Tables des matières

Résumé ..... **iii**

Abstract ..... **v**

Tables des matières ..... **vi**

Liste des illustrations ..... **x**

Liste des abréviations et des symboles ..... **xii**

Remerciements ..... **xvi**

Avant-propos ..... **xvii**

Contributions xvii

Chapitre 1: Introduction **1**

1.1. L'œil humain et le système visuel 2

1.1.1 Le système visuel 2

1.1.2 Le globe oculaire 4

1.1.3 La cornée humaine 5

1.1.3.1 L'épithélium cornéen 6

1.1.3.2 Le stroma cornéen 6

1.1.3.2.1 Les collagènes composant le stroma cornéen 7

1.1.3.2.2 Les protéoglycans composant le stroma cornéen 8

1.1.3.2.3 Les métalloprotéinases matricielles (MMP) 8

1.1.3.3 L'endothélium cornéen 8

1.1.4 L'iris 9

1.1.5 Le cristallin 9

1.1.6 La rétine 10

1.1.7 L'épithélium pigmentaire rétinien (RPE) 10

1.1.8 La choroïde 11

1.2 L'oxydation 11

1.2.1 Sources d'oxydations 11

1.2.1.1 Le rayonnement solaire atteignant la surface terrestre 11

1.2.1.1.1 Le rayonnement ultraviolet (UV) et l'induction de dommages à l'ADN 11

1.2.1.1.2 La lumière visible 15

1.2.1.2 L'oxydation endogène par la chaîne respiratoire mitochondriale (OXPHOS) 16

1.2.2 Conséquences de l'oxydation et mécanismes de protection 19

1.2.2.1 Dommage oxydatif à l'ADN: le 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodG) 19

1.2.2.2 La réparation des dommages oxydatifs sur l'ADN 20

1.2.2.3 Les télomères et l'oxydation 21

1.2.2.4 Les antioxydants cellulaires 21

1.3 Les mitochondries 22

1.3.1 Le génome mitochondrial (ADNmt) 22

1.3.2 La biogenèse mitochondriale 23

1.3.3 Susceptibilité de l'ADNmt aux mutations 23
1.3.3.1 Dommages oxydatifs à l'ADNmt 24
1.3.3.2 Absence d'histones: nucléoides 24
1.3.3.3 Système de réparation de l'ADNmt limité 24
1.3.4 Les délétions mitochondriales 26
1.3.4.1 Modèle théorique de délétion mitochondriale lors de la réplication de l'ADNmt 26
1.3.4.2 Autre modèle complémentaire au mécanisme de délétion de l'ADNmt lors de la réparation de dommages 28
1.3.5 Le cercle vicieux des délétions mitochondriales 29
1.3.6 Types les plus communs de délétion de l'ADNmt 31
1.3.6.1 La délétion commune de 4977 pb ($ADNmt^{CD4977}$) 31
1.3.6.2 La délétion de 3895 pb ($ADNmt^{3895}$) 32
1.3.7 Le phénomène de vieillissement associé aux délétions mitochondriales 33
1.3.8 Les maladies oculaires associées aux dysfonctions mitochondriales 34
1.4 La dystrophie cornéenne endothéliale de Fuchs (FECD) 36
1.4.1 Historique 36
1.4.2 Stades cliniques de la maladie 37
1.4.3 Prévalence de la pathologie et traitement 38
1.4.4 Facteurs influençant la pathogenèse de la maladie 39
1.4.4.1 Facteurs génétiques: le gène COL8A2 39
1.4.4.2 Facteurs génétiques: le gène SLC4A11 40
1.4.4.3 Facteurs génétiques: les locus chromosomiques 40
1.4.4.4 Facteurs hormonaux 41
1.4.4.5 Facteurs environnementaux: Le stress oxydatif 41
1.4.4.6 Réduction de la réponse antioxydante 41
1.4.5 Le dysfonctionnement des pompes des cellules endothéliales 42
1.4.6 Modèle *in vivo* de la FECD par génie tissulaire 42
1.5 Contexte et objectifs 43
1.5.1 Détection de la présence de délétion mitochondriale $ADNmt^{CD4977}$ et $ADNmt^{3895}$ dans la cornée humaine 43
1.5.2 Étude de l'effet d'une irradiation chronique aux UVA sur la composition de l'ECM du stroma cornéen 44
1.5.3 Étude de l'implication du stress oxydatif dans la dystrophie cornéenne endothéliale de Fuchs 44

Chapitre 2: Mitochondrial DNA common deletion in the human eye: A relation with corneal aging 45

2.1 Résumé en français 46
2.2 Article 47
2.2.1 Résumé (anglais) 48
2.2.2 Introduction 49
2.2.3 Matériel et Méthodes 51
2.2.4 Résultats 53
2.2.5 Discussion 55
2.2.6 Remerciements 59
2.2.7 Références 60

2.2.8 Table et Figures 64

Chapitre 3: The 3895-bp mitochondrial DNA deletion in the human eye: a potential involvement in corneal ageing and macular degeneration 72

3.1 Résumé en français 73
3.2 Article 74
3.2.1 Résumé (anglais) 75
3.2.2 Introduction 76
3.2.3 Matériel et Méthodes 78
3.2.4 Résultats 80
3.2.5 Discussion 82
3.2.6 Remerciements 86
3.2.7 Références 87
3.2.8 Table et Figures 91

Chapitre 4: Modifications in stromal extracellular matrix of aged corneas can be induced by ultraviolets A irradiation 98

4.1 Résumé en français 99
4.2 Article 100
4.2.1 Résumé (anglais) 101
4.2.2 Introduction 102
4.2.3 Matériel et Méthodes 104
4.2.4 Résultats et Discussion 107
4.2.5 Conclusion 111
4.2.6 Remerciements 112
4.2.7 Références 113
4.2.8 Table et Figures 117

Chapitre 5: Restoration of mitochondrial integrity, telomere length and sensitivity to oxidation by *in vitro* culture of late stage Fuch's Endothelial Corneal Dystrophy cells . 132

5.1 Résumé en français 133
5.2 Article 134
5.2.1 Résumé (anglais) 135
5.2.2 Introduction 136
5.2.3 Matériel et Méthodes 139
5.2.4 Résultats 144
5.2.5 Discussion 146
5.2.6 Remerciements 149
5.2.7 Références 150
5.2.8 Table et Figures 153

Chapitre 6: Discussion et Conclusions 166

6.1 Effet du stress oxydatif sur la cornée humaine 167
6.2 L'utilisation des délétions mitochondriales dans l'œil humain comme biomarqueurs de dommage à l'ADNmt 167
6.3.1. Les délétions ADNmt^{CD4977} et ADNmt^{3895} dans la cornée 169

6.3.2 Les délétions ADNmt^{CD4977} et ADNmt^{3895} et le photovieillissement cornéen 171
6.4 Rôle des UVA dans le photovieillissement cornéen 173
6.5 Présence d'ADNmt^{3895} dans la rétine 175
6.6 Rôle de l'oxydation dans la FECD 175
6.7 Conclusions générales 178

Bibliographie (Chapitres 1 et 5) 180

Annexe 1: Implication of ultraviolet light in the etiology of uveal melanoma: A review 195

A1.1 Résumé en français 196
A1.2 Article 197
A1.2.1 Résumé (anglais) 198
A1.2.2 Introduction 199
A1.2.3 Discussion 205
A1.2.4 Remerciements 207
A1.2.5 Références 208

Liste des illustrations

Chapitre 1

Figure 1.1 Représentation schématique du chemin visuel dans le cerveau, adapté de (Snell et LEMP MA, 1997). 2
Figure 1.2 Représentation schématique d'un œil humain, adapté de (Snell et LEMP MA, 1997). 4
Figure 1.3 Représentation schématique de la cornée adapté de (Gendron SP et al., 2012) 5
Figure 1.4 Représentation de la structure d'une fibrille de collagène adapté de (Meek MK et Knupp C, 2015). 7
Figure 1.5 Représentation schématique du spectre solaire terrestre contenant les rayons UV (UVC, UVB et UVA) 12
Figure 1.6 Réaction de Fenton et de Photo-Fenton. 13
Figure 1.7 Représentation de la chaîne respiratoire adapté de (DiMauro S et al., 2013; Lodish H et al., 2005). 16
Figure 1.8 Représentation schématique de la production de superoxydes par la chaîne de transport d'électrons mitochondriale adaptée de (Jornayvaz FR et al., 2010) 18
Figure 1.9 Représentation de la formation du 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine par les radicaux de l'oxygène. 20
Figure 1.10 Schéma du modèle théorique de délétion mitochondriale, adapté de (Piceathly et al., 2012). 27
Figure 1.11 Schéma du cercle vicieux de génération des délétions mitochondriales. 30
Figure 1.12 Schéma de l'ADNmt représentant la délétion commune de 4977 pb. 32
Figure 1.13 Schéma de l'ADNmt représentant la délétion de 3895 pb. 33
Figure 1.14 Représentation schématique de la différence entre un endothélium sain et un endothélium atteint de la FECD comportant des guttaes adapté de (Laing RA et al., 1981). 37

Table 2.1 List of oligonucleotide PCR primers used in this study. 64

Figure 2.1 Schematic representation of human mtDNA indicating the PCR primer positions. 65
Figure 2.2 mtDNA^{CD4977} occurences follows a gradient from anterior to posterior eye structures. 66
Figure 2.3 Within the cornea, mtDNA^{CD4977} is concentrated in the stroma. 68
Figure 2.4 mtDNA^{CD4977} is concentrated in the central cornea and decreases toward the periphery. 70
Figure 2.5 mtDNA^{CD4977} accumulates with age in human corneal stromas. 71

Chapitre 3

Table 3.1 List of oligonucleotide PCR primers and TaqMan probes used in this study (Harbottle and Birch-Machin, 2006). 91

Figure 3.1 Schematic representation of the human mtDNA indicating 3895-bp deletion, the Q-PCR primers and the TaqMan probes positions. 92
Figure 3.2 The mtDNA^{3895} analysis in different ocular structures. 93
Figure 3.3 Within the cornea, the mtDNA^{3895} is concentrated in the stroma. 94

Figure 3.4 The mtDNA^{3895} accumulates with age in the human corneal stroma. 95
Figure 3.5 The mtDNA^{3895} is concentrated in the macular region of the neural retina and the RPE. 96
Figure 3.6 Model of mtDNA deletion formation from endogenous and exogenous source of ROS and the consequences of those deletions on human skin and eye. 97

Chapitre 4

Figure 4.1 Emission spectrum of the UVA lamp. 117
Figure 4.2 Schematic representation of the UVA irradiation protocol and further analysis of transcriptomic and proteomic changes induced by irradiation. 118
Figure 4.3 Microarray analysis of UVA-induced transcriptomic changes in human diploid stromal keratocytes. 122
Figure 4.4 UVA-induced collagen changes in human diploid corneal keratocytes. 125
Figure 4.5 UVA-induced proteoglycans and other extracellular matrix (ECM) changes in human diploid corneal keratocytes. 128
Figure 4.6 UVA-induced metalloproteinase (MMP) and TIMP changes in human diploid corneal keratocytes. 131

Chapitre 5

Table 5.1 List of Q-PCR primer sets and standard oligomers used in this study. 153
Table 5.2 Comparative list of genes expression from FECD corneal endothelial explants and cultured cells relative to healthy endothelium as detected by PCR array and microarray gene profiling. 154

Figure 5.1 Mitochondrial level and integrity in corneal endothelial healthy and FECD explants and cultured cells. 157
Figure 5.2 Telomeres are shorter in FECD patients but cultured corneal endothelial cells from healthy and FECD subjects show an increased telomere length without telomerase gene expression and activity. 160
Figure 5.3 Similar sensitivity to UVA- and H_2O_2-induced mortality in cultured corneal endothelial FECD and healthy cells. 162

Table supplémentaire 5.1 Classification of age and sex of healthy and FECD donors used in this study by figure. 165

Liste des abréviations et des symboles

ADP	Adénosine diphosphate
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNmt	Acide désoxyribonucléique mitochondrial
ADNmt^{4977}	Délétion commune de 4977 paires de bases de l'ADN mitochondrial
ADNmt^{3895}	Délétion de 3895 paires de bases de l'ADN mitochondrial
ADNn	Acide désoxyribonucléique nucléaire
ALDH	Aldéhyde déshydrogénase
AMPK	AMP-activated protein kinase
ANT	Translocateur de nucléotides à adénine
ARE	Antioxidant responsive element
ARN	Acide ribonucléique
ARNr	Acide ribonucléique ribosomique
ARNt	Acide ribonucléique de transfert
ATP	Adénosine-5′-triphosphate
BER	Réparation par excision de base
CAT	Catalase
CATC	Carnitine-acylcarnitine translocase
CoA	Coenzyme A
CoQ	Coenzyme Q
CO_2	Dioxyde de carbone
CPD	Dimère cyclobutylique de pyrimidine
CPT	Carnitine O-palmitoyltransférase
Ct	Temps de cycle
Cyt c	Cytochrome c
Da	Dalton
DIC	Transporteur d'acide dicarboxylique
D-Loop	Fourche de déplacement
DMEK	Descemet membrane endothelial keratoplasty
DMLA	Dégénérescence maculaire liée à l'âge
DSAEK	Descemet's stripping automated endothelial keratoplasty
DTT	Dithiothréitol
ECM	Matrice extracellulaire
EtBr	Bromure d'éthidium
ETF	Flavoprotéine de transfert d'électrons
FACIT	Fibril Associated Collagens with Interrupted Triple helices
FAD	Flavine adénine dinucléotide
FBS	Sérum de veau foetal
FECD	Dystrophie cornéenne endothéliale de Fuchs
FNC	Fibronectine
Glu	Glucose
GdSH	Génération de second harmonique
GPx	Glucathion peroxydase

Rapport-Gratuit.com

h	Heure
HEV	Lumière à haute énergie visible
HR	Recombinaison homologue
H_2O_2	Peroxyde d'hydrogène
H_2O	Eau
ipRGC	Cellules ganglionnaires photosensibles intrinsèques de la rétine
IR	Rayons infrarouges
kJ	Kilojoule
KSS	Syndrome de Kearns-Sayre
m	Mètre
mg	Milligramme
MIM	Membrane interne mitochondriale
min	Minute
mL	Millilitre
mM	Millimolaire
mm	Millimètre
MMP	Métalloprotéinase matricielle
$mtDNA^{4977}$	Délétion commune de 4977 paires de bases de l'ADN mitochondrial
$mtDNA^{3895}$	Délétion de 3895 paires de bases de l'ADN mitochondrial
Na^+/K^+ ATPase	Pompe sodium-potassium
NaBC1	Transporteur du borate couplé au sodium
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide
NCR	Région non codante
NER	Réparation par excision de nucléotides
NHEJ	Recombinaison par la jonction d'extrémités non homologues
ng	Nanogramme
nm	Nanomètre
nM	Nanomolaire
NCR	Région non codante
NoUV	Non irradié aux rayons ultraviolets
OH	Origine de réplication du brin lourd
OH•	Radical hydroxyle
OL	Origine de réplication du brin léger
OXPHOS	Phosphorylation oxydative
$O_2\bullet^-$	Anion superoxyde
pb	Paire de bases
PBS	Tampon phosphate salin
PCR	Réaction en chaîne par polymérase
PDHC	Complexe pyruvate déshydrogénase
P_i	Phosphate inorganique
ppm	Partie par million
Prdx	Peroxyrédoxine
Q-PCR	Réaction en chaîne par polymérase quantitative
Redox	Réaction d'oxydoréduction

RONS	Espèces réactives à l'azote
ROS	Espèces réactives à l'oxygène
RPE	Épithélium pigmentaire rétinien
S	Unité Svedberg
s	Seconde
SLRP	Petit protéoglycan riche en leucine
SNP	Polymorphisme d'un seul nucléotide
SOD	Superoxyde dismutase
TIMP	Inhibiteur de tissu des métalloprotéinases
TRAP	Telomerase repeat amplification protocol
TRX	Thiorédoxine
UV	Ultraviolet
UVA	Ultraviolet de type A
UVB	Ultraviolet de type B
UVC	Ultraviolet de type C
VDAC	Canal anionique voltage-dépendant
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
6-4PP	Photoproduit de pyrimidine (6-4) pyrimidone
8-oxodG	8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine
$\Delta\psi m$	Potentiel membranaire mitochondrial
µg	Microgramme
µL	Microlitre
µM	Micromolaire
µm	Micromètre
°C	Degré Celcius

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

The man who moves a mountain begins by carrying away small stones.

- **Confucius**

Remerciements

Je tient d'abord à remercier mon directeur de recherche, Patrick Rochette, pour m'avoir permis de joindre son laboratoire en 2010 pour la maîtrise et de m'avoir fait confiance tout au long de mon doctorat. L'occasion m'a été donnée d'acquérir de l'expérience dans une grande diversité de techniques en biologie cellulaire afin de parfaire ma formation. Cela m'a permis d'élargir mes horizons scientifiques, de développer une démarche de travail professionnelle et une rigueur scientifique.

Je tiens également à remercier les organismes subventionnaires qui ont permis d'entreprendre les expériences: le FRQ-S, le CRSNG et les IRSC. Je tiens notamment à remercier la banque Banque D'Yeux du Centre Universitaire d'Ophtalmologie de Québec pour nous avoir fourni les spécimens biologiques humains. Je tiens également à remercier les docteurs Isabelle Brunette, Richard Bazin, Patrick-Ann Laughrea, Marie-Ève Légaré et Julia Talajic pour nous avoir fournis des explants de cornées.

Un merci à tous les membres du LOEX/CUO-Recherche présent et passé pour leur appui. Un merci particulier à Patrick Carrier, Olivier Rochette et Manon Gaudreault pour avoir pris le temps de me former personnellement en culture cellulaire, en microscopie et en profilage génique. Un merci spécial va de même à Justin, Mathieu, Audrey-Anne, Sarah, Marjorie, Marie-Catherine, Marie, Sébastien, Ariane et Nathalie pour leur appui et leur aide tout au long de ma formation. Je remercie également Israel Martel du CMDGT d'avoir pris le temps de me former pour l'utilisation du cryostat. Je tiens également à remercier Serge Goupil et Pierre Leclerc en reproduction du CHUL qui m'ont donné une solide base en biologie moléculaire lorsque j'ai travaillé chez eux avant d'entreprendre ma maîtrise.

Finalement, je remercie mes parents et mon frère pour m'avoir soutenu inconditionnellement tout au long de mes études.

Avant-propos

Contributions

Cette thèse est écrite sous forme d'insertion d'articles. Les chapitres 2 à 5 ainsi que l'annexe 1 ont été publiés ou sont en attente de publication dans des journaux scientifiques. La présente section décrit ma contribution ainsi que celle des co-auteurs à ces ouvrages scientifiques.

Chapitre 2

L'étude présentée dans ce chapitre a été publiée dans le journal *Mechanisms of Ageing and Development* en févier 2012. Le contenu de l'article originellement publié en anglais a été introduit dans le cadre d'insertion d'article pour cette thèse. En ce qui concerne la contribution des coauteurs sur le plan expérimental, Justin D. Mallet et Nathalie Bastien ont contribué à l'extraction d'ADN et la quantification de l'ADNmt^{CD4977} de la figure 2a. Patrick J. Rochette a contribué à la figure 2b. Par ailleurs, Patrick J. Rochette a contribué en majorité à la rédaction du manuscrit alors que Nathalie Bastien et Justin D. Mallet ont contribué à la révision du manuscrit. Justin D. Mallet a contribué aux dessins des figures 3A et 4A. Pour ma part, en tant que premier auteur sur cet article, j'ai contribué expérimentalement entièrement à la réalisation des figures 3,4 et 5. Pour la rédaction du manuscrit, j'ai contribué également à sa rédaction et j'ai produit toutes les figures et tableaux mises à part les figures 3A et 4A. Pour l'ensemble de cet article ma contribution est d'environ 65%.

Chapitre 3

L'étude présentée dans ce chapitre a été publiée dans le journal *Mutagenesis* en mars 2013. Le contenu de l'article originellement publié en anglais a été introduit dans le cadre d'insertion d'article pour cette thèse. En ce qui concerne la contribution des coauteurs sur le plan expérimental, Justin D. Mallet et Nathalie Bastien ont contribué aux manipulations expérimentales de la figure 2 et Nathalie Bastien a mis au point la technique Q-PCR. Par ailleurs, Patrick J. Rochette a contribué en majorité à la rédaction du manuscrit alors que Nathalie Bastien et Justin D. Mallet ont contribué à sa révision. Pour ma part, en tant que premier auteur sur cet article, j'ai contribué expérimentalement à la réalisation des figures 3, 4 et 5. Pour la rédaction du manuscrit, j'ai contribué également à sa rédaction et j'ai produit toutes les figures, le tableau et les schémas. Pour l'ensemble de cet article, ma contribution est d'environ 70%.

Chapitre 4

L'étude présentée dans ce chapitre a été publiée dans le journal *Aging Cell* au mois de juin 2015. Le contenu de l'article originellement publié en anglais a été introduit dans le cadre d'insertion d'article pour cette thèse. En ce qui concerne le coauteur, Patrick J. Rochette a contribué en majorité à la rédaction du manuscrit. Pour ma part, en tant que premier auteur sur cet article, j'ai contribué expérimentalement à la réalisation de la totalité des expériences, à la création des protocoles ainsi qu'à leurs exécutions. J'ai effectué moi-même le profilage génique ainsi que son analyse. La spectrométrie de masse a été effectuée par le service offert par la plate-forme protéomique du Centre de génomique de Québec situé au centre de recherche du CHU de Québec. J'ai effectué l'analyse des données de spectrométrie de masse sur le logiciel Scaffold. Pour la rédaction du manuscrit, j'ai contribué également à sa rédaction et j'ai produit toutes les figures et le schéma. Pour l'ensemble de cet article, ma contribution est d'environ 80%.

Chapitre 5

L'étude présentée dans ce chapitre sera soumise dans le journal *The American Journal of Pathology*. Le contenu de l'article qui a été originellement soumis en anglais a été introduit dans le cadre d'insertion d'article pour cette thèse. En ce qui concerne la contribution des coauteurs sur le plan expérimental, Mathieu Thériault a participé expérimentalement en effectuant l'isolation des cellules endothéliales à partir des biopsies des patients humains et Isabelle Brunette a participé expérimentalement en fournissant les biopsies des patients humains. Par ailleurs, Mathieu Thériault, Stéphanie Proulx, Isabelle Brunette et Patrick J. Rochette ont participé à la révision du manuscrit.

Pour ma part, en tant que premier auteur sur cet article, j'ai contribué expérimentalement majoritairement à la réalisation des expériences, à la création des protocoles ainsi qu'à leurs exécutions. J'ai effectué expérimentalement l'ensemble des résultats menant à la création de toutes les figures et tableaux. En ce qui concerne la rédaction du manuscrit, j'en ai écrit la première version dans son intégralité, j'ai participé à sa révision et j'ai produit toutes les figures et tableaux. Pour l'ensemble de cet article, ma contribution est d'environ 90%.

Annexe 1

L'article intitulé: « Implication of ultraviolet light in the etiology of uveal melanoma: A review » est une revue de littérature qui a été publiée dans le journal *Photochemistry and photobiology* en 2014. Le contenu de l'article originellement publié en anglais a été introduit dans le cadre d'insertion d'article pour cette thèse. En ce qui

concerne la contribution de l'auteur et des coauteurs, ceux-ci ont contribué à l'écriture et la révision à différents degrés de l'article. Pour ma part j'ai participé à une modeste partie de l'écriture et à la révision critique de l'article. Les autres tâches ont été partagées par Justin D. Mallet, Marie-Catherine Drigeard Desgarnier et Patrick J. Rochette. Pour l'ensemble des travaux, ma contribution relative est d'environ 15%.

Chapitre 1: Introduction

1.1. L'œil humain et le système visuel

1.1.1 Le système visuel

Le système visuel permet aux signaux lumineux d'être acheminés et interprétés au cerveau. Le système visuel comprend le globe oculaire, la rétine, le nerf optique, le chiasma optique, les tractus optiques, les corps géniculés latéraux, les radiations optiques et le cortex visuel (Figure 1.1). Le système visuel peut être considéré comme une partie du système nerveux central. Au niveau du développement, la rétine est une excroissance du prosencéphale et le nerf optique est quant à lui de la substance blanche, principalement constituée de faisceaux de fibres nerveuses permettant la communication entre les cellules nerveuses (Snell RS et LEMP MA, 1997).

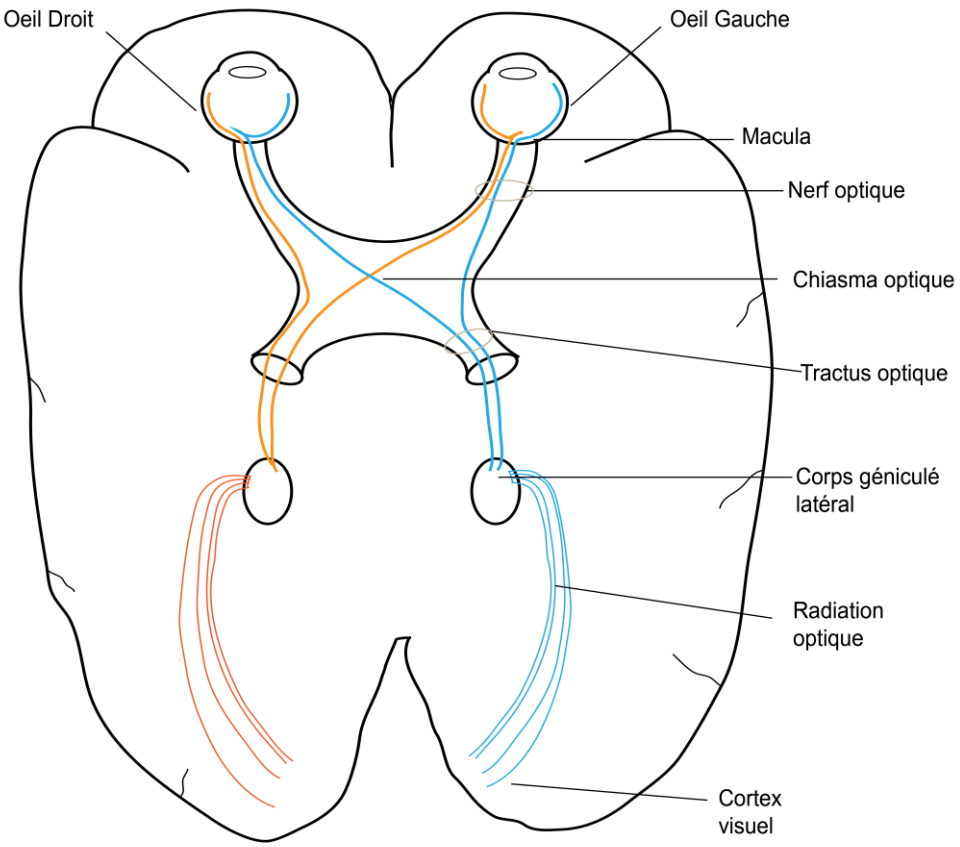


Figure 1.1 Représentation schématique du chemin visuel dans le cerveau, adapté de (Snell et LEMP MA, 1997).

Les signaux lumineux pénètrent d'abord par le globe oculaire pour y être convertis en signal visuel. Le signal est transmis par le nerf optique pour parvenir jusqu'au chiasma optique où les fibres des nerfs optiques des deux yeux se croisent. Le signal visuel continue par la suite par le tractus optique où les fibres nerveuses des parties fonctionnelles correspondantes provenant de chaque rétine deviennent associées. Ensuite, le signal visuel passe par le corps géniculé latéral, suit les radiations optiques qui sont constituées de fibres nerveuses pour finalement aboutir au cortex visuel où les informations visuelles seront traitées (Snell RS et LEMP MA, 1997; Crescitelli F et al., 1977).

La réception de la lumière joue également d'autres rôles secondaires à la perception d'images. Elle joue notamment un rôle au niveau de la régulation du rythme circadien (Casper RF and Gladanac B, 2014). Le cycle circadien est un mécanisme qui influence des réponses physiologiques et comportementales diurnes sur une période de 24 heures. Ces réponses subviennent suite à des signaux émis par les cellules ganglionnaires rétiniennes intrinsèquement photosensibles (ipRGC) qui expriment un photopigment: la mélanopsine. La mélanopsine permet de capter la lumière maximalement à une longueur d'onde de 484 nm (Newman LA et al., 2003). Les signaux émis par les ipRGC mènent à des cascades de changements hormonaux qui synchronisent la transcription de gènes circadiens tel *Clock ou Period.* Un désalignement du cycle circadien peut augmenter le risque de troubles cardiovasculaires, d'obésité, de cancer, de reproduction et des désordres de l'immunité (Casper RF and Gladanac B, 2014; Plikus MV et al., 2015).

De plus, la lumière permet la régulation d'un autre mécanisme de photoréception non visuelle, comme le réflexe pupillaire. Ce dernier est affecté par l'intensité, la longueur d'onde et la durée de l'illumination (Wang B et al., 2015).

Rapport-Gratuit.com

1.1.2 Le globe oculaire

Le globe oculaire est l'organe névralgique à la vision et est représenté à la figure 1.2. Ce dernier est formé lors de l'embryogenèse par l'ectoderme et le mésenchyme. L'ectoderme qui est dérivé du tube neural mène à la création de la rétine, aux fibres nerveuses du nerf optique et aux muscles lisses de l'iris. La surface de l'ectoderme forme l'épithélium cornéen et conjonctif, le cristallin et les glandes lacrymales. Le mésenchyme forme entre autres le stroma cornéen, la sclère, la choroïde et l'iris. L'endothélium cornéen quant à lui provient de la crête neurale (Snell RS et LEMP MA, 1997; Tuft SJ et al, 1990).

L'œil est l'organe permettant de capter la lumière et la transmet pour qu'elle soit interprétée au cerveau. Afin que la lumière soit acheminée aux photorécepteurs sans défaut, elle doit être transmise par les différentes structures du segment antérieur. Ce segment comprend entre autres la cornée, l'iris et le cristallin ainsi que l'humeur aqueuse. L'humeur aqueuse est un liquide biologique continuellement filtré et renouvelé qui permet entre autres le maintien de la pression oculaire. La lumière doit ensuite traverser à travers le corps vitré pour se rendre jusqu'aux structures du segment postérieur où la lumière sera focalisée à la rétine.

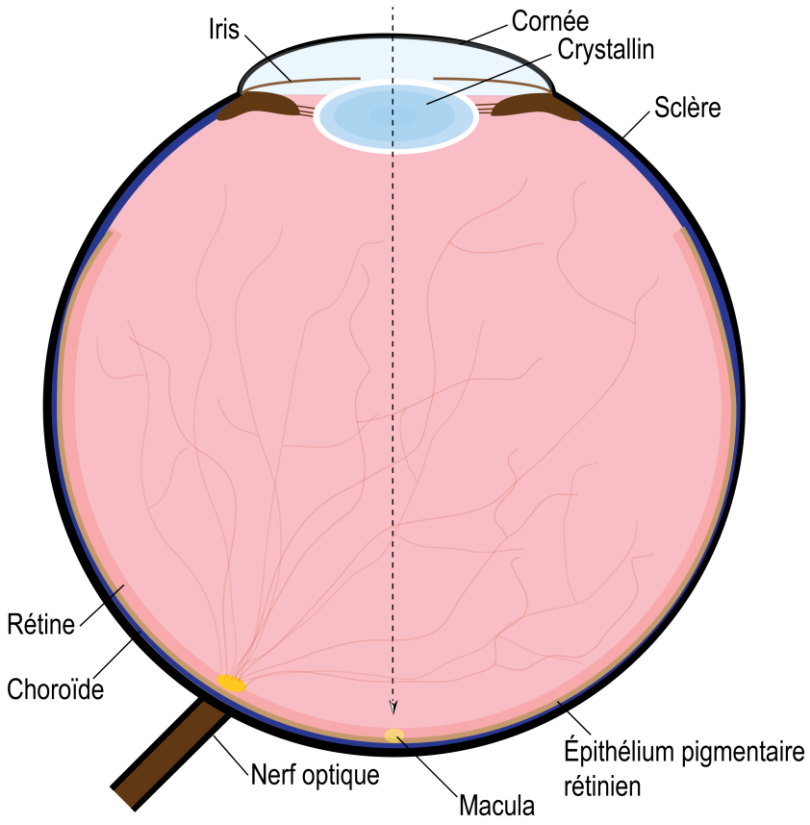


Figure 1.2 Représentation schématique d'un œil humain, adapté de (Snell et LEMP MA, 1997). La ligne pointillée représente le parcours optique de la lumière.

1.1.3 La cornée humaine

La cornée est une structure transparente primordiale pour la focalisation de la lumière et est illustrée à la figure 1.3. Elle est la structure la plus antérieure de l'œil et est constituée d'un épithélium reposant sur la membrane de Bowman, d'un stroma, de la membrane de Descemet et d'un endothélium.

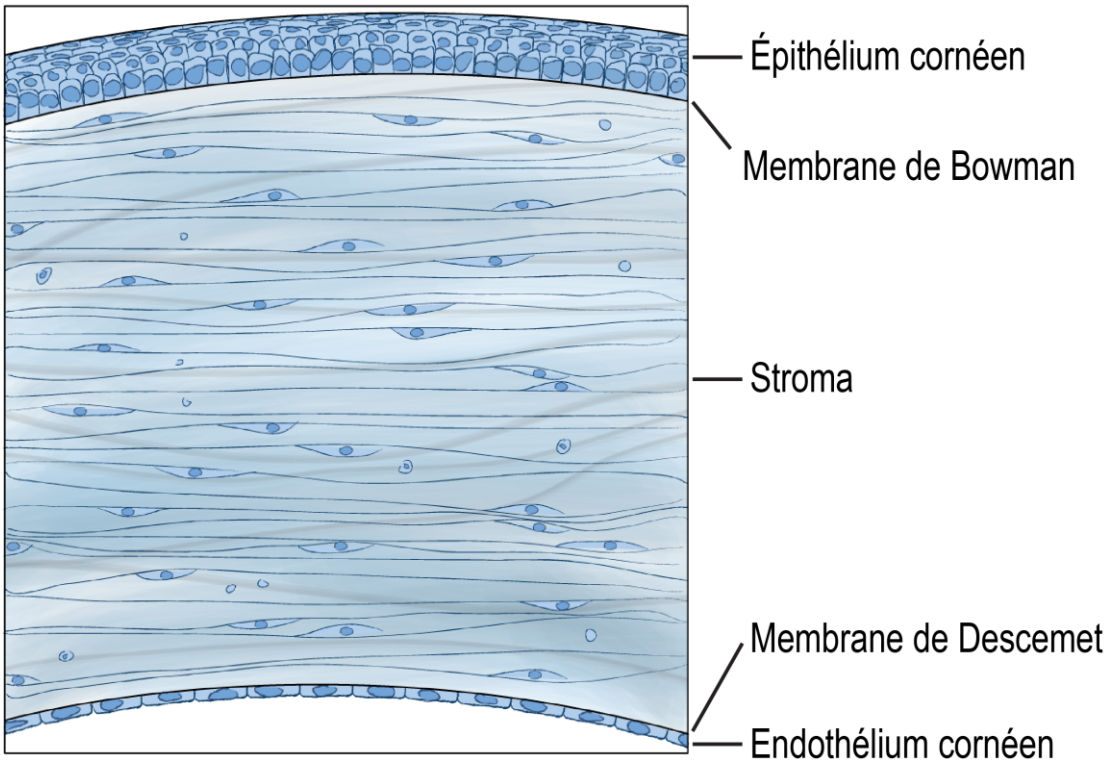


Figure 1.3 Représentation schématique de la cornée adapté de (Gendron SP et al., 2012) L'épithélium cornéen occupe la partie antérieure de la cornée et repose sur la membrane de Bowman. Le stroma cornéen constitue une structure intermédiaire puis est suivi de la membrane de Descemet en position postérieure sur laquelle se situe l'endothélium cornéen.

La cornée est recouverte du film lacrymal provenant des glandes lacrymales. Le film lacrymal est composé de trois couches distinctes. La couche antérieure est constituée de lipides. La couche intermédiaire est aqueuse et contient entre autres des nutriments et des électrolytes. La couche postérieure contient des mucines dont l'hydrophobicité permet son étalement sur la surface cornéenne. Le film lacrymal permet d'inhiber l'invasion de la surface oculaire par des pathogènes, prévient le dessèchement de la surface de la cornée et fournit la cornée en nutriments et métabolites afin qu'elle maintienne une bonne transparence et reste avasculaire

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

(Conrady CD et al., 2016). L'absence de vaisseaux sanguins permet la transparence et les cellules sont nourries et oxygénées par le biais du film lacrymal et de l'humeur aqueuse qui se diffuse.

La cornée joue également un rôle de lentille optique et permet la convergence de la lumière par nature dioptrique d'environ 43 dioptries incluant le film lacrymal. La cornée contribue au 2/3 du pouvoir réfractant de l'œil (Ratner BD et al., 2012).

1.1.3.1 L'épithélium cornéen

L'épithélium cornéen constitue la couche la plus antérieure de l'œil humain. Les cellules de l'épithélium cornéen sont renouvelées à partir de cellules souches présentent dans le limbe. Le limbe est situé en périphérie de la cornée à la limite de la conjonctive. Ces cellules souches se divisent et donnent naissance à des cellules amplificatrices transitoires qui à leur tour se diviseront et donneront lieu à des cellules en différenciation terminale (Li C et al., 2011). L'épithélium cornéen est constitué d'une épaisseur de 5 à 7 cellules épithéliales non kératinisées pour une épaisseur d'environ 50 μm (Ramos T et al., 2015; Michelacci YM, 2003). Cette structure repose sur la membrane de Bowman constituée principalement de collagène V et a une épaisseur de 12 μm (Nakayasu K et al., 1986; Michelacci YM, 2003)

1.1.3.2 Le stroma cornéen

Le stroma cornéen constitue 90% de l'épaisseur de la cornée pour une épaisseur d'environ 500 μm et est responsable de 75% du pouvoir réfractif de l'œil (Michelacci YM, 2003). La transparence de la cornée est le résultat de l'espacement régulier entre les fibrilles de collagènes, du diamètre uniforme de ces fibrilles et de l'espace interfibrillaire. Les fibrilles de collagènes constituants le stroma mesurent de 25 à 30 nm et sont distribuées de manières homogènes et condensées en lamelles. Cela permet de diminuer la dispersion de la lumière afin de garder une bonne transparence. L'arrangement de ces fibrilles dépend entre autres de l'état partiellement déshydraté du stroma cornéen. La présence d'eau dans le stroma modifie sa transparence en variant l'organisation des fibrilles de collagènes et en dispersant la lumière (Hassell JR et Birk DE, 2010; Maurice DM, 1984). L'état d'hydratation et l'épaisseur du stroma sont dépendants du rôle de l'endothélium cornéen qui sera abordé plus en détail à la section 1.1.3.3.

Le stroma cornéen est constitué d'une matrice extracellulaire (ECM) composée en majorité de collagènes, de protéoglycans et de kératocytes de manière intercalée. Les résultats présentés au chapitre 4 mettent en lumière l'action du rayonnement UV sur l'ECM de la cornée.

1.1.3.2.1 Les collagènes composant le stroma cornéen

Les collagènes qui composent majoritairement le stroma cornéen mature sont de type I et de type VI dans une proportion de 75% et 17% respectivement (Michelacci YM, 2003). Le stroma cornéen mature contient également d'autres types de collagène en plus petites proportions comme le collagène III, V, XII et XIV.

Les fibres de collagène du stroma cornéen sont constituées de collagènes de type I incorporé à ceux de type V afin de produire des fibres hétérotypiques. Les collagènes de type VI forment des structures microfibrillaires par agrégation latérale et les collagènes de type XII et XIV sont des «FACIT». Les collagènes FACIT sont des collagènes associés à des microfibrilles avec des triples hélices interrompues (Michelacci YM, 2003).

Les fibres de collagènes sont constituées de microfibrilles qui elles sont constituées de molécules à triples hélices. De 300 à 400 molécules à triples hélices regroupées dans une quantité d'environ 70 microfibriles forment une fibre de collagène tel qu'illustré à la figure 1.4.

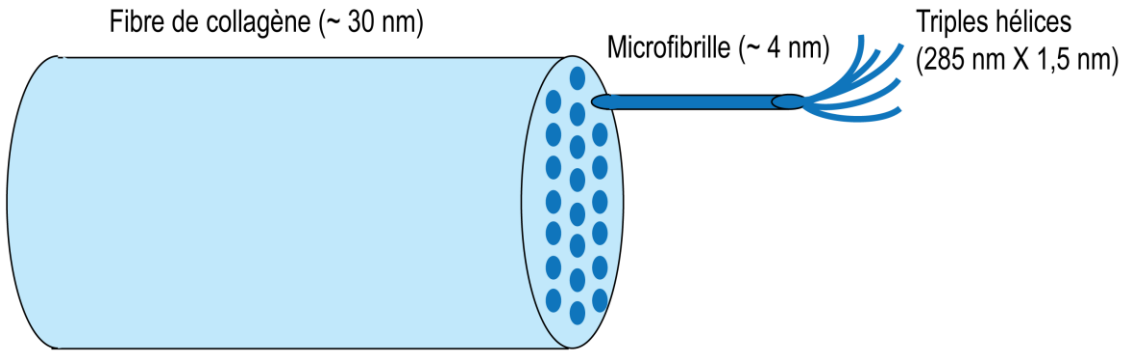


Figure 1.4 Représentation de la structure d'une fibrille de collagène adapté de (Meek MK et Knupp C, 2015). La fibre de collagène est constituée de microfibriles qui elles sont constituées de triples hélices.

Cette structure permet aux fibres de collagènes qui constituent les lamelles de collagène la capacité de résister aux forces de tension due à la pression intraoculaire et de protéger les autres tissus oculaires internes des traumatismes extérieurs. De plus, cet agencement permet également de conserver un diamètre étroit des fibres afin de permettre la transparence du tissu (Meek MK et Knupp C, 2015).

1.1.3.2.2 Les protéoglycans composant le stroma cornéen

Les protéoglycans sont responsables de l'organisation et l'alignement des fibres de collagènes (Hassell JR et Birk DE, 2010). Ils sont aussi impliqués dans la fibrillogénèse des fibres de collagènes et l'assemblage de l'ECM (Michelacci YM, 2003). Le stroma cornéen humain adulte comprend quatre petits protéoglycans riches en leucine (SLRP) dont la décorine, lumican, kératocan et mimecan. La décorine est de type dermatan sulfate et les trois autres sont de type keratan sulfate. Les protéoglycans de type dermatan sulfate sont impliqués dans le contrôle de l'espace interfibrillaire. Les protéoglycans de type keratan sulfate régulent pour leur part le diamètre des fibres. Le stroma cornéen contient également d'autres protéoglycans comme biglycan, la fibromoduline et podocan (Michelacci YM, 2003).

La présence des protéoglycans à un niveau précis est cruciale pour la transparence de la cornée. En effet, une déficience en lumican chez la souris a démontré une opacité et un amincissement cornéen sévère associé à la désorganisation des fibres de collagènes (Meij JT et al., 2007)

Ainsi, nous pouvons constater que la transparence du stroma cornéen est liée aux propriétés de transmission et de diffusion de la lumière et peut être déstabilisée par plusieurs facteurs.

1.1.3.2.3 Les métalloprotéinases matricielles (MMP)

Les métalloprotéinases matricielles sont des protéases responsables de la dégradation des protéines de l'ECM, incluant les collagènes et les protéoglycans. Il en existe plus de 25 types (Nelson AR et al., 2000; Mezentsev A et al., 2014). Le rôle des MMP dans le photovieillissement de la peau est bien défini. L'exposition de la peau aux UV mène à une augmentation de l'expression de MMP1, MMP3 et MMP9 (Fisher GJ et al., 2002). L'activité des MMP peut également être inhibée entre autres par une famille d'inhibiteur de protéases: les TIMP (Tissue inhibitors of métalloproteinase). La famille des TIMP contient 4 membres: TIMP1, TIMP2, TIMP3 et TIMP4 (Moore L et al., 2012). La dégradation des constituants de l'ECM mène à des phénotypes de photovieillissement.

1.1.3.3 L'endothélium cornéen

L'endothélium cornéen a une épaisseur approximative de 1,5 à 2,5 μm et est composé une monocouche de cellules qui sont arrêtées en phase G1 (Zhang J et Patel DV, 2015; Joyce NC, 2003). Elles sécrètent du collagène de type VIII. Cela forme ainsi sur leur surface antérieure la membrane de Descemet (Michelacci YM, 2003). Les cellules de l'endothélium ont une morphologie hexagonale et maintiennent la transparence de la cornée en régulant la quantité d'ions dans le stroma cornéen, en agissant comme barrière à l'entrée de fluide provenant de l'humeur aqueuse et pompant les ions hors de la cornée grâce à leurs pompes Na^+/K^+ ATPase,

ce qui en fait des cellules métaboliquement très actives (Bourne W.M., 2010). Leur rôle principal est donc de garder le stroma cornéen en état de déturgescence continuelle. Les cellules de l'endothélium cornéen ne prolifèrent pas ou prolifèrent à un rythme plus bas que les cellules qui meurent progressivement avec le temps (Joyce NC, 2003). Ainsi, il est estimé qu'entre l'âge de 20 et 80 ans, la densité cellulaire de l'endothélium diminue de 0,6% annuellement et est compensée par une variation de la taille et la forme des cellules tel que revue dans (Faragher RGA et al., 1997). Toutefois, il est suggéré que certaines cellules souches résident dans le limbe postérieur dans la périphérie de l'endothélium cornéen. Celles-ci seraient utiles en cas de blessure à la cornée où il y aurait une initiation du processus de réparation de l'endothélium et permettraient possiblement à un remplacement lent des cellules endothéliales (McGowan SL et al., 2007).

1.1.4 L'iris

L'iris est une structure de l'œil localisée entre la cornée et le cristallin, et est immergé dans l'humeur aqueuse. L'iris est composé de muscles dont un dilatateur et un sphincter qui contrôle l'ouverture de la pupille (Borrás T, 2014). Son rôle consiste à moduler le niveau de luminosité qui se rend au fond du globe oculaire. L'iris est constitué de pigments de phéomélanine et d'eumélanine sécrétés par les mélanocytes qui la composent. Le ratio phéomélanine sur eumélanine détermine la couleur de l'iris. Ces pigments permettent aussi d'absorber les rayons de lumière qui sont déviés dans la chambre antérieure de l'œil tel que revue dans (Gillbro JM et Olsson MJ, 2011).

1.1.5 Le cristallin

Le rôle du cristallin est de transmettre et de focaliser la lumière sur la rétine (Hetjmancik JF et al., 2015). Pour faciliter cette fonction, le cristallin est une structure lentille transparente biconvexe contenant une des plus hautes concentrations en protéines de tous les tissus (jusqu'à 60% de sa masse) ce qui lui permet d'avoir un haut indice de réfraction (Hejtmancik JF et Shiels A, 2015). Pesant en moyenne 65 mg à la naissance, il pourra atteindre 250 mg à 90 ans. Bien que le cristallin soit sans couleur à la naissance, il deviendra graduellement jaune avec l'âge. Cela est dû à la production de composés dérivés du tryptophane comme l'acide xanthurénique et le 3-hydroxykynurénine qui filtrent la lumière ultraviolette. Le tryptophane est un précurseur pour ces molécules qui agissent contre filtre UV tel que revue dans (Avila F et al., 2015). Par ailleurs, le cristallin transmet des longueurs d'onde allant jusqu'à 1200 nm, mais peu en bas de 390nm. Le cristallin est enveloppé par une capsule collagèneuse dont l'intérieur est constitué d'un noyau fibreux fait de longues cellules transparentes anucléées. Seule la face antérieure du noyau fibreux possède un épithélium dont les cellules se divisent lentement. Le cristallin est reconnu pour être sensible au stress oxydatif

(Hejtmancik JF et Shiels A, 2015; Ni S et al., 2013). Il contribue à environ 1/3 du pouvoir réfractif de l'œil grâce à son pouvoir réfractaire d'environ 20 dioptres (Ratner BD et al., 2012).

1.1.6 La rétine

La rétine est la structure au fond de l'œil située sous l'humeur vitrée et repose sur l'épithélium pigmentaire rétinien; la couche la plus postérieure de la rétine. La rétine sensorielle comprend 5 couches de cellules dont les cellules ganglionnaires rétiniennes, les cellules amacrines, les cellules bipolaires, les cellules horizontales et les photorécepteurs qui incluent les cônes et les bâtonnets. Grâce aux cellules des photorécepteurs, le processus complexe de phototransduction visuelle peut avoir lieu. Ce processus a pour but de transformer les signaux lumineux (photons) en signaux électrochimiques captés par les neurones. Les photorécepteurs sont des cellules hautement actives métaboliquement. Les bâtonnets très sensibles à la lumière sont responsables de la vision nocturne. Les cônes quant à eux sont 100 fois moins sensibles que les bâtonnets, mais ont une réponse kinétique beaucoup plus rapide lors de la phototransduction visuelle. De plus, chaque cône est plus sensible à une longueur d'onde spécifique, ce qui les rend plus adaptés pour la vision diurne et la vison des couleurs (Hoon M et al., 2014).

La macula située dans la rétine est la zone la plus concentrée en photorécepteurs de type cônes. C'est la région de l'acuité visuelle. La macula possède une couleur jaunâtre étant donné la présence de caroténoïdes comme la zéaxanthine et la lutéine (Bone RA et al., 1993; Voland S et al., 2015). La partie centrale de la macula se nomme la fovea qui est une zone de 500 μm de diamètre avasculaire constitué essentiellement de photorécepteurs de type cônes (Grossniklaus He et al., 2015).

1.1.7 L'épithélium pigmentaire rétinien (RPE)

L'épithélium pigmentaire rétinien est une monocouche de cellules pigmentées hautement spécialisées qui séparent la rétine neurale de la choroïde vasculaire. En étant pigmentées, ces cellules absorbent la lumière déviée à l'intérieur de l'œil. Ces cellules jouent un rôle dans l'homéostasie de la rétine dont la maintenance des photorécepteurs par le recyclage des photopigments. Le RPE permet l'échange entre la rétine et la choroïde de nombreuses molécules telles que des ions, de l'eau, des nutriments ou des déchets cellulaires grâce à ses nombreuses protéines de transport et canaux (Zhang Y et Wildsoet CF, 2015).

1.1.8 La choroïde

La choroïde est une structure située entre le RPE et la sclère. Les rôles principaux de la choroïde sont de fournir en oxygène et nutriments la rétine et l'iris, d'absorber la lumière grâce à ses pigments, de moduler la pression intraoculaire et de jouer un rôle dans la thermorégulation (Zhang Y et Wildsoet CF, 2015).

1.2 L'oxydation

1.2.1 Sources d'oxydations

1.2.1.1 Le rayonnement solaire atteignant la surface terrestre

Comme la peau, l'œil humain est directement exposé au soleil. Ce dernier produit de très grandes quantités de rayonnement électromagnétique. Le spectre électromagnétique émis par le soleil comprend en ordre croissant de longueur d'onde: les rayons gamma, les rayons X, les rayons ultraviolets, la lumière visible, l'infrarouge, les micro-ondes et les ondes radio. Plus la longueur d'onde est grande, moins les rayons sont énergétiques. Le rayonnement solaire absorbé à la surface terrestre et dans l'atmosphère est la source primaire d'énergie permettant les mouvements atmosphériques nécessaires aux précipitations (Lacis AA et Hansen JE, 1973). Plusieurs bienfaits peuvent résulter du rayonnement solaire selon la longueur d'onde: le rayonnement infrarouge (IR) situé entre 760 nm et 10^6 nm agit comme source de chaleur sur la surface terrestre ou encore la lumière visible qui permet la vision chez les êtres vivants et la photosynthèse chez les plantes (International Organization for Standardization ISO 20473, 2007).

1.2.1.1.1 Le rayonnement ultraviolet (UV) et l'induction de dommages à l'ADN

Toutefois certains rayonnements solaires atteignant la terre peuvent avoir des effets néfastes comme c'est le cas pour le rayonnement ultraviolet (UV). Les rayons UV tels que présentés à la figure 1.5 sont divisés en trois catégories et leurs effets néfastes diffèrent selon leur catégorie:

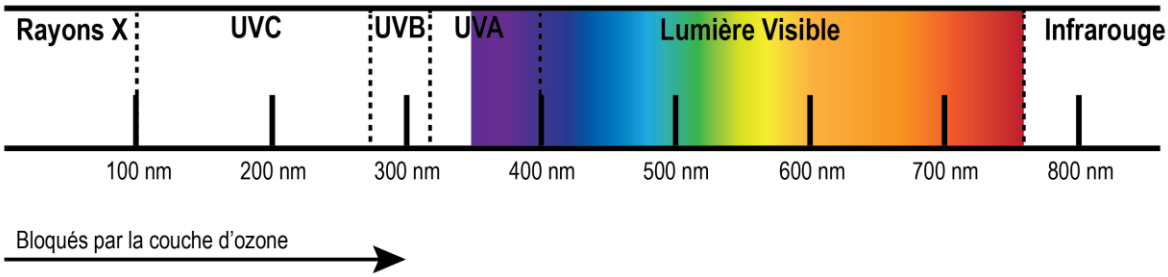


Figure 1.5 Représentation schématique du spectre solaire terrestre contenant les rayons UV (UVC, UVB et UVA). Les rayons UVC sont bloqués par la couche d'ozone.

1) Les rayons UVC, situés entre 100 et 280 nm, sont les rayons UV les plus énergétiques. Les UVC sont les rayons les plus dommageables pour les êtres vivants puisqu'ils couvrent l'intervalle d'absorption de l'ADN (260nm), de l'ARN (260 nm) et des protéines (280 nm) (Wu S et al., 2014; Widel M, 2012). Les UVC sont les plus létaux des UV étant donné leur énergie, mais sont peu pénétrants. Les UVC sont efficaces à engendrer des dommages sur l'ADN tel que les dimères cyclobutyliques de pyrimidines (CPD) et des photoproduits de pyrimidines (6-4) pyrimidones (6-4PP) (Friedberg EC et al., 1995). Ces deux types de lésions à l'ADN lorsque qu'elles ne sont pas réparées peuvent être promutagéniques (Jans J et al., 2005). Les UVC mènent également à la production d'espèces réactives à l'oxygène (ROS) qui peuvent mener à la formation de cassure de brins et à l'oxydation de molécules (Wiseman H and Halliwell B., 1996; Cadet J et al., 2005). Heureusement pour les êtres vivants, les UVC solaires sont bloqués naturellement par la couche d'ozone. Toutefois, l'humain peut être exposé à certaines sources artificielles d'UVC telles que les lampes germicides. Les UVC ont été reportés pour ne pénétrer que dans l'épithélium cornéen (Mallet JD et Rochette PJ, 2013).

2) Les rayons UVB sont situés entre 280 et 320 nm. Ces derniers sont absorbés en grande partie par la couche d'ozone et seulement 5% des UVB émit par le soleil se rendent à la surface terrestre. Étant donné que les UVB ont une longueur d'onde proche de l'absorption de l'ADN (260 nm), ces derniers sont efficaces à générer des dommages directs à l'ADN par excitation de bases de pyrimidines résultant en la formation de CPD, mais également de 6-4PP dans une quantité plus faible (Cadet J et al., 2009; Lo HL et al., 2005). Les UVB causent également des dommages directs à l'ADN via l'ionisation de bases (guanine) résultant 8-oxoguanine ou en fapy-guanine (Cadet J et al., 2009). Physiologiquement, les UVB sont presque complètement absorbés par la couche protectrice de l'épiderme de la peau et sont responsables de l'effet de bronzage, des coups de soleil ainsi que de la plupart des cancers de la peau, tel que revue dans (D'orazio J et al., 2013; Narayanan DL et al., 2010). Les UVB ont été reportés pour causer des CPD principalement à l'épithélium cornéen (Mallet JD et Rochette PJ, 2013).

3) Les rayons UVA se divisent eux-mêmes en deux sous-catégories: les UVA1 (340-400 nm) et les UVA2 (315-340 nm). Les UVA1 constituent pour leur part environ 75% des UVA. Les UVA ne sont pas facilement absorbés par la couche d'ozone et représentent 5,1% de la lumière du soleil qui atteint la surface terrestre alors que les UVB ne représentent que 0,3%. Les rayons UVA sont les plus pénétrants des rayons UV dans les tissus biologiques. Les UVA ont été reportés pour pénétrer à travers la cornée jusqu'à l'iris par leur génération de CPD (Mallet JD et Rochette PJ, 2013). Toutefois, les UVA ne génèrent pas de 6-4PP (Tewari A et al., 2012).

Par ailleurs, un bon nombre de chromophores biologiques absorbent les UVA, ces chromophores incluent entre autres des cofacteurs d'enzyme, des pigments (ex: l'eumélanine et la phléomélanine) et des dérivés d'espèces d'amino-acides. En plus de dissiper l'énergie absorbée par l'émission de photons, les chromophores excités peuvent propager cet état excité dans des molécules avoisinantes par des mécanismes de transfert d'énergie. L'énergie transférée réagit avec l'oxygène moléculaire pour former des espèces réactives à l'oxygène telles que l'oxygène singulet, le peroxyde d'hydrogène et des superoxydes (Franks AT et al., 2015).

Les UVA ont également été démontrés pour causer des dommages aux cellules par des mécanismes dépendant du fer. L'exposition de kératinocytes et de fibroblastes de la peau aux UVA a montré un relâchement des molécules de fer (Fe) provenant des réserves cellulaires comme la ferritine et les hèmes. Les hèmes constituent des sous-unités prosthétiques importantes des métalloprotéines et sont également des éléments essentiels qui constituent le cytochrome c oxydase nécessaire à la chaîne respiratoire (Pourzand C et al., 1999). Bien que la cellule possède une machinerie d'homéostasie du fer, une trop grande quantité de fer qui est libérée risque de ne pas être régulée et de subir une réaction de Fenton illustrée dans la figure 1.6.

Réaction de Fenton $Fe^{2+} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{3+} + OH^{\bullet} + OH^-$

Réaction de Photo-Fenton $Fe^{3+} + OH^- \longrightarrow FeOH^{2+}$

$FeOH^{2+} + H_2O_2 \xrightarrow{h\nu} Fe^{2+} + OH^{\bullet}$

Figure 1.6 Réaction de Fenton et de Photo-Fenton. Chacune des réactions mène à la production du radical hydroxyle.

Rapport-Gratuit.com

La réaction de Fenton utilise le Fe^{2+} et le peroxyde d'hydrogène présent dans la cellule pour mener à la création du radical hydroxyle, un puissant oxydant. La réaction de Photo-Fenton quant à elle peut survenir lorsqu'il y a présence d'ions Fe3+, de peroxyde d'hydrogène et des radiations compris entre 280 nm et 405 nm et produit également des radicaux hydroxyles (Bueno VB et al., 2010; Velásquez M et al., 2014). Les espèces réactives à l'oxygène (ROS) ainsi générées peuvent endommager les constituants de la cellule tels que l'ADN, les protéines et les lipides. Les UVA jouent un rôle dans l'oxydation cellulaire et sont plus efficaces que les UVB pour générer des ROS par leur interaction avec les chromophores cellulaires (Baier J et al., 2006). Les UVA peuvent ainsi mener à la formation indirecte de photoproduits par: A) transfert d'énergie résultant en CPD ou par B) processus photodynamique résultant entre autres en purines ou pyrimidines oxydées (Cadet J et al., 2009).

De même, les UVA sont reconnus pour contribuer au bronzage de la peau en activant les pigments de mélanine présente dans les cellules à la surface de la peau, mais ils sont également responsables du photovieillissement prématuré cutané (D'orazio J et al., 2013; World Health Organization, accédé le 4 juin 2016). Plusieurs études ont montré les effets de l'exposition chronique aux UVA sur la peau: on retrouve entre autres une diminution de la synthèse des collagènes et une augmentation de la synthèse des métalloprotéinases matricielles (MMP) qui dégradent la matrice extracellulaire (Fisher GJ et al., 2000; Yaar M and Gilchrest BA 2007). En effet, il a été démontré *in vitro* et *in vivo* que l'exposition aux UVA augmente notamment l'expression de la MMP-1 dans des fibroblastes de derme humain (Wang Y et al., 2014; Battie C et al., 2014; Marionnet C et al., 2011; Wlaschek M et al., 1995). De même, l'expression de la MMP-3 est également augmentée par l'exposition aux UVA (Scharffetter-Kochanek K et al., 2000). Physiquement, il y a donc détérioration de l'ECM de la peau par la perte de collagène dermique, perte d'élasticité et formation de rides tel que revue dans (Battie C et al., 2014; Scharffetter-Kochanek K et al., 2000). Les UVA jouent même un rôle dans l'étiologie de certains cancers de la peau puisqu'il y a accumulation de lésions précancéreuses (Beani JC, 2014; Kim JA et al., 2013).

Néanmoins, les conséquences biochimiques et moléculaires de l'exposition chronique aux UVA sur la cornée, un tissu partageant des caractéristiques avec la peau n'ont pas encore été bien documentés dans la littérature faute de modèle. Ainsi, les résultats expérimentaux présentés au chapitre 4 viennent mettre en lumière l'effet des UVA sur la matrice extracellulaire de la cornée humaine.

1.2.1.1.2 La lumière visible

La lumière visible se divise en six catégories: le violet (360-450 nm), le bleu (450-500 nm), le vert (500-570 nm), le jaune (570-591 nm), l'orange (591-610 nm) et le rouge (610 à 760 nm) (International Organization for Standardization ISO 20473, 2007). L'œil humain absorbe la lumière visible la transforme en signal visuel, nous permettant ainsi d'obtenir de l'information sur notre environnement. La lumière visible joue également un rôle sur le rythme circardien qui lui a un profond effet sur la santé physique et mentale (Emens JS et Burgess HJ, 2015).

Toutefois, la lumière visible comporte une portion qui est sujette à causer de l'oxydation (Yoshida A et al., 2015). La portion la plus énergétique de la lumière située entre 400 nm et 500 nm est nommée lumière visible à haute énergie (HEV) (Logan P et al., 2015). Son effet sur la peau en matière de photovieillissement, d'immunosuppression ou d'émergence de tumeur est malheureusement beaucoup moins caractérisé que pour les UVA par exemple (Vandersee S et al., 2015). La HEV se rend au fond de l'œil où se situe la rétine contrairement aux UVA qui s'arrêtent à l'iris. C'est pourquoi son effet est investigué dans le cadre de maladies oculaires comme la dégénérescence maculaire liée à l'âge ou le mélanome uvéal (Logan et al., 2015). La lumière bleue interagit avec les chromophores présents dans les photorécepteurs de la rétine et les cellules épithéliales pigmentaires, ce qui cause du stress et du dommage oxydatifs (Osborne NN et al., 2010; Logan P et al., 2015).

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

1.2.1.2 L'oxydation endogène par la chaîne respiratoire mitochondriale (OXPHOS)

La chaîne respiratoire mitochondriale est nécessaire à la production d'énergie sous forme d'ATP dont la cellule a besoin. Le détail est schématisé à la figure 1.7.

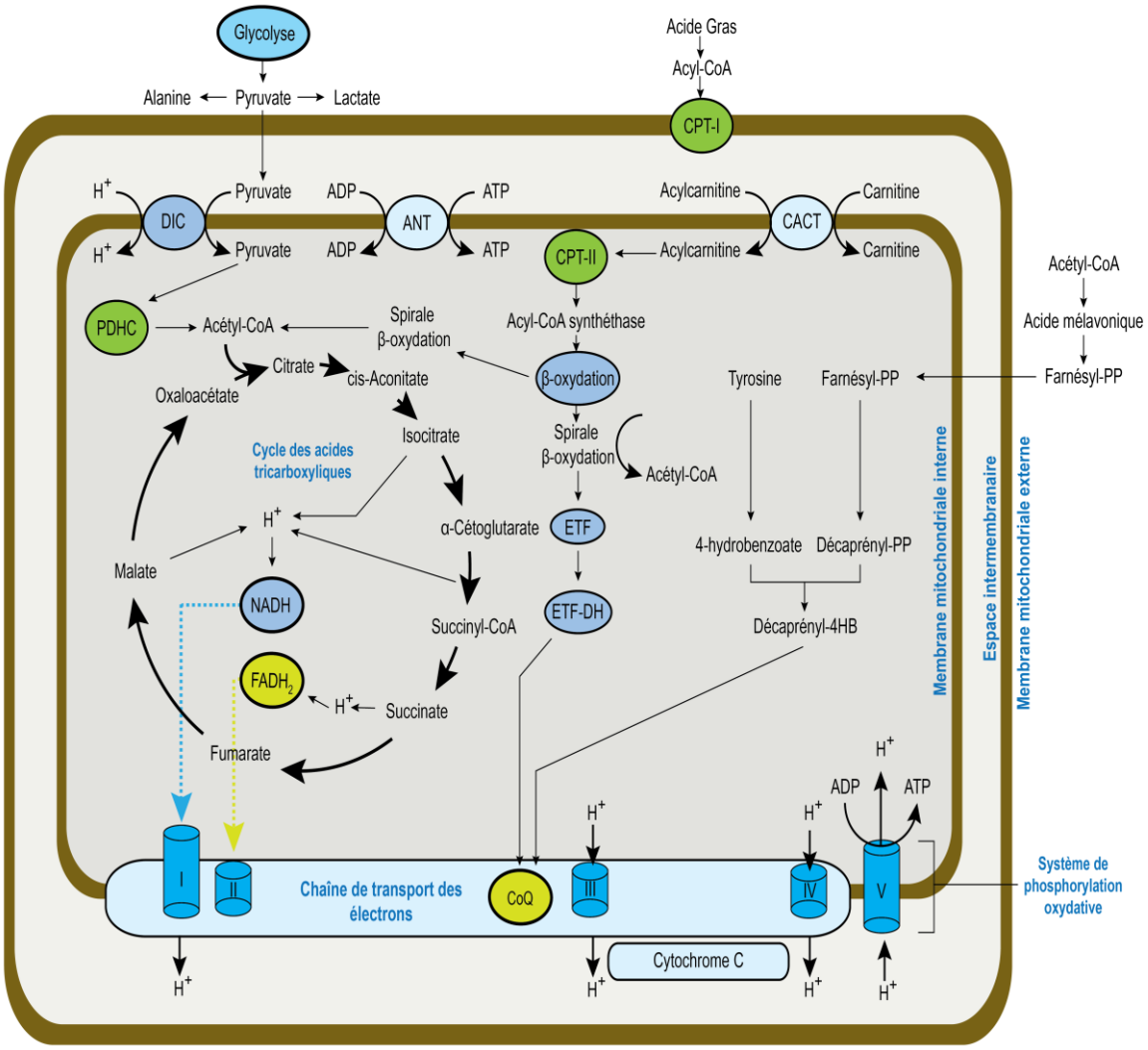


Figure 1.7 Représentation de la chaîne respiratoire adapté de (DiMauro S et al., 2013; Lodish H et al., 2005). Les électrons provenant des déhydrogénases cellulaires du cycle de Krebs (cycle des acides tricarboxyliques) et des spirales β-oxydative (dégradation des acides gras) sont transportés horizontalement sur quatre complexes protéiques (I à IV) et deux transporteurs d'électrons (NADH et $FADH_2$) qui constituent la chaîne de transport des électrons qui est insérée dans la membrane mitochondriale interne (MIM). Les électrons voyagent du complexe I

à IV dans le but de créer un gradient électrochimique de protons sur la longueur de la MIM qui est utilisée pour faire fonctionner le complexe V qui convertit l'ADP en ATP. Le système de phosphorylation oxydative comprend les complexes I à V. Les abréviations suivantes signifient: ANT (translocateur de nucléotides à adénine); CATC (carnitine-acylcarnitine translocase); CoA (coenzyme A); CoQ (coenzyme Q10); CPT (carnitine O-palmitoyltransférase); DIC (transporteur d'acide dicarboxylique); ETF (flavoprotéine de transfert d'électrons); ETF-DH (ETF-ubiquinone déshydrogénase); FAD (flavine adénine dinucléotide) et PDHC (complexe pyruvate déshydrogénase).

Bien que la chaîne respiratoire mitochondriale soit efficace pour la production de 85-90% d'ATP cellulaire, cette dernière mène à la production d'espèces réactives à l'oxygène comme les superoxydes (Jornayvaz FR et al., 2010; Murphy MP, 2009). Des superoxydes sont générés par la chaîne de transport des électrons mitochondrial tel qu'illustré à la figure 1.8.

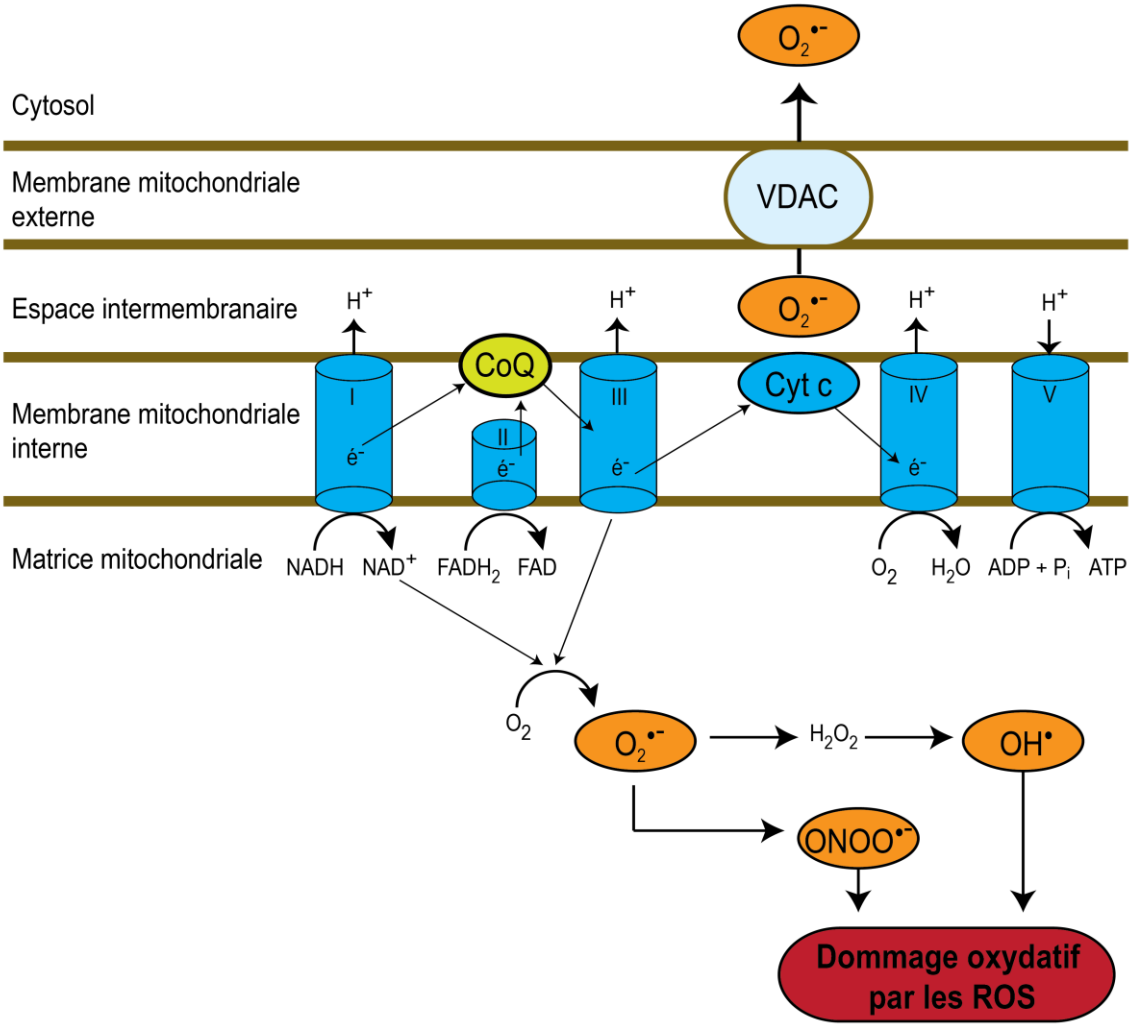


Figure 1.8 Représentation schématique de la production de superoxydes par la chaîne de transport d'électrons mitochondriale adaptée de (Jornayvaz FR et al., 2010). Les anions superoxydes ($O_2^{\bullet -}$) sont produits par les complexes I et III de la chaîne de transport des électrons grâce aux fuites d'électron qui s'effectuent de manière basale. La fuite d'électron survient lorsque les électrons passés le long de la chaîne de transport des électrons sortent avant que la réduction de l'oxygène en eau ait lieu au cytochrome c oxydase. Les électrons ayant fui réagissent avec l'oxygène pour former du superoxyde. Les superoxydes relâchés dans l'espace intermembranaire sont dirigés vers le cytosol par un canal anionique voltage-dépendant (VDAC) où ils seront dismutés par la superoxyde dismutase. Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) présent dans la matrice mitochondriale peut être converti en radical hydroxyle (OH•). Des espèces réactives de l'azote peuvent également être formées par l'interaction entre des anions superoxydes et du monoxyde d'azote (NO), ce qui résulte en du

peroxynitirite (ONOO•-). Le radical hydroxyle et le peroxynitirite sont deux ROS qui peuvent causer du stress oxydatif à la cellule et qui sont générés de manière endogène par la cellule. La coenzyme Q est représenté par (CoQ) et le cytochrome c par (Cyt c).

En sommes, le radical hydroxyle et le peroxynitirite sont deux ROS qui peuvent causer du stress oxydatif à la cellule et qui sont générés de manière endogène par la cellule. De même, plus une cellule aura un métabolisme élevé, plus le niveau de base de fuite d'électron augmentera (Jornayvaz FR et al., 2010; Jastroch M et al., 2010).

1.2.2 Conséquences de l'oxydation et mécanismes de protection

1.2.2.1 Dommage oxydatif à l'ADN: le 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodG)

L'ADN subit des agressions constantes et la réparation des dommages à l'ADN est nécessaire afin de préserver un fonctionnement normal des fonctions cellulaires. Un génome endommagé peut résulter en un mésappariement de l'ADN menant à la création de mutations (substitutions de base, délétions et fragmentation de brin) dont certaines peuvent promouvoir la transformation tumorale (Loft S et Poulsen HE, 1996). Un large éventail d'éléments sont produits lorsqu'il y a oxydation de l'ADN: modifications de base et de sucre, réticulations covalentes ou encore cassures de brin simple ou double tel que revue dans (Valavanidis A et al., 2009). Les dommages oxydatifs à l'ADN sont reconnus pour contribuer au vieillissement, au développement de tumeur maligne et sont impliqués dans plusieurs maladies dégénératives (Valavanidis A et al., 2009). Parmi les dommages oxydatifs exercés sur l'ADN dans la cellule, la lésion oxydative la plus fréquente faite sur l'ADN par des radicaux libres est le 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxo-dG) telle qu'illustrée à la figure 1.9.

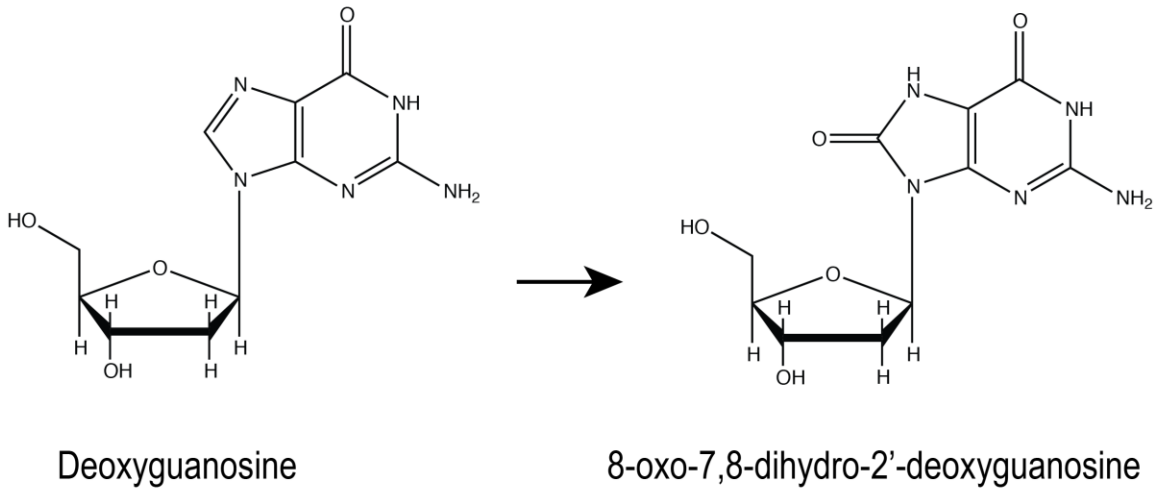


Figure 1.9 Représentation de la formation du 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine par les radicaux de l'oxygène.

Le 8-oxodG est un type de dommage indirect à l'ADN en comparaison au CPD ou au 6-4PP. La 8-oxodG peut être causée par des ROS comme le radical hydroxyle issu de la réaction de Fenton. Les cellules humaines possèdent toutes un niveau de base de dommage oxydatif à l'ADN comme le 8-oxodG étant donné la génération continue de ROS par le métabolisme respiratoire. Toutefois, la balance oxydante-antioxydante et la réparation de l'ADN d'une cellule permettent de pallier à ces dommages (Valavanidis A et al., 2009).

1.2.2.2 La réparation des dommages oxydatifs sur l'ADN

La cellule humaine possède plusieurs mécanismes de réparation de l'ADN afin de pallier aux dommages encourus. Parmi ces mécanismes, on retrouve entre autres la réparation par excision de bases (BER), la réparation par excision de nucléotides (NER), la réparation des mésappariements (MMR) et la réparation de cassure double brin comme la recombinaison homologue (HR) ou la jonction d'extrémités non homologues (NHEJ). Le système de réparation le plus utilisé pour réparer les bases oxydées est le BER (Scott TL et al., 2014). Il a été suggéré qu'une déficience en BER puisse être associée avec des maladies dégénératives (Pal R et al., 2015; Barja G, 2004). De même, il a été démontré qu'une déficience en OGG1, une glycosylase cruciale au bon fonctionnement de la BER, résulte en une augmentation de 20 fois de la quantité de 8-oxodG dans le génome mitochondrial (de Souza-Pinto NC et al., 2001).

1.2.2.3 Les télomères et l'oxydation

Les télomères sont des régions hautement répétées de séquences TTAGGG situées aux extrémités de chaque chromosome eucaryote et sont composés de complexes multifonctionnels ADN-protéine. Ils jouent un rôle dans le maintien de la stabilité chromosomique et dans l'intégrité du génome. Le raccourcissement naturel des télomères de 50 à 200 nucléotides à chaque division cellulaire limite la capacité réplicative des cellules et limite leur immortalité en les menant à la sénescence (Sun B et al., 2015).

Les télomères sont sensibles aux dommages oxydatifs, ce qui cause un raccourcissement télomérique et une accélération de la sénescence (Pawlas N et al., 2015). Le stress oxydatif est reconnu pour accélérer ce raccourcissement télomérique (Zglinicki TV, 2002; Tchirkov A et al., 2003). Ce dernier est associé avec des syndromes de vieillissement prématuré, avec une fonction diminuée des cellules et avec des maladies dégénératives telles que la maladie d'Alzheimer ou l'artériosclérose rénale (Sebastián C et al., 2009; Zhan Y et al., 2015; Mathur S et al., 2014; Sun L et al., 2015; De Vusser K et al., 2015).

La télomérase, une ribonucléoprotéine, compense pour le raccourcissement télomérique en synthétisant des répétitions de séquence TTAGGG aux bouts 3' des chromosomes eucaryotes tel que revue dans (Schmidt JC et Cech TR, 2015). L'activité télomérase est absente ou basse dans les cellules somatiques humaines, elle est toutefois hautement exprimée dans les cellules embryonnaires, dans les cellules germinales adultes, dans les cellules souches de tissu en prolifération et dans 90% des tumeurs humaines tel que revue dans (Blasco MA, 2005;). La télomérase est typiquement réactivée lors de la progression tumorale chez l'humain (Hande MP et al., 1997). Cela permet ainsi aux cellules qui expriment la télomérase de pouvoir se diviser indéfiniment.

1.2.2.4 Les antioxydants cellulaires

La cellule possède un mécanisme de défense antioxydant afin de neutraliser les ROS cellulaires comme le radical hydroxyle, les anions superoxydes et le peroxyde d'hydrogène. Les ROS sont neutralisés par des enzymes présentes dans l'œil humain tel que le superoxyde dismutase (SOD), la glutathion peroxydase (GPx), la catalase (CAT), les aldéhydes déshydrogénases (ALDH) et les thiorédoxines/peroxyrédoxines (TRX-Prdx). Ces enzymes antioxydantes peuvent également être utilisées en tant que biomarqueurs de l'oxydoréduction (redox) dans plusieurs maladies (Yang HY et Lee TH., 2015). Le processus de vieillissement a également été démontré pour tendre vers un état où les tissus âgés sont plus oxydés que les tissus jeunes (Perluigi M et al., 2010).

Dépendamment du tissu, les cellules peuvent également contenir des molécules antioxydantes comme l'acide ascorbique (vitamine C), l'acide urique, le rétinol (vitamine A), l'α-tocophérol (forme de vitamine E) ou le

xanthone (Marchitti SA et al., 2011). Dans le cas de l'acide ascorbique, celle-ci est impliquée dans plusieurs fonctions biologiques comme cofacteur d'enzyme et joue un rôle anticancéreux par son activité antioxydante (Naksuriya O et Okonogi S., 2015). La vitamine C est l'antioxydant non enzymatique le plus répandu de la cornée humaine.

1.3 Les mitochondries

Les mitochondries sont des organelles susceptibles aux dommages causés par l'oxydation. Cette section traite de l'effet de l'oxydation sur elles et des conséquences physiologiques qui en découlent.

Les mitochondries sont des organelles intracellulaires essentielles impliquées dans les procédées métaboliques de production d'énergie de l'ATP (voir section 1.2.1.2). Ces organelles sont des descendants d'α-protobactéries et leur origine dans la cellule date d'environ 1,5 milliard d'années lorsque des mitochondries et des cellules eucaryotes ont établi une relation symbiotique. Les mitochondries exécutent plusieurs tâches cellulaires additionnelles à la production d'énergie telles que: l'homéostasie du calcium, la thermogénèse, l'apoptose, la participation à de nombreuses voies métaboliques telle la synthèse d'hème, de stéroïdes ou de protéines fer-souffre (DiMauro S et al., 2013; Gonzalez-Freire M et al., 2015).

1.3.1 Le génome mitochondrial (ADNmt)

Les protéines nécessaires au bon fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale proviennent de deux éléments génomiques:

A) Plusieurs copies d'un génome double brin circulaire composé de 16 569 paires de bases similaires à un génome bactérien. Les copies du génome mitochondrial sont présentes jusqu'à 10 par mitochondries et les mitochondries sont présentent jusqu'à 10 000 par cellules (Attardi G et Schatz G, 1988). Ce génome sert à encoder 22 ARN transfert, 2 ARN ribosomaux et 13 protéines essentielles impliquées dans la phosphorylation oxydative. Le génome mitochondrial est une molécule hautement compacte sans intron et avec une seule région non codante conservée appelée région contrôle (NCR) d'environ 900 paires de bases. Cette région contient l'origine de réplication sur le brin lourd (OH), l'origine de la transcription pour le brin lourd et le brin léger et la fourche de déplacement lors de la réplication. L'ADNmt comporte un brin lourd et un brin léger étant donné leur constitution en purines ou pyrimidines. Le brin lourd contient conséquemment plus de purines que le brin léger et a donc un poids moléculaire plus élevé (Pitceathly RDS et al., 2012).

B) Le génome nucléaire (ADNn) sert également à coder des protéines pour le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale. Parmi celles-ci on retrouve entre autres les 77 sous-unités nécessaires à la

phosphorylation oxydative (OXPHOS), les protéines impliquées dans la transcription et la traduction de l'ADNmt, les protéines nécessaires à l'assemblage du complexe enzymatique de l'OXPHOS et les protéines indispensables dans la biosynthèse de la chaîne de transport des électrons (Calvo S et al., 2006; Pitceathly RDS et al., 2012; Gonzalez-Freire M et al., 2015).

1.3.2 La biogenèse mitochondriale

Les mitochondries par leur origine bactérienne possèdent un génome autoréplicatif. La biogenèse des mitochondries requiert la coordination de la synthèse et de l'importation d'approximativement 1500 protéines encodée par le génome nucléaire et synthétisé par des ribosomes cytosoliques (Baker MJ et al., 2007). La fusion et la fission (division) des mitochondries sont également des évènements coordonnés. La balance entre ces deux évènements est reliée à l'ajustement homéostatique de la masse mitochondriale au besoin métabolique des différentes cellules et tissus (Mishra P et al., 2014). En effet, la réplication de l'ADNmt se fait de manière indépendante du cycle cellulaire et est influencée par plusieurs éléments dont: le stress environnemental tel que l'activité physique, les besoins énergétiques, la restriction calorique, la basse température, la division et différenciation cellulaire et finalement le stress oxydatif (Jornayvaz FR et Shulman GI, 2010). En effet, il a été reporté qu'une demande en énergie régulière dans certains tissus comme les muscles ou les neurones augmente l'activité mitochondriale ainsi que leur nombre dans les cellules. On dénote dans de telles cellules une augmentation en enzymes mitochondriales et en protéines qui constituent l'OXPHOS. Ainsi le nombre de mitochondries dans ces cellules peut varier, de même que leur taille et leur masse (Gollnick et al., 1972; Holloszy JO, 1967).

1.3.3 Susceptibilité de l'ADNmt aux mutations

En comparaison à l'ADNn, l'ADNmt est jusqu'à 20 fois plus susceptible d'être muté (Richter C et al., 1988; Lynch M et al., 2006). Plusieurs facteurs rendent l'ADNmt sensible aux mutations, dont la susceptibilité aux dommages oxydatifs, l'absence d'histones et la réparation limitée. Ces facteurs sont élaborés davantage aux sections 1.3.3.1 à 1.3.3.3.

La présence de ces mutations dans l'ADNmt donne lieu à un état d'hétéroplasmie. L'hétéroplasmie mitochondriale se définit comme la présence dynamique de plus d'un type d'ADNmt dans une même cellule. Il y a alors présence d'ADNmt de type sauvage et de type muté à des ratios variables (Stefano GB et Kream RM, 2016). L'ADNmt muté comprend entre autres des mutations de type délétion qui sont néfastes pour la cellule, ces mutations sont traitées en détail à la section 1.3.4. Le patron d'hétéroplasmie est maintenu de manière stable sur le cours de plusieurs divisions cellulaires chez des cellules filles provenant d'une cellule

Rapport-Gratuit.com

hétéroplasmique (Jayaprakash AD et al., 2015). Un mécanisme de transcomplémentation entre les divers types d'ADNmt est soupçonné d'avoir lieu afin de permettre le fonctionnement bioénergétique des mitochondries (Schon EA et Gilkerson RW, 2010). Le seuil limite de mutation de l'ADNmt avant qu'il y ait dysfonctionnement complet de la chaîne respiratoire dépend de la localisation de la mutation sur l'ADNmt et du tissu (Rossignol R et al., 1999; Gaziev AI et al., 2014). Chez le rat, une étude menée sur des tissus hautement métaboliques comme les muscles, le coeur, le foie, le cerveau ou les reins montre des seuils limite au-dessus de 50% (Rossignol R et al., 1999). En comparaison, des cellules provenant de patients humains atteints de cytopathies mitochondriales vont cliniquement exprimer en général une hétéroplasmie excédant 50% (Nonaka I, 1992).

1.3.3.1 Dommages oxydatifs à l'ADNmt

En effet, l'ADNmt est enclin aux dommages oxydatifs étant donné sa proximité aux sources de radicaux libres comme les espèces réactives à l'oxygène (ROS) provenant de la chaîne respiratoire (Mammucari C et Rizzuto R, 2010; Gonzalez-Freire M et al., 2015). Le processus de phosphorylation oxydative induit de larges quantités de ROS dont notamment des anions superoxyde, du peroxyde d'hydrogène et des radicaux hydroxyles (Patel M et al., 1996; Fridovich I, 1997; Brand MD et al., 2004; Cantu D et al., 2011).

1.3.3.2 Absence d'histones: nucléoides

Également, l'ADNmt est dépourvue de la protection physique des histones et est plutôt compacté par des complexes ADN-protéines d'assemblage nommés nucléoides. Chez l'humain, chaque nucléoide est composé de 1 à 10 copies d'ADNmt et de protéines associées telles que: TFAM qui agit en tant que facteur de transcription et protéine d'assemblage et la polymérase γ; la seule polymérase mitochondriale réplicative et qui possède une lecture d'épreuve limitée. Les nucléoides contiennent également la protéine mtSSB qui joue un rôle dans la stimulation de l'activité de l'ADN hélicase et polymérase mitochondriale en plus de se lier à l'ADNmt pour empêcher l'appariement prématuré lors de l'ouverture de l'ADNmt lors de la réplication. mtSSB permet par sa liaison à l'ADNmt de protéger ce dernier d'être digéré par des nucléases. De plus, les nucléoides contiennent l'hélicase mitochondriale Twinkle qui sert à l'ouverture de l'ADNmt (Gilkerson RW et al., 2008; Ruhanen H et al., 2010; Sen D et al., 2016; Kasiviswanathan R et al., 2012).

1.3.3.3 Système de réparation de l'ADNmt limité

Le système de réparation de l'ADNmt est limité étant donnée l'absence de réparation par excision de nucléotides (NER), mais possède toutefois la réparation par excision de base (BER). En plus de l'absence de NER, la polymérase γ mitochondriale a une fidélité réduite lors de la translésion de dommages oxydatifs

comme les 8-oxo-2'-désoxyguanosine. De même, des études ont démontré que la polymérase γ possède une activité translésionnelle peu efficace contre certains types de dommages. En effet, la polymérase γ est reconnue pour se bloquer facilement à des sites abasiques (Pinz KG et al., 1995; Graziewicz MA et al., 2004). Il a été dénoté que la polymérase γ a une efficacité d'incorporation diminuée lorsqu'elle fait face à un dimère. En effet, la polymérase a une fidélité d'incorporation diminuée jusqu'à 800 fois lorsque la polymérase γ fait face à un CPD de type T-T (Kasiviswanathan R et al., 2012). Cela suggère que la majorité des génomes mitochondriaux contenant des T-T deviendrait dans une situation où le complexe de réplication se bloque et laisse le génome mitochondrial non répliqué (Kasiviswanathan R et al., 2012; Squires S et al., 2004). Selon la fréquence des lésions sur le génome mitochondrial et le nombre de copies de génome, cela peut mener à une déplétion de l'ADNmt. Une autre possibilité est que le blocage de la polymérase puisse mener à une cassure double-brin résultant en des délétions de l'ADNmt. En effet, les dommages induits par les UV peuvent interrompre la réplication normale et fidèle de l'ADNmt par la polymérase γ (Kasiviswanathan R et al., 2012; Krishnan KJ et al., 2008; Atanassova N et al., 2011).

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

1.3.4 Les délétions mitochondriales

Tel que mentionné à la section 1.3.3, l'ADNmt est hautement susceptible aux mutations dont notamment les mutations de changement de cadre, les mutations non-sens et les mutations de délétion (Tomkinson AE et al., 1990; Wallace DC, 1990). La présente section met en lumière les modèles théoriques menant aux délétions mitochondriales.

Une corrélation entre l'ADNmt endommagées par l'oxydation et les délétions mitochondriales a été démontrée (Quan C et al., 2015; Lezza AM et al., 1999). La figure 1.10 représente le modèle consensus du mécanisme de délétion mitochondriale. Le mécanisme moléculaire exact n'est pas entièrement connu, mais la plupart des délétions de l'ADNmt ont été reportées pour comporter des séquences répétées, soit parfaites (68%) ou imparfaites (12%) flanquant les délétions. Plus de 263 délétions de l'ADNmt ont été répertoriées (Samuels DC et al., 2004). Ces délétions se produisent la majorité du temps (85%) entre les deux origines de réplication OH et OL. La raison la plus probable est pour que l'ADNmt muté s'accumule dans une cellule, les molécules mutées doivent conserver leur habileté à se répliquer. Toutefois, un défaut dans la réparation des dommages oxydatifs dans les séquences répétées reste l'hypothèse la plus plausible expliquant les délétions mitochondriales (Chen T et al., 2011; Albertini AM et al., 1982; Krishnan KJ et al., 2008). La ségrégation tant préférentielle ou discriminative de l'ADNmt muté a été rapportée (Rajasimha et al.,2008; Yoneda et al., 1992).

1.3.4.1 Modèle théorique de délétion mitochondriale lors de la réplication de l'ADNmt

Le modèle théorique de délétion mitochondriale lors de la réplication du génome mitochondrial est présenté à la figure 1.10.

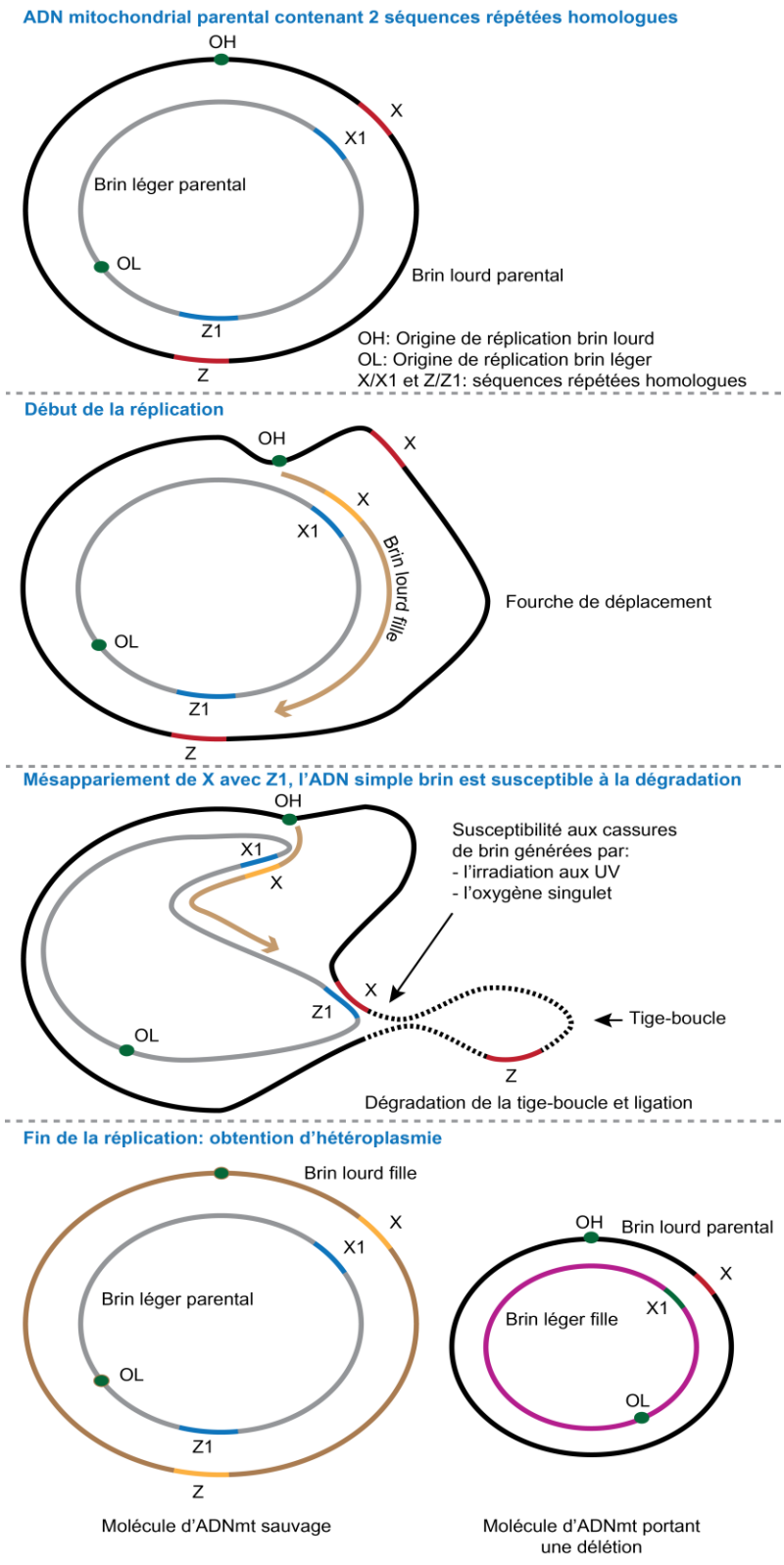


Figure 1.10 Schéma du modèle théorique de délétion mitochondriale, adapté de (Piceathly et al., 2012). Une molécule d'ADNmt double brin contient deux séquences nucléotidiques répétées

homologues (X/X1 et Z/Z1). La réplication est d'abord initiée à l'origine de réplication OH, le brin lourd fille utilise le brin léger parental comme gabarit et cause ainsi la formation d'une fourche de déplacement (D-Loop). La première séquence homologue sur le brin parental (X) se mésapparie avec la seconde séquence nouvellement exposée (Z1) sur le brin léger parental, créant ainsi une tige-boucle. La tige boucle est susceptible, notamment par sa haute concentration en guanosines, aux cassures de brin généré par des sources d'oxygène singulet ou par des irradiations aux UVA. Suite à une cassure, la tige-boucle sera dégradée jusqu'à l'atteinte de la portion double-brin, les bouts francs obtenus subissent ensuite une ligation résultant en une perte d'information génétique. La réplication continue et il y aura obtention d'une molécule d'ADNmt de type sauvage et une molécule d'ADNmt de type muté créant ainsi un état d'hétéroplasmie.

Les erreurs de réplication faite par la polymérase γ ont été reportées pour être la source principale de mutations mitochondriales (Gaziev AI et al., 2014). De plus, il a été reporté que les guanosines représentent la cible de choix pour les modifications par les UVA et l'oxygène singulet (ex: 8-oxo-dG). En effet, le brin lourd de l'ADNmt contient plusieurs répétitions de guanosines de 3 à 5 bases ce qui le rend plus susceptible aux dommages (Berneberg et al., 1999).

1.3.4.2 Autre modèle complémentaire au mécanisme de délétion de l'ADNmt lors de la réparation de dommages

Un modèle complémentaire à celui présenté précédemment propose que les délétions surviennent aussi lors de la réparation de l'ADNmt suite à des cassures bicaténaires plutôt que lors de la réplication (Krishnan KJ et al., 2008). Dans l'environnement mitochondrial, les cassures bicaténaires peuvent être causées de manière endogène par les espèces réactives à l'azote (RONS). Dans certain cas, les cassures bicaténaires peuvent également résulter de la superposition de cassures simple brin sur des brins complémentaires ou encore de la réparation des basés modifiés et de sites apurinique/apyrimidique localisés en proximité une de l'autre (Gaziev AI et al., 2014). Le stress oxydatif peut également provenir d'une source endogène comme la chaîne respiratoire (OXPHOS) ou exogène comme les rayons UV. Les dommages oxydatifs à l'ADNmt ne contribuent pas substantiellement à l'augmentation de la fréquence de mutations, mais plutôt à l'augmentation d'erreur de réparation faite par la polymérase γ.

Lors de la réparation de ces cassures, il y a obtention d'un état de transition nécessaire à la restauration de la fourche de réplication suite à un évènement de blocage. Cet état comporte la création d'ADNmt simple brin généré par une activité exonucléase. L'ADNmt simple brin est alors libre de s'apparier avec des séquences

homologues; la réparation, ligation et dégradation ultérieure des brins simples exposés mèneraient à l'obtention de portions supprimées sur l'ADNmt. Ce modèle est suggéré par (Krishnan KJ et al., 2008) puisque si les délétions se forment seulement durant la réplication, des niveaux supérieurs de délétion mitochondriale devraient être observés dans des cellules en mitose plutôt que dans les cellules post-mitotiques où la réplication de l'ADNmt est moins fréquente. Des expériences effectuées sur des tissus en division ont montré que ce n'était pas le cas (Taylor et al., 2003). De même, le modèle de délétion mitochondriale lors de la réplication de l'ADNmt prédit la conservation de séquences répétées en 3' sur la molécule fille comportant la délétion alors que des expériences ont démontré que cela n'a pas tout le temps lieu (Bue E et al., 2006; Reeve AK et al., 2008).

1.3.5 Le cercle vicieux des délétions mitochondriales

La grandeur et la localisation des délétions mitochondriales peuvent varier comme en témoignent plus de 263 délétions mitochondriales répertoriées (Samuels DC et al., 2004). Les délétions de l'ADNmt suppriment des gènes essentiels qui codent pour des protéines des sous-unités des complexes I, III, IV et V de la chaîne de transport des électrons en plus de certains ARNt nécessaires à la traduction de protéines codant pour les complexes d'OXPHOS. De telles délétions résultent ainsi en un dysfonctionnement de la chaîne respiratoire (Pitceathly RDS et al., 2012). La capacité d'OXPHOS d'une cellule dépend de manière critique sur la quantité d'ADNmt fonctionnel de type sauvage. Un cercle vicieux a été suggéré dans la littérature pour expliquer l'accumulation de délétions de l'ADNmt dans le vieillissement et vice-versa. La figure 1.11 illustre ce cercle vicieux. Le stress oxydatif endogène provenant de la chaîne respiratoire (OXPHOS) ou exogène provenant par exemple des rayons UV induit des délétions de l'ADNmt. Cela mène à une perte de gènes codant pour des protéines ou ARNt nécessaire à la constitution de la chaîne respiratoire. La chaîne respiratoire étant déficiente, il y a production d'une quantité réduite en énergie et davantage d'espèces réactives à l'oxygène (Mammucari C and Rizzuto R., 2010; Wondrak GT et al., 2006). En effet, il a été démontré que les délétions de l'ADNmt s'accumulent lors d'insuffisance métabolique (Herbst A et al., 2013).

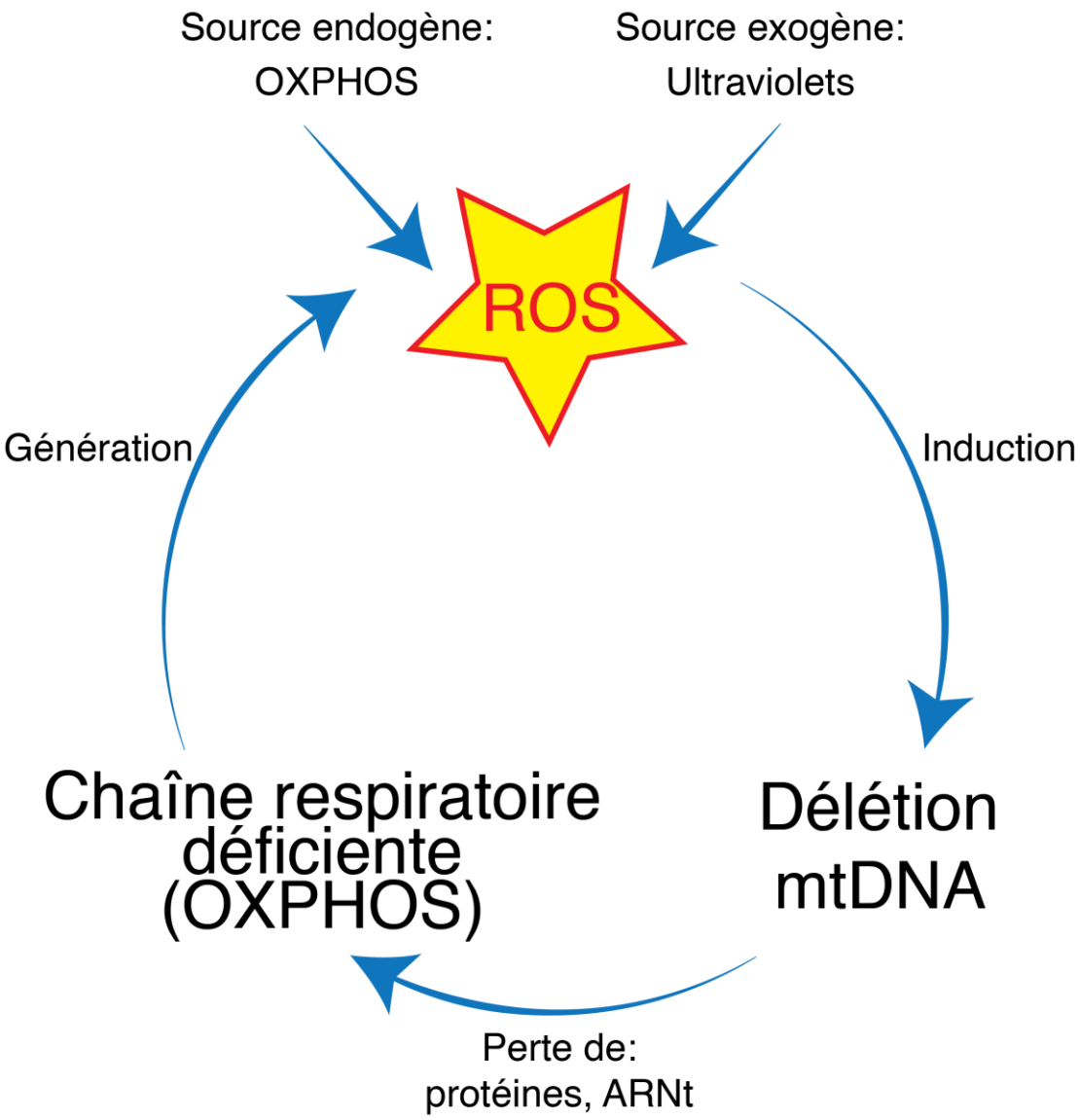


Figure 1.11 Schéma du cercle vicieux de génération des délétions mitochondriales. Le stress oxydatif endogène provenant de sources endogène (OXPHOS) ou exogène (ex: UV) induit des délétions de l'ADNmt. Il en résulte une perte de gènes codant pour des protéines ou ARNt nécessaire à la constitution de la chaîne respiratoire. La chaîne respiratoire étant déficiente, il y a production d'une quantité réduite en énergie et davantage d'espèces réactives à l'oxygène endogène.

1.3.6 Types les plus communs de délétion de l'ADNmt

Le processus de vieillissement a été associé avec l'accumulation de mutations dans l'ADNmt (Berneberg et al., 1997). Ces mutations sont retrouvées dans une variété de maladies dégénératives qui implique habituellement le cerveau, le coeur et les muscles. Certaines des délétions de l'ADNmt ont également été identifiées comme biomarqueurs de l'exposition solaire cumulée dans la peau (Krishnan KJ et al., 2004).

1.3.6.1 La délétion commune de 4977 pb (ADNmt^{CD4977})

Plus de 25% des patients atteint de maladies liées aux délétions de l'ADNmt possèdent une large délétion (Chinnery PF et al., 2000). La plus fréquemment observée dans les tissus humains est une délétion de 4977 paires de bases, communément appelé délétion commune (ADNmt^{CD4977}) (Arnheim N et Cortopassi G, 1992; Wei YH et Lee HC, 2002; Shen J et al., 2016). L'ADNmt^{CD4977} représenté par la figure 1.12 comporte la perte des gènes situés entre les nucléotides en position 8470 et 13 477. Étant la délétion mitochondriale la plus fréquente, cette dernière est considérée comme un marqueur de la présence d'autres délétions de l'ADNmt. Les rayons UV sont importants dans la génération de stress oxydatif et sont considérés comme la cause principale menant à la formation de cassure de brins menant à génération de l'ADNmt^{CD4977} (Cortopassi GA et al., 1992). Parmi les ROS générés, l'oxygène singulet a été démontré pour jouer un rôle important dans les lésions à l'ADNmt. L'accumulation de l'ADNmt^{CD4977} corrèle avec le photovieillissement de la peau (Berneberg et al., 1999). Ainsi l'ADNmt^{CD4977} permet de témoigner de l'effet du stress oxydatif.

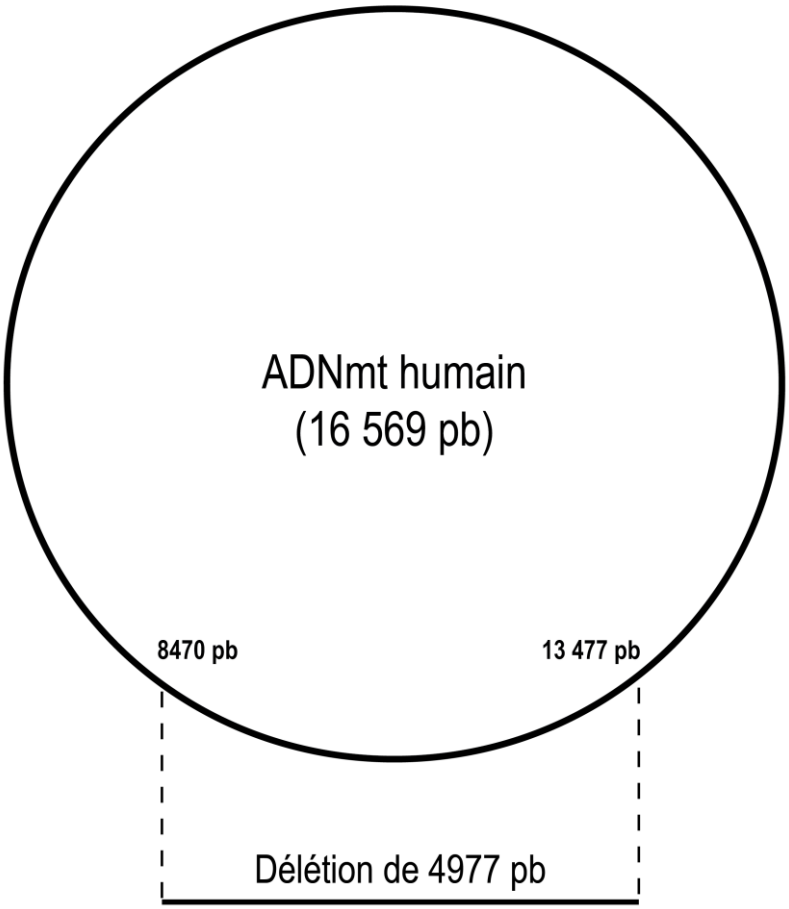


Figure 1.12 Schéma de l'ADNmt représentant la délétion commune de 4977 pb.

L'ADNmt^{CD4977} comporte la perte de gènes codant pour 5 ARNt et 7 protéines. Parmi celles-ci on retrouve la perte de gènes codants pour les ATPases 6 et 8, COXIII , ND3, ND4, ND4L et ND5. Cela résulte en une chaîne respiratoire déficiente puisqu'il y a perte entre autres de l'information codante pour le cytochrome c et des NADH déhydrogénases (Wallace DC et al, 1990; Wang P et al., 2013).

1.3.6.2 La délétion de 3895 pb (ADNmt^{3895})

La délétion mitochondriale de 3895 paires de bases a lieu aux nucléotides entre les positions 547 et 4443 inclusivement et est représentée par la figue 1.13. Cette délétion a initialement été reportée dans des maladies musculaires, le syndrome de Kearns-Sayre et l'ophtalmoplégie externe progressive chronique (Kiyomoto BH et al, 1997; Moraes CT et al., 1995). Cette délétion comporte la perte du site de liaison mtTF1 situé dans le début de la fourche de déplacement (D-loop) qui sert à lier l'ARNt méthionine. Également, la délétion comporte la perte des gènes de l'ARNr 12S, l'ARNr 16S, ND1 et les promoteurs nécessaires à la transcription des brins lourds et légers. Cela résulte en une OXPHOS déficiente. L'ADNmt^{3895} a été reportée

pour être plus fréquente dans de la peau exposée aux radiations solaires en comparaison à de la peau non exposée. Tout comme l'ADNmt^{CD4977}, l'ADNmt^{3895} peut être induite dans des cellules épithéliales de peau suite à une irradiation répétée aux UVA et contribue au photovieillissement de la peau (Harbottle A et Birch-Machin MA, 2006).

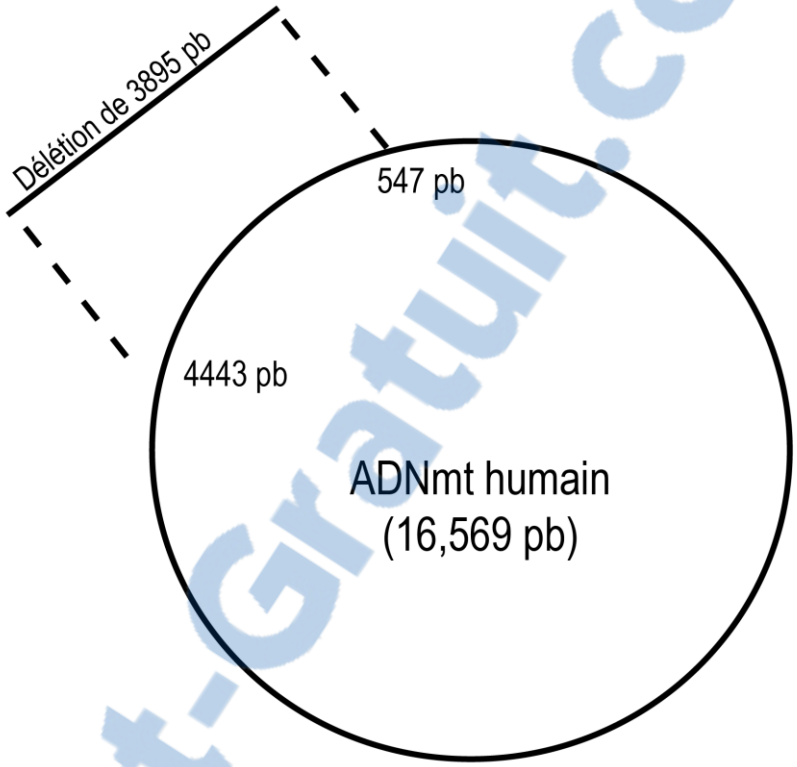


Figure 1.13 Schéma de l'ADNmt représentant la délétion de 3895 pb.

1.3.7 Le phénomène de vieillissement associé aux délétions mitochondriales

Le processus biologique de vieillissement est caractérisé par une perte graduelle des fonctions biologiques et physiologiques de plusieurs organes. Le vieillissement a un impact plus important sur les tissus non réplicatif comme le coeur, les tissus neuronaux comme le cerveau et les muscles squelettiques qui sont hautement dépendants sur le métabolisme oxydatif pour générer de l'énergie (Bua E et al., 2006). L'accumulation de délétions mitochondriales vient perturber le métabolisme oxydatif en exacerbant la production de ROS. Il a été reporté que plusieurs délétions de l'ADNmt comme l'ADNmt^{CD4977} et l'ADNmt^{3895} s'accumulent avec l'âge et commence à apparaitre à partir de 30 ans (Cortopassi GA et al., 1992).

Rapport-Gratuit.com

Également, le renouvellement mitochondrial, le facteur principal contribuant à la maintenance de l'ADNmt et à la fonctionnalité mitochondriale, est affecté par le vieillissement. En effet, la biogenèse mitochondriale, la dynamique mitochondriale (fission et fusion) et la suppression sélective autophagique des mitochondries dysfonctionnelles (mitophagie) ont une activité diminuée avec le vieillissement (Gaziev AI et al., 2014). Une prévalence de l'expansion clonale d'ADNmt muté a également été démontrée comme effet du vieillissement (Johnston W et al., 1995; Popadin K et al., 2014).

Certains facteurs impliqués dans la régulation de la biogenèse mitochondriale, comme l'AMPK (AMP-activated protein kinase) qui sert de senseur énergétique dans les cellules, diminuent avec l'âge. Cela résulte en une baisse de la biogenèse mitochondriale (Jornayvaz FR et Shulman GI, 2010).

Le seuil limite de mutation de l'ADNmt avant qu'il y ait dysfonctionnement de la chaîne respiratoire dépend de la localisation de la mutation. Dans le cas de la maladie de Parkinson, un taux de délétion de 50% de l'ADNmt a été répertorié dans les neurones. Ce seuil limite varie selon le tissu et le niveau d'hétéroplasmie. Toutefois, lorsque la fréquence de mutation de l'ADNmt dépasse le seuil limite; il y a dysfonctionnement de l'homéostasie de l'énergie du tissu et cela favorise le vieillissement et les maladies dégénératives tel que revue dans (Gaziev AI et al., 2014).

Tel que mentionné précédemment, un phénomène de photovieillissement a été identifié dans la peau suite à l'accumulation de délétion de l'ADNmt. Ce phénomène de photovieillissement s'accompagne par plusieurs manifestations physiques telles que l'épaississement de la peau, la formation de rides, la perte d'élasticité, la dégradation de la matrice extracellulaire et la sénescence des cellules (Farage MA et al., 2008; Fisher GJ et al., 2002; Kammeyer A et Luiten RM, 2015).

Les travaux expérimentaux présentés au chapitre 2 et 3 mettent en lumière l'implication potentielle des délétions mitochondriales au niveau de l'œil humain.

1.3.8 Les maladies oculaires associées aux dysfonctions mitochondriales

Le dysfonctionnement mitochondrial est reconnu pour jouer un rôle de plus en plus important dans les maladies ophtalmologiques lié au vieillissement. Cela s'explique entre autres par le rôle critique que joue la mitochondrie dans l'intégrité et la survie cellulaire (Pfleger J et al, 2015). L'œil étant un organe en haute demande en énergétique; que ce soit par les pompes ATPase situées dans l'endothélium cornéen ou les

cellules neurales de la rétine. Ce métabolisme élevé le rend particulièrement sensible aux dommages mitochondriaux induits par le stress oxydatif.

Les maladies oculaires mitochondriales sont divisées en deux catégories selon leur étiologie: primaire ou secondaire. L'étiologie de plusieurs maladies oculaires communes est reportée dans la littérature pour impliquer de plus en plus l'accumulation de mutation et de dommage à l'ADNmt (Schrier SA et Falk MJ, 2011).

D'une part, une pathologie oculaire mitochondriale sera considérée primaire lorsqu'elle résultera d'un défaut direct dans la fonction mitochondriale liée à un gène situé sur l'ADNmt ou sur l'ADNn. De manière notable, seulement 13 des plus de 1000 protéines nécessaires pour la composition et la fonction des mitochondries sont encodées par l'ADNmt. Un exemple de maladie de type primaire est l'atrophie optique dominante qui affecte principalement les cellules ganglionnaires rétiniennes et la couche de fibre nerveuse de la rétine. Cette maladie cause une perte de l'acuité visuelle et affecte 1 personne sur 35 000. Le gène OPA1 a été identifié pour être responsable de la majorité des cas (Ferré M et al., 2009). Un autre exemple est l'ophtalmoplégie externe chronique progressive qui crée un dysfonctionnement de la mobilité des muscles extraoculaires et cause la fermeture des paupières (ptosis). Six gènes nucléaires sont reconnus pour être impliqués dans la maladie: TYMP, OPA1, PEO1, POLG, POLG2 et ANT1 (Schrier SA et Falk MJ, 2011).

D'autre part, une pathologie oculaire mitochondriale sera considérée secondaire lorsqu'elle résultera de facteurs environnementaux et/ou de facteurs génétiques. Les gènes impliqués dans ces maladies ne sont pas tous encore clairement identifiés. Dans le cadre des résultats présentés dans cette thèse, l'attention sera portée sur les maladies de type secondaire étant donnée leur nature multifactorielle et l'implication de stress environnementaux comme le stress oxydatif. Parmi ces pathologies de type secondaire, on retrouve entre autres:

A) La dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) qui est une maladie dégénérative de la rétine. Cette pathologie est responsable en large proportion de la cécité dans la population vieillissante. Les longueurs d'onde lumineuses entre 400 et 700 nm ont été rapportées pour affecter spécifiquement les tissus en haute teneur en mitochondries comme la rétine, en réduisant l'activité des déhydrogénases mitochondriales et en augmentant la formation de ROS. Les cellules ganglionnaires de la rétine sont particulièrement sensibles aux dommages induits par la lumière, dont la HEV (380-495 nm) qui est la plus énergétique du spectre visible. La lumière bleue interagit avec les chromophores présents dans les photorécepteurs et les cellules épithéliales pigmentaires, ce qui cause du stress et dommage oxydatif (Osborne NN et al., 2010). Une étude effectuée par (Kenney MC et al., 2010) a comparé l'ADN dans la rétine et le sang de patients souffrant de DMLA versus des patients sains et a démontré qu'il y avait plus de mutations de l'ADNmt dans les rétines de patients souffrant de DLMA. L'étude regardait plus particulièrement les polymorphismes d'un seul nucléotide (SNP).

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

B) La dystrophie endothéliale de Fuchs est une maladie dégénérative touchant l'endothélium cornéen où l'action du stress oxydatif entre autres est soupçonnée d'être impliqué dans la maladie. Comme un chapitre complet est dédié à cette pathologie, elle est expliquée davantage à la section 1.4.

1.4 La dystrophie cornéenne endothéliale de Fuchs (FECD)

Les travaux expérimentaux présentés au chapitre 5 démontrent un exemple concret de l'implication de l'oxydation et du dysfonctionnement mitochondrial dans une maladie oculaire : la dystrophie endothéliale de Fuchs.

1.4.1 Historique

La dystrophie endothéliale de Fuchs a pour la première fois été décrite en 1910 par Ernst Fuchs comme une «dystrophie de l'épithélium cornéen» (Fuchs E, 1910; Schmedt et al., 2012). Toutefois, ce n'est qu'en 1920 que l'endothélium cornéen a été mis en cause comme la source du problème de la maladie. Durant les années 1920, l'observation histologique de cornées atteintes a permis de démontrer qu'il y avait une accumulation d'excroissances extracellulaires nommées «guttae» sur la membrane de Descemet. Ce n'est que plus tard, vers les années 1980, que davantage d'informations sur la maladie ont été acquises; l'accumulation de guttae est accompagnée par une perte du nombre des cellules endothéliales et cette quantité est inversement proportionnelle au nombre de guttae. (Waring GO, 3rd et al., 1982). Lorsque le nombre de cellules devient trop bas, le rôle de déturgescence des cellules endothéliales cornéennes devient inefficace et les pompes Na^+/K^+ ATPase servant à pomper les fluides ne suffisent plus à exercer leur travail. L'épithélium et le stroma cornéen deviennent ainsi trop hydratés et il y a formation d'un oedème cornéen, ce qui cause une opacification de la cornée et résulte en une perte de la vision. De plus, la progression de la maladie implique des changements à la morphologie des cellules endothéliales: il y a apparition de pléomorphisme (variation dans la forme des cellules) et de polymégatisme (variation dans la taille des cellules) (Polak, 1974; Waring GO, 3rd et al., 1982). La figure 1.14. représente la différence de morphologie entre un endothélium sain et un atteint d'un stade précoce de la dystrophie de Fuchs. Les cellules endothéliales atteintes de la pathologie perdent la morphologie hexagonale qui leur est caractéristique et les cellules occupent plus de volume. On dénote également la présence de guttae, des dépôts majoritairement constitués de collagène VIII (Biwas S et al, 2001).

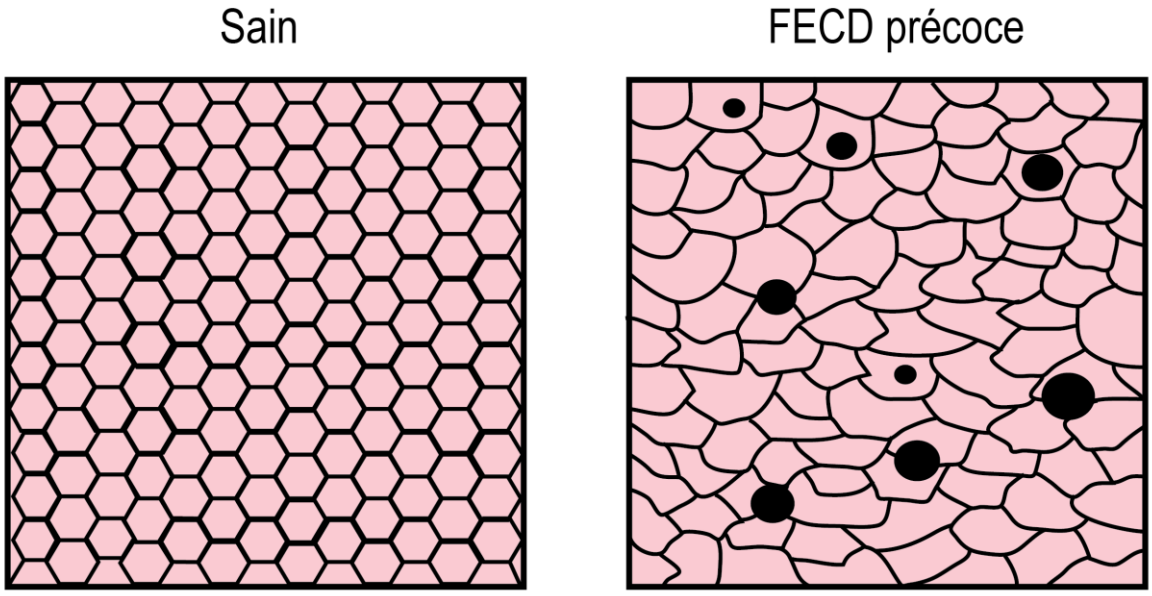


Figure 1.14 Représentation schématique de la différence entre un endothélium sain et un endothélium atteint de la FECD comportant des guttaes adapté de (Laing RA et al., 1981). Dans l'endothélium sain (gauche), on observe un arrangement des cellules homogène ayant une morphologie hexagonale alors que dans l'endothélium pathologique (droit), les cellules présentent du pléomorphisme et du polymégatisme.

1.4.2 Stades cliniques de la maladie

La dystrophie cornéenne endothéliale de Fuchs est une maladie dégénérative de l'endothélium cornéen qui mène à une perte de la vision et est une cause principale de greffe cornéenne. La dystrophie se divise en quatre stades de progression:

1) Le premier stade se caractérise par l'apparition de dépôts de matrice extracellulaire nommée guttae sur la partie centrale de l'endothélium cornéen qui sont excrétés par la membrane de Descemet. Le patient ne présente pas de symptômes à ce stage. Habituellement, les guttaes débutent dans le centre de la cornée, puis apparaissent en périphérie.

2) Le second stade se caractérise par une perte permanente de cellules endothéliales accompagnée d'une augmentation de phléomorphisme et de polymégatisme. Le nombre de guttaes augmente sur la membrane de Descemet et s'étend à la périphérie. L'épaisseur de l'endothélium proche des jonctions cellulaires et où les

guttaes peuvent être aussi minces que 0,2 μm (Bergmanson JP et al., 1999). Au niveau clinique, le patient présente une diminution de la vision sans douleur et de l'éblouissement causés par une augmentation de l'oedème du stroma cornéen.

3) Le troisième stade se caractérise par la progression d'oedème cornéen accompagnée d'une fonction altérée des pompes à ions des cellules endothéliales. L'oedème progresse au niveau épithélial et il y a formation de bulles épithéliales et sous-épithéliales (Adamis AP et al., 1993). La rupture des ces bulles cause de la douleur et expose le patient à un plus haut risque d'infection (Bourne WM, 1995; Yanoff M et al., 1996). L'épaisseur de l'épithélium cornéen peut devenir irrégulière et la base de ce dernier peut devenir ondulée, nuisant ainsi à la bonne focalisation de la lumière et à une perte de l'acuité visuelle (Iwamoto T et al., 1971). Dans les zones comportant les guttaes, l'épaisseur de l'endothélium peut être aussi mince que 0,06 μm alors qu'en temps normal l'épaisseur varie de 1,5 à 2,5 μm (Zhang J et al., 2015; Kayes J et Holmberg A, 1964).

4) Le quatrième stade se caractérise par l'opacification de la cornée causant une perte de la vision. Cliniquement le patient est atteint d'oedème chronique de la cornée et présente de la douleur. Il y a vascularisation de la cornée et il y a déposition sous-épithéliale de tissu fibreux contenant principalement du collagène (Waring GO 3rd et al., 1982; Adamis AP et al., 1993; Elhalis H et al., 2010).

1.4.3 Prévalence de la pathologie et traitement

La prévalence de la pathologie est de 897 individus par million aux États-Unis. Ceci représente 278 000 personnes sur une population de 310 millions (Musch et al., 2011). La maladie touche principalement les personnes âgées de plus de 40 ans et présente une prédominance pour le sexe féminin (Schmedt et al., 2012; Elhalis et al., 2010; Rosenblum P et al., 1980). La FECD est la cause principale de greffe de l'endothélium cornéen, elle était responsable de 47,7% des 23 287 greffes d'endothélium cornéen en 2011 aux États-Unis (EBAA, 2011 Eye bank statistical report. Washington, DC; 2012).

Présentement le seul traitement définitif à la pathologie est la greffe de cornée. Plusieurs types de greffes sont possibles:

A) La kératoplastie pénétrante est une procédure invasive consistant à remplacer la cornée en totalité, de l'épithélium à l'endothélium. Ce type de greffe comporte un temps de récupération pour le patient qui peut s'échelonner jusqu'à 1 an. (Rahman I et al., 2009; Hargrave S et al., 2003).

B) La DSAEK «Descemet's stripping automated endothelial keratoplasty» est une procédure peu invasive qui consiste à enlever l'endothélium et la membrane de Descemet malade pour être remplacé par une partie

postérieure du stroma cornéen, une membrane de Descemet et un endothélium d'un donneur sain. La présence d'une partie du stroma cornéen permet une meilleure préparation et manipulation du greffon étant donné sa rigidité. Toutefois, la présence de stroma supplémentaire semble être responsable de certains inconvénients post-chirurgicaux comme de l'astigmatisme postérieur et résulte en une moins bonne acuité visuelle. Le temps de récupération pour cette procédure est généralement rapide allant de 2 à 6 mois (Maier AK et al., 2015).

C) La DMEK «Descemet membrane endothelial keratoplasty» diffère de la DSAEK par le fait que seulement un endothélium sain sur une membrane de Descemet d'un donneur sain est greffé. Il n'y a pas de partie postérieure de stroma cornéen. La réhabilitation est plus rapide que la DSAEK et l'acuité visuelle post-chirurgie est meilleure (Maier AK et al., 2015; Tourtas T et al., 2012).

1.4.4 Facteurs influençant la pathogenèse de la maladie

1.4.4.1 Facteurs génétiques: le gène COL8A2

L'étiologie de la pathologie n'est pas encore bien déterminée, mais l'implication de multiples facteurs incluant l'hérédité, des facteurs hormonaux et environnementaux ont été soulevés (Zhan X et al, 2013).

Sur le plan génétique, les premiers défauts génétiques associés avec la maladie sont des mutations retrouvées dans le gène codant pour la sous-unité α2 du collagène VIII (*COL8A2*). Les mutations dans ce gène sont associées avec la forme précoce de la dystrophie. Plusieurs mutations ont été identifiées par des analyses sur des familles multigénérationnelles; une mutation autosomale dominante de substitution d'une leucine pour un tryptophane (L450W) a été reportée par le groupe de Gottsch et al. (Gottsch JD et al., 2005). Celle-ci a été retrouvée pour des cas de FECD précoce. D'autres mutations ont également été identifiées dans des stades précoces de la maladie pour une tranche d'âge plus jeune de 21 à 48 ans telle que la mutation de substitution de glycine à lysine (Q455K) ou celle de glycine à valine (Q455V) reportée par Biwas et al. et Mok et al., respectivement (Biwas et al., 2001; Mok et al., 2009).

Le collagène VIII est un constituant majeur de la membrane de Descemet secrété par les cellules de l'endothélium cornéen et ce type de collagène est produit de manière aberrante dans le cas de la FECD. Il est soupçonné que les mutations dans ce gène puissent influencer la différenciation terminale des cellules endothéliales cornéennes. De plus, les mutations dans le collagène VIII risquent de causer un dysfonctionnement moléculaire de la matrice extracellulaire puisque ces mutations peuvent affecter la structure tertiaire de la protéine. Malgré l'identification des mutations dans le *COL8A2* dans la forme précoce de la maladie, aucune association entre ces mutations et les mutations de la forme tardive de la maladie n'a

été répertoriée (Elhalis H et al., 2010; Kobayashi A et al., 2004; Aldave AJ et al., 2006). Par ailleurs, un modèle de souris déficiente en collagène VIII a été développé et a montré une diminution de l'épaisseur du stroma cornéen et de la membrane de Descemet, ce qui n'est pas surprenant puisque le collagène VIII est un constituant clé de ces structures. Les cellules endothéliales cornéennes du modèle sont réduites en nombre et présentent également du pléomorphisme et du polymégatisme, mais ne démontre aucune présence de guttae. Cette étude a été une première tentative de comprendre l'interaction entre le collagène VIII et les cellules endothéliales dans le contexte de la maladie (Hopfer U et al., 2005). Toutefois, bien que le modèle généré a des similarités avec les phénotypes de la pathologie, les auteurs ont conclu que le modèle ne reflétait probablement pas la FECD.

1.4.4.2 Facteurs génétiques: le gène SLC4A11

Le gène *SLC4A11* a été associé avec une forme tardive de FECD parmi une cohorte de patients Chinois et Indiens (Vithana EN et al., 2008). L'étude a identifié 3 mutations nonsense et 1 mutation de délétion et estime que 5% de leur patient Chinois et 4 % de leurs patients Indiens étant atteint de la FECD sont attribués à ces mutations dans le gène *SLC4A11*. Ce gène code pour la protéine NaBC1 qui fonctionne comme transporteur du bicarbonate (CO_2) et est un cotransporteur du borate de sodium (Elhalis H et al., 2010; Hodson S et Miller F, 1976; Park M et al., 2004). Le bicarbonate est un élément clé pour le bon fonctionnement des pompes de l'endothélium cornéen puisque celles-ci opèrent en «pompant» les ions bicarbonate vers l'humeur aqueuse (Hodson S et Miller F, 1976). NaBC1 facilite le mouvement des molécules d'H_2O à travers la membrane cellulaire. Ce transporteur est localisé dans la membrane basolatérale des cellules endothéliales (Zhang J et al., 2015). Des mutations dans le gène SLC4A11 ont été reportées pour causer de la dystrophie endothéliale congénitale héréditaire (Vithana EN et al., 2008).

1.4.4.3 Facteurs génétiques: les locus chromosomiques

Un certain nombre de locus chromosomiques ont été associés avec des stades avancés de la pathologie. En effet, les locus *FCD1*, *2*, *3* et *4* ont été identifiées par des investigations de pedigrees multigénérationnels sur les chromosomes 13, 18, 5 et 9 respectivement (Sundin OH, Brwman KW et al., 2006; Sundin OH, Jun AS et al., 2006; Riazuddin SA et al., 2009; Riazuddin SA et al., 2010). Une étude de liaison chromosomique a également identifié une implication potentielle des chromosomes 1, 7, 15, 17 et X dans la FECD (Afshari NA et al., 2009). Suite aux résultats obtenus, les auteurs de cette étude ont donc conclu que la FECD pourrait être héritée de manière autosomale dominante et de manière complexe.

1.4.4.4 Facteurs hormonaux

Certaines études montrent que la FECD présente une prévalence pour le sexe féminin dans un ratio de 2,5-3:1 dans la forme tardive de la maladie (Cross HE et al, 1971; Krachmer JH et al., 1978; Waring GO, 3rd et al., 1978; Wilson SE and Bourne WM, 1988). Une autre étude de (Rosemblum P et al, 1980) présente une sévérité de la pathologie augmentée en général chez les femmes. Toutefois, d'autres études ne démontrent aucune disparité entre les sexes (Lorenzetti DW et al., 1967; Santo RM et al., 2005; Margovern M et al., 1979). Ce qui pourrait expliquer ce manque de consensus dans la littérature scientifique est la difficulté d'avoir des pédigrées complets et le manque de pouvoir statistique. Ainsi, c'est pourquoi l'implication des hormones féminines dans l'étiologie de la pathologie reste incertaine.

1.4.4.5 Facteurs environnementaux: Le stress oxydatif

Les cellules endothéliales de la cornée ont une haute activité métabolique étant donnée l'activité de déturgesence du stroma cornéen qu'elles effectuent par le biais de leurs pompes Na^+/K^+ ATPase. Plusieurs évidences suggèrent que le stress oxydatif est impliqué dans la dystrophie cornéenne endothéliale de Fuchs. Des niveaux accrus de dommages oxydatifs et d'apoptose ont été reportés dans les cellules atteintes de la maladie (Jurkunas UV et al., 2010; Greiner MA et al., 2015). De même, une étude récente a démontré une augmentation du nombre de génome mitochondrial et de délétions mitochondriales $ADNmt^{CD4977}$ dans des patients atteints de la FECD (Czarny P et al., 2014). L'ADNmt est une cible primaire pour les dommages causés par l'oxydation.

1.4.4.6 Réduction de la réponse antioxydante

Le groupe de Jurkunas et al. a démontré une diminution de l'expression de plusieurs gènes étant responsables de la réponse antioxydante dans les cellules atteintes de la FECD (Jurkunas et al., 2010). Notamment, des niveaux diminués de l'expression de DJ-1 retrouvé dans la FECD causent une translocation diminuée du facteur Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2), un acteur clé liant le site des éléments de la réponse antioxydante (ARE). Ce site est majeur dans la régulation de la réponse antioxydante. De même, des enzymes antioxydantes comme les peroxidoxines 2 et 5 ainsi que le superoxyde dismutase 2 (SOD2) sont sous-exprimées dans la FECD (Jurkunas et al., 2008).

1.4.5 Le dysfonctionnement des pompes des cellules endothéliales

L'endothélium cornéen joue un rôle important de déturgescence de la cornée. Ce rôle est principalement assumé par les pompes Na^+/K^+ ATPase localisées du côté basolatéral de l'endothélium cornéen qui permettent de transporter activement les fluides hors de la cornée vers l'humeur aqueuse. En contrepartie, les fluides et les nutriments provenant de l'humeur aqueuse passent de manière passive vers la cornée par les cellules endothéliales qui jouent un rôle de barrière sélective. Lorsque les pompes sont dysfonctionnelles, il y a formation d'oedème cornéen (Elhalis H et al., 2010). Il est suggéré que le fonctionnement des pompes et le rôle des barrières endothéliales sont affectés différemment selon le stade de progression de la maladie (Burns WM, 1995; Wilson et al., 1988). Le dysfonctionnement des pompes a été soulevé comme élément clé dans la pathogenèse de la maladie (Bergmanson JP et al., 1999; Jurkunas et al., 2010; Wojcik KA et al., 2013).

1.4.6 Modèle *in vivo* de la FECD par génie tissulaire

Récemment, un modèle *in vivo* de la FECD a été testé par le groupe de (Haydari MN et al., 2012) en utilisant des cellules endothéliales de patients FECD pour créer des endothélia reconstruits par génie tissulaire. Leurs résultats ont démontré qu'il était possible d'obtenir un endothélium reconstruit fonctionnel à partir de cellules de patient atteint par la pathologie dans le contexte d'une xénogreffe chez le félin. Ces résultats suggèrent qu'il y aurait un potentiel de réhabilitation des cellules pathologiques par l'entremise du génie tissulaire. Les résultats expérimentaux présentés au chapitre 5 tentent d'approfondir la compréhension de ce phénomène en regardant l'effet de la mise en culture sur les cellules FECD.

1.5 Contexte et objectifs

Lors de l'élaboration de ce projet, les effets des UVA sur la cornée humaine et l'œil en général étaient encore peu étudiés. Les études portaient majoritairement sur la peau et ceux réalisés sur l'œil étaient souvent faits chez l'animal. La cornée en ayant une structure similaire à la peau et étant également exposée aux rayons UV, nous avons donc entrepris de vérifier si les phénomènes observés chez la peau étaient similaires chez la cornée.

Le but de cette thèse est donc de mieux comprendre l'effet du stress oxydatif exogène et endogène sur la cornée humaine dans un contexte sain et pathologique. Les travaux présentés dans les chapitres suivants aborderont l'effet de cette oxydation sur la cornée humaine en étudiant la fréquence des délétions mitochondriales ADNmt^{CD4977} et ADNmt^{3895} aux chapitres 2 et 3. Le chapitre 4 fera l'étude des changements provoqués par une exposition chronique au stress oxydant exogène généré par les rayons UVA sur la composition de la matrice extracellulaire du stroma cornéen. Le chapitre 5 quant à lui permettra d'étudier une pathologie de la cornée dans laquelle l'oxydation est un facteur étiologique démontré: la dystrophie cornéenne endothéliale de Fuchs.

La cornée et la peau sont deux organes directement exposés à lumière terrestre. Les deux possèdent une structure similaire. En effet, la peau est également composée d'un épithélium et d'un stroma qui s'apparente à la cornée. L'hypoderme cutané diffère toutefois de l'endothélium cornéen. La peau est un organe bien étudié en matière de photovieillissement, d'exposition aux rayons solaire et d'oxydation; alors que la cornée est beaucoup moins bien étudiée. C'est pourquoi les observations faites pour la cornée sont souvent comparées à ceux obtenus pour la peau. Les résultats présentés dans cette thèse permettent d'en connaître davantage sur ces sujets au niveau de la cornée humaine.

1.5.1 Détection de la présence de délétion mitochondriale ADNmt^{CD4977} et ADNmt^{3895} dans la cornée humaine

Tel que décrit aux sections 1.3.5.1 et 1.3.5.2, il est connu que l'exposition de la peau aux rayons UVA induit des délétions mitochondriales. L'accumulation de ces délétions mène également à des phénotypes de photovieillissement.

Les chapitres 2 et 3 ont pour objectifs: (1) d'identifier la fréquence des mutations mitochondriales dans diverses structures de l'œil humain et (2) de vérifier si elles se font plus abondantes avec l'âge. Une

Rapport-Gratuit.com

accumulation des mutations mitochondriales avec l'âge dans la cornée pourrait faire un lien entre notre exposition solaire cumulée dans les yeux humains et le photovieillissement.

De plus, le chapitre 3 tente de porter l'investigation plus loin en étudiant la fréquence de l'ADNmt^{3895} dans la rétine et plus précisément dans la macula où sont situés les photorécepteurs. La rétine telle que présentée à la section 1.1.7 contient des photorécepteurs au métabolisme hautement actif qui risque de produire davantage de stress oxydatif. De même, la lumière bleue présentée à la section 1.2.1.2 est une longueur d'onde qui est connue pour interagir avec les chromophores présents dans les photorécepteurs de la rétine et les cellules épithéliales pigmentaires rétiniennes, ce qui cause du stress et du dommage oxydatif.

1.5.2 Étude de l'effet d'une irradiation chronique aux UVA sur la composition de l'ECM du stroma cornéen

Les chapitres 2 et 3 permettent de démontrer que les délétions mitochondriales ADNmt^{CD4977} et ADNmt^{3895} s'accumulent dans le stroma cornéen avec l'âge (Gendron SP et al., 2012; Gendron SP et al., 2013). C'est donc dans cette structure, qui est constamment exposée aux rayons UVA, que l'oxydation semble être la plus prononcée. Le stroma cornéen étant similaire au derme de la peau où se manifestent les phénomènes de photovieillissement, nous avons voulu comprendre davantage les effets des UVA sur le stroma cornéen. À ce moment, la littérature ne comportait pas d'information sur l'effet des UVA sur le stroma cornéen faute de modèle. Nous avons donc développé notre propre modèle cellulaire de photovieillisment par exposition chronique aux UVA.

Le chapitre 4 a donc pour objectif d'étudier les changements provoqués par une exposition chronique aux UVA sur la composition de la matrice extracellulaire du stroma cornéen.

1.5.3 Étude de l'implication du stress oxydatif dans la dystrophie cornéenne endothéliale de Fuchs

La dystrophie de Fuchs est la pathologie oculaire cornéenne pour laquelle l'oxydation endogène est un facteur contributoire de la maladie. Le chapitre 5 vise ainsi à évaluer les conséquences de cette oxydation sur l'ADN mitochondrial et télomérique afin de mieux comprendre l'effet de l'oxydation endogène sur les cellules de l'endothélium. Également, nous avons observé l'effet de la mise en culture des cellules FECD en démontrant une sélection de cellules fonctionnelles FECD.

Chapitre 2: Mitochondrial DNA common deletion in the human eye: A relation with corneal aging

Mechanisms of Ageing and Development 2012 Fev-Mar 133(2-3):68-74

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

2.1 Résumé en français

La mutation la plus fréquente de l'ADN mitochondrial (ADNmt) est une délétion de 4977 pb connue sous le nom de délétion commune (ADNmt^{CD4977}). L'ADNmt^{CD4977} est relié au photovieillissement de la peau et au vieillissement chronologique des cellules ayant un haut niveau de demande énergétique telles que les neurones et les cellules musculaires. L'œil humain contient aussi bien des structures exposées au soleil (cornée, iris) que des structures à haute demande énergétique (rétine). Dans cette étude, nous avons utilisé une technique hautement sensible de PCR quantitatif pour déterminer la présence de l'ADNmt^{CD4977} dans diverses structures de l'œil humain. Nous avons trouvé que la cornée, la structure la plus antérieure de l'œil, contient la plus haute quantité d'ADNmt^{CD4977} (2,6%, 0,25% et 0,06% dans la cornée, l'iris et la rétine, respectivement). Au niveau de la cornée, l'ADNmt^{CD4977} est presque exclusivement retrouvée dans le stroma, la couche cellulaire conférant la transparence et la rigidité à la cornée humaine (8,59%, 0,13% et 0,05% dans le stroma, l'endothélium et l'épithélium, respectivement). De plus, nous montrons que l'ADNmt^{CD4977} s'accumule avec l'âge dans le stroma cornéen. Nos résultats suggèrent que l'ADNmt^{CD4977} est reliée au photovieillissement plutôt qu'au vieillissement chronologique dans l'œil humain. De façon similaire à l'implication de l'ADNmt^{CD4977} dans les phénotypes de photovieillissement cutanés, nous croyons que les manifestations cliniques du vieillissement cornéen, incluant l'opacification et la rigidification, sont associé avec l'accumulation d'ADNmt^{CD4977} dans le stroma cornéen.

2.2 Article

Mitochondrial DNA common deletion in the human eye: A relation with corneal aging

Sébastien P. Gendron, Justin D. Mallet, Nathalie Bastien, Patrick J. Rochette

LOEX/CUO-Recherche, Centre de recherche du CHA, and Département d'Ophtalmologie, Université Laval, Québec, Canada

* Corresponding author at:

Dr. Patrick J. Rochette

Loex/CUO-Recheche

Centre hospitalier affilié universitaire de Québec

Hôpital du Saint-Sacrement, Bureau H2-10

1050 Chemin Sainte-Foy, Québec, QC, Canada, G1S 4L8

Phone: 1-(418) 682-7568

Fax: 1-(418) 682 8000

E-mail address: Patrick.rochette@orlo.ulaval.ca

2.2.1 Résumé (anglais)

The most frequent mitochondrial DNA (mtDNA) mutation is a 4,977-bp deletion known as the common deletion ($mtDNA^{CD4977}$). $mtDNA^{CD4977}$ is related to skin photo-aging and to chronological aging of cells with high-energy demands such as neurons and muscle cells. The human eye contains both sun-exposed (cornea, iris) and high-energy demand structures (retina). In this study, we employed a highly sensitive quantitative PCR technique to determine $mtDNA^{CD4977}$ occurrence in different structures of the human eye. We found that the cornea, the most anterior structure of the eye, contains the highest amount of $mtDNA^{CD4977}$ (2.6%, 0.25% and 0.06% for the cornea, iris and retina, respectively). Within the cornea, $mtDNA^{CD4977}$ is almost exclusively found in the stroma, the cellular layer conferring transparency and rigidity to the human cornea (8.59%, 0.13% and 0.05% in the stroma, endothelium and epithelium, respectively). Moreover, we show that $mtDNA^{CD4977}$ accumulates with age in the corneal stroma. Taken together, our results suggest that $mtDNA^{CD4977}$ is related to photo-aging rather than chronological aging in the human eye. Similar to the involvement of $mtDNA^{CD4977}$ in skin photo-aging phenotypes, we believe that the clinical manifestations of corneal aging, including clouding and stiffening, are associated with the accumulation of $mtDNA^{CD4977}$ in the corneal stroma.

2.2.2 Introduction

Human mitochondrial DNA (mtDNA) is a 16,569 bp doublestranded circular DNA that encodes 13 polypeptides, 2 rRNAs and 22 tRNAs involved in oxidative phosphorylation (OXPHOS) and in mitochondrial protein synthesis (Anderson et al., 1981; Attardi and Schatz, 1988; Wallace, 1999). There are up to 10 mtDNA copies in each mitochondrion and up to 10,000 mitochondria per cell (Attardi and Schatz, 1988). Therefore, newly acquired mtDNA somatic mutations are heteroplasmic (a mixture of wild-type and mutant mtDNA molecules within a cell). However, the replicative segregation of mutant mtDNA may allow it to become prominent and even lead to homoplasmy (Shen et al., 2010).

When compared with nuclear genomic DNA, the mtDNA genome is particularly vulnerable to DNA insults and is highly susceptible to mutations including deletion, missense and frameshift mutations (Tomkinson et al., 1990; Wallace, 1999). Many factors render mtDNA more sensitive to mutations including the absence of histones, a limited DNA repair capacity and a replication by DNA polymerase γ, which has limited proofreading capacity (Clayton et al., 1974; Longley et al., 2001; Wallace, 1999). More importantly, ATP production through the OXPHOS process leads to DNA-damaging byproducts. This pathway provides 90% of the energy necessary for cellular functions (Shen et al., 2010) but also generates reactive oxygen species (ROS), such as superoxide radicals and hydrogen peroxide, which are able to oxidize DNA (Mammucari and Rizzuto, 2010). This is the major source of endogenous oxidative stress. ROS can also be exogenously generated, primarily by ultraviolet (UV) radiations from the sun. More precisely, UVA induces the formation of oxidatively generated DNA damage through a photodynamic process involving ROS production (Cadet et al., 2009). A correlation between the mispairing of oxidatively damaged repetitive DNA sequences and mtDNA deletions has been demonstrated (Lezza et al., 1999).

The most frequent mtDNA mutation is a 4977 bp deletion ($mtDNA^{CD4977}$), known as the common deletion, affecting 5 tRNAs and 7 protein-coding genes. The $mtDNA^{CD4977}$ deletion is thought to be the consequence of an intragenomic recombination event between two GC-rich 13 bp repeats at nucleotide positions 8470 and 13,477 (Shoffner et al., 1989). This deletion was originally observed in two myopathies, Kearns-Sayres syndrome and chronic progressive external opthalmoplegia (Wallace, 1992). $mtDNA^{CD4977}$ and other mtDNA deletions are frequently detected in aged tissues presenting high-energy demands (Bua et al., 2006; Corral-Debrinski et al., 1992; Cortopassi and Arnheim, 1990; Kraytsberg et al., 2006; Melov et al., 1995). It has thus been proposed that these deletions are related to the aging process.

A vicious cycle has been hypothesized to explain how mtDNA deletions can translate into aging and vice versa. It is thought that oxidative stress induces mtDNA mutations leading to a deficient mitochondrial

respiratory chain, which in turn leads to reduced energy production, increased ROS production and ultimately to tissue aging (Balaban et al., 2005; Wallace et al., 1998). For example, ROS-induced mtDNA^{CD4977} removes many genes that are indispensable for normal mitochondrial functions, which could lead to an abnormal ROS generation by an inefficient OXPHOS process (Peng et al., 2006). The oxidative stress that catalyzes the vicious cycle between mtDNA deletions and aging can come from an endogenous (i.e., OXPHOS process) or an exogenous source (i.e., UV radiations from the sun) (Mammucari and Rizzuto, 2010; Wondrak et al., 2006). As they are exposed to the sun, the skin and eyes are subject to both OXPHOS- and UV-induced oxidative stress. Accordingly, it has been previously reported that the incidence of mtDNA^{CD4977} in the skin is proportional to accumulated UV exposure (photo-aging) (Berneburg et al., 1997; Birch-Machin et al., 1998; Eshaghian et al., 2006; Koch et al., 2001; Krishnan and Birch-Machin, 2006; Ray et al., 2000; Reimann et al., 2008; Yang et al., 1994).

Several aging manifestations (e.g. corneal stiffening and clouding) are present in the corneas of human eyes exposed to both endogenous and exogenous oxidative stress (Faragher et al., 1997; Kotecha et al., 2006). However, the occurrence of mtDNA^{CD4977} has not yet been quantified in the human eye. To shed light on this issue, we quantified the amount of mtDNA^{CD4977} in different human eye structures. We determined that mtDNA^{CD4977} is concentrated in the human cornea and accumulates with corneal aging.

2.2.3 Matériel et Méthodes

All experiments performed in this study were conducted in accordance with our institution's guidelines and the Declaration of Helsinki. The research protocols received approval by the Centre Hospitalier Affilié Universitaire de Québec (CHA) institutional committee for the protection of human subjects.

Human eye treatment and DNA purification

We used 57 human eyes from 7- to 94-year-old post-mortem donors (provided by La Banque d'Yeux du Centre Universitaire d'Ophtalmologie, Québec, Canada) unsuitable for transplantation and without overt mitochondrial diseases. Transplantation exclusion criteria are based on the tissues quality criteria (e.g. scars). In presence of familial history, genetic disease or viruses (e.g. hepatitis, AIDS), the eyes were not enucleated and were thus unavailable for research purpose. All patients but the 7-year-old subject died from classical ''aging'' diseases such as cancer, pneumonia or heart failure. The eyes were removed no later than 1 h after death. They were dissected or frozen at -80 °C for later dissection immediately when they were received, 24–48 h after enucleation.

The cornea, iris and retina were dissected from whole ocular globes then washed 3 times in 1X PBS. To isolate the epithelium, stroma and endothelium, the corneas were incubated in HEPES buffer (0.01 M HEPES, pH 7.45; 0.142 M NaCl, 6.7 mM KCl and 1 mM CaCl2) containing 2 mg/mL dispase II (Roche Applied Science) for 18 h at 4 °C. The epithelium and endothelium were then mechanically separated from the stroma under a dissecting microscope (Carrier et al., 2008). The 3 corneal structures were then washed in 1X PBS.

Total DNA, including mitochondrial and nuclear DNA, was purified using the DNeasy Blood and Tissue Kit according to the manufacturer's protocol with an RNase A treatment (Qiagen).

mtDNA^{CD4977} level analysis by PCR

mtDNA^{CD4977} and total mtDNA were either quantitatively measured on a Rotor-Gene Q real-time thermocycler (Qiagen) or detected by standard PCR on a PTC-200 thermocycler (MJ Research) (Figure 1).

PCR amplifications were performed with primer sets designed to detect mtDNA^{CD4977} (Table 1, Figure 1). These primer sets allow PCR amplification only when the mtDNA molecule is deleted (mtDNA^{CD4977}). We also used primer sets for total mtDNA detection that amplifies an area without previously reported mtDNA mutations (Table 1, Figure 1).

PCR primers for the quantitative PCR (Q-PCR) were designed by Shao et al (2004) according to MITOMAP Human mtDNA Cambridge Sequence data (www.mitomap.org)(Table 1, Figure 1). For the Q-PCR technique, a standard curve was performed with primers detecting total mtDNA (300, 30, 3 and 0.3 ng total DNA/reaction). Those primers are located in cytochrome c oxidase II coding region, just outside the deleted region (Table 1, Figure 1). PCR primers overlapping the common deletion were used to detect $mtDNA^{CD4977}$ using 30 ng total DNA/reaction. PCR reactions were performed in 20 μL reaction volumes containing 1X Brilliant III Ultra Fast SYBR Green Master Mix (Agilent Technologies) and 500 nM of each primer. PCR conditions were as follows: 3 min at 95°C followed by 40 cycles of 20 sec at 95°C and 20 sec at 60°C. The amplification level using primers to detect $mtDNA^{CD4977}$ was compared with the standard curve from primers detecting total mtDNA, and a ratio of "mtDNA molecules containing the common deletion" to "total mtDNA molecules" ($mtDNA^{CD4977}$/mtDNA ratio) was then derived.

PCR primers for the standard PCR were designed by Berneburg et al. (1997) according to the sequence described by Anderson et al. (1981). As for the Q-PCR, primers used to amplify $mtDNA^{CD4977}$ molecules are spanning both sides of the common deletion and primers amplifying all mtDNA molecules are located within a region where no mtDNA mutation has been reported so far. The standard PCR reactions were carried out in 25 μL reaction volumes using a PCR Core Kit mix (Roche Applied Science) with either 2, 5, 10 or 20 ng total DNA, 400 nM of each primer, 200 μM dNTP and 0.4 U Taq DNA polymerase. PCR conditions were as follows: 1 min at 94°C followed by 30 cycles of 30 sec at 94°C, 45 sec at 61°C and 60 sec at 72°C, and a final step of 7 min at 72°C. mtDNA and $mtDNA^{CD4977}$ fragments were detected on an agarose gel.

2.2.4 Résultats

To evaluate the mtDNA^{CD4977} presence in different structures of the human eye, we quantitatively amplified mtDNA by Q-PCR using previously published primers spanning both sides of the common deletion (Shao et al., 2004) (Table 1, Figure 1). These primers, along with our PCR conditions and a short primer extension time, only allow for DNA amplification of the deleted mtDNA molecules. Total mtDNA molecules were amplified with primers located in a region of the mitochondrial genome without reported deletion (Shao et al., 2004) (Table 1, Figure 1). Using the Q-PCR data, we derived the "mtDNA molecules containing the common deletion/total mtDNA molecules" (mtDNA^{CD4977}/mtDNA) ratio. This strategy corrects for the variation of mtDNA copy number between cells.

mtDNA^{CD4977} in different ocular structures

To determine the occurrence of mtDNA^{CD4977} in different ocular structures, we evaluated the mtDNA^{CD4977}/mtDNA ratio in the cornea, iris and retina from subjects with a median age of 65 (n = 9). Among all of the eye structures analyzed, the cornea contains the highest level of mtDNA^{CD4977}. In fact, the mtDNA^{CD4977}/mtDNA ratios are 2.6%, 0.25% and 0.06% for the cornea, iris and retina, respectively (Figure 2A). The occurrence of mtDNA^{CD4977} is significantly different between the 3 ocular structures and follows an inverted gradient from anterior to posterior. By a standard PCR approach using DNA from a 72-year-old subject and a different primer set (Berneburg et al., 1997) (Table 1, Figure 1), we confirmed the presence of a higher amount of mtDNA^{CD4977} in the cornea compared with the retina (Figure 2B).

mtDNA^{CD4977} in the human cornea

After describing the incidence of mtDNA^{CD4977} in structures of the human eye, we studied its formation in the 3 main cellular layers of the cornea (i.e., the epithelium, stroma and endothelium from anterior to posterior) (Figure 3A). This investigation was performed with corneas from subjects with a median age of 77. We determined that the stroma, by far, contains the highest amount of mtDNA^{CD4977} ($p=0.008$ for the stroma compared with both the epithelium and endothelium). More precisely, the mtDNA^{CD4977}/mtDNA ratios are 8.59%, 0.13% and 0.05% in the stroma, endothelium and epithelium, respectively (Figure 3B).

We then verified if mtDNA^{CD4977} was evenly distributed in the central, median and peripheral parts of the cornea (Figure 4A) in subjects with a median age of 82. Due to the impossibility to separate corneal layers when the cornea is cut into small sections, the experiment was performed with the 3 corneal layers kept together. Thus, in this experiment, the calculated mtDNA^{CD4977}/total mtDNA ratio is evaluated with the 3 corneal layers and represents the incidence of mtDNA^{CD4977} in the stroma diluted by its incidence in the

Rapport-Gratuit.com

epithelium and endothelium. We found that the central part of the cornea contains the highest mtDNA^{CD4977} concentration (p=0.002 and 0.018 for the central part compared with the peripheral and median parts, respectively), with mtDNA^{CD4977}/mtDNA ratios of 7.36%, 3.02% and 1.18% for the central, median and peripheral parts, respectively (Figure 4B).

mtDNA^{CD4977} accumulates during human corneal aging

To verify if mtDNA^{CD497} accumulates with human aging, we determined the mtDNA^{CD4977}/total mtDNA ratio in corneal stromas from subjects of different ages (Figure 3). This was performed with corneas from 36 individuals ranging from 50 to 94 years old. Because the eyes come from post-mortem donors, it is difficult to obtain eyes from young individuals. Only one subject under 50 years old (a 7-year-old patient) has been tested, and we found that the level of mtDNA^{CD4977} was undetectable in the corneal stroma.

We arbitrarily divided subjects into 2 age groups (50 to 70 and 70 to 95 years old). We found 5 times more mtDNA^{CD4977} in the older group than in the younger group with median mtDNA^{CD4977}/total mtDNA ratio values of 4.64% and 0.93%, respectively. The difference between the two groups is significant ($p<0.01$), showing a correlation between mtDNA^{CD4977} and human aging in the corneal stroma (Figure 5).

2.2.5 Discussion

mtDNA^{CD4977} incidence has been investigated in many tissues including skeletal muscle, brain tissue and skin (Berneburg et al., 1997; Birch-Machin et al., 1998; Bogliolo et al., 1999; Corral-Debrinski et al., 1992; Koch et al., 2001; Liu et al., 1998; Yang et al., 1994; Yu-Wai-Man et al., 2010). The mtDNA^{CD4977} has also been investigated in two ocular structures (i.e. retina and trabecular meshwork) (Barreau et al., 1996; Izzotti et al., 2010,2011). Using a sensitive Q-PCR technique (Shao et al., 2004), we analyzed the occurrence of mtDNA^{CD4977} in the human eye.

mtDNA^{CD4977} level follows a gradient from anterior to posterior in the human eye

Evidence suggests that oxidatively generated DNA damage are the main cause of mtDNA^{CD4977} formation (Berneburg et al., 1999; Birch-Machin et al., 1998; Hou and Wei, 1996). In cells, the OXPHOS pathway induces oxidative stress by the generation of ROS. This oxidation is more important in cells with a high energetic activity level, such as neurons and muscle cells. In the eye, the sensory cells are located in the retina and are highly active. These sensory retinal cells should thus be exposed to and damaged by ROS. Previous studies found an association between oxidative stress and the progression of age-related macular degeneration (Karunadharma et al. 2010; Kenney et al. 2010). It has also been shown that mtDNA^{CD4977} accumulates in an age-related manner in the human retina (Barreau et al., 1996). More precisely, this study reported an mtDNA^{CD4977}/total mtDNA ratio of 0.016% in the retina (Barreau et al., 1996), which is lower than the 0.06% that we obtained for the retina (Figure 2A) but within the same range. This difference may be explained by the fact that the quantification techniques used to derive those ratios were different.

In the eye, retina cells are the most energetically active cells, and they are thus the most exposed to endogenous oxidative stress. Our result showing that the retina contains the least mtDNA^{CD4977} indicates that the OXPHOS pathway is not the only mechanism implicated in the oxidation process in the eye and that exogenous oxidation is a major source of oxidative stress in the anterior parts of the eye. Among the exogenous factors, human eyes are exposed daily to UV light, which is known to cause oxidative stress and shown to induce mtDNA^{CD4977} in human skin (Berneburg et al., 1997; Birch-Machin et al., 1998; Eshaghian et al., 2006; Koch et al., 2001; Krishnan and Birch-Machin, 2006; Ray et al., 2000; Reimann et al., 2008; Yang et al., 1994). Here, we showed that the mtDNA^{CD4977} mutation forms a gradient from the most UV-exposed part of the eye to the least exposed, with the cornea presenting 10 and 45 times more mtDNA^{CD4977} than the iris and retina, respectively (Figure 2A).

The iris is exposed to UV light but to a lesser extent than the cornea (Lerman, 1980; Mallet and Rochette, 2011; Norren and Vos, 1974). Consequently, the oxidative stress caused by UV exposure in the iris is lower

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

than in corneal layers, where a large part of the UV light is blocked. The melanin type (eumelanin and pheomelanin, both present in different ratios in each individual) found in the iris is the main factor responsible for the eye color. It is well known that melanin is a UV-absorbing chromophore affecting the UV-induced oxidation level (Meredith and Sarna, 2006; Tseng et al., 2009; Young, 1997). We have not been able to correlate eye color with the mtDNA^{CD4977} amount but this does not mean that melanin has no effect on mtDNA^{CD4977} induction. We suspect that aging and cumulative UV exposure are more important than melanin type and their ratio for mtDNA^{CD4977} induction in the iris. Additional experiments must be conducted in this regard. To isolate the real impact of melanin in the mtDNA^{CD4977} formation it would be necessary to obtain eyes without melanin, as found in albino donors, which is almost impossible to obtain.

In the anterior chamber, the trabecular meshwork shows the highest sensitivity to the consequences of oxidative stress, both in term of 8-oxoGua formation and DNA fragmentation (Izzotti et al., 2009). It is postulated that, because they are exposed to UV light, the cornea and the iris possess antioxidant defense mechanisms that are not activated in the trabecular meshwork, making it hypersensitive to oxidation. Izzotti et al. (2010,2011) has measured the level of mtDNA^{CD4977} in the trabecular meshwork. Since we have not investigated it ourselves, it would be hazardous for us to correlates the incidence of mtDNA^{CD4977} in cornea and iris with its incidence in trabecular meshwork. Therefore, we don't know if cornea is preventing or not mtDNA^{CD4977} induction in trabecular meshwork by blocking UV light.

It would have also been interesting to determine mtDNA^{CD4977} induction in the lens, but the harvested DNA from this structure was insufficient to perform Q-PCR. Our gradient result strongly suggests a role for UV light in mtDNA^{CD4977} induction in human eye.

Within the human cornea, mtDNA^{CD4977} is concentrated in the stroma

According to the hypothesis that UV light is involved in mtDNA^{CD4977} formation, it is expected that the epithelium, as the most anterior part of cornea, should contain more mtDNA^{CD4977} than the stroma and the endothelium (Figure 3A). In agreement with this idea, we recently showed that the epithelium is the most damaged corneal layer when the whole eye is exposed to UVB (Mallet and Rochette, 2011). Here, we report that mtDNA^{CD4977} is almost exclusively present in the stroma, where mtDNA^{CD4977} is 65 and 175 times more present than in the endothelium and epithelium, respectively (Figure 3B). This would be surprising, but a similar mtDNA^{CD4977} distribution was observed in the skin, where a preferential induction is observed in the dermis, even if the epidermis is more exposed to UV (Berneburg et al., 2004; Birch-Machin et al., 1998; Krishnan and Birch-Machin, 2006). However, the mtDNA^{CD4977} induction difference between skin layers is not as striking as what we observed between corneal layers (Berneburg et al., 2004). This result is not inconsistent with the involvement of UV in mtDNA^{CD4977} formation. It has been shown that mtDNA^{CD4977} can be induced in

vitro by chronic UVA irradiations in both epidermis keratinocytes (Koch et al., 2001) and dermis fibroblasts (Berneburg et al., 1999). In skin (in vivo), keratinocytes are not sensitive to UV-induced mtDNA^{CD4977} formation. This indicates that a protective mechanism is taking place in those cells in the context of the epidermis. The high turnover of keratinocytes observed in skin is suspected to protect them from mtDNA^{CD4977}. This is consistent with the higher susceptibility of UV-induced mtDNA^{CD4977} found in quiescent dermal fibroblasts.

The fact that the turnover of corneal epithelium cells is high may contribute to explain why virtually no mtDNA^{CD4977} is found in the corneal epithelium but it would not explain the absence of mtDNA^{CD4977} in the endothelium where cells are in quiescent state and are exposed to UV light (S Lerman, 1980; Mallet and Rochette, 2011; Norren and Vos, 1974). Another possible mechanism could explain the specific epithelial and endothelial layers protection against mtDNA^{CD4977} formation is the presence of antioxidants (i.e. ascorbate, superoxide dismutase and glutathione peroxidase) that would prevent UV-induced oxidation. More precisely, it has been shown that ascorbate is up to 8 times more concentrated in corneal epithelium and endothelium compared to corneal stroma (Brubaker et al., 2000; Pirie, 1946 Delamere, 1996; Ringvold et al., 2000). Three different superoxide dismutases (SOD1, 2 and 3) are constitutively expressed in mammalian corneal epithelium and endothelial layers, but not in stroma (Zelko et al., 2002). Moreover, glutathione peroxidase 1 is predominantly localized in the epithelium and endothelium of the cornea (Atalla et al., 1988).

mtDNA^{CD4977} is concentrated in the central region of the cornea

We have shown that the level of mtDNA^{CD4977} is higher in the central region of the human cornea and decreases toward the periphery (Figure 4). This mtDNA^{CD4977} distribution is in agreement with the hypothesis that UV light is responsible for mtDNA^{CD4977} induction in the human eye. Under low light conditions, the eyelid nearly always covers the higher portion of the cornea and is almost completely closed in conditions of intense light (Sliney, 2005). Consequently, the central part of the cornea is the most UV-exposed. A very small portion of the temporal and nasal median and the peripheral parts of the cornea are also exposed to UV but in too small of a surface to affect the average level of mtDNA^{CD4977} detected in those parts.

mtDNA^{CD4977} accumulates during human corneal aging

It is well documented that mtDNA^{CD4977} accumulates with age in human skin (Berneburg et al., 1997; Birch-Machin et al., 1998; Eshaghian et al., 2006; Gerhard et al., 2002; Liu et al., 1998; Yang et al., 1994). There is strong evidence that this accumulation is due to photo-aging rather than normal aging (Berneburg et al., 1997; Birch-Machin et al., 1998; Eshaghian et al., 2006; Yang et al., 1994). Here, we show that there is a significant

correlation between aging and mtDNA^{CD4977} occurrence (Figure 5) and that UV is probably involved in this process (Figure 2-4) in the human cornea.

It has been reported that mtDNA^{CD4977} accumulation has a negative effect on skin collagen organization and degradation (Krutmann and Schroeder, 2009; Majora et al., 2009). Because collagen is an important structural element of the skin, it is possible that the collagen imbalance caused by mtDNA^{CD4977} accumulation is involved in certain phenotypes of skin photo-aging (e.g., appearance of wrinkles/fine lines). In the eye, aging manifests as corneal stiffening and clouding, and mtDNA^{CD4977} accumulation could explain those aging phenotypes (Faragher et al., 1997; Kotecha et al., 2006). Corneal collagen is crucial for its rigidity and transparency properties. It constitutes the main portion of the stroma, where the highest amount of mtDNA^{CD4977} has been found (Figure 3). We believe that mtDNA^{CD4977} accumulation in stromal cells is involved in aging phenotypes, such as corneal clouding and stiffening. Additional extensive studies should be conducted to confirm this hypothesis.

2.2.6 Remerciements

The authors are gratefuls to Dr. Lucie Germain's laboratory (Laval University, Quebec, Canada) for technical support. This work was supported by a grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) to P.J.R.

2.2.7 Références

Anderson, S., Bankier, A.T., Barrell, B.G., de Bruijn, M.H., Coulson, A.R., Drouin, J., Eperon, I.C., Nierlich, D.P., Roe, B.A., Sanger, F., Schreier, P.H., Smith, A.J., Staden, R., Young, I.G., 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. Nature 290, 457-465.

Atalla, L.R., Sevanian, A., Rao, N.A., 1988. Immunohistochemical localization of glutathione peroxidase in ocular tissue. Curr. Eye Res. 7, 1023-1027.

Attardi, G., Schatz, G., 1988. Biogenesis of mitochondria. Annu. Rev. Cell Biol. 4, 289-333.

Balaban, R.S., Nemoto, S., Finkel, T., 2005. Mitochondria, oxidants, and aging. Cell 120, 483-495.

Barreau, E., Brossas, J.Y., Courtois, Y., Treton, J.A., 1996. Accumulation of mitochondrial DNA deletions in human retina during aging. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 37, 384-391.

Berneburg, M., Gattermann, N., Stege, H., Grewe, M., Vogelsang, K., Ruzicka, T., Krutmann, J., 1997. Chronically ultraviolet-exposed human skin shows a higher mutation frequency of mitochondrial DNA as compared to unexposed skin and the hematopoietic system. Photochem. Photobiol. 66, 271-275.

Berneburg, M., Grether-Beck, S., Kurten, V., Ruzicka, T., Briviba, K., Sies, H., Krutmann, J., 1999. Singlet oxygen mediates the UVA-induced generation of the photoaging-associated mitochondrial common deletion. J. Biol. Chem. 274, 15345-15349.

Berneburg, M., Plettenberg, H., Medve-Konig, K., Pfahlberg, A., Gers-Barlag, H., Gefeller, O., Krutmann, J., 2004. Induction of the photoaging-associated mitochondrial common deletion in vivo in normal human skin. J. Invest. Dermatol. 122, 1277-1283.

Birch-Machin, M.A., Tindall, M., Turner, R., Haldane, F., Rees, J.L., 1998. Mitochondrial DNA deletions in human skin reflect photo- rather than chronologic aging. J. Invest. Dermatol. 110, 149-152.

Bogliolo, M., Izzotti, A., De Flora, S., Carli, C., Abbondandolo, A., Degan, P., 1999. Detection of the '4977 bp' mitochondrial DNA deletion in human atherosclerotic lesions. Mutagenesis 14, 77-82.

Brubaker, R.F., Bourne, W.M., Bachman, L.A., McLaren, J.W., 2000. Ascorbic acid content of human corneal epithelium. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 41, 1681-1683.

Bua, E., Johnson, J., Herbst, A., Delong, B., McKenzie, D., Salamat, S., Aiken, J.M., 2006. Mitochondrial DNA-deletion mutations accumulate intracellularly to detrimental levels in aged human skeletal muscle fibers. Am. J. Hum. Genet. 79, 469-480.

Cadet, J., Douki, T., Ravanat, J.L., Di Mascio, P., 2009. Sensitized formation of oxidatively generated damage to cellular DNA by UVA radiation. Photochem. Photobiol. Sci. 8, 903-911.

Carrier, P., Deschambeault, A., Talbot, M., Giasson, C.J., Auger, F.A., Guerin, S.L., Germain, L., 2008. Characterization of wound reepithelialization using a new human tissue-engineered corneal wound healing model. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 49, 1376-1385.

Clayton, D.A., Doda, J.N., Friedberg, E.C., 1974. The absence of a pyrimidine dimer repair mechanism in mammalian mitochondria. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 71, 2777-2781.

Corral-Debrinski, M., Shoffner, J.M., Lott, M.T., Wallace, D.C., 1992. Association of mitochondrial DNA damage with aging and coronary atherosclerotic heart disease. Mutat. Res. 275, 169-180.

Cortopassi, G.A., Arnheim, N., 1990. Detection of a specific mitochondrial DNA deletion in tissues of older humans. Nucleic Acids Res. 18, 6927-6933.

Delamere, N.A., 1996. Ascorbic acid and the eye. Subcell. Biochem. 25, 313-329.

Eshaghian, A., Vleugels, R.A., Canter, J.A., McDonald, M.A., Stasko, T., Sligh, J.E., 2006. Mitochondrial DNA deletions serve as biomarkers of aging in the skin, but are typically absent in nonmelanoma skin cancers. J. Invest. Dermatol. 126, 336-344.

Faragher, R.G., Mulholland, B., Tuft, S.J., Sandeman, S., Khaw, P.T., 1997. Aging and the cornea. Br. J. Ophthalmol. 81, 814-817.

Gerhard, G.S., Benko, F.A., Allen, R.G., Tresini, M., Kalbach, A., Cristofalo, V.J., Gocke, C.D., 2002. Mitochondrial DNA mutation analysis in human skin fibroblasts from fetal, young, and old donors. Mech. Ageing Dev. 123, 155-166.

Hou, J.H., Wei, Y.H., 1996. The unusual structures of the hot-regions flanking large-scale deletions in human mitochondrial DNA. Biochem. J. 318 (Pt 3), 1065-1070.

Izzotti, A., Longobardi, M., Cartiglia, C., Saccà, S.C., 2011. Mitochondrial damage in the trabecular meshwork occurs only in primary open-angle glaucoma and in pseudoexfoliative glaucoma. PLoS One 6, e14567.

Izzotti A., Saccà S.C., Longobardi M., Cartiglia C., 2009. Sensitivity of ocular anterior chamber tissues to oxidative damage and its relevance to the pathogenesis of glaucoma. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 50, 5251-5258.

Izzotti, A., Saccà, S.C., Longobardi, M., Cartiglia, C., 2010. Mitochondrial damage in the trabecular meshwork of patients with glaucoma. Arch. Ophthalmol. 128, 724-730.

Karunadharma, P.P., Nordgaard, C.L., Olsen, T.W., Ferrington, D.A., 2010. Mitochondrial DNA damage as a potential mechanism for age-related macular degeneration. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 51, 5470-5479.

Kenney, M.C., Atilano, S.R., Boyer, D., Chwa, M., Chak, G., Chinichian, S., Coskun, P., Wallace, D.C., Nesburn, A.B., Udar, N.S., 2010. Characterization of retinal and blood mitochondrial DNA from age-related macular degeneration patients. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 51, 4289-4297.

Koch, H., Wittern, K.P., Bergemann, J., 2001. In human keratinocytes the Common Deletion reflects donor variabilities rather than chronologic aging and can be induced by ultraviolet A irradiation. J. Invest. Dermatol. 117, 892-897.

Kotecha, A., Elsheikh, A., Roberts, C.R., Zhu, H., Garway-Heath, D.F., 2006. Corneal thickness- and age-related biomechanical properties of the cornea measured with the ocular response analyzer. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 47, 5337-5347.

Kraytsberg, Y., Kudryavtseva, E., McKee, A.C., Geula, C., Kowall, N.W., Khrapko, K., 2006. Mitochondrial DNA deletions are abundant and cause functional impairment in aged human substantia nigra neurons. Nat. Genet. 38, 518-520.

Krishnan, K.J., Birch-Machin, M.A., 2006. The incidence of both tandem duplications and the common deletion in mtDNA from three distinct categories of sun-exposed human skin and in prolonged culture of fibroblasts. J. Invest. Dermatol. 126, 408-415.

Krutmann, J., Schroeder, P., 2009. Role of mitochondria in photoaging of human skin: the defective powerhouse model. J. Investig. Dermatol. Symp. Proc. 14, 44-49.

Lerman, S., 1980. Radiant energy and the eye. Macmillan Publishing Co., Inc., New York.

Lezza, A.M., Mecocci, P., Cormio, A., Beal, M.F., Cherubini, A., Cantatore, P., Senin, U., Gadaleta, M.N., 1999. Mitochondrial DNA 4977 bp deletion and OH8dG levels correlate in the brain of aged subjects but not Alzheimer's disease patients. FASEB J. 13, 1083-1088.

Liu, V.W., Zhang, C., Pang, C.Y., Lee, H.C., Lu, C.Y., Wei, Y.H., Nagley, P., 1998. Independent occurrence of somatic mutations in mitochondrial DNA of human skin from subjects of various ages. Hum. Mutat. 11, 191-196.

Longley, M.J., Nguyen, D., Kunkel, T.A., Copeland, W.C., 2001. The fidelity of human DNA polymerase gamma with and without exonucleolytic proofreading and the p55 accessory subunit. J. Biol. Chem. 276, 38555-38562.

Majora, M., Wittkampf, T., Schuermann, B., Schneider, M., Franke, S., Grether-Beck, S., Wilichowski, E., Bernerd, F., Schroeder, P., Krutmann, J., 2009. Functional consequences of mitochondrial DNA deletions in human skin fibroblasts: increased contractile strength in collagen lattices is due to oxidative stress-induced lysyl oxidase activity. Am. J. Pathol. 175, 1019-1029.

Mallet, J.D., Rochette, P.J., 2011. Ultraviolet light-induced cyclobutane pyrimidine dimers in rabbit eyes. Photochem. Photobiol. 87, 1363-1368.

Mammucari, C., Rizzuto, R., 2010. Signaling pathways in mitochondrial dysfunction and aging. Mech. Ageing Dev. 131, 536-543.

Melov, S., Shoffner, J.M., Kaufman, A., Wallace, D.C., 1995. Marked increase in the number and variety of mitochondrial DNA rearrangements in aging human skeletal muscle. Nucleic Acids Res. 23, 4122-4126.

Meredith, P., Sarna, T., 2006. The physical and chemical properties of eumelanin. Pigment Cell Res 19, 572-594.

Norren, D.V., Vos, J.J., 1974. Spectral transmission of the human ocular media. Vision Res. 14, 1237-1244.

Peng, T.I., Yu, P.R., Chen, J.Y., Wang, H.L., Wu, H.Y., Wei, Y.H., Jou, M.J., 2006. Visualizing common deletion of mitochondrial DNA-augmented mitochondrial reactive oxygen species generation and apoptosis upon oxidative stress. Biochim. Biophys. Acta 1762, 241-255.

Pirie, A., 1946. Ascorbic acid content of cornea. Biochem. J. 40, 96-100.

Ray, A.J., Turner, R., Nikaido, O., Rees, J.L., Birch-Machin, M.A., 2000. The spectrum of mitochondrial DNA deletions is a ubiquitous marker of ultraviolet radiation exposure in human skin. J. Invest. Dermatol. 115, 674-679.

Reimann, V., Kramer, U., Sugiri, D., Schroeder, P., Hoffmann, B., Medve-Koenigs, K., Jockel, K.H., Ranft, U., Krutmann, J., 2008. Sunbed use induces the photoaging-associated mitochondrial common deletion. J. Invest. Dermatol. 128, 1294-1297.

Ringvold, A., Anderssen, E., Kjonniksen, I., 2000. Distribution of ascorbate in the anterior bovine eye. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 41, 20-23.

Shao, J.Y., Gao, H.Y., Li, Y.H., Zhang, Y., Lu, Y.Y., Zeng, Y.X., 2004. Quantitative detection of common deletion of mitochondrial DNA in hepatocellular carcinoma and hepatocellular nodular hyperplasia. World J. Gastroenterol. 10, 1560-1564.

Shen, L., Fang, H., Chen, T., He, J., Zhang, M., Wei, X., Xin, Y., Jiang, Y., Ding, Z., Ji, J., Lu, J., Bai, Y., 2010. Evaluating mitochondrial DNA in cancer occurrence and development. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1201, 26-33.

Shoffner, J.M., Lott, M.T., Voljavec, A.S., Soueidan, S.A., Costigan, D.A., Wallace, D.C., 1989. Spontaneous Kearns-Sayre/chronic external ophthalmoplegia plus syndrome associated with a mitochondrial DNA deletion: a slip-replication model and metabolic therapy. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86, 7952-7956.

Sliney, D.H., 2005. Exposure geometry and spectral environment determine photobiological effects on the human eye. Photochem. Photobiol. 81, 483-489.

Tomkinson, A.E., Bonk, R.T., Kim, J., Bartfeld, N., Linn, S., 1990. Mammalian mitochondrial endonuclease activities specific for ultraviolet-irradiated DNA. Nucleic Acids Res. 18, 929-935.

Tseng, S.H., Bargo, P., Durkin, A., Kollias, N., 2009. Chromophore concentrations, absorption and scattering properties of human skin in-vivo. Opt. Express 17, 14599-14617.

Wallace, D.C., 1992. Mitochondrial genetics: a paradigm for aging and degenerative diseases? Science 256, 628-632.

Wallace, D.C., 1999. Mitochondrial diseases in man and mouse. Science 283, 1482-1488.

Wallace, D.C., Brown, M.D., Melov, S., Graham, B., Lott, M., 1998. Mitochondrial biology, degenerative diseases and aging. Biofactors 7, 187-190. Wondrak, G.T., Jacobson, M.K., Jacobson, E.L., 2006. Endogenous UVA-photosensitizers: mediators of skin photodamage and novel targets for skin photoprotection. Photochem. Photobiol. Sci. 5, 215-237.

Yang, J.H., Lee, H.C., Lin, K.J., Wei, Y.H., 1994. A specific 4977-bp deletion of mitochondrial DNA in human ageing skin. Arch. Dermatol. Res. 286, 386-390.

Young, A.R., 1997. Chromophores in human skin. Phys. Med. Biol. 42, 789-802.

Yu-Wai-Man, P., Lai-Cheong, J., Borthwick, G.M., He, L., Taylor, G.A., Greaves, L.C., Taylor, R.W., Griffiths, P.G., Turnbull, D.M., 2010. Somatic mitochondrial DNA deletions accumulate to high levels in aging human extraocular muscles. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 51, 3347-3353.

Zelko, I.N., Mariani, T.J., Folz, R.J., 2002. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. Free Radic. Biol. Med. 33, 337-349.

Rapport-Gratuit.com

2.2.8 Table et Figures

		Primers	Amplicon size (bp)	Position	References
Q-PCR	mtDNA^{CD4977}	A1 5'-TATTAAACACAAACTACCACCTACC	132	8448-8472	Shao et al.(2004)
		A2 5'-GGCTCAGGCGTT TGTGTATGAT		13560-13539	
	mtDNA	B1 5'-AATCAATTGGCGACCAATGG	101	7878-7897	
		B2 5'-CGCCTGGTTCTAGGAATAATGG		7979-7958	
Standard PCR	mtDNA^{CD4977}	C1 5'-TGAACCTACGAGTACACCGA	772	7901-7920	Berneburg et al. (1997)
		C2 5'-GGGGAAGCGAGGTTGACCTG		13650-13631	
	mtDNA	D1 5'-CTTACCACGCTACTCCTACC	526	5463-5482	
		D2 5'-AGGACTCCAGCTCATGCGCC		5989-5870	

Table 2.1 List of oligonucleotide PCR primers used in this study.

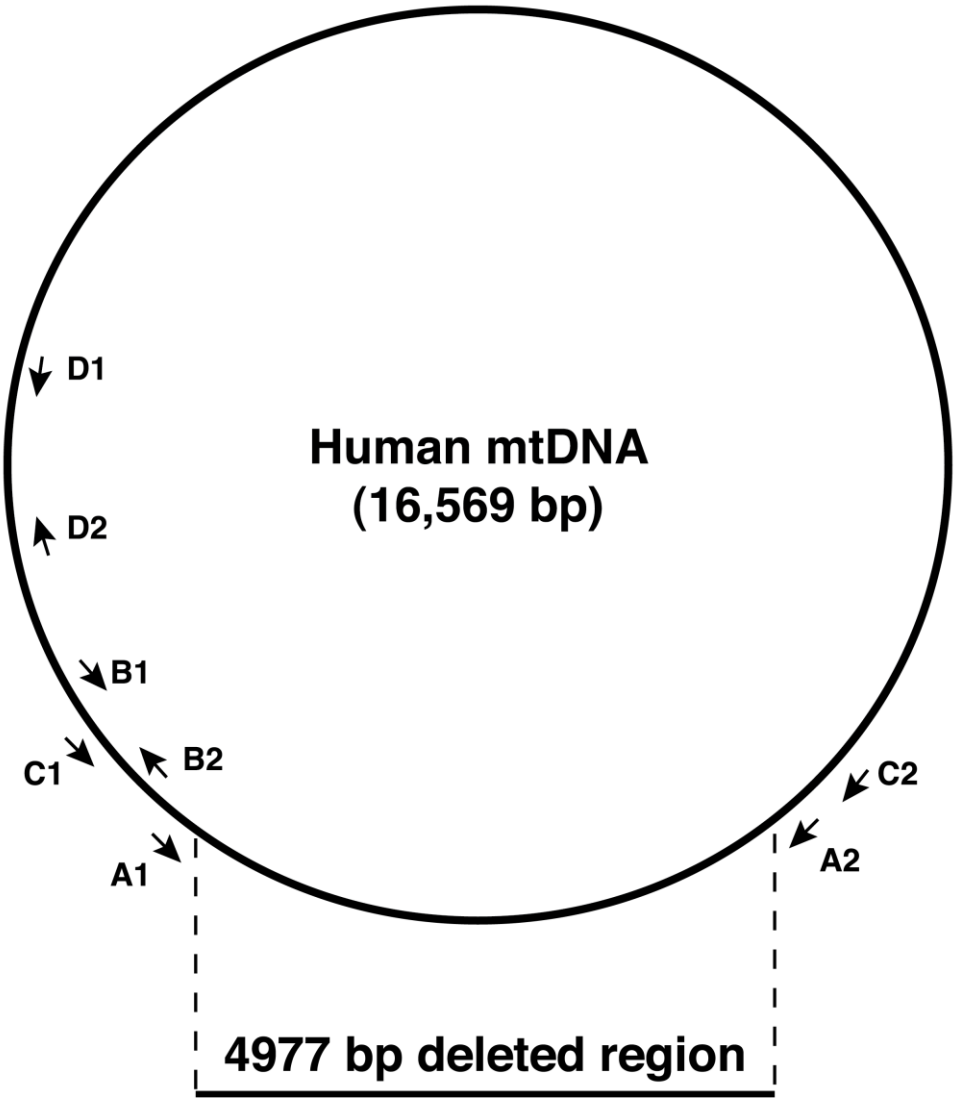


Figure 2.1 Schematic representation of human mtDNA indicating the PCR primer positions. Arrows indicate primer binding sites and directions. Primer sets A1/A2 and C1/C2 are designed to only amplify mtDNA molecules carrying the mtDNA^{CD4977} using Q-PCR and standard PCR techniques, respectively. Primer sets B1/B2 and D1/D2 were used to detect total mtDNA using Q-PCR and standard PCR techniques, respectively. Both primer sets were designed to amplify an mtDNA region with no previously reported deletion.

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

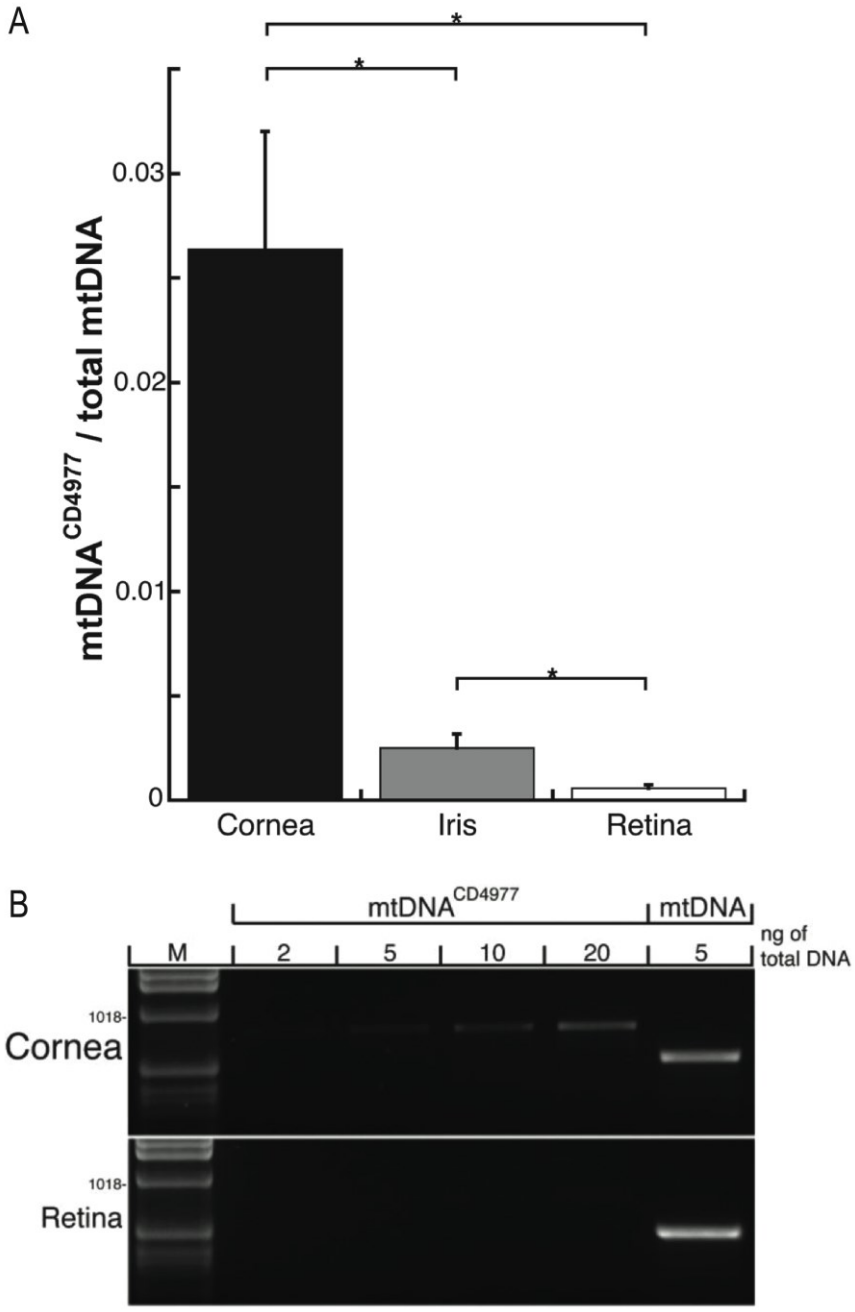


Figure 2.2 mtDNA^{CD4977} occurences follows a gradient from anterior to posterior eye structures. The cornea, iris and retina were dissected, and total DNA was extracted from each structure. The cornea, iris and retina were dissected, and total DNA was extracted from each structure, mtDNA and mtDNA^{CD4977} were then detected by PCR.

A) mtDNA^{CD4977}/total mtDNA ratios were evaluated by Q-PCR in the cornea, iris and retina of 9 human subjects with a median age of 65 years. The result depicted in the histogram clearly shows a higher level of

mtDNA^{CD4977} in the cornea (2.64%), followed by the iris (0.25%) and the retina (0.06%) According to the two-tailed heteroscedastic Student's t-test, the mtDNA^{CD4977}/total mtDNA ratio was significantly different between each ocular structure analyzed (* $p<0.00004$).

B) Confirmation of mtDNA^{CD4977} predominance in the cornea by standard PCR in a 72-year-old subject.

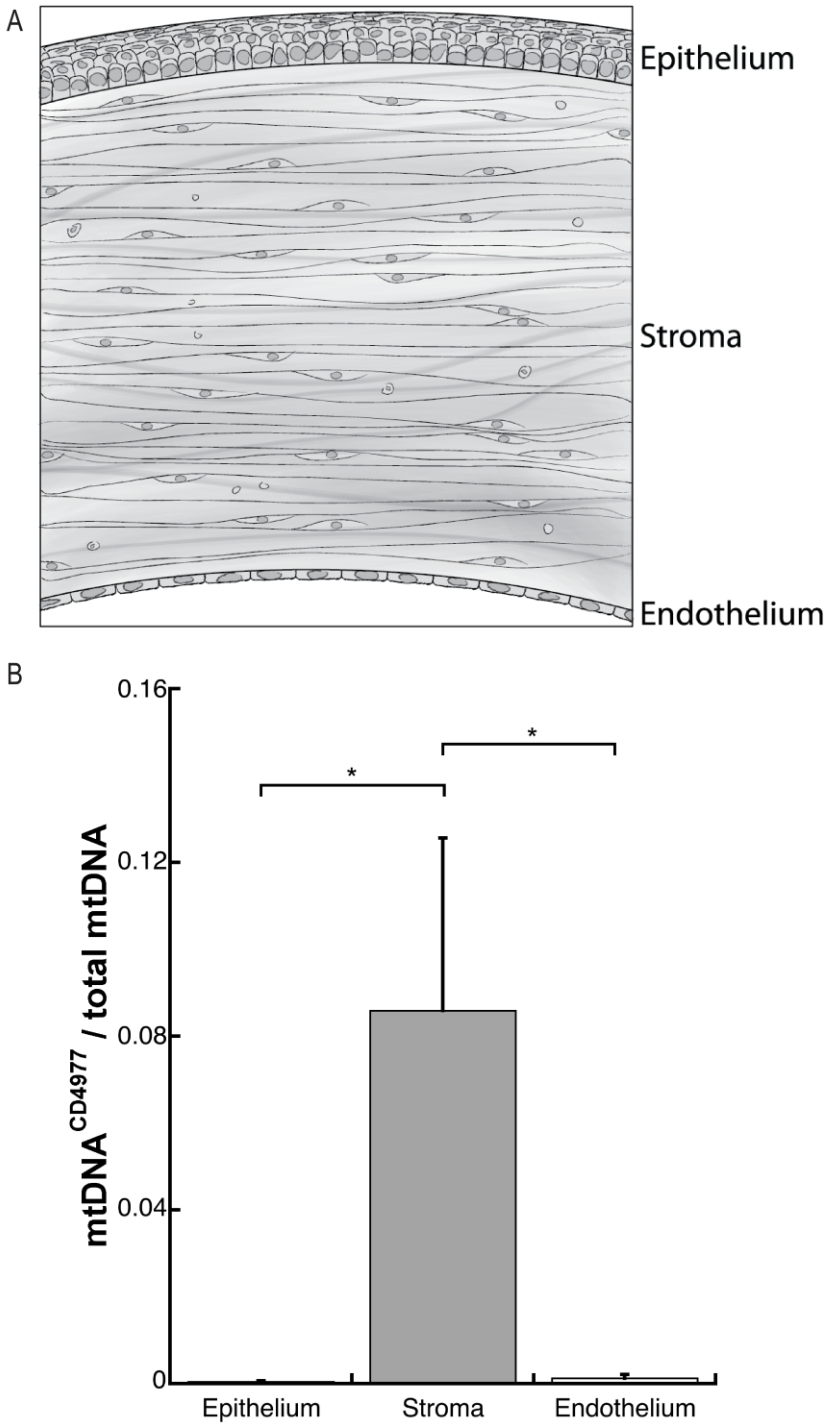


Figure 2.3 Within the cornea, mtDNA^{CD4977} is concentrated in the stroma.

A) Schematic representation of the human cornea consisting of 3 main layers, i.e., the epithelium, stroma and endothelium from the anterior to posterior.

B) mtDNA^{CD4977}/total mtDNA ratios were evaluated by Q-PCR in the corneal epithelium, stroma and endothelium of 10 human subjects with a median age of 77 years. Corneas were dissected, and their layers were separated by dispase treatment. As depicted in the histogram, mtDNA^{CD4977} is highly concentrated in the stroma (8.86%) but essentially absent from the epithelium (0.05%) and endothelium (0.13%). According to the two-tailed heteroscedastic Student's t-test, the mtDNA^{CD4977}/total mtDNA ratio was significantly different between the stroma and both the epithelium and endothelium (* $p < 0.01$).

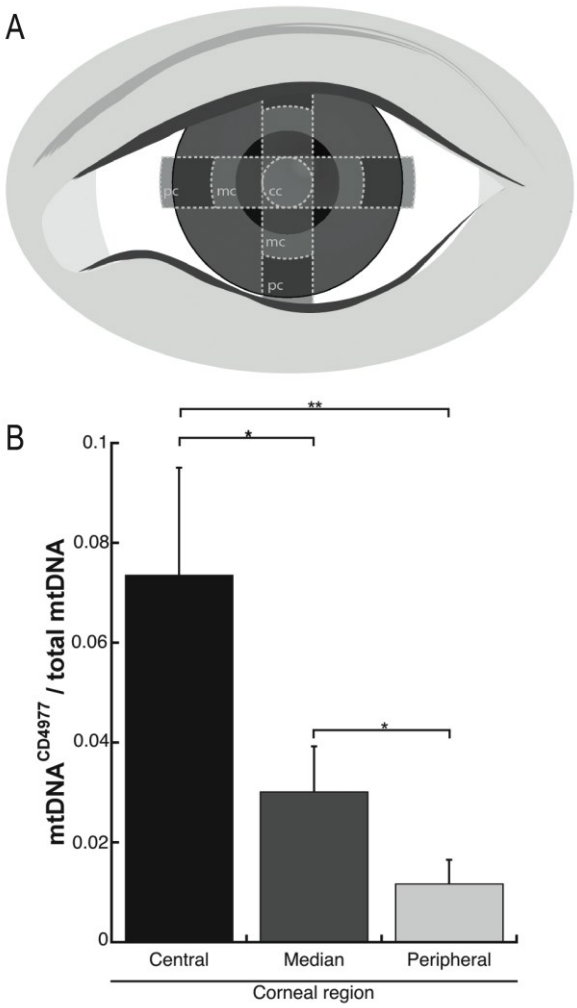


Figure 2.4 mtDNA^{CD4977} is concentrated in the central cornea and decreases toward the periphery.

A) Dissection strategy used to study mtDNA^{CD4977} in differents portions of the human cornea. Corneas were dissected in one central piece (cc), four median pieces (mc) and four peripheral (pc) pieces. All four median or peripheral pieces were pooled together. Peripheral pieces contained 1-2 mm of sclera with limbic cells. Each corneal piece contained the epithelium, stroma and endothelium.

B) mtDNA^{CD4977}/total mtDNA ratios were evaluated by Q-PCR in the corneal epithelium, stroma and endothelium of 9 human subjects with a median age of 82 years. DNA, including mtDNA, was extracted from each corneal piece. As depicted in the histogram, mtDNA^{CD4977} is highly concentrated in the central part of the cornea (7.36%) and decreases toward the periphery (3.02% and 1.12% for the median and peripheral parts of the cornea, respectively). According to the two-tailed heteroscedastic Student's t-test, the mtDNA^{CD4977}/total mtDNA ratio was significantly different between each part of the cornea. (* $p< 0.05$, ** $p<0.01$).

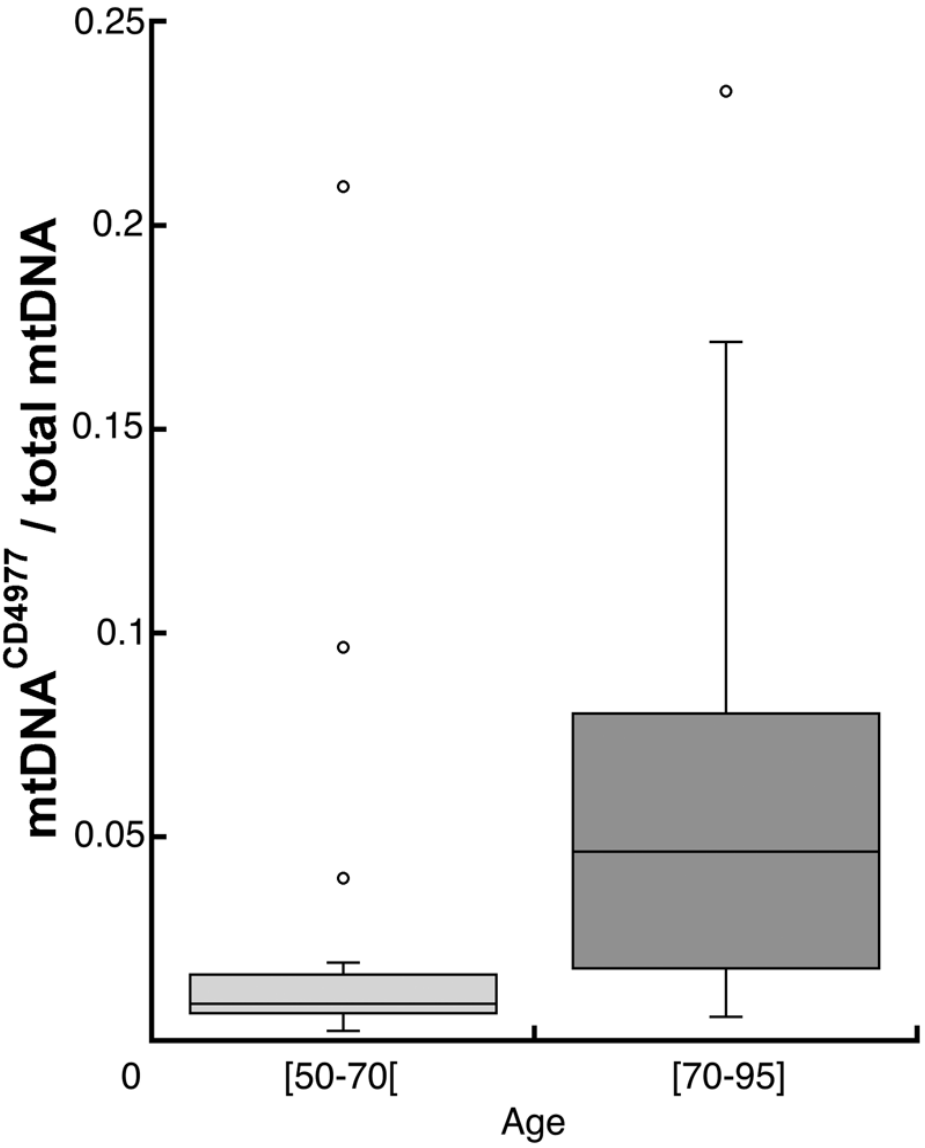


Figure 2.5 mtDNA^{CD4977} accumulates with age in human corneal stromas. Total DNA, including mtDNA, was extracted from the corneal stromas of 36 subjects. Stromas were isolated by dissection followed by a dispase treatment. mtDNA^{CD4977}/total mtDNA ratios were evaluated by Q-PCR in the 50-70 and 70-95-year-old groups (15 and 21 subjects, respectively). The box and whisker plot shows a higher mtDNA^{CD4977} accumulation in the 70-95-year-old group with 4.64% compared with 0.93% in the 50-70-year-old group. According to the Wilcoxon-Mann-Whitney rank sum test, the mtDNA^{CD4977}/total mtDNA ratio was significantly higher in the older group ($p < 0.01$).

Chapitre 3: The 3895-bp mitochondrial DNA deletion in the human eye: a potential involvement in corneal ageing and macular degeneration

Mutagenesis 2013 March 23(2):197-204

3.1 Résumé en français

Dans la peau humaine, la délétion mitochondriale de 3896 pb (ADNmt^{3895}) est catalysée par les rayons ultraviolets (UV) par la génération d'espèces réactives à l'oxygène (ROS). Étant donné sa fonction visuelle, l'œil humain est exposé l'oxydation par les UV et la lumière bleue dans ses structures antérieures (cornée, iris) et postérieure (rétine). Dans la présente étude, nous avons utilisé une technique hautement sensible de PCR quantitatif pour déterminer de l'occurrence de l'ADNmt^{3895} dans l'œil humain. Nos analyses montrent que l'ADNmt^{3895} se concentre dans la cornée et la rétine. À l'intérieur de la cornée, le plus haut niveau d'ADNmt^{3895} se situe dans le stroma, la couche cellulaire conférant la transparence et la rigidité à la cornée humaine. De plus, l'ADNmt^{3895} s'accumule avec l'âge dans le stroma, suggérant un rôle de cette délétion mitochondriale dans le vieillissement cornéen. À l'intérieur de la rétine, l'ADNmt^{3895} est concentrée dans la région maculaire de la rétine neurale et de l'épithélium pigmentaire rétinien, supportant ainsi l'hypothèse que cette délétion est impliquée dans les pathologies rétiniennes telle que la dégénérescence maculaire liée à l'âge. Nos résultats suggèrent que les radiations UV et la lumière bleue catalysent l'induction de l'ADNmt^{3895} dans l'œil humain.

Rapport-Gratuit.com

3.2 Article

The 3895-bp mitochondrial DNA deletion in the human eye: a potential involvement in corneal ageing and macular degeneration

Sébastien P. Gendron, Nathalie Bastien, Justin D. Mallet and Patrick J. Rochette

LOEX/CUO-Recherche, Centre de recherche du CHA, and Département d'Ophtalmologie, Université Laval, Québec, Canada

* Corresponding author at:

Dr. Patrick J. Rochette

LOEX/CUO-Recheche

Centre hospitalier affilié universitaire de Québec

Hôpital du Saint-Sacrement, Bureau H2-10

1050 Chemin Sainte-Foy, Québec, QC, Canada, G1S 4L8

Phone: 1-(418) 682-7568

Fax: 1-(418) 682 8000

E-mail address: Patrick.rochette@orlo.ulaval.ca

3.2.1 Résumé (anglais)

In human skin, the 3895-bp deletion of the mitochondrial DNA (mtDNA^{3895}) is catalyzed by ultraviolet (UV) light, through the generation of reactive oxygen species. Given its function in vision, the human eye is exposed to oxidising UV and blue light in its anterior (cornea, iris) and posterior (retina) structures. In this study, we employed a highly sensitive quantitative PCR technique to determine mtDNA^{3895} occurrence in human eye. Our analysis shows that the mtDNA^{3895} is concentrated in both the cornea and retina. Within the cornea, the highest mtDNA^{3895} level is found in the stroma, the cellular layer conferring transparency and rigidity to the human cornea. Moreover, mtDNA^{3895} accumulates with age in the stroma, suggesting a role of this deletion in corneal ageing. Within the retina, mtDNA^{3895} is concentrated in the macular region of both the neural retina and the retinal pigment epithelium, supporting the hypothesis that this deletion is implicated in retinal pathologies such as age-related macular degenerescence. Taken together, our results imply that UV and blue light catalyze mtDNA^{3895} induction in the human eye.

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

3.2.2 Introduction

The human mitochondrial DNA (mtDNA) is a double stranded 16 569 bp circular DNA. There are up to 10 000 mitochondria per cell and each mitochondrion contains up to 10 mtDNA copies (Attardi and Schatz, 1988). The presence of many mtDNA copies makes somatic mtDNA mutations heteroplasmic, that is a mixture of wild-type and mutant mtDNA in a given cell. Compared to genomic DNA, mtDNA is highly susceptible to various mutations, such as deletion, frameshift and missense mutations (Tomkinson et al., 1990; Wallace, 1999). Many factors are responsible for the high mutation sensitivity of the mtDNA genome. The absence of histones, the limited repair capacity and the limited proofreading capacity during replication by the DNA polymerase γ are among those factors (Wallace, 1999; Clayton et al., 1974; Longley et al., 2001). Another important factor explaining the high sensitivity of mtDNA is its close proximity to the mitochondrial inner membrane where the adenosine triphosphate production through the oxidative phosphorylation (OXPHOS) process takes place. The OXPHOS pathway induces a large amount of reactive oxygen species (ROS) including superoxide anion, hydrogen peroxide and hydroxyl radical (Patel et al., 1996; Fridovich, 1997; Brand et al., 2004; Cantu et al., 2011) that lead to the formation of oxidatively generated mutagenic DNA damage (Mammucari and Rizzuto, 2010). ROS can also be exogenously generated, primarily by solar ultraviolet (UV) (100-400 nm) and blue light (400-500 nm). More precisely, through a photodynamic process, UV and blue light photo-excite cellular chromophores, leading to ROS production and ultimately to DNA damage formation (Cadet et al., 2009).

Among all mutations found in the mtDNA genome, there are more than 263 known deletions (Samuels et al., 2004). Because they are frequently detected in aged tissues with high-energy demands it has been suggested that mtDNA deletions are related to aging (Bua et al., 2006; Corral-Debrinski et al., 1992; Cortopassi and Arnheim, 1990; Kraytsberg et al., 2006; Melov et al., 1995). A vicious cycle has been hypothesized to explain how mtDNA deletions can translate into aging and vice versa. Oxidative stress induces mtDNA deletion mutations that lead to a deficient mitochondrial respiratory chain, which in turn conduces to reduced energy production, to increased ROS production and, ultimately, to tissue aging (Balaban et al., 2005; Wallace et al., 1998). The oxidative stress catalyzing the vicious cycle can be endogenous (OXPHOS process) or exogenous (e.g. exposition to solar UV and blue rays) (Mammucari and Rizzuto, 2010; Wondrak et al., 2006). The exact molecular mechanism explaining mtDNA deletion formation is not entirely understood. However, most mtDNA deletions are flanked by perfect (68%) or imperfect (12%) repeated DNA sequences and a defect in oxidatively generated DNA damage repair at the repetitive sequences is the most plausible hypothesis explaining mtDNA deletion formation (T. Chen et al., 2011; Lezza et al., 1999; Albertini et al., 1982; Krishnan et al., 2008). This strongly suggests that mtDNA deletion formation is catalyzed by ROS-induced DNA damage in repeated sequences.

Large mtDNA deletions are the most frequently observed mutations in mitochondrial disorders, cancer and aged tissues (reviewed in (T. Chen et al., 2011)). Among large mtDNA deletions, the 4977-bp deletion ($mtDNA^{CD4977}$) is particularly frequent. Numerous studies have shown that this deletion is proportional to the accumulation of UV-induced oxidative stress in the skin (Berneburg et al., 1997; Birch-Machin et al., 1998; Eshaghian et al., 2006; Koch et al., 2001; Krishnan and Birch-Machin, 2006; Ray et al., 2000; Reimann et al., 2008; J. H. Yang et al., 1994). Similarly to the skin, the eyes are exposed to both endogenous and exogenous oxidative stress. We recently showed that the $mtDNA^{CD4977}$ incidence in the cornea, iris and retina correlates with UV penetrance in the human eye but not with blue light (Gendron et al., 2012). This result suggests that UV-induced oxidative stress plays a role in the appearance of this mutation in the eye. We have observed that the $mtDNA^{CD4977}$ accumulates with age in the corneal stroma, the layer conferring rigidity and transparency to the cornea, thus suggesting a role of this deletion in corneal aging manifestations such as corneal stiffening and clouding (Gendron et al., 2012; Faragher et al., 1997; Kotecha et al., 2006). Taken together, these observations made in the skin and in the eye, suggest that UV light is the most important source of oxidative damage involved in the $mtDNA^{CD4977}$ formation.

Another important mtDNA mutation is the 3895-bp deletion ($mtDNA^{3895}$). This deletion, occurring between positions 547 and 4443, has been originally described in diseased muscles (Moraes et al., 1992), and associated to Kearns-Sayre syndrome and chronic progressive external opthalmoplegia (Moraes et al., 1995). Almost a decade after its first observation in muscular diseases, the $mtDNA^{3895}$ incidence was investigated in skin. As for the $mtDNA^{CD4977}$, it has been shown that the $mtDNA^{3895}$ accumulates with age in sun-exposed skin and that UV light catalyzes the appearance of this deletion in skin cells via the generation of ROS (Krishnan et al., 2004; Harbottle and Birch-Machin, 2006; Harbottle et al., 2010; Rizwan et al., 2011). Furthermore, the $mtDNA^{3895}$ has been proposed as a biomarker of sunlight exposure in human skin (Harbottle and Birch-Machin, 2006; Harbottle et al., 2010). Given that the eye is exposed to both light-induced exogenous oxidative stress and, as a part of the neural system, to high endogenous oxidative stress, it was intuitive to survey the presence of the $mtDNA^{3895}$ in this organ. In the present study, using a sensitive TaqMan Q-PCR technique (Harbottle and Birch-Machin, 2006), we quantified the $mtDNA^{3895}$ occurrence in different human ocular structures including the cornea, the iris and the retina. Similarly to the $mtDNA^{CD4977}$, we found that the $mtDNA^{3895}$ accumulates with age in the corneal stroma. Moreover, in contrast to the $mtDNA^{CD4977}$, we show that the $mtDNA^{3895}$ is concentrated in the macular retina. To our knowledge, the $mtDNA^{3895}$ is the first mtDNA mutation shown to accumulate in the macular region of the retina.

3.2.3 Matériel et Méthodes

All experiments performed in this study were conducted in accordance with our institution's guidelines and the Declaration of Helsinki. The research protocols received approval by the Centre Hospitalier Affilié Universitaire de Québec (CHA) institutional committee for the protection of human subjects.

Human eye structures isolation and DNA purification

We used 47 human eyes from 7- to 94-year-old post-mortem donors (provided by La Banque d'Yeux du Centre Universitaire d'Ophtalmologie, Québec, Canada) unsuitable for transplantation and without overt mitochondrial diseases. Transplantation exclusion criteria are based on the tissues quality criteria (e.g. scars). In presence of family history, genetic disease or virus (e.g. hepatitis, AIDS), the eyes were not enucleated and were thus unavailable for research purpose. All patients but the 7-year-old subject died from classical "ageing" diseases such as cancer, pneumonia or heart failure. The eyes were removed no later than 1 h after death. They were dissected or frozen at -80°C for later dissection immediately upon reception, 24-48h after enucleation. The cornea, iris and neural retina were dissected from whole ocular globes then washed in 1X PBS. In order to isolate the epithelium, stroma and endothelium, the corneas were incubated in HEPES buffer (0.01 M HEPES, pH 7.45; 0.142 M NaCl, 6.7 mM KCl and 1 mM $CaCl_2$) containing 2 mg/mL dispase II (Roche Applied Science) for 18h at 4°C. The epithelium and the endothelium were then mechanically separated from the stroma under a dissecting microscope (Carrier et al., 2008). The three corneal structures were then washed in 1X phosphate-buffered saline. Isolation of the retinal pigment epithelium (RPE) was achieve by incubating the posterior eye with HEPES buffer containing 2 mg/mL dispase II (Roche Applied Science) for 45 minutes at 37°C. The RPE was then mechanically isolated from the choroid and then washed in 1X phosphate-buffered saline.

For all ocular structures, total DNA including mitochondrial and nuclear DNA, was isolated using the DNeasy Blood and Tissue Kit according to the manufacturer's protocol with an RNase treatment (Qiagen). DNA extracted from the neural retina, RPE and iris contains melanin that interferes with PCR reactions. We thus further purified DNA from those ocular structures using MicroBiospin 6 chromatography columns (Bio-Rad Laboratories) to remove any trace of melanin.

mtDNA^{3895} levels analysis by PCR

mtDNA^{3895} and total mtDNA levels were measured with a Rotor-Gene Q real-time thermocycler (Qiagen). PCR amplifications were performed with previously published primers designed to amplify mtDNA^{3895} and total mtDNA and the quantification was achieve using TaqMan probes (Figure 1 and Table 1) (Harbottle and Birch-

Machin, 2006). The $mtDNA^{3895}$ primer set allows PCR amplification only when the mtDNA molecule contains the 3895-bp deletion. The amplification using those primers was done with 20 ng of total DNA. The primer set for total mtDNA amplifies a region without previously reported mtDNA deletion. Those primers are located in the 7S DNA coding region. A standard curve (20, 10, 1, 0.1, 0.01 and 0.005 ng total DNA/reaction) was performed with those primers and the TaqMan probe detecting total mtDNA. For each sample, the amplification level of $mtDNA^{3895}$ primers was compared to the standard curve and a ratio of "mtDNA molecules containing the 3895-bp deletion" to "total mtDNA molecules" ($mtDNA^{3895}$/mtDNA) was derived. Samples with a Ct over 35 amplification cycles in our conditions were considered negative for the presence of $mtDNA^{3895}$. PCR experiments were performed in 20 μl containing 1X TaqMan Universal PCR standard Mix (Roche Applied Science), 7.5 μM of each primers and 2.5 μM of the TaqMan probe (Table 1). Q-PCR cycling conditions were as follows: 2 min at 50°C, 10 min at 95°C followed by 40 cycles of 15 s at 95°C and 60 s at 56°C.

Statistical analysis

Quantification data were reported on KaleidaGraph v4.0 software to generate statistical analysis. The $mtDNA^{3895}$ level between subjects did not follow a normal distribution within an eye structure. Therefore, Wilcoxon is the appropriate test to compare the $mtDNA^{3895}$ level between the different eye structures. Wilcoxon is a non-parametric statistical hypothesis test for paired samples or repeated measurements on a single sample. It is used as an alternative to the Student's t-test when data are not normally distributed. Concerning the graphical representation, a box plot showing median values is the appropriate way to present data when they do not follow a normal distribution.

3.2.4 Résultats

mtDNA^{3895} levels were quantitatively evaluated by Q-PCR in different human eye structures using previously published TaqMan probes and primers spanning both sides of the deletion (Harbottle and Birch-Machin, 2006) (Figure 1 and Table 1). Those primers are designed in such a way that our short Q-PCR extension time only allows amplification of the deleted mtDNA molecule. Total mtDNA molecules were amplified with primers located in a control region without reported deletion and its level was detected using a TaqMan probe. Using the Q-PCR data, we derived the "mtDNA molecules containing the 3895-bp deletion/total mtDNA molecules" ratio. This strategy corrects for the variation of mtDNA copy number between cells.

The mtDNA^{3895} occurrence in the human eye

We quantified the mtDNA^{3895}/mtDNA ratio in the cornea, iris and retina from 10 subjects with a median age of 73.5 years. We observed a significant higher mtDNA^{3895} level in both the cornea and the neural retina compared to the iris ($p < 0.002$) with median values of 0.062%, 0.034% and 0.006%, respectively (Figure 2). No statistical difference was found between the cornea and the neural retina.

The mtDNA^{3895} accumulates with age in the human corneal stroma

Since a high mtDNA^{3895} incidence is found in the cornea, we further analyzed its formation in the different layers constituting that structure (i.e., the epithelium, stroma and endothelium). Corneas from eight subjects with a median age of 68 years were used (Figure 3). We found that the corneal stroma contains the highest level of mtDNA^{3895} in comparison to the epithelium and the endothelium ($p < 0.005$) with median values of 0.054%, 0.015% and 0.022%, respectively.

We then verified if the mtDNA^{3895} accumulates with age in the corneal stroma by evaluating the mtDNA^{3895}/mtDNA ratio in this layer from 24 subjects (Figure 4). Because the eyes come from post-mortem donors, eyes from young subjects are rarely obtained. In fact, only one subject under 50 years old (a 7-year-old subject) was tested and the mtDNA^{3895} level was undetectable in the corneal stroma of this particular donor. The other samples were divided in 2 arbitrary groups ranging from 50-70 years old exclusively and from 70-95 years old inclusively. As can be seen in Figure 4, the occurrence of mtDNA^{3895} is higher in the older group than in the younger group with mtDNA^{3895}/mtDNA median ratios of 0.061% and 0.030%, respectively. The difference between the two groups is significant ($p < 0.006$), indicating a correlation between mtDNA^{3895} and human ageing in the corneal stroma (Figure 4).

The mtDNA^{3895} in human neural retina and RPE

Since the mtDNA^{3895} is present at a similarly high level in the cornea and the neural retina, we further investigated its occurrence in the retina. This was done using neural retina from six human subjects with a median age of 61 years. We found that the macular region of the neural retina contains a significantly ($p < 0.04$) higher mtDNA^{3895} level compared to the peripheral region (i.e., 0.048% and 0.026% for the macular and peripheral neural retina, respectively) (Figure 5). The retina is composed of several layers of nerve cells (neural retina) and the RPE. The RPE plays a major role in vision and is intimately connected with the photoreceptors of the neural retina. We thus also investigated the mtDNA^{3895} occurrence in the peripheral and macular region of the RPE. Using RPE of seven human donors with a median age of 85 years, we show that the macular region of the RPE contains a significantly ($p < 0.04$) higher mtDNA^{3895} level than the peripheral region (Figure 5).

3.2.5 Discussion

The mtDNA^{3895} in the cornea, iris and retina

Previous studies have shown that UV light catalyzes mtDNA^{3895} formation in the human skin (Krishnan et al., 2004; Harbottle and Birch-Machin, 2006; Harbottle et al., 2010; Rizwan et al., 2011). Moreover, it has been demonstrated that antioxidants prevent mtDNA^{3895} induction in UV-exposed skin cells (Rizwan et al., 2011). Those evidences strongly suggest that oxidatively generated DNA damage by UV light are the main cause of mtDNA^{3895} formation. Here, we observed a high mtDNA^{3895} concentration in the cornea, the most anterior part of the eye. More precisely, the mtDNA^{3895} levels are 0.062% and 0.006% in the cornea and the iris, respectively. These results are consistent with the data supporting that UV light catalyzes the occurrence of this deletion. Indeed, the cornea absorbs a large portion of UV wavelengths (S Lerman, 1980; Mallet and Rochette, 2011; Norren and Vos, 1974). In consequence, the amount of oxidatively generated DNA damage induced by UV light is suspected to be high in this ocular structure. The iris is also exposed to UV light but to a lesser extent than the cornea (S Lerman, 1980; Mallet and Rochette, 2011; Norren and Vos, 1974). Because the mtDNA^{3895} levels follow the UV penetrance in the cornea and the iris, a mechanism involving the UV-induced oxidative stress is suspected to cause this deletion in the anterior part of the eye. On the other hand, mtDNA^{3895} level comparable to what has been found in the cornea is observed in the neural retina (Figure 2). Since UV wavelengths are completely filtered out by the adult cornea, this result is in contradiction with an exclusive role of UV light in the induction of the mtDNA^{3895} in the human eye.

We have previously analyzed the occurrence of another mtDNA deletion (the mtDNA^{CD4977}) in the human eye (Gendron et al. 2012). The deleted regions involved in the mtDNA^{3895} and the mtDNA^{CD4977} are different but they are both flanked by a repetitive DNA sequences that are thought to be responsible for their formation (T. Chen et al., 2011; Lezza et al., 1999; Albertini et al., 1982; Krishnan et al., 2008) (www.mitomap.org). Our present results concerning the mtDNA^{3895} are consistent with what we have found for the mtDNA^{CD4977} in the anterior part of the eye but differ from what we have found in neural retina. Indeed, as well as for the mtDNA^{CD4977}, the mtDNA^{3895} is 10 times more concentrated in the cornea compared to the iris. On the other hand, we reported 40-fold less mtDNA^{CD4977} deletion in the retina when compared to the cornea, whereas the mtDNA^{3895} levels are similar in those structures. This suggests that the induction mechanism of the mtDNA^{3895} and the mtDNACD^{4977} is different in the retina.

The mtDNA^{3895} is concentrated in the human corneal stroma

According to the hypothesis that sunlight is involved in mtDNA^{3895} formation, it could be expected that, as the most anterior part of the cornea, the epithelium should contain the highest levels of the mtDNA^{3895} followed by

the stroma and the endothelium. Here, we report that the mtDNA^{3895} is concentrated in the stroma, with levels 3.6 and 2.5 times higher than in the epithelium and the endothelium, respectively (Figure 3). We have previously observed that the mtDNA^{CD4977} is also concentrated in the corneal stroma, but to a much greater extent, (i.e., 175 and 65 times higher in the stroma than in the epithelium and endothelium, respectively). These results are not inconsistent with the involvement of sunlight-induced oxidation in the generation of both the mtDNA^{3895} and the mtDNA^{CD4977}. In fact, the high corneal epithelial cells turnover might protect them from accumulating mtDNA deletions. This is consistent with the higher susceptibility of quiescent corneal stroma cells (keratocytes) to UV-induced mtDNA deletions. However, this is incoherent with the low level of mtDNA deletions found in the corneal endothelium, where cells are also in a quiescent state and exposed sunlight's UV rays (S Lerman, 1980; Mallet and Rochette, 2011; Norren and Vos, 1974). Another mechanism that may prevent the mtDNA deletions formation in the corneal epithelium and endothelium is the presence of antioxidants (i.e. ascorbate, superoxide dismutases (SOD) and glutathione peroxidase 1 (GPx)) that can prevent light-induced oxidation. Those are either absent or present at a much lower concentration in corneal stroma compared to the corneal epithelium and endothelium (Atalla et al., 1988; Brubaker et al., 2000; Delamere, 1996; Pirie, 1946; Ringvold et al., 2000; Zelko et al., 2002).

The mtDNA^{3895} and corneal aging

In human skin, the mtDNA^{3895} has been found to accumulate with age in sun-exposed skin and has thus been proposed as a biomarker for sunlight exposure (Krishnan et al., 2004; Harbottle and Birch-Machin, 2006; Harbottle et al. 2010). Our evaluation of the mtDNA^{3895} in human eye clearly shows that this deletion accumulates with age in the corneal stroma (Figure 4) and that sunlight is most likely involved in this process (Figure 2 and 3). In a previous work, we have also observed an age-related mtDNA^{CD4977} accumulation in the corneal stroma (Gendron et al., 2012). It has also been reported that mtDNA deletions accumulation catalyzes skin collagen disorganization and degradation (Krutmann and Schroeder, 2009; Majora et al., 2009). Collagen is the main constituent of the corneal stroma, where the highest amount of mtDNA deletions has been found ((Gendron et al., 2012); Figure 3). Stromal collagen plays a major role in the rigidity and transparency properties of the cornea. Corneal stiffening and clouding are observed with age and it is speculated that mtDNA deletions accumulation is responsible for some of those ageing phenotypes (Faragher et al., 1997; Kotecha et al., 2006).

The mtDNA^{3895} in the retina

Exogenous and endogenous elements make the retina an environment with high oxidative content. Because of its function, the retina is exposed to a large amount of visible light, including the blue oxidizing light (S Lerman, 1980; Norren and Vos, 1974). The retina contains a large number of photosensitizing chromophores (e.g.

Rapport-Gratuit.com

vitamin A metabolites, lipofuscin, melanin, flavins, porphyrins and carotenoids) that generates ROS when excited by an appropriate wavelength of light (reviewed in (Boulton et al., 2001)). Cellular chromophores are mainly excited by UVA (320-400 nm) and blue light wavelengths (400-500 nm). For example, lipofuscin is highly concentrated in the RPE and has an absorption peak at 430 nm. The absorption of blue light by lipofuscin leads to the formation of singlet oxygen, superoxide anion and hydrogen peroxide (Boulton et al., 1990; Rozanowska et al., 1998; S. Davies et al., 2001). Also, the mitochondrial OXPHOS process generating ROS is more important in cells with a high energetic activity level, such as neurons and muscle cells. Since the retina contains photosensitive neural sensory cells (cones and rods), the OXPHOS process generates substantial mitochondrial ROS levels in those cells (Harman, 1972; Beckman and Ames, 1998; Winkler et al., 1999; Gutteridge and Halliwell, 2000; Sastre et al., 2000). In fact, the retina is one of the highest oxygen-consuming tissues in the human body (Yu and Cringle, 2005). The $mtDNA^{3895}$ level comparable to what we found in the cornea is observed in the neural retina (Figure 2).

The $mtDNA^{3895}$ is concentrated in the macula of human retina

In both the neural retina and the RPE, the $mtDNA^{3895}$ is significantly higher in the macular when compared to the peripheral region (Figure 5). The macular region is responsible for the central high-resolution vision. Consequently, light entering the eye is focused on the macula. We hypothesize that the high macular $mtDNA^{3895}$ concentration is a consequence of the environmental light-induced oxidation, presumably from the blue-light wavelengths. This is consistent with the observation that blue light exposure harms mitochondrial respiratory activity and damages mtDNA of skin epithelial cells (Godley et al., 2005). Taken together, our previously published data (Gendron et al., 2012) and the results presented here suggest that the $mtDNA^{CD4977}$ is catalyzed by UV wavelengths that are blocked by the anterior part of the eye, whereas the $mtDNA^{3895}$ is catalyzed by the UV and the blue light wavelengths that affect both the cornea and the macular retina.

The $mtDNA^{3895}$ and age-related macular degeneration

Age-related macular degeneration (AMD) is the leading cause of vision loss in adults over 50 years old. It affects 10% of patients between 65 and 75 years old and 30% of patients over 75 years old. There are number of evidences strongly supporting that mitochondrial dysfunction is an important factor underlying the development of AMD. The $mtDNA^{CD4977}$ has been shown to accumulate with age in the RPE (Barreau et al., 1996; A. L. Wang et al., 2008) but those studies have either not analyzed or failed to demonstrate that this deletion is concentrated in the macular region. Our results show 2.6 times more $mtDNA^{3895}$ in the macular RPE when compared with the peripheral (Figure 5). The number of mitochondria decreases with age in RPE cells and this phenomenon is accentuated in AMD patients (Feher et al., 2006). It is suspected that this decrease leads to a compensation mechanism in which each mitochondrion needs to produce more adenosine

triphosphate by the OXPHOS process, resulting in more generated ROS, thus feeding the "vicious cycle" (Figure 6). When exposed to high levels of ROS, there is a preferential damage to mtDNA and a slow DNA repair in RPE cells (Ballinger et al., 1999; Jarrett and Boulton, 2005, 2007). Our results concerning the mtDNA^{3895} bring additional evidence supporting that mitochondrial dysfunction may be an important factor involved in AMD. However, at this point, it is hazardous to speculate about the implication of mtDNA^{3895} deletion in the etiology of AMD. The clinical expression of a pathogenic mtDNA mutation is determined by the relative proportion of normal and mutant mtDNA genomes in the tissue. A minimal critical level of mutant DNA is required to cause mitochondrial dysfunction resulting in disease. This critical level, called the threshold, is unknown for the mtDNA^{3895} deletion. Therefore, it is impossible to predict if the measured amount of deletion in the macular region of the retina is likely to be responsible for the AMD. Nonetheless, to our knowledge, this is the first mtDNA mutation showing an accumulation in the macular region of the retina. The impact of the mtDNA^{3895} on mitochondrial functions needs further investigation but it can be speculated that the accumulation of this deletion, affecting at least nine proteins and tRNAs coding sequences, is perturbing the mitochondrial respiratory chain, thereby participating in the amplification of the “vicious cycle” of ROS generation (Jarrett et al., 2010) (Figure 6).

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

3.2.6 Remerciements

The authors are grateful to La Banque d'Yeux du Centre Universitaire d'Ophtalmologie de Québec for providing the specimens. La Banque d'Yeux du Centre Universitaire d'Ophtalmologie de Québec is supported by le Réseau de recherche en santé de la vision du Fonds de recherche du Québec - Santé (FRQ-S). This work was supported by a grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) to P.J.R. P.J.R is a research scholar from the FRQ-S.

3.2.7 Références

1. Attardi, G. and Schatz, G. (1988) Biogenesis of mitochondria. *Annu. Rev. Cell. Biol.*, **4**, 289-333.
2. Tomkinson, A.E., Bonk, R.T., Kim, J., Bartfeld, N. and Linn, S. (1990) Mammalian mitochondrial endonuclease activities specific for ultraviolet-irradiated DNA. *Nucleic. Acids Res*, **18**, 929-935.
3. Wallace, D.C. (1999) Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science*, **283**, 1482-1488.
4. Clayton, D.A., Doda, J.N. and Friedberg, E.C. (1974) The absence of a pyrimidine dimer repair mechanism in mammalian mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **71**, 2777-2781.
5. Longley, M.J., Nguyen, D., Kunkel, T.A. and Copeland, W.C. (2001) The fidelity of human DNA polymerase gamma with and without exonucleolytic proofreading and the p55 accessory subunit. *J. Biol. Chem.*, **276**, 38555-38562.
6. Patel, M., Day, B.J., Crapo, J.D., Fridovich, I. and McNamara, J.O. (1996) Requirement for superoxide in excitotoxic cell death. *Neuron*, **16**, 345-355.
7. Fridovich, I. (1997) Superoxide anion radical (O2-.), superoxide dismutases, and related matters. *J. Biol. Chem.*, **272**, 18515-18517.
8. Brand, M.D., Affourtit, C., Esteves, T.C., Green, K., Lambert, A.J., Miwa, S., Pakay, J.L. and Parker, N. (2004) Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins. *Free Radic. Biol. Med.*, **37**, 755-767.
9. Cantu, D., Fulton, R.E., Drechsel, D.A. and Patel, M. (2011) Mitochondrial aconitase knockdown attenuates paraquat-induced dopaminergic cell death via decreased cellular metabolism and release of iron and H_2O_2. *J. Neurochem.*, **118**, 79-92.
10. Mammucari, C. and Rizzuto, R. (2010) Signaling pathways in mitochondrial dysfunction and ageing. *Mech. Ageing Dev.*, **131**, 536-543.
11. Cadet, J., Douki, T., Ravanat, J.L. and Di Mascio, P. (2009) Sensitized formation of oxidatively generated damage to cellular DNA by UVA radiation. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **8**, 903-911.
12. Samuels, D.C., Schon, E.A. and Chinnery, P.F. (2004) Two direct repeats cause most human mtDNA deletions. *Trends Genet.*, **20**, 393-398.
13. Bua, E., Johnson, J., Herbst, A., Delong, B., McKenzie, D., Salamat, S. and Aiken, J.M. (2006) Mitochondrial DNA-deletion mutations accumulate intracellularly to detrimental levels in aged human skeletal muscle fibers. *Am. J. Hum. Genet.*, **79**, 469-480.
14. Corral-Debrinski, M., Shoffner, J.M., Lott, M.T. and Wallace, D.C. (1992) Association of mitochondrial DNA damage with ageing and coronary atherosclerotic heart disease. *Mutat. Res.*, **275**, 169-180.
15. Cortopassi, G.A. and Arnheim, N. (1990) Detection of a specific mitochondrial DNA deletion in tissues of older humans. *Nucleic Acids Res.*, **18**, 6927-6933.
16. Kraytsberg, Y., Kudryavtseva, E., McKee, A.C., Geula, C., Kowall, N.W. and Khrapko, K. (2006) Mitochondrial DNA deletions are abundant and cause functional impairment in aged human substantia nigra neurons. *Nat. Genet.*, **38**, 518-520.
17. Melov, S., Shoffner, J.M., Kaufman, A. and Wallace, D.C. (1995) Marked increase in the number and variety of mitochondrial DNA rearrangements in aging human skeletal muscle. *Nucleic Acids Res.*, **23**, 4122-4126.
18. Balaban, R.S., Nemoto, S. and Finkel, T. (2005) Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell*, **120**, 483-495.
19. Wallace, D.C., Brown, M.D., Melov, S., Graham, B. and Lott, M. (1998) Mitochondrial biology, degenerative diseases and aging. *Biofactors*, **7**, 187-190.

20. Wondrak, G.T., Jacobson, M.K. and Jacobson, E.L. (2006) Endogenous UVA-photosensitizers: mediators of skin photodamage and novel targets for skin photoprotection. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **5**, 215-237.
21. Chen, T., He, J., Huang, Y. and Zhao, W. (2011) The generation of mitochondrial DNA large-scale deletions in human cells. *J. Hum. Genet.*, **56**, 689-694.
22. Lezza, A.M., Mecocci, P., Cormio, A., Beal, M.F., Cherubini, A., Cantatore, P., Senin, U. and Gadaleta, M.N. (1999) Mitochondrial DNA 4977 bp deletion and OH8dG levels correlate in the brain of aged subjects but not Alzheimer's disease patients. *FASEB J.*, **13**, 1083-1088.
23. Albertini, A.M., Hofer, M., Calos, M.P. and Miller, J.H. (1982) On the formation of spontaneous deletions: the importance of short sequence homologies in the generation of large deletions. *Cell*, **29**, 319-328.
24. Krishnan, K.J., Reeve, A.K., Samuels, D.C., Chinnery, P.F., Blackwood, J.K., Taylor, R.W., Wanrooij, S., Spelbrink, J.N., Lightowlers, R.N. and Turnbull, D.M. (2008) What causes mitochondrial DNA deletions in human cells? *Nat. Genet.*, **40**, 275-279.
25. Berneburg, M., Gattermann, N., Stege, H., Grewe, M., Vogelsang, K., Ruzicka, T. and Krutmann, J. (1997) Chronically ultraviolet-exposed human skin shows a higher mutation frequency of mitochondrial DNA as compared to unexposed skin and the hematopoietic system. *Photochem. Photobiol.*, **66**, 271-275.
26. Birch-Machin, M.A., Tindall, M., Turner, R., Haldane, F. and Rees, J.L. (1998) Mitochondrial DNA deletions in human skin reflect photo- rather than chronologic aging. *J. Invest. Dermatol.*, **110**, 149-152.
27. Eshaghian, A., Vleugels, R.A., Canter, J.A., McDonald, M.A., Stasko, T. and Sligh, J.E. (2006) Mitochondrial DNA deletions serve as biomarkers of aging in the skin, but are typically absent in nonmelanoma skin cancers. *J. Invest. Dermatol.*, **126**, 336-344.
28. Koch, H., Wittern, K.P. and Bergemann, J. (2001) In human keratinocytes the Common Deletion reflects donor variabilities rather than chronologic aging and can be induced by ultraviolet A irradiation. *J. Invest. Dermatol.*, **117**, 892-897.
29. Krishnan, K.J. and Birch-Machin, M.A. (2006) The incidence of both tandem duplications and the common deletion in mtDNA from three distinct categories of sun-exposed human skin and in prolonged culture of fibroblasts. *J. Invest. Dermatol.*, **126**, 408-415.
30. Ray, A.J., Turner, R., Nikaido, O., Rees, J.L. and Birch-Machin, M.A. (2000) The spectrum of mitochondrial DNA deletions is a ubiquitous marker of ultraviolet radiation exposure in human skin. *J. Invest. Dermatol.*, **115**, 674-679.
31. Reimann, V., Kramer, U., Sugiri, D., Schroeder, P., Hoffmann, B., Medve-Koenigs, K., Jockel, K.H., Ranft, U. and Krutmann, J. (2008) Sunbed use induces the photoaging-associated mitochondrial common deletion. *J. Invest. Dermatol.*, **128**, 1294-1297.
32. Yang, J.H., Lee, H.C., Lin, K.J. and Wei, Y.H. (1994) A specific 4977-bp deletion of mitochondrial DNA in human ageing skin. *Arch. Dermatol. Res.*, **286**, 386-390.
33. Gendron, S.P., Mallet, J.D., Bastien, N. and Rochette, P.J. (2012) Mitochondrial DNA common deletion in the human eye: a relation with corneal aging. *Mech. Ageing. Dev.*, **133**, 68-74.
34. Faragher, R.G., Mulholland, B., Tuft, S.J., Sandeman, S. and Khaw, P.T. (1997) Aging and the cornea. *Br. J. Ophthalmol.*, **81**, 814-817.
35. Kotecha, A., Elsheikh, A., Roberts, C.R., Zhu, H. and Garway-Heath, D.F. (2006) Corneal thickness- and age-related biomechanical properties of the cornea measured with the ocular response analyzer. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **47**, 5337-5347.

36. Moraes, C.T., Ricci, E., Petruzzella, V., Shanske, S., DiMauro, S., Schon, E.A. and Bonilla, E. (1992) Molecular analysis of the muscle pathology associated with mitochondrial DNA deletions. *Nat. Genet.*, **1**, 359-367.
37. Moraes, C.T., Sciacco, M., Ricci, E., Tengan, C.H., Hao, H., Bonilla, E., Schon, E.A. and DiMauro, S. (1995) Phenotype-genotype correlations in skeletal muscle of patients with mtDNA deletions. *Muscle Nerve*, **3**, S150-153.
38. Krishnan, K.J., Harbottle, A. and Birch-Machin, M.A. (2004) The use of a 3895 bp mitochondrial DNA deletion as a marker for sunlight exposure in human skin. *J. Invest. Dermatol.*, **123**, 1020-1024.
39. Harbottle, A. and Birch-Machin, M.A. (2006) Real-time PCR analysis of a 3895 bp mitochondrial DNA deletion in nonmelanoma skin cancer and its use as a quantitative marker for sunlight exposure in human skin. *Br. J. Cancer*, **94**, 1887-1893.
40. Harbottle, A., Maki, J., Reguly, B., Wittock, R., Robinson, K., Parr, R. and Birch-Machin, M.A. (2010) Real-time polymerase chain reaction analysis of a 3895-bp mitochondrial DNA deletion in epithelial swabs and its use as a quantitative marker for sunlight exposure in human skin. *Br. J. Dermatol.*, **163**, 1291-1295.
41. Rizwan, M., Rodriguez-Blanco, I., Harbottle, A., Birch-Machin, M.A., Watson, R.E. and Rhodes, L.E. (2011) Tomato paste rich in lycopene protects against cutaneous photodamage in humans in vivo: a randomized controlled trial. *Br. J. Dermatol.*, **164**, 154-162.
42. Carrier, P., Deschambeault, A., Talbot, M., Giasson, C.J., Auger, F.A., Guerin, S.L. and Germain, L. (2008) Characterization of wound reepithelialization using a new human tissue-engineered corneal wound healing model. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **49**, 1376-1385.
43. Lerman, S. (1980) *Radiant energy and the eye*. Macmillan Publishing Co., Inc., New York.
44. Mallet, J.D. and Rochette, P.J. (2011) Ultraviolet light-induced cyclobutane pyrimidine dimers in rabbit eyes. *Photochem. Photobiol.*, **87**, 1363-1368.
45. Norren, D.V. and Vos, J.J. (1974) Spectral transmission of the human ocular media. *Vision. Res.*, **14**, 1237-1244.
46. Atalla, L.R., Sevanian, A. and Rao, N.A. (1988) Immunohistochemical localization of glutathione peroxidase in ocular tissue. *Curr. Eye Res.*, **7**, 1023-1027.
47. Brubaker, R.F., Bourne, W.M., Bachman, L.A. and McLaren, J.W. (2000) Ascorbic acid content of human corneal epithelium. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **41**, 1681-1683.
48. Delamere, N.A. (1996) Ascorbic acid and the eye. *Subcell. Biochem.*, **25**, 313-329.
49. Pirie, A. (1946) Ascorbic acid content of cornea. *Biochem J.*, **40**, 96-100.
50. Ringvold, A., Anderssen, E. and Kjonniksen, I. (2000) Distribution of ascorbate in the anterior bovine eye. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **41**, 20-23.
51. Zelko, I.N., Mariani, T.J. and Folz, R.J. (2002) Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic. Biol. Med.*, **33**, 337-349.
52. Krutmann, J. and Schroeder, P. (2009) Role of mitochondria in photoaging of human skin: the defective powerhouse model. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.*, **14**, 44-49.
53. Majora, M., Wittkampf, T., Schuermann, B., Schneider, M., Franke, S., Grether-Beck, S., Wilichowski, E., Bernerd, F., Schroeder, P. and Krutmann, J. (2009) Functional consequences of mitochondrial DNA deletions in human skin fibroblasts: increased contractile strength in collagen lattices is due to oxidative stress-induced lysyl oxidase activity. *Am. J. Pathol.*, **175**, 1019-1029.

54. Boulton, M., Rozanowska, M. and Rozanowski, B. (2001) Retinal photodamage. *J. Photochem. Photobiol. B.*, **64**, 144-161.
55. Boulton, M., Docchio, F., Dayhaw-Barker, P., Ramponi, R. and Cubeddu, R. (1990) Age-related changes in the morphology, absorption and fluorescence of melanosomes and lipofuscin granules of the retinal pigment epithelium. *Vision Res.*, **30**, 1291-1303.
56. Rozanowska, M., Wessels, J., Boulton, M., Burke, J.M., Rodgers, M.A., Truscott, T.G. and Sarna, T. (1998) Blue light-induced singlet oxygen generation by retinal lipofuscin in non-polar media. *Free Radic. Biol. Med.*, **24**, 1107-1112.
57. Davies, S., Elliott, M.H., Floor, E., Truscott, T.G., Zareba, M., Sarna, T., Shamsi, F.A. and Boulton, M.E. (2001) Photocytotoxicity of lipofuscin in human retinal pigment epithelial cells. *Free Radic. Biol. Med.*, **31**, 256-265.
58. Harman, D. (1972) The biologic clock: the mitochondria? *J. Am. Geriatr. Soc.*, **20**, 145-147.
59. Beckman, K.B. and Ames, B.N. (1998) The free radical theory of aging matures. *Physiol. Rev.*, **78**, 547-581.
60. Winkler, B.S., Boulton, M.E., Gottsch, J.D. and Sternberg, P. (1999) Oxidative damage and age-related macular degeneration. *Mol. Vis.*, **5**, 32.
61. Gutteridge, J.M. and Halliwell, B. (2000) Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **899**, 136-147.
62. Sastre, J., Pallardo, F.V. and Vina, J. (2000) Mitochondrial oxidative stress plays a key role in aging and apoptosis. *IUBMB Life*, **49**, 427-435.
63. Yu, D.Y. and Cringle, S.J. (2005) Retinal degeneration and local oxygen metabolism. *Exp. Eye Res.*, **80**, 745-751.
64. Godley, B.F., Shamsi, F.A., Liang, F.Q., Jarrett, S.G., Davies, S. and Boulton, M. (2005) Blue light induces mitochondrial DNA damage and free radical production in epithelial cells. *J. Biol. Chem.*, **280**, 21061-21066.
65. Barreau, E., Brossas, J.Y., Courtois, Y. and Treton, J.A. (1996) Accumulation of mitochondrial DNA deletions in human retina during aging. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **37**, 384-391.
66. Wang, A.L., Lukas, T.J., Yuan, M. and Neufeld, A.H. (2008) Increased mitochondrial DNA damage and down-regulation of DNA repair enzymes in aged rodent retinal pigment epithelium and choroid. *Mol. Vis.*, **14**, 644-651.
67. Feher, J., Kovacs, I., Artico, M., Cavallotti, C., Papale, A. and Balacco Gabrieli, C. (2006) Mitochondrial alterations of retinal pigment epithelium in age-related macular degeneration. *Neurobiol. Ageing*, **27**, 983-993.
68. Ballinger, S.W., Van Houten, B., Jin, G.F., Conklin, C.A. and Godley, B.F. (1999) Hydrogen peroxide causes significant mitochondrial DNA damage in human RPE cells. *Exp. Eye Res.*, **68**, 765-772.
69. Jarrett, S.G. and Boulton, M.E. (2005) Antioxidant up-regulation and increased nuclear DNA protection play key roles in adaptation to oxidative stress in epithelial cells. *Free Radic. Biol. Med.*, **38**, 1382-1391.
70. Jarrett, S.G. and Boulton, M.E. (2007) Poly(ADP-ribose) polymerase offers protection against oxidative and alkylation damage to the nuclear and mitochondrial genomes of the retinal pigment epithelium. *Ophthalmic Res.*, **39**, 213-223.
71. Jarrett, S.G., Lewin, A.S. and Boulton, M.E. (2010) The importance of mitochondria in age-related and inherited eye disorders. *Ophthalmic Res.*, **44**, 179-190.

3.2.8 Table et Figures

	Name	Sequence (5'→3')	Position
mtDNA^{3895}	X1	CAACCCTCGCCCATCCTA	491-508
	X2	CCTGCAAAGATGGTAGAGTAGATGAC	4516-4489
	X3	FAM – TGCTAACCCCATACCCCGAAAATGTTGG – TAMRA	527//4450
mtDNA	Y1	GATTTGGGTACCACCCAAGTATTG	16042-16066
	Y2	AATATTCATGGTGGCTGGCAGTA	16125-16102
	Y3	VIC – CACCCATCAACAACCGCTATGTATTTCGTACA – TAMRA	16069-16101

Table 3.1 List of oligonucleotide PCR primers and TaqMan probes used in this study (Harbottle and Birch-Machin, 2006).

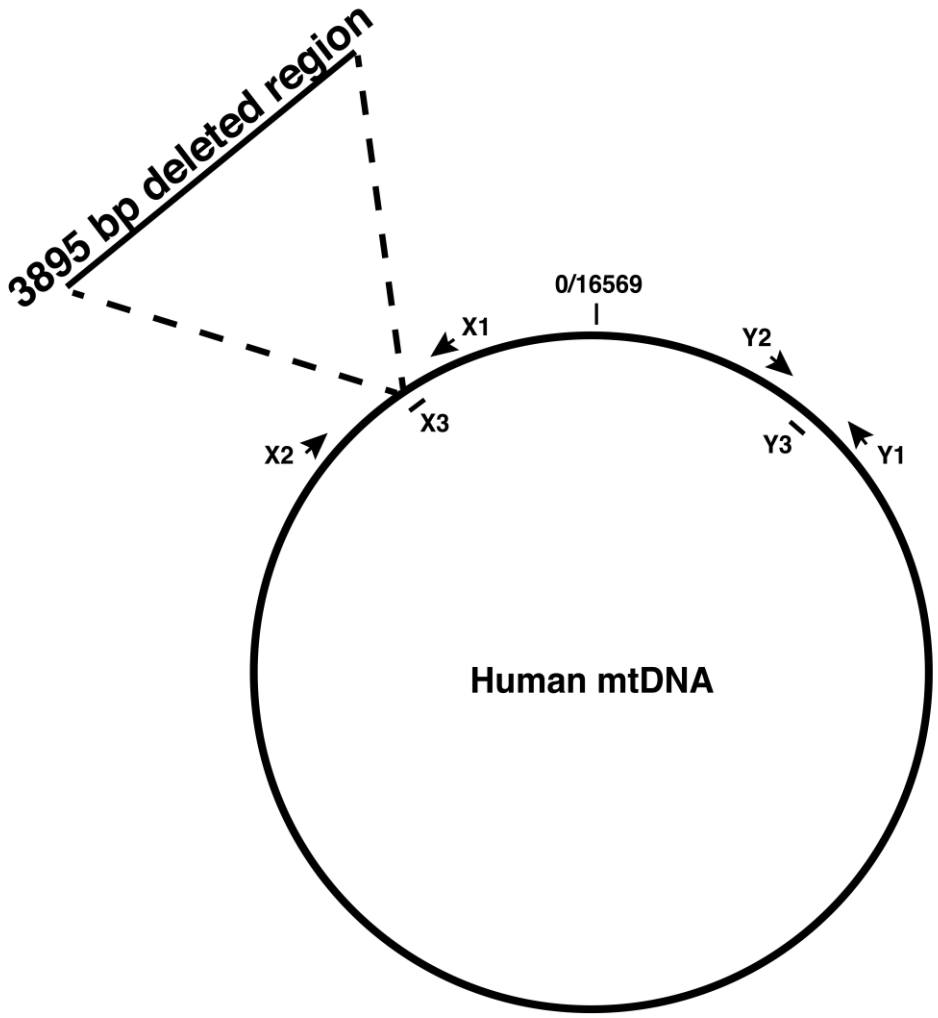


Figure 3.1 Schematic representation of the human mtDNA indicating 3895-bp deletion, the Q-PCR primers and the TaqMan probes positions. The arrows indicate primer binding sites and directions. The primer set X1/X2 is designed to only amplify mtDNA molecules carrying the $mtDNA^{3895}$. The primer set Y1/Y2 is designed to detect total mtDNA by amplifying an mtDNA region without previously reported deletion. X3 and Y3 are TaqMan probes allowing quantitative detection of the $mtDNA^{3895}$ and total mtDNA, respectively. X3 probe only binds to $mtDNA^{3895}$ molecules.

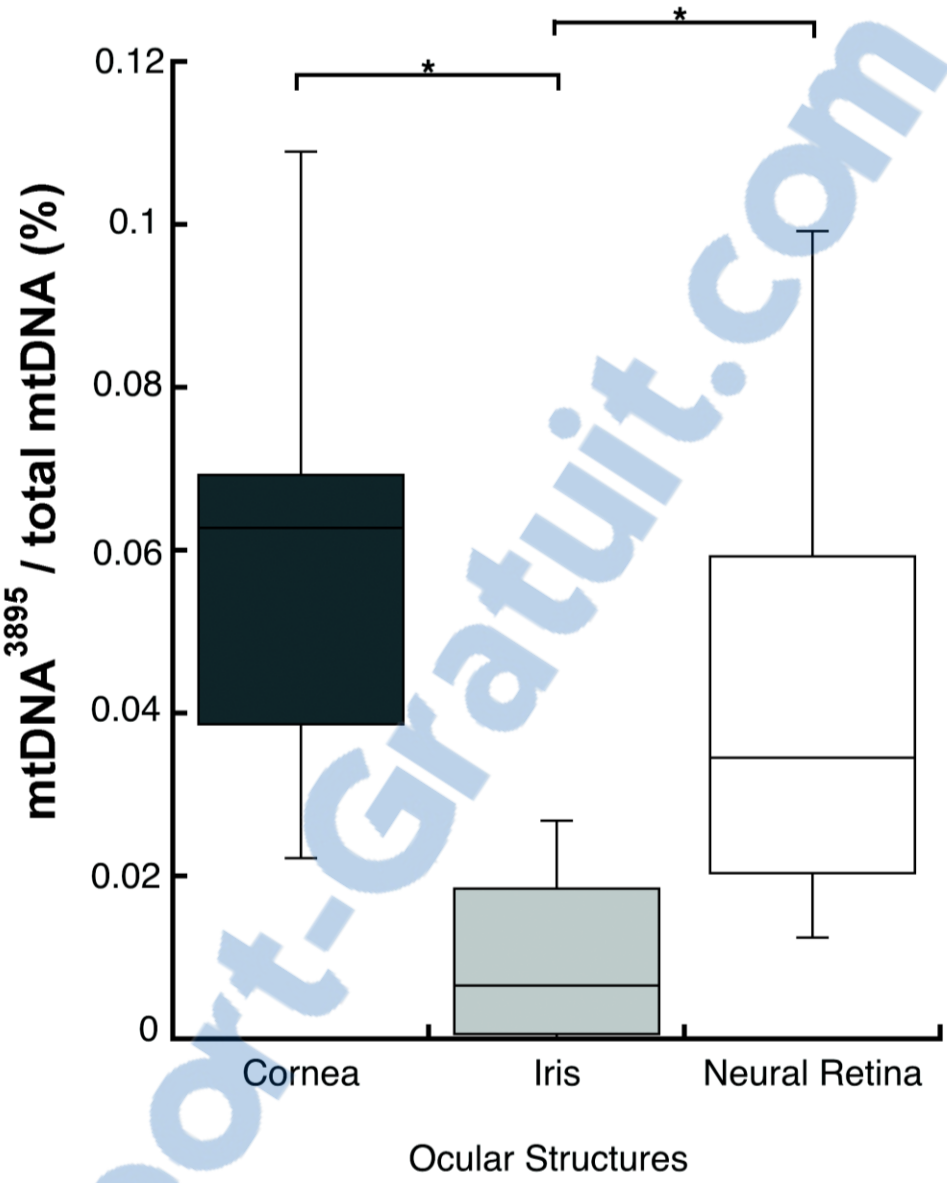


Figure 3.2 The mtDNA^{3895} analysis in different ocular structures. The cornea, iris and neural retina were dissected and total DNA was extracted from each structure. The mtDNA^{3895} and total mtDNA were then detected by Q-PCR. mtDNA^{3895}/total mtDNA ratio was evaluated by Q-PCR in the neural retina, iris and cornea of 10 human subjects with a median age of 73.5 years. The results depicted in the box plot clearly show a higher mtDNA^{3895} levels in both the cornea (0.062%) and the neural retina (0.034%) when compared to the iris (0.006%). According to the Wilcoxon test, the mtDNA^{3895}/total mtDNA ratio was significantly different between the cornea and the iris and between the neural retina and the iris (*$p < 0.002$) but not between the neural retina and the cornea.

Rapport-Gratuit.com

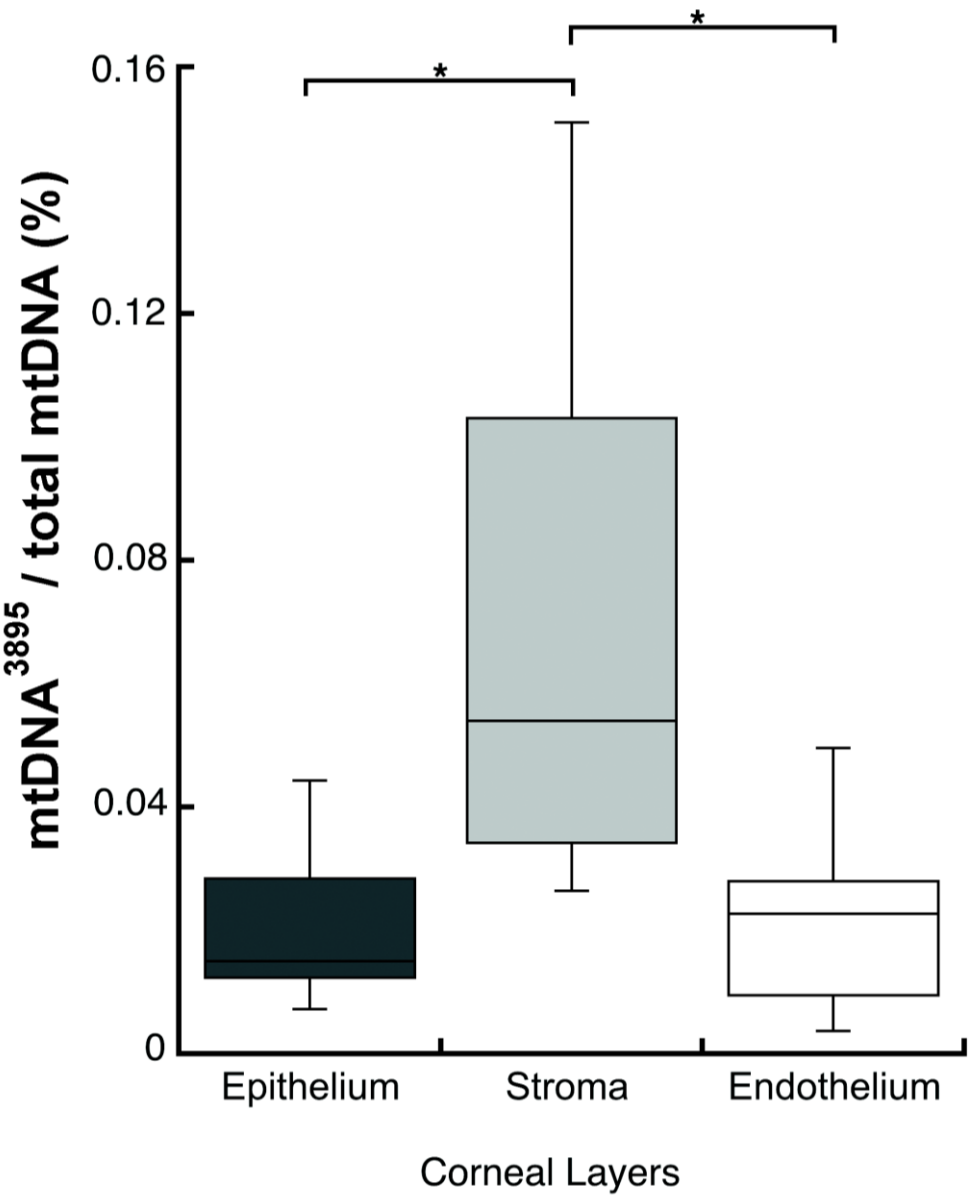


Figure 3.3 Within the cornea, the mtDNA^{3895} is concentrated in the stroma. The mtDNA^{3895}/total mtDNA ratio was evaluated by Q-PCR in the corneal epithelium, stroma and endothelium of eight human subjects with a median age of 68. Corneas were dissected and their layers were separated by a dispase II treatment. As depicted in the box plot, the mtDNA^{3895} is concentrated in the stroma (0.054%) when compared with the epithelium (0.015%) and the endothelium (0.022%). The mtDNA^{3895}/total mtDNA ratio was significantly different between the stroma and both the epithelium and endothelium (*$p < 0.005$).

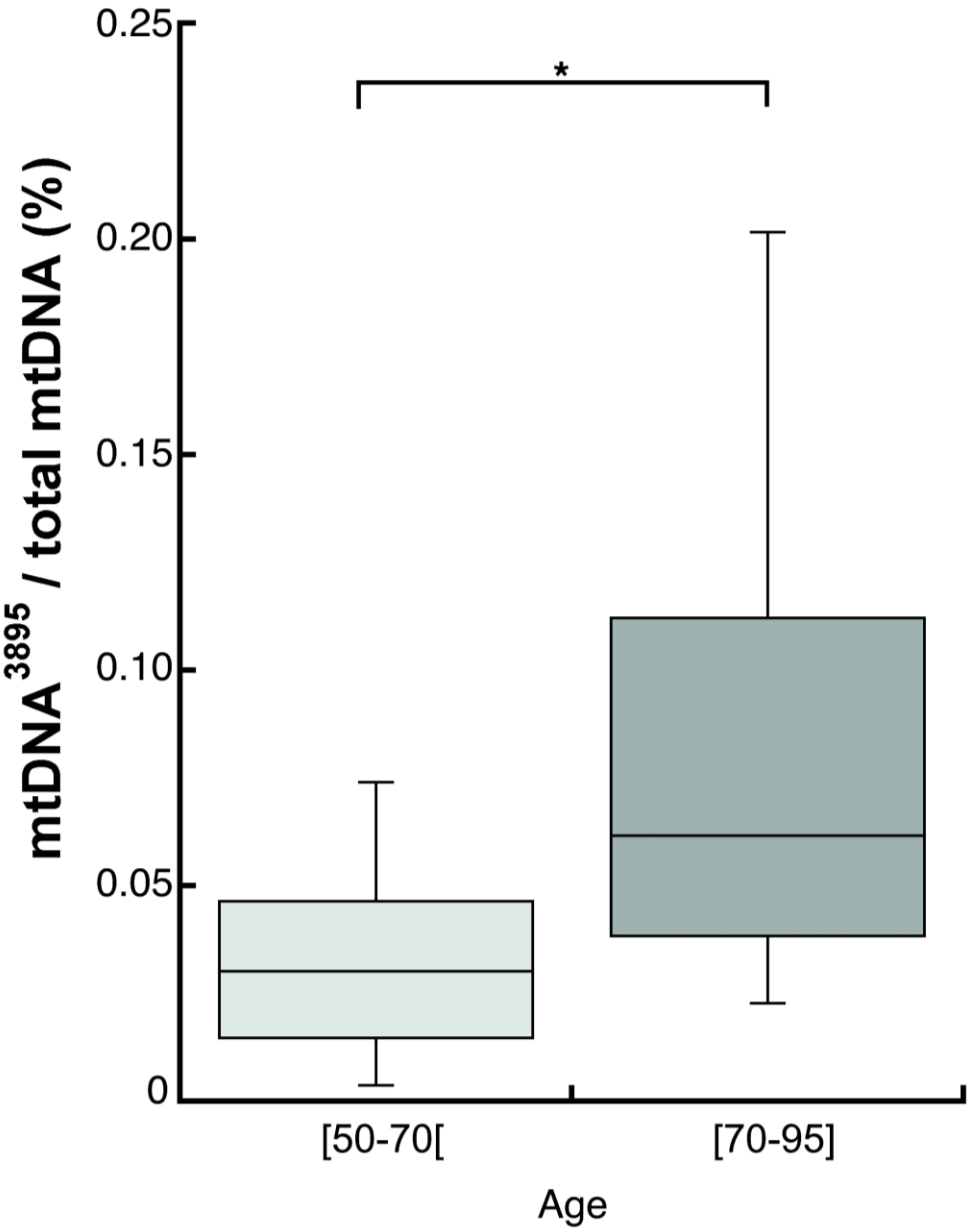


Figure 3.4 The mtDNA^{3895} accumulates with age in the human corneal stroma. Corneas of 11 subjects of 50-70-years-old and 13 subjects of 70-95-years-old were dissected and the stromal layer was separated using a dispase II treatment. Total DNA was extracted then the mtDNA^{3895} and total mtDNA were detected by Q-PCR. The box plot shows a significantly higher mtDNA^{3895} level in the 70 to 95-year-old group (0.061%) when compared with the 50 to 69-year-old group (0.030%) (*$p < 0.006$).

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

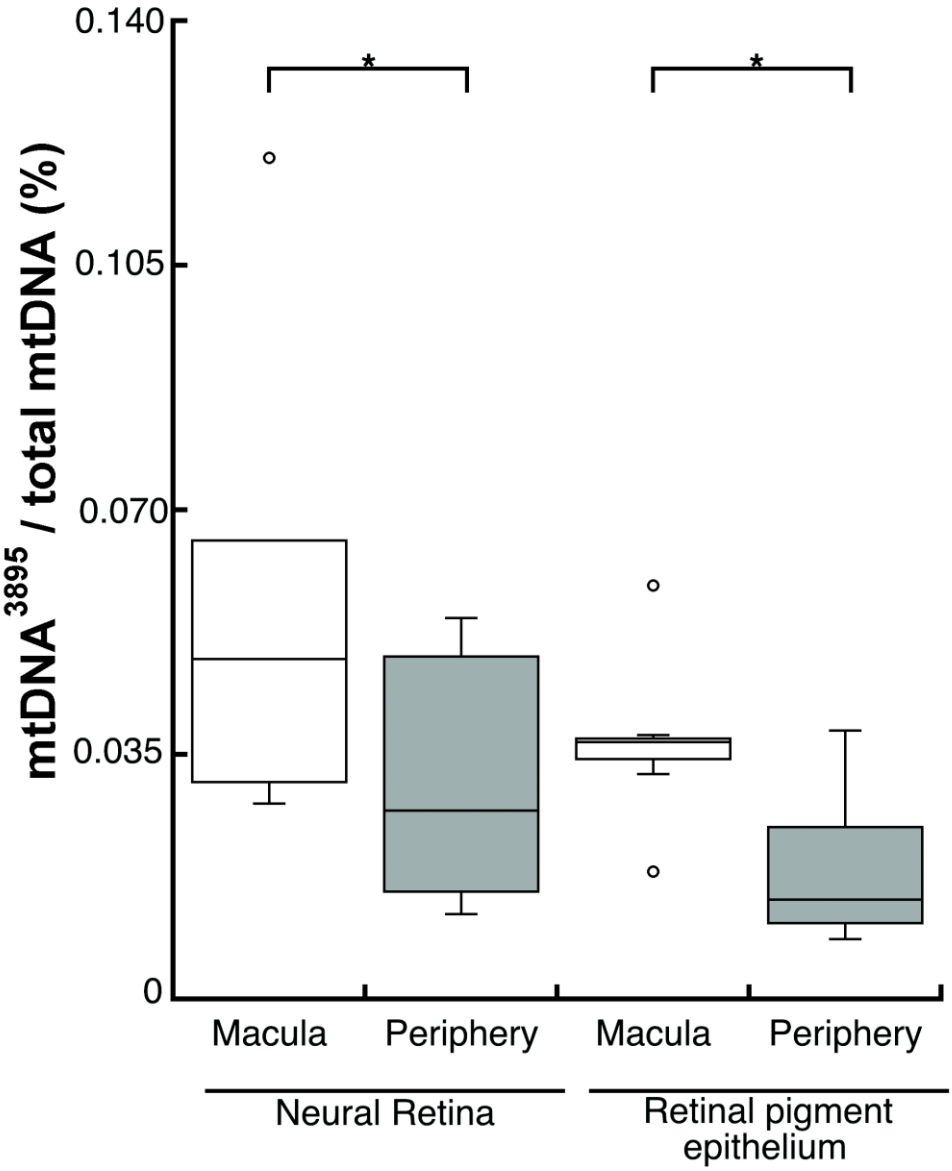


Figure 3.5 The mtDNA^{3895} is concentrated in the macular region of the neural retina and the RPE. The neural retinas and the RPE were dissected and then the macular and peripheral regions were separated. The mtDNA^{3895}/total mtDNA ratio was evaluated by Q-PCR in the neural retina of six human subjects with a median age of 61 years old. As depicted in the box plot, mtDNA^{3895} is concentrated in the macular region of the neural retina (0.048%) when compared to the periphery (0.026%). For the RPE, the mtDNA^{3895}/total mtDNA ratio was evaluated by Q-PCR in the RPE of seven human subjects with a median age of 85 years old. As for the neural retina, the mtDNA^{3895} level in RPE is concentrated in the macular region (0.036%) compared to the peripheral (0.014%). The mtDNA^{3895}/total mtDNA ratio was significantly different between the macular region and the periphery of both the neural retina and the RPE (*$p < 0.04$).

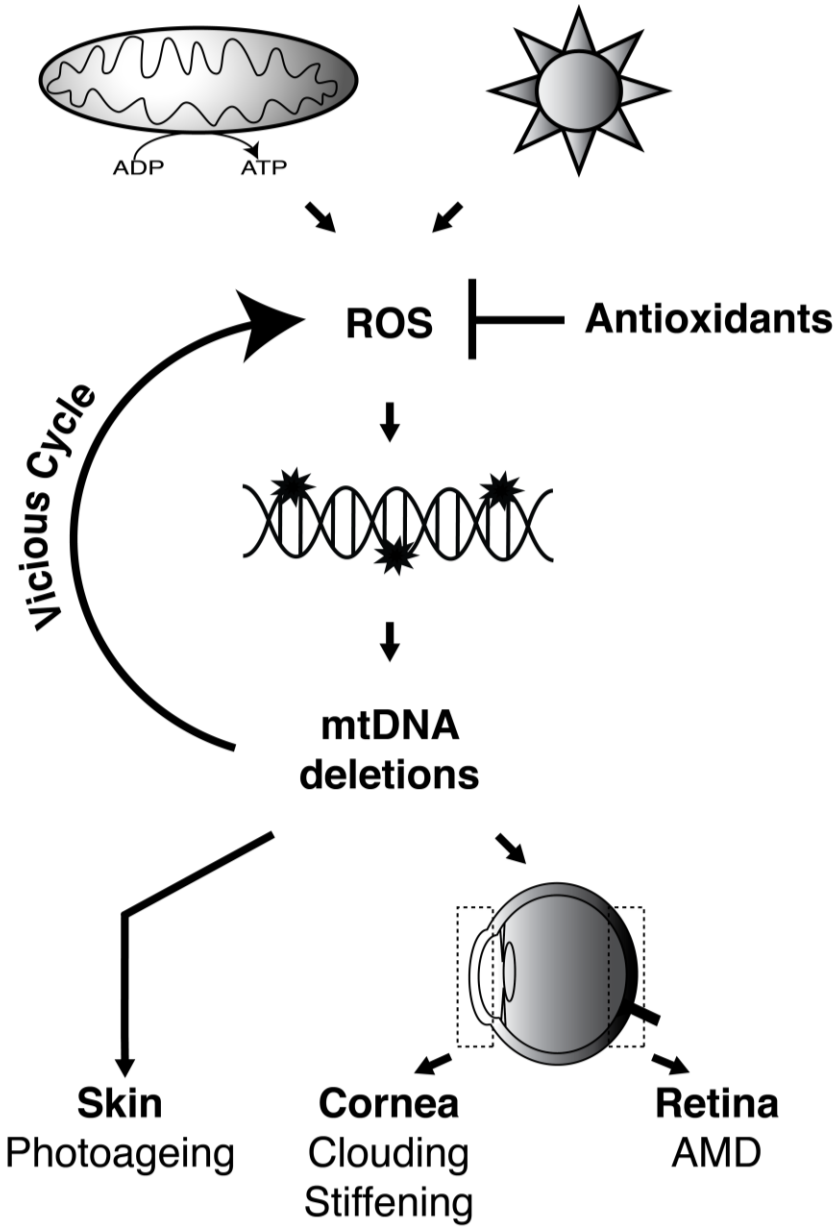


Figure 3.6 Model of mtDNA deletion formation from endogenous and exogenous source of ROS and the consequences of those deletions on human skin and eye. ROS originating from endogenous (OXPHOS) and exogenous sources (UV and blue light) lead to the formation of oxidatively generated mtDNA damage that catalyze the induction of mitochondrial deletions, such as the mtDNA^{3895}. Accumulation of mtDNA deletions causes the loss of coding proteins and tRNA resulting in a deficient OXPHOS pathway that lead the formation of more ROS, feeding the known "vicious cycle". The accumulation of mtDNA deletions in the skin is responsible for some of the photoageing phenotypes such as wrinkles and loss of elasticity. In the eye, mtDNA deletions are suspected to be responsible for aging phenotypes such as clouding and stiffening in the cornea and AMD in the retina.

Chapitre 4: Modifications in stromal extracellular matrix of aged corneas can be induced by ultraviolets A irradiation

Aging Cell 2015 June 14(3):433-442

4.1 Résumé en français

Avec l'âge, des changements structurels et fonctionnels peuvent être observés dans la cornée humaine. Plusieurs études ont montré une perte de la transparence cornéenne et une augmentation de la turbidité associée avec le vieillissement. Ces changements sont causés par des modifications dans la composition et l'arrangement de la matrice extracellulaire du stroma cornéen. Dans la peau humaine, il est bien documenté que l'exposition aux radiations solaires, et principalement aux rayons UVA, mène aux phénotypes de photovieillissement caractérisé par l'altération de la matrice extracellulaire du derme. Bien que la cornée soit aussi exposée aux radiations solaires, les modifications de la matrice extracellulaire observées dans des cornées vieillissantes ont principalement été attribuées au vieillissement chronologique et non à l'exposition solaire. Afin de vérifier l'implication réelle de l'exposition aux UVA dans les changements à la matrice extracellulaire observés avec l'âge dans les cornées humaines, nous avons développé un modèle de photovieillissement en exposant des kératocytes de stroma cornéen à un régime précis de d'irradiation chroniques de rayons UVA. En utilisant ce modèle, nous avons analysé les changements transcriptomiques et protéomiques induits par les rayons UVA dans le stroma. Nos résultats montrent que l'exposition cumulée aux UVA cause des changements dans la matrice extracellulaire qui sont retrouvés dans des stromas cornéens d'individus âgés, suggérant que l'exposition solaire catalyse le vieillissement cornéen. En effet, nous observons une dérégulation à la baisse de l'expression génique des collagènes et des protéoglycans et une réduction de la production et de la sécrétion des protéoglycans en réponse à l'exposition cumulée aux UVA. Cette étude fournit la première évidence que l'exposition oculaire chronique à la lumière du soleil affecte la composition de la matrice extracellulaire et joue ainsi un rôle dans les changements cornéens observés avec l'âge.

4.2 Article

Modifications in stromal extracellular matrix of aged corneas can be induced by ultraviolets A irradiation

Sébastien P. Gendron and Patrick J. Rochette

LOEX/CUO-Recherche, Centre de recherche du CHU de Québec (Axe médecine régénératrice) and Département d'Ophtalmologie, Université Laval, Québec, Canada

* Corresponding author at:

Dr. Patrick J. Rochette

LOEX/CUO-Recheche

Centre de recherche du CHU de Québec (Axe médecine régénératrice)

Hôpital du Saint-Sacrement, Bureau H2-10

1050 Chemin Sainte-Foy, Québec, QC, Canada, G1S 4L8

Phone: 1-(418) 682-7568

Fax: 1-(418) 682 8000

E-mail address: Patrick.rochette@orlo.ulaval.ca

4.2.1 Résumé (anglais)

With age, structural and functional changes can be observed in human cornea. Some studies have shown a loss of corneal transparency and an increase in turbidity associated with aging. These changes are caused by modifications in the composition and arrangement of extracellular matrix in the corneal stroma. In human skin, it is well documented that exposure to solar radiation, and mainly to the UVA wavelengths, leads to phenotypes of photoaging characterized by alteration in extracellular matrix of the dermis. Although the cornea is also exposed to solar radiation, the extracellular matrix modifications observed in aging corneas have been mainly attributed to chronological aging and not to solar exposure. To ascertain the real implication of UVA exposure in extracellular matrix changes observed with age in human cornea, we have developed a model of photoaging by chronically exposing corneal stroma keratocytes with a precise UVA irradiation protocol. Using this model, we have analysed UVA-induced transcriptomic and proteomic in corneal stroma. Our results show that cumulative UVA exposure causes changes in extracellular matrix that are found in corneal stromas of aged individuals, suggesting that solar exposure catalyzes corneal aging. Indeed, we observe a downregulation of collagen and proteoglycan gene expression and a reduction in proteoglycan production and secretion in response to cumulative UVA exposure. This study provides the first evidence that chronic ocular exposure to sunlight affects extracellular matrix composition and thus plays a role in corneal changes observed with age.

4.2.2 Introduction

The cornea plays a protective role by blocking the majority of ultraviolet (UV; 100-400 nm) while allowing visible light (400-750 nm) to reach the posterior part of the eye. The cornea is the principal refractive element in the eye. It is composed of 3 cellular layers: epithelium, stroma and endothelium. The epithelium, the most anterior corneal layer, contains 6 to 8 strata of epithelial cells. Underlying the epithelium, the stroma represents up to 90% of the corneal thickness. It confers the biomechanical and optical properties to the cornea and is mainly composed of specifically oriented collagen fibers and a few dispersed extracellular matrix-producing keratocytes (Ruberti et al., 2011). The endothelium is the most posterior layer of the cornea and is composed of a monolayer of endothelial cells. It maintains the corneal stroma in a relatively dehydrated state by creating a semi-permeable barrier between the cornea and the anterior ocular chamber (Bonanno, 2011).

Light transmission in human corneas from patients of different ages is documented. It was first measured in 1962 by Boettner and Wolter in corneas from 9 patients ranging from 4 weeks to 75 years of age (Boettner and Wolter, 1962). Their results showed a loss of corneal transparency with age. In 1980, Lerman confirmed the age-dependent opacification found by Boettner and Wolter by measuring corneal transparency in patients of three different ages (8, 24 and 80 years old) (Lerman, 1980). Beems and van Best, in 1990, have measured corneal transmission in eight patients between 22 and 87 years old. They found a slight but non-significant age-dependent loss of corneal transparency (Beems and Van Best, 1990). Although there is some evidence that aging affects corneal transparency, this remains a subject of controversy.

Despite the controversy resulting from data on the measurement of corneal transparency in aging corneas, it is well understood that important changes occur with age in the corneal stroma extracellular matrix (ECM). An increased turbidity (Stocker and Moore, 1975) and stromal density (Weale, 1963) can be observed clinically. A change in the collagen fiber spacing and in degeneration, providing areas free of collagen, is observed with aging (Kanai and Kaufman, 1973). An increase in glycation and in advanced glycation end-products (AGEs) is also associated with age (Malik et al., 1992). It has also been shown that the corneal collagen interfibrillar spacing is decreased with age, and this may be related to changes in the interfibrillar matrix proteoglycan composition (Malik et al. 1992; Malik and Meek, 1996; Daxer et al., 1998). Moreover, considerable stiffening is observed with age, possibly related to the age-related nonenzymatic cross-linking of the corneal stroma collagen fibrils (Elsheikh et al., 2007, 2010). Most of the studies on corneal changes are observational and none have precisely analyzed the extent of ECM changes with age.

In humans, the skin and the eye are the only two organs exposed to UV radiation from the sun. The photoaging-induced biochemical and molecular changes in dermal ECM are well defined. They include the

aberrant overproduction of elastin, known as solar elastosis (Bernstein et al., 1995; Bernstein and Uitto, 1996). Cumulative UV exposure also affects dermal collagens, the most abundant dermal ECM proteins, representing 70% of the dry skin mass (Gniadecka et al., 1998). There is strong evidence showing that photoaging leads to a decrease in collagen synthesis (Fisher et al., 2000; Quan et al., 2004). Moreover, the reactive oxygen species (ROS) induced by UV radiation stimulate the matrix metalloproteinase (MMP) gene expression through the MAPK signaling pathways (Pimienta and Pascual, 2007; Yaar and Gilchrest, 2007). MMPs are responsible for the collagen degradation observed in photoaged skin (Fisher et al., 2002; Quan et al., 2009). These photoaging-related changes in the skin are primarily attributed to the UVA component of UV light (Krutmann, 2000). UVA rays penetrate deeper in the dermis and induce ROS orders of magnitude more efficiently than UVB via chromophore photosensitization reactions (Baier et al., 2006; Tewari et al., 2012).

Similar to the skin, the cornea is constantly exposed to sun's UV radiation, and we have shown that UVA penetrates throughout the corneal stroma (Mallet and Rochette, 2011; Mallet and Rochette, 2013). However, the modifications observed in the ECM of aging corneas have been mainly attributed to chronological aging, ignoring the real implication of UV light in those changes. To our knowledge, the biochemical and molecular consequences of cumulative corneal UV exposure have not been documented. This is mainly attributed to a lack of a proper model to study. In skin, it is possible to compare regions of sun-exposed and sun-protected skin in the same individual, allowing the precise determination of photo-induced changes in skin. This strategy is not possible for studies of the effect of cumulative UV exposure in the cornea. Therefore, we have developed a model of corneal photoaging to study the effects of cumulative UV exposure in the cornea. Corneal stroma keratocytes have been chronically UVA-irradiated, and the transcriptome and the proteome have been analyzed. Our results clearly show a downregulation of collagen and proteoglycan gene expression and a reduction in proteoglycan production and secretion in response to cumulative UVA exposure. This study provides the first evidence that chronic ocular exposure to sunlight affects ECM composition and thus plays a role in corneal changes observed with age.

Rapport-Gratuit.com

4.2.3 Matériel et Méthodes

All experiments performed in this study were conducted in accordance with our institution's guidelines and the Declaration of Helsinki. The research protocols received approval by the CHU de Québec institutional committee for the protection of human subjects.

Cell culture

Corneal stroma keratocytes were obtained from the eyes of 6-day-old and 87-year-old human subjects (provided by La Banque d'Yeux du Centre Universitaire d'Ophtalmologie, Québec, Canada). Cells were cultured to full confluence in DMEM medium (Wisent, St-Bruno, Québec, Canada) with 10% FBS (Wisent, St-Bruno, Québec, Canada) and 1% penicillin/streptomycin (Wisent, St-Bruno, Québec, Canada) at 37°C, 5% CO_2. Cells were used between passages 1 and 3.

UVA irradiation

Fully confluent keratocytes of a 6-day-old patient were irradiated with a UVA lamp emitting UVA1 wavelengths (340-400 nm) with less than 0.01% of UVA2 wavelengths (315-340 nm) (Figure 1) (UVP 365 nm lamp with filter, Upland, CA, USA). Cells were irradiated with 20 kJ/m^2 UVA, 2 times a day, 5 days a week for 9 weeks (90 X 20 kJ/m^2, for a total of 1800 kJ/m^2 UVA). During the irradiation, DMEM medium was changed to PBS (Wisent, St-Bruno, Québec, Canada) to avoid oxidative stress coming from the irradiated culture medium. New medium was added after each irradiation. For the control, cells from the same strain were cultured in the same conditions but not UVA-irradiated. The medium was changed to PBS at the same frequency as the irradiated cells.

Gene profiling

Total RNA was isolated from irradiated and non-irradiated 6-day-old corneal stroma keratocytes at 100% confluence with TRIzol reagent (Ambion, Life Technologies, Grand Island, NY, USA) using the manufacturer's protocol. Cyanines 3-CTP (Agilent protocol)-labeled cRNA targets were prepared from 200 ng of total RNA from both experimental samples using the Agilent One-color Microarray-Based Gene Expression Analysis kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Then, 600 ng cRNA was incubated on a G4851A SurePrint G3 Human Ge 8 x 60 K array slide (60,000 probes, Agilent Technologies). Slides were then hybridized for 18 hours, washed and scanned on an Agilent SureScan Scanner. Data were then analyzed using the Arraystar V4.1 (DNAstar, Madison, WI, USA) software for scatter plot and heat map generation for selected genes. Statistical analysis of data have been performed using the RMA (Robust Multiarray Analysis) for background

correction of the raw data values. Microarray data shown in this study comply with the Minimum Information About a Microarray Experiment (MIAME) requirements (Brazma et al., 2001).

Engineered corneal stroma production

After UVA irradiation (90 X 20 kJ/m^2), irradiated and non-irradiated 6-day-old and 87-year-old cells were cultured for 40 days in medium containing 50 µg/ml ascorbic acid, using a protocol adapted from (Proulx et al., 2010). Ascorbic acid allows fibroblasts to secrete and assemble extracellular matrix (ECM) to form an engineered corneal stroma. The engineered stroma was then partially decellularized with 1.8 mM sodium deoxycholate, which is beneath the critical micellular concentration of 2 mM at 25°C. This concentration avoids solubilization of the ECM in the decellularization process. Engineered stroma was washed 3 times with PBS at 37°C and 1.8 mM sodium deoxycholate was then added to the engineered stromas for 15 minutes at room temperature. Stromas were then washed 5 times with PBS at 37°C. Decellularized stromas were stored at -80°C.

Mass spectrometry analysis

The protein preparation and mass spectrometry analysis were performed by the Proteomics platform of the Eastern Quebec Genomic Center, CHU de Quebec, Canada. Decellularized engineered corneal stromas were sent to the platform for protein separation on gels and further processing. Each lane of the protein gel was cut into ten bands and then washed with water. Tryptic digestion was performed on a MassPrep liquid handling robot (Waters, Milford, MA, USA) according to the manufacturer's specifications and the protocol in Shevchenko et al (Shevchenko *et al.* 1996) with the modifications suggested by Havlis et al (Havlis *et al.* 2003). Briefly, proteins were reduced with 10 mM DTT and alkylated with 55 mM iodoacetamide. Trypsin digestion was performed using 126 nM of modified porcine trypsin (Sequencing grade, Promega, Madison, WI, USA) at 58°C for 1 h. Digestion products were extracted using 1% formic acid, 2% acetonitrile followed by 1% formic acid, 50% acetonitrile. The recovered extracts were pooled, dried by vacuum centrifuge, resuspended in 10 µl of 0.1% formic acid and analyzed by mass spectrometry.

Peptide samples were separated by online reversed-phase (RP) nanoscale capillary liquid chromatography (nanoLC) and analyzed by electrospray ionization-tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS). The experiments were performed with an Agilent 1200 nano pump connected to a 5600 mass spectrometer (AB Sciex, Framingham, MA, USA) equipped with a nanoelectrospray ion source. Peptide separation occurred on a self-packed PicoFrit column (New Objective, Woburn, MA) packed with Jupiter (Phenomenex) 5u, 300A C18, 15 cm x 0.075 mm internal diameter. Peptides were eluted in a linear gradient with 2-50% solvent B (acetonitrile, 0.1% formic acid) in 30 minutes, at 300 nL/min. Mass spectra were acquired using a data dependent

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

acquisition mode using Analyst software version 1.6. Each full scan mass spectrum (400 to 1250 m/z) was followed by collision-induced dissociation of the 20 most intense ions. Dynamic exclusion was set for a period of 3 sec and a tolerance of 100 ppm.

Database searching

All MS/MS peak lists (MGF files) were generated using ProteinPilot (AB Sciex, Framingham, MA, USA, Version 4.5) with the paragon algorithm. MGF peak list files were created using Protein Pilot version 4.5 software (ABSciex) utilizing the Paragon and Progroup algorithms (Shilov). MGF sample files were then analyzed using Mascot (Matrix Science, London, UK; version 2.4.0). Mascot was searched with a fragment ion mass tolerance of 0.100 Da and a parent ion tolerance of 0.100 Da. Carbamidomethyl of cysteine was specified in Mascot as a fixed modification. Glu->pyro-Glu of the n-terminus, gln->pyro-Glu of the n-terminus, deamidation of asparagine and glutamine and oxidation of methionine were specified in Mascot as variable modifications.

Criteria for protein identification

Scaffold (version Scaffold 4.3.0, Proteome Software Inc., Portland, OR) was used to validate MS/MS based peptide and protein identifications. Peptide identifications were accepted if they could be established at greater than 95.0% probability by the Peptide Prophet algorithm (Keller et al., 2002; Nesvizhskii et al., 2003). Protein identifications were accepted if they could be established at greater than 99.0% probability and contained at least 2 identified peptides. Protein probabilities were assigned by the Protein Prophet algorithm (Nesvizhskii et al., 2003). Proteins that contained similar peptides and could not be differentiated based on MS/MS analysis alone were grouped to satisfy the principles of parsimony.

4.2.4 Résultats et Discussion

The accumulated sunlight exposure of an individual during its lifetime is highly variable, and it is virtually impossible with the available tools to approximate the UVA dose received in the cornea of a given subject. Nonetheless, to partially mimic the solar exposure received by a cornea during a lifetime, we have developed a precise irradiation protocol. The irradiation source consists almost entirely of UVA1 wavelengths (340-400 nm) and contains less than 0.01% of UVA2 wavelengths (315-340 nm) (Figure 1). The UVA dose and irradiation frequency were calibrated to avoid cell death, and the cells were irradiated at 100% confluency to reduce the replication rate. UVA rays were used in our study because (1) they represent 95% of the UV wavelengths reaching the earth surface from the sun, (2) they penetrate deeper in the corneal stroma than UVB wavelengths, reaching the posterior portion of the cornea (Mallet and Rochette, 2011; Mallet and Rochette, 2013), and (3) they are the main wavelength responsible for skin photoaging (Krutmann, 2000). Stress related to the irradiation procedure is induced in the cells. For instance, the culture medium is replaced by PBS during irradiation, and the cells are removed from the 37ºC incubator during the preparation and irradiation period. Those stresses can also induce transcriptomic and proteomic changes. In our experiment, the non-irradiated controls (NoUV) underwent the same procedure as the irradiated samples (UVA). Therefore, the observed changes can safely be attributed to the UVA exposure and not to the stress caused by the procedure. Our model, using primary cultures of human corneal stroma keratocytes, also has the advantage of being fully isogenic.

To better understand the molecular changes induced by chronic exposure to UVA, we analyzed the transcriptomic and proteomic changes induced by our irradiation protocol in human corneal keratocytes (Figure 2). For the transcriptomic analysis, RNA was isolated from artificially photoaged and control keratocytes and was analyzed using microarray technology. For the proteomic analysis, the photoaged or control stromal keratocytes were induced using ascorbic acid to secrete and arrange ECM to generate tissue-engineered corneal stromas. ECM constitution was analyzed by mass spectrometry.

Gene profiling

We analyzed the gene expression of artificially photoaged and control stromal keratocytes. The experiment was performed in triplicate. The transcriptome analysis of the significantly deregulated genes (Figure 3A and B) showed very little variation between each experimental triplicate, and it can be stated that the experimental procedure is reproducible.

Amongst the 48 most deregulated genes, some are of particular interest in regard to the sunlight-induced corneal changes (Figure 3C and D). Collagen XV (col15a1) and collagen IV (col4a4) code for two ECM

proteins found in corneal stroma. They are present at a marginal level (<1%) in corneal stroma. The exact function of collagen XV, a nonfibrillar collagen, is not well defined (Muragaki et al., 1994; Pihlajaniemi and Rehn, 1995). On the other hand, collagen IV is a main component of the corneal basement membrane, which interacts with corneal epithelial cells (Kurpakus Wheater et al., 1999). Both collagens are downregulated after irradiation. In addition, another ECM-coding gene, the proteoglycan mimecan (OGN), was highly downregulated by artificial photoaging. OGN is a keratan sulfate important in collagen fibrillogenesis and matrix assembly. Mimecan-deficient mice have thicker collagen fibrils in the corneal stroma (Pellegata et al., 2000).

PNLIPRP3 gene is the most upregulated gene after irradiation. This is surprising because no stress response or aging function has been reported for this gene. In fact, PNLIPRP3 and its function are not well documented, and it may be interesting to investigate its function in relation to UV-induced response. However, we consider the investigation of PNLIPRP3 to be beyond the purpose of this study.

Collagens

The predominant collagens found in corneal stroma are collagen I and VI, representing 75% and 17% of total stromal ECM collagen, respectively (Michelacci, 2003). The genes encoding those collagens also have the highest expression in corneal stroma keratocytes (Figure 4A, B and C). The chronic UVA irradiation induces a significant downregulation of genes coding for collagen I (col1a1), collagen III (col3a1), collagen IV (col4a3, a4, a5 and a6), collagen V (col5a1 and a2), collagen VIII (col8a2), collagen IX (col9a3), collagen XII (col12a1) and collagen XV (col15a1). None of the collagen-coding genes were upregulated by the UVA-irradiation regime.

With the help of ascorbic acid, the secreted collagens are crosslinked, assembled into fibrils and aggregated into fibers (Proulx et al., 2010). We analyzed the assembled collagen content in the tissue-engineered corneal stromas using mass spectrometry (Figure 4D). Collagen VI (col6a1, a2 and a3), collagen XII (col12a1) and collagen XIV (col14a1) were detected by mass spectrometry. Collagen I, the predominant collagen normally found in corneal stroma, is a fibril-forming collagen. Consequently, we found it at an almost undetectable level using standard mass spectrometry procedure. Genes coding for collagen VI and XII were the most highly expressed non-fibril forming collagens, which correlated with the fact that they are the ones detected at the highest level using mass spectrometry. A small reduction in collagen VI and XII was observed in our irradiated stromal keratocytes when compared with the unirradiated controls (Figure 4D). However, this reduction was either less important or not apparent when comparing stromal cells from an old donor (87 years old) with a young donor (6 days old) (Figure 4D). This indicates that the cumulative UVA exposure throughout a lifetime does not contribute significantly to differences in corneal stroma collagen deposition.

Proteoglycans and other ECM

Proteoglycans are responsible for the organization and alignment of collagen fibers (reviewed in (Hassell and Birk, 2010)). Their presence at a precise level is crucial for corneal transparency. For example, lumican knockout mice exhibit severe corneal opacity and corneal thinning associated with disorganized collagen fibrils in the corneal stroma (Meij et al., 2007). Lumican is responsible for the organization and spacing of collagen fibrils and the regulation of collagen assembly, and lumican -/- mice develop bilateral corneal opacification (Chakravarti et al., 1998). Lumican plays a regulatory role for other keratocans, and a downregulation of lumican leads to a downregulation of keratocans such as biglycan, decorin and podocan (Chen and Birk, 2013). Gene expression of lumican (LUM), keratocan (KERA) and biglycan (OGN) was significantly downregulated by chronic UVA irradiation (Figure 5A and B). We also observed a downregulation of decorin (DCN) and podocan (PODN) gene expression, but it is not statistically significant.

At the protein level, the mass spectrometry analysis of the engineered stromal ECM showed a clear decrease of different proteoglycans (Figure 5D). This is in accordance with the downregulation of proteoglycan gene expression observed in transcriptome analysis (Figure 5A and B). Lumican, decorin, biglycan, podocan and fibromodulin were all found at lower levels in engineered stroma from irradiated cells when compared with unirradiated controls. The decrease in the protein levels of all proteoglycans was also observed in engineered stromas from cells from 87-year-old subjects when compared with cells from 6-day-old subjects. This clearly indicates that cumulative UVA exposure to the cornea is implicated in the depletion of corneal stroma proteoglycans observed with aging.

Amongst other ECM-coding genes, a significant downregulation of fibronectin (FN1) and thrombospondin (THBS2 and 4) was observed (Figure 5D). Fibronectin and thrombospondin are not found in native corneal stroma. However, they are important in corneal wound healing (Matsuba et al., 2011; Blanco-Mezquita et al., 2013). The corneal stroma keratocytes cultured *in vitro* adopt characteristics of fibroblasts, mimicking what can be observed in the corneal wound healing process (Matsuba et al., 2011). This explains, at least in part, the expression of those genes in cultured keratocytes. We observed the depletion in fibronectin associated with chronic UVA exposure in engineered stromas, and this depletion was also observed in 87-year-old cells (Figure 5D). However, because fibronectin is associated with wound healing, this may reflect that UVA influences wound healing rather than corneal stroma composition. The gene encoding nidogen 2 (NID2) is downregulated by UVA, and its protein level is also depleted to a level undetectable by mass spectrometry in both engineered stromas from irradiated keratocytes (UVA) and keratocytes from a 87-year-old subject (Old) (Figure 5). In the native cornea, nidogen 2 is found in the basement membrane at the epithelium/stroma junction. Nidogen 2 is expressed on both sides of basement membrane in infants, but it is expressed only on

the epithelial side of the membrane in adults (Kabosova et al., 2007). Because our model of tissue-engineered stroma does not contain an epithelium and/or a membrane, the conclusions that can be drawn from this result are limited.

Matrix-degrading metalloproteinases

We then analyzed gene expression of matrix-degrading metalloproteinases (MMPs) and MMP inhibitors (TIMP) (Figure 6). MMPs are proteinases responsible for the degradation of ECM proteins, including collagens and proteoglycans (Nelson et al., 2000; Sternlicht and Werb, 2001). The role of MMPs in skin photoaging is well defined (reviewed in (Fisher et al., 2002; Quan et al., 2009)). UV exposure leads to a strong increase in the expression of the genes coding for MMP1 and MMP3 and a modest increase in MMP9 in human skin *in vivo* (Fisher et al., 1996; Fisher et al., 1997; Fisher and Voorhees, 1998; Brenneisen et al., 2002; Fisher et al., 2002; Hazane et al., 2005; Wang et al., 2008). In agreement with findings in skin, expression of MMP1 and MMP3 increased in corneal stroma keratocytes. In total, 6 MMP-coding genes were significantly upregulated (MMP1, 3, 7, 14, 15 and 24) (Figure 6A and B). This result validates our model of corneal photoaging and supports our hypothesis that the accumulation of UVA irradiation in the eye produces effects through a process similar to skin photoaging. Only one MMP-coding gene, MMP23B, was downregulated by UVA irradiation. MMP23B is predominantly expressed in reproductive tissues, and no role in corneal ECM has been attributed to this MMP (Velasco et al., 1999; Ohnishi et al., 2001). On the other hand, amongst the TIMPs, only the TIMP4-coding gene is significantly upregulated by the irradiation protocol. TIMP4 has a central role in MMP regulation. It inhibits MMP1, 2, 3, 7 and 9 (reviewed in (Melendez-Zajgla et al., 2008)). However, the relative expression level of TIMP4 is marginal compared to the other 3 TIMPs (Figure 6C). The imbalance of the MMP/TIMP ratio is responsible for the ECM degradation observed in skin photoaging (Hachiya et al., 2009). Based on our results, it would be hazardous to draw any conclusions about the potential role of MMPs or the inhibition of their effect by TIMPs in the UVA-induced ECM changes observed in corneal stroma keratocytes.

4.2.5 Conclusion

Our study focuses on two aspects: (1) the development of a model of corneal photoaging and (2) the molecular characterization of corneal photoaging. We developed a specific irradiation protocol to accumulate large amounts of UVA (1800 kJ/m^2) in corneal stroma keratocytes without inducing significant mortality. Considering that we are exposed to approximately 50 kJ/m^2 per hour at the zenith of summer (Kuluncsics et al., 1999), we exposed our experimental stromal keratocytes to the equivalent of 36 h of direct sunlight. However, because many factors reduce the sun exposure received by our stromal cells, the actual time spent outside to reach 1800 kJ/m^2 of UVA wavelengths in our keratocytes is much higher than the given 36 h. First, the sun intensity varies and is rarely at its maximal intensity. Moreover, we rarely look directly at the sun, and 40% the UVA wavelengths that reach the cornea are filtered by the corneal epithelium and never reach the corneal stroma (Mallet and Rochette, 2013). Thus, even if it is impossible to estimate the average solar exposure received by an individual's corneal stroma, we can safely state that 1800 kJ/m^2 UVA is a high dose that should suffice to induce a photoaging effect in corneal stroma cells. By comparing corneal stroma keratocytes exposed to our irradiation protocol with the same unexposed cells, we established a perfectly isogenic system to study the effect of sun exposure on ECM components. This model is greatly enhanced by the fact that using tissue engineering techniques, we reproduced an artificial corneal stroma by inducing irradiated and unirradiated keratocytes to secrete and organize their ECM. Using this corneal photoaging model, we have shed light on important changes in ECM production (at the RNA level), and secretion and organization (at the protein level) induced by UVA light. We have shown that proteoglycans are highly affected by chronic UVA irradiation, and this deregulation is also found in the corneal stromas of older subjects. These results strongly suggest that UVA plays an important role in corneal aging and that the phenotypes of corneal aging could be prevented by using appropriate eye protection against UVA wavelengths. This work is an important first step in the understanding of corneal photoaging. It is well accepted that UVA exert their biological effects mostly via the generation of ROS (Cadet and Douki, 2011). In the perspective of this study, it would be of great interest to assess the implication of UVA-induced oxidation and photosensitizer involved in the ECM changes observed. We anticipate that with the establishment of our corneal photo-aging model, more work will be conducted to understand the real impact of chronic exposure to sunlight in the human cornea.

4.2.6 Remerciements

The authors are grateful to La Banque d'Yeux du Centre Universitaire d'Ophtalmologie de Québec for providing the specimens. La Banque d'Yeux du Centre Universitaire d'Ophtalmologie de Québec is supported by le Réseau de recherche en santé de la vision du Fonds de recherche du Québec - Santé (FRQ-S). This work was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) to P.J.R (MOP-133719). P.J.R is a research scholar from the FRQ-S. S.P.G holds a Doctoral Research Award from the FRQ-S.

4.2.7 Références

Baier J, Maisch T, Maier M, Engel E, Landthaler M, Baumler W (2006). Singlet oxygen generation by UVA light exposure of endogenous photosensitizers. *Biophys J*. **91**, 1452-1459.

Beems EM, Van Best JA (1990). Light transmission of the cornea in whole human eyes. *Exp. Eye Res*. **50**, 393-395.

Bernstein EF, Brown DB, Urbach F, Forbes D, Del Monaco M, Wu M, Katchman SD, Uitto J (1995). Ultraviolet radiation activates the human elastin promoter in transgenic mice: a novel in vivo and in vitro model of cutaneous photoaging. *J. Invest. Dermatol*. **105**, 269-273.

Bernstein EF, Uitto J (1996). The effect of photodamage on dermal extracellular matrix. *Clin. Dermatol*. **14**, 143-151.

Blanco-Mezquita JT, Hutcheon AE, Zieske JD (2013). Role of thrombospondin-1 in repair of penetrating corneal wounds. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. **54**, 6262-6268.

Boettner EA, Wolter JR (1962). Transmission of the ocular media. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. **1**, 776-783.

Bonanno JA (2011). Molecular mechanisms underlying the corneal endothelial pump. *Exp. Eye Res*. **95**, 2-7.

Brazma A, Hingamp P, Quackenbush J, Sherlock G, Spellman P, Stoeckert C, Aach J, Ansorge W, Ball CA, Causton HC, Gaasterland T, Glenisson P, Holstege FC, Kim IF, Markowitz V, Matese JC, Parkinson H, Robinson A, Sarkans U, Schulze-Kremer S, Stewart J, Taylor R, Vilo J, Vingron M (2001). Minimum information about a microarray experiment (MIAME)-toward standards for microarray data. *Nat. Genet*. **29**, 365-371.

Brenneisen P, Sies H, Scharffetter-Kochanek K (2002). Ultraviolet-B irradiation and matrix metalloproteinases: from induction via signaling to initial events. *Ann. N.Y. Acad. Sci*. **973**, 31-43.

Cadet J, Douki T (2011). Oxidatively generated damage to DNA by UVA radiation in cells and human skin. *J. Invest. Dermatol*. **131**, 1005-1007.

Chakravarti S, Magnuson T, Lass JH, Jepsen KJ, LaMantia C, Carroll H (1998). Lumican regulates collagen fibril assembly: skin fragility and corneal opacity in the absence of lumican. *J. Cell. Biol*. **141**, 1277-1286.

Chen S, Birk DE (2013). The regulatory roles of small leucine-rich proteoglycans in extracellular matrix assembly. *FEBS J*. **280**, 2120-2137.

Daxer A, Misof K, Grabner B, Ettl A, Fratzl P (1998). Collagen fibrils in the human corneal stroma: structure and aging. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. **39**, 644-648.

Elsheikh A, Geraghty B, Rama P, Campanelli M, Meek KM (2010). Characterization of age-related variation in corneal biomechanical properties. *J. R. Soc. Interface*. **7**, 1475-1485.

Elsheikh A, Wang D, Brown M, Rama P, Campanelli M, Pye D (2007). Assessment of corneal biomechanical properties and their variation with age. *Curr. Eye Res*. **32**, 11-19.

GJ, Datta S, Wang Z, Li XY, Quan T, Chung JH, Kang S, Voorhees JJ (2000). c-Jun-dependent inhibition of cutaneous procollagen transcription following ultraviolet irradiation is reversed by all-trans retinoic acid. *J. Clin. Invest*. **106**, 663-670.

Fisher GJ, Datta SC, Talwar HS, Wang ZQ, Varani J, Kang S, Voorhees JJ (1996). Molecular basis of sun-induced premature skin ageing and retinoid antagonism. *Nature*. **379**, 335-339.

Fisher GJ, Kang S, Varani J, Bata-Csorgo Z, Wan Y, Datta S, Voorhees JJ (2002). Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. *Arch. Dermatol*. **138**, 1462-1470.

Fisher GJ, Voorhees JJ (1998). Molecular mechanisms of photoaging and its prevention by retinoic acid: ultraviolet irradiation induces MAP kinase signal transduction cascades that induce Ap-1-regulated

Rapport-gratuit.com

matrix metalloproteinases that degrade human skin in vivo. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc*. **3**, 61-68.

Fisher GJ, Wang ZQ, Datta SC, Varani J, Kang S, Voorhees JJ (1997). Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light. *New Eng. J Med*. **337**, 1419-1428.

Gniadecka M, Nielsen OF, Wessel S, Heidenheim M, Christensen DH, Wulf HC (1998). Water and protein structure in photoaged and chronically aged skin. *J. Invest. Dermatol*. **111**, 1129-1133.

Hachiya A, Sriwiriyanont P, Fujimura T, Ohuchi A, Kitahara T, Takema Y, Kitzmiller WJ, Visscher MO, Tsuboi R, Boissy RE (2009). Mechanistic effects of long-term ultraviolet B irradiation induce epidermal and dermal changes in human skin xenografts. *Am. J. Pathol*. **174**, 401-413.

Hassell JR, Birk DE (2010). The molecular basis of corneal transparency. *Exp. Eye Res*. **91**, 326-335.

Havlis J, Thomas H, Sebela M, Shevchenko A (2003). Fast-response proteomics by accelerated in-gel digestion of proteins. *Anal. Chem*. **75**, 1300-1306.

Hazane F, Valenti K, Sauvaigo S, Peinnequin A, Mouret C, Favier A, Beani JC (2005). Ageing effects on the expression of cell defence genes after UVA irradiation in human male cutaneous fibroblasts using cDNA arrays. *J. Photoch. Photobio. B*. **79**, 171-190.

Kabosova A, Azar DT, Bannikov GA, Campbell KP, Durbeej M, Ghohestani RF, Jones JC, Kenney MC, Koch M, Ninomiya Y, Patton BL, Paulsson M, Sado Y, Sage EH, Sasaki T, Sorokin LM, Steiner-Champliaud MF, Sun TT, Sundarraj N, Timpl R, Virtanen I, Ljubimov AV (2007). Compositional differences between infant and adult human corneal basement membranes. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. **48**, 4989-4999.

Kanai A, Kaufman HE (1973). Electron microscopic studies of corneal stroma: aging changes of collagen fibers. *Ann. Ophthalmol*. **5**, 285-287 passim.

Kang SJ, Kim EK, Kim HB (1999). Expression and distribution of extracellular matrices during corneal wound healing after keratomileusis in rabbits. *Ophthalmologica.* **213**, 20-24.

Keller A, Nesvizhskii AI, Kolker E, Aebersold R (2002). Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search. *Anal. Chem*. **74**, 5383-5392.

Krutmann J (2000). Ultraviolet A radiation-induced biological effects in human skin: relevance for photoaging and photodermatosis. *J Dermatol. Sci*. **23** (Suppl 1), S22-26.

Kuluncsics Z, Perdiz D, Brulay E, Muel B, Sage E (1999). Wavelength dependence of ultraviolet-induced DNA damage distribution: involvement of direct or indirect mechanisms and possible artefacts. *J. Photoch. Photobio. B*. **49**, 71-80.

Kurpakus Wheater M, Kernacki KA, Hazlett LD (1999). Corneal cell proteins and ocular surface pathology. *Biotech. Histoch*. **74**, 146-159.

Lake J, Zaniolo K, Gaudreault M, Carrier P, Deschambault A, Bazin R, Germain L, Salesse C, Guerin SL (2013). Expression of the alpha5 integrin gene in corneal epithelial cells cultured on tissue-engineered human extracellular matrices. *Biomaterials*. **34**, 6367-6376.

Lee S, Jo M, Lee J, Koh SS, Kim S (2007). Identification of novel universal housekeeping genes by statistical analysis of microarray data. *J. Biochem. Mol. Biol*. **40**, 226-231.

Lerman S (1980). *Radiant energy and the eye*. New York: Macmillan Publishing Co., Inc.

Malik NS, Meek KM (1996). Vitamins and analgesics in the prevention of collagen ageing. *Age Ageing*. **25**, 279-284.

Malik NS, Moss SJ, Ahmed N, Furth AJ, Wall RS, Meek KM (1992). Ageing of the human corneal stroma: structural and biochemical changes. *Biochim. Biophys. Acta*. **1138**, 222-228.

Mallet JD, Rochette PJ (2011). Ultraviolet light-induced cyclobutane pyrimidine dimers in rabbit eyes. *Photochem. Photobiol*. **87**, 1363-1368.

Mallet JD, Rochette PJ (2013). Wavelength-dependent ultraviolet induction of cyclobutane pyrimidine dimers in the human cornea. *Photochem. Photobiol. Sci*. **12**, 1310-1318.

Matsuba M, Hutcheon AE, Zieske JD (2011). Localization of thrombospondin-1 and myofibroblasts during corneal wound repair. *Exp. Eye Res*. **93**, 534-540.

Meij JT, Carlson EC, Wang L, Liu CY, Jester JV, Birk DE, Kao WW (2007). Targeted expression of a lumican transgene rescues corneal deficiencies in lumican-null mice. *Mol. Vis*. **13**, 2012-2018.

Melendez-Zajgla J, Del Pozo L, Ceballos G, Maldonado V (2008). Tissue inhibitor of metalloproteinases-4. The road less traveled. *Mol. cancer*. **7**, 85.

Michelacci YM (2003). Collagens and proteoglycans of the corneal extracellular matrix. *Braz. J. Med. Biol. Res*. **36**, 1037-1046.

Muragaki Y, Abe N, Ninomiya Y, Olsen BR, Ooshima A (1994). The human alpha 1(XV) collagen chain contains a large amino-terminal non-triple helical domain with a tandem repeat structure and homology to alpha 1(XVIII) collagen. *J. Biol. Chem*. **269**, 4042-4046.

Murakami J, Nishida T, Otori T (1992). Coordinated appearance of beta 1 integrins and fibronectin during corneal wound healing. *J. Lab. Clin. Med*. **120**, 86-93.

Nelson AR, Fingleton B, Rothenberg ML, Matrisian LM (2000). Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. *J. Clin. Oncol*. **18**, 1135-1149.

Nesvizhskii AI, Keller A, Kolker E, Aebersold R (2003). A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. *Anal. Chem*. **75**, 4646-4658.

Ohnishi J, Ohnishi E, Jin M, Hirano W, Nakane D, Matsui H, Kimura A, Sawa H, Nakayama K, Shibuya H, Nagashima K, Takahashi T (2001). Cloning and characterization of a rat ortholog of MMP-23 (matrix metalloproteinase-23), a unique type of membrane-anchored matrix metalloproteinase and conditioned switching of its expression during the ovarian follicular development. *Mol. Endocrinol*. **15**, 747-764.

Pellegata NS, Dieguez-Lucena JL, Joensuu T, Lau S, Montgomery KT, Krahe R, Kivela T, Kucherlapati R, Forsius H, de la Chapelle A (2000). Mutations in KERA, encoding keratocan, cause cornea plana. *Nat. Genet*. **25**, 91-95.

Pihlajaniemi T, Rehn M (1995). Two new collagen subgroups: membrane-associated collagens and types XV and XVII. *Prog. Nucleic Acid Res*. **50**, 225-262.

Pimienta G, Pascual J (2007). Canonical and alternative MAPK signaling. *Cell Cycle*. **6**, 2628-2632.

Proulx S, d'Arc Uwamaliya J, Carrier P, Deschambeault A, Audet C, Giasson CJ, Guerin SL, Auger FA, Germain L (2010). Reconstruction of a human cornea by the self-assembly approach of tissue engineering using the three native cell types. *Mol. Vis*. **16**, 2192-2201.

Quan T, He T, Kang S, Voorhees JJ, Fisher GJ (2004). Solar ultraviolet irradiation reduces collagen in photoaged human skin by blocking transforming growth factor-beta type II receptor/Smad signaling. *Am. J. Pathol*. **165**, 741-751.

Quan T, Qin Z, Xia W, Shao Y, Voorhees JJ, Fisher GJ (2009). Matrix-degrading metalloproteinases in photoaging. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc*. **14**, 20-24.

Ruberti JW, Roy AS, Roberts CJ (2011). Corneal biomechanics and biomaterials. *Annu. Rev. Biomed. Eng*. **13**, 269-295.

Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem*. **68**, 850-858.

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

Sternlicht MD, Werb Z (2001). How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu. Rev. Cell Dev. Bi*. **17**, 463-516.

Stocker FW, Moore LW, Jr. (1975). Detecting changes in the cornea that come with age. *Geriatrics*. **30**, 57-59, 63-54, 67-59.

Tanaka T, Furutani S, Nakamura M, Nishida T (1999). Changes in extracellular matrix components after excimer laser photoablation in rat cornea. *Jpn. J. Ophthal*. **43**, 348-354.

Tewari A, Sarkany RP, Young AR (2012). UVA1 induces cyclobutane pyrimidine dimers but not 6-4 photoproducts in human skin in vivo. *J. Invest. Dermatol*. **132**, 394-400.

Velasco G, Pendas AM, Fueyo A, Knauper V, Murphy G, Lopez-Otin C (1999). Cloning and characterization of human MMP-23, a new matrix metalloproteinase predominantly expressed in reproductive tissues and lacking conserved domains in other family members. *J. Biol. Chem*. **274**, 4570-4576.

Wang F, Garza LA, Cho S, Kafi R, Hammerberg C, Quan T, Hamilton T, Mayes M, Ratanatharathorn V, Voorhees JJ, Fisher GJ, Kang S (2008). Effect of increased pigmentation on the antifibrotic response of human skin to UV-A1 phototherapy. *Arch. Dermatol*. **144**, 851-858.

Weale RA (1963). *The aging eye*: Hoeber Medical Division, Harper & Row.

Yaar M, Gilchrest BA (2007). Photoageing: mechanism, prevention and therapy. *Br. J. Dermatol*. **157**, 874-887.

4.2.8 Table et Figures

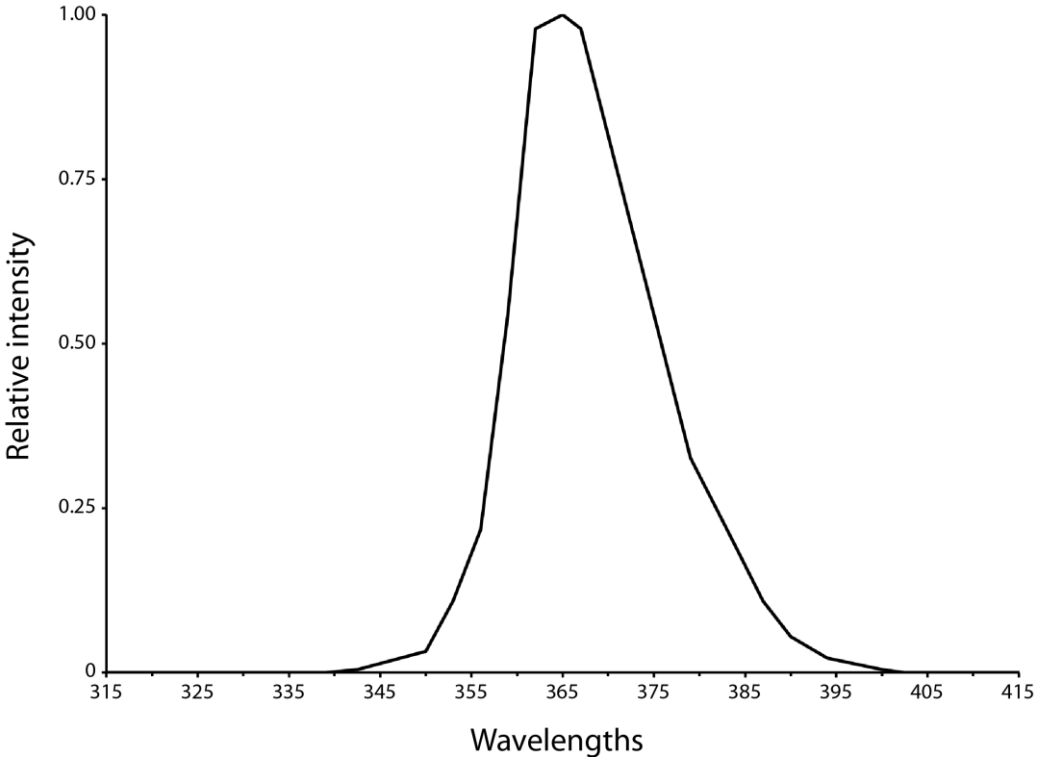


Figure 4.1 Emission spectrum of the UVA lamp. UVA irradiations were performed using B100 (UVP) lamps. The spectrum is derived from the manufacturer's specifications and modified according to measurements made using an International Light double monochromator spectroradiometer (IL7000/760D/790).

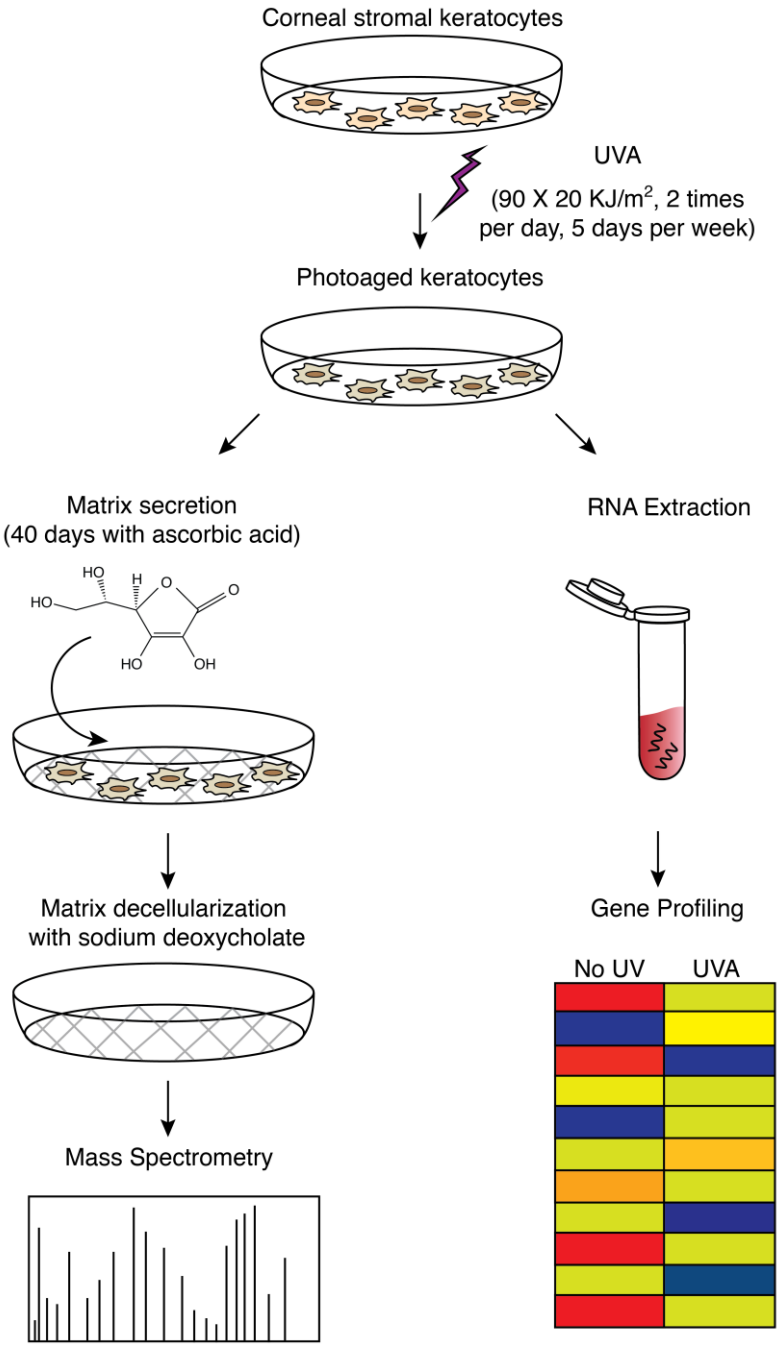
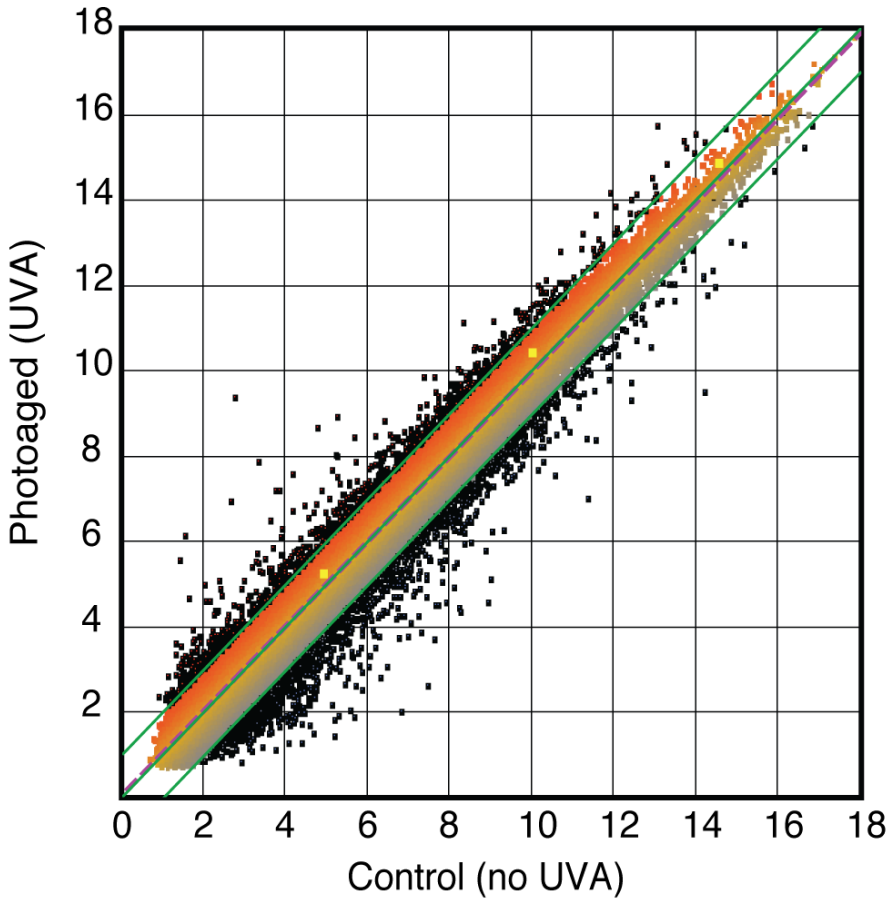


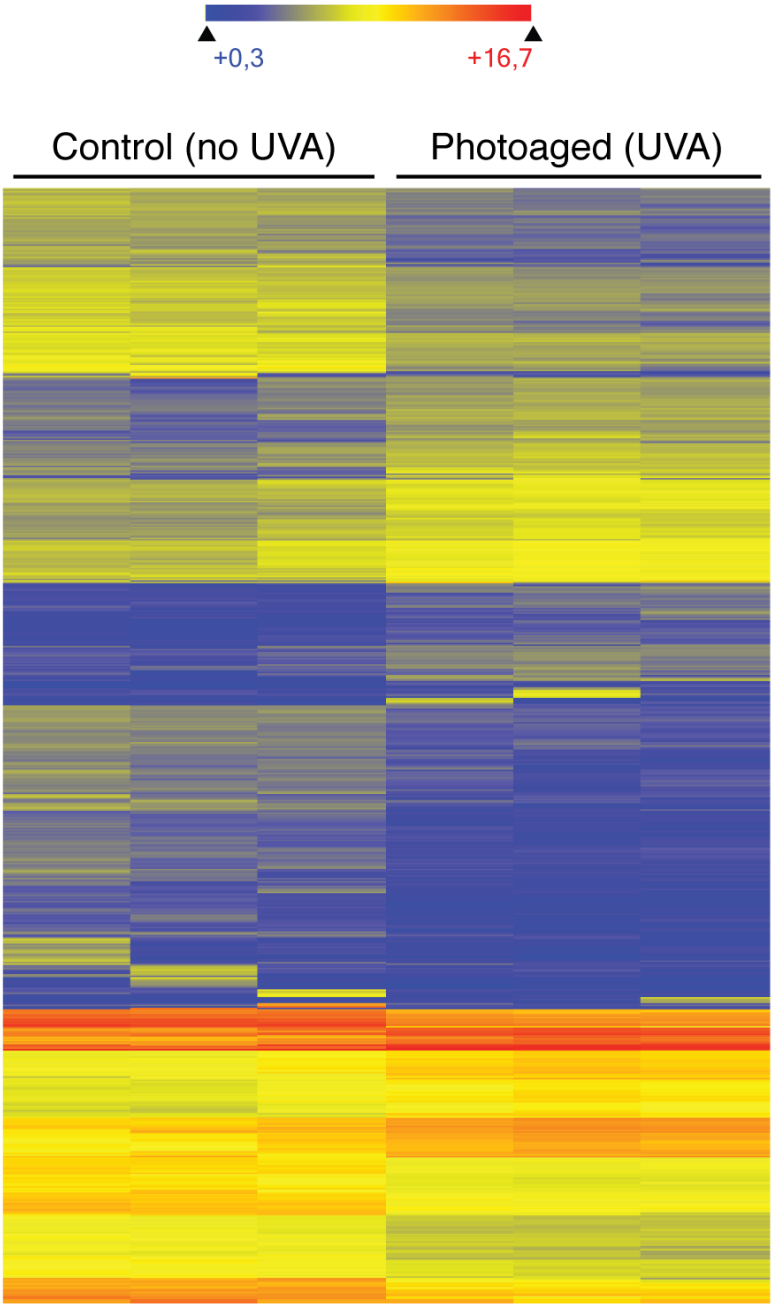
Figure 4.2 Schematic representation of the UVA irradiation protocol and further analysis of transcriptomic and proteomic changes induced by irradiation. Corneal stroma keratocytes were isolated from human corneas, cultured and irradiated *in cellulo* using 20 kJ/m^2 UVA, 2 times per day, 5 days per weeks for a total of 90 irradiations or 1800 kJ/m^2. (1) RNA was isolated from irradiated or unirradiated control keratocytes, and the

transcriptome was analyzed using microarray technology. (2) Irradiated corneal keratocytes and unirradiated controls were exposed to ascorbic acid in order to induce secretion and arrangement of extracellular matrix. This tissue engineering technique was used to reproduce corneal stroma *in vitro*. The tissue-engineered corneal stroma was decellularized using sodium deoxycholate, and the extracellular matrix (ECM) was then analyzed by mass spectrometry.

A



B



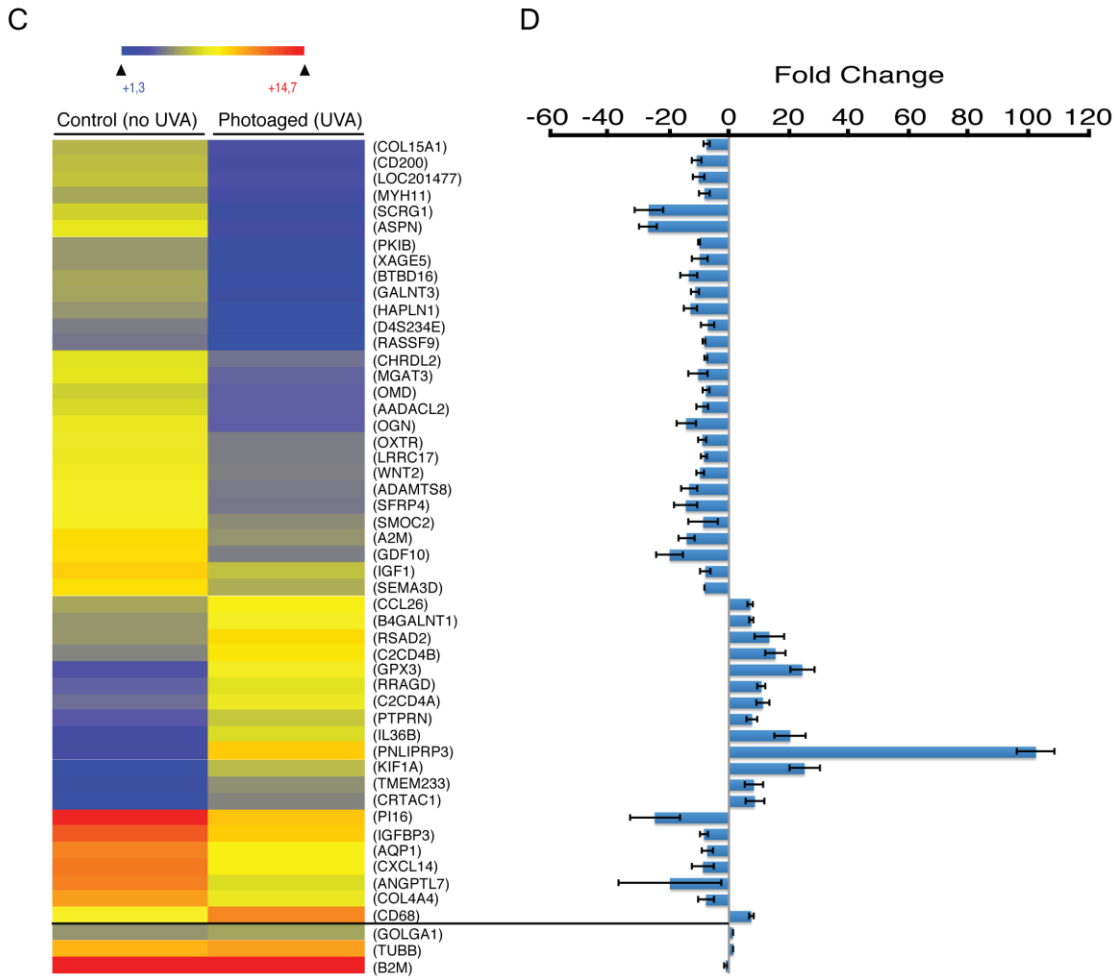
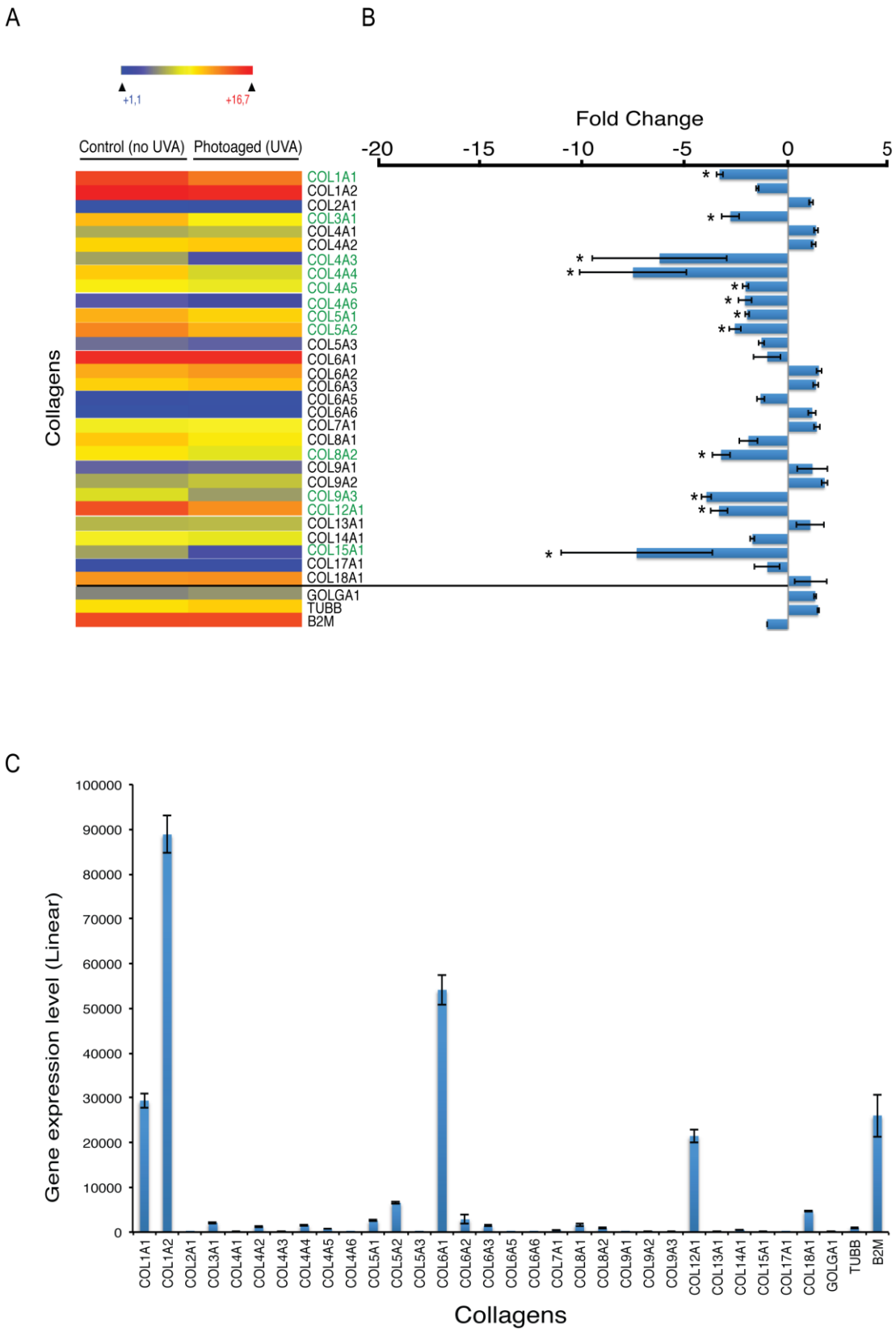


Figure 4.3 Microarray analysis of UVA-induced transcriptomic changes in human diploid stromal keratocytes. **(A)** Scatter plot of log2 signal intensity for 60 000 targets covering the entire human transcriptome. The signal for UVA-irradiated keratocyte targets (photoaged) (y-axis) is plotted against the signal of unirradiated keratocytes (control) (x-axis). The significantly deregulated targets (>2-fold positively or negatively) between the two conditions are represented in black dots. (B) Heatmap depicting the significantly deregulated genes in photoaged and control keratocytes. The experiment was performed in triplicate, and the heatmap clearly shows the experimental reproducibility. The observed changes in gene expression can thus be interpreted as UVA-induced changes and not as experimental variations. The color scale used to display the log2 expression level values was determined by the hierarchical clustering algorithm of the Euclidian metric distance between genes. Genes indicated in dark blue correspond to those whose expression is very low, whereas highly expressed genes are shown in orange/red. (C) Heatmap depicting the most deregulated 48 genes by chronic UVA-irradiation. Three control genes (GOLGA1, TUBB and B2M) are used as experimental controls (bottom 3 genes of the heatmap). The transcription level of those genes is stable, independent of cell type and condition

(Lee et al., 2007). Those three genes are non-significantly deregulated by UVA-irradiation. (D) Graphical representation of the gene expression difference between photoaged and control keratocytes.

Rapport-Gratuit.com


A
B
+1,1
+16,7
Control (no UVA)
Photoaged (UVA)
Collagens
COL1A1
COL1A2
COL2A1
COL3A1
COL4A1
COL4A2
COL4A3
COL4A4
COL4A5
COL4A6
COL5A1
COL5A2
COL5A3
COL6A1
COL6A2
COL6A3
COL6A5
COL6A6
COL7A1
COL8A1
COL8A2
COL9A1
COL9A2
COL9A3
COL12A1
COL13A1
COL14A1
COL15A1
COL17A1
COL18A1
GOLGA1
TUBB
B2M
Fold Change
-20
-15
-10
-5
0
5
C
Gene expression level (Linear)
100000
90000
80000
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
Collagens

D

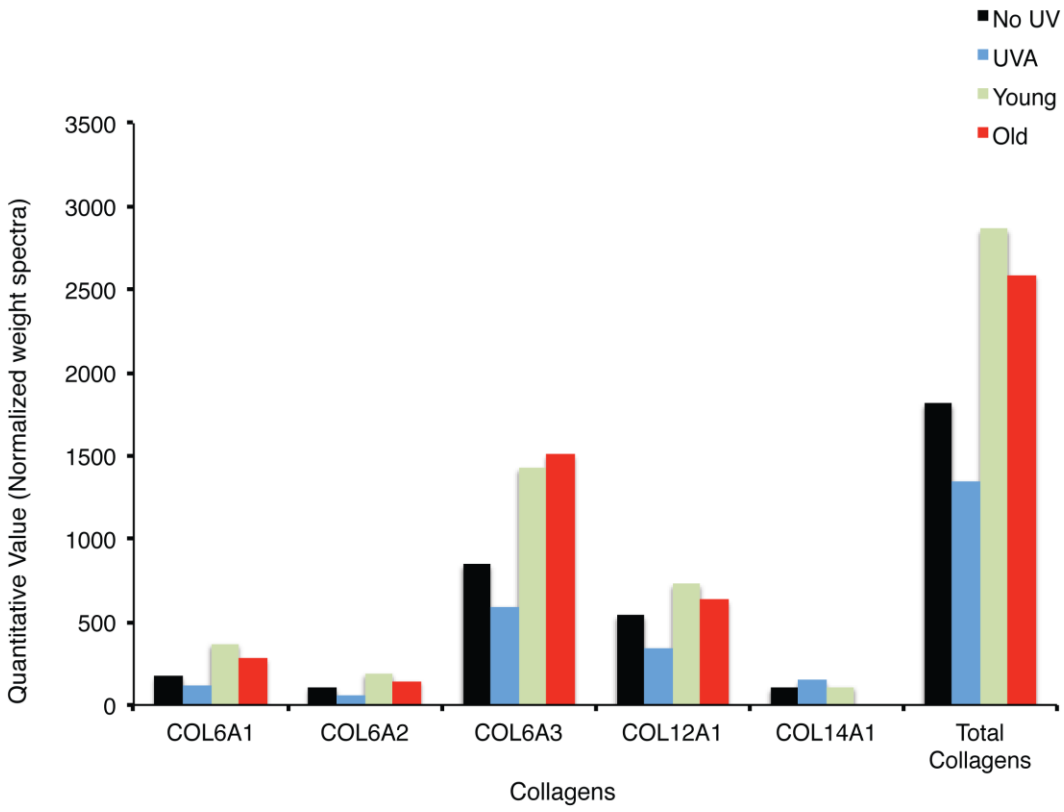
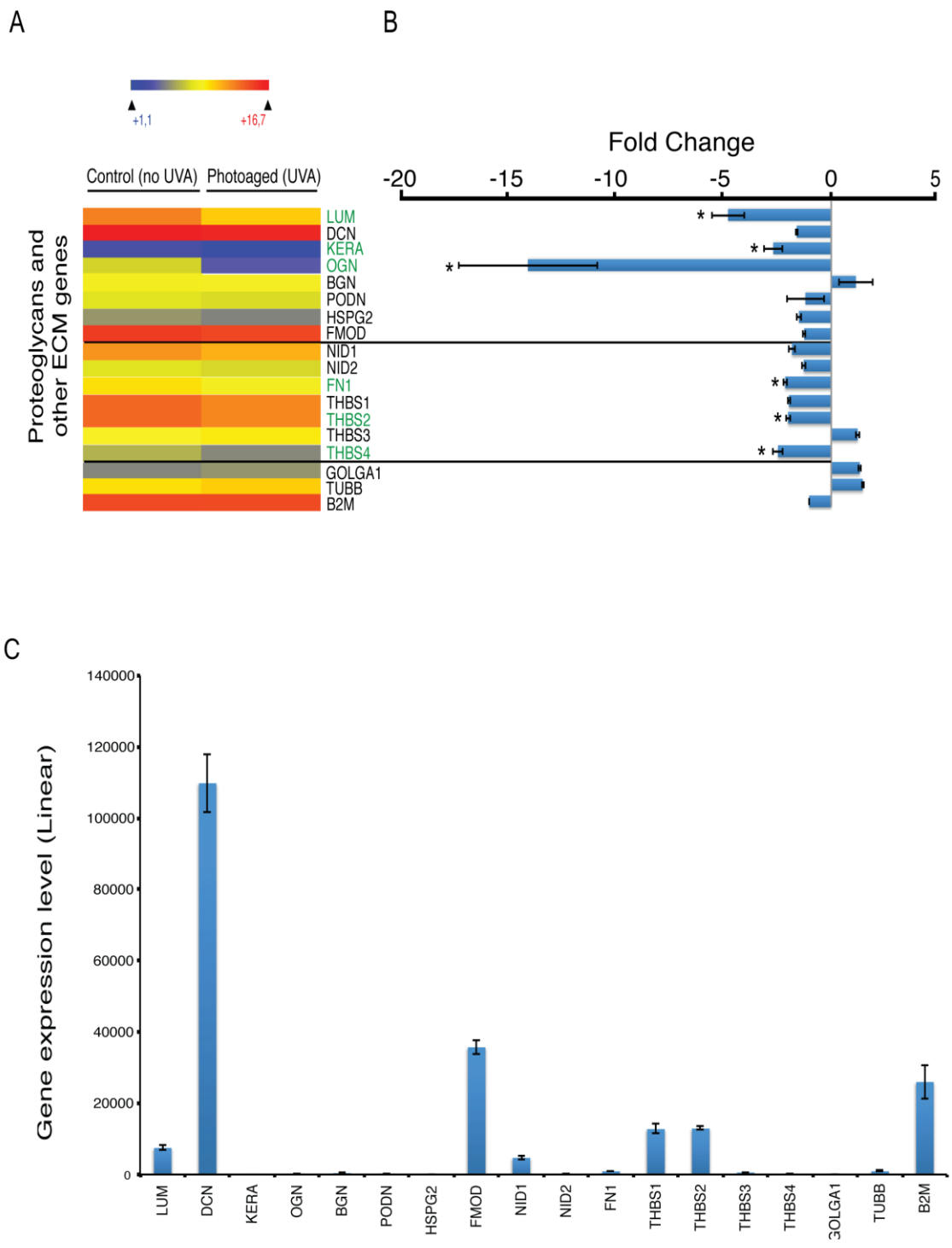


Figure 4.4 UVA-induced collagen changes in human diploid corneal keratocytes. (A) Heatmap depicting the relative expression of collagen-coding genes in photoaged and control human diploid corneal stroma keratocytes. The significantly deregulated targets (>2-fold positively or negatively) between the two conditions are identified by an asterisk (*). (B) Graphical representation of collagen-coding gene expression differences between photoaged and control keratocytes. The vast majority of collagen-coding genes are downregulated in photoaged cells, and 12 are significantly downregulated. These include collagen-coding genes from the collagen I, III, IV, V, VIII, IX, XII and XV families. (C) Linear expression level of collagen-coding genes in unirradiated control keratocytes. Collagen I-coding genes (col1a1 and col1a2) are the most expressed (approximately 60% of all collagen-coding gene expression). This correlates with the fact that collagen I represents 75% of all collagens found in corneal stroma. Collagen VI-coding genes (col6a1, a2, a3, a4, a5 and a6) and the collagen XII-coding gene (col12a1) are the second and the third most expressed (approximately 30% and 10% of all collagen-coding gene expression, respectively). (D) Graphical representation of the mass spectrometry analysis depicting collagen protein levels in photoaged keratocytes (UVA) and in unirradiated controls (NoUV). The collagen protein levels in corneal stromal keratocytes from 6-day-old (Young) and 87-year-old (Old) patients were used as a comparison. The results show a downregulation of the detected collagens in photoaged keratocytes. This tendency is not reproduced when comparing collagen secretion between keratocytes from young and old patients. Using mass spectrometry, fibril-associated collagens with

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

interrupted triple helices (FACIT) and nonfibrillar collagens were mainly detected. Although fibrillar collagens are the main constituent of the corneal stroma, their detection by mass spectrometry is challenging.


A
B
+1,1
+16,7
Control (no UVA)
Photoaged (UVA)
Proteoglycans and other ECM genes
LUM
DCN
KERA
OGN
BGN
PODN
HSPG2
FMOD
NID1
NID2
FN1
THBS1
THBS2
THBS3
THBS4
GOLGA1
TUBB
B2M
Fold Change
-20
-15
-10
-5
0
5
C
Gene expression level (Linear)
140000
120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
LUM
DCN
KERA
OGN
BGN
PODN
HSPG2
FMOD
NID1
NID2
FN1
THBS1
THBS2
THBS3
THBS4
GOLGA1
TUBB
B2M

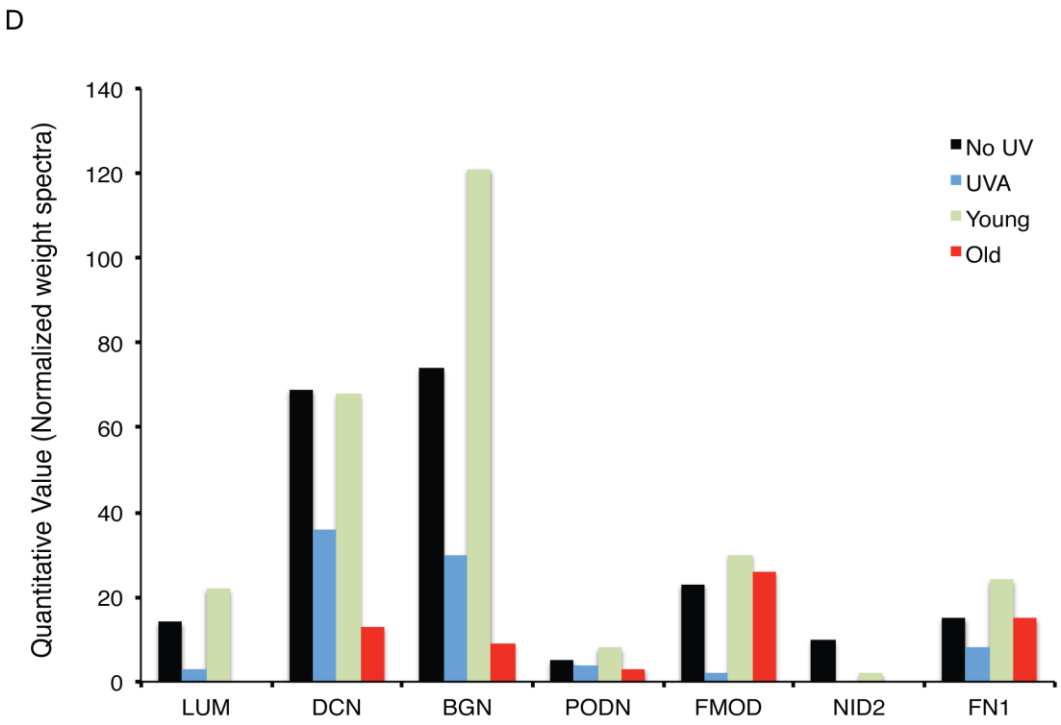
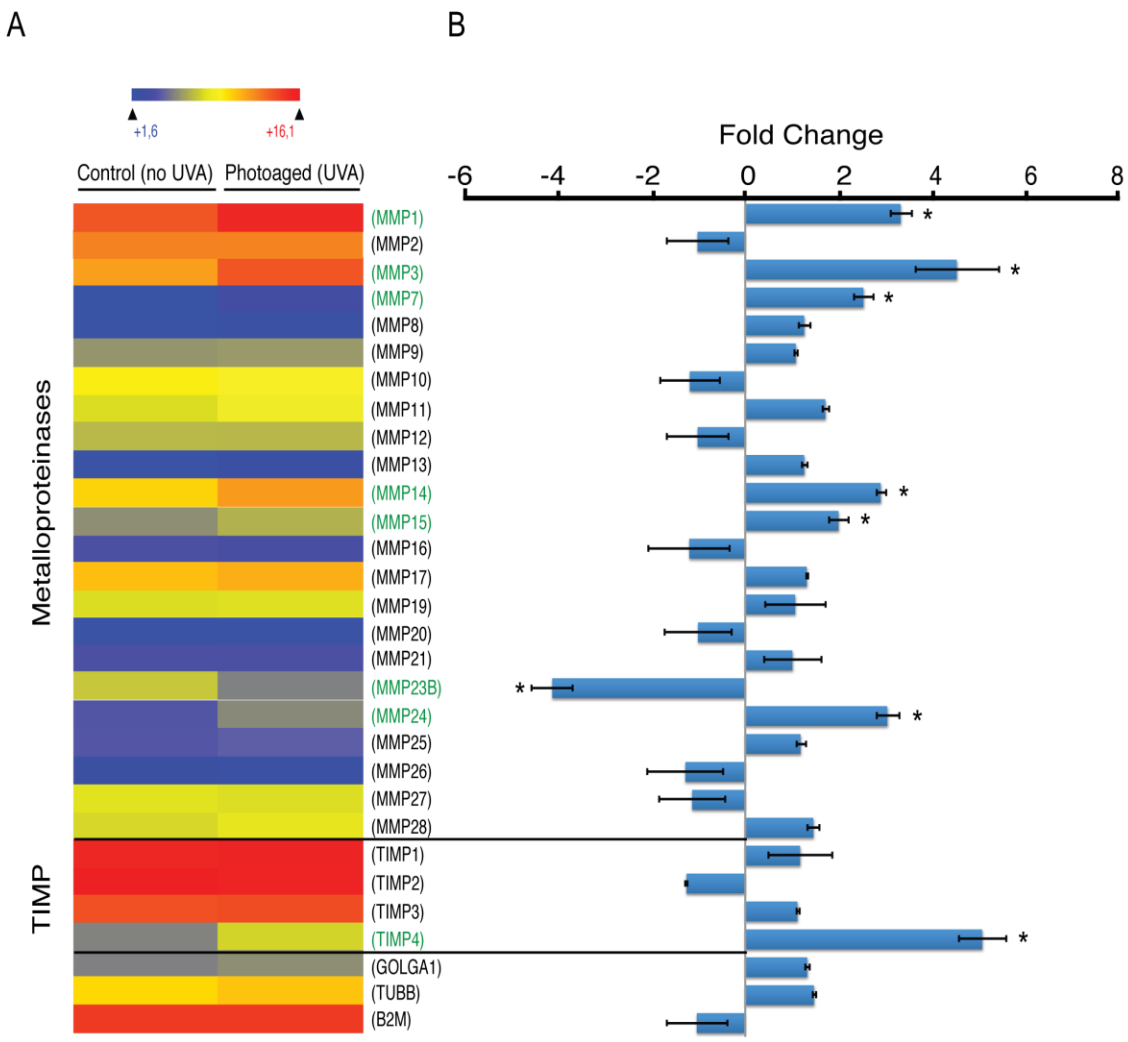


Figure 4.5 UVA-induced proteoglycans and other extracellular matrix (ECM) changes in human diploid corneal keratocytes. (A) Heatmap depicting the relative expression of proteoglycans and other ECM-coding genes in photoaged and control diploid corneal stroma keratocytes. The top eight genes (above the top horizontal line) code for proteoglycans, the middle seven genes (between the 2 horizontal lines) code for other ECM and the bottom three genes are housekeeping genes used as controls. The significantly deregulated targets (>2-fold positively or negatively) between the two conditions are identified by an asterisk (*). (B) Graphical representation of proteoglycan and other ECM-coding gene expression differences between photoaged and control keratocytes. Three major proteoglycan-coding genes are significantly downregulated (more than 2x) by chronic UVA irradiation (i.e., lumican, keratocan and mimecan). Among the proteoglycan-coding genes, mimecan is the most deregulated in photoaged cells, with a >14-fold decrease. Among the other ECM-coding genes, three are significantly downregulated by the UVA irradiation, that is, fibronectin I, thrombospondin 2 and 4. None of the proteoglycans and other ECM genes were upregulated by UVA irradiation. (C) Linear expression level of proteoglycan and other ECM-coding genes in unirradiated control keratocytes. Decorin showed the highest expression level. Among the UVA-induced dysregulated genes, lumican showed the highest expression level. (D) Graphical representation of the mass spectrometry analysis depicting proteoglycan and other ECM protein levels in photoaged keratocytes (UVA), unirradiated controls (NoUV), and in keratocytes from 6-day-old (Young) and 87-year-old (Old) patients. The result shows a clear downregulation of all detected proteoglycans (lumican, decorin, biglycan, podocan and fibromodulin) by both UVA-irradiation and age. Among other ECM proteins, fibronectin, a temporary ECM component used in corneal wound healing

to promote corneal epithelial cell adhesion and migration (Murakami et al., 1992; Kang et al., 1999; Tanaka et al., 1999), is downregulated by both UVA-irradiation and age. The presence of fibronectin is an indication that our tissue-engineered stromas are not completely mature (Lake et al., 2013).


A
B
+1,6
+16,1
Control (no UVA)
Photoaged (UVA)
Metalloproteinases
TIMP
(MMP1)
(MMP2)
(MMP3)
(MMP7)
(MMP8)
(MMP9)
(MMP10)
(MMP11)
(MMP12)
(MMP13)
(MMP14)
(MMP15)
(MMP16)
(MMP17)
(MMP19)
(MMP20)
(MMP21)
(MMP23B)
(MMP24)
(MMP25)
(MMP26)
(MMP27)
(MMP28)
(TIMP1)
(TIMP2)
(TIMP3)
(TIMP4)
(GOLGA1)
(TUBB)
(B2M)
Fold Change
-6
-4
-2
0
2
4
6
8

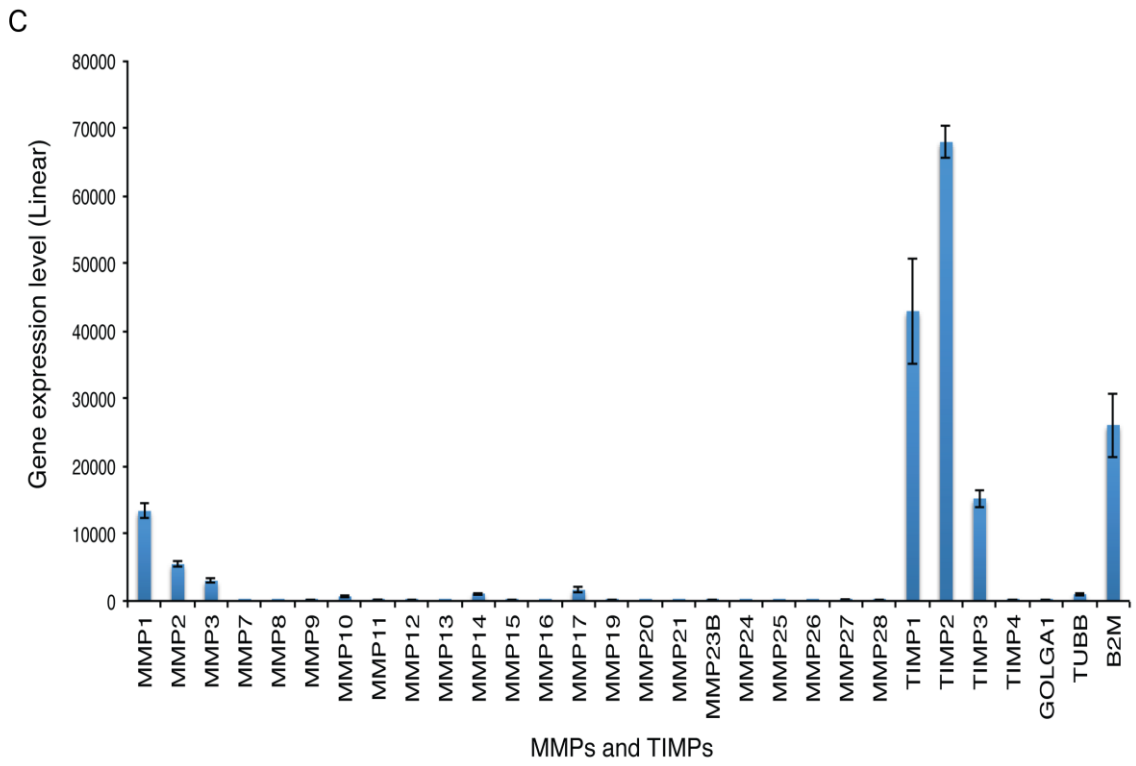


Figure 4.6 UVA-induced metalloproteinase (MMP) and TIMP changes in human diploid corneal keratocytes. (A) Heatmap depicting the relative expression of MMP- and TIMP-coding genes in photoaged and control diploid corneal stroma keratocytes. The significantly deregulated targets (>2-fold positively or negatively) between the two conditions are identified by an asterisk (*). (B) Graphical representation of MMP- and TIMP-coding gene expression differences between photoaged and control keratocytes. A general upregulation of MMP-coding genes caused by UVA irradiation was observed. More precisely, 6 MMP-coding genes (MMP1, 3, 7, 14, 15 and 24) were significantly upregulated by UVA irradiation and only one (MMP23B) was downregulated. On the other hand, only TIMP4 is upregulated and no TIMP family member is downregulated by the UVA irradiation. (C) Linear expression level of MMP- and TIMP-coding genes in unirradiated control keratocytes. MMP1, 2 and 3 are the most highly expressed MMPs, but their expression levels are far from those of TIMP-coding genes (TIMP1, 2 and 3). The expression level of TIMP4, the only one found deregulated by UVA irradiation, is marginal compared to the other TIMPs.

Chapitre 5: Restoration of mitochondrial integrity, telomere length and sensitivity to oxidation by *in vitro* culture of late stage Fuch's Endothelial Corneal Dystrophy cells

(Soumis à *The American Journal of Pathology*)

5.1 Résumé en français

La dystrophie cornéenne endothéliale de Fuchs (FECD) est une maladie dégénérative de l'endothélium cornéen menant à une perte de la vision et est une cause importante de greffe de cornée. L'étiologie de la maladie est encore mal inconnue, mais l'implication du stress oxydant est fortement suggérée. Dans cette étude nous avons analysé l'impact de la FECD sur l'intégrité de l'ADN mitochondrial (ADNmt) et sur la longueur télomérique qui sont affectées par l'état d'oxydation cellulaire. Nous avons comparé des cultures cellulaires endothéliales *in vitro* de patient FECD et des explants d'endothélium cornéen *ex vivo* de patients FECD pour l'intégrité et la longueur télomérique. En utilisant une technique de PCR quantitative nous avons déterminé les niveaux totaux d'ADNmt, de délétion commune de l'ADNmt (4977pb) et la longueur télomérique relative entre des cellules FECD et saines en explants et en condition de culture. L'expression des gènes oxydant-antioxydant des cellules en culture a été analysée par microarray ainsi que leur sensibilité à la mort cellulaire par UVA ou H_2O_2. Nos résultats montrent une augmentation des niveaux d'ADNmt et un raccourssicement télomérique dans les explants FECD. Nous observons également que la culture de cellules FECD restaure leur phénotype normal puisque nous avons observé des niveaux comparables d'ADNmt, de longueur télomérique, de balance de l'expression des gènes oxydant-antioxydant et de la sensibilité à la mort cellulaire induite par stress oxydant lorsque des cellules FECD en culture sont comparées avec des cellules endothéliales saines. Ainsi, nos résultats amènent des nouvelles évidences de l'implication du stress oxydant dans la pathologie et démontrent que la culture de cellules FECD peut réhabiliter leurs phénotypes moléculaires reliés à l'oxydation. Nous montrons que cette réhabilitation est obtenue par la sélection de cellules FECD «saine» par la condition de culture, démontrant ainsi que la FECD n'affecte pas de façon homogène l'intégrité des toutes les cellules cornéennes endothéliales.

Rapport-Gratuit.com

5.2 Article

Restoration of mitochondrial integrity, telomere length and sensitivity to oxidation by *in vitro* culture of late stage Fuch's Endothelial Corneal Dystrophy cells

Sébastien P. Gendron[1,2], Mathieu Thériault[1,2], Stéphanie Proulx[1,2,3], Isabelle Brunette[4, 5] and Patrick J. Rochette[1,2, 3,]†

1. Axe Médecine Régénératrice, Centre de Recherche du CHU de Québec – Université Laval, Hôpital du Saint-Sacrement, Québec, QC, Canada
2. Centre de Recherche en Organogénèse Expérimentale de l'Université Laval/LOEX, Université Laval, Québec, QC, Canada
3. Département d'Ophtalmologie et ORL - Chirurgie cervico-faciale, Université Laval, Québec, QC, Canada
4. Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Center, Montreal, QC, Canada
5. Department of Ophthalmology, University of Montreal, Montreal, QC, Canada

† To whom correspondence should be addressed. Tel: (418) 682-7568; Fax: (418) 682-8000; E-mail: Patrick.rochette@orlo.ulaval.ca

5.2.1 Résumé (anglais)

Fuch's endothelial corneal dystrophy (FECD) is a degenerative disease of the corneal endothelium, which leads to vision loss and is a leading cause of corneal transplantation. The etiology of the pathology is still unknown, but the implication of oxidative stress is strongly suggested. In this study, we analyzed the impact of FECD on mitochondrial DNA (mtDNA) integrity and telomere length, both being affected by the oxidative status of the cells. We compared cell culture of FECD-affected corneal endothelial cells and corneal endothelium explants from FECD patients for the mtDNA integrity and telomere length. We employed a highly sensitive quantitative PCR technique to determine levels of total mtDNA, mtDNA common deletion (4977bp) and relative telomere length between FECD and healthy cells in explants and in culture conditions. Oxidant-antioxidant gene expression of cells in culture was assayed by microarray and sensitivity to UVA- and H_2O_2-induced cell death of cultured cells was observed. Our results show mtDNA increased level and telomere shortening in FECD corneal endothelium explants. We also found that culturing FECD cells restore their normal phenotype as we observe comparable levels of mtDNA, telomere length, oxidant-antioxidant gene expression balance and sensitivity to oxidative stress-induced cell death in FECD cultured cells when compared with healthy corneal endothelium cells. Taken together, our results grant new evidence of the implication of oxidative stress in the disease and demonstrate that culturing FECD cells can rehabilitate molecular phenotypes related to this oxidation. We also show that this rehabilitation is achieved by selecting the more functional FECD cells by culture condition, demonstrating that FECD does not evenly affect the integrity of all corneal endothelium cells.

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

5.2.2 Introduction

The posterior layer of the human cornea, the corneal endothelium, is crucial for corneal transparency and vision via its role in maintaining proper corneal deturgescence. Fuchs endothelial corneal dystrophy (FECD) is a degenerative disease of the corneal endothelium. The prevalence of FECD in the United States is estimated at 897 individuals per million and the symptoms usually appear after the age of 60 year (Musch DC et al., 2011). FECD is typically characterized by an abnormal deposition of extracellular matrix on the posterior aspect of Descemet membrane, generating excrescences called guttae. The progressive enlargement of the guttae is associated with a progressive and irreversible loss of endothelial cells. This leads to corneal edema, which, if left untreated, results in painful bullous keratopathy, scarring and blindness (Hamill CE et al., 2013; Schmedt T et al., 2012). The only treatment currently available to restore sight is corneal endothelial transplantation (Hamill CE et al., 2013). FECD is the leading indication for corneal endothelial transplantation and was responsible for 53.4% of the 28 064 endothelial keratoplasties performed in the United States in 2014. The etiology of the disease is believed to involve hereditary, hormonal and environmental factors (reviewed in Zhang J et al., 2015).

Corneal endothelium is exposed to endogenous and exogenous oxidative stress. The deturgescence activity of the corneal endothelium results in a high aerobic metabolism of the endothelial cells. To compensate for the leakage of fluid from the aqueous humor to the corneal stroma, endothelial Na^+/K^+-ATPases and Na^+/HCO_3^- co-transporters actively transport ions, generating an osmotic gradient and thus a water flux out of the cell, to the anterior chamber (Greiner MA et al., 2015). This high aerobic metabolism leads to endogenous oxidation and the generation of ROS. Moreover, the cornea is constantly exposed to sunlight UV radiation and it has been shown that the UVA portion reaches the corneal endothelium (Mallet JD and Rochette PJ, 2011; 2013). UVA light is well described as an exogenous oxidizer that generate ROS (reviewed in Cadet J et al., 2015). The high aerobic metabolism, the fact that the corneal endothelial cells *in vivo* are arrested in the G1 phase of the cycle (i.e. non-mitotic cells), and the context of lifetime exposure to toxic sunlight, all together make the corneal endothelium prone to oxidative stress (Liu C et al., 2014).

Generation of ROS by both endogenous and exogenous sources can oxidize DNA and induce the mutagenic 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-oxoG). Accumulation of 8-oxoG has recently been described in FECD endothelial cells, mostly at the level of the mitochondrial DNA (mtDNA) (Schmedt T et al., 2012; Jurkunas UV et al., 2010). mtDNA is highly susceptible to oxidative damage because of its direct exposure to the ROS-generating respiratory chain and its lack of histones protection (Jurkunas UV et al., 2010; Johns DR, 1995). Damage to the mtDNA can cause loss of integrity of the inner mitochondrial membrane potential, apoptosis and accumulation mtDNA deletions, leading to dysfunctional synthesis of mitochondrial proteins (Elhalis H et

al., 2010; Gendron SP et al., 2012; Gendron SP et al., 2013). Telomeric DNA is also sensitive to oxidative damage, which induces telomeric shortening, acceleration of cellular senescence and impaired cell function (Pawlas N et al., 2015; Tchirkov A et al., 2003; von Zglinicki T, 2002).

Several observations indicate that FECD cells are poorly protected against oxidative stress: (**1**) The DJ-1 protein, which is known to protect against oxidative damage, is downregulated in FECD. This results in an impaired Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2) nuclear translocation, which aggravates cell susceptibility to apoptosis (Bitar MS et al., 2012). NRF2 is a transcription factor that regulates the expression of antioxidant proteins. The impaired translocation of Nrf2 sensitizes the corneal endothelial cell to UVA light by decreasing the expression of antioxidant gene, increasing oxidative damage, and activating p53-dependant apoptosis (Liu C et al., 2014; Azizi B et al., 2011). (**2**) Transcriptome analyses have shown that mitochondrial antioxidant genes, such as SOD2 (mitochondrial superoxide dismutase 2) and Prx3, are downregulated in FECD (Gottsch JD et al., 2003). (**3**) Oxidative stress implicating lipid peroxidation, advanced glycation end-products and other reactive oxygen species (ROS), was shown to be implicated in FECD (Buddi R et al., 2002; Wang Z et al., 2007). (**4**) Moreover, an imbalance in oxidant-antioxidant toward a pro-oxidant state has been documented in FECD on several occasions (Schmedt T et al., 2012; Jurkunas UV et al., 2010; Jurkunas UV et al., 2008).

Our group recently showed that FECD endothelial cells could be successfully cultured without transduction. We also demonstrated that the diseased endothelial cells of clinically decompensated FECD corneas, when cultured and seeded on a devitalized stromal carrier and transplanted in the living animal eye, can recover active pump function and restore corneal transparency for 7 days after transplantation (Haydari MN et al., 2012). The partial recovery in culture of these end-stage FECD endothelial cells harvested from the central and most diseased part of the cornea has opened the door on a new perspective, which is herein analysed on an “oxidation standpoint”.

The goal of this study was to investigate the effect of cell culture on the oxidative imbalance documented in FECD corneal endothelial cells. More specifically, using specimens from FECD subjects and specimens from normal subjects as controls, we compared the corneal endothelial cells of fresh corneal endothelial explants with cultured endothelial cells, looking for differences in mitochondrial levels, mtDNA integrity, telomere shortening, oxidant-antioxidant gene expression and sensitivity to oxidative stress-induced cell death. Increased mtDNA levels and telomere shortening were observed in fresh FECD explants, but not in cultured FECD cells. Mitochondrial integrity, sensitivity to oxidative stress-induced cell death as well as oxidant-antioxidant gene expression were found virtually identical between cultured FECD and healthy endothelial cells. Additionally, the restoration of normal telomere length was not associated with reactivation of telomerase

activity, suggesting that the normal phenotypes found in cultured FECD cells would result from the selection of the less affected FECD cells.

5.2.3 Matériel et Méthodes

All experiments performed in this study were conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and the research protocol received approval by the Maisonneuve-Rosemont Hospital and the CHU de Québec – Université Laval institutional ethics committees. Corneal endothelium and Descemet's membrane specimens were collected from consenting patients with late-stage FECD at the time of their corneal transplantation, as described previously (Zaniolo K et al., 2012). Healthy human corneas, unsuitable for transplantation, were obtained from our local eye bank (Banque d'Yeux du Centre universitaire d'ophtalmologie).

Cell Culture

(1) Healthy corneal endothelium cells: Healthy corneas were obtained within 48 hours of death. They were kept in Optisol-GS corneal storage medium (Bausch & Lomb, Rochester, NY) at 4°C until isolation of corneal endothelial cells (Zhu C et al., 2004). Descemet's membrane was peeled from the corneas and incubated in growth medium overnight at 37°C and 8% CO_2. Treatment with ethylene-diamine-tetra-acetic acid 0.02% (Sigma Life Science, St. Louis, MO) during 20-45 minutes and gentle up and down agitation of the pipet were used to detach the cells from the Descemet's membrane. Loose cells were then seeded in culture dishes covered with FNC coating mix (Athena Enzyme Systems, Baltimore, MD) in OptiMem-I (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) culture medium supplemented with 8 % fetal bovine serum (HyClone, Logan, UT), 5 ng/mL human epidermal growth factor (Austral Biologicals, San Ramon, CA), 20 ng/mL nerve growth factor (Biomedical Technologies, Stoughton, MA), 100 μg/mL bovine pituitary extract (Biomedical Technologies), 20 μg/mL ascorbic acid (Sigma), 0.08 % chondroitin sulfate (Sigma), 25 μg/mL gentamicin sulfate (Schering Pointe Claire, QC, Canada) and 100 IU/mL penicillin G (Sigma) (Proulx S et al., 2007). Cells were cultured up to passage 3. For gene profiling analyses, cells were grown and cultured for 24 days post-confluence, with the addition of hydrocortisone (0.4 μg/ml) (Calbiochem, Etobicoke, ON, Canada) during the last 7 days of culture. (2) FECD corneal endothelial cells: Endothelial cells from the surgical specimens were isolated and cultured following the same protocols as for healthy cells. (3) Corneal stromal fibroblasts and HT1080: Corneal stromal fibroblasts from a 68 years old donor and fibrosarcoma cells (HT1080) were cultured to full confluence in DMEM medium (Wisent, St-Bruno, Quebec, Canada) with 10% FBS (Wisent, St-Bruno, Quebec, Canada) and 1% penicillin/streptomycin (Wisent, St-Bruno, Quebec, Canada) at 37 °C, 5% CO_2. Healthy and FECD corneal endothelial cells were cultured up to passage 3. The list of healthy and FECD donors used for the experiments described in this article can be found in supplementary material (Table S1).

DNA Isolation

For the mtDNA^{CD4977}, the mtDNA level and telomere length analyses, total DNA (mitochondrial and nuclear) from healthy and FECD corneal endothelial cells was purified using the DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, Toronto, ON, Canada) according to the manufacturer's protocol with an RNase A treatment.

mtDNA^{CD4977} Level and mtDNA Level Analysis by PCR

mtDNA^{CD4977} and total mtDNA levels were measured using a Rotor-Gene Q real-time thermocycler (Qiagen, Toronto, ON, Canada). PCR amplifications were performed with previously published primers designed to amplify mtDNA^{CD4977}, total mtDNA and genomic DNA 18S (Gendron SP et al., 2012; Karabekian Z et al., 2009). The amplification was achieved using primer set shown in Table 1.

The mtDNA^{CD4977} primer set spans both sides of the common deletion. These primers, along with our PCR conditions and a short primer extension time, only allow for DNA amplification of the deleted mtDNA molecules. These primers are located in cytochrome c oxidase II coding region, just outside the deleted region. The amplification was done with 10 ng of total DNA. Total mtDNA molecules were amplified with primers located in a region of the mitochondrial genome without reported deletion. They are located in the 7S DNA coding region. A standard curve (5, 1, 0.1, 0.01 and 0.001 ng total DNA/reaction) was performed with the total mtDNA primers. For each sample, the amplification level of mtDNA^{CD4977} primers was compared with the standard curve and a ratio of "mtDNA molecules containing the 4977-bp deletion" to "total mtDNA molecules" (mtDNA^{CD4977}/mtDNA) was derived. Samples with a Ct over 35 amplification cycles in our conditions were considered negative for the presence of mtDNA^{CD4977}. PCR reactions were performed in 20 µL reaction volumes containing 1x Brilliant III Ultra Fast SYBR Green Master Mix (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) and 500 nM of each primer. PCR conditions were as follows: 3 min at 95°C followed by 40 cycles of 20 s at 95°C and 20 s at 60°C.

The mtDNA levels were measured with the previously described primer set and a primer set for nuclear genome is located in the 18S ribosomal subunit DNA coding region shown in Table 1 (Karabekian Z et al., 2009). The amplification using the mtDNA primers was done with 0.25 ng of total DNA. A standard curve (5, 1, 0.5, 0.05 and 0.005 ng total DNA/reaction) was performed with the 18S primers. For each sample, the amplification level of mtDNA primers was compared with the 18S DNA coding region standard curve and a ratio of "mtDNA molecules" to "18S coding region" (mtDNA/18S DNA) was derived. PCR conditions were the same as previously described for the mtDNA^{CD4977} primer set.

Mitochondrial Staining

Corneal endothelial cells (healthy and FECD) were cultured 24 days post-confluence prior to mitochondrial staining. Central Descemet's membranes and attached endothelium explants were kept in Optisol-GS. Mitochondrial staining was performed using the Mitotracker Red CMXRos dye (Life technologies, Burlington, ON, Canada) with minor modifications to the manufacturer's protocol. Briefly, samples were washed twice with pre-warmed (37°C) OptiMem-I to remove serum oxidases from the culture medium. Cells were incubated with a pre-warmed (37°C) staining solution containing 250 nM (for cultured cells) or 40 nM (for explants) mitotracker dye diluted in OptiMem-I. Cells were incubated 40 minutes in the dark at 37°C with 8% CO_2. Samples were then washed 2 times with warm OptiMem-I (37°C), fixed in OptiMem-I containing 3,7% formaldehyde (Laboratoire Mat, Montreal, Canada) in dark at 37°C with 8% CO_2 for 15 minutes and washed 2 times with OptiMem-I. Samples were put on a microscope slide, mounted with SlowFade® Gold Antifade (Life technologies, Burlington, ON, Canada), observed on a Zeiss Imager Z2 microscope and imaged (AxioVision 4.8.2 software).

Relative Telomeres Length Analysis

Relative telomere length was assayed using a Rotor-Gene Q real-time thermocycler (Qiagen, Toronto, ON, Canada) with previously described primers (Aviv A, et al., 2011; O'Callaghan NJ and Fenech M, 2011; Rochette PJ and Brash DE, 2010). Amplification was achieved using primer set and standards shown in Table 1. The telomere primer set allows amplification of telomeres of variable fragments over a size range since they can anneal at various distances apart on the telomeric repeats. The amplification was done with 0.5 ng of total DNA. A telomere standard oligomer of 14 repeats of the sequence TTAGGG was used for the standard curve. A standard curve (60, 6, 0.6, 0.06, 0.006 and 0.0006 pg total telomere standard/reaction) was performed with this oligomer with the addition of 2 pg of plasmid DNA without telomeric repeat (PCruzGFP™L, Santa Cruz, Dallas, Texas) per reaction to allow efficient PCR reaction. For each sample, the amplification level of telomere primers was compared with the telomere standard curve and a "*T*" ratio of "telomere repeats" to "telomere standard" (telomere repeats/ telomere standard) was derived.

The HBG primer set allows amplification of hemoglobin gene, which is present in 2 copies in the human genome. The amplification using these primers was done with 0.5 ng of total DNA. A HBG standard oligomer corresponding to the coding DNA sequence of the gene was used for the standard curve. A standard curve (20, 2, 0.2, 0.02, 0.002 and 0.0002 pg total HBG standard/reaction) was performed with this oligomer. For each sample, the amplification level of HBG primers was compared with the HBG standard curve and a "*S*" ratio of "HBG copy" to "HBG standard" (HBG copy/ HBG standard) was derived. A final ratio of "*T/S*" was derived to compare relative telomere length per cells. In all cases, PCR reactions were performed in 20 µL

reaction volumes containing 1x Brilliant III Ultra Fast SYBR Green Master Mix (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) and 500 nM of each primer. PCR conditions were as follows: 3 min at 95°C followed by 40 cycles of 20 s at 95°C and 60 s at 56°C.

Telomerase Repeat Amplification Protocol (TRAP) Assay

Corneal endothelial cells from healthy and FECD donors, HT1080 fibrosarcoma telomerase positive cell line and a 68 years-old telomerase negative corneal keratocyte cell strain were cultured to full confluence. Total protein extracts were prepared and telomerase catalytic activity was determined using by TRAP assay using the TRAPeze® Telomerase Detection kit (Chemicon International, Temecula, CA) according to the manufacturer's protocol. The TRAP assay was performed using 0.6 µg of the protein extract (equivalent of 1500 cells). The reaction mix was incubated at 94°C for 30 seconds, 59°C for 30 seconds, and 72°C for 1 minute for 30 cycles on a thermocycler. The amplified products were resolved on a 12.5% polyacrylamide non-denaturing gel. The gel was then stained for 30 minutes with Redsafe™ Nucleic Acid staining Solution (iNtRON Biotechnology Inc., Toronto, ON, Canada).

Gene Profiling Analysis

Gene profiling was performed as previously described (Gendron SP et al., 2015). Cell from healthy donors and FECD patients were cultured for 24 days post-confluence, with the addition of hydrocortisone (0.4 µg/ml) (Calbiochem, Etobicoke, ON, Canada) during the last 7 days. RNA was isolated from the samples using TRizol reagent according to the manufacturer's protocol (Ambion; Life Technologies; Grand Island, NY). Cyanine 3-CTP (Agilent protocol)-labeled cRNA targets were prepared from 200 ng of total RNA from the different samples using the Agilent One-color Microarray-Based Gene Expression Analysis kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Then, 600 ng cRNA was incubated on a G4851A SurePrint G3 Human Ge 8 X 60 K array slide (60 000 probes; Agilent Technologies). Slides were then hybridized for 18 hours, washed, and scanned on an Agilent SureScan Scanner. Heatmaps were then analyzed for selected genes using the Arraystar V4.1 software (DNAstar, Madison, WI).

UVA and H_2O_2 Exposure and Cell Viability Analysis

Corneal endothelial cells were cultured in 96-wells until full confluence. For UVA irradiation, cells were washed 2 times with PBS (Wisent, St-Bruno, QC, Canada) and covered with PBS for irradiation with a UVA lamp emitting UVA1 wavelengths (340–400 nm) with < 0.01% of UVA2 wavelengths (315–340 nm) (UVP 365 nm lamp with filter, Upland, CA). Cells were irradiated with 0, 100, 200, 300, 400, 500 or 600 kJ/m^2 of UVA and then incubated for 24 hours.

For H_2O_2 experiment, cells were incubated 24 hours in the presence of H_2O_2 in culture medium at 37°C and 8% CO_2. They were exposed to H_2O_2 concentrations of 0, 200, 400, 600, 800 or 1000 µM. After the incubation period, cell viability was assessed using LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity kit for mammalian cells (Life technologies, Burlington, ON, Canada) according to the manufacturer's protocol. Briefly, cells were washed twice with PBS and incubated in PBS supplemented with 4 mM calcein AM and 2 mM ethidium homodimer-1 for 35 minutes in the dark at room temperature. Cells were then washed twice again with PBS and observed using a Nikon Eclipse TE 2000-U microscope. Signal quantification was done with the AxioVision 4.8.2 software. For normalization, the average number of viable cells per field in the control sample (i.e. 0 kJ/m^2 or 0 µM H_2O_2) was set as the baseline for 100% viability. Subsequent conditions were reported as the ratio of "number of viable cells per field / number of viable cells per field in the control". At least 8 fields were analyzed for each H_2O_2 concentration and UVA dose.

Statistical Analysis

KaleidaGraph v4.1.3 software was used to generate statistical analysis. Wilcoxon test was used to compare the mtDNA, $mtDNA^{CD4977}$ and *T/S* Q-PCR ratio levels of the different samples. Wilcoxon is a non-parametric statistical hypothesis test for paired samples or repeated measurements on a single sample. Box plots and median values illustrate data (Gendron SP et al., 2013).

Statistical analyses for the microarray experiment were performed using the robust multiarray analysis for background correction of the raw data values. Microarray data shown in this study comply with the Minimum Information About a Microarray Experiment (MIAME) requirements (Brazma A et al., 2011).

Rapport-Gratuit.com

5.2.4 Résultats

Mitochondrial levels, mtDNA integrity, telomere shortening, oxidant-antioxidant gene expression and sensitivity to oxidative stress-induced cell death were investigated in healthy and FECD explants and cultured cells.

Differences in Mitochondrial Level and mtDNA^{CD4977} Between Healthy and FECD Explants and Cultured Corneal Endothelial Cells

In order to investigate mitochondrial dysfunction in FECD as well as the potential restoration of the mitochondrial functions and telomere lengths by culturing FECD endothelial cells, we first investigated the numbers of mitochondrial DNA copies and the levels of mtDNA^{CD4977}. We derived two ratios: (1) "total mtDNA molecules/ total ribosomal 18S subunit DNA sequences" (mtDNA/18S) (Figure 1A), to determine the level of mtDNA per cell; and (2) "mtDNA molecules containing the common deletion/ total mtDNA molecules" (mtDNA^{CD4977}/ total mtDNA), to determine the level of deleted mtDNA per mitochondrial genome (Figure 1C).

We first assessed mtDNA levels in corneal endothelial cell from tissue explants and cultured cells of healthy and FECD subjects using a mtDNA/18S ratio (Figure 1A). FECD explants showed 11 times more mtDNA per cell (11.63) than healthy explants (1.06). No significant difference was found between cultured endothelial cells from healthy (1.23) and FECD (2.57) subjects. This was qualitatively confirmed by staining mitochondria healthy and FECD explants and cultured cells using Mitotraker (Figure 1B). The mitochondrial signal was stronger in FECD explants than it was for FECD cells in culture. It was also stronger in FECD explants than in healthy explants, confirming results of Figure 1A. Noteworthy, in FECD explants, the mitochondrial signal was not equally distributed, some cells (≈20-30%) clearly showing a stronger signal.

We then evaluated if the mtDNA^{CD4977} accumulate in cultured FECD cells (Figure 1C) and we found no significant difference in mtDNA^{CD4977}/total mtDNA ratio between healthy (0.07%) and FECD (0.13%) cultured cells ($P > 0.05$).

Telomeres are Shorter in FECD Patients but Cultured Corneal Endothelial Cells From Healthy and FECD Subjects Show an Increased Telomere Length Without Telomerase Gene Expression and Activity

Telomere length in healthy and FECD endothelial cells was investigated in explants and cell culture conditions (Figure 2A). Telomeres in cultured cells (Relative telomere length T/S: Healthy: 12.6 and FECD: 13.7) were longer than in the explants (T/S: Healthy: 4.4 and FECD: 0.9). Telomeres in FECD explants were significantly shorter than those from healthy explants.

The increase in telomere length found in cultured cells compared to explants could be explained either by telomerase activity or by the selection in culture of the cells with longer telomeres. To assess telomerase activity we first analyzed telomerase gene expression in cultured endothelial cells from healthy and FECD subjects (Figure 2B. Results show an absence of TERT gene expression in both healthy and FECD cultured cells. Telomerase activity was then verified using the TRAP assay (Figure 2C). The assay clearly demonstrated a total absence of telomerase activity in cultures endothelial cells from both healthy and FECD subjects. HT1080, a fibrosarcoma cell line known to express telomerase, was used as positive control and normal human stromal cornea diploid keratocytes, known not to express telomerase, were used as negative controls.[34]

Cultured Corneal Endothelial Cell From Healthy and FECD Subjects Are Equally Sensitive to UVA- and H_2O_2-induced Cell Death

Evidences have shown that corneal endothelial cells from FECD patients are more sensitive to oxidation than normal cells (Jurkunas UV et al., 2010). In order to verify if cultured FECD endothelial cells are more sensitive to oxidation than healthy cells, the sensitivity to UVA- or H_2O_2-induced cell death was studied. No significant difference in cell death sensitivity was observed between FECD and healthy cells, with one exception: cultured FECD cells were more resistant to H_2O_2-induced cells death than healthy cells at a concentration of 1000 μM (*$*P<0.05$*) (Figure 3A).

Expression of Genes Implicated in Oxidative Stress Response is Similar in Cultured Corneal Endothelial Cells from Healthy and FECD Subjects

It has been previously shown that genes implicated in antioxidant protection, ROS metabolism, apoptosis and signaling in response to oxidative stress are deregulated in corneal endothelial cells of FECD patients explants (Table 2). Our gene expression analysis in cultured endothelial cells from healthy and FECD subjects showed no deregulation in the expression of these genes (Table 2). The only exception was the transcript level of peroxiredoxin 5 that was found to be significantly up-regulated in cultured FECD cells compared to healthy cells. As shown in Table 2, we did not found in cultured cells a gene deregulation similar to that reported in explants of FECD corneal endothelium (Jurkunas UV et al., 2010).

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

5.2.5 Discussion

Increased mtDNA amount and mtDNA^{CD4977} in Healthy and FECD Corneal Endothelium Explants and Cultured Cells

Increase in mitochondria has been associated with multiple diseases, including breast cancer, Hepatitis C virus infection or chronic obstructive pulmonary disease (Hsu CW et al., 2010; Lee HC et al., 2000; Liu SF et al., 2015; Zhang AM et al., 2015). The increase was described as a compensatory mechanism against defects in mitochondria harboring mutated mtDNA and/or a defective respiratory system. It is an early cellular response to oxidative stress (Lee HC et al., 2000; Lee HC and Wei YH; 2000). Abnormal accumulation of mitochondria was documented in a mouse model of FECD (Col8a2 knock-in) (Meng H et al., 2013). While mtDNA amount usually correlates with the mitochondrial levels, we measured the amount of mitochondria and mtDNA in FECD and normal endothelial cell. We observed a high mitochondria and mtDNA content in FECD explants (Figure 1). Although the amount of corneal endothelial cells is reduced in FECD pathology, the need for corneal stroma deturgescence remains comparable to healthy patients. We hypothesize that each cell increases its mitochondrial amount to fulfill the increased ATP need for Na/K ATPases ion pump. This, in turns, leads to an increase in ROS production by the mitochondrial respiratory chain. ROS are known to catalyze the apparition of mtDNA deletion, such as the mtDNA^{CD4977} (Berneburg M et al., 1999; Krishnan KJ et al., 2004). In accordance with this hypothesis, Czarni *et al.* recently documented an increase in mtDNA copy number and mtDNA^{CD4977} in the corneal endothelium of FECD patients compared to healthy subjects (Czarny P et al., 2014). Our results showing an increase in mitochondria and mtDNA copies in FECD corneal endothelial cells from explants further support this hypothesis (Figure 1). Since mtDNA accumulates with age, (Lee HC et al., 2000; Lee HC and Wei YH; 2000) FECD and healthy groups were matched regarding median age in this study (Figure 1). We then showed herein that culturing FECD cells restores a normal phenotype in terms of mitochondria and mtDNA content. This was confirmed as we found that mitochondria and mtDNA content in FECD cultured cells returned to a level similar to that of healthy cells (Figure 1). Noteworthy, in the FECD explants, mitochondria were unevenly distributed, *i.e.* 20 to 30% showing much stronger signal. It is reasonable to think that these high mitochondrial-containing cells are highly active and produce more ROS, which in turns would further exacerbate oxidative damage and lead to an increase in mtDNA deletions (Schmedt T et al., 2012; Liu C et al., 2014; Jurkunas UV, et al., 2010; Jurkunas UV et al., 2008; Czarny P et al., 2014). Indeed, increased levels of mitochondrial ROS have been reported in FECD cells (Elhalis H et al., 2010). Beyond a certain threshold, increased ROS levels induce mitochondrial cytochrome c release, which lead to apoptosis (Lee HC and Wei YH, 2000). This may explain in part endothelial cell attrition in FECD.

Another research group has recently evaluated the level of mtDNA^{CD4977} in FECD corneal endothelium explants (Czarny P et al., 2014). They found an increase of mtDNA^{CD4977} occurrence in FECD when compared to healthy subjects. We have investigated mtDNA^{CD4977} levels in cultured cells (Figure 1) and we found no difference between cultured FECD and healthy cells, supporting the hypothesis of either rehabilitation by culture or selection of cells containing less deletion. Noteworthy, the percentage of mtDNA^{CD4977} in FECD and healthy cultured endothelial cells (0.13% and 0.07%, respectively) is similar to that of a normal endothelium explant (0.13%) (Gendron SP et al., 2012).

Relative telomere length, telomerase gene expression and telomerase activity in isolated corneal endothelial cells from FECD

DNA telomeric repeats are stabilizing chromosomes and help preserve genome integrity. Telomeric DNA, however, is highly sensitive to oxidative damage, which causes telomeric shortening and accelerates cellular senescence and cell death (Pawlas N et al., 2015; Li H et al., 2015). Because of the significant role of oxidative stress in FECD, we investigated telomere length in corneal endothelial cells from FECD and healthy subjects. Telomeres were 4 times shorter in FECD endothelial explants than in healthy (Figure 2A). Upon a certain threshold of telomere erosion, the cell enters a senescence state or exhibit chromosomic aberrations (Capper R et al., 2007). On the other hand, our results showed 4 times longer telomeres in cultured healthy and FECD endothelial cells (Figure 2A) when compared to explants from healthy subjects. This could be explained either by the selection of cells with longer telomeres or by telomerase reactivation. We thus investigated telomerase activity and found no telomerase (hTERT) gene expression and no telomerase activity (Figure 2) in healthy and FECD cultured endothelial cells. This strongly suggests a selection of cells with longer telomere in culture. This is supported by the fact that even corneal endothelial cells from healthy subjects have longer relative telomere length in culture than in explants.

No difference in UVA- and H_2O_2-induced cell death sensitivity between cultured endothelial cells from healthy and FECD subjects

FECD cells are poorly protected against oxidative stress and they are exposed to both endogenous (mitochondrial respiratory chain) and exogenous oxidation (UVA), which makes them prone to cell death (Liu C et al., 2014; Jurkunas UV et al., 2010). Moreover, UVA radiations have been suggested to exacerbate the oxidative process involved in the pathology (Eghrari AO and Gottsch JD, 2010; Wojcik KA et al., 2013). We evaluated FECD cells sensitivity to UVA light-induced cell death and found that FECD cultured cells are equally sensitive to UVA-induced cell death when compared to healthy cells (Figure 3A). UVA wavelengths, representing 75% of the terrestrial UV radiations, were used in this experiment since they reach the corneal endothelium and are the most efficient to induce ROS (Cadet J et al., 2015; Tewari A et al., 2014; Mallet JD

and Rochette PJ, 2011; 2013). H_2O_2, an oxidizing component induced by the mitochondrial respiratory chain, was also used to induce cell death in cultured FECD cells (Figure 3B). FECD cells seams slightly less sensitive than healthy cells, but this was non-significant for all the concentration used but the highest concentration (1000 μM). Both methods (UVA and H_2O_2 induced cell death) showed that cultured FECD and healthy cells behave similarly in the presence of an oxidative stress.

The similarity between cultured FECD and healthy cells is further confirmed by gene profiling results shown in Table 2. Major genes implicated in antioxidants protection, ROS metabolism, apoptosis and signaling in response to oxidative stress are not deregulated (<2 fold positively or negatively) in cultured FECD cells with the only exception of peroxiredoxin 5 upregulation. Peroxiredoxin 5 is a cytoprotective antioxidant enzyme working against endogenous or exogenous peroxide widely expressed in tissues (Knoops B et al., 2011). It may be interesting to investigate its function in relation to FECD oxidative stress but this is beyond the purpose of this study. Nonetheless, the results depicted show that there is a rehabilitation of the oxidant-antioxidant balance in FECD cultured cells.

In this study, we showed that the late stage FECD corneal endothelium contains cells that are comparable to healthy endothelial cells in terms of mitochondrial amount and integrity, sensitivity to oxidation and telomere length. Moreover, our results clearly indicate that those functional cells can be selected by cell culture. This is in agreement with previous work showing that an endothelium tissue-engineered from FECD cultured cells retains some functionality (Haydari MN et al., 2012). Currently, the only treatment for FECD is transplantation of an allogeneic corneal endothelial using eye bank donor tissue. Non surgical rehabilitation of the diseased FECD endothelium using allogeneic cultured cells would constitute a great step in the treatment of this pathology.

5.2.6 Remerciements

The authors are grateful to the Banque d'Yeux du Centre Universitaire d'Ophtalmologie de Québec for providing the donor corneas and to the Banque Québécoise de Cellules Cornéennes (BQCC) for providing the FECD corneal endothelial cells. We are grateful to Drs Richard Bazin, Isabelle Brunette, Patrick-Ann Laughrea, Marie-Eve Légaré and Julia Talajic for providing FECD corneal endothelium explants. This work was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) to I.B., S.P. and P.J.R. P.J.R and S.P. are research scholars from the Fonds de Recherche du Québec - Santé (FRQ-S). S.P.G holds a Doctoral Research Award from the FRQ-S. IB is the holder of the Charles-Albert Poissant Research Chair in Corneal Transplantation, University of Montreal, Canada. The Quebec Eye Tissue Bank for Vision Research is partly supported by the FRQ-S Vision Health Research Network.

5.2.7 Références

1. Musch DC, Niziol LM, Stein JD, Kamyar RM, Sugar A: Prevalence of corneal dystrophies in the United States: estimates from claims data. Invest Ophthalmol Vis Sci 2011, 52:6959-63.
2. Hamill CE, Schmedt T, Jurkunas U: Fuchs endothelial cornea dystrophy: a review of the genetics behind disease development. Semin Ophthalmol 2013, 28:281-6.
3. Schmedt T, Silva MM, Ziaei A, Jurkunas U: Molecular bases of corneal endothelial dystrophies. Exp Eye Res 2012, 95:24-34.
4. Zhang J, Patel DV: The pathophysiology of Fuchs' endothelial dystrophy--a review of molecular and cellular insights. Exp Eye Res 2015, 130:97-105.
5. Greiner MA, Burckart KA, Wagoner MD, Schmidt GA, Reed CR, Liaboe CA, Flamme-Wiese MJ, Zimmerman MB, Mullins RF, Kardon RH, Goins KM, Aldrich BT: Regional assessment of energy-producing metabolic activity in the endothelium of donor corneas. Invest Ophthalmol Vis Sci 2015, 56:2803-10.
6. Mallet JD, Rochette PJ: Ultraviolet light-induced cyclobutane pyrimidine dimers in rabbit eyes. Photochem Photobiol 2011, 87:1363-8.
7. Mallet JD, Rochette PJ: Wavelength-dependent ultraviolet induction of cyclobutane pyrimidine dimers in the human cornea. Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology 2013, 12:1310-8.
8. Cadet J, Douki T, Ravanat JL: Oxidatively generated damage to cellular DNA by UVB and UVA radiation. Photochem Photobiol 2015, 91:140-55.
9. Liu C, Chen Y, Kochevar IE, Jurkunas UV: Decreased DJ-1 leads to impaired Nrf2-regulated antioxidant defense and increased UV-A-induced apoptosis in corneal endothelial cells. Invest Ophthalmol Vis Sci 2014, 55:5551-60.
10. Jurkunas UV, Bitar MS, Funaki T, Azizi B: Evidence of oxidative stress in the pathogenesis of fuchs endothelial corneal dystrophy. Am J Pathol 2010, 177:2278-89.
11. Johns DR: Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Mitochondrial DNA and disease. The New England journal of medicine 1995, 333:638-44.
12. Elhalis H, Azizi B, Jurkunas UV: Fuchs endothelial corneal dystrophy. Ocul Surf 2010, 8:173-84.
13. Gendron SP, Bastien N, Mallet JD, Rochette PJ: The 3895-bp mitochondrial DNA deletion in the human eye: a potential involvement in corneal ageing and macular degeneration. Mutagenesis 2013, 28:197-204.
14. Gendron SP, Mallet JD, Bastien N, Rochette PJ: Mitochondrial DNA common deletion in the human eye: a relation with corneal aging. Mechanisms of ageing and development 2012, 133:68-74.
15. Pawlas N, Plachetka A, Kozlowska A, Mikolajczyk A, Kasperczyk A, Dobrakowski M, Kasperczyk S: Telomere length, telomerase expression, and oxidative stress in lead smelters. Toxicol Ind Health 2015.
16. Tchirkov A, Lansdorp PM: Role of oxidative stress in telomere shortening in cultured fibroblasts from normal individuals and patients with ataxia-telangiectasia. Hum Mol Genet 2003, 12:227-32.
17. von Zglinicki T: Oxidative stress shortens telomeres. Trends Biochem Sci 2002, 27:339-44.
18. Bitar MS, Liu C, Ziaei A, Chen Y, Schmedt T, Jurkunas UV: Decline in DJ-1 and decreased nuclear translocation of Nrf2 in Fuchs endothelial corneal dystrophy. Invest Ophthalmol Vis Sci 2012, 53:5806-13.

19. Azizi B, Ziaei A, Fuchsluger T, Schmedt T, Chen Y, Jurkunas UV: p53-regulated increase in oxidative-stress--induced apoptosis in Fuchs endothelial corneal dystrophy: a native tissue model. Invest Ophthalmol Vis Sci 2011, 52:9291-7.
20. 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, 44:594-9.
21. Buddi R, Lin B, Atilano SR, Zorapapel NC, Kenney MC, Brown DJ: Evidence of oxidative stress in human corneal diseases. J Histochem Cytochem 2002, 50:341-51.
22. Wang Z, Handa JT, Green WR, Stark WJ, Weinberg RS, Jun AS: Advanced glycation end products and receptors in Fuchs' dystrophy corneas undergoing Descemet's stripping with endothelial keratoplasty. Ophthalmology 2007, 114:1453-60.
23. Jurkunas UV, Rawe I, Bitar MS, Zhu C, Harris DL, Colby K, Joyce NC: Decreased expression of peroxiredoxins in Fuchs' endothelial dystrophy. Invest Ophthalmol Vis Sci 2008, 49:2956-63.
24. Haydari MN, Perron MC, Laprise S, Roy O, Cameron JD, Proulx S, Brunette I: A short-term in vivo experimental model for Fuchs endothelial corneal dystrophy. Invest Ophthalmol Vis Sci 2012, 53:6343-54.
25. Zaniolo K, Bostan C, Rochette Drouin O, Deschambeault A, Perron MC, Brunette I, Proulx S: Culture of human corneal endothelial cells isolated from corneas with Fuchs endothelial corneal dystrophy. Exp Eye Res 2012, 94:22-31.
26. Zhu C, Joyce NC: Proliferative response of corneal endothelial cells from young and older donors. Invest Ophthalmol Vis Sci 2004, 45:1743-51.
27. Proulx S, Bourget JM, Gagnon N, Martel S, Deschambeault A, Carrier P, Giasson CJ, Auger FA, Brunette I, Germain L: Optimization of culture conditions for porcine corneal endothelial cells. Molecular vision 2007, 13:524-33.
28. Karabekian Z, Gillum ND, Wong EW, Sarvazyan N: Effects of N-cadherin overexpression on the adhesion properties of embryonic stem cells. Cell Adh Migr 2009, 3:305-10.
29. Aviv A, Hunt SC, Lin J, Cao X, Kimura M, Blackburn E: Impartial comparative analysis of measurement of leukocyte telomere length/DNA content by Southern blots and qPCR. Nucleic acids research 2011, 39:e134.
30. O'Callaghan NJ, Fenech M: A quantitative PCR method for measuring absolute telomere length. Biol Proced Online 2011, 13:3.
31. Rochette PJ, Brash DE: Human telomeres are hypersensitive to UV-induced DNA Damage and refractory to repair. PLoS genetics 2010, 6:e1000926.
32. Gendron SP, Rochette PJ: Modifications in stromal extracellular matrix of aged corneas can be induced by ultraviolet A irradiation. Aging cell 2015.
33. Brazma A, Hingamp P, Quackenbush J, Sherlock G, Spellman P, Stoeckert C, Aach J, Ansorge W, Ball CA, Causton HC, Gaasterland T, Glenisson P, Holstege FC, Kim IF, Markowitz V, Matese JC, Parkinson H, Robinson A, Sarkans U, Schulze-Kremer S, Stewart J, Taylor R, Vilo J, Vingron M: Minimum information about a microarray experiment (MIAME)-toward standards for microarray data. Nature genetics 2001, 29:365-71.
34. Hsu CC, Chen CH, Hsu TI, Hung JJ, Ko JL, Zhang B, Lee YC, Chen HK, Chang WC, Lin DY: The 58-kda microspherule protein (MSP58) represses human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene expression and cell proliferation by interacting with telomerase transcriptional element-interacting factor (TEIF). Biochim Biophys Acta 2014, 1843:565-79.

35. Hsu CW, Yin PH, Lee HC, Chi CW, Tseng LM: Mitochondrial DNA content as a potential marker to predict response to anthracycline in breast cancer patients. Breast J 2010, 16:264-70.
36. Lee HC, Yin PH, Lu CY, Chi CW, Wei YH: Increase of mitochondria and mitochondrial DNA in response to oxidative stress in human cells. Biochem J 2000, 348 Pt 2:425-32.
37. Liu SF, Kuo HC, Tseng CW, Huang HT, Chen YC, Tseng CC, Lin MC: Leukocyte Mitochondrial DNA Copy Number Is Associated with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. PloS one 2015, 10:e0138716.
38. Zhang AM, Ma K, Song Y, Feng Y, Duan H, Zhao P, Wang B, Xu G, Li Z, Xia X: Mitochondrial DNAs decreased and correlated with clinical features in HCV patients from Yunnan, China. Mitochondrial DNA 2015:1-4.
39. Lee HC, Wei YH: Mitochondrial role in life and death of the cell. J Biomed Sci 2000, 7:2-15.
40. Meng H, Matthaei M, Ramanan N, Grebe R, Chakravarti S, Speck CL, Kimos M, Vij N, Eberhart CG, Jun AS: L450W and Q455K Col8a2 knock-in mouse models of Fuchs endothelial corneal dystrophy show distinct phenotypes and evidence for altered autophagy. Invest Ophthalmol Vis Sci 2013, 54:1887-97.
41. Berneburg M, Grether-Beck S, Kurten V, Ruzicka T, Briviba K, Sies H, Krutmann J: Singlet oxygen mediates the UVA-induced generation of the photoaging-associated mitochondrial common deletion. The Journal of biological chemistry 1999, 274:15345-9.
42. Krishnan KJ, Harbottle A, Birch-Machin MA: The use of a 3895 bp mitochondrial DNA deletion as a marker for sunlight exposure in human skin. J Invest Dermatol 2004, 123:1020-4.
43. Czarny P, Seda A, Wielgorski M, Binczyk E, Markiewicz B, Kasprzak E, Jimenez-Garcia MP, Grabska-Liberek I, Pawlowska E, Blasiak J, Szaflik J, Szaflik JP: Mutagenesis of mitochondrial DNA in Fuchs endothelial corneal dystrophy. Mutation research 2014, 760:42-7.
44. Li H, Hedmer M, Wojdacz T, Hossain MB, Lindh CH, Tinnerberg H, Albin M, Broberg K: Oxidative stress, telomere shortening, and DNA methylation in relation to low-to-moderate occupational exposure to welding fumes. Environ Mol Mutagen 2015, 56:684-93.
45. Capper R, Britt-Compton B, Tankimanova M, Rowson J, Letsolo B, Man S, Haughton M, Baird DM: The nature of telomere fusion and a definition of the critical telomere length in human cells. Genes Dev 2007, 21:2495-508.
46. Eghrari AO, Gottsch JD: Fuchs' corneal dystrophy. Expert Rev Ophthalmol 2010, 5:147-59.
47. Wojcik KA, Kaminska A, Blasiak J, Szaflik J, Szaflik JP: Oxidative stress in the pathogenesis of keratoconus and Fuchs endothelial corneal dystrophy. Int J Mol Sci 2013, 14:19294-308.
48. Tewari A, Grys K, Kollet J, Sarkany R, Young AR: Upregulation of MMP12 and its activity by UVA1 in human skin: potential implications for photoaging. J Invest Dermatol 2014, 134:2598-609.
49. Knoops B, Goemaere J, Van der Eecken V, Declercq JP: Peroxiredoxin 5: structure, mechanism, and function of the mammalian atypical 2-Cys peroxiredoxin. Antioxid Redox Signal 2011, 15:817-29.

5.2.8 Table et Figures

	Primer	Amplicon Size (bp)	Ref
18 S ribosomal RNA coding region	F 5'-TAGAGGGACAAGTGGCGTTC	104	Karabekian et al. (2009)
	R 5'-CGCTGAGCCAGTCAGTGT		
mtDNA	F 5'-AATCAATTGGCGACCAATGG	101	Gendron et al. (2012)
	R 5'-CGCCTGGTTCTAGGAATAATGG		
mtDNA^{CD4977}	F 5'-TATTAAACACAAACTACCACCTACC	132	Gendron et al. (2012)
	R 5'-GGCTCAGGCGTTTGTGTATGAT		
HBG	F 5'-GCTTCTGACACAACTGTGTTCACTAGC	120	Aviv et al. (2011)
	R 5'-CACCAACTTCATCCACGTTCACC		
Telomere	F 5'-GGTTTTTGAGGGTGAGGGTGAGGGTGAG	variable	Rochette et al.(2010)
	R 5'-TCCCGACTATCCCTATCCCTACCCCTATC		
	Standard oligomer		
Telomere Standard	(TTAGGG)14	84	O'Callaghan et al. (2011)
HBG Standard	GCTTCTGACACAACTGTGTTCACTAGCAACCT CAAACAGACACCATGGTGCATCTGACTCCTG AGGAGAAGTCTGCCGTTACTGCCCTGTGGGG CAAGGTGAACGTGGATGAAGTTGGTG	120	NCBI GenBank: KP309825.1

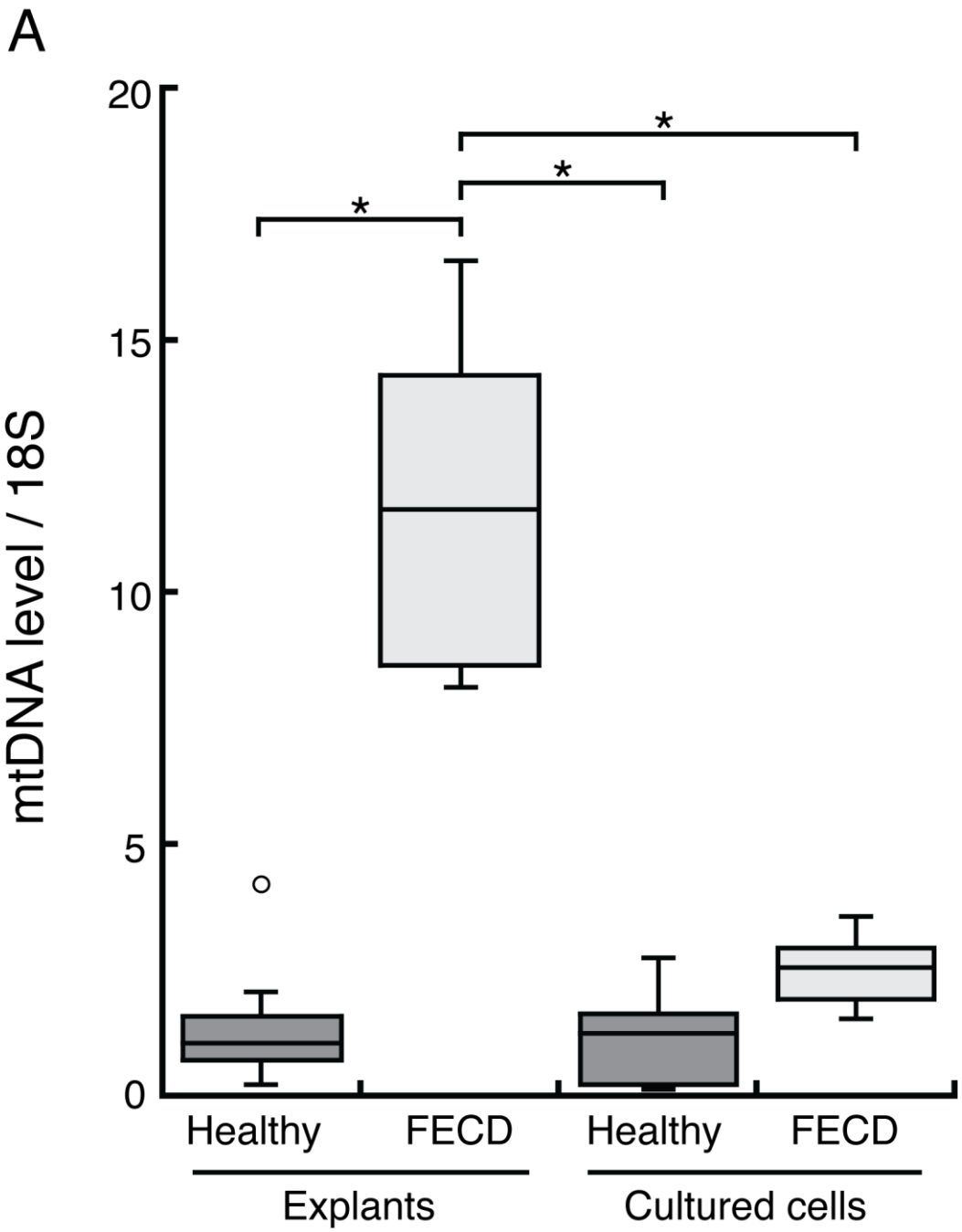
Table 5.1 List of Q-PCR primer sets and standard oligomers used in this study.

Rapport-Gratuit.com

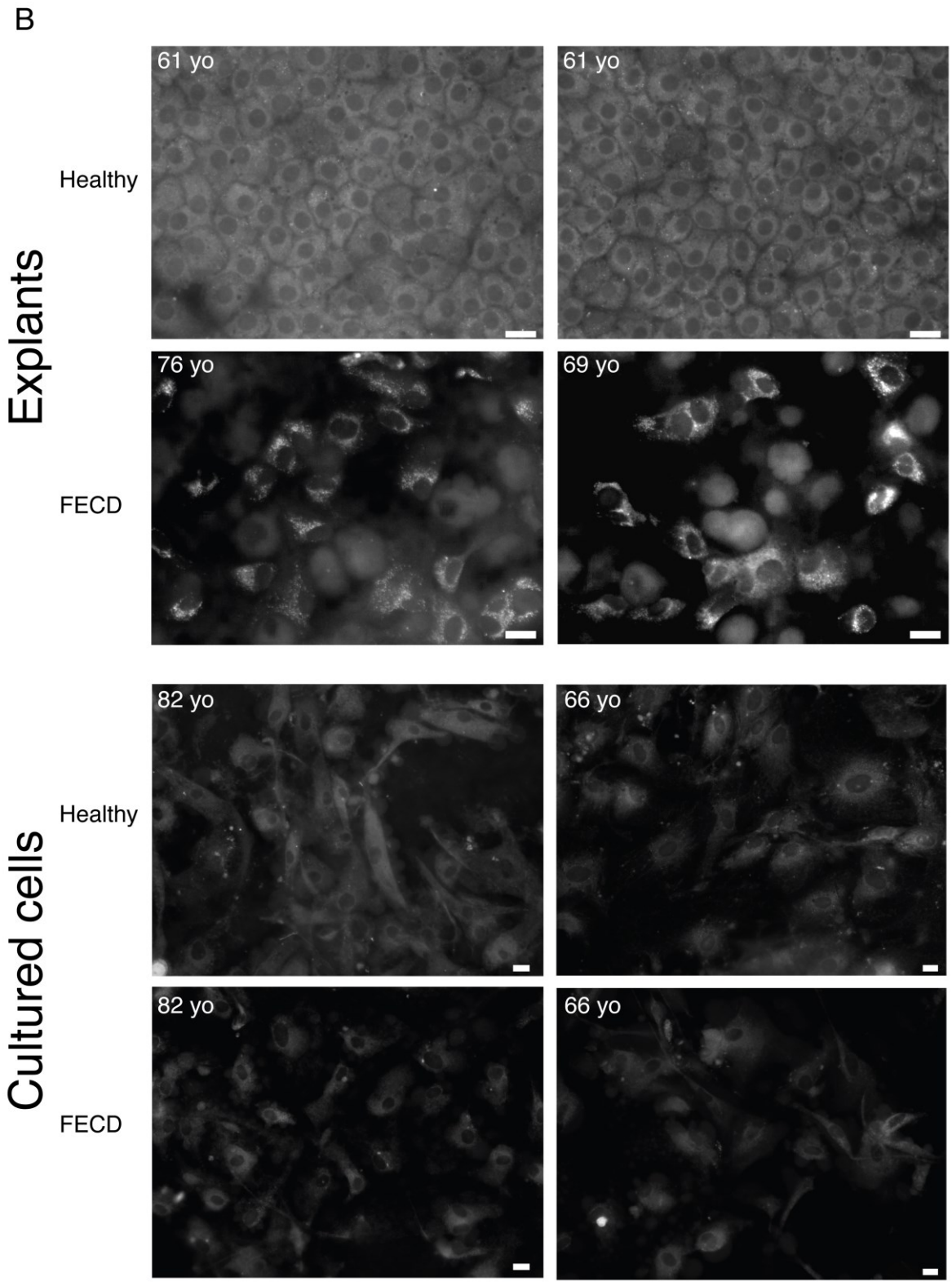
Gene description	Symbol	*in vivo** Fold Regulation	*in vitro* Fold Regulation
Antioxydant			
Metallothionein 3	*MT3*	-5.65	1.346
Superoxide dismutase 3. extracellular	*SOD3*	-5.37	1.802
Peroxiredoxin 1	*PRDX1*	-2.02	-1.026
Peroxiredoxin 2	*PRDX2*	-4.3	-1.236
Peroxiredoxin 5	*PRDX5*	-3.05	1.311
Peroxiredoxin 6	*PRDX6*	-3.29	**2.663**
Superoxide dismutase 2. mitochondrial	*SOD2*	-2.65	-1.147
Cytoglobin	*CYGB*	-2.23	-1.558
Thioredoxin reductase 1	*TXNRD1*	-2.23	1.06
Albumin	*ALB*	3.34	-1.135
ROS Metabolism			
Neutrophil cytosolic factor 2	*NCF2*	3.48	1.209
Nitric oxide synthase 2A (inductible. hepatocytes)	*NOS2A*	-3.91	1.131
Arachidonate 12-lipoxygenase	*ALOX12*	-2.31	-1.059
Apoptosis			
BCL2/adenovirus E1B 19 kd interacting protein 3	*BNIP3*	-4.61	-1.027
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	*GAPDH*	-2.61	-1.088
Signaling in response to oxidative stress			
Dual Specificity phosphatase 1	*DUSP1*	-3.12	-1.057
Oxidative-stress response 1	*OXSR1*	-2.18	-1.708
Serine/threonine kinase 25 (STE20 homolog. yeast)	*STK25*	-2.16	1.119
Other oxidative stress responsive genes			
Angiopoietin-like 7	*ANGPTL7*	-4.74	-1.824
Selenoprotein P. plasma. 1	*SEPP1*	-2.03	1.072

*Taken from Ula V. Jurkuna et al. *Evidence of Oxidative Stress in the Pathogenesis of Fuch Endothelial Corneal Dystrophy.* The American Journal of Pathology. (November 2010) Vol.177 No. 5 p. 2278-2289

Table 5.2 Comparative list of genes expression from FECD corneal endothelial explants and cultured cells relative to healthy endothelium as detected by PCR array and microarray gene profiling.



Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES


B
Explants
Healthy
61 yo
61 yo
FECD
76 yo
69 yo
Cultured cells
Healthy
82 yo
66 yo
FECD
82 yo
66 yo

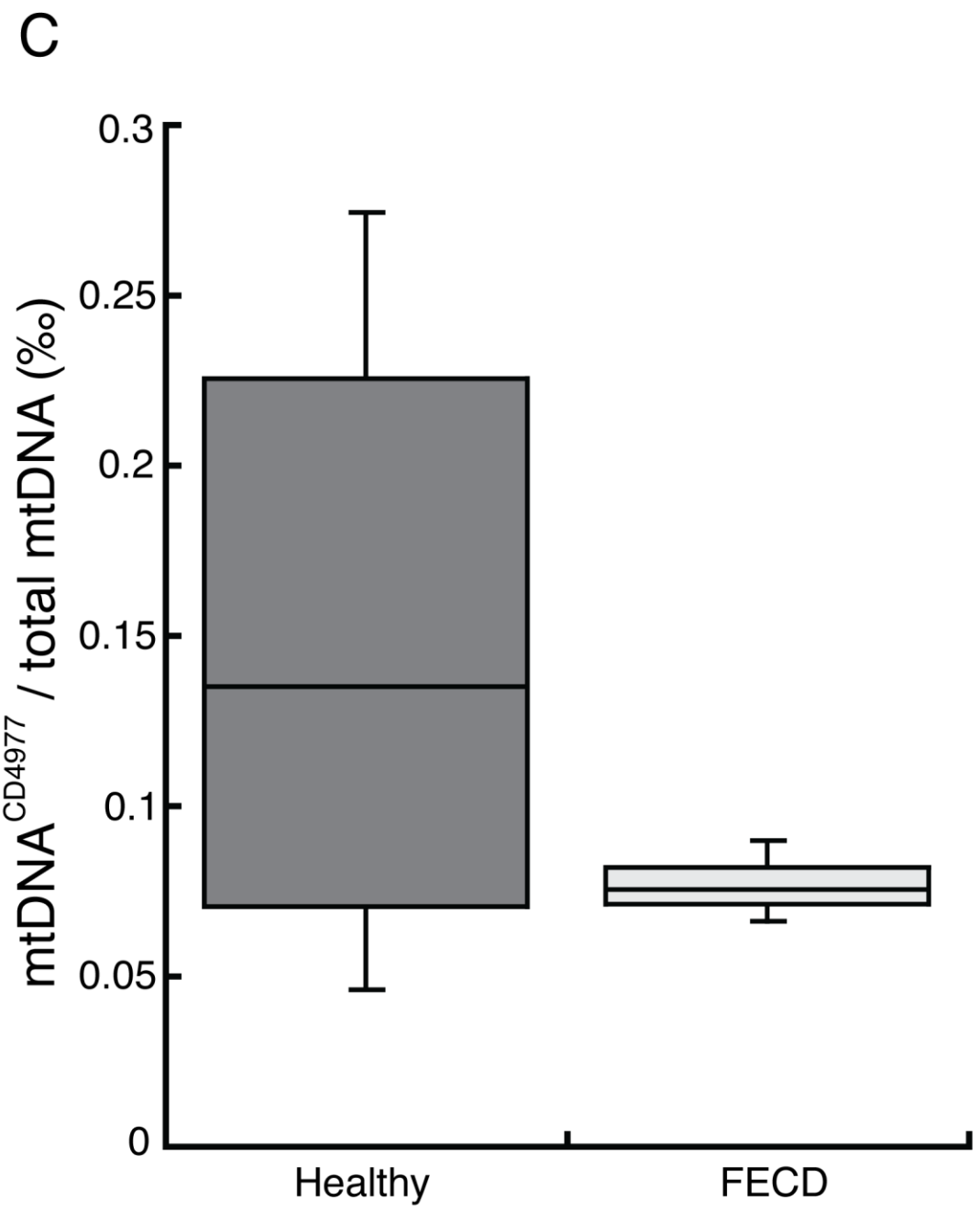
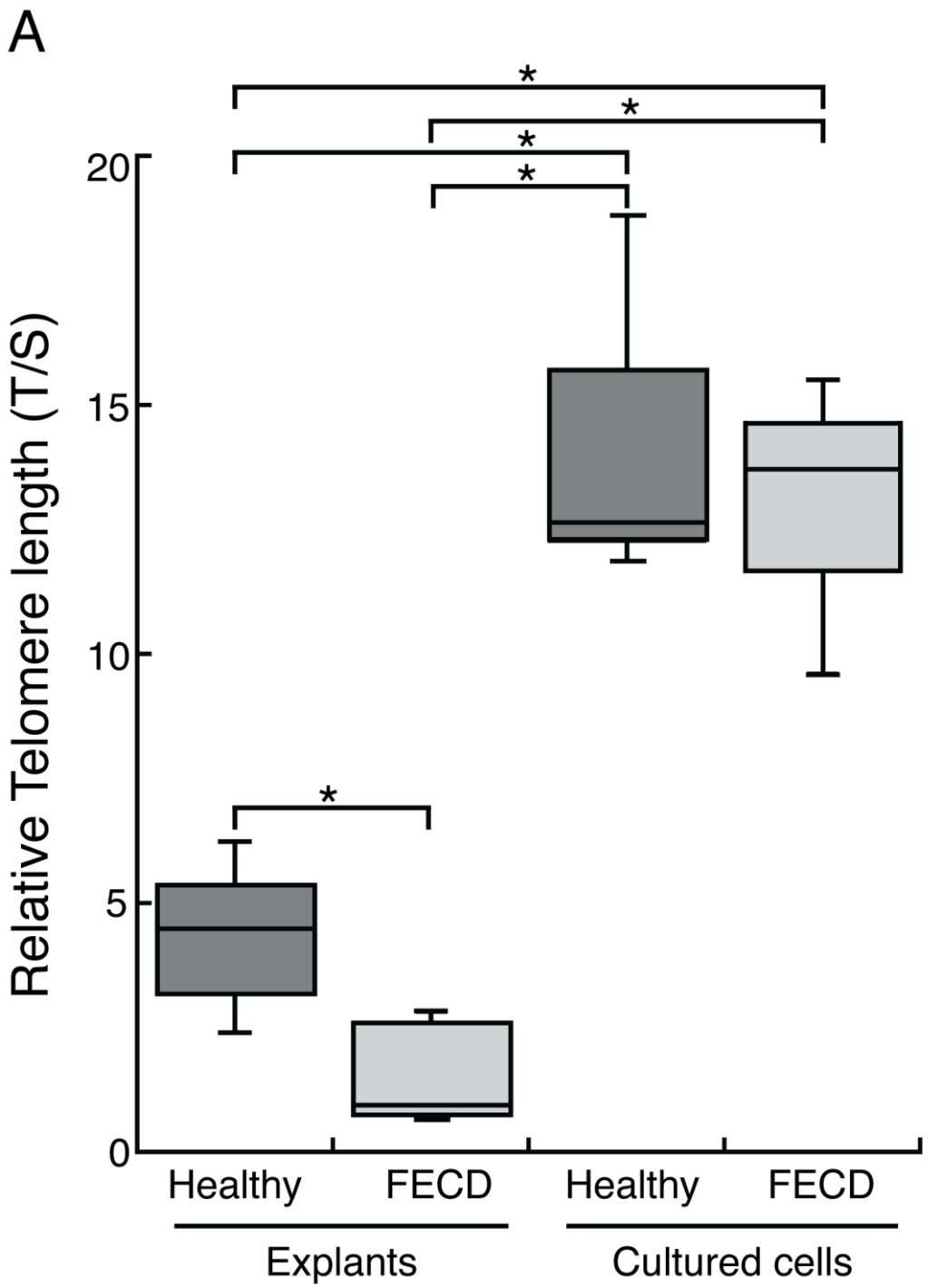


Figure 5.1 Mitochondrial level and integrity in corneal endothelial healthy and FECD explants and cultured cells. **(A)** The amount of mtDNA per cell in cultured corneal endothelium healthy and FECD cells as well as in corneal endothelium explants has been measured using a ratio of the mtDNA level over a known copy number per cell gene (i.e. gene coding for 18S ribosomic subunit) (mtDNA/18S ratio). Total DNA, including mtDNA, of corneal endothelial cells from healthy or FECD human subjects was extracted from endothelium explants or from confluent cultured cells at passage 3. mtDNA/18S ratio was evaluated for a total of 23 subjects with a median age of 67 years old; with each condition containing at least 5 subjects. The results depicted clearly

show up to 11 times more mtDNA per cell in FECD *explants* (median: 11.63) when compared to healthy explants (median: 1.06), healthy *cultured cells* (median: 1.23) or FECD *cultured cells* (median: 2.57). The mtDNA/18S ratio was significantly different between the FECD *ex vivo* condition and all the other conditions (***$P<0.008$*). **(B)** Mitochondrial density evaluation using Mitotracker® Red CMXRos staining in *explants* and *cultured* endothelial cells of similar age from both healthy and FECD human subjects. More mitochondria are found in FECD *explants* than in any other conditions (FECD *cultured cells* or Healthy *explants* and *cultured cells*). Noteworthy, in FECD *explants* condition, the signal is not equally distributed and some cells (≈20-30%) have a much stronger mitochondrial signal than others. Except this condition, all other conditions have equally distributed mitochondrial signal among their cells. The median age of the eight shown samples is 67.5 years old. White scale bars represent 50 μm. **(C)** Quantification of $mtDNA^{CD4977}$ in corneal endothelial FECD and healthy cultured cells. $mtDNA^{CD4977}$ and total mtDNA were detected by Q-PCR. Total DNA, including mtDNA, of corneal endothelial cells from healthy and FECD human subjects was extracted from confluent cultured cells at passage 3. Primer sets specific for detecting $mtDNA^{CD4977}$ and mtDNA were used and a ratio $mtDNA^{CD4977}$ / total mtDNA was derived. This ratio was evaluated between healthy and FECD cultured cells of 4 subjects per condition with a median age of 66 years old. No significant difference between the $mtDNA^{CD4977}$/total mtDNA ratio between the two conditions: median value of 0.07% and 0,13% for healthy and FECD respectively (*$P>0.05$*).


A
Relative Telomere length (T/S)
20
15
10
5
0
*
*
*
*
*
Healthy
FECD
Healthy
FECD
Explants
Cultured cells

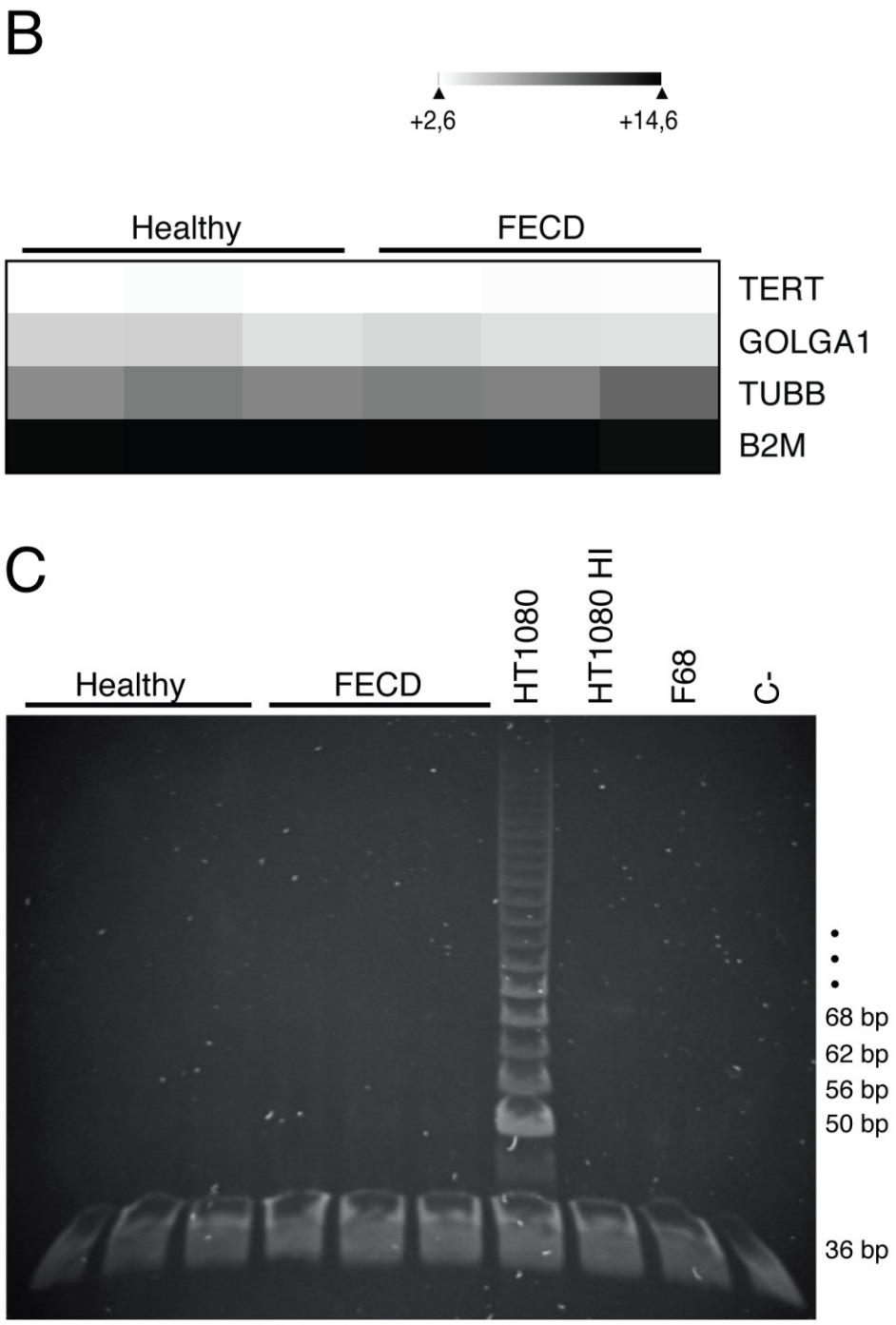


Figure 5.2 Telomeres are shorter in FECD patients but cultured corneal endothelial cells from healthy and FECD subjects show an increased telomere length without telomerase gene expression and activity. **(A)** Relative telomere length evaluated by Q-PCR in corneal endothelium explants and cultured cells from healthy and FECD subjects. This was done using 17 subjects with a median age of 69 years old. Total DNA, including mtDNA, of corneal endothelial cells from healthy or FECD human subjects was extracted from endothelium explants or from confluent cultured cells at passage 3. The ratio of telomeric Q-PCR amplification signal (T)

over the signal generated by the single-copy gene HBG (S) was determined (T/S). Relative telomere length was greater in cultured cells (Healthy: T/S = 12.6 and FECD: T/S = 13.7) than in the corneal endothelium explants (Healthy: T/S = 4.4 and FECD: T/S = 0.9). Noteworthy, relative telomere lengths were significantly less for FECD than for healthy explants, a difference that was not observed in culture. (Wilcoxon test, *$*P<0.04$*). **(B)** Gene expression of telomerase-coding gene (TERT) in post-confluent corneal endothelial cultured cells from healthy and FECD subjects using gene expression microarray technique. The experiment was performed with cells from 3 healthy (60, 66 and 82 years old) and 3 FECD subjects (58, 66 and 82 years old). Median age was 66 years. The scale used to display the log2 expression level values was determined by the hierarchical clustering algorithm of the Euclidian metric distance between genes. White indicates a very low and black, a very high gene expression. The three genes shown in the lower lines (GOLGA1, TUBB and B2M) are housekeeping genes used as experimental controls. The transcription level of these genes is stable, independent of cell type and conditions (*Lee et al.*, 2007). Results indicate an absence of TERT gene expression and no significant difference in gene expression between FECD and healthy corneal endothelial cells. **(C)** Telomerase activity measured in cultured corneal endothelial cell from healthy and FECD subjects using the telomerase repeat amplification protocol (TRAP) assay. The assay was done using cells from 3 healthy (64, 70 and 72 years-old) and 3 FECD (69, 69 and 70 years-old) subjects (median age: 69.5 years). HT1080 is a telomerase positive fibrosarcoma cell line and HT1080 HI is the heat-inactivated control. F68 is a 68 years-old telomerase negative corneal stroma keratocyte cell strain and C- is a negative control without protein extract. The 36-bp fragment is an internal PCR amplification control band. We found no telomerase activity in both healthy and FECD corneal endothelial cultured cells.

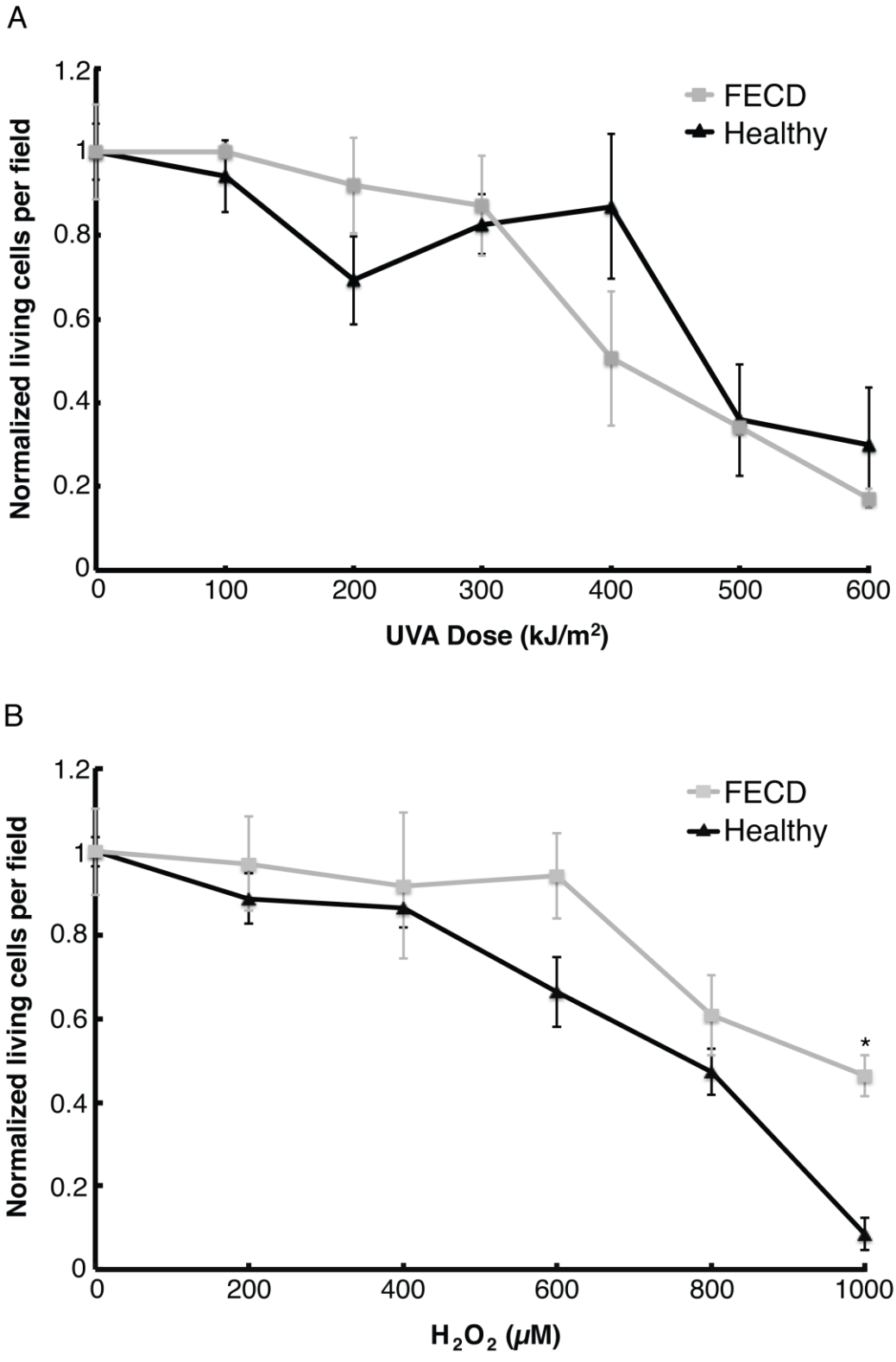


Figure 5.3 Similar sensitivity to UVA- and H_2O_2-induced mortality in cultured corneal endothelial FECD and healthy cells. **(A)** Cells were irradiated to UVA doses ranging from 0 to 600 kJ/m^2. Cell viability was measured

24 hours post-irradiation. Cell sensitivity to UVA was evaluated in at least 3 different subjects for each FECD and healthy patients for a total of 7 subjects and a median age of 72 years old. The results depict no significant difference in UVA-induced cell death sensitivity between cultured corneal endothelial cells from healthy and FECD subjects. Data are presented as means ± standard deviation. **(B)** Cells were exposed to H_2O_2 at doses ranging from 0 to 1000 μM. Cell viability was measured 24 hours later. No significant difference in H_2O_2-induced cell death was observed between healthy and FECD cells from 0 to 800 μM. In fact, FECD cells seemed to be less sensitive to H_2O_2-induced cell death and FECD cells exposed to 1000 μM were significantly more resistant to H_2O_2-induced cell death than healthy cells (*$*P<0.05$*). Cell viability was evaluated with at least 3 different subjects for each category for a total of 7 subjects and a median age of 72 years old. Data are presented as means ± STD.

Rapport-Gratuit.com

Healthy (H) or FECD (F)	Age	Sex	Figure
F	60	Male	1a,1c,2a,2b
F	66	Female	1a,1b,1c,2a,2b
F	82	Female	1a,1b,1c,2a,2b
F	67	Male	1a
F	78	Male	1a
H	66	Female	1a,2a,2b
H	58	Male	1a,1c,2b
H	82	Female	1a,1c,2a,2b
H	72	Male	1a,1c,2a
H	77	Male	1a
H	66	Male	1a
F	83	Female	1a,2a
F	72	Male	2a
F	67	Male	1a,2a
F	66	Male	1a,2a
F	64	Male	1a
F	82	Male	1a
H	54	Male	1a,2a
H	69	Male	1a,2a
H	50	Female	1a
H	63	Male	1a,2a
H	77	Male	1a,2a
H	73	Male	1a,2a
H	50	Female	1a
H	82	Female	1b
H	66	Female	1b,1c
H	61	Female	1b
H	61	Female	1b
F	76	Male	1b
F	69	Male	1b
F	67	Male	2a
F	78	Male	2a
H	72	Female	2c
H	70	Female	2c
H	64	Female	2c
F	70	Male	2c
F	69	Male	2c
F	69	Male	2c
H	50	Female	3a,3b

Healthy (H) or FECD (F) (Continued)	Age	Sex	Figure
H	59	Female	3a,3b
H	62	Female	3a,3b
H	72	Female	3a,3b
F	76	Male	3a,3b
F	79	Male	3a,3b
F	81	Male	3a,3b

Table supplémentaire 5.1 Classification of age and sex of healthy and FECD donors used in this study by figure.

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

Chapitre 6: Discussion et Conclusions

6.1 Effet du stress oxydatif sur la cornée humaine

Les travaux réalisés dans cette thèse ont été faits dans le but de mieux comprendre l'effet de l'oxydation exogène, telle que celle produite par les rayons UV, et endogène sur la cornée humaine. L'oxydation des composants cellulaires a été associée avec la dégénération, des phénotypes de vieillissement et des pertes de fonctionnalités des tissus. La peau a bien été étudiée à ce sujet, mais peu d'études portent sur la cornée humaine alors que tous les deux sont des tissus exposés directement aux rayonnements UV (Kammeyer A et Luiten RM, 2015). Les UVA ont été principalement étudiés étant donné qu'ils sont les plus efficaces des rayons UV à induire de l'oxydation, tel que démontré par la formation de dommages oxydatifs à l'ADN et par l'apparition de délétions mitochondriales qui en résultent (Baier J et al., 2006; Berneberg et al., 1999; Cadet J et Douki T, 2011; Cadet J et al., 2015; Mouret S et al., 2012). La fréquence d'apparition des délétions mitochondriales ADNmt^{CD4977} et ADNmt^{3895} a été associée avec l'exposition aux UVA dans la peau, nous avons donc vérifié dans un premier temps quelles structures principales de l'œil humain étaient sujettes à ces délétions (Berneberg et al., 1999; Harbottle A and Birch-Machin MA, 2006). Nos travaux ont montré que le stroma cornéen est la structure cornéenne la plus touchée par la présence de ces délétions mitochondriales (Gendron SP et al., 2012; Gendron SP et al., 2013). Cela a permis d'amener une preuve supplémentaire que la cornée humaine est belle et bien susceptible à l'oxydation.

L'étape subséquente a donc été de vérifier l'effet des rayons UVA sur la composition de l'ECM du stroma cornéen. En utilisant un modèle de stroma reconstruit par génie tissulaire irradié chroniquement aux rayons UVA, nous avons observé des changements dans l'ECM du stroma cornéen liés à des phénotypes de photovieillissement (Gendron SP et al., 2015).

Par la suite, l'oxydation et son implication dans la dystrophie cornéenne endothéliale de Fuchs ont été investiguées. Les résultats obtenus démontrent des évidences d'oxydation dans la pathologie dont des effets sur les mitochondries et le raccourcissement des télomères, des phénomènes réversibles par la mise en culture des cellules pathologiques (Gendron SP et al., 2016).

6.2 L'utilisation des délétions mitochondriales dans l'œil humain comme biomarqueurs de dommage à l'ADNmt

Notre attention s'est portée sur les deux délétions mitochondriales les plus communes parmi les 263 répertoriées (Samuels DC et al., 2004; Revised Cambridge Human mtDNA reference sequence, http://www.mitomap.org accédé le 1 mai 2016). L'ADNmt^{CD4977} et l'ADNmt^{3895} ont été utilisées pour témoigner de l'effet de l'oxydation puisqu'une corrélation entre le mésappariement de séquences d'ADN répétées

endommagées par l'oxydation et l'apparition de délétion de l'ADNmt a été démontrée (Lezza AM et al., 1999). L'utilisation des délétions de l'ADNmt comme outil pour témoigner de l'effet de l'oxydation comporte certains avantages plutôt que la mesure des 8-oxo-dG pour mesurer l'état d'oxydation. En effet, la mesure des 8-oxo-dG peut varier selon le tissu analysé, la procédure d'extraction et la méthode d'analyse (Lezza AM et al., 1999; Cadet J et al., 1997). De même, la présence de 8-oxo-dG ne résulte pas nécessairement en un dysfonctionnement mitochondrial puisqu'ils peuvent être pris en charge et être réparés par le système de réparation de l'ADNmt comme le BER. La mesure des 8-oxo-dG permettrait alors d'observer l'état d'oxydation plutôt que ses conséquences. Il a été suggéré que l'augmentation de nucléotides oxydés représentés par les 8-oxo-dG doit dépasser un seuil limite avant qu'il y ait un effet néfaste sur l'intégrité de l'ADNmt (Lezza AM et al., 1999). Dans ce cas-ci, l'intégrité de l'ADNmt est mieux représentée par la mesure des délétions $ADNmt^{CD4977}$ et $ADNmt^{3895}$. Les délétions de l'ADNmt montrent réellement la conséquence de l'oxydation UVA-induite. Il est toutefois important de tenir compte du fait que les délétions de l'ADNmt ne sont pas exclusivement induites par l'exposition aux UVA. En effet, le stress oxydatif endogène joue également un rôle dans leur formation comme décrite à la section 1.2.1.2. De même, il y a notamment certaines pathologies mitochondriales où l'on retrouve ces délétions sans exposition solaire. C'est le cas pour le syndrome de Kearns-Sayre, le syndrome de Pearson et l'ophtalmoplégie externe chronique progressive tel que revue dans (Dimauro S et Garone C, 2011). Les défauts génétiques mitochondriaux peuvent résulter de mutation non seulement dans l'ADNmt, mais également dans l'ADNn (McFarland et al., 2010; Schon et al., 2012).

Les délétions de l'ADNmt avaient été investiguées dans deux structures oculaires avant la publication des chapitres 2 et 3, la rétine et le trabéculum (Barreau E et al., 1996; Izzotti A et al., 2010; Izzotti A et al., 2011). Dans ces études, l'$ADNmt^{CD4977}$ avait été utilisée puisqu'il était connu qu'elle s'accumulait avec l'âge et que son accumulation peut résulter du stress oxydatif produit par le métabolisme cellulaire, le stress ou la lumière. En 2014, l'équipe de (Czarny P et al., 2014) ont mesuré à leur tour l'$ADNmt^{CD4977}$ dans des cellules endothéliales cornéennes et l'ont utilisé comme biomarqueur de dommage à l'ADNmt.

Bien que l'$ADNmt^{CD4977}$ et l'$ADNmt^{3895}$ soient les délétions les plus fréquentes de l'ADNmt, il serait intéressant en perspective d'étudier le profil complet des 263 délétions connues pour chacun des cas où l'on retrouve les délétions de l'ADNmt. Cela permettrait de savoir si des combinaisons de délétions sont plus néfastes que d'autres pour l'atteinte d'un seuil limite menant à une dysfonction mitochondriale. Cela permettrait également de comparer si certaines délétions contribuent plus que d'autres à des fuites d'électrons de la chaîne de transport des électrons qui favorisent la formation de ROS. En effet, le manque ou l'inhibition d'une sous-unité essentielle de la chaîne de transport des électrons comme le complexe I ou III cause une augmentation de la fuite d'électron qui résulte en la formation davantage de ROS tel que revue dans (Keane PC et al., 2011).

C'est notamment le cas dans la maladie de Parkinson où l'activité des complexes I et IV est diminuée et que les dommages oxydatifs sont impliqués dans la pathogenèse (Müftüoglu M et al., 2004).

Ce profilage serait présentement très coûteux en matériel, en temps et en matériel biologique s'il devait être effectué par Q-PCR. Présentement les PCR multiplex disponibles sur le marché permettant de quantifier plusieurs amplicons (ex: délétions) à la fois sont limitées jusqu'à environ 20 (Platinum® Multiplex PCR Master Mix, https://www.thermofisher.com accédé le 11 juin 2016). Il faut également reconnaître que la détection de délétion de l'ADNmt telle que nous l'avons effectué comporte certaines limites. Parmi celles-ci, nous ignorons pour une molécule d'ADNmt donnée le pourcentage total de ses nucléotides qui sont mutés ou qui comporte des délétions en comparaison à une molécule de type sauvage. Nous ignorons également comment se présente la répartition des délétions mitochondriales dans une cellule donnée, c'est-à-dire si les délétions se concentrent dans certaines mitochondries ou si elles sont distribuées de façon homogène entre toutes les mitochondries. C'est le même cas pour ce qui concerne les cellules d'un même tissu observé, à savoir si certaines cellules sont plus affectées que d'autres. Cela nous permettrait d'avoir un profil plus complet de l'hétéroplasmie dans un tissu. Une étude récente a d'ailleurs montré une corrélation linéaire entre l'hétéroplasmie et l'âge pour un tissu hautement métabolique comme les muscles (Naue J et al., 2015). Néanmoins, les corrélations possibles entre l'hétéroplasmie et l'hérédité, le type de tissu, l'âge d'un individu, le sexe ou le type de maladie est encore sujet à controverse et est sous investigation (Avital G et al., 2012; Coskun PE et al., 2004; de Camargo MA et al., 2011; do Rosario Marinho AN et al., 2011; He Y et al., 2010; Lagerström-Fermér M et al., 2001; Rose G et al., 2010; Wang Y, Michikawa Y et al., 2001).

6.3.1. Les délétions ADNmt^{CD4977} et ADNmt^{3895} dans la cornée

Le premier volet de l'objectif des chapitres 2 et 3 visait à identifier la fréquence des mutations mitochondriales dans diverses structures de l'œil humain, la cible étant de trouver la ou les structures les plus touchée(s). Les résultats obtenus dans nos deux premières publications montrant une accumulation de délétions de l'ADNmt dans la cornée sont en concordance avec l'hypothèse que nous avions que la cornée possède une haute fréquence de délétion étant donné qu'elle est exposée au rayonnement solaire au même titre que la peau. Contrairement à notre attente, l'accumulation n'a pas lieu dans l'épithélium cornéen, la première couche exposée à l'environnement, mais bien dans le stroma cornéen. Cette attente avait été formulée suite à des résultats obtenus dans notre laboratoire démontrant que l'épithélium cornéen est la couche qui contient le plus de dommage à l'ADN lorsqu'un œil est exposé aux UVB (Mallet JD et Rochette PJ, 2011). Toutefois, nos résultats obtenus ne sont pas contraires aux attentes par rapport à la littérature. En effet, dans la peau, l'ADNmt^{CD4977} et l' ADNmt^{3895} s'accumulent dans le derme qui est une structure similaire au stroma cornéen (Berneburg M et al., 2004; Krishnan KJ et l., 2004).

L'accumulation d'ADNmt^{CD4977} et d'ADNmt^{3895} dans le stroma s'expliquerait entre autres par la présence d'antioxydants dans l'épithélium et l'endothélium cornéen comme l'ascorbate présenté la section 1.2.2.4. En effet, il a été reporté que l'ascorbate est 8 fois plus concentré dans ces deux couches que dans le stroma cornéen (Brubaker RF et al., 2000; Pirie A, 1946; Delamere NA, 1996; Ringvold A et al., 2000). De même, des enzymes antioxydantes comme la superoxyde dismustase 1, 2 et 3 ainsi que la glutathione peroxydase 1 sont exprimées de façon prédominante dans l'épithélium et l'endothélium cornéen (Zelko IN et al., 2002; Attala LR et al., 1988). Le renouvellement cellulaire de l'épithélium cornéen peut également expliquer ce résultat puisque les cellules qui auraient accumulé des délétions seraient éliminées. Ce renouvellement se fait en 7 semaines chez la souris (Nagasaki T and Zhao J, 2003). Par contre, les keratocytes qui constituent le stroma cornéen sont des cellules quiescentes et sont confinées dans la matrice extracellulaire. Cela les rend donc plus sujets à une accumulation de délétions mitochondriales.

Les résultats obtenus pour le stroma cornéen sont en concordance avec ceux obtenus dans la littérature pour la peau. En effet, la distribution des délétions de l'ADNmt dans la peau se fait également dans le derme qui est une structure similaire au stroma cornéen (Berneburg M et al., 2004). Les plus hauts niveaux d'ADNmt^{CD4977}/ADNmt ou ADNmt^{3895}/ADNmt total que l'on a retrouvés dans la cornée sont localisés dans le stroma cornéen et ont une valeur de 8,86% et 0,054%, respectivement. Ces niveaux sont en dessous du seuil limite moyen de 50% reporté dans la littérature pour qu'il y ait un dysfonctionnement complet de la chaîne respiratoire mitochondriale dans des tissus hautement métaboliques (Rossignol R et al., 1999). Néanmoins, la présence de ces délétions témoigne des conséquences de l'oxydation ayant lieu dans ces cellules, dont possiblement le photovieillissement. La relation entre les délétions de l'ADNmt et le photovieillissement cornéen est abordée en détail à la section 6.3.2.

À notre connaissance les travaux effectués sur l'ADNmt^{3895} sont les premiers effectués dans l'œil humain. Il est donc impossible d'effectuer une comparaison des niveaux de délétion avec d'autres études au niveau oculaire. Toutefois, en ce qui concerne l'ADNmt^{CD4977}, cette dernière a été étudiée dans une autre structure: le trabéculum. Le trabéculum est une structure sensible à l'oxydation et des ratios élevés d'ADNmt (5,32 fois) s'y retrouvent dans des patients atteints de glaucome versus sains (Izzotti et al., 2009; 2010). Le ratio (pathologie/sain) obtenu dans cette étude est dans le même ordre de grandeur si l'on le compare à notre résultat obtenu pour l'âge dans le stroma cornéen où l'on observait 4,98 fois plus d' ADNmt^{CD4977} chez l'intervalle 70-95 ans que chez l'intervalle 50-70 ans. Le ratio entre les deux catégories d'âges pourrait possiblement être interprété comme la conséquence du photovieillissement cornéen. Par ailleurs, l'ADNmt^{CD4977} a également été investigué dans l'endothélium cornéen par le groupe de (Czarny P et al., 2014). Ceux-ci ont obtenu des ratios de délétion de l'ADNmt^{CD4977} similaires aux nôtres pour les cellules endothéliales au phénotype non pathologique.

Par ailleurs, une autre mutation mitochondriale, la mutation de transversion T414G habituellement retrouvée dans des maladies dégénératives comme la maladie d'Alzheimer et le vieillissement a été investiguée dans la cornée humaine en relation avec la pathologie du kératocône (Atilano SR et al., 2005). L'étude a démontré une absence totale de la mutation aussi bien chez les cornées saines que pathologiques. Ce qui suggère que cette mutation est spéfique au tissu. Ainsi, l'ADNmt^{CD4977} et l'ADNmt^{3895} semblent être des meilleurs outils pour détecter des mutations à l'ADNmt dans la cornée humaine.

6.3.2 Les délétions ADNmt^{CD4977} et ADNmt^{3895} et le photovieillissement cornéen

Le deuxième volet de l'objectif des chapitres 2 et 3 visait à vérifier si l'ADNmt^{CD4977} et l'ADNmt^{3895} se font plus abondantes avec l'âge. Nos résultats ont démontré que l'ADNmt^{CD4977} et l'ADNmt^{3895} sont non seulement présentes dans le stroma cornéen, mais également qu'elles s'accumulent avec l'âge dans cette structure. Le fait que les deux délétions concordent dans leur localisation supporte davantage le fait que le stroma cornéen soit soumis à de l'oxydation. L'accumulation avec l'âge pour les deux délétions appuie l'implication probable de la lumière solaire dans la génération de ces délétions mitochondriales. L'œil humain au long d'une vie subit une exposition solaire cumulée et les kératocytes présents dans le stroma également. Comme mentionné précédemment les kératocyte sont plus susceptibles à l'oxydation par leur quiescence et leur niveau plus bas d'antioxydants, ce qui expliquerait leur niveau de délétions de l'ADNmt.

Dans la peau exposée au soleil, l'ADNmt^{CD4977} et l'ADNmt^{3895} ont montré une accumulation avec l'âge et ont ainsi été proposées comme biomarqueurs de l'exposition solaire (Krishnan KJ et al., 2004; Harbottle A et Birch-Machin MA, 2006; Harbottle A et al., 2010). Les évidences suggèrent fortement que cette accumulation de délétions est due au photovieillissement plutôt qu'au vieillissement normal.

Sur le plan physique, l'accumulation de délétions de l'ADNmt dans la peau a des effets néfastes tels qu'une désorganisation des collagènes de la peau ainsi qu'une dégradation de ceux-ci. Cela résulte en des phénotypes de photovieillissement tels que la formation de rides et une perte d'élasticité. Il a été reporté que le vieillissement de la peau dépend en majorité de facteurs environnementaux comme l'exposition aux radiations solaires, la fumée de cigarette et les polluants atmosphériques. L'exposition aux rayons UV est le facteur prédominant des facteurs environnementaux. Par exemple, il est reporté que le photovieillissement est responsable de 80% du vieillissement du visage (Friedman O, 2005). La dégénération due à l'oxydation est la cause principale du vieillissement prématuré de la peau plutôt que la sénescence des cellules (Kammeyer A and Luiten RM 2015). Un parallèle est fait ici avec la peau puisque la cornée possède une structure similaire.

Au niveau oculaire, la cornée joue un rôle crucial dans la réfraction de la lumière dont le stroma cornéen qui est responsable de 75% du pouvoir réfractif de l'œil (Michelacci YM, 2003). Tel que mentionné à la section 1.1.3, la composition en collagènes et son organisation sont extrêmement importantes pour la transparence et la rigidité de la cornée. Une atteinte aux collagènes par le vieillissement cornéen se traduit entre autres par une rigidification, une opacification et un changement dans son pouvoir réfractif (Faragher RGA et al., 1997). Nos résultats montrent une accumulation de délétions de l'ADNmt dans le stroma cornéen, ce qui suggère que la présence de l'ADNmt^{CD4977} et l'ADNmt^{3895} pourrait être associée au photovieillissement cornéen comme c'est le cas pour la peau. Une accumulation de ceux-ci pourrait être associée aux manifestations du vieillissement cornéen.

En perspective, il serait intéressant de combiner à nos résultats des observations provenant de techniques permettant la caractérisation de la cornée comme de la microscopie multiphoton et de la tomographie en cohérence optique. La microscopie multiphoton permet une observation en profondeur d'un tissu en utilisant l'autofluorescence de composants cellulaires comme la nicotinamide adénine dinucléotide (NADH) ou l'élastine. La tomographie en cohérence optique permet quant à elle l'acquisition d'images tridimensionnelles d'un tissu par l'utilisation d'un laser. Ces deux techniques en combinaison ont déjà été utilisées afin de caractériser des cornées humaines afin d'en acquérir leur indice de réfraction et leur épaisseur en comparaison avec d'autres animaux (Lai T et Tang S, 2014). Il serait intéressant de savoir si des cornées qui portent des délétions de l'ADNmt peuvent être associées avec une variation de ces deux caractéristiques puisque le photovieillissement modifie les collagènes et leur organisation.

De manière similaire, la génération de seconde harmonique (GdSH) a été utilisée afin de quantifier les changements en collagènes liés au photovieillissement dans une peau exposée versus non exposée. Cette technique permet de révéler les changements en collagènes de manière tridimensionnelle (Zhuo S et al., 2013). Il serait intéressant de vérifier l'effet du photovieillissement sur la cornée par le biais de cette technique. Cela permettrait d'avoir une idée plus claire des changements en collagènes et la modification de leur structure causée par le photovieillissement. En effet, l'organisation des fibres de collagènes dans le stroma est primordiale à la transparence cornéenne.

6.4 Rôle des UVA dans le photovieillissement cornéen

L'objectif du chapitre 4 était d'étudier les changements provoqués par une exposition chronique aux UVA sur la composition de la matrice extracellulaire du stroma cornéen. Les résultats obtenus aux chapitres 2 et 3 ont démontré une accumulation de délétions de l'ADNmt dans le stroma cornéen, nous avons donc décidé d'investiguer cette structure davantage puisque la présence de délétion de l'ADNmt témoigne de l'effet de l'oxydation et que cette structure est essentielle au pouvoir réfractif de l'œil. Comme mentionné à la section 1.2.1.1, les UVA sont reconnus pour être les rayons UV au plus fort potentiel oxydatif et ont été démontrés pour traverser l'entièreté de la cornée (Mallet JD et Rochette PJ, 2013). Les UV régulent à la hausse l'expression des métalloprotéinases par les ROS qu'ils induisent (Sanchez WY et al., 2013). Au niveau de la peau, les UVA augmentent la synthèse et l'expression de MMP-1 dans les fibroblastes dermiques, ce qui joue un rôle important dans le photovieillissement de la peau en augmentant la dégradation des collagènes dermiques (Varani J et al., 2001; Lan CC et al., 2015). Les UVA sont absorbés par les chromophores dermiques ce qui active la génération des ROS; les protéines de l'ECM cutanée jouent alors un rôle de photosensibilisateurs (Wondrak GT et al., 2003). Dans les fibroblastes dermiques, l'exposition aux UVA augmente également le stress oxydant par l'augmentation en ferritine, ce qui mène à la création de radicaux hydroxyles par le biais de la réaction de Fenton (Vile GF et Tyrell RM, 1993). En effet, les UVA induisent ainsi du photovieillissement cutané entre autres par le biais de l'oxydation (Scharffetter-Kochanek K et al., 1997; Vile GF et Tyrell Rm, 1995).

Pour ces raisons, les UVA ont été utilisés pour induire du photovieillissement plutôt que les UVB ou les UVC. De même la lampe utilisée contenait à 99,99% des UVA1 car ces derniers constituent la majorité des UVA. Cela nous a donc permis d'étudier exclusivement l'effet de l'exposition cumulée des UVA sur le stroma cornéen.

Afin de mener cette étude, nous avons dû faire preuve d'innovation. En effet, dans la peau il est possible de comparer des régions exposées au soleil à des régions non exposées. Cela n'est pas possible pour des cornées puisqu'elles sont exposées afin de recevoir le signal visuel par les donneurs humains. Pour pallier à ce problème, nous avons développé notre propre modèle de photovieillissement grâce à l'utilisation de kératocytes et de génie tissulaire. Notre modèle avait l'avantage d'être isogénique afin d'effectuer nos comparaisons.

Nos résultats ont montré une régulation à la baisse de l'expression génique des collagènes et protéoglycans ainsi qu'une réduction dans la production et l'excrétion des protéoglycans suite à une exposition cumulée aux UVA. Ces résultats démontrent aussi que l'exposition cumulée aux UVA provoque des changements dans la

Rapport-Gratuit.com

matrice extracellulaire qui s'apparentent à ceux que nous avons également retrouvés dans des stromas de cornées natives d'individus âgés, suggérant ainsi le fait que l'exposition solaire catalyse le vieillissement cornéen. Cela met ainsi en lumière les changements provoqués par une exposition chronique aux UVA sur la composition d'ECM du stroma cornéen.

Bien que nos travaux constituent une première étape importante dans la compréhension du photovieillissement cornéen, ils comprennent certaines limitations. Parmi celles-ci, on note que modèle utilisé ne comprenait que le stroma cornéen. Un modèle reconstruit par génie tissulaire comprenant toutes les couches de la cornée nous aurait permis d'avoir un portrait plus complet de l'effet des UVA sur l'ensemble de la cornée. En effet, les protéines associées aux jonctions adhérentes et aux adhésions focales des cellules épithéliales participent à la communication avec le microenvironnement du tissu avoisinant, comme la communication entre l'épithélium et le stroma (Epifano C et Perez-Moreno M, 2012). Une altération aux jonctions adhérentes et aux adhésions focales peut résulter entre autres en des changements dans l'expression des protéines de l'ECM, des métalloprotéinases, des facteurs de croissance et des cytokines tel que revue dans (Epifano C et Perez-Moreno M, 2012). De même, le processus de guérison cornéenne dont nos cornées reconstruites semblent avoir des traits communs notamment par la présence de fibronectine est un processus complexe qui implique des interactions stroma-épithélium médiées par les cytokines où l'interleukine-1 joue un rôle de médiateur principal (Matsuba M et al., 2011; Wilson SE et al., 2001). Dans ce processus, les cytokines dérivées des cellules stromales jouent également un rôle entre autres dans la déposition de collagène, la prolifération des kératocytes, la nécrose des cellules stromales ainsi que la mitose et la migration épithéliale (Wilson SE et al., 2001). L'ECM quant à elle interagit également sur la morphologie et la fonction des cellules épithéliales entre autres par le biais de sa rigidité (Schwartz MA et DeSimone DW, 2008; Mammoto T et Ingber DE, 2010). En ce qui concerne l'endothélium, il a été reporté que l'oxydation modifie la structure et la fonction de l'ECM sécrété par les cellules endothéliales d'artères coronaires dont notamment par une hausse de l'expression génique de métalloprotéinases (Chuang CY et al., 2014).

Une autre limitation de notre modèle est que l'exposition utilisée ne contenait pas non plus d'autres composants habituellement retrouvés dans l'exposition solaire comme la HEV qui est reconnue pour diminuer les caroténoïdes dans la peau, ce qui indique la génération de radicaux libres (Vandersee S et al., 2015).

Ainsi, il serait donc intéressant en perspective de vérifier l'implication de l'oxydation sur les changements observés dans l'ECM cornéen d'une cornée reconstruite complète comportant un épithélium et un endothélium puisque ces derniers affectent la constitution de l'ECM par leurs interactions.

6.5 Présence d'ADNmt^{3895} dans la rétine

En plus de l'accumulation dans le stroma cornéen, nous avons trouvé que l'ADNmt^{3895} s'accumule dans la rétine et particulièrement dans la région maculaire de la rétine neurale et de l'épithélium pigmentaire rétinien qui est la zone la plus concentrée en photorécepteurs de type cônes. Tel que mentionné à la section 1.2.1.1, les UV ne pénètrent pas jusqu'à la rétine (Mallet JD et Rochette PJ, 2013; Boettner EA, 1967). Cela suggère ainsi que la présence de l'ADNmt^{3895} provient probablement d'un mécanisme autre que UV-induit. Parmi les autres mécanismes, on peut soumettre l'hypothèse qu'une portion de l'oxydation menant à la formation d'ADNmt^{3895} provienne de la HEV qui se rend à la rétine et interagit avec les chromophores présents dans les photorécepteurs et les cellules épithéliales pigmentaires, ce qui cause du stress et du dommage oxydatifs (Osborne NN et al., 2010; Logan P et al., 2015). Une autre cause possible est le fait que la rétine est fortement active au niveau métabolique par le biais de l'activité de ses photorécepteurs et que la respiration cellulaire encourue génère d'importantes quantités de ROS. En fait, la rétine est le tissu qui consomme le plus d'oxygène de tout le corps humain (Yu DY et Cringle SJ, 2005).

Ces résultats soulignent l'implication du stress oxydatif exogène et endogène dans la rétine. Nos résultats obtenus ont démontré pour la première fois une accumulation d'ADNmt délétée dans la région maculaire. C'est pourquoi l'ADNmt^{3895} pourrait être potentiellement impliquée dans la dégénérescence maculaire liée à l'âge où l'oxydation joue un rôle important dans l'étiologie de la pathologie. Nos résultats concordent également avec une étude qui avait démontré que la rétine dans les sujets atteints de DMLA comporte des hauts niveaux de délétions de l'ADNmt dont des polymorphismes d'un seul nucléotide (Kenney MC et al., 2010). En perspective, il pourrait être intéressant d'investiguer l'effet de l'irradiation aux HEV sur le taux de délétions mitochondriales dans un modèle *in vitro*.

6.6 Rôle de l'oxydation dans la FECD

L'objectif du chapitre 5 vise à mieux comprendre l'effet de l'oxydation endogène sur les cellules de l'endothélium dans la FECD, mais également de comprendre les changements liés à la réhabilitation des cellules en culture.

Nos résultats ont démontré d'une part l'implication du stress oxydatif dans la maladie par l'augmentation de la quantité d'ADNmt et un raccourcissement des télomères dans les explants de cellules pathologiques. D'une autre part, nos résultats ont montré que la mise en culture des cellules FECD permet la sélection de cellules fonctionnelles ayant des phénotypes moléculaires comparables aux cellules saines en termes de quantité d'ADNmt et de son intégrité, de sensibilité à l'oxydation et de longueur télomérique.

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

Nos résultats ont amené de nouvelles évidences à la présence du stress oxydatif dans la FECD. Notamment, la hausse de l'ADNmt dans les explants de FECD avait été également rapportée par (Czarny P et al., 2014); à cette observation nous avons rajouté l'information que les mitochondries ne sont pas également distribuées entre les cellules. Certaines cellules (≈20-30%) possèdent une plus large quantité d'ADNmt. En ayant plus de mitochondries, ces cellules sont probablement plus actives et produisent ainsi plus de ROS, ce qui exacerbe les dommages oxydatifs et peut mener ainsi à la formation de délétion de l'ADNmt dans la FECD comme l'ADNmt^{CD4977} qui a également été reportée (Czarny P et al., 2014). Nous avons également, pour la première fois investiguée dans la FECD, l'état des télomères qui sont sensibles à l'oxydation et nous avons noté un raccourcissement de ceux-ci dans les endothélia pathologiques. Tel que mentionné dans la section 1.2.2.3, l'érosion des télomères mène à la sénescence des cellules. Ces résultats obtenus concordent avec une étude récente qui démontrait une association entre des télomères courts et un haut niveau d'ADNmt dans des individus atteints de psychopathologies (Tyrka AR et al., 2016). En effet, le cerveau est également un tissu en haute demande énergétique et des dysfonctions mitochondriales ont également été reportées dans des maladies psychiatriques comme la schizophrénie, le trouble bipolaire et le trouble dépressif majeur (Streck EL et al., 2014; Lopresti AL et al., 2013). Il est intéressant de noter un dysfonctionnement mitochondrial dans une variété de maladies dégénératives.

En ce qui concerne la réhabilitation des cellules FECD en culture, nos résultats indiquent que cette réhabilitation se fait par la sélection de cellules FECD plus «saines» ou fonctionnelles. Ce qui démontre que la FECD n'affecte pas de manière homogène l'intégrité de toutes les cellules de l'endothélium cornéen. Ce fait est supporté par le résultat montrant la distribution inégale d'ADNmt dans les explants FECD. Les cellules «saines» constituent probablement celles qui sont le moins affectées par l'oxydation. De même, la restauration d'une longueur télomérique normale des cellules FECD lorsque mises en culture et l'absence d'activité télomérase témoigne de la sélection des cellules les moins affectées par la pathologie.

Une explication possible serait également la présence de cellules endothéliales progénitrices parmi les cellules sélectionnées. Certaines études ont déjà rapporté la présence de cellules endothéliales progénitrices dans l'endothélium cornéen humain et leur potentiel en médecine régénérative (Hara S et al., 2014; Stroncek JD et al., 2009). Toutefois, une étude chez l'humain mentionne que ce type de cellules est présent en périphérie de la membrane de Descemet alors que les membranes de Descemet utilisé dans nos expériences étaient la partie centrale (McGowan SL et al., 2007). Il serait d'intérêt d'utiliser un marqueur spécifique aux cellules endothéliales progénitrices afin d'en faire leur identification.

En perspective, il serait intéressant de regarder dans la FECD l'état de fonctionnement des mitochondries. Cet état peut notamment être évalué en mesurant le potentiel membranaire mitochondrial ($\Delta\psi$m). Des fonctions

mitochondriales compromises telles qu'une production diminuée d'ATP ou une élévation dans la production de ROS ont été rapportées pour jouer un rôle dans plusieurs maladies oculaires (Chernoivanenko IS et al., 2015). Une dépolarisation du $\Delta\psi m$ peut témoigner de l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondrial, ce qui mène à de l'apoptose (LY JD et al., 2003). Le calcium (Ca^{2+}) mitochondrial pourrait également être investigué puisque ce dernier s'accumule dans les mitochondries énergisées. Le calcium mitochondrial joue notamment un rôle dans le signalement intracellulaire de calcium, dans le métabolisme cellulaire, dans la survie cellulaire et dans la régulation d'effecteurs mitochondriaux (Rizzuto R et al., 2012).

À cet effet, la mélatonine a été rapportée pour prévenir le dysfonctionnement mitochondrial tel que revue dans (Paradies G et al., 2015). La mélatonine est un produit sécrété majoritairement par la glande pinéale situé dans l'épithalamus du cerveau. La molécule agit comme agent antioxydant et protège ainsi les fonctions bioénergétiques mitochondriales. La mélatonine agit aussi dans la régulation du cycle du sommeil. Le corps ciliaire et les glandes lacrymales en sécrètent également (Watson RR, 2012; Paredes SD et al., 2009;). Une étude exécutée sur *Xenopus laevis* (grenouille) a démontré qu'il y a présence de récepteurs à la mélatonine (Mel_{1a} et Mel_{1c}) dans l'épithélium, le stroma et l'endothélium cornéen et que la mélatonine jouerait un rôle dans la croissance, la maintenance et la réparation de la cornée (Wiechmann AF et Rada JA, 2003). Chez l'homme, le récepteur à la mélatonine Mel_{1a} a également été rapporté pour être exprimé dans les cellules endothéliales et dans les cellules basales épithéliales cornéennes (Meyer P et al., 2002). Ces récepteurs sont principalement investigués chez l'homme dans le RPE et la rétine en raison de son rôle dans le cycle circadien. La prévention du dysfonctionnement mitochondrial pourrait être une stratégie effective afin de contrer les maladies dégénératives comme la FECD (Paradies G et al., 2015).

D'ailleurs, une étude récente faite sur des yeux de crabes a montré que la prise d'une dose physiologique de mélatonine avant l'exposition à des UVA ou UVB diminuait de manière significative la production de ROS (Vargas MA et al., 2011). Il serait intéressant de voir si la prise de mélatonine pourrait avoir un effet bénéfique pour les patients atteints de la FECD. La mélatonine possède plusieurs fonctions antioxydantes telles que le piégeage de radicaux libres, la stimulation d'enzymes antioxydantes, l'augmentation de l'efficacité de la phosphorylation oxydative mitochondriale et la réduction de la fuite d'électrons ainsi que l'augmentation de l'efficacité d'autres antioxydants tel que revue dans (Reiter RJ et al., 2003). De plus, une étude effectuée sur des cellules cybrides comportant différents niveaux d'$ADNmt^{CD4977}$ a montré que la mélatonine prévient significativement l'augmentation de ROS généré dans les mitochondries en plus de prévenir la dépolarisation du $\Delta\psi m$ (Jou MJ et al., 2007). Chez l'humain, l'administration de la mélatonine est peu toxique, elle a d'ailleurs été donnée en traitement à des nouveau-nés afin de traiter un choc septique ou de l'asphyxie respiratoire (Gitto E et al., 2001; Fulia F et al., 2001). La mélatonine a également été administrée chez l'adulte en traitement à des maladies neurodégénératives liées à l'âge comme la maladie d'Alzeimer et n'a présenté

aucune toxicité aiguë ou chronique (Brusco LI et al., 1998; Cohen-Mansfield JS et al., 2000; Jahnke G et al., 1999; Jan JE et al., 2000; Seabra ML et al., 2000).

Ainsi, il serait intéressant d'investiguer davantage l'effet des UVA dans l'étiologie de la FECD. Ils doivent probablement exacerber l'état oxydatif des cellules de l'endothélium puisque ces dernières ont déjà une balance antioxydante qui tend vers l'oxydation, où les antioxydants sont régulés à la baisse (Jurkunas UV et al., 2010). De même, la sélection de cellules FECD fonctionnelles par la culture pourrait être utile pour la création d'endothélia autologues par génie tissulaire, ce qui constituerait une grande avancée dans le traitement de la pathologie étant donné que présentement le seul traitement définitif à la pathologie est la greffe de cornée allogénique.

6.7 Conclusions générales

Le travail présenté dans cette thèse permet de mieux comprendre l'effet de l'oxydation induite par les rayons UVA et endogène sur la cornée humaine. Nous avons d'abord exploré la présence des délétions mitochondriales ADNmt^{CD4977} et ADNmt^{3895} dans l'œil humain en les utilisant comme témoins de la présence de l'effet du stress oxydatif généré entre autres par les UVA. Nous avons identifié le stroma cornéen comme une structure étant principalement affectée. Étant donné que le stroma cornéen joue un rôle capital dans la réfraction de la lumière, l'investigation a été portée plus loin. Nous avons donc voulu comprendre les changements induits par les rayons UVA sur cette structure en créant notre propre modèle d'étude par génie tissulaire. En effet, il n'existait aucun type de modèle pour tester ces changements. Notre modèle d'étude sera d'ailleurs utile comme point de départ pour examiner les effets des différentes composantes de la lumière comme la HEV par exemple. Nous avons déterminé que l'exposition cumulée aux UVA menait à des phénotypes de photovieillissement et cela pourrait être responsable des changements observés avec l'âge dans la cornée comme son opacification et sa rigidification. Nous concluons donc que les UVA favorisent la formation des délétions ADNmt^{CD4977} et ADNmt^{3895} dans le stroma cornéen et que les UVA jouent un rôle néfaste dans la composition de l'ECM du stroma. L'identification de l'ADNmt^{3895} dans la rétine a également permis de souligner la présence de stress oxydatif dans cette structure et plus particulièrement dans la zone la macula.

Notre compréhension du stress oxydatif dans la cornée a été poussée plus loin en essayant de comprendre son implication dans la dystrophie cornéenne endothéliale de Fuchs. Nous avons déterminé que l'oxydation dans la pathologie mène à une hausse de l'ADNmt et à un raccourcissement télomérique qui a été démontré pour la première fois dans le cadre de la maladie. Nous avons également contribué aux connaissances scientifiques en montrant qu'il est possible de faire la sélection de cellules fonctionnelles FECD par la mise en

culture. Nous avons démontré que ces cellules sont semblables aux cellules saines en termes de quantité d'ADNmt et de son intégrité, de sensibilité à l'oxydation et de longueur télomérique.

Mes travaux de doctorat ont donc permis d'en apprendre davantage sur l'effet du stress oxydatif induit par les rayons UVA et endogène sur la cornée humaine. Ces connaissances permettent de comprendre davantage les mécanismes liés au photovieillissement ainsi que d'étendre les notions liées à la dystrophie cornéenne endothéliale de Fuchs en plus de permettre le développement d'endothélium cornéen autologues afin de traiter la FECD. Mes travaux constituent donc une fondation solide pour l'étude ultérieure de l'implication du stress oxydatif dans la cornée humaine.

Bibliographie (Chapitres 1 et 5)

Adamis AP, Filatov V, Tripathi BJ, Tripathi RC. Fuchs' endothelial dystrophy of the cornea. Surv Ophthalmol. 1993; 38(2):149–168.

Afshari NA, Li YJ, Pericak-Vance MA, Gregory S and Klintworth GK. (2009) Genome-wide linkage scan in fuchs endothelial corneal dystrophy. Invest Ophthalmol Vis Sci. 50(3):1093-1097

Albertini AM, Hofer M, Calos MP and Miller JH. (1982) On the formation of spontaneous deletions: the importance of short sequence homologies in the generation of large deletions. Cell. 29(2):319–328

Aldave AJ, Rayner SA, Salem AK, Yoo GL, Kim BT, Saeedian M, Sonmez B and Yellore VS. (2006) No pathogenic mutations identified in the COL8A1 and COL8A2 genes in familial Fuchs corneal dystrophy. Invest Ophthalmol Vis Sci. 47(9):3787–3790

Arnheim N., and Cortopassi, G. (1992). Deleterious mitochondrial DNA mutations accumulate in aging human tissues. Mutat. Res. 275:157–167

Atanassova N, Fusté JM, Wanrooij S, Macao B, Goffart S, Bäckström S, Farge G, Khvorostov I, Larsson NG, Spelbrink JN and Falkenberg M. (2011) Sequence-specific stalling of DNA polymerase γ and the effects of mutations causing progressive ophthalmoplegia. Hum Mol Genet. 20(6):1212-1223

Atalla LR, Sevanian A and Rao NA. (1988) Immunohistochemical localization of glutathione peroxidase in ocular tissue. Curr Eye Res. 7(10):1023–1027

Attardi G and Schatz G. (1988) Biogenesis of mitochondria. Annu. Rev. Cell Biol. 4:289-333

Avila F, Friguet B and Silva E. (2015) Photosensitizing Activity of Endogenous Eye Lens Chromophores: An Attempt to Unravel Their Contributions to Photo-Aging and Cataract Disease. Photochem Photobiol. 91(4):767-779

Avital G, Buchshtav M, Zhidkov I, Tuval Feder J, Dadon S, Rubin E, Glass D, Spector TD and Mishmar D. (2012) Mitochondrial DNA heteroplasmy in 892 diabetes and normal adults: role of acquired and inherited mutational patterns in 893 twins. Hum. Mol. Genet. 21(19):4214–4224

Baker MJ, Frazier AE, Gulbis JM and Ryan MT. (2007) Mitochondrial protein-import machinery: correlating structure with function. Trends Cell Biol. 17:456-464

Balasubramanian D. (2000) Ultraviolet radiation and cataract. J Ocul Pharmacol Ther. 16(3):285-297

Baier J, Maisch T, Maier M, Engel E, Landthaler M and Baumler W (2006) Singlet oxygen generation by UVA light exposure of endogenous photosensitizers. Biophys J. 91:1452–1459.

Barja G. (2004) Aging in vertebrates, and the effect of caloric restriction: a mitochondrial free radical production-DNA damage mechanism? Biol Rev Camb Philos Soc. 79(2):235-251

Battie C, Jitsukawa S, Bernerd F, Del Bino S, Marionnet C and Verschoore M. (2014) New insights in photoaging, UVA induced damage and skin types. Exp Dermatol. suppl 1:7-12

Barreau E, Brossas JY, Courtois Y and Treton JA. (1996) Accumulation of mitochondrial DNA deletions in human retina during aging. Invest Ophthalmol Vis Sci. 37(2):384–391

Beani JC. (2014) Ultraviolet A-induced DNA damage: role in skin cancer. Bull Acad Natl med. 198(2):273-295

Bergmanson JP, Sheldon TM and Goosey JD. (1999) Fuchs' endothelial dystrophy: a fresh look at an aging disease. Ophthalmic Physiol Opt. 19(3):210–222

Berneburg M, Gattermann N, Stege H, Grewe M, Vogelsang K, Ruzicka T and Krutmann J. (1997) Chronically ultraviolet-exposed human skin shows a higher mutation frequency of mitochondrial DNA as compared to unexposed skin and the hematopoietic system. Photochem Photobiol. 66(2):271-275

Berneburg M, Grether-Beck S, Kürten V, Ruzicka T, Brivibas K, Sies H and Krutmann J. (1999) Singlet oxygen mediates the UVA-induced generation of the photoaging-associated mitochondrial common deletion. J Biol Chem. 274(22):15345-15349

Berneburg M, Plettenberg H, Medve-Konig K, Pfahlberg A, Gers-Barlag H, Gefeller O and Krutmann J. (2004) Induction of the photoaging-associated mitochondrial common deletion in vivo in normal human skin. J Invest Dermatol. 122(5):1277–1283

Biswas S, Munier FL, Yardley J, Hart-Holden N, Perveen R, Cousin P, Sutphin JE, Noble B, Batterbury M, Kielty C, Hackett A, Bonshek R, Ridgway A, McLeod D, Sheffield VC, Stone EM, Schorderet DF and Black GC. (2001) Missense mutations in COL8A2, the gene encoding the alpha2 chain of type VIII collagen, cause two forms of corneal endothelial dystrophy. Hum Mol Genet. 10(21):2415–2423

Blasco MA. (2005) Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. Nat Rev Genet. 6(8):611-622

Boettner EA. (1967) Spectral Transmission of the eye. The University of Michigan. Ann Arbor, Michigan. 1-46

Bone RA, Landrum JT, Hime GW, Cains A and Zamor J. (1993) Stereochimistry of the human macular carotenoids. Invest Ophtalmol Vis Sci. 34(6):2033-40

Borrás T. (2014) The cellular and molecular biology of the iris, an overlooked tissue: the iris and pseudoexfoliation glaucoma. J Glaucoma. 23(8 Suppl 1):S39-42.

Bourne, W.M. (2010) Corneal endotheliume--past, present, and future. Eye Contact Lens 36, 310e314.

Bourne, WM. (1995) Fuchs' corneal dystrophy. In: Fraunfelder, FT.; Roy, FH., editors. Current Ocular Therapy. Philadelphia, PA: Saunders

Brand MD, Affourtit C, Esteves TC, Green K, Lambert AJ, Miwa S, Pakay JL and Parker N. (2004) Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins. Free Radic Biol Med. 37(6):755–767

Brubaker RF, Bourne WM, Bachman LA, McLaren JW. (2000) Ascorbic acid content of human corneal epithelium. Invest Ophthalmol Vis Sci. 41:1681–1683

Brusco LI, Márquez M and Cardinali DP. (2000) Melatonin treatment stabilizes chronobiologic and cognitive symptoms in Alzheimer's disease. Neuro Endocrinol Lett. 21(1):39-42

Bua E, Johnson J, Herbst A, Delong B, Mckenzie D, Salamat S and Aiken JM. (2006) Mitochondrial DNA-deletion mutations accumulate intracellularly to detrimental levels in aged human skeletal muscle fibers. Am J Hum Genet. 79(3):469–480

Bueno VB, Catalani LH, Daghastanli KRP, Cuccovia IM and Chaimovich H. (2010) Preparation of PVP hydrogel nanoparticles using lecithin vesicles. Quim Nova. 33(10):2983-2087

Burns RR, Bourne WM and Brubaker RF. (1981) Endothelial function in patients with cornea guttata. Invest Ophthalmol Vis Sci. 20(1):77–85

Cadet J and Douki T. (2011) Oxidatively generated damage to DNA by UVA radiation in cells and human skin. J Invest Dermatol. 131(5):1005-1007

Cadet J, Douki T and Ravanat JL. (1997) Artifacts associated with the measurement of oxidized DNA bases. Environ Health Perspect. 105(10):1034-1039

Cadet J, Douki T, Ravanat JL and Di Mascio P. (2009) Sensitized formation of oxidatively generated damage to cellular DNA by UVA radiation. Photochem Photobiol Sci. 8(7):903-911

Cadet J, Douki T and Ravanat JL. (2015) Oxidatively generated damage to cellular DNA by UVB and UVA radiation. Photochem Photobiol. 91(1):140-155

Cadet J, Sage E and Douki T. (2005) Ultraviolet radiation-mediated damage to cellular DNA. Mutat. Res. 571:3-17

Calvo S, Jain M, Xie X, Sheth SA, Chang B, Goldberger OA, Spinazzola A, Zeviani M, Carr SA and Mootha VK. (2006) Systematic identification of human mitochondrial disease genes through integrative genomics. Nat Genet. 38(5):576–582

Cantu D, Fulton RE, Drechsel DA and Patel M. (2011) Mitochondrial aconitase knockdown attenuates paraquat-induced dopaminergic cell death via decreased cellular metabolism and release of iron and H_2O_2. J Neurochem. 118(1)79–92

Carelli V, Maresca A, Caporali L, Trifunov S, Zanna C and Rugolo M. (2015) Mitochondria: Biogenesis and mitophagy balance in segregation and clonal expansion of mitochondrial DNA mutations. Int J Biochem Cell Biol. 63:21-24

Casper RF and Gladanac B. (2014) Circadian rhythm and its disruption: impact on reproductive function. Fertility and Sterility. 102(2):319-320

Chen T, He J, Huang Y and Zhao W. (2011) The generation of mitochondrial DNA large-scale deletions in human cells. J Hum Genet. 56(10):689–694

Chernoivanenko IS, Matveeva EA, Gelfand VI, Goldman RD and Minin AA. (2015) Mitochondrial membrane potential is regulated by vimentin intermediate filaments. FASEB J. 29(3):820-827

Chinnery PF, Johnson MA, Wardell TM, Singh-Kler R, Hayes C, Brown DT, Taylor RW, Bindoff LA and Turnbull DM. (2000) The epidemiology of pathogenicmitochondrial DNA mutations. Ann Neurol. 48:188–93

Chuang CY, Degendorfer G, Hammer A, Whitelock JM, Malle E and Davies MJ. (2014) Oxidation modifies the structure and function of the extracellular matrix generated by human coronary artery endothelial cells. Biochem J. 459(2):313-322

Cohen-Mansfield J, Garfinkel D and Lipson S. (2000) Melatonin for treatment of sundowning in elderly persons with dementia - a preliminary study. Arch Gerontol Geriatr. 31(1):65-76

Conrady CD, Joos ZP and Patel BC. (2016) Review: The Lacrimal Gland and Its Role in Dry Eye. J Ophthalmol. 2016:7542929 Epub

Cortopassi GA, Shibata D, Soong NW and Amheim N. (1992) A pattern of accumulation of a somatic deletion of mitochondrial DNA in aging human tissues. Proc Natl Acad Sci USA. 89(16):7370-7374

Coskun PE, Beal MF and Wallace DC, (2004) Alzheimer's brains harbor somatic mtDNA 925 control-region mutations that suppress mitochondrial transcription and replication. Proc Natl Acad Sci USA. 101(19):10726–10731

Crescitelli F, Dvorak CA, Eder DJ, Granda AM, Hamasaki D, Holmberg K, Hughes A, Locket NA, McFarland WN, Meyer DB, Muntz WRA, Munz FW, Olson EC and Reyer RW. (1977) Handbook of sensory physiology The Visual system in vertebrates. Springer-Verlag Berlin Heidelnerg New York. Volume VII/5

Cross HE, Maumenee AE and Cantolino SJ. (1971) Inheritance of Fuchs' endothelial dystrophy. Arch Ophthalmol. 85(3):268–272

Czarny P, Seda A, Wielgorski M, Binczyk E, Markiewicz B, Kasprzak E, Jiménez-García MP, Grabska-Liberek I, Pawlowska E, Blasiak J, Szaflik J and Szaflik JP. (2014) Mutagenesis of mitochondrial DNA in Fuchs endothelial corneal dystrophy. Mutat Res. 760:42-47

de Camargo MA, Paneto GG, de Mello AC, Martins JA, Barcellos W and Cicarelli RM. (2011) No relationship found between point heteroplasmy in mitochondrial DNA control region and age range, sex and haplogroup in human hairs. Mol Biol Rep. 38(2):1219-1223

Delamere NA. (1996) Ascorbic acid and the eye. Subcell Biochem. 25:313–329

de Souza-Pinto NC, Eide L, Hogue BA, Thybo T, Stevnsner T, Seeberg E, Klungland A and Bohr VA. (2001) Repair of 8-oxodeoxyguanosine lesions in mitochondrial dna depends on the oxoguanine dna glycosylase

(OGG1) gene and 8-oxoguanine accumulates in the mitochondrial dna of OGG1-defective mice. Cancer Res. 61(14):5378-5381

De Vusser K, Pieters N, Janssen B, Lerut E, Kuypers D, Jochmans I, Monbaliu D, Pirenne J, Nawrot T and Naesens M. (2015) Telomeres length, cardiovascular risk and arteriosclerosis in human kidneys: an observational cohort study. Aging. 7(10):1-10

DiMauro S, Schon EA, Carelli V and Hirano M. (2013) The clinical maze of mitochondrial neurology. Nat Rev Neurol.9(8):429–444

Dimauro S and Garone C. (2011) Metabolic disorders of fetal life: glycogenoses and mitochondrial defects of the mitochondrial respiratory chain. Semin Fetal Neonatal Med. 16(4):181-189

D'Orazio J, Jarrett S, Amaro-Ortiz A and Scott T. (2013) UV radiation and the skin. Int J Mol Sci. 14(6):12222-12248

do Rosário Marinho AN, de Moraes MR, Santos S and Ribeiro-Dos-Santos A. (2011) Human aging and somatic point mutations in mtDNA: A comparative study of generational differences (grandparents and grandchildren). Genet Mol Biol. 34(1):31-34

EBAA, 2011 Eye bank statistical report. Washington, DC; 2012

Emens JS and Burgess HJ. (2015) Effect of Light and Melatonin and Other Melatonin Receptor Agonists on Human Circadian Physiology. Sleep Med Clin. 10(4):435-453

Epifano C and Perez-Moreno M. (2012) Crossroads of integrins and cadherins in epithelia and stroma remodeling. Cell Adh Migr. 6(3):261-273

Farage MA, Miller KW, Elsner P and Maibach HI. (2008) Intrinsic and extrinsic factors in skin ageing: a review. Int. J. Cosmet. Sci. 30:87-95.

Faragher RGA, Mulholland B, Tuft SJ, Sandeman S and Khaw PT. (1997) Aging and the cornea. Br J Ophthalmol. 81(10):814-817

Ferré M, Bonneau D, Milea D, Chevrollier A, Verny C, Dolfus H, Ayuso C, Defoort S, Vignal C, Zanlonghi X, Charlin JF, Kaplan J, Odent S, Hamel CP, Procaccio V, Reynier P and Amati-Bonneau P. (2009) Molecular screening of 980 cases of suspected hereditary optic neuropathy with a report on 77 novel OPA1 mutations. Hum Mutat. 30(7):E692-705

Fisher GJ, Datta S,Wang Z, Li XY,Quan T,Chung JH, Kang S and Voorhees JJ. (2000) c-Jun dependent inhibition of cutaneous procollagen transcription following ultraviolet irradiation is reversed by all-trans retinoic acid. J. Clin. Invest. 106:663–670

Fisher GJ, Kang S, Varani J, Bata-Csorgo Z, Wan Y, Datta S and Voorhees JJ (2002) Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. Arch Dermatol. 138:1462–1470

Franks AT, Wang Q and Franz KJ. (2015) A multifunctional, light-activated prochelator inhibits UVA-induced oxidative stress. Bioorg Med Chem Lett. 25(21):4843-4847

Fridovich I. (1997) Superoxide anion radical (O2-.), superoxide dismutases, and related matters. J Biol Chem. 272(30):18515–18517

Friedberg EC, Walker GC and Siede W. (1995) DNA repair and mutagenesis. San Franscico. WH Freeman and compagny.

Friedman O. (2005) Changes associated with the aging face. Facial Plast Surg Clin North Am. 13(3):371-380

Fulia F, Gitto E, Cuzzocrea S, Reiter RJ, Dugo L, Gitto P, Barberi S, Cordaro S and Barberi I. (2001) Increased levels of malondialdehyde and nitrite/nitrate in the blood of asphyxiated newborns: reduction by melatonin. J Pineal Res. 31(4):343-349

Gaziev AI, Abdullaev S and Podlutsky A. (2014) Mitochondrial function and mitochondrial DNA maintenance with advancing age. Biogerontology. 15(5):417-438

Report-Graduit.com

Gendron SP, Bastien N, Mallet JD and Rochette PJ. (2013) The 3895-bp mitochondrial DNA deletion in the human eye: a potential involvement in corneal ageing and macular degeneration. Mutagenesis. 28(2):197-204

Gendron SP, Mallet JD, Bastien N and Rochette PJ. (2012) Mitochondrial DNA common deletion in the human eye: a relation with corneal aging. Mech Ageing Dev. 133(2-3):68-74

Gendron SP and Rochette PJ. (2015) Modifications in stromal extracellular matrix of aged corneas can be induced by ultraviolet A irradiation. Aging Cell. 14(3):433-442

Gendron SP, Thériault M, Proulx S, Brunette I and Rochette PJ. (2016) Restoration of mitochondrial integrity, telomere length and sensitivity to oxidation by in vitro culture of late stage Fuch's Endothelial Corneal Dystrophy cells. Manuscrit en préparation et sera sousmis à Journal of American Pathology

Gilkerson RW, Schon EA, Hernandez E et Davidson MM. (2008) Mitochondrial nucleoids maintain genetic autonomy but allow for functional complementation. J Cell Biol. 181(7):1117-1128

Gillbro JM et Olsson MJ (2011) The melanogenesis and mechanisms of skin-lightening agents--existing and new approaches. International journal of cosmetic science 33(3):210-221

Gitto E, Karbownik M, Reiter RJ, Tan DX, Cuzzocrea S, Chiurazzi P, Cordaro S, Corona G, Trimarchi G and Barberi I. (2001) Effects of melatonin treatment in septic newborns. Pediatr Res. 50(6):756-760

Gollnick PD, Armstrong RB, Saubert CW 4th, Piehl K and Saltin B. (1972) Enzyme activity and fiber composition in skeletal muscle of untrained and trained men. J Appl Physiol. 33(3):312–319

Gonzalez-Freire M, De cabo R, Bernier M, Scollott SJ, Fabbri E, Navas P and Ferrucci L. (2015) Reconsidering the role of mitochondria in aging. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 70(11): 1334-1342

Gottsch JD, Sundin OH, Liu SH, Jun AS, Broman KW, Stark WJ, Vito EC, Narang AK, Thompson JM and Magovern M. (2005) Inheritance of a novel COL8A2 mutation defines a distinct early-onset subtype of fuchs corneal dystrophy. Invest Ophthalmol Vis Sci. 46(6):1934–1939

Graziewicz MA, Sayer JM, Jerina DM and Copeland WC. (2004) Nucleotide incorporation by human DNA polymerase γ opposite benzo-[a]pyrene and benzo[c]phenanthrene diol epoxide adducts of deoxyguanosine and deoxyadenosine. Nucleic Acids Res. 32(1):397–405

Greiner MA, Burckart KA, Wagoner MD, Schmidt GA, Reed CR, Liaboe CA, Flamme-Wiese MJ, Zimmerman MB, Mullins RF, Kardon RH, Goins KM and Aldrich B. (2015) Regional assessment of energy-producing metabolic activity in the endothelium of donors corneas. Invest Ophthalmol Vis Sci. 56(5):2803-2810

Grossniklaus HE, Geisert EE and Nickerson JM. (2015) Introduction to the retina. Prog Mol Biol Transl Sci. 134:383-396

Hande MP, Balajee AS and Natarajan AT. (1997) Induction of telomerase activity by UV-irradiation in Chinese hamster cells. Oncogene. 15(14):1747-1752

Hara S, Hayashi R, Soma T, Kageyama T, Duncan T, Tsujikawa M and Nishida K. (2014) Identification and potential application of human corneal endothelial progenitor cells. Stem Cells Dev. 23:2190-201

Harbottle A and Birch-Machin MA. (2006) Real-time PCR analysis of a 3895 bp mitochondrial DNA deletion in nonmelanoma skin cancer and its use as a quantitative marker for sunlight exposure in human skin. Br J cancer. 94(12):1887-1893

Harbottle A, Maki J, Reguly B, Wittock R, Robinson K, Parr R and Birch-Machin MA. (2010) Real-time polymerase chain reaction analysis of a 3895-bp mitochondrial DNA deletion in epithelial swabs and its use as a quantitative marker for sunlight exposure in human skin. Br J Dermatol. 163(6)1291–1295

Hargrave S, Chu Y, Mendelblatt D, Mayhew E and Niederkorn J. (2003) Preliminary findings in corneal allograft rejection in patients with keratoconus. Am J Ophthalmol. 135(4):452-460

Hassell JR and Birk DE. (2010) The molecular basis of corneal transparency. Exp Eye Res. 91(2):326-335

Haydari MN, Perron MC, Laprise S, Roy O, Cameron JD, Proulx S and Brunette I. (2012) A short-term in vivo experimental model for Fuchs endothelial corneal dystrophy. Invest Ophthalmol Vis Sci. 53(10):6343-6354

Hejtmancik JF, Riazuddin SA, McGreal R, Liu W, Cvekl A and Shiels A. (2015) Lens biology and biochemistry. Prog Mol Biol Transl Sci. 134:169-201

Hejtmancik JF et Shiels A. (2015) Overview of the Lens. Prog Mol Biol Transl Sci. 134:119-127

Herbst A, Johnson CJ, Hynes K, McKenzie D and Aiken JM. (2013) Mitochondrial biogenesis drives a vicious cycle of metabolic insufficiency and mitochondrial DNA deletion mutation accumulation in aged rat skeletal muscle fibers. PLoS One. 8(3):e59006

He Y, Wu J, Dressman DC, Iacobuzio-Donahue C, Markowitz SD, Velculescu VE, Diaz LA Jr, Kinzler KW, Vogelstein B and Papadopoulos N. (2010) Heteroplasmic mitochondrial DNA mutations in normal and tumour cells. Nature. 464(7288):610-614

Hodson S et Miller F. (1976) The bicarbonate ion pump in the endothelium which regulates the hydration of rabbit cornea. J Physiol. 263(3):563-577

Holloszy JO. (1967) Biochemical adaptations in muscle. Effects of exercise on mitochondrial oxygen uptake and respiratory enzyme activity in skeletal muscle. J Biol Chem. 242(9):2278–2282

Hoon M, Okawa H, Della Santina L and Wong RO. (2014) Functional architecture of the retina: development and disease. Prog Retin Eye Res. 42:44-48

Hopfer U, Fukai N, Hopfer H, Wolf G, Joyce N, Li E and Olsen BR. (2005) Targeted disruption of Col8a1 and Col8a2 genes in mice leads to anterior segment abnormalities in the eye. FASEB J. 19(10):1232-1244

International Organization for Standardization. (2007) Optics and photonics - Spectral bands. ISO 20473

Iwamoto T and DeVoe AG. (1971) Electron microscopic studies on Fuchs'combined dystrophy. II. Anteriorportion of the cornea. Invest Ophthalmol. 10:29-40

Izzotti A, Longobardi M, Cartiglia C and Saccà SC. (2011) Mitochondrial damage in the trabecular meshwork occurs only in primary open-angle glaucoma and in pseudoexfoliative glaucoma. PLoS One. 6:e14567

Izzotti A, Saccà SC, Longobardi M and Cartiglia C. (2010) Mitochondrial damage in the trabecular meshwork of patients with glaucoma. Arch Ophthalmol. 128(6):724–730

Izzotti A, Saccà SC, Longobardi M and Cartiglia C. (2009) Sensitivity of ocular anterior chamber tissues to oxidative damage and its relevance to the pathogenesis of glaucoma. Invest Ophthalmol Vi. Sci 50(11):5251–5258.

Jahnke G, Marr M, Myers C, Wilson R, Travlos G and Price C. (1999) Maternal and developmental toxicity evaluation of melatonin administered orally to pregnant Sprague-Dawley rats. Toxicol Sci. 50(2):271-279

Jan JE, Hamilton D, Seward N, Fast DK, Freeman RD and Laudon M. (2000) Clinical trials of controlled-release melatonin in children with sleep-wake cycle disorders. J Pineal Res. 29(1):34-39

Jans J, Schul W, Sert YG, Rijksen Y, Rebel H, Eker AP, Nakajima S, van Steeg H, de Gruijl FR, Yasui A, Hoeijmakers JH and van der Horst GT. (2005) Powerful skin cancer protection by a CPD-photolyase transgene. Curr Biol. 15(2):105-115

Jastroch M, Divakaruni AS, Mookerjee S, Treberg JR and Brand MD. (2010) Mitochondrial proton and electron leaks. Essays Biochem. 47:(53-67)

Jayaprakash AD, Benson EK, Gone S, Liang R, Shim J, Lambertini L, Toloue MM, Wigler M, Aaronson SA and Sachidanandam R. (2015) Stable heteroplasmy at the single-cell level is facilitated by intercellular exchange of mtDNA. Nucleic Acid Res. 43(4):21777-21787

Johnston W, Karpati G, Carpenter S, Arnold D and Shoubridge EA. (1995) Late-onset mitochondrial myopathy. Ann Neurol. 37(1):16-23

Jornayvaz FR and Shulman GI. (2010) Regulation of mitochondrial biogenesis. Essays Biochem. 47:69-84

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

Jou MJ, Peng TI, Yu PZ, Jou SB, Reiter RJ, Chen JY, Wu HY, Chen CC and Hsu LF. (2007) Melatonin protects against common deletion of mitochondrial DNA-augmented mitochondrial oxidative stress and apoptosis. J Pineal Res. 43(4):389-403

Joyce NC. (2003) Proliferative capacity of the corneal endothelium. Prog Retin Eye Res. 22(3):359-389

Jurkunas UV, Bitar MS, Funaki T and Azizi B (2010) Evidence of oxidative stress in the pathogenesis of fuchs endothelial corneal dystrophy. Am J Pathol. 177(5):2278-2289

Jurkunas UV, Rawe I, Bitar MS, Zhu C, Harris DL, Colby K and Joyce NC. (2008) Decreased expression of peroxidoxins in Fuchs' endothelial dystrophy. Invest Ophtalmol Vis Sci. 49(7):2956-2963

Kammeyer A and Luiten RM. (2015) Oxidation events and skin aging. Ageing Res Rev. 21:26-29

Kasiviswanathan R, Gustafson MA, Copeland WC and Meyer JN. (2012) Human mitochondrial DNA polyerase γ exhibits potential for bypass and mutagenesis at UV-induced cyclobutane thymine dimers. J Biol Chem. 287(12): 9222-9229

Kayes, J. and Holmberg, A., (1964) The Fine structure of the cornea in Fuchs' endothelial dystrophy. Invest Ophthalmol. 3, 47e67

Keane PC, Kurzawa M, Blain PG and Morris CM. (2011) Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. Parkinsons Dis. 2011:716871

Kenney MC, Atilano SR, Boyer D, Chwa M, Chak G, Chinichian S, Coskun P, Wallace DC, Nesburn AB and Udar NS. (2010) Characterization of retinal and blood mitochondrial DNA from age-related macular degeneration patients. Invest Ophthalmol Vis Sci. 51(8):4289-4297

Kim JA, Ahn BN, Kong CS and Kim SK. (2013) The chromene sargachromanol E inhibits ultraviolet A-induced ageing of skin in human dermal fibroblasts. Br J Dermatol. 168(5):968-976

Kiyomoto BH, Tengan CH, Moraes CT, Oliveira AS and Gabbai AA. (1997) Mitochondrial DNA defects in Brazilian patients with chronic progressive external ophthalmoplegia. J Neurol Sci. 152(2):160-165

Kobayashi A, Fujiki K, Murakami A, Kato T, Chen LZ, Onoe H, Nakayasu K, Sakurai M, Takahashi M, Sugiyama K and Kanai A. (2004) Analysis of COL8A2 gene mutation in Japanese patients with Fuchs' endothelial dystrophy and posterior polymorphous dystrophy. Jpn J Ophthalmol. 48(3):195–198

Krachmer JH. (1985) Posterior polymorphous corneal dystrophy: a disease characterized by epithelial-like endothelial cells which influence management and prognosis. Trans Am Ophthalmol Soc. 83:413–475

Krishnan KJ, Harbottle A and Birch-Machin MA. (2004) The use of a 3895 bp mitochondrial DNA deletion as a marker for sunlight exposure in human skin. J Invest Dermatol. 123(6):1020-1024

Krishnan KJ, Reeve AK, Samuels DC, Chinnery PF, Blackwood JK, Taylor RW, Wanrooij S, Spelbrink JN, Lightowlers RN and Turnbull DM (2008) What causes mitochondrial DNA deletions in human cells? Nat Genet. 40(3):275–279

Lacis AA and Hansen JE. (1973) A parameterization for the absorption of solar radiation in the earth's atmosphere. J Atmos Sci. 31:118-133

Lagerström-Fermér M1, Olsson C, Forsgren Land Syvänen AC. (2001) Heteroplasmy of the human mtDNA control region remains constant during life. Am J Hum Genet. 68(5):1299-1301

Laing RA, Leibowitz HM, Oak SS, Chang R, Berrospi AR and Theodore J. (1981) Endothelial mosaic in Fuchs' dystrophy. A qualitative evaluation with the specular microscope. Arch Ophthalmol. 99(1):80-83

Lai T and Tang S. (2014) Cornea characterization using a combined multiphoton microscopy and optical coherence tomography system. Biomed Opt Express. 5(5):1494-1511

Lan CC, Ho PY, Wu CS, Yang RC and Yu HS. (2015) LED 590 nm photomodulation reduces UVA-induced metalloproteinase-1 expression via upregulation of antioxidant enzyme catalase. J Dermatol Sci. 78(2):125-132

Lezza AM, Mecocci P, Cormio A, Beal MF, Cherubini A, Cantatore P, Senin U and Gadaleta MN. (1999) Mitochondrial DNA 4977 bp deletion and OH8dG levels correlate in the brain of aged subjects but not Alzheimer's disease patients. FASEB J. 13(9):1083–1088

Li C, Yin T, Dong N, Dong F, Fang X, Qu YL, Tan Y, Wu H, Liu Z and Li W. (2011) Oxygen tension affects terminal differentiation of corneal limbal epithelial cells. J Cell Physiol. 226(9):2429-2437

Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser C, Krieger M, Scott M, Zipursky L, Darnell J. (2005) Biologie moléculaire de la cellule. De Boeck & Larcier s.a. 301-350

Loft S and Poulsen HE. (1996) Cancer risk and oxidative DNA damage in man. J Mol Med (Berl). 74(6):297–312

Logan P, Bernabeu M, Ferreira A and Burnier MN Jr. (2015) Evidence for the Role of Blue Light in the Development of Uveal Melanoma. J Ophthalmol. 2015:386986 Epub

Lo HL, Nakajima S, Ma L, Walter B, Yasui A, Ethell DW and Owen LB. (2005) Differential biologic effects of CPD and 6-4PP UV-induced DNA damage on the induction of apoptosis and cell-cycle arrest. BMC Cancer. 5:135

Lopresti AL, Hood SD and Drummond PD. (2013) A review of lifestyle factors that contribute to important pathways associated with major depression: Diet, sleep and exercise. J Affect Disord. 148(1):12–27

Ly JD, Grubb DR, Lawen A. (2003) The mitochondrial membrane potential ($\Delta \psi$ m) in apoptosis; an update. Apoptosis. 8(2):115-128

Lynch M, Koskella B and Schaack S. (2006) Mutation pressure and the evolution of organelle genomic architecture. Science 311(5768):1727–1730

Mallet JD and Rochette PJ. (2011) Ultraviolet light-induced cyclobutane pyrimidine dimers in rabbit eyes. Photochem Photobiol. 87(6):1363-1368

Mallet JD and Rochette PJ. (2013) Wavelength-dependent ultraviolet induction of cyclobutane pyrimidine dimers in the human cornea. Photochem Photobiol Sci. 12(8):1310-1318

Mammoto T and Ingber DE. (2010) Mechanical control of tissue and organ development. Development. 137(9):1407-1420

Mammucari C and Rizzuto R. (2010) Signaling pathways in mitochondrial dysfunction and aging. Mech Ageing Dev. 131(7-8):536–543

Marchitti SA, Chen Y, Thompson DC and Vasiliou V. (2011) Ultraviolet radiation: cellular antioxidant response and the role of ocular aldehyde dehydrogenase enzymes. Eye Contact Lens. 37(4):206-213

Marionnet C, Grether-Beck S, Seité S, Marini A, Jaenicke T, Lejeune F, Bastien P, Rougier A, Bernerd F and Krutmann J. (2011) A broad-spectrum sunscreen prevents UVA radiation-induced gene expression in reconstructed skin in vitro and in human skin in vivo. Exp Dermatol. 20(6):477-482

Mathur S, Glogowska A, McAvoy E, Righolt C, Rutherford J, Willing C, Banik U, Ruthirakuhan M, Mai S and Garcia A. (2014) Three-dimensional quantitative imaging of telomeres in buccal cells identifies mild, moderate, and severe Alzheimer's disease patients. J Alzheimers Dis. 39(1):35-48

Matsuba M, Hutcheon AE and Zieske JD (2011) Localization of thrombospondin-1 and myofibroblasts during corneal wound repair. Exp Eye Res. 93(4):534–540

Maurice DM. (1984) The cornea and the sclera. In the eye. Vol1B, Davidson H editor. London Academic. 1-158

McGowan SL, Edelhauser HF, Pfister RR and Whikehart DR. (2007) Stem cell markers in the human posterior limbus and corneal endothelium of unwounded and wounded corneas. Mol Vis. 13:1984-2000

McFarland R, Taylor RW and Turnbull DM. (2010) A neurological perspective on mitochondrial disease. Lancet Neurol. 9:829–840

Meek KM and Knupp C. (2015) Corneal structure and transparency. Prog Retin Eye Res. 49:1-16
Meij JT, Carlson EC, Wang L, Liu CY, Jester JV, Birk DE and Kao WW. (2007) Targeted expression of a lumican transgene rescues corneal deficiencies in lumican-nullmice. Mol Vis. 13:2012–2018
Meyer P, Pache M, Loeffler KU, Brydon L, Jockers R, Flammer J, Wirz-Justice A and Savaskan E. (2002) Melatonin MT-1-receptor immunoreactivity in the human eye. Br J Ophthalmol. 86(9):1053-1057
Mezentsev A, Nikolaev A and Bruskin S. (2014) Matrix metalloproteinases and their role in psoriasis. Gene. 540(1):1-10
Michelacci YM. (2003) Collagens and proteoglycans of the corneal extracellular matrix. Braz J Med Biol Res. 36(8):1037-1046
Mishra P, Carelli V, Manfredi G and Chan DC. (2014) Proteolytic cleavage of Opa1 stimulatesmitochondrial inner membrane fusion and couples fusion to oxidative phos-phorylation. Cell Metab. 19:630-641
Mok JW, Kim HS, Joo CK. Q455V mutation in COL8A2 is associated with Fuchs' corneal dystrophy in Korean patients. Eye. 2009; 23:895–903.
Moraes CT, Sciacco M, Ricci E, Tengan CH, Hao H, Bonilla E, Schon EA and DiMauro S. (1995) Phenotype-genotype correlations in skeletal muscle of patients with mtDNA deletions. Muscle Nerve. 3:S150–S153
Moore L, Fan D, Basu R, Kandalam V and Kassiri Z. (2012) Tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs) in heart failure. Heart Fail Rev. 17(4-5):693-706
Mouret S, Forestier A and Douki T. (2012) The specificity of UVA-induced DNA damage in human melanocytes. Photochem Photobiol Sci. 11(1):155-162
Müftüoglu M, Elibol B, Dalmizrak O, Ercan A, Kulaksiz G, Ogüs H, Dalkara T and Ozer N. (2004) Mitochondrial complex I and IV activities in leukocytes from patients with parkin mutations. Mov Disord. 19(5):544-48
Murphy MP. (2009) How mitochondria produce reactive oxygen species. Biochem J. 417(1):1–13
Nagasaki T and Zhao J (2003) Centripetal movement of corneal epithelial cells in the normal adult mouse. Invest Ophthalmol Vis Sci. 44(2):558-66
Nakayasu K, Tanaka M, Konomi H and Hayashi T. (1986) Distribution of types I, II, III, IV and V collagen in normal and keratoconus corneas. Ophthalmic Res. 18(1):1-10
Naksuriya O and Okonogi S. (2015) Comparison and combination effects on antioxidant power of curcumin with gallic acid, ascorbic acid, and xanthone. Drug Discov Ther. 9(2):136-141
Narayanan DL, Saladi RN and Fox JL. (2010) Ultraviolet radiation and skin cancer. Int J Dermatol. 49(9):978-986
Naue J, Hörer S, Sänger T, Strobl C, Hatzer-Grubwieser P, Parson W and Lutz-Bonengel S. (2015) Evidence for frequent and tissue-specific sequence heteroplasmy in human mitochondrial DNA. Mitochondrion. 20:82-94
Nelson AR, Fingleton B, Rothenberg ML, Matrisian LM (2000) Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. J Clin Oncol. 18:1135–1149
Newman LA, Walker MT, Brown RL, Cronin TW and Robinson PR. (2003) Melanopsin forms a functional short-wavelength photopigment. Biochemistry. 42(44);12734-12738
Ni S, Yu Y, Zhang Y, Wu W, Lai K and Yao K. (2013) Study of oxidative stress in human lens epithelial cells exposed to 1.8 GHz radiofrequency fields. PLoS One. 8(8):e72370
Nonaka I. (1992) Mitochondrial diseases. Curr Opin Neurol Neurosurg. 5(5):622-632
Osborne NN, Kamalden TA, Majid AS, del Olmo-Aguado S, Manso AG and JiD. (2010) Light effects on mitochondrial photosensitizers in relation to retinal degeneration. Neurochem Res. 35(12):2027-2034

Pal R, Ramdzan ZM, Kaur S, Duquette PM, Marcotte R, Leduy L, Davoudi S, Lamarche-Vane N, Iulianella A et Nepveu A. (2015) CUX2 protein functions as an accessory factor in the repair of oxidative DNA damage. J Biol Chem. 290(37):22520-22531

Paradies G, Paradies V, Ruggiero FM and Petrosillo G. (2015) Protective role of melatonin in mitochondrial dysfunction and related disorders. Arch Toxicol. 89(6):923-939

Paredes SD, Korkmaz A, Manchester LC, Tan DX and Reiter RJ. (2009) Phytomelatonin: a review. J Exp Bot. 60(1):57-69

Park M, LI Q, Shcheynikov N, Zeng W and Muallem S. (2004) NaBAC1 is a ubiquitous electrogenic Na+ - coupled borate transporter essential for cellular boron homeostasis and cell growth and proliferation. Mol Cell. 16(3);331-341

Patel M, Day BJ, Crapo JD, Fridovich I and McNamara JO. (1996) Requirement for superoxide in excitotoxic cell death. Neuron. 16(2):345–355.

Pawlas N, Plachetka A, Kozlowska A, Mikolajczyk A, Kasperczyk A, Dobrakowski M and Kaperczyk S (2015). Telomere length, telomerase expression, and oxidative stress in leads smelters. Toxicol Ind Health. pii: 0748233715601758

Perluigi M, Di Domenico F, Giorgi A, Schininà ME, Coccia R, Cini C, Bellia F, Cambria MT, Cornelius C, Butterfield DA and Calabrese V. (2010) Redox proteomics in aging rat brain: involvement of mitochondrial reduced glutathione status and mitochondrial protein oxidation in the aging process. J Neurosci Res. 88(16):3498-3507

Pfleger J, He M and Abdellatif M. (2015) Mitochondrial complex II is a source of the reserve respiratory capacity that is regulated by metabolic sensors and promotes cell survival. Cell Death Dis. 6:e1835

Pinz KG, Shibutani S and Bogenhagen DF. (1995) Action of mitochondrial DNA polymerase γ at sites of base loss or oxidative damage. J Biol Chem. 270(16):9202–9206

Pirie A. (1946) Ascorbic acid content of cornea. Biochem. J. 40:96–100

Pitceathly RDS, Rahman S and Hanna MG. (2012) Single deletions in mitochondrial DNA - Molecular mechanisms and disease phenotypes in clinical practice. Neuromuscul Disord. 22(7):577-586

Plikus MV, Van Spyk EN, Pham K, Geyfman M, Kumar V, Takahashi JS and Andersen B. (2015) The circadian clock in skin: implications for adult stem cells, tissues regeneration, cancer, aging and immunity. J Biol Rhythms. 30(3):163-182

Popadin K, Safdar A, Kraytsberg Y and Khrapko K. (2014) When man got his mtDNA deletions? Aging Cell. 13(4):579-582

Pourzand C, Watkin RD, Brown JE, Tyrell RM. (1999) Ultraviolet A radiation induces immediate release of iron in human primary skin fibroblasts: The role of ferritin. Proc Natl Acad Sci USA 96:6751-6756

Quan C, Cho MK, Perry D and Quan T. (2015) Age-associated reduction of cell spreading induces mitochondrial DNA common deletion by oxidative stress in human skin dermal fibroblasts: implication for human skin connective tissue aging. J Biomed Sci. 22:62

Ramos T, Scott D and Ahmad S. (2015) An Update on Ocular Surface Epithelial Stem Cells: Cornea and Conjunctiva. Stem cells international 2015:601731

Ratner BD, Hoffman AS, Schoen F, Lemons J (2012) Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine. Academic Press

Rajasimha HK, Chinnery PF and Samuels DC. (2008) Selection agaisnt pathogenic mtDNA mutations in a stem cell leads to the loss of the 3243A-->G mutation in blood. AM J Hum Genet. 82(2):333-343

Reeve AK, Krishnan KJ, Elson JL, Morris CM, Bender A, Lightowlers RN and Turnbull DM. (2008) Nature of mitochondrial DNA deletions in substantia nigra neurons. Am J Hum Genet. 82(1):228–235

Reiter RJ, Tan DX, Mayo JC, Sainz RM, Leon J and Czarnocki Z. (2003) Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans. Acta Biochim Pol. 50(4):1129-1146

Riazuddin SA, Eghrari AO, Al-Saif A, Davey L, Meadows DN, Katsanis N and Gottsch JD. (2009) Linkage of a mild late-onset phenotype of Fuchs corneal dystrophy to a novel locus at 5q33.1-q35.2. Invest Ophthalmol Vis Sci. 50(12):5667-5671

Riazuddin SA, Zaghloul NA, Al-Saif A, Davey L, Diplas BH, Meadows DN, Eghrari AO, Minear MA, Li YJ, Klintworth GK, Afshari N, Gregory SG, Gottsch JD and Katsanis N. (2010) Missense mutations in TCF8 cause late-onset Fuchs corneal dystrophy and interact with FCD4 on chromosome 9p. Am J Hum Genet. 86(1):45-53

Richter C, Park JW and Ames BN. (1988) Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. Proc Nat Acad Sci USA 85(17):6465–6467

Ringvold A, Anderssen E and Kjonniksen I. (2000) Distribution of ascorbate in the anterior bovine eye. Invest Ophthalmol Vis Sci. 41(1):20–23

Rizzuto R, De Stefani D, Raffaello A and Mammucari C. (2012) Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. Nat Rev Mol Cell Biol. 13(9):566-578

Rose G, Romeo G, Dato S, Crocco P, Bruni AC, Hervonen A, Majamaa K, Sevini F, Franceschi C and Passarino G; GEnetics of Healthy Ageing Project Consortium. (2010) Somatic point mutations in mtDNA control region are influenced by genetic background and associated with healthy aging: a GEHA study. PLoS One. 5(10):e13395

Rosenblum P, Stark WJ, Maumenee IH, Hrist LW and Maumenee AE. (1980) Hereditary Fuch's Dystrophy. Am J Ophthalmol. 90(4):455-462

Rossignol R, Malgat M, Mazat JP and Letellier T. (1999) Threshold effect and tissue specificity. Implication for mitochondrial cytopathies. J Biol Chem. 274(47):33426-33432

Ruhanen H, Borrie S, Szabadkai G,Tyynismaa H, Jones AWE, Kang D, Taanman JW and Yasukawa T. (2010) Mitochondrial single-stranded DNA binding protein is required for maintenance of mitochondrial DNA and 7S DNA but is not required for mitochondrial nucleoid organisation. Biochim Biophys Acta. 1803(8):931-939

Samuels DC, Schon EA and Chinnery PF. (2004) Two direct repeats cause most human mtDNA deletions. Trends Genet. 20(9):393–398

Scharffetter-Kochanek K, Brenneisen P, Wenk J, Herrmann G, Ma W, Kuhr L, Meewes C and Wlaschek M. (2000) Photoaging of the skin from phenotype to mechanisms. Exp. Gerontol. 35(3):307-316

Scharffetter-Kochanek K, Wlaschek M, Brenneisen P, Schauen M, Blaudschun R and Wenk J. (1997) UV-induced reactive oxygen species in photocarcinogenesis and photoaging. Biol Chem. 378(11):1247-1257

Schmidt JC and Cech TR. (2015) Human telomerase: biogenesis, trafficking, recruitment, and activation. Genes Dev. 29(11):1095-1105

Schon EA and Gilkerson RW. (2010) Functional complementation of mitochondrial DNAs: Mobilizing mitochondrial genetics against dysfunction. Biochim Biophys Acta. 1800:245-249

Schon EA, Dimauro S and Hirano M. (20120) Human mitochondrial DNA: roles of inherited and somatic mutations. Nature Reviews Genetics. 13:878–890

Schrier SA and Falk MJ. (2011) Mitochondrial Disorders and The Eye. Curr Opin Ophthalmol. 22(5):325-331

Schwartz MA and DeSimone DW. (2008) Cell adhesion receptors in mechanotransduction. Curr Opin Cell Biol. 20(5):551-556

Scott TL, Rangaswamy S, Wicker CA and Izumi T. (2014) Repair of oxidative DNA damage and cancer: recent progress in DNA base excision repair. Antioxid Redox Signal. 20(4):708-726

Seabra ML , Bignotto M, Pinto LR Jr and Tufik S. (2000) Randomized, double-blind clinical trial, controlled with placebo, of the toxicology of chronic melatonin treatment. J Pineal Res. 29(4):193-200

Sebastián C, Herrero C, Serra M, Lloberas J, Blasco MA and Celada A (2009) Telomere shortening and oxidative stress in aged macrophages results in impaired STAT5a phosphorylation. J Immunol. 183(4):2356-2364

Sen D, Patel G and Patel SS. (2016) Homologous DNA strand exchange activity of the human mitochondrial DNA helicase TWINKLE. Nucleic Acids Res. gkw098 Epub ahead of print

Shen J, Wan J, Huff C, Fang S, Lee JE and Zhao H. (2016) Mitochondrial DNA 4977-base pair common deletion in blood leukocytes and melanoma risk. Pigment Cell Melanoma Res. 29(3):372-378

Snell RS and Lemp MA. (1998) Clinical Anatomy of the eye, Second Edition. Blackwell Science. p1-430

Squires S, Coates JA, Goldberg M, Toji LH, Jackson SP, Clarke DJ and Johnson RT. (2004) p53 prevents the accumulation of double-strand DNA breaks at stalled-replication forks induced by UV in human cells. Cell cycle. 3(12):1543-1557

Streck EL, Goncalves CL, Furlanetto CB, Scaini G, Dal-Pizzol F and Quevedo J. (2014): Mitochondria and the central nervous system: Searching for a pathophysiological basis of psychiatric disorders. Rev Bras Psiquiatr. 36(2):156–167

Stefano GB and Kream RM. (2016) Mitochondrial DNA heteroplasmy in human health and disease. Biomed Rep. 4(3):259-262

Stroncek JD, Grant BS, Brown MA, Povsic TJ, Truskey GA and Reichert WM. (2009) Comparison of endothelial cell phenotypic markers of late-outgrowth endothelial progenitor cells isolated from patients with coronary artery disease and healthy volunteers. Tissue Eng Part A. 15:3473-86

Sun B, Wang Y, Kota K, Shi Y, Motlak S, Makambi K, Loffredo CA, Shields PG, Yang Q, Harris CC and Zheng YL. (2015) Telomere length variation: A potential new telomere biomarker for lung cancer risk. Lung Cancer. 88(3):297-303

Sun L, Tan R, Xu J, LaFace J, Gao Y, Xiao Y, Attar M, Neumann C, Li GM, Su B, Liu Y, Nakajima S, Levine AS and Lan L. (2015) Targeted DNA damage at individual telomeres disrupts their integrity and triggers cell death. Nucleic Acids Res. 43(13):6334-6347

Sundin OH, Broman KW, Chang HH, Vito EC, Stark WJ and Gottsch JD. (2006) A common locus for lateonset Fuchs corneal dystrophy maps to 18q21.2-q21.32. Invest Ophthalmol Vis Sci. 47:3919–3926

Sundin OH, Jun AS, Broman KW, Liu SH, Sheehan SE, Vito EC, Stark WJ and Gottsch JD. (2006) Linkage of late-onset Fuchs corneal dystrophy to a novel locus at 13pTel-13q12.13. Invest Ophthalmol Vis Sci. 47:140–145.

Taylor RW, Barron MJ, Borthwick GM, Gospel A, Chinnery PF, Samuels DC, Taylor GA, Plusa SM, Needham SJ, Greaves LC, Kirkwood TB and Turnbull DM. (2003) Mitochondrial DNA mutations in human colonic crypt stem cells. J Clin Invest. 112(9):1351–1360

Tchirkov A and Lansdorp PM. (2003) Role of oxidative stress in telomere shortening in cultured fibroblasts from normal individuals and patients with ataxia-telangiectasia. Hum mol Genet. 12(3):227-232

Tewari A, Sarkany RP and Young AR (2012) UVA1 induces cyclobutane pyrimidine dimers but not 6-4 photoproducts in human skin in vivo. J. Invest. Dermatol. 132:394–400.

Tomkinson AE, Bonk RT, Kim J, Bartfeld N and Linn S. (1990) Mammalian mitochondrial endonuclease activities specific for ultraviolet irradiated DNA. Nucleic Acids Res. 18(4):929–935

Tourtas T, Laaser K, Bachmann BO, Cursiefen C and Kruse FE. (2012) Descemet membrane endothelial keratoplasty versus descemet stripping automated endothelial keratoplasty. Am J Ophthalmol. 153(6):1082-1090

Tuft SJ and Coster DJ. (1990) The corneal endothelium. Eye (Lond). 4(Pt 3):389–424

Tyrka AR, Parade SH, Price LH, Kao HT, Porton B, Philip NS, Welch ES and Carpenter LL. (2016) Alterations of Mitochondrial DNA Copy Number and Telomere Length With Early Adversity and Psychopathology. Biol Psychiatry. 79:78-86

Valavanidis A, Vlachogianni T and Fiotakis C. (2009) 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev. 27(2):120-139.

Vandersee S, Beyer M, Lademann J and Darvin ME. (2015) Blue-violet light irradiation dose dependently decreases carotenoids in human skin, which indicates the generation of free radicals. Oxid Med Cell Longev. 2015:579675

Varani J, Spearman D, Perone P, Fligiel SE, Datta SC, Wang ZQ, Shao Y, Kang S, Fisher GJ and Voorhees JJ. (2001) Inhibition of type I procollagen synthesis by damaged collagen in photoaged skin and by collagenase-degraded collagen in vitro. Am J Pathol. 158(3):931-942

Vargas MA, Geihs MA, Maciel FE, Cruz BP, Nery LE and Allodi S. (2011) The effects of UV radiation on the visual system of the crab Neohelice granulata: a protective role of melatonin. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol. 154(4):427-434

Velásquez M, Santander IP, Contreras DR, Yáñez J, Zaror C, Salazar RA, Pérez-Moya M and Mansilla HD. (2014) Oxidative degradation of sulfathiazole by Fenton and photo-Fenton reactions. J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng. 49(6):661-670

Vile GF and Tyrrell RM. (1995) UVA radiation-induced oxidative damage to lipids and proteins in vitro and in human skin fibroblasts is dependent on iron and singlet oxygen. Free Radic Biol Med. 18(4):721-730

Vile GF and Tyrrell RM. (1993) Oxidative stress resulting from ultraviolet A irradiation of human skin fibroblasts leads to a heme oxygenase-dependent increase in ferritin. J Biol Chem. 268(20):14678-14681

Vithana EN, Morgan PE, Ramprasad V, Tan DT, Yong VH, Venkataraman D, Venkatraman A, Yam GH, Nagasamy S, Law RW, Rajagopal R, Pang CP, Kumaramanickevel G, Casey JR and Aung T. (2008) SLC4A11 mutations in Fuchs endothelial corneal dystrophy. Hum Mol Genet. 17(5):656–666.

Volland S, Esteve-Rudd J, Hoo J, Yee C and Williams DS. (2015) A comparison of some organizational characteristics of the mouse central retina and the human macula. PLoS One. 10(4):e0125631

Wallace DC. (1999) Mitochondrial diseases in man and mouse. Science. 283(5407):1482–1488

Wallace DC, Lott MT, Lezza AM, Seibel P, Voljavec AS and Shoffner JM. (1990) Mitochondrial DNA mutations associated with neuromuscular diseases: analysis and diagnosis using the polymerase chain reaction. Pediatr Res. 28(5):525-528

Wang B, Shen C, Zhang L, Qi L, Yao L, Chen J, Yang G, Chen T and Zhang Z. (2015) Dark adaptation-induced change in rod, cone and intrinsically photosensitive retinal ganglion cell (ipRGC) sensitivity differentially affect the pupil light response (PLR) Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 253:1997-2005

Wang P, Liu YL, Han L, Zhao FL, Guo F, Wang XA and Lu YM. (2013) Mitochondria DNA 4977 bp common deletion in peripheral whole blood from healthy donors. Biomed Environ Sci. 26(12):990-993

Wang Y, Chen H, Wang W, Wang R, Liu ZL, Zhu W and Lian S. (2014) N-terminal 5-mer peptide analog P165 of amyloid precursor protein inhibits UVA-induced MMP-1 expression by suppressing the MAPK pathway in human dermal fibroblasts. Eu J Pharmacol. 734:1-8

Wang Y, Michikawa Y, Mallidis C, Bai Y, Woodhouse L, Yarasheski KE, Miller CA, Askanas V, Engel WK, Bhasin S and Attardi G. (2001) Muscle-specific mutations accumulate with aging in critical human mtDNA control sites for replication. Proc Natl Acad Sci USA. 98(7):4022-4027

Waring GO 3rd, Bourne WM, Edelhauser HF and Kenyon KR. (1982) The corneal endothelium. Normal and pathologic structure and function. Ophthalmology. 89:531–590

Waring GO 3rd, Rodrigues MM and Laibson PR. (1978) Corneal dystrophies. II. Endothelial dystrophies. Surv Ophthalmol. 23(3):147–168

Watson RR. (2012) Melatonin in the promotion of health second edition. CRC Press Taylor & Francis Group. USA. 1-582

Wei, Y.H., and Lee, H.C. (2002). Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and impairment of antioxidant enzymes in aging. Exp Biol Med (Maywood) 227(9):671–682

Widel M. (2012) Bystander effect induced by UV radiation; why should we be interested? Postepy Hig Med Dosw (Online). 66:828-837

Wiechmann AF and Rada JA. (2003) Melatonin receptor expression in the cornea and sclera. Exp Eye Res. 77(2):219-225

Wilson SE, Bourne WM. (1988) Fuchs' dystrophy. Cornea. 7:2–18

Wilson SE, Bourne WM, O'Brien PC and Brubaker RF. (1988) Endothelial function and aqueous humor flow rate in patients with Fuchs' dystrophy. Am J Ophthalmol. 106(3):270–278

Wilson SE, Mohan RR, Mohan RR, Ambrósio R Jr, Hong J and Lee J. (2011) The corneal wound healing response: cytokine-mediated interaction of the epithelium, stroma, and inflammatory cells. Prog Retin Eye Res. 20(5):625-637

Wiseman H and Halliwell B. (1996) Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. Biochem. J. 313:17-29

Wlaschek M, Briviba K, Stricklin GP, Sies H and Scharffetter-Kochanek K. (1995) Singlet oxygen may mediate the ultraviolet A-induced synthesis of interstitial collagenase. J Invest Dermatol. 104(2):104-198

Wondrak GT, Jacobson MK and Jacobson EL. (2006) Endogenous UVA-photosensitizers: mediators of skin photodamage and novel targets for skin photoprotection. Photochem Photobiol Sci. 5(2):215–237

Wondrak GT, Roberts MJ, Cervantes-Laurean D, Jacobson MK, Jacobson EL. (2003) Proteins of the extracellular matrix are sensitizers of photo-oxidative stress in human skin cells. J Invest Dermatol. 121(3):578-586

World Health Organization, The known health effects of UV, http://www.who.int/uv/faq/uvhealtfac/en/, accédé le 4 juin 2016

Wu S, Jin C, Lu X, Yang J, Liu Q, Qi M, Lu S, Zhang L and Cai Y. (2014) Bystander effect induced by UVC radiation in Chinese hamster V79 cells. Photochem Photobiol. 90(4):837-844

Yaar M and Gilchrest BA (2007) Photoageing: mechanism, prevention and therapy. Br J Dermatol. 157:874–887

Yang HY and Lee TH. (2015) Antioxidant enzymes as redox-based biomarkers: a brief review. BMB Rep. 48(4):200-208

Yanoff M and Fine BS. (1996) Ocular Pathology. Barcelona: Mosby-Wolfe. p. 276-278

Yoneda M, Chomyn A, Martinuzzi A, Hurko O and Attardi G. (1992) Marked replicative advantage of human mtDNA carrying a point mutation that causes the MELAS encephalomyopathy. Proc Natl Acad Sci USA 89(23):11164-11168

Report-Gratuit.com

Yoshida A, Shiotsu-Ogura Y, Wada-Takahashi S, Takahashi SS, Toyama T and Yoshino F. (2015) Blue light irradiation-induced oxidative stress in vivo via ROS generation in rat gingival tissue. J Photochem Photobiol B. 151:48-53

Yu DY and Cringle SJ. (2005) Retinal degeneration and local oxygen metabolism. Exp Eye Res. 80(6):745–751

Zelko IN, Mariani TJ and Folz RJ. (2002) Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. Free Radic Biol Med. 33(3):337–349

Zglinicki TV. (2002) Oxidative stress shortens telomeres. Trends Biochem Sci. 27(7):339-344

Zhang J and Patel DV. (2015) The pathophysiology of Fuchs' endothelial dystrophy - A review of molecular and cellular insights. Exp Eye Res. 130:97-105

Zhang X, Igo Jr RP, Fondran J, Mootha VV, Oliva M, Hammersmith K, Sugar A, Lass JH and Iyengar SK for the Fuch's Genetics Multi-Center Group. (2013) Association of smoking and other risk factors with Fuch's endothelial corneal dystrophy severity and corneal thickness. Invest Ophthalmol Vis Sci. 54(8):5829-5835

Zhan Y, Song C, Karlsson R, Tillander A, Reynolds CA, Pedersen NL and Hägg S. (2015) Telomere length shortening and Alzheimer Disease-A mendelian randomization study. JAMA Neurol. 72(10):1202-1203

Zhang Y and Wildsoet CF. (2015) RPE and Choroid Mechanisms Underlying Ocular Growth and Myopia. Prog Mol Biol Transl Sci. 134:221-240

Zhuo S, Zhu X, Chen J and Xie S. (2013) Quantitative biomarkers of human skin photoaging based on intrinsic second harmonic generation signal. Scanning. 35(4):273-276

Annexe 1: Implication of ultraviolet light in the etiology of uveal melanoma: A review

(Photochem Photobiol 2014 Jan-Fev 90(1):15-21

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

A1.1 Résumé en français

Le mélanome uvéal est le cancer intraoculaire le plus fréquent et la deuxième forme de mélanome la plus commune. Il y a présence de métastases dans la moitié des patients affectés et le pronostic est habituellement mauvais. Bien que l'exposition aux rayons ultraviolets (UV) ait été démontrée comme un facteur de risque pour le mélanome de la peau, le rôle des radiations UV dans l'étiologie du mélanome uvéal est encore matière à controverse. Nous avons comparé les données épidémiologiques et génétiques du rôle potentiel des radiations UV dans l'induction du mélanome uvéal avec les données disponibles pour le mélanome cutané. Même si les gènes fréquemment mutés dans le mélanome cutané (*e.g. BRAF*) diffèrent que ceux retrouvés dans le mélanome uvéal (*i.e. GNAQ, GNA11*), leur patron de mutation comporte de fortes similitudes. De plus, nous apportons de nouveaux résultats démontrant que *RAC1*, un gène récemment retrouvé pour porter une mutation signature de l'exposition UV dans les mélanomes cutanés, est également muté dans les mélanomes uvéaux. Cet article passe en revue les différents travaux effectués dans la dernière décennie sur le mélanome uvéal de manière à comprendre son étiologie en plus de discuter de nouvelles avenues mettant en lumière le rôle potentiel de l'exposition aux rayons UV dans l'induction du mélanome uvéal.

A1.2 Article

Implication of ultraviolet light in the etiology of uveal melanoma: a review

Justin D. Mallet, Sébastien P. Gendron, Marie-Catherine Drigeard Desgarnier and Patrick J. Rochette*

* Axe Médecine Régénératrice, Centre de Recherche FRQS du CHU de Québec, Hôpital du Saint-Sacrement, Québec, Canada

*Centre LOEX de l'Université Laval, QC, Canada

*Département d'Ophtalmologie et ORL - Chirurgie Cervico-faciale, Faculté de Médecine, Université Laval, QC, Canada

* Corresponding author at:

Dr. Patrick J. Rochette

Loex/CUO-Recheche

Centre hospitalier affilié universitaire de Québec

Hôpital du Saint-Sacrement, Bureau H2-10

1050 Chemin Sainte-Foy, Québec, QC, Canada, G1S 4L8

E-mail address: Patrick.rochette@orlo.ulaval.ca

A1.2.1 Résumé (anglais)

Uveal melanoma is the most frequent intraocular cancer and the second most common form of melanoma. It metastasizes in half of the patients and the prognostic is poor. Although ultraviolet (UV) radiation is a proven risk factor for skin melanoma, the role of UV light in the etiology of uveal melanoma is still contradictory. We have compared epidemiological and genetic evidence of the potential role of UV radiation in uveal melanoma with data on cutaneous melanoma. Even though frequently mutated genes in skin melanomas (e.g. *BRAF*) differ from those found in uveal melanoma (i.e. *GNAQ*, *GNA11*), their mutation pattern bears strong similarities. Furthermore, we provide new results showing that *RAC1*, a gene recently found harboring UV-hallmark mutation in skin melanoma, is also mutated in uveal melanoma. This article aims to review the work done in the last decades in order to understand the etiology of uveal melanoma and discuss new avenues, which shed some light on the potential role of UV exposure in uveal melanoma.

A1.2.2 Introduction

With 5.1 cases per million in the US population, uveal melanoma is the second most common form of melanoma (after the skin) and is the most common ocular cancer (Singh A. D. and Topham, 2003; Singh A. D. et al., 2011). Approximately 3% of all melanomas are from uveal origin (Singh A. D. et al., 2011; Chang et al., 1998; Dutton et al., 1984) and are predominately located in the choroid (90%, 7% and 3% in the choroid, the ciliary body and the iris, respectively) (Singh A. D. et al., 2011; Landreville et al., 2008). In 50% of the patients, uveal melanoma metastasizes, mainly to the liver where it is fatal within 1 year (Diener-West et al., 2005; Augsburger et al., 2009; "The COMS randomized trial of iodine 125 brachytherapy for choroidal melanoma: V. Twelve-year mortality rates and prognostic factors: COMS report No. 28", 2006). The etiology of uveal melanoma is not well understood, but accumulation of solar UV exposure is one of the suspected risk factors. This review aims to present evidences related to the possible role of UV exposure in this neoplasia.

Genotoxic effects of ultraviolet light

Exposure to the sunlight's ultraviolet (UV) radiations is the preeminent risk factor in skin cancer development (El Ghissassi et al., 2009; "IARC Working group on the Evaluation of Carcinogenics Risks to humans - Radiation", 2012; Armstrong and Kricker, 2001). The sun emits the whole UV spectrum (*i.e.* UVC, UVB and UVA). However, wavelengths under 290 nm (UVC and short UVB) are completely absorbed by the stratospheric ozone layer. Therefore, UVA and long UVB are the only UV wavelengths reaching the earth surface. UV light induces different types of DNA damage including cyclobutane pyrimidine dimers (CPD), (6-4) pyrimidine-pyrimidone photoproducts (6-4PP) and oxidatively generated DNA damage. Although 6-4PP were found mutagenic in *Escherichia coli* (Glickman et al., 1986), CPD are considered as the main promutagenic DNA adducts induced by UV wavelengths (Pfeifer and Besaratinia, 2012). They are the most abundant UV-induced DNA damage (up to 85% of all photodamage), and they are repaired in a relatively slow manner by nucleotide excision repair (NER) in humans. It is also well established that cytosine deamination is drastically accelerated within a CPD (Song et al., 2011; Tu et al., 1998) and that some translesional DNA polymerases (*e.g.* pol zeta and kappa) misincorporate an adenine when polymerizing over a cytosine in a CPD (Yoon J. H. et al., 2009; Choi and Pfeifer, 2005; Kozmin et al., 2003). Consequently, cytosine-containing CPD are highly mutagenic, leading to C:G→T:C transition mutations and CpC:GpG→TpT:ApA tandem transitions (Jiang and Taylor, 1993). Those mutations are the signature of UV exposure (Hutchinson F, 1994; Brash D.E. et al., 1991).

UV light and skin melanoma

The role of UV light from natural sunlight and from UV-emitting tanning devices in the occurrence of non-melanoma skin cancer is well established (Armstrong and Kricker, 2001; Brash et al., 1991; de Gruijl, 1999). More recently, the International Agency for Research on Cancer (IARC) concluded that there is also a causative relationship between UV light from both the sun and tanning devices and skin melanoma (El Ghissassi et al., 2009; "Radiation," 2012).

Epidemiological evidences have determined that a cumulative strong exposure to sunlight and sunburn episodes at a relatively young age (pre-adult) catalyze the formation of skin melanoma (Tatalovich et al., 2006; Leiter and Garbe, 2008). Moreover, the UV portion of sunlight has been epidemiologically associated with the development of skin melanoma (Moan et al., 2012; Moan et al., 2008; Wang S. Q. et al., 2001). More precisely, UVA wavelengths rather than UVB are preferentially linked to skin melanoma (de Gruijl, 2000, 2002; Y. Y. He et al., 2004; Coelho and Hearing, 2010; Autier et al., 2011; Cadet and Douki, 2011; Boniol et al., 2012; Dore and Chignol, 2012; Noonan et al., 2012; Zhao et al., 2013).

Many genes are found mutated in skin melanoma. Among them, *BRAF* is the most frequently mutated gene with 70% of human skin melanoma harboring mutations in this gene. Up to 90% of *BRAF* mutations are localized in or around the codon 600 of the exon 15 (Davies H et al., 2002). Mutations reported in this codon are not the classical UV signature mutations (i.e. C:G→T:C at dipyrimidinic sites), but rather predominantly A:T→T:A transversion mutations (Davies H et al., 2002). Moreover, 29% of these mutations are found as tandem mutations (Thomas et al., 2004; Thomas et al., 2006; Thomas NE, 2006). Although they are not the classical UV signature mutations, a model has been proposed to explain their induction by UV light (Thomas et al., 2006; Besaratinia and Pfeifer, 2008). It has been hypothesized that an error prone translesional DNA polymerase crossing a dipyrimidinic site at or close to the codon 600 of *BRAF* gene would result in nucleotide base misincorporation at codon 600. On the other hand, *TP53* and *CDKN2*, other genes found mutated in skin melanoma, harbor predominately C:G→T:C mutations in the sporadic form, consolidating a potential role of UV light in the etiology of this cancer (Besaratinia et al., 2008; Hocker and Tsao, 2007; Pollock et al., 1995).

Recently, Krauthammer *et al.* (Krauthammer et al., 2012) have sequenced the exome of 147 primary or metastatic skin melanomas. In addition to the already known mutated genes (*e.g. BRAF*, *TP53* and *CDKN2*), this study led to the identification of mutations in *RAC1* and *PPP6C* genes. In the *RAC1* gene, the predominant mutation is a C:G→T:C transition mutation in a pyrimidine run (5'TTTCCT), strongly suggesting a role of UV-light in the induction of this mutant. This study reported a predominance of C:G→T:C mutations at dipyrimidinic sites in mutated genes of skin melanomas, confirming the role of UV light in the etiology of this

cancer (Krauthammer et al., 2012). Previous studies have also determined that skin melanoma harbors predominantly UV-signature mutations (Greenman et al., 2007; Pleasance et al., 2010). Altogether, the epidemiological and genetic evidences presented confirm the role of UV light in the etiology of skin melanoma.

UV light and uveal melanoma

Epidemiology

The occurrence of uveal melanoma is 200 times higher in Caucasians compared to the black population (Singh et al., 2011; Margo et al., 1998). Moreover, light-colored irides, blond hair and fair skin color are risk factors (Singh et al., 2004; Egan et al., 1988; Holly et al., 1990; Rootman and Gallagher, 1984; Seddon et al., 1990; Tucker et al., 1985; Prota et al., 1998; Sarna, 1992). As for cutaneous melanoma, this uveal melanoma ethnic predisposition may appear as an evidence of the oncogenic effect of sunlight on the etiology of this cancer. However, epidemiological studies have failed so far to validate the role of sunlight in the occurrence of uveal melanoma. More precisely, case studies have determined either a weak positive (Seddon et al., 1990; Vajdic et al., 2003) or no statistically significant (Gallagher et al., 1985; Pane and Hirst, 2000) correlation between UVB-light exposure during life and the risk of uveal melanoma. Moreover, a very weak to not significant correlation between time spent outdoors and sunbathing and the risk of uveal melanoma is reported (Tucker et al., 1985; Seddon et al., 1990). In fact, epidemiological studies on the influence of occupational sunlight exposure seem to indicate that sunlight has a protective effect against uveal melanoma. Indeed, case-control studies reported that indoor workers have a significant increased risk to develop uveal melanoma whereas outdoor workers such as farming workers do not have a significant increased risk (Gallagher et al., 1985; Swerdlow, 1983; Vagero et al., 1990; Ajani et al., 1992; Holly et al., 1996; Monarrez-Espino et al., 2002; Lutz et al., 2005). On the other hand, several studies provide evidence of a causative relationship between the use of UV-emitting tanning devices and uveal melanoma (Tucker et al., 1985; Seddon et al., 1990; Vajdic et al., 2004; El Ghissassi et al., 2009). In summary, the epidemiological studies published so far about a possible implication of UV-light exposure in the occurrence of uveal melanoma are contradictory and the subject is still under debate.

Using epidemiological analyses to establish solar UV exposure as a risk factor for uveal melanoma is hazardous for some reasons. First, epidemiological studies do not distinguish between UVA and UVB exposure. Also, solar exposure of an individual during its lifetime cannot be precisely measured using the available tools. The measurement of UV across populations is challenging especially because multiple components contribute to an individual's exposure at any given time, including wearing prescription glasses, sunglasses or contact lenses; extent of shade coverage; length of forelock hairs; protrusion of the brow; eyelid anatomy; posture; activity, leisure and occupation; day of the year, latitude, elevation; environmental condition

(air quality, cloud cover) (Sliney, 1995). It is virtually impossible to precisely gather all this information with an activity diary and/or a survey. However, the first thing to consider is the penetration of UV light in the eye. Beyond the UV dose to which an individual is exposed during its lifetime, one important consideration is whether UV light reaches the posterior segment of the human eye where the choroïdal melanocytes are located.

UV light penetration in the ocular media

UV light transmittance of the human eye is documented. The human cornea is the first ocular layer in contact with the sun's UV rays and it absorbs wavelengths below 295 nm. Some of the long UVB, UVA and wavelengths above pass through the cornea and reach the iris and the lens (Lerman S, 1980; Norren and Vos, 1974; Mallet and Rochette, 2013). The iris is opaque to the UV rays and the adult lens absorbs all wavelengths below 370 nm, letting through less than 2% of UVA between 370 and 400 nm (Norren and Vos, 1974; Lerman S, 1980). In the lens of younger humans (<8 years old) the formation of 3-hydroxy kynurenine and its glucoside that absorb 300 to 400 nm UV wavelengths is not completed (Dillon et al., 1990; Dillon, 1991; Krishna et al., 1991). Consequently, a portion of these wavelengths is transmitted through the lens of those children (Norren and Vos, 1974; Lerman S, 1980) and their retina is exposed to UVA and UVB light. This means that exposure to the sun at an early age may lead to the formation of genotoxic DNA damage in structures from both the anterior and the posterior segment of the eye. Therefore, juvenile solar overexposure may be a risk factor to develop uveal melanoma, as it is for skin melanoma (Tatalovich et al., 2006; Leiter and Garbe, 2008). However, this would be challenging to assess and to our knowledge, it has not been epidemiologically documented.

Genetics

Unlike skin melanoma, uveal melanoma does not harbor mutations in *BRAF* and *NRAS* genes. Mutations are rather concentrated in *GNAQ* and *GNA11* genes, both coding for the q class of heterotrimeric G-protein α subunit (Gαq and Gα11, respectively) sharing 91% of amino acid homology.

Van Raamsdonk *et al.* reported that the codon 209 of both *GNAQ a*nd *GNA11* genes is mutated in 45% and 32% of all uveal melanomas and in 22% and 57% of all uveal melanoma metastases, respectively (Van Raamsdonk et al., 2009; Van Raamsdonk et al., 2010). Mutations found in the codon 209 (CAG) of *GNA11* are mainly A:T$\rightarrow$T:A transversions (95%) and less often A:T$\rightarrow$C:G, ApG:CpT$\rightarrow$TpA:TpA and ApG:CpT$\rightarrow$TpT:ApA. In *GNAQ*, the mutations found in the codon 209 (CAA) occur on the second A. They are mainly A:T$\rightarrow$T:A, A:T$\rightarrow$C:G and, less often, A:T$\rightarrow$G:C. They are "gain of function" mutations converting *GNAQ* into a dominant acting oncogene (Van Raamsdonk et al., 2009). It can be speculated that *GNA11*

mutations have the same impact on protein function but it has not been demonstrated. Although there are potential UV-targets (*i.e.* CC, CT or TC) in or near codon 209 of both *GNAQ* and *GNA11*, none of the mutations found are UV-signature mutations. This could be explained by the fact that a C:G→T:A transition in the codon 209 of both *GNAQ* and *GNA11* would prevent phenotypic expression of the mutated genes, as this mutation would result in either a stop codon or a silent mutation. As can be seen for the *BRAF* gene in skin melanoma, all mutations found in codon 209 of *GNAQ* and *GNA11* implicates a CpA:TpG dinucleotide and tandem mutations are seen at this dinucleotide. As hypothesized by Besaratinia and Pfeifer, there may be an unidentified dimeric photoproduct in this sequence related to melanin or tyrosine photochemistry in skin and uveal melanocytes (Besaratinia and Pfeifer, 2011).

In addition to the codon 209, the codon 183 of *GNAQ* (CGA) and *GNA11* (CGC) has been found mutated in around 2.5% of uveal melanomas and 5.9% of metastases from uveal origins (Van Raamsdonk et al., 2010). All mutations found at this codon are C:G→T:A transitions at dipyrimidine sites, the signature of UV-light induced genotoxicity. In addition, a tandem mutant has been reported carrying the CpC:GpG→TpT:ApA UV-signature mutation in codons 182/183 of *GNA11* (Van Raamsdonk et al., 2009; Van Raamsdonk et al., 2010).

Mutational spectrum of *GNAQ* and *GNA11* in uveal melanoma brings some indications of a role of UV-light in the occurrence of this cancer. First, mutations found in codon 209 of *GNAQ* and *GNA11*, although they are not UV-specific mutations, have strong similarities with *BRAF* mutations reported in skin melanomas in which the implication of UV is well accepted. Mutations occur at a CpA dinucleotide in either the codon 600 of *BRAF* gene in skin melanoma and the codon 209 of *GNAQ* and *GNA11* genes in uveal melanoma. Also, the tandem mutations, an extremely rare type of mutation, are reported in the CpA dinucleotide in codon 209 of *GNAQ* and *GNA11* genes of uveal melanoma as well as in codon 600 of *BRAF* gene of skin melanomas. Moreover, mutations found in codon 183 of *GNAQ* and *GNA11* are exclusively UV-related mutations (C:G→T:A).

In light of the C:G→T:A transition mutation obtained in *RAC1* gene of skin melanoma, but not in uveal melanoma, by Krauthammer *et al.* (Krauthammer et al., 2012), we have investigated the occurrence of the same mutation in 15 uveal melanoma cell lines. We have determined that three of the cell lines (20%) harbor the aforementioned C:G→T:A transition. This is the first genetic alteration similitude shared between skin and uveal melanoma. However, this result has been obtained using cell lines derived from the tumors (Hu DN et al., 1993). Therefore, it has to be taken with caution and should be confirmed with primary tumors.

DNA repair

In human, UV-photoproducts (CPD and 6-4PP) are repaired by nucleotide excision repair in which the XP protein family (XPA-F and XPV) is the core of the repair system (Yang W, 2011; Sertic et al., 2012).

Rapport-Gratuit.com

Xeroderma pigmentosum patients harbor defect in one or more XP proteins and are therefore deficient in UV-induced DNA photoproducts repair. Those patients have a 600- to 800-fold increased risk to develop a skin melanoma (Kraemer et al., 1984; Kraemer et al., 1994). There are reported cases of ocular melanoma in xeroderma pigmentosum patients but they are rather of surface squamous origin (conjunctival melanoma) than uveal origin (Aoyagi et al., 1993; Mehta et al., 1996; Benatiya Andaloussi et al., 2012). Nevertheless, there are reported cases of uveal melanoma of the iris (Johnson et al., 1989) and the choroid (Kraemer et al., 1987) and an overall 58-fold increased risk of developing uveal melanoma in xeroderma pigmentosum patients has been estimated (Seddon et al., 1990). Thus, xeroderma pigmentosum disease is a significant risk factor for developing uveal melanoma even if that risk is less important than the one to develop skin melanoma.

A1.2.3 Discussion

Epidemiological and genetic data, as well as the optical properties of the ocular media, lead to controversial conclusions concerning the involvement of solar UV radiation as a risk factor for uveal melanoma. On one hand, UV light reaches the posterior structures of the eye (*e.g.* retina and choroid) within the first decade of life. On the other hand, the adult cornea, aqueous humour, lens and vitreous chamber absorb all UV wavelengths, thus protecting the posterior segment of the eye. However, as sunburns at younger age have been established as a risk factor for skin melanoma, it can be hypothesized that overexposure to sunlight at a young age, when UV wavelengths are able to reach the posterior segment of the eye, could be a risk factor for uveal melanoma. Nevertheless, this hypothesis has not been assessed and needs more investigation.

Epidemiological analyses have failed to clearly demonstrate that UV light is a risk factor for uveal melanoma. On the contrary, some case studies found a negative correlation between occupational exposure and uveal melanoma. Nonetheless, genetic analyses seem to validate the influence of UV light as a carcinogen responsible for the development of uveal melanomas. UV-hallmark mutations (CpG→TpA) are found in the codon 183 of *GNAQ* and *GNA11* and in the *RAC1* gene. On another hand, mutations found in codon 209 of *GNAQ* and *GNA11* seem not related to UV exposure. Those mutations however share homology with skin melanoma mutations reported in the codon 600 of *BRAF* gene. Since the role of UV light is accepted as a risk factor for skin melanoma, this mutational homology can be interpreted as a clue as to the implication of UV light in the etiology of uveal melanoma. Furthermore, a defective UV photoproduct repair in xeroderma pigmentosum patients is a moderate but significant risk for uveal melanoma.

With these information in hands, is it possible to conciliate contradictory epidemiological studies and genetic data on the uveal melanoma? It is well documented that vitamin D3 has a protective effect against several cancers, including skin melanoma (Boscoe and Schymura, 2006; Giovannucci et al., 2006; Grant and Garland, 2006; Grant, 2007; Garland et al., 2009; Godar et al., 2009; Tang et al., 2011) and that exposition of the skin to UVB wavelengths is essential for the conversion of 7-dehydrocholesterol into vitamin D3 (Lehmann B, 2009). It has also been shown that skin melanoma cells can convert vitamin D3 to calcitriol, which causes growth inhibition and apoptotic cell death (Godar et al., 2009). To our knowledge, the protective effect of vitamin D3 on uveal melanoma development has not been assessed so far. However, a strong protective effect of vitamin D3 would explain some of the data presented on uveal melanoma. It can be hypothesized that there is a balance between the protective effect of UVB via the formation of vitamin D3 and the genotoxic effect of UV light via the formation of mutagenic DNA photodamage. This premise could explain the fact that epidemiological studies have failed to establish a possible role for UV-light as a risk factor for uveal melanoma. In support to this hypothesis, we have highlighted a contradiction between epidemiological evidences showing

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

that, as opposed to sunlight exposure, the use of sun-tanning devices is a risk factor for uveal melanoma. Lamps used for sun-tanning emit mainly short UVA wavelengths. Thus, artificial tanning is not a useful way to increase systemic level of vitamin D3 (Levine et al., 2005; Weinstock and Fisher, 2010; Diffey B, 2011). Consequently, sun-tanning devices have the genotoxic effect of sunlight UV without the protective effect of UVB-induced vitamin D3. The fact that indoor occupation is a risk factor for uveal melanoma supports this hypothesis. In fact, it has been demonstrated that indoor solar UVA exposure (UVB being blocked by windows) depletes vitamin D3 (Levine et al., 2005).

In conclusion, there has been a tremendous amount of work done in the last decades to understand the etiology of uveal melanoma. However, it is still hazardous to establish UV exposure as a risk factor for uveal melanoma. There has been recent progress, especially in the determination of mutations that provide new insights on the implication of UV in uveal melanoma. New advances with the high-throughput sequencing will undoubtedly bring some light in this controversy. Also, the influence of systemic levels of vitamin D3 may bring new avenues to understand the occurrence of uveal melanoma.

A1.2.4 Remerciements

The authors sincerely thank Nathalie Bastien for her valuable help in the preparation of this manuscript. This work was supported by a grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) to P.J.R. P.J.R. is a research scholar from the Fonds de recherche du Québec – Santé (FRQ-S).

A1.2.5 Références

1. Singh, A. D. and A. Topham (2003) Incidence of uveal melanoma in the United States: 1973-1997. *Ophthalmology*, **110**, 956-961.
2. Singh, A. D., M. E. Turell and A. K. Topham (2011) Uveal melanoma: trends in incidence, treatment, and survival. *Ophthalmology*, **118**, 1881-1885.
3. Chang, A. E., L. H. Karnell and H. R. Menck (1998) The National Cancer Data Base report on cutaneous and noncutaneous melanoma: a summary of 84,836 cases from the past decade. The American College of Surgeons Commission on Cancer and the American Cancer Society. *Cancer*, **83**, 1664-1678.
4. Dutton, J. J., R. L. Anderson, R. L. Schelper, J. J. Purcell and D. T. Tse (1984) Orbital malignant melanoma and oculodermal melanocytosis: report of two cases and review of the literature. *Ophthalmology*, **91**, 497-507.
5. Landreville, S., O. A. Agapova and J. W. Harbour (2008) Emerging insights into the molecular pathogenesis of uveal melanoma. *Future Oncol.*, **4**, 629-636.
6. Diener-West, M., S. M. Reynolds, D. J. Agugliaro, R. Caldwell, K. Cumming, J. D. Earle, B. S. Hawkins, J. A. Hayman, I. Jaiyesimi, L. M. Jampol, J. M. Kirkwood, W. J. Koh, D. M. Robertson, J. M. Shaw, B. R. Straatsma and J. Thoma (2005) Development of metastatic disease after enrollment in the COMS trials for treatment of choroidal melanoma: Collaborative Ocular Melanoma Study Group Report No. 26. *Arch. Ophthalmol.*, **123**, 1639-1643.
7. Augsburger, J. J., Z. M. Correa and A. H. Shaikh (2009) Effectiveness of treatments for metastatic uveal melanoma. *Am. J. Ophthalmol.*, **148**, 119-127.
8. Collaborative Ocular Melanoma Study Group (2006) The COMS randomized trial of iodine 125 brachytherapy for choroidal melanoma: V. Twelve-year mortality rates and prognostic factors: COMS report No. 28. *Arch. Ophthalmol.*, **124**, 1684-1693.
9. El Ghissassi, F., R. Baan, K. Straif, Y. Grosse, B. Secretan, V. Bouvard, L. Benbrahim-Tallaa, N. Guha, C. Freeman, L. Galichet and V. Cogliano (2009) A review of human carcinogens--part D: radiation. *Lancet Oncol.*, **10**, 751-752.
10. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans (2012) Radiation. *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum.*, **100**, 7-303.
11. Armstrong, B. K. and A. Kricker (2001) The epidemiology of UV induced skin cancer. *J. Photochem. Photobiol. B*, **63**, 8-18.
12. Glickman, B. W., R. M. Schaaper, W. A. Haseltine, R. L. Dunn and D. E. Brash (1986) The C-C (6-4) UV photoproduct is mutagenic in Escherichia coli. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **83**, 6945-6949.
13. Pfeifer, G. P. and A. Besaratinia (2012) UV wavelength-dependent DNA damage and human non-melanoma and melanoma skin cancer. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **11**, 90-97.
14. Song, Q., V. J. Cannistraro and J. S. Taylor (2011) Rotational position of a 5-methylcytosine-containing cyclobutane pyrimidine dimer in a nucleosome greatly affects its deamination rate. *J. Biol. Chem.*, **286**, 6329-6335.
15. Tu, Y., R. Dammann and G. P. Pfeifer (1998) Sequence and time-dependent deamination of cytosine bases in UVB-induced cyclobutane pyrimidine dimers in vivo. *J. Mol. Biol.*, **284**, 297-311.
16. Yoon, J. H., L. Prakash and S. Prakash (2009) Highly error-free role of DNA polymerase eta in the replicative bypass of UV-induced pyrimidine dimers in mouse and human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **106**, 18219-18224.

17. Choi, J. H. and G. P. Pfeifer (2005) The role of DNA polymerase eta in UV mutational spectra. *DNA Repair (Amst)*, **4**, 211-220.
18. Kozmin, S. G., Y. I. Pavlov, T. A. Kunkel and E. Sage (2003) Roles of Saccharomyces cerevisiae DNA polymerases Poleta and Polzeta in response to irradiation by simulated sunlight. *Nucleic Acids Res.*, **31**, 4541-4552.
19. Jiang, N. and J. S. Taylor (1993) In vivo evidence that UV-induced C-->T mutations at dipyrimidine sites could result from the replicative bypass of cis-syn cyclobutane dimers or their deamination products. *Biochemistry*, **32**, 472-481.
20. Hutchinson, F. (1994) Induction of tandem-base change mutations. *Mutat. Res.*, **309**, 11-15.
21. Brash, D. E., J. A. Rudolph, J. A. Simon, A. Lin, G. J. McKenna, H. P. Baden, A. J. Halperin and J. Ponten (1991) A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **88**, 10124-10128.
22. de Gruijl, F. R. (1999) Skin cancer and solar UV radiation. *Eur. J. Cancer*, **35**, 2003-2009.
23. Tatalovich, Z., J. P. Wilson, T. Mack, Y. Yan and M. Cockburn (2006) The objective assessment of lifetime cumulative ultraviolet exposure for determining melanoma risk. *J. Photochem. Photobiol. B*, **85**, 198-204.
24. Leiter, U. and C. Garbe (2008) Epidemiology of melanoma and nonmelanoma skin cancer-the role of sunlight. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **624**, 89-103.
25. Moan, J., Z. Baturaite, A. C. Porojnicu, A. Dahlback and A. Juzeniene (2012) UVA, UVB and incidence of cutaneous malignant melanoma in Norway and Sweden. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **11**, 191-198.
26. Moan, J., A. C. Porojnicu and A. Dahlback (2008) Ultraviolet radiation and malignant melanoma. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **624**, 104-116.
27. Wang, S. Q., R. Setlow, M. Berwick, D. Polsky, A. A. Marghoob, A. W. Kopf and R. S. Bart (2001) Ultraviolet A and melanoma: a review. *J. Am. Acad. Dermatol.*, **44**, 837-846.
28. Noonan, F. P., M. R. Zaidi, A. Wolnicka-Glubisz, M. R. Anver, J. Bahn, A. Wielgus, J. Cadet, T. Douki, S. Mouret, M. A. Tucker, A. Popratiloff, G. Merlino and E. C. De Fabo (2012) Melanoma induction by ultraviolet A but not ultraviolet B radiation requires melanin pigment. *Nat. Commun.*, **3**, 884.
29. Cadet, J. and T. Douki (2011) Oxidatively generated damage to DNA by UVA radiation in cells and human skin. *J. Invest. Dermatol.*, **131**, 1005-1007.
30. Zhao, B., M. Ming and Y. Y. He (2013) Suppression of PTEN transcription by UVA. *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, **27**, 184-191.
31. He, Y. Y., J. L. Huang and C. F. Chignell (2004) Delayed and sustained activation of extracellular signal-regulated kinase in human keratinocytes by UVA: implications in carcinogenesis. *J. Biol. Chem.*, **279**, 53867-53874.
32. de Gruijl, F. R. (2002) Photocarcinogenesis: UVA vs. UVB radiation. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.*, **15**, 316-320.
33. de Gruijl, F. R. (2000) Photocarcinogenesis: UVA vs UVB. *Methods Enzymol.*, **319**, 359-366.
34. Autier, P., J. F. Dore, A. M. Eggermont and J. W. Coebergh (2011) Epidemiological evidence that UVA radiation is involved in the genesis of cutaneous melanoma. *Curr. Opin. Oncol.*, **23**, 189-196.
35. Coelho, S. G. and V. J. Hearing (2010) UVA tanning is involved in the increased incidence of skin cancers in fair-skinned young women. *Pigment Cell Melanoma Res.*, **23**, 57-63.
36. Dore, J. F. and M. C. Chignol (2012) Tanning salons and skin cancer. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **11**, 30-37.
37. Boniol, M., P. Autier, P. Boyle and S. Gandini (2012) Cutaneous melanoma attributable to sunbed use: systematic review and meta-analysis. *BMJ*, **345**, e4757.

38. Davies, H., G. R. Bignell, C. Cox, P. Stephens, S. Edkins, S. Clegg, J. Teague, H. Woffendin, M. J. Garnett, W. Bottomley, N. Davis, E. Dicks, R. Ewing, Y. Floyd, K. Gray, S. Hall, R. Hawes, J. Hughes, V. Kosmidou, A. Menzies, C. Mould, A. Parker, C. Stevens, S. Watt, S. Hooper, R. Wilson, H. Jayatilake, B. A. Gusterson, C. Cooper, J. Shipley, D. Hargrave, K. Pritchard-Jones, N. Maitland, G. Chenevix-Trench, G. J. Riggins, D. D. Bigner, G. Palmieri, A. Cossu, A. Flanagan, A. Nicholson, J. W. Ho, S. Y. Leung, S. T. Yuen, B. L. Weber, H. F. Seigler, T. L. Darrow, H. Paterson, R. Marais, C. J. Marshall, R. Wooster, M. R. Stratton and P. A. Futreal (2002) Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*, **417**, 949-954.
39. Thomas, N. E., M. Berwick and M. Cordeiro-Stone (2006) Could BRAF mutations in melanocytic lesions arise from DNA damage induced by ultraviolet radiation? *J. Invest. Dermatol.*, **126**, 1693-1696.
40. Thomas, N. E., A. Alexander, S. N. Edmiston, E. Parrish, R. C. Millikan, M. Berwick, P. Groben, D. W. Ollila, D. Mattingly and K. Conway (2004) Tandem BRAF mutations in primary invasive melanomas. *J. Invest. Dermatol.*, **122**, 1245-1250.
41. Thomas, N. E. (2006) BRAF somatic mutations in malignant melanoma and melanocytic naevi. *Melanoma Res.*, **16**, 97-103.
42. Besaratinia, A. and G. P. Pfeifer (2008) Sunlight ultraviolet irradiation and BRAF V600 mutagenesis in human melanoma. *Hum. Mutat.*, **29**, 983-991.
43. Besaratinia, A., S. I. Kim and G. P. Pfeifer (2008) Rapid repair of UVA-induced oxidized purines and persistence of UVB-induced dipyrimidine lesions determine the mutagenicity of sunlight in mouse cells. *FASEB J*, **22**, 2379-2392.
44. Hocker, T. and H. Tsao (2007) Ultraviolet radiation and melanoma: a systematic review and analysis of reported sequence variants. *Hum. Mutat.*, **28**, 578-588.
45. Pollock, P. M., F. Yu, L. Qiu, P. G. Parsons and N. K. Hayward (1995) Evidence for u.v. induction of CDKN2 mutations in melanoma cell lines. *Oncogene*, **11**, 663-668.
46. Krauthammer, M., Y. Kong, B. H. Ha, P. Evans, A. Bacchiocchi, J. P. McCusker, E. Cheng, M. J. Davis, G. Goh, M. Choi, S. Ariyan, D. Narayan, K. Dutton-Regester, A. Capatana, E. C. Holman, M. Bosenberg, M. Sznol, H. M. Kluger, D. E. Brash, D. F. Stern, M. A. Materin, R. S. Lo, S. Mane, S. Ma, K. K. Kidd, N. K. Hayward, R. P. Lifton, J. Schlessinger, T. J. Boggon and R. Halaban (2012) Exome sequencing identifies recurrent somatic RAC1 mutations in melanoma. *Nat. Genet.*, **44**, 1006-1014.
47. Pleasance, E. D., R. K. Cheetham, P. J. Stephens, D. J. McBride, S. J. Humphray, C. D. Greenman, I. Varela, M. L. Lin, G. R. Ordonez, G. R. Bignell, K. Ye, J. Alipaz, M. J. Bauer, D. Beare, A. Butler, R. J. Carter, L. Chen, A. J. Cox, S. Edkins, P. I. Kokko-Gonzales, N. A. Gormley, R. J. Grocock, C. D. Haudenschild, M. M. Hims, T. James, M. Jia, Z. Kingsbury, C. Leroy, J. Marshall, A. Menzies, L. J. Mudie, Z. Ning, T. Royce, O. B. Schulz-Trieglaff, A. Spiridou, L. A. Stebbings, L. Szajkowski, J. Teague, D. Williamson, L. Chin, M. T. Ross, P. J. Campbell, D. R. Bentley, P. A. Futreal and M. R. Stratton (2010) A comprehensive catalogue of somatic mutations from a human cancer genome. *Nature*, **463**, 191-196.
48. Greenman, C., P. Stephens, R. Smith, G. L. Dalgliesh, C. Hunter, G. Bignell, H. Davies, J. Teague, A. Butler, C. Stevens, S. Edkins, S. O'Meara, I. Vastrik, E. E. Schmidt, T. Avis, S. Barthorpe, G. Bhamra, G. Buck, B. Choudhury, J. Clements, J. Cole, E. Dicks, S. Forbes, K. Gray, K. Halliday, R. Harrison, K. Hills, J. Hinton, A. Jenkinson, D. Jones, A. Menzies, T. Mironenko, J. Perry, K. Raine, D. Richardson, R. Shepherd, A. Small, C. Tofts, J. Varian, T. Webb, S. West, S. Widaa, A. Yates, D. P. Cahill, D. N. Louis, P. Goldstraw, A. G. Nicholson, F. Brasseur, L. Looijenga, B. L. Weber, Y. E. Chiew, A. DeFazio, M. F. Greaves, A. R. Green, P. Campbell, E. Birney, D. F. Easton, G. Chenevix-Trench, M. H. Tan, S. K. Khoo, B. T. Teh, S. T. Yuen, S. Y. Leung, R. Wooster, P. A. Futreal and M. R. Stratton (2007) Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature*, **446**, 153-158.

49. Margo, C. E., Z. Mulla and K. Billiris (1998) Incidence of surgically treated uveal melanoma by race and ethnicity. *Ophthalmology*, **105**, 1087-1090.
50. Singh, A. D., I. G. Rennie, S. Seregard, M. Giblin and J. McKenzie (2004) Sunlight exposure and pathogenesis of uveal melanoma. *Surv. Ophthalmol.*, **49**, 419-428.
51. Egan, K. M., J. M. Seddon, R. J. Glynn, E. S. Gragoudas and D. M. Albert (1988) Epidemiologic aspects of uveal melanoma. *Surv. Ophthalmol.*, **32**, 239-251.
52. Holly, E. A., D. A. Aston, D. H. Char, J. J. Kristiansen and D. K. Ahn (1990) Uveal melanoma in relation to ultraviolet light exposure and host factors. *Cancer Res.*, **50**, 5773-5777.
53. Rootman, J. and R. P. Gallagher (1984) Color as a risk factor in iris melanoma. *Am. J. Ophthalmol.*, **98**, 558-561.
54. Seddon, J. M., E. S. Gragoudas, R. J. Glynn, K. M. Egan, D. M. Albert and P. H. Blitzer (1990) Host factors, UV radiation, and risk of uveal melanoma. A case-control study. *Arch. Ophthalmol.*, **108**, 1274-1280.
55. Tucker, M. A., J. A. Shields, P. Hartge, J. Augsburger, R. N. Hoover and J. F. Fraumeni, Jr. (1985) Sunlight exposure as risk factor for intraocular malignant melanoma. *N. Engl. J. Med.*, **313**, 789-792.
56. Prota, G., D. N. Hu, M. R. Vincensi, S. A. McCormick and A. Napolitano (1998) Characterization of melanins in human irides and cultured uveal melanocytes from eyes of different colors. *Exp. Eye Res.*, **67**, 293-299.
57. Sarna, T. (1992) Properties and function of the ocular melanin--a photobiophysical view. *J. Photochem. Photobiol. B*, **12**, 215-258.
58. Vajdic, C. M., A. Kricker, M. Giblin, J. McKenzie, J. Aitken, G. G. Giles and B. K. Armstrong (2003) Incidence of ocular melanoma in Australia from 1990 to 1998. *Int. J. Cancer*, **105**, 117-122.
59. Gallagher, R. P., J. M. Elwood, J. Rootman, J. J. Spinelli, G. B. Hill, W. J. Threlfall and J. M. Birdsell (1985) Risk factors for ocular melanoma: Western Canada Melanoma Study. *J. Natl. Cancer Inst.*, **74**, 775-778.
60. Pane, A. R. and L. W. Hirst (2000) Ultraviolet light exposure as a risk factor for ocular melanoma in Queensland, Australia. *Ophthalmic. Epidemiol.*, **7**, 159-167.
61. Ajani, U. A., J. M. Seddon, C. C. Hsieh, K. M. Egan, D. M. Albert and E. S. Gragoudas (1992) Occupation and risk of uveal melanoma. An exploratory study. *Cancer*, **70**, 2891-2900.
62. Holly, E. A., D. A. Aston, D. K. Ahn and A. H. Smith (1996) Intraocular melanoma linked to occupations and chemical exposures. *Epidemiology*, **7**, 55-61.
63. Lutz, J. M., I. Cree, S. Sabroe, T. K. Kvist, L. B. Clausen, N. Afonso, W. Ahrens, T. J. Ballard, J. Bell, D. Cyr, M. Eriksson, J. Fevotte, P. Guenel, L. Hardell, K. H. Jockel, A. Miranda, F. Merletti, M. M. Morales-Suarez-Varela, A. Stengrevics and E. Lynge (2005) Occupational risks for uveal melanoma results from a case-control study in nine European countries. *Cancer Causes Control*, **16**, 437-447.
64. Monarrez-Espino, J., A. Stang, K. Bromen, H. Merzenich, G. Anastassiou and K. H. Jockel (2002) Occupation as a risk factor for uveal melanoma in Germany. *Scand. J. Work Environ. Health*, **28**, 270-277.
65. Swerdlow, A. J. (1983) Epidemiology of eye cancer in adults in England and Wales, 1962-1977. *Am. J. Epidemiol.*, **118**, 294-300.
66. Vagero, D., A. J. Swerdlow and V. Beral (1990) Occupation and malignant melanoma: a study based on cancer registration data in England and Wales and in Sweden. *Br. J. Ind. Med.*, **47**, 317-324.
67. Vajdic, C. M., A. Kricker, M. Giblin, J. McKenzie, J. F. Aitken, G. G. Giles and B. K. Armstrong (2004) Artificial ultraviolet radiation and ocular melanoma in Australia. *Int. J. Cancer*, **112**, 896-900.
68. Sliney, D. H. (1995) UV radiation ocular exposure dosimetry. *J. Photochem. Photobiol. B*, **31**, 69-77.
69. Lerman, S. (1980) *Radiant energy and the eye*. Macmillan Publishing Co., Inc., New York.

70. Norren, D. V. and J. J. Vos (1974) Spectral transmission of the human ocular media. *Vision Res.*, **14**, 1237-1244.
71. Mallet, J. D. and P. J. Rochette (2013) Wavelength-dependent ultraviolet induction of cyclobutane pyrimidine dimers in the human cornea. *Photochem. Photobiol Sci.*, **12**, 1310-1318
72. Dillon, J., R. H. Wang and S. J. Atherton (1990) Photochemical and photophysical studies on human lens constituents. *Photochem. Photobiol.*, **52**, 849-854.
73. Krishna, C. M., S. Uppuluri, P. Riesz, J. S. Zigler, Jr. and D. Balasubramanian (1991) A study of the photodynamic efficiencies of some eye lens constituents. *Photochem. Photobiol.*, **54**, 51-58.
74. Dillon, J. (1991) The photophysics and photobiology of the eye. *J. Photochem. Photobiol. B*, **10**, 23-40.
75. Van Raamsdonk, C. D., K. G. Griewank, M. B. Crosby, M. C. Garrido, S. Vemula, T. Wiesner, A. C. Obenauf, W. Wackernagel, G. Green, N. Bouvier, M. M. Sozen, G. Baimukanova, R. Roy, A. Heguy, I. Dolgalev, R. Khanin, K. Busam, M. R. Speicher, J. O'Brien and B. C. Bastian (2010) Mutations in GNA11 in uveal melanoma. *N. Engl. J. Med.*, **363**, 2191-2199.
76. Van Raamsdonk, C. D., V. Bezrookove, G. Green, J. Bauer, L. Gaugler, J. M. O'Brien, E. M. Simpson, G. S. Barsh and B. C. Bastian (2009) Frequent somatic mutations of GNAQ in uveal melanoma and blue naevi. *Nature*, **457**, 599-602.
77. Besaratinia, A. and G. P. Pfeifer (2011) Uveal melanoma and GNA11 mutations: a new piece added to the puzzle. *Pigment Cell Melanoma Res.*, **24**, 18-20.
78. Hu, D. N., S. A. McCormick, R. Ritch and K. Pelton-Henrion (1993) Studies of human uveal melanocytes in vitro: isolation, purification and cultivation of human uveal melanocytes. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **34**, 2210-2219.
79. Yang, W. (2011) Surviving the sun: repair and bypass of DNA UV lesions. *Protein Sci.*, **20**, 1781-1789.
80. Sertic, S., S. Pizzi, F. Lazzaro, P. Plevani and M. Muzi-Falconi (2012) NER and DDR: classical music with new instruments. *Cell Cycle*, **11**, 668-674.
81. Kraemer, K. H., M. M. Lee and J. Scotto (1984) DNA repair protects against cutaneous and internal neoplasia: evidence from xeroderma pigmentosum. *Carcinogenesis*, **5**, 511-514.
82. Kraemer, K. H., D. D. Levy, C. N. Parris, E. M. Gozukara, S. Moriwaki, S. Adelberg and M. M. Seidman (1994) Xeroderma pigmentosum and related disorders: examining the linkage between defective DNA repair and cancer. *J. Invest. Dermatol.*, **103**, 96S-101S.
83. Aoyagi, M., N. Morishima, Y. Yoshino, N. Imagawa, M. Kiyosawa, M. Ito, S. Kondou and O. Matsubara (1993) Conjunctival malignant melanoma with xeroderma pigmentosum. *Ophthalmologica*, **206**, 162-167.
84. Mehta, C., C. N. Gupta and M. Krishnaswamy (1996) Malignant melanoma of conjunctiva with xeroderma pigmentosa--a case report. *Indian J. Ophthalmol.*, **44**, 165-166.
85. Benatiya Andaloussi, I., M. Abdellaoui and H. Tahri (2012) [Conjunctival melanoma and xeroderma pigmentosum, a rare association]. *Bull. Soc. Belge Ophtalmol.*, **1**, 17-21.
86. Johnson, M. W., G. L. Skuta, M. C. Kincaid, C. C. Nelson and J. R. Wolter (1989) Malignant melanoma of the iris in xeroderma pigmentosum. *Arch. Ophthalmol.*, **107**, 402-407.
87. Kraemer, K. H., M. M. Lee and J. Scotto (1987) Xeroderma pigmentosum. Cutaneous, ocular, and neurologic abnormalities in 830 published cases. *Arch. Dermatol.*, **123**, 241-250.
88. Garland, C. F., E. D. Gorham, S. B. Mohr and F. C. Garland (2009) Vitamin D for cancer prevention: global perspective. *Ann. Epidemiol.*, **19**, 468-483.
89. Giovannucci, E., Y. Liu, E. B. Rimm, B. W. Hollis, C. S. Fuchs, M. J. Stampfer and W. C. Willett (2006) Prospective study of predictors of vitamin D status and cancer incidence and mortality in men. *J. Natl. Cancer Inst.*, **98**, 451-459.

90. Grant, W. B. and C. F. Garland (2006) The association of solar ultraviolet B (UVB) with reducing risk of cancer: multifactorial ecologic analysis of geographic variation in age-adjusted cancer mortality rates. *Anticancer Res.*, **26**, 2687-2699.
91. Boscoe, F. P. and M. J. Schymura (2006) Solar ultraviolet-B exposure and cancer incidence and mortality in the United States, 1993-2002. *BMC Cancer*, **6**, 264.
92. Grant, W. B. (2007) An ecologic study of cancer mortality rates in Spain with respect to indices of solar UVB irradiance and smoking. *Int. J. Cancer*, **120**, 1123-1128.
93. Tang, J. Y., T. Fu, E. Leblanc, J. E. Manson, D. Feldman, E. Linos, M. Z. Vitolins, N. C. Zeitouni, J. Larson and M. L. Stefanick (2011) Calcium plus vitamin D supplementation and the risk of nonmelanoma and melanoma skin cancer: post hoc analyses of the women's health initiative randomized controlled trial. *J. Clin. Oncol.*, **29**, 3078-3084.
94. Godar, D. E., R. J. Landry and A. D. Lucas (2009) Increased UVA exposures and decreased cutaneous Vitamin D(3) levels may be responsible for the increasing incidence of melanoma. *Med. Hypotheses*, **72**, 434-443.
95. Lehmann, B. (2009) Role of the vitamin D_3 pathway in healthy and diseased skin--facts, contradictions and hypotheses. *Exp. Dermatol.*, **18**, 97-108.
96. Levine, J. A., M. Sorace, J. Spencer and D. M. Siegel (2005) The indoor UV tanning industry: a review of skin cancer risk, health benefit claims, and regulation. *J. Am. Acad. Dermatol.*, **53**, 1038-1044.
97. Weinstock, M. A. and D. E. Fisher (2010) Indoor ultraviolet tanning: what the data do and do not show regarding risk of melanoma and keratinocyte malignancies. *J. Natl. Compr. Canc. Netw.*, **8**, 867-872; quiz 873.
98. Diffey, B. (2011) Ultraviolet A sunbeds and vitamin D. *J Am. Ac*

Rapport-Gratuit.com