

## **Chapitre III : Discussion**

### **3.1 Discussion**

Le but de mes travaux de maîtrise était de caractériser un substitut choroïdien reconstruit par la méthode d'auto-assemblage du génie tissulaire. Ces substituts pourraient servir de modèles d'études ou comme supports lors de greffes d'EPR afin de traiter la DMLA. Bien que l'auto-assemblage ait été utilisé pour produire toute une panoplie de tissus tels que la peau (Michel et al. 1999), la cornée (Proulx et al. 2010), des vaisseaux sanguins (L'Heureux et al. 1998) et même du tissu osseux (Galbraith et al. 2017), la choroïde n'a jamais été reconstruite auparavant de cette manière.

#### **3.1.1 Les SCR comme modèle d'études**

Les modèles 3D permettent d'étudier les interactions dynamiques et réciproques des cellules dans un environnement 3D récapitulant la composition et l'architecture de la MEC *in vivo*. L'importance d'un tel environnement a été constatée dans le cadre des études sur les cellules de l'EPR. Il est en effet connu que ces dernières doivent être cultivées en présence d'une membrane basale (Kuznetsova et al. 2014, Forest et al. 2015) dont la structure devrait mimer au mieux celle de la MBr, afin de se différencier et d'accomplir leurs fonctions. Par exemple, en ensemençant des cellules de l'EPR humaines fœtales sur un support poreux recouvert de laminine, il a été possible de créer un ingénieux modèle mimant plusieurs aspects de la formation de druses et l'activation du complément (Johnson et al. 2011). Quelques modèles plus complets utilisant également des CEV en coculture avec des cellules de l'EPR et ayant recours à des membranes synthétiques ou biologiques ont également été introduits (Fan et al. 2002, Hamilton et al. 2007). Cependant, à notre connaissance, il n'existe aucun modèle basé sur un stroma choroïdien.

##### **3.1.1.1 Forces de l'étude**

Plusieurs propriétés de nos SCR en font d'excellents candidats pour la production de modèles 3D biomimétiques. Tout d'abord, ils ont été reconstruits sans matériel exogène, et à partir de FSC humains. Le fait que les cellules aient sécrété leur propre matrice par la suite incorporée dans le microenvironnement cellulaire est probablement à l'origine de la similarité de la composition de la MEC reconstruite avec celle retrouvée *in vivo* (selon nos résultats en spectrométrie de masse et par immunomarquages). De plus, les propriétés

biomécaniques des tissus à la rupture, à savoir l'élasticité, la résistance à la traction et la déformation, étaient elles aussi semblables. Puisque les stimuli mécaniques interviennent dans la signalisation cellulaire (par exemple la mécanotransduction), il ne peut qu'être bénéfique que les deux types de tissus soient comparables sur ce point. Ensuite, la biocompatibilité du tissu est un autre avantage de nos SCR. Ainsi, les cellules de l'EPR ont proliféré sur le support et ont formé une monocouche, de la même manière que dans le tissu natif. Une pseudo-vascularisation ainsi qu'une repigmentation des SCR ont également été observées suite à l'ajout d'HUVEC et de MCN, ce qui rapproche nos substituts d'une choroïde native. Finalement, il est facile d'extraire les cellules choroïdiennes et de les cultiver (comparativement à l'isolement des cellules de l'EPR qu'il faudra optimiser). Par exemple, une choroïde entière peut donner environ 8 millions de FSC au premier passage et donc une quarantaine de SCR.

### **3.1.1.2 Limites de l'étude**

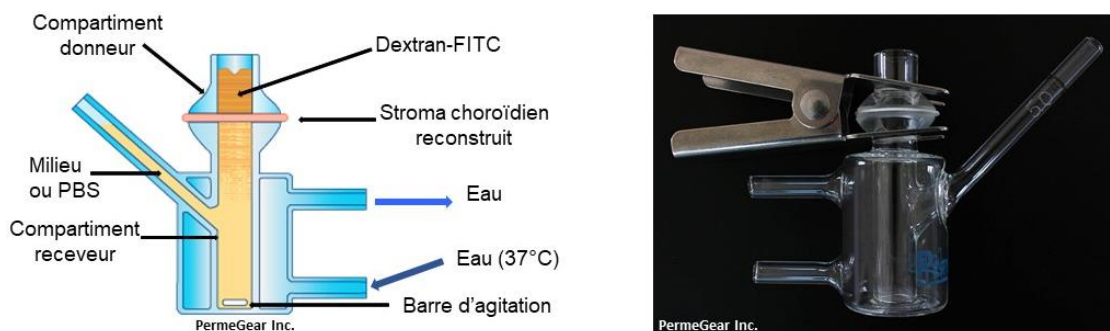
Toutes les cellules choroïdiennes n'ont pas été isolées. Les NIC en particulier seraient difficiles à extraire et à intégrer dans notre modèle puisque la culture de neurones est un défi. Un autre problème réside dans l'approche même de la culture cellulaire. Ainsi, les capacités prolifératives et contractiles des cellules ont été modifiées avec notamment l'ajout de sérum bovin, conduisant alors à une augmentation de la contractilité des SCR et à la perte d'au moins 60% de leur surface initiale une fois détachés de leur ancrage en papier. Il est aussi connu que la culture à 21% O<sub>2</sub> induit du stress hyperoxique dans les cellules et influencent leur comportement ; c'est le cas par exemple des MCN (Weidmann et al. 2017). Il faudrait donc réduire la concentration en oxygène pour nos cultures choroïdiennes étant donné qu'elle est d'environ 8% dans la choroïde des primates *in vivo* (Birol et al. 2007). L'absence d'une MBr pourrait également influencer les résultats des études effectuées en utilisant nos SCR. La MBr se forme durant l'embryogenèse et l'EPR et la choroïde co-interviennent vraisemblablement dans la production des protéines la composant (Booij et al. 2010, Curcio et Johnson 2013). Il serait difficile de reproduire sa structure pentalaminaire si particulière sans introduire de matériel exogène. Il se pourrait que de nouvelles avancées de la bio-impression 3D permettent d'obtenir un tel modèle complexe en multicouches. Néanmoins, il est encourageant que les cellules de l'EPR puissent adhérer et proliférer sur nos stromas.

### 3.1.1.3 Perspectives

Il sera intéressant d'ajouter les cellules de l'EPR, les MCN et les CEV choroïdiennes ensemble dans un même stroma afin d'obtenir un substitut plus fidèle. Il se pourrait d'ailleurs que cela agisse sur la contractilité de la matrice puisque l'absence de la signalisation paracrine est possiblement l'un des inducteurs de la contractilité (Tschumperlin 2013). Se passer de sérum sera aussi une option à explorer. Non seulement cela ressemblerait plus aux conditions observées *in vivo*, mais cela réduirait également la contractilité (Peterson et Burridge 2001, Tschumperlin 2013). Des équipes du LOEX s'attellent justement à l'étude de l'utilisation de facteurs spécifiques comme alternative à l'utilisation de sérum bovin. Un protocole optimisé de culture de chacun des types cellulaires sera également à établir. La méthode de culture « calcium-switch » est par exemple utilisée pour faire différencier l'EPR. Il s'agit de les cultiver dans un milieu pauvre en sérum avant de substituer ce dernier par un milieu riche en calcium (Rak et al. 2006). La quantité de MCN à ensemercer sera également à optimiser puisque le ratio fibroblastes/MCN influe sur la pigmentation lors d'une coculture (Smith-Thomas et al. 1996). Aussi, il faudra étudier la vascularisation des SCR en utilisant des CEV choroïdiennes transfectées pour qu'elles expriment la GFP (ce qui permet de suivre la vascularisation). Les HUVEC forment des pseudo-vaisseaux même dans les matrices synthétiques du moment qu'elles sont incorporées dans un environnement 3D (Gagnon et al. 2002, Kim et al. 2017) et il existe d'importantes différences dans l'expression génique des HUVEC et des CEV choroïdiennes (Browning et al. 2012). Nous utiliserons donc les CEV choroïdiennes afin de générer un modèle encore plus représentatif. Ensuite, puisqu'on sait que les propriétés de la macula sont différentes du reste de la rétine, il sera intéressant de fabriquer des stromas avec, par exemple, une MEC plus poreuse et de les comparer à des SCR plus caractéristiques de la choroïde sous-jacente à la rétine périphérique. L'une des propriétés caractéristiques de la choroïde est sa haute perméabilité aux macromolécules (Moore et Clover 2001). Il est possible d'étudier cette propriété en utilisant une cellule de Franz (Franz 1975, Michel et al. 1993). Les SCR seront placés entre deux compartiments (donneur/receveur) tandis que du dextran-FITC de différents poids moléculaires (jusqu'à 200 kDa) sera ajouté dans le compartiment donneur (voir figure 3.1). En récoltant à différents temps le milieu dans le compartiment receveur, il sera possible de suivre la

cinétique de diffusion du dextran-FITC par spectrofluorimétrie. Il sera aussi intéressant d'évaluer la composition en fibres élastiques des SCR et de la comparer aux choroïdes natives.

Finalement, nous avons isolés au laboratoire des cellules choroïdiennes de donneurs présentant des druses visibles au microscope binoculaire. Il sera donc possible de les utiliser pour reconstruire une « choroïde DMLA ».



**Figure 3.1 Une cellule de Franz avec enceinte thermostatique.** Le dextran-FITC sera déposé dans le compartiment dit « donneur ». La molécule diffusera ensuite à travers les stromas reconstruits et sera recueillie dans le compartiment dit « receveur ». La solution contenue dans ce compartiment est prélevée à intervalle de temps régulier afin de doser le pourcentage de dextran-FITC ayant diffusé.

### **3.1.2 Translation vers la clinique : Les SCR comme supports en vue de greffe de l'EPR**

La DMLA est la principale cause de cécité centrale dans les pays industrialisés et touche plus de 600 millions de personnes à l'échelle mondiale (Wong et al. 2014). C'est une maladie associée à un important fardeau socio-économique alors qu'il est projeté que le nombre de personnes touchées va croître étant donné l'augmentation de l'espérance de vie dans la plupart des pays. Elle est causée par un ensemble de facteurs génétiques et environnementaux (Ambati et Fowler 2012).

La greffe de cellules de l'EPR constitue une thérapie prometteuse afin de traiter la DMLA sèche ou humide (section 1.6.2). Bien que le concept ait été introduit assez tôt, la greffe n'a pas connu le succès qu'on lui prédisait. Il est probable que ce soit dû à la nécessité d'un support sur lequel les cellules de l'EPR seraient déjà polarisées et capables d'effectuer des tâches complexes telles que la phagocytose et le cycle visuel. Plusieurs équipes ont déjà

tenté d'en synthétiser ou d'utiliser des membranes biologiques (revue de (Binder et al. 2007, Heller et Martin 2014, Jha et Bharti 2015)). Nous proposons d'utiliser les SCR, non seulement comme supports mais également en remplacement de la choroïde rétrofovéolaire.

Une des forces de nos substituts choroïdiens réside dans la similitude des SCR avec la choroïde native (c'est-à-dire la MEC et les propriétés biomécaniques), leur biocompatibilité et leur caractère endogène. Les feuillets dermiques produits par auto-assemblage sont greffés aux grands brûlés depuis plusieurs années ce qui prouve leur innocuité en termes d'absence de rejet (lorsqu'autologues) et d'effets secondaires (plusieurs études cliniques ont été menées au LOEX, par exemple ClinicalTrials.gov #NCT02350205). Puisque la choroïde d'un patient atteint de DMLA est elle aussi dysfonctionnelle, greffer les cellules de l'EPR adhérees sur les SCR représente une nouvelle approche thérapeutique avec du potentiel. Même s'il est peu probable qu'elle conduise à la formation de CC dont l'architecture est très particulière, la revascularisation est possible ce qui serait particulièrement positif pour les patients atteints de DMLA sèche dont les vaisseaux choroïdiens s'atrophient (Ambati et al. 2013). Les cellules de l'EPR seraient ainsi différenciées avant la transplantation ce qui augmenterait les chances de succès. Les SCR sont également manipulables et résistants. Finalement, leur épaisseur est modulable en jouant sur le nombre de feuillets empilés. Une étude effectuée chez le lapin démontre qu'une greffe de choroïde/EPR d'épaisseur partielle entraîne moins de complications et une revascularisation plus rapide qu'une greffe pleine épaisseur. Une explication possible est que les nutriments diffusent plus facilement à travers le tissu si son épaisseur est réduite de moitié (Hu et al. 2008).

L'importante contraction des SCR est une limite à considérer pour sa future utilisation clinique. Il serait cependant possible de la contourner en découpant les stromas et en les laissant totalement se contracter avant d'ensemencer les cellules de l'EPR. Nous ignorons cependant si les SCR vont se détendre après quelques jours ou une fois implantés *in vivo*. Il est toutefois possible d'étudier ce phénomène chez le lapin. Cela nous permettra également de découvrir si un remodelage rapide va se produire et changer la nature initiale du tissu. Si

la réduction du pourcentage de sérum n'entraîne pas la diminution de l'expression de la fibronectine, de la tenascin C et de l' $\alpha$ -SMA, il faudra également vérifier qu'il n'y aura pas d'effets secondaires post-greffe associés à la surexpression de ces protéines. Les peaux reconstruites expriment la tenascin C, se contractent également et peuvent perdre jusqu'à 30% de leur surface initiale sans que cela n'affecte leur intégration (Gauvin et al. 2013, Beaudoin Cloutier et al. 2015, Larouche et al. 2016). Il est possible qu'une fois dans des conditions physiologiques, les cellules n'aient plus un phénotype cicatriciel.

La greffe des cellules de l'EPR ensemencées sur SCR chez le lapin, un des meilleurs modèles animaux en ce qui concerne les transplantations d'EPR (voir 1.6.6.2) (Alexander et al. 2015), permettra de répondre aux questions soulevées. Cela pourra aussi servir à étudier les possibles réactions de rejet. Il faudra également vérifier si la culture *in vitro* induit des modifications épigénétiques et de l'instabilité génomique lors des passages avant la greffe. L'étude de la différenciation des cellules de l'EPR sur les SCR sera également effectuée. Utiliser des cellules de donneurs plus jeunes sera également une piste à explorer puisque la DMLA est une maladie dégénérative survenant avec l'âge.

### **3.2 Conclusion**

Mes travaux de maîtrise visaient à fabriquer des substituts choroïdiens afin de les utiliser comme modèles d'études ou comme supports lors de greffe de l'EPR. L'extraction des cellules pures de la choroïde constituait la première étape puisque nous avons utilisé une approche de « déconstruction-reconstruction ». Les cellules de l'EPR pures ont également été isolées puisqu'elles sont en interaction très étroite avec la choroïde *in vivo*. Les FSC ont servi, pour la première fois, à la fabrication d'un stroma choroïdien dont la composition de la MEC de même que les propriétés biomécaniques sont semblables à celles des choroïdes natives. La biocompatibilité des stromas a finalement été testée en y ensemencant des cellules de l'EPR, des HUVEC et des MCN. Les cellules de l'EPR se sont organisées en monocouche sur ces derniers, rappelant la structure qu'elles forment *in vivo*, tandis qu'une pseudo-vascularisation s'est établie après l'ajout des HUVEC. Finalement, les SCR ont pigmenté après l'ensemencement des MCN.

Mon étude a en conséquence démontré que les substituts choroïdiens miment les caractéristiques structurales de la choroïde native et également plusieurs de ses caractéristiques fonctionnelles. Ils pourront servir de modèles 3D choroïdiens qui à ce jour sont inexistantes. En permettant d'en savoir plus sur les interactions cellules choroïdiennes-cellules choroïdiennes et/ou cellules choroïdiennes/cellules de l'EPR, ils serviront en outre à élucider les mécanismes cellulaires et moléculaires à l'origine de la DMLA, une maladie causant la perte irréversible de la vision centrale et touchant des millions de personnes notamment dans les pays industrialisés. Ils pourront également servir de support tissulaire à la monocouche d'EPR en vue d'une greffe, toujours dans l'espoir de guérir les patients atteints de DMLA. Les substituts choroïdiens ont donc une utilité autant en recherche fondamentale que clinique.