

1.4.2 La dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA)

1.4.2.1 Épidémiologie de la DMLA et facteurs de risque

La DMLA est la principale cause de perte de vision centrale chez les personnes âgées dans les pays industrialisés et de façon globale, la troisième derrière la cataracte et le glaucome (W.H.O. 2017). Il était estimé en 2014 que 8,7% de la population mondiale était atteinte de la DMLA et qu'en 2040, le nombre projeté de personnes avec la maladie atteindrait 288 millions (Wong et al. 2014) étant donné l'augmentation de l'espérance de vie de la population. C'est une maladie chronique et évolutive d'origine multifactorielle pour laquelle des facteurs environnementaux et génétiques sont mis en cause.

L'âge est un facteur de risque et la maladie s'annonce généralement dans la soixantaine (Swaroop et al. 2009). La prévalence augmente avec l'âge, quelles que soient l'origine ethnique et la région géographique. Cependant, la fréquence de la DMLA est plus élevée chez les personnes d'origine européenne et chez celles vivant en Europe ou en Amérique du Nord (Ho et al. 2013, Wong et al. 2014). Avoir des membres de la famille atteints de la DMLA est un autre facteur de risque (revue de (Gorin 2012)) et le fait de fumer est le facteur environnemental déclenchant/aggravant le plus important (voir section 1.4.3.2).

1.4.2.2 Description clinique de la DMLA

La forme précoce, asymptomatique, est caractérisée par des anomalies de la pigmentation de la macula et l'apparition de druses, des dépôts de débris extracellulaires entre la membrane basale des cellules de l'EPR et la MBr. La MBr s'épaissit également (Holz et al. 2014, Nazari et al. 2015). La maladie peut ensuite progresser vers deux types (Figure 1.7) : la forme humide ou DMLA exsudative qui est due à la croissance anormale de nouveaux vaisseaux sanguins choroïdiens (NVC : néo-vascularisation choroïdienne) et la forme sèche ou DMLA atrophique pour laquelle il n'y a pas de vaisseaux sanguins envahissant la rétine (Ambati et Fowler 2012).

Dans la forme humide, les CEV sont stimulées par la sécrétion accrue de facteurs angiogéniques et vont migrer, proliférer et produire des MMP qui vont lyser la MBr (Binder et al. 2007). Elles vont ensuite la traverser et se développer sous la rétine ou l'EPR. La fragilité des vaisseaux et l'absence d'une barrière hémato-oculaire conduisent à des

fuites de liquide séreux ou de sang se traduisant par des hémorragies sous-rétiniennes ou intra-rétiniennes ainsi que des œdèmes (Swaroop et al. 2009, Cheung et Eaton 2013). Ces fluides vont entraîner des décollements de l'EPR ou de la rétine neurosensorielle et donc des distorsions des lignes droites appelées métamorphopsies, l'un des premiers symptômes de cette DMLA (Figure 1.8). Un autre phénotype clinique est la DMLA dite disciforme, dans laquelle du tissu fibro-vasculaire contenant de l'EPR dédifférencié et ayant acquis un phénotype (myo)fibroblastique prolifère et remplace la rétine neurosensorielle, aboutissant ainsi à une cicatrice en forme de disque et une atrophie du tissu chorio-rétinien (S.N.O.F. , Jalkh et al. 1990, Kent et Sheridan 2003, Swaroop et al. 2009). La DMLA humide, bien que plus rare (environ 10-15% des cas), est plus agressive et de progression extrêmement rapide. Non traitée, elle peut conduire à la cécité centrale en quelques mois. Ses complications causent ainsi approximativement 80-90% des cas de cécité légale (S.N.O.F. , Ferris et al. 1984, Ambati et Fowler 2012, Purves et al. 2012, Holz et al. 2014). Il est rare que les patients perdent leur vision périphérique (Zarbin 2004).

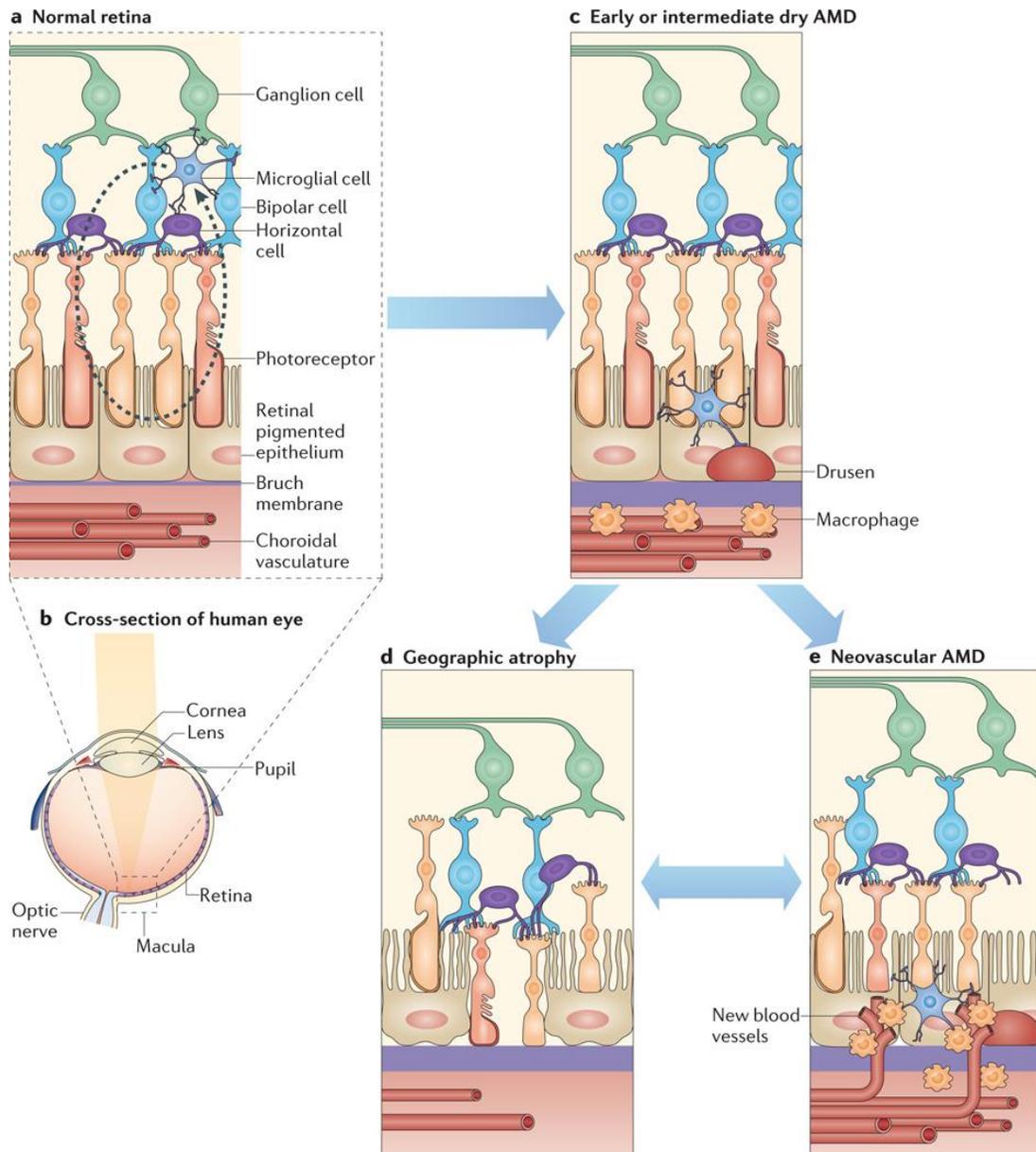


Figure 1.7 Schémas de rétines normale ou atteinte de DMLA. L'anatomie de la rétine normale (a) et atteinte de la DMLA précoce/intermédiaire (c), atrophique (d) ou exsudative (e). La MBR s'épaissit et des druses se forment au stade précoce. L'atrophie des cellules de l'EPR et des CC est associée à une régression des druses. Des vaisseaux nouvellement formés infiltrent la rétine dans la DMLA exsudative. En b, une coupe sagittale d'un œil humain. Tirée de (Ambati et al. 2013).

La DMLA de type sec se remarque initialement par des trous dans les images, comme si des lettres disparaissaient d'un texte (Jong 2006). Son évolution est beaucoup plus lente et peut s'étendre sur plusieurs années. Elle se finit au stade avancé en atrophie géographique (AG), c'est-à-dire des régions confluentes où l'EPR s'est atrophié. La perte des cellules de

l'EPR s'accompagne de la dégénérescence des CC et des photorécepteurs sous-jacents (Ambati et Fowler 2012, Bhutto et Lutty 2012).

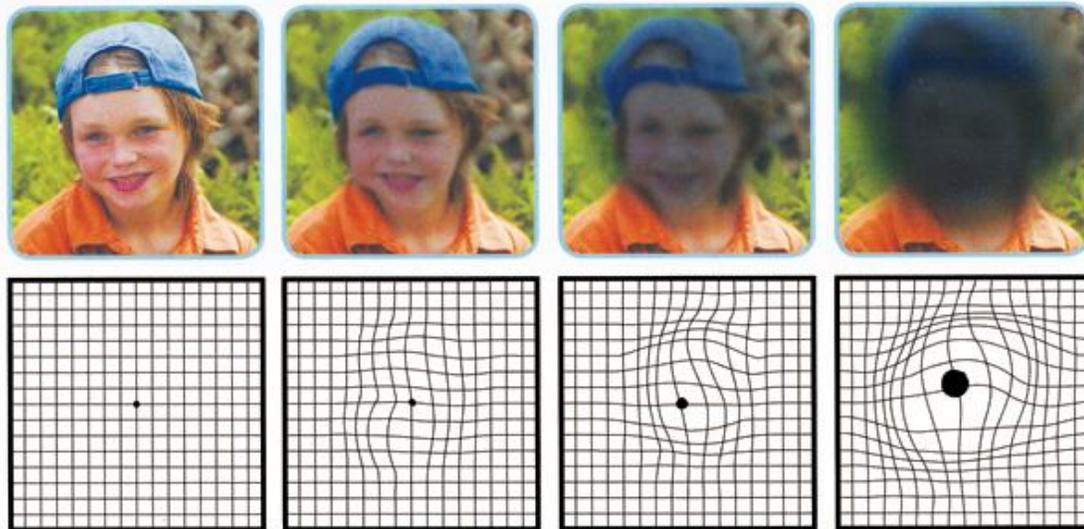


Figure 1.8 Simulation de la vision d'un patient atteint de la DMLA humide. Les lignes droites deviennent irrégulières et ondulées (métamorphopsie) puis la vision centrale est perdue au stade avancé. Chippewa Valley Eye Clinic. <http://cv-eye.com/procedures/retina/macular-degeneration/>

1.4.2.3 DMLA exsudative vs DMLA atrophique

La DMLA est donc traditionnellement divisée en deux formes. Cependant, de nouvelles études indiquent que les mécanismes les causant seraient les mêmes, avec des modifications moléculaires et cellulaires ainsi que des facteurs de risques génétiques communs, et ce, malgré des signes cliniques considérablement différents (Ambati et Fowler 2012, Holz et al. 2014, Nazari et al. 2015). Aussi, les deux stades avancés peuvent se recouper. Un patient peut avoir la NVC dans un œil et l'AG dans l'autre. Un patient atteint d'AG peut également présenter des lésions néovasculaires à la périphérie des zones atrophiées, dans les parties épargnées et sans atrophie, ou dans les zones avec des CC intacts (Schatz et McDonald 1989, Sunness et al. 1999). De même, la régression du tissu néovasculaire est associée à la forme cicatricielle de la DMLA exsudative et peut ressembler à une AG (Bressler et al. 1988, Jalkh et al. 1990). Diviser la DMLA sur la base clinique reste cependant approprié puisque les manifestations cliniques (Figure 1.9) et les traitements ne sont pas les mêmes.

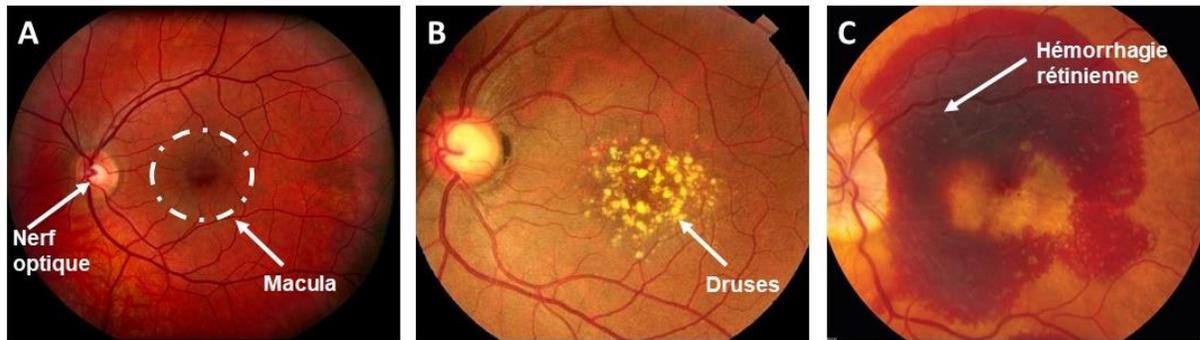


Figure 1.9. Images par rétinographe de fonds d'œil. L'œil (A) est normal tandis que les images (B) et (C) proviennent de patients atteints de la DMLA sèche ou humide respectivement. Eye Physicians of North Houston. <http://1960eye.com/macular-degeneration>

1.4.3 Pathophysiologie de la DMLA

1.4.3.1 Les dépôts basaux et les druses

Les druses sont considérées comme l'une des caractéristiques principales de la DMLA même si on les retrouve dans certains cas chez les rétines âgées normales (Rudolf et al. 2008, Ardeljan et Chan 2013). Ce sont des agrégats de protéines intracellulaires, extracellulaires et sécrétées dont la vitronectine, l'albumine sérique, l'apolipoprotéine E et le TIMP3, des agrégats de dépôts amyloïdes et des débris lipidiques et cellulaires retrouvés entre la membrane basale de l'EPR et la MBr (Sarks 1976, Green et Enger 1993, Crabb et al. 2002). Les druses dites « dures » ressemblant à des points jaunes, sont généralement d'un diamètre inférieur à 63 μm et ont des délimitations bien définies. Ce sont ces types de druses que l'on retrouve à la fois dans les rétines vieillissantes ainsi que dans les rétines atteintes de DMLA (Klein et al. 1992, Klein et al. 1997, Buch et al. 2005, Ardeljan et Chan 2013). Elles sont présentes dans la macula et dans la périphérie (Rudolf et al. 2008). Les druses « molles » sont par contre restreintes à la macula, sont plus grandes (diamètre > 125 μm) et ont des bords plus flous et indistincts. Elles ont une structure moins compacte et sont plus fragiles aux traitements chimiques lors des manipulations et études. Elles contiennent des pools considérables de cholestérol (Malek et al. 2003). Il existe également des dépôts basaux du côté interne de la membrane basale de l'EPR et dans la membrane de Bruch. Les druses molles tendent à fusionner.

Le nombre de druses, leur taille et la superficie qu'elles couvrent sont des facteurs de risque de la DMLA (Sarks 1982, Macular Photocoagulation Study 1997, Klein et al. 2002, Age-

Related Eye Disease Study Research 2005). On ignore encore exactement leur rôle précis dans la pathophysiologie de la DMLA. Certains pensent que les druses sont du matériel incomplètement digéré par l'EPR du fait du fardeau phagocytaire et qui se trouve incapable de traverser la MBr pour être éliminé par les CC (Farkas et al. 1971, Bok 2002). Cela expliquerait pourquoi les druses se forment davantage dans la macula, étant donné la forte densité des photorécepteurs dans cette zone (Booij et al. 2010). Les druses créeraient un stress sur l'EPR en entravant le transport des macromolécules et par l'oxydation des lipoprotéines qu'elles contiennent (Curcio et Johnson 2013). Un rôle des druses dans l'inflammation pouvant mener à la DMLA sera évoqué plus tard (section 1.4.3.4).

1.4.3.2 Le stress oxydant

Comme mentionné à plusieurs reprises, l'EPR et la rétine sont soumis à un stress oxydant chronique du fait d'une exposition à la lumière continue, d'une très forte demande énergétique, d'une pression partielle en oxygène élevée et de la peroxydation lipidique des membranes des disques des segments externes. Bien qu'ils soient riches en antioxydants enzymatiques et non enzymatiques, avec l'âge, la capacité antioxydante diminue de même que l'efficacité des systèmes de réparation. Par exemple, les caroténoïdes maculaires (la lutéine et la zéaxanthine), l'activité de la catalase, la glutathione S-transférase et la vitamine E déclinent (Liles et al. 1991, Friedrichson et al. 1995, Beatty et al. 2001, Maeda et al. 2005). Les niveaux de ROS augmentent alors, ce qui crée un environnement propice aux dommages aux protéines, lipides et ADN. Il est probable que la réponse soit exacerbée dans la DMLA comparée au vieillissement normal (Ardeljan et Chan 2013). Des marqueurs de stress oxydatif sont ainsi plus élevés dans le sérum de patients atteints de DMLA (Totan et al. 2009, Venza et al. 2012). Aussi, des modèles de souris déficientes en gènes de la voie enzymatique antioxydante développent des pathologies rétiniennes ressemblant à la DMLA (Imamura et al. 2006, Zhao et al. 2011). Finalement, des études récentes suggèrent que des déficiences dans les voies de réparation de l'ADN mitochondrial (ADNmt) contribuent de façon importante à la pathogenèse de dégénérescences rétiniennes à cause du stress oxydant, et des polymorphismes de l'ADNmt ont été associés à la DMLA (Feher et al. 2006, Udar et al. 2009, Karunadharma et al. 2010).

Enfin, le tabagisme est le facteur environnemental invariablement associé au risque d'être atteint de la DMLA et il est lié à une production plus importante de ROS (Seddon et al.

1996, Smith et al. 1996, Mitchell et al. 2002). L'exposition à la lumière n'est pas par contre associée de façon systématique à la DMLA d'un point de vue épidémiologique. Des études expérimentales ont cependant démontré une perte de viabilité des cellules de l'EPR après irradiation avec des rayons ultraviolets UVA, UVB et la lumière bleue (≈ 430 nm). Cette dernière entraîne elle aussi la surproduction de ROS et, à des faibles doses chroniques, altèrent le profil mitochondrial et la formation de produits glyqués (voir section 1.4.3.3) ce qui suggère un rôle dans la DMLA (Roehlecke et al. 2009).

1.4.3.3 Les débris intracellulaires

La lipofuscine est un agrégat protéique/lipidique granulaire qui s'accumule progressivement dans les lysosomes des cellules post-mitotiques métaboliquement actives (Terman et Brunk 1998, Murdaugh et al. 2011), incapables de la diluer par division cellulaire (Höhn et Grune 2013). C'est un pigment considéré comme un marqueur de sénescence cellulaire. Sa présence est corrélée à plusieurs maladies liées à l'âge (Beatty et al. 2000). Dans l'EPR, la lipofuscine peut occuper jusqu'à 19% du volume cytoplasmique (Feeney-Burns et al. 1984), est généralement concentrée au niveau basal (Hogan et al. 1971) et est contenue dans les lysosomes secondaires. De plus, chez des donneurs âgés, la lipofuscine forme des complexes avec la mélanine. On appelle ces agrégats la mélanolipofuscine (Feeney-Burns et al. 1984, Bieseimer et al. 2011).

La lipofuscine dans l'œil résulte de la dégradation incomplète des segments externes des photorécepteurs et de l'élimination autophagique des organites intracellulaires vieux ou endommagés (Kennedy et al. 1995, Beatty et al. 2000) qui persistent et finissent par devenir cytotoxiques. On retrouve de nombreux dérivés rétinoides (Eldred et Lasky 1993, Parish et al. 1998, Fishkin et al. 2004) générés par des réactions aléatoires non enzymatiques, des adduits lipidiques et des produits issus de la peroxydation lipidique (Schutt et al. 2003, Sparrow et Boulton 2005, Ng et al. 2008). La nature aléatoire de la production des pigments de la lipofuscine leur permet justement d'échapper à la digestion lysosomale d'où leur accumulation (Ardeljan et Chan 2013). C'est leur fluorescence qui explique l'autofluorescence jaune dorée de la lipofuscine (et donc celle de l'EPR si caractéristique) lorsqu'excitée par des longueurs d'onde courtes (Boulton 2013). Le N-rétinylidène-N-

rétinyléthanolamine ou A2E, un bis-rétinoïde, est le fluorophore de la lipofuscine le mieux caractérisé.

Les produits photooxydés des bis-rétinoïdes de la lipofuscine déclenchent l'activation du complément (voir 1.4.3.4). Aussi, l'exposition à la lumière, particulièrement la lumière bleue, a des effets délétères sur les cellules de l'EPR gorgées de lipofuscine. En effet, la photooxydation des bis-rétinoïdes est toxique, entraîne la mort des cellules de l'EPR ainsi que la formation de produits glyqués ou AGE (*advanced glycation end products*) (Sparrow et al. 2012). Les AGE modifient par des réactions parfois irréversibles les propriétés biomécaniques et fonctionnelles de biomolécules et sont impliqués dans le diabète et plusieurs maladies liées à l'âge. Les ROS peuvent de même accélérer la formation de AGE (Gkogkolou et Böhm 2012). Des protéines modifiées par des AGE sont d'ailleurs détectées dans les druses notamment des CEP (2-(ω -carboxyethyl)pyrrole), des modifications protéiques spécifiques dérivant de l'oxydation des lipides contenant de l'acide docosahexaénoïque (Crabb et al. 2002).

1.4.3.4 Dérégulation immunologique

Le complément ou système du complément fait partie de la réponse immunitaire innée. C'est un groupe d'au moins 20 protéines plasmatiques synthétisées dans le foie circulant sous forme de précurseurs inactifs. Lorsque stimulées par des facteurs comme la fixation d'anticorps sur des agents pathogènes, les protéases du complément activées peuvent cliver des facteurs protéiques spécifiques ce qui conduit à la libération de cytokines spécifiques et à l'activation séquentielle d'autres clivages. Le complément est donc une cascade biochimique qui « complète » les systèmes inné et adaptatif et accroît l'efficacité de presque tous les aspects de la réaction inflammatoire (Marieb et Hoehn 2010, Bhutto et Luty 2012). Des études d'association génétique pangénomique ont démontré qu'environ la moitié des formes héréditaires de la DMLA étaient dues à un seul polymorphisme d'un régulateur du complément, le facteur H. D'autres variants génétiques de membres du complément ont également été impliqués (revue de (Ambati et al. 2013)).

Aussi, le ratio de macrophages M1/M2 change avec l'âge et le débalancement entre les M1 qui sont pro-inflammatoires/anti-angiogéniques et les M2 anti-inflammatoires/pro-

angiogéniques aurait un rôle dans la DMLA. Les macrophages sont notamment activés dans la NVC. Beaucoup d'autres composantes du système immunitaire sont également mises en cause telles que la génération d'auto-anticorps dirigés contre les CEP et l'activation chronique des cellules microgliales de la rétine (Ardeljan et Chan 2013).

Les druses contiennent des protéines du complément et des facteurs pro-inflammatoires (Crabb et al. 2002) et des extraits de druses peuvent activer l'inflammasome (Doyle et al. 2012). Il y a également un important lien entre le stress oxydant et l'inflammation. En effet, l'inflammation peut générer du stress oxydant et réduire les capacités antioxydantes des cellules, tandis que la production de dérivés réactifs peut agir sur l'activité de gènes inflammatoires (Han et al. 2001, Khansari et al. 2009). Finalement, l'A2E active le complément, l'inflammasome, l'expression de cytokines et induit ainsi la dégénérescence de l'EPR (voir (Ambati et al. 2013)). De plus, l'accumulation d'AGE peut conduire à l'activation de facteurs de transcription impliqués dans la réponse immunitaire, de marqueurs d'adhésion de CEV et de facteurs pro-inflammatoires (voir (Ardeljan et Chan 2013)).

Tout cela a mené à un modèle tentant d'expliquer l'étiologie de la DMLA et son aspect multidimensionnel avec au cœur de la maladie, un dysfonctionnement immunitaire.

1.4.3.5 Modèle intégrateur de la DMLA

Dans les deux revues de (Ardeljan et Chan 2013) et (Ambati et al. 2013), la DMLA est considérée comme résultant d'une perte de l'homéostasie rétinienne perturbant la balance immunologique du tissu. Les facteurs de risque génétiques (gènes immunologiques et mitochondriaux notamment), métaboliques (lipofuscine, AGE, A2E, druses, etc.) et environnementaux (tabagisme, stress oxydatif) – facteurs étant par ailleurs tous très entrelacés et s'influençant mutuellement – vont, entraîner avec l'âge une accumulation de plus en plus importante d'éléments toxiques. Les mécanismes de protection antioxydante s'amenuisent également avec le temps, et les substances nocives vont finir par activer de façon chronique la réponse immunitaire. Dans la forme humide, la fonction de barrière hémato-rétinienne de l'EPR cesserait d'être efficace pour une quelconque raison et les macrophages de la circulation seraient recrutés dans un milieu pro-inflammatoire et

produiraient des substances comme le VEGF, d'où l'angiogenèse (Ambati et al. 2013). Il se pourrait également que les CC meurent ou deviennent anormaux dans un tel milieu toxique, ce qui rendrait les cellules de l'EPR hypoxiques. Ce sont ces dernières qui produiraient alors des substances angiogéniques pour pallier leur manque d'oxygène (Bhutto et Luttu 2012). Dans la DMLA de type sec, les cellules circulatoires immunitaires seraient incapables d'accéder à la rétine et la dégénérescence des cellules de l'EPR va résulter des produits toxiques qu'elles contiennent (Ambati et al. 2013). Cela expliquerait que la perte des CC soient secondaires dans cette DMLA (Bhutto et Luttu 2012, Ardeljan et Chan 2013).

Il reste néanmoins encore beaucoup d'inconnus quant aux mécanismes menant à la DMLA. Cependant, il est apparent que la relation entre les photorécepteurs, l'EPR, la choroïde (plus spécifiquement la MBr et les CC) est ébranlée dans la pathogenèse de la DMLA. C'est par contre le dysfonctionnement et la mort des photorécepteurs de la macula qui conduisent à la cécité centrale observée.

1.5 Les thérapies approuvées pour le traitement de la DMLA

La qualité de vie des patients atteints de la DMLA se trouve gravement réduite et certains sont même en proie à une dépression majeure. La DMLA est également associée à un important fardeau financier et socio-économique (Brown et al. 2005) sans cesse croissant. Il n'existe malheureusement pas de traitements curatifs et les options sont limitées quant aux traitements palliatifs et préventifs du fait de la nature multifactorielle et complexe de la maladie.

Inhiber l'action du VEGF, le plus important régulateur angiogénique de la NVC, est la méthode la plus efficace à ce jour contre la DMLA humide. Depuis une dizaine d'années, des antagonistes du VEGF tels que le Lucentis® (ranibizumab) et le Eylea® (aflibercept) sont ainsi utilisés sous forme d'injections afin de bloquer ce dernier dans l'espace extracellulaire. Cela empêche sa fixation sur les récepteurs des CEV et donc l'activation de ces dernières. Ces antagonistes détruisent non seulement les néo-vaisseaux préexistants, mais préviennent également la formation de nouveaux vaisseaux (Schmucker et al. 2012,

Kaiser 2013). Cependant, ils ne résolvent pas les causes à l'origine de la DMLA. De plus, ce traitement requiert des injections intra-vitréennes mensuelles avec les risques et dérangements associés, représentent un coût important pouvant atteindre des centaines de milliers de dollars et ne peuvent pas traiter les cas avancés (Steinbrook 2006, Yorston 2014). En conséquent, même s'il y a amélioration de l'AV pour certains patients, selon la posologie et le médicament utilisés, on détecte tout de même la présence de fluide sous-rétinien résiduel chez environ 30% des patients et un détachement de l'EPR pour environ la moitié d'entre eux, et ce, jusque deux ans après le début du traitement. L'amélioration de l'AV, qui n'est jamais restaurée complètement, va également dépendre des caractéristiques morphologiques de la rétine avant traitement et des particularités symptomatiques du patient (Waldstein et al. 2016). Finalement, approximativement un patient sur cinq recevant les traitements anti-VEGF développe une AG (Grunwald et al. 2014, Xu et al. 2015). Cela peut être dû au fait que le VEGF reste malgré tout un facteur de croissance dont les cellules ont besoin et que le bloquer résulterait en un dysfonctionnement de l'EPR et des CC.

Contrairement à la DMLA exsudative, il n'y a pas une unique molécule que l'on peut cibler pour la DMLA de type sec. Une option serait la prise de suppléments, à de fortes doses, de vitamines antioxydantes (vitamines C et E, et β -carotène) et de zinc, une combinaison établie par l'essai clinique AREDS-1 (Age-Related Eye Disease Study Research 2001) qui réduit légèrement le risque de progression de la DMLA du stade intermédiaire à la CNV et potentiellement à l'AG. Cet avantage ne touche cependant pas les personnes n'ayant pas la DMLA ou présentant quelques druses. L'étude a cependant été beaucoup critiquée quant à son protocole, ses résultats et ses tests statistiques, ainsi que pour les effets négatifs potentiels des fortes doses utilisées (Abramson et Abramson 2002, Ambati et Ambati 2002, Seigel 2002). Toujours dans l'optique de traiter le stress oxydant sous-jacent à la DMLA, AREDS-2 a voulu déterminer si l'ajout de lutéine/zéaxanthine et/ou d'acides gras oméga-3 au mélange préconisé par l'AREDS-1 diminuerait encore plus le risque de progresser au stade avancé de la DMLA, mais les résultats ne furent pas concluants (The Age-Related Eye Disease Study 2 Research 2013).

Il n'y a donc pas de thérapies approuvées pour la DMLA atrophique qui est pourtant la forme la plus courante et les traitements anti-angiogéniques sont à raffiner et à améliorer.

1.6 Les thérapies en développement pour le traitement de la DMLA

1.6.1 Les voies angiogéniques et immunitaires

Des essais cliniques sont en cours afin de déterminer si le fait de combiner l'action des antagonistes du VEGF avec d'autres molécules, telles que des inhibiteurs du PDGF (*platelet-derived growth factor*), augmenterait leur efficacité. Le PDGF stimule l'angiogenèse ainsi que le recrutement et la maturation des péricytes qui eux protègent les CEV de l'inhibition contre le VEGF (Jaffe et al. 2017). De même, d'autres équipes essaient, par thérapie génique ou pharmacologique, de contrebalancer le ratio VEGF/PEDF, le PEDF étant un facteur de croissance angiogénique sécrété par l'EPR (revues de (Campochiaro 2011, Ishikawa et al. 2015)).

Quant aux thérapies immunologiques ciblant, par exemple, l'inhibition des voies du complément et visant à traiter les deux types de DMLA, elles n'ont pas encore eu de succès, probablement du fait de la dualité du système immunitaire dans la DMLA et de sa complexité (Ambati et al. 2013, Ishikawa et al. 2015).

1.6.2 Les thérapies cellulaires

1.6.2.1 Justification du principe

Les propriétés de l'œil en font un excellent candidat pour les thérapies cellulaires (Schwartz et al. 2016, Zarbin 2016). En effet, la structure et la fonction des cellules rétinienne sont bien connues et les techniques chirurgicales permettant l'accès à la cavité vitrée et à l'espace sous-rétinien ont fait leurs preuves. De même, l'œil et l'espace sous-rétinien en particulier bénéficient d'un privilège immun relatif, grâce notamment à l'EPR et à sa fonction de barrière hémato-rétinienne et à la sécrétion de facteurs réprimant la réponse immunitaire (Forrester et Xu 2012), même si ce privilège diminue avec l'âge, la perte des cellules de l'EPR et les maladies. Aussi, il est facile de suivre l'évolution des cellules injectées ou des tissus greffés en utilisant des technologies d'imagerie non invasives *in vivo* telles que la tomographie par cohérence optique qui utilise la réflexion des rayons laser par

les différentes structures anatomiques de la rétine et permet la visualisation de ces dernières.

Parmi toutes les cellules rétinienne, les cellules de l'EPR sont parmi les plus attrayantes pour la greffe. En effet, il est possible de les cultiver et d'obtenir un grand nombre de cellules puisqu'elles se divisent *in vitro*. Aussi, contrairement aux autres cellules de la rétine, elles n'ont pas besoin d'établir des connections synaptiques pour assurer leurs fonctions (Alexander et al. 2015). Les propriétés autofluorescentes de l'EPR permettent également de l'imager et donc d'évaluer la présence des cellules une fois greffées (Pan et al. 2013). Finalement, étant donné que la pathologie de la DMLA semble débiter avec ce tissu, la greffe d'EPR, sa translocation ou l'injection de cellules comme traitement, est une approche somme toute logique (Alexander et al. 2015). Les cellules de l'EPR seraient alors remplacées avant la mort irréversible des photorécepteurs et des CC ; puisqu'il semblerait que les DMLA de type sec et humide sont initiées par un dysfonctionnement de l'EPR, y procéder au stade précoce de la maladie permettrait de prévenir les deux formes de la maladie.

1.6.2.2 Les traitements expérimentaux utilisant les cellules de l'EPR

Fortes de ces constats, beaucoup d'équipes de recherche se sont donc penchées sur l'utilisation de cellules de l'EPR de différentes sources dans le but de traiter les patients atteints de la DMLA. Différentes approches ont été explorées soit directement chez l'humain, soit chez des animaux modèles. Le lapin est un excellent modèle pour les techniques de greffe de l'EPR (comparé à la souris par exemple) du fait de la taille de son œil (un peu plus petit que le nôtre) et de l'espace suffisant de sa cavité vitréenne qui limite les risques de déchirure de la MBr et de traumatismes de la choroïde lors des chirurgies (Alexander et al. 2015)

Greffe d'un feuillet d'EPR ou d'un complexe EPR/choroïde

Greffer un feuillet d'EPR devrait résulter en un résultat favorable étant donné que les cellules de l'EPR sont déjà organisées, polarisées et fonctionnelles, et plusieurs essais ont été effectués chez l'humain. Cependant, la greffe d'un feuillet d'EPR allogénique chez des patients avec NVC n'a pas entraîné d'amélioration de l'AV et le feuillet pouvait se replier

(Del Priore et al. 2001, Tezel et al. 2007). Quant à une greffe autologue (de la périphérie) d'une choroïde entière avec de l'EPR, son avantage repose sur le fait qu'il n'y a pas de rejet. Par contre, même s'il y a eu revascularisation du tissu et amélioration de l'AV, la chirurgie était complexe et traumatique et générait d'importantes complications. De plus les feuillets pouvaient se contracter et les cellules greffées contenaient la même information génétique ayant favorisé l'apparition de la maladie (Joussen et al. 2006, Joussen et al. 2007, Caramoy et al. 2010).

Injection de cellules de l'EPR sur la MBr

Une autre approche consiste à injecter des cellules de l'EPR dans l'espace sous-rétinien et à les laisser recoloniser la MBr. Les cellules peuvent être allogéniques ou autologues. Chez le lapin (cellules allogéniques), on notait la présence de multicouches par endroits ainsi que des réactions de rejet (Crafoord et al. 1999). Chez l'humain, les cellules de l'EPR dissociées (autologues) n'ont pas adhéré à la MBr endommagée sous la macula (Binder et al. 2002). Des études *in vitro* ont confirmé l'importance de la fonctionnalité et de la sénescence de la MBr pour la prolifération et la survie à long terme des cellules de l'EPR (Tezel et al. 1999, Gullapalli et al. 2004, Gullapalli et al. 2005). En 2012, Schwartz et al. ont décrit la première greffe de cellules de l'EPR dérivées de cellules souches embryonnaires humaines chez des patients atteints de DMLA et de la maladie de Stargardt, une maladie dégénérative maculaire juvénile (Schwartz et al. 2012). À ce stade, c'était plus le dosage, la faisabilité et l'absence de danger (tumorigenèse, formation de tissu ectopique, dédifférenciation, rejet, modifications épigénétiques, etc.) qui ont été évalués dans cette étude clinique de phase 1. Par la suite, d'autres résultats préliminaires ont confirmé l'innocuité à moyen et long terme de la procédure, la survie des cellules injectées et possiblement une activité biologique des cellules et une amélioration de l'AV de certains patients. Les effets indésirables étaient limités à la chirurgie et à l'immunosuppression (Schwartz et al. 2015, Schwartz et al. 2016). Ils attribuent leur possible succès, là où d'autres ont échoué, au fait qu'ils ont injecté les cellules de l'EPR différenciées dans une zone de transition chevauchant du tissu maculaire et du tissu périphérique relativement normal, plutôt qu'au centre d'une large zone atrophique contenant probablement des CC, MBr et photorécepteurs atrophiques. On voit là encore l'importance de la membrane sur

laquelle repose l'EPR. D'autres équipes ont également procédé récemment à des greffes de cellules de l'EPR dérivées de cellules souches embryonnaires humaines (Song et al. 2015) ou de cellules souches pluripotentes induites autologues (Mandai et al. 2017) sans qu'il n'y ait de problèmes majeurs (phase I).

Utilisation d'un support (MBr artificielle)

Afin d'éviter une distribution irrégulière des cellules de l'EPR une fois injectées dans l'espace sous-rétinien, une autre approche consiste à utiliser une membrane servant de support à l'EPR et, en même temps, de remplacement à la MBr. Les cellules de l'EPR seraient déjà assemblées et fonctionnelles avant l'implantation. Un tel support devrait justement permettre la repolarisation et la fonctionnalisation des cellules de l'EPR cultivées dessus et aurait une porosité comparable à une MBr jeune (Binder et al. 2007). Ce support devrait être facile à manipuler et toléré dans l'espace sous-rétinien. Il pourrait être biodégradable (support temporaire) ou s'intégrer avec le temps (support permanent) (Binder et al. 2007). La membrane devrait également avoir une structure fibrillaire tridimensionnelle (3D) proche de celle de la zone collagénique interne (Warnke et al. 2013) et être biocompatible. Plusieurs supports, synthétiques ou non, ont été utilisés mais peu d'entre eux rassemblent toutes les propriétés voulues (peu ou pas de perméabilité, réactions inflammatoires à corps étrangers etc.) et/ou ont été testés *in vivo* (revues de (Binder et al. 2007, Heller et Martin 2014, Jha et Bharti 2015)).

1.6.3 Le génie tissulaire et la technique de l'auto-assemblage (LOEX)

Le génie tissulaire est un « domaine multidisciplinaire appliquant les principes du génie et des sciences biologiques afin de développer des substituts biologiques qui restaurent, maintiennent, ou améliorent la fonction d'un tissu ou d'un organe entier » (Langer et Vacanti 1993). Il peut donc permettre de traiter des conditions pathologiques requérant une greffe à la suite de lésions importantes. Généralement, les éléments essentiels du génie tissulaire sont au nombre de trois : des cellules, un matériau de soutien et des signaux de croissance. Le matériau de soutien, d'origine synthétique (organique ou non), naturel ou hybride, doit mimer au mieux les caractéristiques de la MEC du tissu natif puisque cette dernière contribue non seulement à l'intégrité mécanique mais également joue un rôle dans la régulation et la signalisation (Chan et Leong 2008, Lanza et al. 2014). Différentes

méthodes ont été utilisées, mixant les éléments de la triade, et ont permis de reconstruire des tissus comme la trachée, du tissu osseux, de la peau, des vaisseaux sanguins ou des tissus rénaux (Lanza et al. 2014).

L'approche de l'auto-assemblage du LOEX réussit à se passer de matériaux exogènes et utilise la propriété qu'ont la majorité des cellules humaines de reconstruire leur tissu d'origine du moment qu'elles sont cultivées dans les conditions adéquates, ainsi que la capacité des cellules mésenchymateuses à produire de la MEC endogène abondante en présence d'acide ascorbique (vitamine C) (L'Heureux et al. 1998, Groupe de réflexion sur la recherche et Lacolley 2007). L'acide ascorbique est un cofacteur intervenant dans la synthèse, la maturation et la sécrétion du collagène (Ronchetti et al. 1996) et sa présence dans le milieu de culture de cellules stimule la sécrétion de plusieurs composantes de la MEC (Russell et al. 1981, Hata et Senoo 1989, Pasonen-Seppanen et al. 2001). Les cellules vont alors s'« auto-assembler » en un tissu cohérent et s'enrober de leur propre MEC, ce qui va conduire à la fabrication d'un feuillet (Figure 1.10). Cette approche a permis la reconstruction de plusieurs tissus dont la composition matricielle et les propriétés biophysiques ressemblaient à celles des tissus natifs, comme des vaisseaux sanguins (L'Heureux et al. 1998), la peau (Michel et al. 1999), du tissu adipeux (Vermette et al. 2007), la cornée (Proulx et al. 2010), des tissus urologiques (Cattan et al. 2011, Imbeault et al. 2013) et osseux (Galbraith et al. 2017). Les peaux reconstruites (ClinicalTrials.gov NCT02350205) et les vaisseaux sanguins (Wystrychowski et al. 2014) issus de cette méthode sont en ce moment utilisés en essais cliniques pour respectivement le traitement de grands brûlés et pour la faisabilité et l'innocuité d'une greffe vasculaire chez des patients sous hémodialyse. Une demande de brevet a également été déposée pour l'étude de la guérison de plaies épithéliales cornéennes (numéro de demande : PCT/CA2016/051287) en utilisant des composés thérapeutiques qui ont pu être déterminés par l'utilisation de modèles de cornées humaines reconstruites par auto-assemblage (Couture et al. 2016).

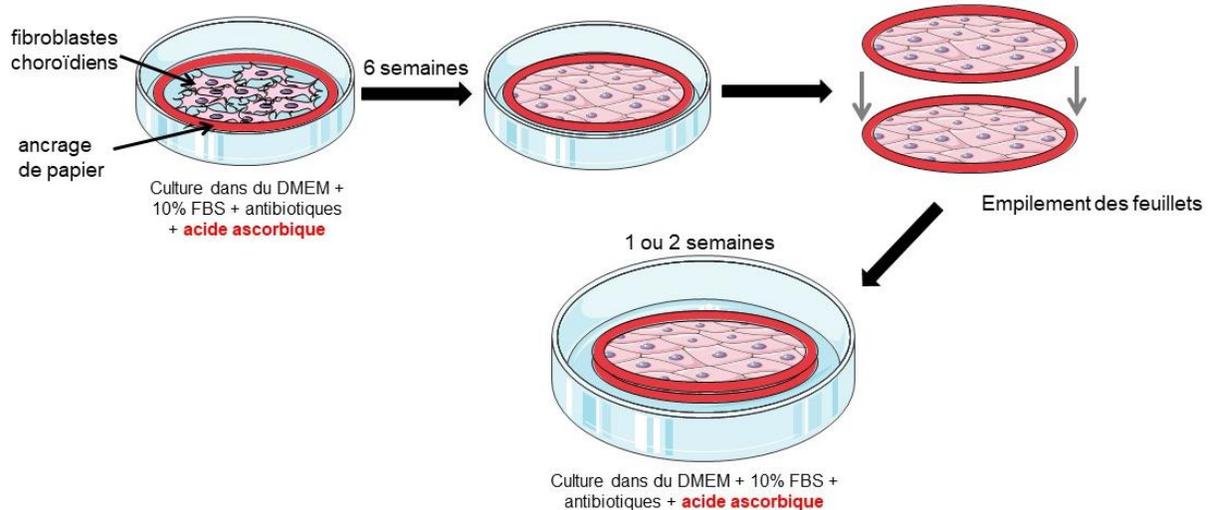


Figure 1.10 La technique d'autoassemblage du LOEX. Images de cellules tirées la banque d'images Servier Medical Art.

1.7 Objectifs des travaux de maîtrise

La DMLA est une maladie chronique et évolutive entraînant la perte de la vision du fait du dysfonctionnement des cellules de l'EPR et de la choroïde. Malgré une implication du stress oxydant, du catabolisme et de la dérégulation immunologique exacerbés par des prédispositions génétiques et l'âge, la maladie reste encore très mal connue. L'absence de modèles cellulaires et animaux fidèles et témoignant de la complexité de la DMLA est un autre obstacle dans la compréhension de son étiologie. Aussi, l'avancée des thérapies pour traiter la DMLA sèche, la plus commune, est sévèrement limitée du fait de la disparité des cibles identifiables. Un espoir de traitement repose sur le remplacement de l'EPR par un tissu sain, mais cela requiert un support permettant la survie et la fonctionnalité à long terme des cellules de l'EPR.

Mon objectif général de recherche consistait à développer un stroma choroïdien reconstruit par auto-assemblage pouvant non seulement servir comme support, mais aussi comme modèle d'étude des interactions cellules choroïdiennes-cellules choroïdiennes et/ou cellules choroïdiennes-cellules de l'EPR puisque ces dernières sont méconnues. Les substituts produits par cette approche du génie tissulaire ont généralement des caractéristiques biophysiques et matricielles similaires à celles des tissus natifs.

Mon hypothèse de recherche était que les fibroblastes choroïdiens humains génèrent une MEC choroïdienne dont les propriétés seraient semblables à celles du stroma choroïdien natif et qui serait biocompatible.

Mes objectifs spécifiques étaient :

1. L'extraction des cellules de choroïdes humaines et la vérification de leur pureté.
2. La fabrication de stromas choroïdiens reconstruits (SCR) par auto-assemblage, à partir de fibroblastes choroïdiens.
3. La caractérisation de la composition de la MEC et des propriétés biomécaniques des SCR comparativement à celles des choroïdes natives.
4. L'étude du repeuplement des SCR par des cellules de l'EPR, des CEV choroïdiennes et des MCN pour mieux mimer la choroïde native.

Pour vérifier l'hypothèse de recherche et répondre aux objectifs, nous avons tout d'abord mis au point une technique de dissection permettant d'isoler et de cultiver séparément les cellules de l'EPR, ainsi que les fibroblastes, les mélanocytes et les CEV de la choroïde. La pureté des cellules a été déterminée par des immunomarquages. Le Tableau 1.2 présente le choix des anticorps utilisés pour ce faire. Les fibroblastes ont ensuite été mis en culture en présence de sérum et d'acide ascorbique afin de vérifier leur capacité à produire des feuillets de MEC *in vitro*. Les feuillets formés ont été superposés pour former un substitut choroïdien par la suite caractérisé au niveau de sa composition matricielle (par spectrométrie de masse et immunomarquages) et de ses propriétés biomécaniques (par des mesures d'élasticité et de résistance à la traction). Finalement, des cellules de l'EPR, des MCN ainsi que des HUVEC (*human umbilical vein endothelial cells*) ont été ensemencés sur les SCR afin de vérifier si les SCR sont biocompatibles. Ces travaux sont présentés sous forme d'article dans le Chapitre 2.

Tableau 1.2 Anticorps utilisés pour déterminer la pureté des fibroblastes choroïdiens

Anticorps			
Épitope de l'anticorps	Clone	Espèce hôte	Source
HMB45	HMB-45	Souris, monoclonal	Dako
K8/K18	5D3	Souris, monoclonal	Abcam
VE-cadherine		Lapin, polyclonal	Abcam
Vimentine	V9	Souris, monoclonal	Abcam