noncircadian photic control of *zfxR* expression in LD lighting cycles remains unknown.

In summary, the present study provides evidence that the circadian system in the zebrafish pineal organ is potentially functional as early as 18–21 hpf, *i.e.* 2 d before the retina. Anatomically immature pinealocytes are capable of transducing light signals and generating circadian oscillations in *zfaANAT2* expression. Accordingly, it appears that light sensitivity, circadian clock function, and output are present early

in embryonic development and that the pineal gland—not the retina—mediates photic responses at this stage. Our results also provide further support to the interpretation that minimal photic cues are sufficient to initiate pineal circadian clock function during development. Finally, it appears that light perception *per se*, as provided by LL, is not sufficient to initiate the circadian oscillations; rather, a photic transition is required, with the time of light onset determining the subsequent phase of the oscillations. This and previous studies (13) suggest that the onset and entrainment of the pineal circadian clocks need both light and darkness, *i.e.* light acting through induction of *zfPer2* expression, and darkness acting through a yet unknown mechanism. It remains to be determined whether the photic transitions (L→D or D→L) start the clock ticking in each cell or synchronizes circadian activity of individual cells, or does both. These questions may be asked, using the paradigm established here, in which single photic transitions are sufficient to generate a circadian output, *i.e.* *zfANAT2* mRNA.

### Acknowledgments

The authors thank M. Fuentès, B. Rivière, and D. Saint-Hilaire for their technical assistance.

Received December 8, 2005. Accepted February 9, 2006.

Address all correspondence and requests for reprints to: Jack Falcón, Laboratoire Arago, Unité Mixte de Recherche 7628, Centre National de la Recherche Scientifique and University Pierre and Marie Curie, BP 44, F-66651 Banyuls sur Mer, France. E-mail: falcon@obs-banyuls.fr.

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (Grant PICS 2556) and the Intramural Research Program, National Institute of Child Health and Human Development, National Institutes of Health.

Disclosure statement: R.V., L.B., G.B., A.P., Y.G., W.G.G., D.C.K., and J.F. have nothing to declare.

### References

- Vallone D, Condi SB, Whitmore D, Foulkes NS 2004 E-box function in a period gene repressed by light. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:4106–4111
- Sato TK, Panda S, Miraglia LJ, Reyes TM, Rudic RD, McNamara P, Naik KA, FitzGerald GA, Kay SA, Hogenesch JB 2004 A functional genomics strategy reveals Rora as a component of the mammalian circadian clock. *Neuron* 43:527–537
- Delaunay F, Thisse C, Marchand O, Laudet V, Thisse B 2000 An inherited functional circadian clock in zebrafish embryos. *Science* 289:297–300
- Kaneko M, Cahill GM 2005 Light-dependent development of circadian gene expression in transgenic zebrafish. *PLoS Biol* 3:e34
- Kazimi N, Cahill GM 1999 Development of a circadian melatonin rhythm in embryonic zebrafish. *Brain Res Dev Brain Res* 117:47–52
- Hurd MW, Cahill GM 2002 Entraining signals initiate behavioral circadian rhythmicity in larval zebrafish. *J Biol Rhythms* 17:307–314
- Falcón J, Besseau L, Boeuf G, Molecular and cellular regulation of pineal organ responses. In: Hara T, Zielinski B, eds. *Fish physiology: sensory systems neuroscience*. Amsterdam: Elsevier Science, in press
- Appelbaum L, Anzulovich A, Baler R, Gothilf Y 2005 Homeobox-clock protein interaction in zebrafish. A shared mechanism for pineal-specific and circadian gene expression. *J Biol Chem* 280:11544–11551
- Chen W, Baler R 2000 The rat arylalkylamine N-acetyltransferase E-box: differential use in a master vs. a slave oscillator. *Brain Res Mol Brain Res* 81:43–50
- Chong NW, Bernard M, Klein DC 2000 Characterization of the chicken serotonin N-acetyltransferase gene. Activation via clock gene heterodimer/E-box interaction. *J Biol Chem* 275:32991–32998
- Gothilf Y, Coon SL, Toyama R, Chitnis A, Namboodiri MA, Klein DC 1999 Zebrafish serotonin N-acetyltransferase-2: marker for development of pineal photoreceptors and circadian clock function. *Endocrinology* 140:4895–4903
- Mano H, Kojima D, Fukada Y 1999 Exo-rhodopsin: a novel rhodopsin expressed in the zebrafish pineal gland. *Brain Res Mol Brain Res* 73:110–118
- Ziv L, Levkovitz S, Toyama R, Falcón J, Gothilf Y 2005 Functional development of the zebrafish pineal gland: light-induced expression of period2 is required for onset of the circadian clock. *J Neuroendocrinol* 17:314–320
- Thisse B, Heyer V, Lux A, Alunni V, Degraeve A, Seilliez J, Kirchner J, Parkhill JP, Thisse C 2004 Spatial and temporal expression of the zebrafish genome by large-scale in situ hybridization screening. *Methods Cell Biol* 77:505–519
- Reynolds ES 1963 The use of the lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J Biophys Biochem Cytol* 17:208–212
- Wilson SW, Easter SSJ 1991 A pioneering growth cone in the embryonic zebrafish brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:2293–2296
- Allwardt BA, Dowling JE 2001 The pineal gland in wild-type and two zebrafish mutants with retinal defects. *J Neurocytol* 30:493–501
- Falcón J 1999 Cellular circadian clocks in the pineal. *Prog Neurobiol* 58:121–162
- Tsujiyama M, Malicki J 2004 Genetics of photoreceptor development and function in zebrafish. *Int J Dev Biol* 48:925–934
- Forsell J, Holmqvist B, Ekstrom P 2002 Molecular identification and developmental expression of UV and green opsin mRNAs in the pineal organ of the Atlantic halibut. *Brain Res Dev Brain Res* 136:51–62
- Schmitt EA, Dowling JE 1999 Early retinal development in the zebrafish, *Danio rerio*: light and electron microscopic analyses. *J Comp Neurol* 404:515–536
- Takechi M, Kawamura S 2005 Temporal and spatial changes in the expression pattern of multiple red and green subtype opsin genes during zebrafish development. *J Exp Biol* 208:1337–1345
- Iuvone PM, Tosini G, Pozdeyev N, Haque R, Klein DC, Chaurasia SS 2005 Circadian clocks, clock networks, arylalkylamine N-acetyltransferase, and melatonin in the retina. *Prog Retinal Eye Res* 24:433–456
- Reppert SM, Weaver DR 2002 Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* 418:935–941
- Kyriacou CP, Rosato E 2000 Squaring up the E-box. *J Biol Rhythms* 15:483–490
- Hardin PE 2004 Transcription regulation within the circadian clock: the E-box and beyond. *J Biol Rhythms* 19:348–360
- Munoz E, Baler R 2003 The circadian E-box: when perfect is not good enough. *Chronobiol Int* 20:371–388

*Endocrinology* is published monthly by The Endocrine Society (<http://www.endo-society.org>), the foremost professional society serving the endocrine community.