Table des matières

RÉSUMÉ	iii
ABSTRACT	v
Table des matières	vii
Liste des tableaux	xiii
Liste des figures	xv
Liste des abréviations	xix
Remerciements	xxvii
Avant-propos	xxix
Chapitre I : Revue de la littérature	1
1. Introduction	1
1.1. Le globe oculaire humain	2
1.2. La cornée	4
1.2.1. L'épithélium cornéen	5
1.2.2. Le stroma cornéen et la membrane de Bowman	13
1.2.3. L'endothélium cornéen et la membrane de Descemet	16
1.3. Maladies de la cornée : Syndromes de déficience en cellules souches limbiques	17
1.3.1. Les traitements	18
1.3.1.1. Greffes de limbe et de cornée	
1.3.1.2. Greffe d'épithélium cornéen cultivé in vitro	20
1.3.1.3. Cornées reconstruites <i>in vitro</i> par génie tissulaire	21
1.4. Cicatrisation cornéenne	
1.4.1. Les étapes de la cicatrisation de l'épithélium cornéen	
1.4.1.1. Phase latente	
1.4.1.2. Migration cellulaire	
1.4.1.3. Prolifération et différenciation cellulaire	34
1.4.1.4. Adhésion cellulaire	
1.4.2. Cicatrisation du stroma cornéen	
1.4.3. Cicatrisation de l'endothélium cornéen	
1.4.4. Modèles pour l'étude de la guérison des plaies cornéenne	40
1.4.5. Facteurs modulant la cicatrisation de la cornée	46
1.4.5.1. Les facteurs de croissance, les cytokines et les facteurs neuraux	46

1.4.5.2. Les sérine-protéases et les métalloprotéinases matricielles (MMPs)	51
1.4.5.2.1. Les sérine-protéases	51
1.4.5.2.2. Les métalloprotéinases matricielles (MMPs)	53
1.4.5.2.2.1. Les membres de la famille des métalloprotéinases matricielles et leurs	
substrats	53
1.4.5.2.2.2. La régulation des métalloprotéinases	58
1.4.5.2.2.3. Les métalloprotéinases et la guérison des plaies cornéennes	62
1.4.5.2.2.3.1. MMP-1	63
1.4.5.2.2.3.2. MMP-3	63
1.4.5.2.2.3.3. MMP-9	64
1.4.5.2.2.3.4. MMP-10	65
1.4.5.2.2.3.5. MMP-12	65
1.4.5.3. Les protéines de la matrice extracellulaire (MEC)	66
1.4.5.3.1. Les Laminines (LM)	68
1.4.5.3.2. Les collagènes	72
1.4.5.3.3. La Ténascine (TN)	75
1.4.5.3.4. La Fibronectine (FN)	77
1.4.5.3.5. Remodelage de la MEC durant la cicatrisation cornéenne	80
1.4.5.4. Les Intégrines	83
1.4.5.4.1. Généralités, structure et ligands des intégrines	84
1.4.5.4.2. Les fonctions des intégrines	91
1.4.5.4.3. Les voies de signalisation intracellulaires modulées par les intégrines	93
1.4.5.4.4. Modification de l'expression des intégrines durant la cicatrisation cornéenne	94
1.5. Intégrine α5β1	97
1.5.1. Généralités	97
1.5.2. Les fonctions de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$	98
1.5.3. Le gène de la sous-unité d'intégrine α5	98
1.5.4. Le gène de la sous-unité d'intégrine β1	. 101
1.5.5. La régulation de l'expression de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$. 102
1.5.6. Les facteurs de transcription importants dans la modulation de la transcription du gène ITGA5	. 106
1.5.6.1. Le facteur de transcription Sp1	.107
1.5.6.2. Le facteur de transcription AP-1	.111
1.5.6.3. Les facteurs de transcription NFI	.116

1.6. Problématique et Objectifs de recherche	118
1.6.1. Déterminer l'influence des composantes combinées de la matrice extracellulaire sur la s α5 dans les cellules épithéliales de cornée	ous-unité 119
1.6.2. Évaluer l'influence des matrices simples de collagènes (CI ou CIV) sur l'expression du g dans les cellules épithéliales de cornée	jène α5 120
1.6.3. Étudier l'influence régulatrice du segment d'ADN conservé (50 et 300 nucléotides) entre α3, α5, α9 et αv sur la transcription du gène α5	e les gènes 121
1.6.4. Étudier l'influence des composantes de la MEC sur l'expression d'autres gènes suscept participer à la cicatrisation cornéenne dans les cellules épithéliales de cornée	ibles de 122
Chapitre II	123
Modulation de l'expression du gène de la sous-unité d'intégrine α5 dans les cellules épithéliales de des matrices extracellulaires humaines reconstruites	cornée par 123
2.1. Résumé	123
2.2. Title Page	125
Expression of the α 5 integrin gene in corneal epithelial cells cultured on tissue-engineered huma extracellular matrices	n 125
2.3. Abstract	
2.4. Introduction	127
2.5. Materials and Methods	129
2.5.1. Cell culture and matrix production	
2.5.2. Plasmids and oligonucleotides	
2.5.3. Mass spectrometry	130
2.5.4. Transfections and chloramphenicol acetyltransferase (CAT) assays	131
2.5.5. Nuclear extracts and electrophoretic mobility shift assays (EMSA)	
2.5.6. Western Blots	132
2.5.7. Gene expression profiling	
2.5.8. Quantitative PCR (qRT-PCR)	134
2.5.9. Indirect immunofluorescence	134
2.5.10. Statistical analyses	135
2.6. Results	
2.6.1. Analysis of the extracellular matrix secreted in vitro by human corneal fibroblasts	
2.6.2. Influence of the reconstructed extracellular matrix biomaterial on the activity of the hu integrin gene promoter	ıman α5 136
2.6.3. Influence of the reconstructed stromal biomaterial on the expression of the transcripti that regulate expression of the α 5 gene	on factors 137

2.7. Discussion	141
2.8. Conclusion	143
2.9. Acknowledgments	144
2.10. References	145
2.11. Tables	150
2.12. Figure legends	152
2.13. Supplementary data	158
Chapitre III	161
Impact fonctionnel des collagènes sur l'activité transcriptionnelle dirigée par le promoteur du gène unité d'intégrine α5 dans les cellules épithéliales de la cornée	de la sous- 161
3.1. Résumé	
3.2. Title Page	
Functional impact of collagens on the activity directed by the promoter of the α 5 integrin subunit	gene in
3.3. Abstract	
3.4. Introduction	
3.5. Methods	
3.5.1. Cell culture and matrix production	
3.5.2. Indirect Immunonuorescence.	
2.5.4. Transfections and obleremphanical each dransferrage (CAT) access	
2.5.5. Nuclear extracts and electropheratic mability shift assays (EMSA)	170
3.5.6. Western Plots	
3.5.7 Gone expression profiling	
3.5.8 Somi quantitativo PT PCP assave	172
3.5.9 Oughtitative PCR (aRT_PCR)	
3.5.10. Statistical analyses	173
3.6 Results	
3.6.1 Collegens evert different regulatory influences on the human of gene promoter in R	CECe 174
3.6.2 CIV alters both expression and DNA binding of the transcription factors that regulate	
of the α 5 gene	
3.6.3. The influence of collagens is different in human corneal epithelial cells	177
3.6.4. The genes signature of human corneal epithelial cells is influenced by collagens	178
3.6.5. Expression of the collagen binding integrins changes in HCECs grown on CI and CIV	/180

3.7. Discussion	. 181
3.8. Acknowledgments	. 186
3.9. References	. 187
3.10. Figure legends	. 195
3.11. Supplementary data	. 205
CHAPITRE IV	. 217
Modulation de l'expression du gène de la sous-unité α 5 de l'intégrine α 5 β 1 par l'élément conservé identif amont des promoteurs des gènes α 3, α 5, α 9 et α v	ié en 217
4.1. Introduction	217
4.2. Matériel et Méthodes	. 220
4.2.1. Culture cellulaire	. 220
4.2.2. Identification des séquences conservés et des facteurs de transcription potentiels	. 220
4.2.3. Construction des plasmides et oligonucléotides	. 221
4.2.4. Transfections transitoires	. 222
4.2.5. Extraits nucléaires et Retards sur gel de polyacrylamide (EMSA)	. 224
4.2.6. Profilage d'expression génique (Agilent)	. 224
4.3. Résultats	. 225
4.3.1. Influence de l'élément conservé en amont des gènes des sous-unités d'intégrines α 3, α 5, α et α v sur l'activité du promoteur du gène α 5	α9 225
4.3.2. Facteurs de transcription impliqués dans la modulation de l'expression du gène α 5 par l'élé conservé en amont des gènes de sous-unités d'intégrines α 3, α 5, α 9 et α v	ment 229
4.4. Discussion	. 235
CHAPITRE V	. 243
Modulation de l'expression génique par les composantes de la matrice extracellulaire	. 243
5.1. Introduction	. 243
5.2. Matériel et Méthodes	. 243
5.3. Résultats	. 244
5.3.1. Influence des matrices extracellulaires reconstruites et des matrices simples de collagènes l'expression de gènes autres que les gènes des intégrines dans les CECHs	sur 244
5.3.2. Influence des matrices extracellulaires reconstruites et des matrices simples de collagènes l'expression des gènes MMPs dans les CECHs	sur 248
5.4. Discussion	. 250
Chapitre VI :	. 257
Conclusions et Perspectives de recherche	. 257

6. Conclu	usions2	257
6.1. Me humair	lodulation de l'expression du gène de la sous-unité d'intégrine α5 par des matrices extracellulaires ines reconstruites (Chapitre II)2	258
6.2. Im d'intég	npacts fonctionnels des matrices simples de collagènes sur l'expression du gène de la sous-unité grine α5 (Chapitre III)2	259
6.3. Μ α5, α§	lodulation de la transcription du gène α 5 par la région distante conservée en amont des gènes α 3, 9 et α v (Chapitre IV)2	260
6.4. Mo extrace	lodulation de l'expression des autres gènes que les intégrines par les composantes de la matrice ellulaire (Chapitre V)2	261
6.5. Él	laboration d'un modèle d'action de la matrice extracellulaire sur l'expression du gène α 52	263
6.6. Pe	erspectives de recherche2	270
Bibliograp	phie2	277
ANNEXE	5 1	347
Influence dans les d	e de matrices extracelluaires humaines reconstruites sur l'expression du gène α5 de l'intégrine α5β cellules épithéliales de cornée de lapin	1 347
ANNEXE	3	353
Modulatio extracellu	on de l'expression du gène α5 de l'intégrine α5β1 et des autres gènes par des matrices uaires humaines reconstruites dans les cellules épithéliales de cornée humaine à sous-confluence. a	353
ANNEXE	E 3	361
Les séque liaisons p	iences des éléments conservés en amont des promoteurs des gènes α 3, α 5, α 9, α v et leurs sites potentiels pour certains facteurs de transcription.	de 361

Liste des tableaux

Chapitre I

Tableau 1.1. Les métalloprotéinases matricielles et leurs substrats.	
Table and 1	00
Tableau 1.2. Les 24 neterodimeres d'intégrines et leurs principaux ligands	

Chapitre II

Table 2.1. Immunofluorescence analysis of the ECM components from the corneal stroma of	
bioengineered and native human corneas	150
Table 2.2. DNA sequence of the primers and double-stranded oligonucleotides.	151
Supplementary Table 2.1. Biological functions of the proteins encoded by the differentially	
expressed genes in HCECs grown on BSA and ECM/ keratocytes ⁺	158
Supplementary Table 2.2. Data from gene profiling on Human HT-12 v3 Expression BeadChip)
array (Illumina) in HCECs grown with or without ECM/35d	160

Chapitre III

Supplementary Table 3.1. DNA s	sequence of the primers and double-stranded oligonucleotides	
	2	205
Supplementary Table 3.2. Biolog	ical functions of the proteins encoded by the differentially	
expressed genes in HCECs grown	on BSA, CI and CIV2	207

Chapitre IV

 Tableau 4.1. Séquence d'ADN des oligonucléotides doubles-brins et des amorces.
 223

Liste des figures

Chapitre I

Figure 1.1. Représentation schématique des différentes parties du globe oculaire	2
Figure 1.2. Les différentes couches et membranes de la cornée.	5
Figure 1.3. Organisation de la membrane basale de l'épithélium cornéen humain.	7
Figure 1.4. Histologie du limbe cornéen.	9
Figure 1.5. Localisation et différenciation des cellules souches de l'épithélium cornéen	12
Figure 1.6. Organisation des fibrilles de collagène dans le stroma cornéen	15
Figure 1.7. Reconstruction <i>in vitro</i> d'une cornée humaine	
Figure 1.8. Cicatrisation de l'épithélium cornéen.	
Figure 1.9. Modèle de cicatrisation avec une cornée humaine reconstruite in vitro par la mét	thode
d'auto-assemblage.	45
Figure 1.10. Les métalloprotéinases matricielles et leurs domaines structuraux	55
Figure 1.11. Représentation des différents isoformes de laminines.	67
Figure 1.12. Les domaines fonctionnels de liaison des laminines.	69
Figure 1.13. Organisation structurale des différents types de collagènes.	73
Figure 1.14. Structure de la ténascine-C	76
Figure 1.15. Structure d'un dimère de fibronectine	78
Figure 1.16. Les récepteurs de la famille des intégrines.	
Figure 1.17. Représentation schématique de la structure des intégrines	
Figure 1.18. Représentation schématique de l'adhésion focale.	91
Figure 1.19. Voies de signalisation intracellulaire activées par les intégrines	95
Figure 1.20. Organisation du promoteur du gène de la sous-unité d'intégrine α 5	100
Figure 1.21. Structure du facteur de transcription Sp1	108
Figure 1.22. Structure de l'hétérodimère c-Jun/c-Fos du facteur de transcription AP-1	113
Figure 1.23. Structure de base du facteur de transcription NFI	116

Chapitre II

Figure 2.1. Composition of the reconstructed human corneal fibroblast matrix	154
Figure 2.2. Activity of the basal promoter from the $\alpha 5$ gene in corneal epithelial cells grown on	
reconstructed matrices	155

Rapport-gratuit.com

Figure 2.3. Influence of the ECM/35d matrix on the DNA binding and expression of Sp1, Sp3,	,
NFI, AP-1 and PAX6 in HCECs	156
Figure 2.4. Microarray analysis of integrins gene expression in HCECs grown on the reconstru	icted
matrices	157

Chapitre III

Figure 3.1. Activity of the α 5 promoter in RCECs grown on culture plates coated with collagens
Figure 3.2. Influence of collagens on α 5 promoter activity in RCECs grown to varying cell
densities
Figure 3.3. Influence of CIV on the expression and DNA binding properties of Sp1, NFI and AP-1
Figure 3.4. Activity of the α 5 promoter in HCECs grown to varying cell densities on collagen
coated culture plates
Figure 3.5. Influence of CI and CIV on the expression and DNA binding properties of Sp1, NFI,
AP-1 and PAX-6 in HCECs
Figure 3.6. Microarray analysis of gene expression patterns in HCECs grown on collagens I and
IV
Figure 3.7. Collagen binding integrins expressed by HCECs grown on collagens I and IV204

Chapitre IV

Figure 4.1. Alignement des séquences régulatrices des gènes des sous-unités α d'intégrines α 3, α 5,
α9 et αv
Figure 4.2. Influence de l'élément conservé de 300 nucléotides provenant des gènes α 5 et α 9 sur
l'activité du promoteur du gène α5227
Figure 4.3. Influence de l'élément conservé de 50 nucléotides provenant des gènes α 3, α 5, α 9 et α v
sur l'activité du promoteur du gène α5
Figure 4.4. Analyse de la liaison de protéines nucléaires à l'élément conservé de 50pb par retards
sur gel (EMSA)
Figure 4.5. Affinité des protéines contenues dans les complexes C1, C2 et C3 vis-à-vis les éléments
conservés des gènes a5, av, a3 et a9233

Figure 4.6. Facteurs de transcription potentiels pouvant se lier aux éléments conservés de 300
nucléotides en amont des gènes α 5 et α 9 et leur patron d'expression dans les CECHs, T115 et les
kératinocytes

Chapitre V

Figure 5.1. Patron d'expression des gènes les plus dérégulés des CECHs cultivées sur les matric	es
reconstruites	. 246
Figure 5.2. Patron d'expression des gènes codant pour des composantes de la MEC dans des	
CECHs cultivées sur matrices reconstruites ou sur matrices simples de collagènes	. 247
Figure 5.3. Patron d'expression des gènes des métalloprotéinases matricielles dans des CECHs	
cultivées sur matrices reconstruites dévitalisées	. 249
Figure 5.4. Patron des gènes des métalloprotéinases matricielles exprimés dans des CECHs	
cultivées sur matrices simples de collagènes	. 250

Chapitre VI

Figure 6.1. Modèle d'actio	n de la matrice extracell	ulaire sur l'expression	du gène $\alpha 5$.	
8		1	0	

Annexe 1

Figure A1.1. L'activité du promoteur de gène α 5 dans les CECLs cultivées sur les matrices	
reconstruites	350
Figure A1.2. Influence des matrices ECM35d sur l'activité de liaison à ADN et sur l'expressio	n de
Sp1, NFI et AP-1 dans des CECLs	351

Annexe 2

Figure A2.1. Patrons d'expression des gènes de CECHs cultivées à sous-confluence en présence	
des matrices reconstruites dévitalisées	358
Figure A2.2. Patrons d'expression des gènes les plus dérégulés des CECHs cultivées à sous-	
confluence sur les matrices reconstruites	359
Figure A2.3. Patrons d'expression génique des métalloprotéinases matricielles des CECHs	
cultivées à sous-confluence sur les matrices reconstruites dévitalisées	360

Annexe 3

Figure A3.1. La séquence d'ADN des segments conservés de 50 nucléotides en amont des gènes
α 3, α 5, α 9, α v et leurs sites de liaisons potentiels de facteurs de transcription364
Figure A3.2. Séquence du segment conservé de 300 nucléotides en amont du gène α5 et position
des sites de liaisons potentiels de facteurs de transcription
Figure A3.3. Séquence du segment conservé de 300 nucléotides en amont du gène α9 et position
des sites de liaisons potentiels de facteurs de transcription

Liste des abréviations

15-lox-2 :	Arachidonate 15-lipoxygenase type II (ALOX15B)
α:	Alpha
β:	Beta
γ:	Gamma
κ:	Карра
alb-AR:	alpha-1B adrenergic receptor
α1-PI :	alpha1-Proteinase inhibitor (a1-antitrypsin) ; Inhibiteur de la protéase alpha1
A :	Adénine
a.a. :	Acide aminé
Ab :	Antibody ; Anticorps
ADMIDAS :	Adjacent metal-ion-dependent adhesion site ; Site adjacent de celui pour adhésion dépendant de la liaison d'un ion métallique
ADN / DNA :	Acide désoxyribonucléique / Deoxyribonucleic acid
ADNc / cDNA	ADN complémentaire / complementary DNA
Akt ou PKB :	RAC-serine/threonine-protein kinase (Protein kinase B)
Ala ou A :	Alanine
ALDH :	Aldehyde dehydrogenase
AMPc / cAMP :	Adénosine Monophosphate cyclique / Cyclic adenosine monophosphate
AP-1 :	Activator Protein 1 ; Protéine activatrice 1
AP-2 :	Activating enhancer binding protein 2 ; Protéine activatrice 2
Arg ou R :	Arginine
ARN / RNA :	Acide ribonucléique / Ribonucleic acid
ARNm / mRNA :	ARN messager / messenger RNA
ARNi :	ARN interférence
Arp 2/3 :	Actin-related Proteins 2/3 complex
ATF :	Activating Transcription Factor ; facteur de transcription activateur
Asn ou N	Asparagine
Asp ou D	Acide Aspartique
bFGF :	Basic fibroblast growth factor ; facteur de croissance fibroblastique basique
Bim :	Bcl-2 interacting mediator of cell death
BM :	Basement Membrane ; membrane basale
BMP-1 ou mTLD :	Bone morphogenetic protein 1 ou Mammalian tolloid protein
BRM :	SWI/SNF chromatin remodeling enzyme Brahma ; Enzyme de remodelage de la chromatine Brahma
BSA :	Bovine Serum Albumin ; Albumine de sérum bovin
β-TD :	membrane proximal beta tail domain ; domaine de queue beta
bZIP :	basic region-leucine zipper
C :	Cytosine
C :	Confluence
C/EBP :	CCAAT/enhancer binding protein ; protéine liant l'enhancer CCAAT
Ca^{2+} :	Ion calcium

CAT :	Chloramphenicol acetyltransferase ; Chloramphénicol acétyltransférase
cdk2 :	Cell division protein kinase 2 ou Cyclin-dependent kinase 2 ; Protéine kinase 2 de contrôle de la division cellulaire ou Kinase 2 dépendante de la cycline
Cdc42 :	Cell division control protein 42 homolog ; Protéine homologue 42 de contrôle de la division cellulaire
CEC :	Cellules épithéliales de cornée / Corneal epithélial cells
CECHs / HCECs:	Cellules épithéliales de cornée humaine / Human corneal epithélial cells
CECL / RCECs:	Cellules épithéliales de cornée de lapin / Rabbit corneal epithélial cells
cFN :	Cellular fibronectin ; Fibronectine cellulaire
ChIP :	Chromatin immunoprecipitation ; Immunoprécipitation de chromatine
CI ou Col I :	Collagène de type I ; Collagen type I
CIV ou Col IV :	Collagène de type IV ; Collagen type IV
CKII :	Casein kinase 2
c-Met ou HGFR :	Hepatocyte growth factor receptor ;
COMP ·	Cartilage oligomeric matrix protein
count.	Protéine oligomérique de la matrice du cartilage
COX-2 :	Cyclooxygenase-2
CRE :	cAMP responsive element ; Élément de réponse à l'AMPc
CREB :	Cyclic AMP-responsive element-binding protein ; Protéine qui le CRE
Cys ou C :	Cystéine
DHFR :	Dihydrofolate reductase
DME-HAM :	Dulbecco's modified Eagle's medium + HAM's F12 medium
DMEM :	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMLA	Dégénérescence maculaire liée à l'âge
DNA-PK :	DNA-dependent protein kinase
DNase I :	Deoxyribonuclease I ; Désoxyribonucléase I
E2 :	17β-estradiol
E2F-1 :	Retinoblastoma-associated protein 1
ERa:	Estrogen receptor alpha ; Récepteur de l'oestrogène alpha
ERE :	Estrogen responsive element ; Élément de réponse à l'oestrogène
EDC/NHS :	N-ethyl-N'-[3-dimethylaminopropyl]-carbodiimide / N-hydroxy succinimide
EDTA :	Ethylene Diamine Triacetic Acid ; acide éthylène diamine tétraacétique
EGF :	Epidermal growth factor ; facteur de croissance épidermique
EGFR :	Epidermal growth factor receptor ; Récepteur du facteur de croissance épidermique
EMSA :	Electrophoretic mobility shift assay ; gel de rétention (retards sur gel)
EMMPRIN/CD147:	Extracellular matrix metalloproteinase inducer ;
EDD ·	Inducteur des métalloprotéinases matricielles Énithélium Biomontaire Rétinion : Rotinel Biomont Enithelium
EFK.	Epitientum Fignentane Kennen, Kennar Fignent Epitientum
etac :	Kinase régulée par des signaux extracellulaires Early transient amplifying cells : Cellules amplificatrices transitoires précoces
Ets :	transcription factor E26 transformation-specific
FACITs :	Fibril Associated Collagen with Interrupted Triple helices
	collagènes associés aux fibrilles et à triple hélice interrompue

FAK :	Focal Adhesion Kinase ; kinase de l'adhésion focale
Fas-L :	ligand de Fas; Fas Ligand
FBE :	Forkhead-binding element
FBLN5 :	Fibulin-5
FBS :	Fœtal Bovin Serum ; Sérum de veau foetal
FN :	Fibronectine ; Fibronectin
Foxc2 :	Forkhead box protein C2
Fra-1 ou FOSL1 :	Fos-related antigen 1
Fra-2 ou FOSL2 :	Fos-related antigen 2
FRE :	Fibronectin responsive element ; Élément de réponse à la fibronectine
FRK :	Fos-related kinase
FTs / TFs	Facteurs de transcription / Transcription factors
G :	Guanine
GADD153 :	Growth arrest and DNA damage-inducible gene 153
GAG :	Glycosaminoglycans
GAPDH :	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GGF :	Glial growth factor ; Facteur de croissance glial
Glu ou E :	Acide glutamique
GLUT4 :	Glucose transporter type 4
Gly ou G :	Glycine
GM-CSF :	Granulocyte-macrophage colony stimulating factor;
CDI ·	Facteur stimulant la formation de colonies de granulocytes et de macrophages
GPR2 ·	Growth factor recentor bound protein 2
GSK 28 ·	Glycogen synthese kingse 3bete
GTPase ·	Guanine trinkonhatase
	Histone acetultransferases : Histones acétultransférases
HAIS. HRECE	Henorin hinding EGE like growth factor:
IID-LOI	facteur de croissance épidermique se liant à l'héparine
HCO ³⁻ :	Ions bicarbonates
HDACs :	Histone deacetylases ; Histones déacétylases
HDAC1 :	Histone deacetylase 1 ; Histone déacétylase 1
HGF :	Hepatocyte growth factor ; Facteur de croissance des hépatocytes
hGH :	human growth hormone ; hormone de croissance humaine
HIF :	Hypoxia-inducible factor ; Facteur induit par hypoxie
His ou H :	Histidine
HPV URR :	Human papillomavirus upstream regulatory region
HSC :	Hepatic stellate cells
HSF2 :	Heat shock factor protein 2
HUVEC :	Human Umbilical Vein Endothelial Cells;
iC3b.	Cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine Inactivated complement component C^{2h}
ICAM ·	Intercallular adhesion moleculas : Moléculas d'adhésion intercallulaira
ICAIVI . ICE 1 ·	Insulin like growth factor 1: Eactour de araissance combleble à l'insulin
IOI'-I .	insum-nke growin factor-1, racteur de croissance semblable à l'Insuine

IGFBP-1 : IgG :	Insulin-like growth factor-binding protein -1 ; Protéine se liant au facteur de croissance semblable à l'insuline Immunoglobuline G
ΙΚΚα/β:	Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit alpha/beta (I κ B kinase α/β)
П.:	Interleukin : Interleukine
IL-1R:	Interleukin-1 receptor : Récepteur de l'interleukine-1
Ile ou I :	Isoleucine
ILK :	Integrin-linked kinase : kinase liée aux intégrines
Inr :	Élément initiateur : Initiator element
JAK2 :	Janus kinase 2
JDP :	Jun dimerisation protein
JNK :	c-Jun N-terminal Kinase ; Kinase N-terminale de c-Jun
K :	Kératine : Keratin
kDa :	Kilodalton
KGF :	Keratinocyte growth factor ; Facteur de croissance des kératinocytes
KGFR :	Keratinocyte growth factor receptor ;
	Récepteur du facteur de croissance des kératinocytes
LASIK	Laser-assisted in situ keratomileusis
Leu ou L :	Leucine
LG :	Laminin globular domains ; domaines globulaires des laminines
LIF :	Leukemia inhibitory factor ; Facteur inhibiteur de la leucémie
LM :	Laminine ; Laminin
LMPCR :	Ligation-Mediated PCR ; PCR permise par un adaptateur
LOEX :	Laboratoire d'Organogenèse Expérimental
LUM :	Lumican
Lyf-1 :	Lymphoid transcription factor (DNA-binding protein Ikaros)
LZ:	Leucine-zipper
<i>l</i> TAC :	Late transient amplifying cells ; Cellules amplificatrices transitoires tardives
Lys ou K :	Lysine
MadCAM-1 :	Mucosal addressin cell adhesion molecule; Molécule d'adhésion cellulaire d'adressine des mugueuses
Maf :	Musculoaponeurotif fibrosarcoma oncogen homolog
MAPK :	Mitogen-activated protein kinases ; Kinases activées par les agents mitogènes
Max :	Myc-associated factor X
MCAF ou MCP-1 :	Monocyte chemotactic and activating factor ou Monocyte chemoattractant protein 1
M-CSF :	Macrophage colony-stimulating factor ;
MEC / ECM :	Facteur stimulant la formation de colonies de macrophages Matrice extracellulaire / Extracellular matrix
MEK :	Mitogen-activated protein kinase kinase (MAPK/ERK Kinase)
Met ou M :	Méthionine
Mg ²⁺ :	Ion magnésium
Mn^{2+} :	Ion manganèse
MIDAS :	Metal ion-dependent adhesion site ; Site d'adhésion dépendant de la liaison d'un ion métallique
mi-R :	Micro-RNA ; Micro-ARN

MMPs :	métalloprotéinases matricielles ; Matrix metalloproteinases
MT-MMPs :	Membrane-type MMPs
MyoD :	Myoblast determination protein
Na ⁺ :	Ion sodium
NaCl :	Sodium chloride; Chlorure de sodium
Na+/K+ ATPase :	Pompe sodium-potassium adénosine triphosphatase
NaOH :	Sodium hydroxide ; Hydroxyde de sodium,
NC1 :	Non-Collagenous domain 1 ; Domaine non collagénique 1
NFAT :	Nuclear factor of activated T-cells ; Facteur nucléaire des lymphocytes T activés
NFI :	Nuclear Factor I ; Facteur nucléaire
NF-ĸB :	Nuclear Factor kappa B ; Facteur nucléaire kappa B
NGF :	Nerve growth factor ; Facteur de croissance des nerfs
Nrl :	Neural retina leucine zipper protein ; Protéine de la rétine neuronale de type leucine zipper
NSCLC :	Non-small cell lung carcinoma ; Cellules de carcinome pulmonaire « non à petites cellules »
0:	Hydroxyproline
Oct-1 :	Octamer binding protein-1
OMS	Organisation mondiale de la Santé
OPN :	ostéopontine; Osteopontin
p15 ^{INK4B} :	Cyclin-dependent kinase 4 inhibitor B
$p16^{INK4A}$:	Cyclin-dependent kinase 4 inhibitor A ou Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
$p18^{INK4C}$:	Cyclin-dependent kinase 4 inhibitor C
$p19^{INK4D}$:	Cyclin-dependent kinase 4 inhibitor D
$p21^{WAF1/CIP1}$:	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A ou CDK-interacting protein 1
p27 ^{KIP1} :	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B
$p57^{K1P2}$:	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1C
p130Cas :	p130 Crk-associated substrate ; Protéine de 130 kDa associée à Crk
p300/CBP :	E1A binding protein p300 + CREB-binding protein
PAI :	Plasminogen activator inhibitors ; Inhibiteurs des activateurs du plasminogène
PARP-1 :	Poly (ADP-ribose) polymerase-1
PAX-6 :	Paired box protein 6
pb / bp	Paire de base ; Base pair
PBS :	Phosphate buffer saline ; Tampon phosphate salin
PC :	Post-confluence
PCR :	Polymerase chain reaction ; Réaction en chaîne par polymérase
PDGF :	Platelet-derived growth factor ; Facteur de croissance dérivé des plaquettes
PDGF-R :	Platelet-derived growth factor receptor ;
pFN :	Récepteur du facteur de croissance dérivé des plaquettes Plasmatic fibronectin ; Fibronectine plasmatique
Phe ou F :	Phénylalanine
PI3K :	Phosphoinositide-3 kinase
PIP ₂ :	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PKR	Photokératectomie réfractive

PKA :	Protein kinase A ; Protéine Kinase A
PKC :	Protein kinase C ; Protéine Kinase C
РКС-ζ:	atypical protein kinase C zeta ; Protéine Kinase C atypique zeta
PMA :	Phorbol 12-Myristate 13-Acetate
PMC :	Post-mitotic cells ; Cellules post-mitotiques
PNIPAAm :	Poly(N-isopropylacrylamide)
PP1 :	Protein phosphatase 1 ; Protéine phosphatase 1
PP2A:	Protein phosphatase 2A ; Protéine phosphatase 2A
PPARγ:	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ; Récepteur gamma activé par les proliférateurs des péroxysomes Retinoblastoma-associated protein
Pro ou P ·	Proline
PSI ·	Plexin/Semanhorin/Integrin
PTR ·	Phosphotyrosine-binding domain
Rac ⁻	Ras-related C3 botulinum toxin substrate
RB ·	Région basique : Basic region
aPCR ·	Quantitative PCR (Real-time PCR) · PCR quantitative (PCR en temps réel)
RCL	Reactive Center Loon
RhoA ·	Ras homolog protein family member A · Protéine homologue à Ras membre A
RSK ·	Ribosomal S6 protein kinase (S6K)
RT-PCR ·	Reverse transcription polymerase chain reaction :
Ser ou S :	Transcription inverse suivie d'une PCR. sérine
SC :	Stem cells ; Cellules souches
SC :	Subconfluence ; Sous-confluence
SD :	Standard Deviation ; Écart-type
SDS :	Sodium dodecyl sulfate ; dodécylsulfate de sodium
SH :	Groupement thiol
SH2 :	Src homology 2 domain ; Région homologue 2 à Src
She :	Src homology 2 domain-containing protein ; protéine contenant le 2e domaine homologue à Src
SHEM :	Supplemented normonal epithelial medium
SIPAI :	Signal-induced proliferation-associated protein 1
Smad :	Mothers against decapentaplegic homolog
Spl:	Specific Protein 1; Proteine specifique 1
Sp3 :	Specific Protein 3; Proteine specifique 3
Sp/XKLF	Specificity protein/Kruppel-like factor
SPARC :	Secreted protein acidic and rich in cysteine (Osteonectin)
SPOCKI :	Testican-1
SRC-1 :	Steroid receptor coactivator-1; Co-activateur du récepteur stéroïdien
SSC :	Supershift complex ; complexe super-retenu
STAT :	Signal transducer and activator of transcription ; Transducteur de signaux et activateur de la transcription Small ubiquitin-related modifier 1
SUMO I .	Simian vacuolating virus 40 [°] Virus vacuolant simien 40
SV40	

SyMBS :	Synergistic metal ion binding site ; Site de liaison synergique d'un ion métallique
SWI/SNF :	SWItch/Sucrose NonFermentable nucleosome remodeling complex
Τ:	Thymine
TAC :	Transient amplifying cells ; Cellules amplificatrices transitoires
TAF :	TBP associated-factors ; Facteurs associés à TBP
TBP :	TATA box binding protein ; Proéine de liaison à la boîte TATA
TDC :	Terminally differentiated Cells ; Cellules en différenciation terminale
TEM / EMT :	Transition épithéliale-mésenchymateuse / Epithelial-mesenchymal transition
TFII :	Transcription Factor II ; Facteur de transcription II
TGF-α, TGF-β :	Transforming growth factor alpha ou beta ; Facteur de croissance transformant alpha ou beta
TGF-β-R :	Transforming growth factor beta receptors ; Récepteurs du facteur de croissance transformant beta
Thr ou T :	Thréonine
TIMPs :	Tissue inhibitors of metalloproteinases ; inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases
TK :	Thymidine kinase
TMPRSS4 :	Transmembrane protease serine 4 ; Sérine-protéase transmembranaire 4
TN :	Ténascine ; Tenascin
TNF-α :	Tumour necrosis factor alpha ; Facteur alpha de nécrose tumorale
TNFR:	Tumor necrosis factor receptor ; Récepteur au facteur de nécrose tumorale
TPA :	12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate
tPA :	tissue-type plasminogen activator ; activateur tissulaire du plaminogène
TRE :	TPA responsive element ; Élément de réponse au TPA;
TSC2 :	Tuberous sclerosis complex 2
TSP :	Thrombospondine ; Thrombospondin
tTG :	Tissue transglutaminase ; transglutaminase tissulaire
Tyr ou Y :	Tyrosine
uPA :	urokinase-type plasminogen activator ; activateur du plasminogène de type urokinase
UV :	Ultraviolet
Val ou V :	Valine
VASP :	Vasodilator-stimulated phosphoprotein
VCAM-1 :	Vascular cell adhesion molecule-1; Molécule-1 d'adhésion des cellules vasculaires
VEGF :	Vascular endothelial growth factor ; Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
VN ou VTN	Vitronectine; Vitronectin
WAP :	Whey acidic protein ; Protéine acide du lactosérum
Wnt7a :	Wingless-type MMTV integration site family, member 7A
X :	acide aminé quelconque
YY1 :	Yin Yang 1
ZEB :	Zinc finger E-box binding homeobox
ZF:	Zinc finger motif ; motif en doigts de zinc
Zn^{2+} :	Ion zinc



Remerciements

J'aimerais remercier mon directeur de recherche, le Dr Sylvain Guérin, pour la supervision et pour la réalisation des travaux de doctorat présentés dans cette thèse. Mes remerciements au Dr Guérin pour son support, ses conseils, ses encouragements, ses explications et sa disponibilité durant la période de mes études graduées. Je tiens à remercier également le Dr Christian Salesse pour sa collaboration et pour la relecture de mes articles ainsi que pour ses corrections et ses commentaires pertinents.

Un remerciement au Dr Lucie Germain et à son équipe du laboratoire d'organogenèse expérimental (LOEX), qui ont fourni le matériel biologique, dont les CECHs et les fibroblastes cornéens humains avec leurs milieux de culture respectifs, utilisé pour la réalisation des différentes expériences effectuées durant mon doctorat. Je voudrais remercier spécialement le professionnel de recherche, Patrick Carrier, pour toute l'aide qu'il m'a apportée pour la culture cellulaire et la réalisation des matrices reconstruites à l'aide de la méthode d'auto-assemblage du LOEX.

Un merci spécial aux assistants de recherche Steeve Leclerc, Manon Gaudreault et Karine Zaniolo pour leur soutien et leur disponibilité à répondre aux questions que je me suis posées durant les nombreuses années de mes études graduées. Un grand merci en particulier à Karine Zaniolo pour la réalisation de toutes les analyses sur biopuces à ADN et en qPCR qui sont présentées dans cette thèse ainsi que pour le montage de la plupart des figures illustrées dans mes articles scientifiques.

Des remerciements sincères à toutes les personnes (en particulier, à tous les co-auteurs des articles) qui ont participé à la réalisation des travaux scientifiques ayant permis l'élaboration de cette thèse.

Un merci également à tous les membres du CUO-Recherche et à ma famille pour leurs encouragements et leur intérêt pour la réalisation de ce projet de recherche et la complétion de cette thèse. Je tiens finalement à remercier les Instituts de recherche en santé du Canada (IRSC) pour la Bourse d'études supérieures du Canada F. Banting et C. Best qu'ils m'ont attribuée pour la réalisation de mon Doctorat. Un merci au Réseau de recherche en santé de la vision du FRQS pour leur soutien financier.

Avant-propos

Les travaux de recherche réalisés ainsi que les résultats obtenus pendant mon doctorat sont présentés dans cette thèse, sous forme de deux articles scientifiques (chapitres II et III) ainsi que sous forme de deux chapitres traditionnels (chapitres IV et V). Des résultats complémentaires sont également présentés en Annexe.

Le chapitre II présente mon premier article scientifique, ayant pour titre « Expression of the α 5 integrin gene in corneal epithelial cells cultured on tissue-engineered human extracellular matrices », qui a été publié en 2013 dans le Journal « Biomaterials » (Biomaterials. 2013; 34(27):6367-6376) par Jennifer Lake, Karine Zaniolo, Manon Gaudreault, Patrick Carrier, Alexandre Deschambault, Richard Bazin, Lucie Germain, Christian Salesse et Sylvain L. Guérin. Étant première auteure de cet article, j'ai participé, sous la supervision du Dr Sylvain Guérin, à la conception de cette étude. J'ai effectué la réalisation d'une grande majorité des manipulations expérimentales pour l'acquisition des données présentées dans cette publication, incluant la culture des cellules épithéliales et des fibroblastes cornéens, la production des matrices extracellulaires humaines reconstruites, les transfections et les mesures des activités CAT, les analyses en buvardage Western et de retard sur gel (EMSA). Les analyses en spectrométrie de masse (Figure 2.1A-B) ont été réalisées par la plateforme de Protéomique du Centre de génomique de Québec située au centre de recherche du CHU de Québec. Les analyses sur biopuces à ADN et en qPCR (Figure 2.4) ont été réalisées par Karine Zaniolo et Manon Gaudreault du laboratoire du Dr Guérin. Le buvardage Western pour l'expression de l'intégrine a5 (Figure 2.4E) a été réalisé par Manon Gaudreault. Les études d'immunofluorescences pour l'expression des composantes de la MEC dans les cornées reconstruites et les cornées natives (Figure 2.1C et Table 2.1) ont été effectuées par Alexandre Deschambault et Patrick Carrier du laboratoire du Dr Lucie Germain, tandis que celles pour l'expression de α 5 (Figure 2.4F) ont été réalisées par Karine Zaniolo. L'équipe du Dr Lucie Germain a également contribué à cette étude en fournissant le matériel biologique. J'ai également contribué à l'interprétation des résultats et à la rédaction de certaines parties du manuscrit en collaboration avec le Dr Guérin et le Dr Christian Salesse. Le montage des figures de cet article a été effectué par Karine Zaniolo. Il est à noter que j'ai été récipiendaire du Prix Réseau Vision 2013-2014 pour la publication de cet article.

Le chapitre III présente mon deuxième article scientifique, ayant pour titre « Functional impact of collagens on the activity directed by the promoter of the α 5 integrin subunit gene in corneal epithelial cells », qui vient d'être accepté pour publication avec révisions en 2015 dans le Journal « Investigative Ophthalmology & Visual Science » par Jennifer Lake, Karine Zaniolo, Marie-Êve Gingras, Camille Couture, Christian Salesse et Sylvain L. Guérin. Je suis la première auteure de cet article et j'ai participé, sous la supervision du Dr Guérin, à la conception de cette étude. J'ai également réalisé une partie des expériences présentées dans le chapitre III, incluant la culture des cellules épithéliales sur les matrices simples de collagènes, les transfections et les mesures des activités CAT, les analyses en buvardage Western et de retard sur gel (EMSA). Les résultats présentés dans les figures 3.1 (A à C), 3.2C et 3.3 ont été obtenus par Marie-Êve Gingras pendant ses études graduées de 3^e cycle dans le laboratoire du Dr Guérin. Les résultats présentés dans les figures 3.6F et 3.7D ont été obtenus par Camille Couture, une étudiante au doctorat dans le laboratoire du Dr Guérin. Les analyses sur biopuces à ADN (Figures 3.6A-D et 3.7B), en qPCR (Figures 3.4C, 3.6E et 3.7C) et en buvardage Western pour l'expression de l'intégrine α 5 (Figure 3.4D) ont été réalisées par Karine Zaniolo du laboratoire du Dr Guérin. J'ai également participé à l'interprétation des résultats et à la rédaction de certaines parties du manuscrit en collaboration avec le Dr Guérin et le Dr Salesse. Le montage des figures de cet article a été effectué par Karine Zaniolo avec ma collaboration.

Le chapitre IV présente les résultats d'une troisième étude réalisée au cours de mon doctorat touchant l'élément conservé identifié en amont des promoteurs des gènes $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 9$ et αv (précédemment publié dans Vigneault F., K. Zaniolo et al. *Prog Retin Eye Res* 2007; 26(2): 99-161) et leur modulation de l'expression du gène $\alpha 5$ dans les cellules épithéliales. J'ai réalisé la majorité des expériences présentées dans le chapitre IV, incluant la culture cellulaire, les transfections et les mesures des activités CAT, les analyses de retard sur gel (EMSA), les analyses *TFsearch* et *JASPAR*. J'ai également rédigé cette partie et j'ai effectué le montage des figures de ce chapitre sous la supervision du Dr Guérin. La

construction des plasmides portant les segments conservés de 50pb a été réalisée par Steeve Leclerc et ceux portant les segments conservés de 300pb par Jean-François St-Laurent du laboratoire du Dr Guérin. Les résultats présentés dans la figure 4.4C ont été obtenus par Céline Duval, une étudiante graduée dans le laboratoire du Dr Guérin. Les analyses sur biopuces à ADN (Figure 4.6B) ont été réalisées par Karine Zaniolo du laboratoire du Dr Guérin.

Le Chapitre V présente des résultats complémentaires à ceux décrits dans les chapitres II et III de cette thèse qui ouvrent de nouvelles pistes de recherche sur les gènes, autres que les intégrines, dont l'expression est influencée par les composantes de la MEC. Toutes les analyses sur biopuces à ADN et en qPCR présentées dans cette section ont été réalisées par Karine Zaniolo et Manon Gaudreault, tandis que les analyses zymographiques (Figure 5.3C) ont été effectuées par Steeve Leclerc du laboratoire du Dr Guérin. J'ai participé à l'interprétation des résultats et à la rédaction de cette section sous la supervision du Dr Guérin. J'ai également effectué le montage des figures de ce chapitre avec la collaboration de Karine Zaniolo.

L'Annexe 1 intitulée « Influence de matrices extracelluaires humaines reconstruites sur l'expression du gène α 5 de l'intégrine α 5 β 1 dans les cellules épithéliales de cornée de lapin » et l'Annexe 2 ayant pour titre « Modulation de l'expression du gène α 5 de l'intégrine α 5 β 1 et des autres gènes par des matrices extracellulaires humaines reconstruites dans les cellules épithéliales de cornée humaine à sous-confluence » présentent des résultats qui sont complémentaires aux Chapitres II et V. Les contributions décrites précédemment pour ces chapitres sont les mêmes pour ces annexes. L'Annexe 3 intitulée « Les séquences des éléments conservés en amont des promoteurs des gènes α 3, α 5, α 9, α v et leurs sites de liaisons potentiels pour certains facteurs de transcription » est un complément aux Figures 4.4A et 4.6A présentées au Chapitre IV. Les contributions décrites précédemment pour ce chapitre sont également les mêmes pour cette annexe. J'ai également participé à la rédaction des parties textes associées à ces annexes.

Chapitre I : Revue de la littérature

1. Introduction

Selon les données de l'Organisation mondiale de la Santé (OMS), les blessures et maladies de la cornée sont des causes majeures de perte de vision et de cécité. En effet, on estime qu'il y a plus de 37 million d'individus dans le monde souffrant de cécité bilatérale et un autre 124 million qui ont une vision sévèrement détériorée au niveau des deux yeux (Whitcher et al., 2001 ; Foster, 2005). Les causes principales de cécité sont la cataracte, le glaucome, l'opacification de la cornée (cicatrice résultant de causes variées), la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) et la rétinopathie diabétique (Foster, 2005). Les lésions de la cornée causent 37% des troubles visuels et sont à l'origine de 23% des consultations médicales liées aux problèmes oculaires en Amérique du Nord (Germain et al., 2000). Les lésions cornéennes peuvent être causées par des maladies de l'œil ou des blessures : trauma (coup, éraflure), brûlures chimiques, infections virales ou bactériennes, maladies auto-immunes, sécheresse oculaire, verres de contact portés trop longtemps (kératite) et corps étrangers (Reims et Kottek, 1997). Certaines lésions cornéennes sont superficielles tandis que d'autres sont sévères, persistantes, récurrentes et peuvent engendrer des complications affectant la vision dont des érosions récurrentes, des ulcères de la cornée, des perforations de la cornée et des cicatrices (Reims et Kottek, 1997 ; Das et Seitz, 2008). La greffe de cornée constitue le traitement le plus couramment utilisé pour traiter ces lésions sévères résultant en une opacification de la cornée. Cependant, les dons de cornées humaines sont nettement inférieurs à la demande actuelle de greffes, ce problème risquant de s'accentuer dans les prochaines années suite à l'expansion fulgurante des techniques de chirurgies réfractives utilisées dans le traitement des troubles de la vue (critère d'exclusion des cornées pour greffes à la Eye Bank Association of America). Aux États-Unis, 1 million de procédures de corrections visuelles par chirurgies réfractives au laser sont effectuées chaque année (Kim et Chuck, 2008). La kératectomie photoréfractive (PKR) et la technique du LASIK (laser in situ keratomileusis) sont les méthodes les plus utilisées pour corriger la myopie, l'hypermétropie et l'astigmatisme. Plusieurs

complications, comme l'opacification de la cornée, des éblouissements et des halos, des déformations de la cornée (ectasies) et de la sécheresse oculaire peuvent apparaître à la suite de ces chirurgies réfractives de l'œil et ainsi affecter la vision des patients (Reims et Kottek, 1997 ; Fagerholm, 2003 ; Santhiago et al., 2012). Il est donc d'intérêt d'accroître notre compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la guérison des plaies cornéennes physiologiques ou pathologiques. Ces connaissances permettront éventuellement de développer des meilleurs traitements.

1.1. Le globe oculaire humain

L'œil est l'un des cinq organes des sens du corps humain. Le globe oculaire humain est grossièrement sphérique avec un diamètre d'environ 25 mm chez l'adulte. Il se compose de trois couches : la couche fibreuse ou protectrice (externe), la couche vasculaire (moyenne) et la couche nerveuse ou visuelle (interne) (Figure 1.1) (Marieb et Hoehn, 2010; Remington, 2012).



Figure 1.1. Représentation schématique des différentes parties du globe oculaire.

La paroi de l'œil est composée de trois couches : la couche fibreuse externe (en blanc), la couche vasculaire (en jaune) et la couche nerveuse interne (en rouge). La couche fibreuse comprend la cornée et la sclère. La couche vasculaire est composée de la choroïde, du corps ciliaire et de l'iris. La couche nerveuse interne est formée de la rétine.

La cavité interne de l'œil est composée de l'humeur aqueuse, du cristallin, qui constitue la lentille transparente biconvexe de l'œil, et du corps vitré. La couche protectrice comprend deux parties : la cornée et la sclérotique (aussi appelée sclère). Cette enveloppe externe protège les structures internes de l'œil et maintient sa structure sphérique. La sclère formant la partie postérieure externe de l'œil est opaque et constitue le blanc de l'œil. La sclérotique est recouverte de la conjonctive, une fine membrane muqueuse transparente, dans sa partie antérieure. La cornée est transparente : elle sert de fenêtre à la lumière (objectif de l'œil) et représente seulement 7 % de la surface du globe oculaire. La couche vasculaire est constituée de l'iris, du corps ciliaire et de la choroïde. La choroïde, située entre la sclérotique et la rétine, est très vascularisée et a pour fonction d'assurer la nutrition de l'iris et de la rétine. Cette couche choroïdienne contenant de nombreux pigments colorés maintient l'intérieur de l'œil en chambre noire. La couche visuelle interne contient la rétine et le nerf optique. La rétine est une membrane nerveuse hypersensible hautement vascularisée tapissant la surface interne du globe oculaire et qui est organisée en deux parties: une externe pigmentaire, l'épithélium pigmentaire de la rétine (EPR), et une partie nerveuse interne, la rétine neurosensorielle. La rétine neurosensorielle comprend trois principaux types de neurones (de la surface interne jusqu'à la partie pigmentaire de la rétine): les cellules ganglionnaires, les cellules bipolaires et les cellules visuelles photoréceptrices. Il existe deux types de photorécepteurs : les bâtonnets et les cônes. Les photorécepteurs sont des cellules sensorielles photosensibles qui réagissent aux stimuli lumineux en émettant des influx nerveux aux neurones bipolaires puis aux cellules ganglionnaires vers le nerf optique qui transmet l'image de la rétine au cortex visuel du lobe occipital du cerveau. Les cônes sont responsables de la vision diurne à haute intensité lumineuse et permettent une vision très précise des couleurs, alors que les bâtonnets, qui perçoivent uniquement le noir et le blanc, assurent la vision nocturne dans des conditions de faible luminosité et permettent de voir des images floues et incolores. La rétine contient aussi d'autres types de neurones, les cellules horizontales et les cellules amacrines qui permettent de moduler latéralement la transmission de l'information visuelle. Le fonctionnement, la maintenance, la survie et la protection des cellules neuronales de la rétine dépendent des cellules épithéliales de l'EPR et des cellules gliales de Müller. La lumière qui pénètre dans l'œil est réfractée par la cornée avec l'aide du cristallin,

Rapport-gratuit.com 💦 LE NUMERO I MONDIAL DU MÉMOIRES.

permettant ainsi la formation d'une image inversée sur la rétine. La cornée transparente se comporte comme une lentille convergente indispensable au bon fonctionnement optique du système oculaire (Marieb et Hoehn, 2010 ; Remington, 2012). Dans cette thèse, une attention particulière sera portée à l'anatomie et la physiologie de la cornée ainsi que sur les processus associés à sa cicatrisation.

1.2. La cornée

La cornée humaine, structure transparente la plus antérieure du globe oculaire, agit comme une barrière frontale en protégeant les structures internes de l'œil contre l'environnement extérieur (agents infectieux ou autres); elle est la porte d'entrée de la lumière et, avec le cristallin, assure la réfraction de la lumière jusqu'aux cellules rétiniennes. La cornée est un tissu avasculaire qui reçoit son apport nutritif (notamment, oxygène et glucose) du film lacrymal, de l'humeur aqueuse et de la vascularisation du limbe (surtout pour la périphérie de la cornée) (Klyce et Beuerman, 1998 ; Ehlers et Hjortdal, 2005 ; Nishida et Saika, 2011). Elle est aussi très riche en terminaisons nerveuses (300 à 600 fois plus que la peau), représentant un des tissus les plus sensibles de l'organisme (Beuermann et Pedroza, 1996; Muller et al., 2003 ; Ehlers et Hjortdal, 2005). Son épaisseur central est d'environ 544 ± 34 μm (440-650 μm) et augmente vers la périphérie jusqu'à atteindre 700 μm au niveau du limbe (Hogan et Alvarado, 1971; Klyce et Beuermaun, 1998; Nishida et Saika, 2011). La cornée procure 75% du pouvoir de réfraction du système oculaire. La transparence est une caractéristique importante de la cornée indispensable à son rôle optique. Plusieurs facteurs contribuent à cette transparence cornéenne: la régularité et l'épaisseur uniforme de l'épithélium en association avec l'intégrité du film lacrymal, l'architecture régulière du collagène (lamelles) et la taille des fibrilles, la faible densité des kératocytes avec leur production de protéines cristallines solubles et la présence des protéoglycanes dans le stroma cornéen, la régulation de l'hydratation de la cornée par l'endothélium et l'absence de vascularisation (Jester et al., 1999a; Kinoshita et al., 2001; Kurpakus-Wheater et al., 2001 ; Meek et al., 2003 ; Fischbarg et al., 2005 ; Edelhauser, 2006 ; Jester, 2008 ; Hassell et Birk, 2010). La cornée humaine est constituée de 3 couches tissulaires distinctes séparées par deux membranes spécialisées: un épithélium, une membrane de Bowman, un stroma, une membrane de Descemet et un endothélium (Figure 1.2) (Hogan et Alvarado, 1971 ; Beuerman et Pedroza, 1996 ; DelMonte et Kim, 2011 ; Nishida et Saika, 2011).



Figure 1.2. Les différentes couches et membranes de la cornée.

A) Représentation schématique de la cornée, qui se compose de 3 couches tissulaires distinctes séparées par deux membranes spécialisées, soit: 1) un épithélium avec sa membrane basale, 2) une membrane de Bowman, 3) un stroma, 4) une membrane de Descemet et 5) un endothélium. B) Coupe histologique d'une cornée humaine avec les différentes parties identifiées (Photo tirée de http://www.ophtalmologie-fovea.fr/albumphoto1/page13.html).

1.2.1. L'épithélium cornéen

L'épithélium cornéen constitue la couche la plus superficielle de la cornée et, de ce fait, est aussi la plus exposée à l'environnement externe. L'épithélium de la cornée centrale représente 10 % de l'épaisseur totale de la cornée avec une épaisseur d'environ 50 µm. Il est constitué de 5 à 7 couches de cellules stratifiées, pavimenteuses et non-kératinisées avec une membrane basale sécrétée conjointement par les cellules épithéliales de la couche basale et les kératocytes du stroma. Cet épithélium cornéen est constitué de trois assises cellulaires : basale, intermédiaire et superficielle (Hogan et Alvarado, 1971 ; Beuerman et Pedroza, 1996 ; Nishida et Saika, 2011).

L'assise basale, la couche cellulaire la plus profonde de l'épithélium, est une monocouche composée de cellules basales cuboïdales. Ce sont des cellules hautes, larges, ayant un

novau arrondi, les moins différenciées et où les mitoses sont fréquentes pour permettre un renouvellement constant des couches supérieures de l'épithélium. L'assise intermédiaire comporte 2 ou 3 couches de cellules polygonales ou ailées de formes irrégulières, d'état de différenciation intermédiaire, assurant la transition entre les cellules basales et les cellules superficielles. L'assise superficielle est composée de 2 ou 3 couches de cellules superficielles très étendues et aplaties. Ce sont des cellules différenciées qui deviennent d'autant plus aplaties qu'elles sont superficielles et perdent progressivement leurs différentes organelles. Ces cellules superficielles finissent par disparaître par desquamation. Elles sont caractérisées par la présence de microvillosités apicales qui permettent d'augmenter l'adhésion et la surface d'échange avec le film lacrymal. Ainsi, dans l'épithélium pluristratifié, les cellules basales les moins différenciées sont de forme cuboïdale tandis qu'elles deviennent graduellement de plus en plus aplaties et différenciées tout au long de leur migration vers la partie antérieure (Beuerman et Pedroza, 1996 ; Nishida et Saika, 2011). Les cellules superficielles adhèrent entre elles par des jonctions serrées ('tight junctions zonula occludens') permettant la formation d'une barrière semiperméable et sont attachées aux cellules adjacentes par des desmosomes et des jonctions d'adhésions. Les cellules ailées ou polygonales possèdent des jonctions communicantes ('gap junctions') et des desmosomes les connectant étroitement entre elles et aux cellules basales. Les cellules basales possèdent plusieurs invaginations latérales permettant aux cellules voisines d'être étroitement connectées entre-elles par des desmosomes, des jonctions communicantes ('gap junctions') et des jonctions d'adhésions (Suzuki et al., 2003 ; Nishida et Saika, 2011). Les cellules basales adhèrent fortement à la membrane basale sous-jacente par de nombreux hémidesmosomes (Stepp et al., 1990; Jones et al., 1994).



Figure 1.3. Organisation de la membrane basale de l'épithélium cornéen humain. Les Laminines (LM-1, LM-10) ancrées à la surface cellulaire par les intégrines et les dystroglycanes s'assemblent pour former de larges réseaux et sont associées au réseau en forme de feuillet du collagène de type IV par l'entactine (nidogène) et par un protéoglycane à héparane sulfate, le perlécane, constituant la charpente de la membrane basale (Figure tirée de Alberts et al., 2011).

La membrane basale sur laquelle repose les cellules basales de l'épithélium cornéen est un feuillet enrichi de collagènes de type IV (CIV, chaînes α3 à α6), VII (CVII), XII (CXII), XVII (CXVII), XVIII (CXVIII), de laminines (LM) de type-1 (LM-111), -5 (LM-332), -6 (LM-311), -8 (LM-411), -10 (LM-511), d'entactine (nidogène), d'héparane sulfate protéoglycane (le perlécane) et d'une petite quantité de fibronectine (FN) et de fibrine (Nakayasu et al., 1986 ; Martin et Timpl, 1987 ; Ljubimov et al., 1995 ; Tuori et al., 1996 ; Michelacci, 2003 ; Kabosova et al., 2007 ; Torricelli et al., 2013). Le CIV est un constituant majeur de la membrane basale de l'épithélium cornéen (Zimmermann et al., 1986). Les LM-1 (LM-111), LM-5 (LM-332) et LM-10 (LM-511) sont les principaux isoformes de laminines présents dans la membrane basale cornéenne (Ljubimov et al., 1995 ; Tuori et al., 1996 ; Filenius et al., 2001 ; Kabosova et al., 2007). Les molécules de LM-1 et LM-10 s'assemblent pour former de larges réseaux, tandis que la LM-5 se retrouve concentrée au niveau des hémidesmosomes. Les réseaux des laminines (LM-1, LM-5, LM-10) sont associés au réseau en forme de feuillet du CIV et sont interconnectés et stabilisés par la protéine entactine (nidogène) en collaboration avec le volumineux perlécane (un

protéoglycane à héparane sulfate). Cet ensemble constitue la charpente de la membrane basale qui est maintenue par liaison à des récepteurs transmembranaires situés à la surface des cellules basales de l'épithélium, dont les intégrines et les dystroglycanes, un autre type important de récepteur cellulaire des laminines et du perlécane, et contribue ainsi au maintien structural et fonctionnel de l'épithélium cornéen (Sasaki et al., 2004 ; Alberts et al., 2011 ; Yurchenco, 2011 ; Hohenester and Yurchenco, 2013) (Figure 1.3). Cette membrane basale, avec ses différentes composantes matricielles, permet donc l'adhésion des cellules épithéliales et supporte son organisation en promouvant la survie, la prolifération ou la différenciation cellulaire. Elle sert également de support à la migration cellulaire lors de la cicatrisation cornéenne (Germain et al., 2000 ; Zieske, 2001 ; Suzuki et al., 2003 ; Vigneault et al., 2007).

La surface de l'épithélium cornéen est recouverte par une mince couche de larmes appelée le film lacrymal. Il est constitué traditionnellement de trois phases : une phase superficielle lipidique, une phase intermédiaire aqueuse et une phase mucoïde en contact étroit avec les microvillosités retrouvées à la surface des cellules superficielles épithéliales (Ehlers, 1965 ; Holly et Lemp, 1977 ; Dilly, 1994 ; Gipson et Argüeso, 2003). Ce modèle a néanmoins été révisé au cours des dernières années et il est maintenant admis que le film lacrymal est en fait composé de deux couches : une couche de lipides et une couche aqueuse contenant des concentrations différentes de mucines dont des mucines solubles et des mucines adhérant aux membranes des cellules superficielles épithéliales à l'aide des glycocalyx épithéliaux, des molécules de glycoprotéine-polysaccharide qui recouvrent certaines surfaces épithéliales (Klyce et Beuerman, 1998; Gipson et Argüeso, 2003; Dieckow et Argüeso, 2013). Le film lacrymal est une composante naturelle visant à humidifier et à protéger la surface de la cornée contre les agressions extérieures, telles les petits corps étrangers et irritants (poussière, saleté) ou les agents infectieux et bactériens. Le liquide lacrymal nourrit la cornée en comblant son besoin en oxygène et en différents nutriments. Il permet également de combler les petites irrégularités de la surface épithéliale et contribue ainsi à produire une surface lisse et homogène afin d'obtenir une surface optique régulière pour permettre une vision claire et optimale (Tiffany, 2008 ; Dieckow et Argüeso, 2013).



Figure 1.4. Histologie du limbe cornéen.

Le limbe cornéen, ou la jonction cornéo-sclérale, est la zone de transition entre la cornée transparente d'un côté et la conjonctive et la sclère opaque de l'autre. A) Position schématique du limbe cornéen dans une vue frontale et **B**) dans une vue antérieure en coupe transversale du globe oculaire (Figure tirée de http://medical-dictionary.thefreedictionary.com/limbus ; Dorland's Medical Dictionary for Health Consumers. © 2007 by Saunders, an imprint of Elsevier, Inc.). C) Vue histologique de la jonction cornéo-sclérale appelée le limbe. (Photo tirée de http://faculty.une.edu/com/abell/histo/histolab3b.htm). **D**) Vue histologique de l'épithélium limbique avec localisation des cellules souches épithéliales cornéennes (astérisque) localisées à l'intérieur des palissades de Vogt (flèche) au niveau de la couche basale de l'épithélium limbique. Échelle, 100 µm. (Figure tirée de Bentley et al., 2007)

L'épithélium de la cornée est en renouvellement continuel. Il n'y a que les cellules basales qui possèdent une activité mitotique permettant de remplacer, par prolifération verticale, les couches supérieures, donc de se différencier consécutivement en cellules ailées et en cellules superficielles qui seront éventuellement éliminées par apoptose et desquamation dans le film lacrymal (Hanna et al., 1961 ; Beebe et Masters, 1996). L'épithélium cornéen a donc besoin de cellules souches épithéliales pour assurer sa régénération et sa maintenance. Le limbe cornéo-scléral est la zone de transition entre la cornée transparente d'un côté et la conjonctive et la sclère opaque (partie blanchâtre) de l'autre (Figure 1.4) (Hogan et Alvarado, 1971 ; Remington, 2012). L'épithélium limbique est composé de 10 à 12 couches de cellules épithéliales (Hogan et Alvarado, 1971) et il contient également des mélanocytes pigmentés ainsi que des cellules immunitaires présentatrices d'antigènes, les cellules de Langerhans (Baum, 1970; Vantrappen et al., 1985; Higa et al., 2005). La membrane basale du limbe possède certaines composantes matricielles uniques comparativement à celle de la cornée, incluant le CIV constitué des chaînes a1a2, les isoformes de LM constitués des chaînes $\alpha 2$ et $\beta 2$ ainsi que la ténascine-C (TN-C) (Ljubimov et al., 1995; Schlotzer-Schrehardt et al., 2007; Kabosova et al., 2007; Torricelli et al., 2013; Castro-Muñozledo, 2013). Le stroma limbique sous-jacent contient une grande quantité de vaisseaux sanguins et de nerfs (Goldberg et Bron, 1982 ; Lawrenson et Ruskell, 1991). Toutes ces propriétés contribuent à l'hypothèse d'une niche environnementale (palissades de Vogt) située au limbe pour maintenir la population des cellules souches de la cornée et réguler leur patron de division cellulaire (Li et al., 2007 ; Castro-Muñozledo, 2013). Cette région limbique est donc fonctionnellement importante, puisqu'elle contient les cellules souches de l'épithélium cornéen au niveau de sa couche basale, plus particulièrement à l'intérieur des palissades de Vogt près des vaisseaux sanguins (Kruse, 1994; Zieske, 1994a; Daniels et al., 2001; Schlotzer-Schrehardt et Kruse, 2005; Li et al., 2007). Les Kératines 3 et 12 (K3 et K12), marqueurs d'un phénotype épithélial cornéen différencié, sont présentes sur l'ensemble de l'épithélium cornéen sauf au niveau de la couche basale de la région limbique (Schermer et al., 1986; Kurpakus et al., 1990 ; Schlotzer-Schrehardt et Kruse, 2005 ; Chee et al., 2006). Par contre, la kératine 19 (K19), un marqueur des cellules souches cutanées qui est largement exprimé sur l'épithélium cornéen fœtal, n'est présente chez l'adulte qu'au niveau de la couche
basale de la région du limbe (Schermer et al., 1986 ; Schlotzer-Schrehardt et Kruse, 2005 ; Chee et al., 2006). Ainsi, la couche basale de l'épithélium limbique est vraisemblablement la niche exclusive des cellules souches de l'épithélium cornéen. Ces cellules souches présentent plusieurs caractéristiques : elles ont un grand potentiel prolifératif, elles sont indifférenciées, elles possèdent un cycle cellulaire très lent, mais une durée de vie quasiment illimitée (Dua et Azuara-Blanco, 2000; Sangwan, 2001; Daniels et al., 2001; Schlotzer-Schrehardt et Kruse, 2005). Les cellules souches limbiques indifférenciées sont donc capables de se diviser de manière asymétrique afin : i) de maintenir un réservoir de cellules souches indifférenciées et ii) de se différencier en cellules amplificatrices transitoires, qui démontrent une forte activité mitotique mais une capacité de prolifération limitée, et qui vont elles-mêmes donner naissance aux cellules en différenciation terminale. Les cellules amplificatrices transitoires ont un mouvement de migration centripète, de la périphérie, le long de la couche basale de l'épithélium du limbe, vers le centre de la cornée, pour y constituer une assise de cellules basales épithéliales cornéennes. Ces cellules basales vont ensuite proliférer par un mouvement vertical, de la base vers la surface de l'épithélium cornéen, en se différenciant progressivement d'un stade post-mitotique à un stade de différenciation terminale lorsqu'elles se rapprochent de la surface de la cornée (Figure 1.5) (Hoang-Xuan, 1998; Dua et Azuara-Blanco, 2000; Sangwan, 2001; Li et al., 2007). L'Hypothèse XYZ de Thoft et Friend propose l'existence d'un équilibre entre : 1) la prolifération verticale des cellules épithéliales basales, 2) la prolifération et la migration centripète des cellules souches limbiques, et 3) la perte cellulaire à la surface cornéenne par desquamation (Thoft et Friend, 1983). Ces trois phénomènes interdépendants permettent donc d'assurer un renouvellement constant de cellules épithéliales afin de maintenir l'intégrité structurale de l'épithélium cornéen. Les cellules souches de l'épithélium cornéen au niveau du limbe et les cellules amplificatrices transitoires sont donc essentielles au maintien de l'homéostasie de l'épithélium, mais elles sont également impliquées dans la guérison des plaies cornéennes en fournissant les cellules nécessaires à la régénération de l'épithélium (Kruse, 1994 ; Lehrer et al, 1998 ; Lu et al., 2001).



Figure 1.5. Localisation et différenciation des cellules souches de l'épithélium cornéen. Les cellules souches épithéliales cornéennes (SC), localisées dans des niches appelées palissades de Vogt au niveau basal de l'épithélium du limbe (zone de transition entre l'épithélium cornéen et l'épithélium conjonctival), peuvent se différencier en cellules amplificatrices transitoires précoces (*e*TAC) et ensuite tardives (*I*TAC). Ces dernières migrent en un mouvement centripète le long de la couche basale de la périphérie vers le centre de la cornée et évoluent vers un stade de cellules post-mitotiques (PMC) puis un stade de cellules en différenciation terminale (TDC) lorsqu'elles quittent la couche basale de l'épithélium cornéen et se rapprochent de la surface de la cornée. L'épithélium limbique contient également des mélanocytes (M) et des cellules de Langerhans (LC). Le stroma limbique sous-jacent contient une grande quantité de vaisseaux sanguins (BV) et de nerfs (N). La membrane basale (BM) du limbe possède une composition unique. Toutes ces propriétés contribuent à l'hypothèse des niches (palissades de Vogt) situées au limbe pour maintenir la population des cellules souches épithéliales de la cornée. (Figure tirée de Li et al., 2007).

1.2.2. Le stroma cornéen et la membrane de Bowman

Le stroma cornéen représente 90% (500 µm) de l'épaisseur cornéenne (Hogan et Alvarado, 1971 ; Dawson et al., 2011). Il est constitué à 15% de fibrilles de collagènes organisées en lamelles (principalement le collagène de type I (58%), mais contient aussi les collagènes de types III, V (15%), VI (24%), XII et XIV) (Newsome et al., 1982 ; Meek et Fullwood, 2001 ; Robert et al., 2001 ; Dawson et al., 2011), entre lesquelles on retrouve également des molécules d'eau (constituant 78% de la masse du stroma), des protéoglycanes de type dermatane/chondroïtine sulfate (décorine) et de type kératane sulfate (lumican, mimecane, et kératocane ; 1% de la masse du stroma) et des kératocytes (1% de la masse du stroma) (Michelacci, 2003 ; Ehlers et Hjortdal, 2005 ; Dawson et al., 2011). La fonction principale du stroma est d'être un support structural transparent permettant une réfraction correcte de la lumière pour assurer une bonne vision. Pour répondre à cette fonction, l'organisation tridimensionnelle des fibrilles de collagènes du stroma est particulière et importante (Klyce et Beuerman, 1998 ; Dawson et al., 2011).

Dans le stroma cornéen, les molécules de collagène (types I et V) s'associent pour former des fibrilles de collagène. Les fibrilles de collagène sont organisées en lamelles superposées et entrelacées, parallèles à la surface cornéenne et d'une épaisseur se situant entre 0.2 à 2.5 μm et une largeur entre 0.5 à 250 μm (Komai et Ushiki, 1991 ; Radner et al., 1998 ; Birk, 2001 ; Dawson et al., 2011). À l'intérieur d'une lamelle du stroma de la cornée centrale, les fibrilles de collagène sont parallèles entre-elles, possèdent un diamètre uniforme (25-35 nm) (Komai et Ushiki, 1991; Meek and Leonard, 1993) et sont équidistantes avec un espace interfibrillaire constant (~60 nm) (Meek and Leonard, 1993; Klyce et Beuerman, 1998). Le stroma cornéen est composé d'environ 250 à 300 lamelles (Hamada et al., 1972; Bergmanson et al., 2005) et chaque lamelle stromale forme des angles divers se situant entre 0 et 90 degrés par rapport à la lamelle adjacente. Toutefois, 58% des lamelles du stroma sont orientées, une par rapport à la suivante, d'un angle se situant entre 31° et 60° (Radner et al., 1998; Meek et Fullwood, 2001) (Figure. 1.6). Cette configuration typique et spécifique du stroma cornéen est responsable en grande partie de la transparence de la cornée. Les fibrilles de collagènes types I et V sont entourées de protéoglycanes et d'autres types de collagènes (VI, XII et XIV) contribuant à maintenir un espacement régulier entre



les fibrilles de collagène (Scott, 1991 ; Hirsch et al., 2001 ; Dawson et al., 2011). Les kératocytes sont des cellules aplaties du stroma, à très longs prolongements possédant des jonctions communicantes (*'gap junctions'*) avec les cellules adjacentes. Les kératocytes sont situées entre les lamelles et s'étendent parallèlement à celles-ci. Ces cellules sont peu nombreuses dans la cornée native et affichent un cycle cellulaire très lent (Poole et al., 1993 ; Hahnel et al., 2000). Par contre, suite à une lésion au niveau du stroma, les kératocytes se transforment en fibroblastes actifs responsables de la synthèse des composantes de la matrice extracellulaire (MEC). Ils sont aussi responsables de la production des enzymes de dégradation de la MEC, telles les métalloprotéinases matricielles (MMPs) qui participent ainsi au remodelage de la matrice extracellulaire durant la guérison de ce tissu (Fini, 1999 ; Fini et Stramer, 2005 ; West-Mays et Dwivedi, 2006). Les fibroblastes peuvent se différencier également en myofibroblastes qui sont nécessaires pour permettre la contraction de la plaie et la production de plusieurs facteurs de croissance impliqués dans les différents processus de guérison des plaies cornéennes (Fini, 1999 ; Jester et al., 1999b ; Wilson et al., 2001 ; West-Mays et Dwivedi, 2006).

La membrane de Bowman, aussi appelée lame limitante antérieure, est une région de 8 à 12 µm d'épaisseur séparant la membrane basale de l'épithélium du stroma cornéen. La membrane de Bowman n'est pas une membrane basale typique mais plutôt une couche acellulaire dense formée de nombreuses fibrilles de collagène de petits diamètres (20-25 nm) intriquées, sans aucune orientation et soutenant le stroma (Hogan et Alvarado, 1971 ; Komai et Ushiki, 1991 ; Beuerman et Pedroza, 1996). Elle est composée principalement des collagènes de types I (principal composant), III, V, VI, XII, mais compte également du collagène de type IV et VII provenant de la membrane basale (Jacobsen et al., 1984 ; Nakayasu et al., 1986 ; Marshall et al., 1991a ; Marshall et al., 1991b).



Figure 1.6. Organisation des fibrilles de collagène dans le stroma cornéen.

A) Les molécules de collagène sont constituées de trois chaînes α formant une triple hélice. Dans le stroma cornéen, les molécules de collagène s'associent pour former des fibrilles hétérogènes de collagène de types I et V de 25-35 nm qui sont entourées de collagène de type VI, des collagènes FACIT (types XII et XIV) et de protéoglycanes (décorine, lumicane, mimecane, et kératocane) régulant l'organisation des fibrilles (Figure inspirée de Dawson et al., 2011). B) Schéma du stroma cornéen illustrant les fibrilles de collagène qui sont organisées en lamelles empilées et parallèles à la surface cornéenne. Les lamelles successives sont à angles les unes par rapport aux autres. Les kératocytes se situent entre les lamelles (Figure tirée de Hogan et Alvarado, 1971).

1.2.3. L'endothélium cornéen et la membrane de Descemet

L'endothélium cornéen est la couche fragile tapissant la face postérieure de la cornée. Cette couche, d'une épaisseur d'environ 5 um, est directement en contact avec l'humeur aqueuse. Elle est composée d'une seule couche de cellules hexagonales et aplaties formant une mosaïque relativement régulière et uniforme (Hogan et Alvarado, 1971 ; Beuerman et Pedroza, 1996; Dawson et al., 2011). Les cellules formant cette couche endothéliale sont munies de plusieurs invaginations et jonctions communicantes latérales (jonctions 'gap') avec les cellules voisines ainsi que de jonctions serrées incomplètes et discontinues ('leakv tight junctions' ou 'macula occludens') au niveau apical permettant la formation d'une barrière perméable à la diffusion de l'eau contenue dans l'humeur aqueuse vers le stroma (Hirsch et al., 1977; Ottersen et Vegge, 1977; Fischbarg, 2005; Dawson et al., 2011). La fonction principale de l'endothélium est donc de contrôler l'hydratation du stroma grâce au transport actif par une pompe Na^+/K^+ ATPase expulsant les ions sodium (Na⁺) et bicarbonates (HCO3⁻) dans l'humeur aqueuse et provoquant un gradient osmotique qui assure la sortie de l'eau du stroma nécessaire au maintien de la transparence de la cornée (Fischbarg, 2003; Bonanno, 2003; Fischbarg, 2005; Bonanno, 2012). Ces cellules endothéliales ne possèdent pas la capacité de se régénérer (Joyce, 2003 ; Joyce, 2005) ce qui fait que leur densité cellulaire va progressivement diminuer avec l'âge au profit d'une augmentation du diamètre des cellules, soit de 5000 cellules/mm² à la naissance vers 2500 cellules/mm² chez l'adulte (Yee et al., 1985 ; Abib et Barreto, 2001 ; Dawson et al., 2011).

La membrane de Descemet, aussi appelée lame limitante postérieure, est une membrane basale de 3 µm à la naissance qui s'épaissit avec l'âge jusqu'à environ 10 µm d'épaisseur chez l'adulte et qui est sécrétée par les cellules endothéliales, assurant ainsi son maintien structural. La portion antérieure en contact avec le stroma est fibreuse tandis que la portion postérieure en contact avec l'endothélium est plus homogène (Holgan et Alvarado, 1971 ; Johnson et al., 1982 ; Beuerman et Pedroza, 1996). La membrane de Descemet est principalement constituée de collagènes de types IV et VIII mais contient aussi du collagène de type III, V, VII, (Sawada et al., 1990 ; Marshall et al., 1991a ; Marshall et al., 1991b ; Tamura et al., 1991) ainsi que de la fibronectine et des laminines (Marshall et al., 1991a ; Tervo et al., 1986).

1.3. Maladies de la cornée : Syndromes de déficience en cellules souches limbiques

Les maladies ou les traumas de la cornée sont la deuxième cause la plus importante de perte de vision dans le monde après la cataracte (Garg et al., 2005). Les lésions de la cornée causent 37% des troubles visuels et sont à l'origine de 23% des consultations médicales liées aux problèmes oculaires en Amérique du Nord (Germain et al., 2000). Ces maladies ou blessures endommagent la cornée et sont associées à des problèmes de cicatrisation pouvant éventuellement affecter la vision. L'intégrité de l'épithélium cornéen est indispensable pour assurer une bonne vision. Son renouvellement continuel ou sa régénération après une lésion, assurée par les cellules souches limbiques, est primordial afin de conserver une bonne acuité visuelle. Des dommages au niveau de la population de cellules souches de la couche basale du limbe peuvent engendrer le syndrome de déficience en cellules souches limbiques partiel ou total, entraînant, par-conséquent, une incapacité de régénération normale de l'épithélium cornéen et conduisant à une guérison qui favorise la migration de l'épithélium de type conjonctival (Dua et al., 1994 ; Gatinel et Hoang-Xuan, 2000 ; Dua et Azuara-Blanco, 2000 ; Daniel et al., 2001). Le syndrome de déficience en cellules souches limbiques se caractérise cliniquement par un envahissement progressif de la surface cornéenne par un épithélium de type conjonctival (conjonctivalisation), incluant les cellules à gobelet, une néovascularisation progressive de la cornée, une inflammation chronique et l'apparition de cicatrices et d'un épithélium irrégulier avec des érosions récurrentes et des ulcérations épithéliales étendues menant à une opacification de la cornée et pouvant conduire à une perte de vision (Puangsricharern and Tseng, 1995; Dua et Azuara-Blanco, 2000). Le déficit en cellules souches peut être unilatéral ou bilatéral, partiel ou total, réversible ou irréversible.

La classification des étiologies des déficits en cellules souches limbiques comprend deux catégories. La catégorie I est caractérisée par la destruction des cellules souches limbiques suite à des brûlures oculaires chimiques ou thermiques, à des chirurgies multiples répétées, à des cryothérapies ou radiothérapies de la région limbique, après port inadéquat de lentilles de contact (kératites), à la suite de kératites infectieuses sévères (trachome, herpès,

bactéries) ainsi que des maladies inflammatoires auto-immunes comme le syndrome de Stevens-Johnson et la pemphigoïde. La catégorie II est associée à une dysfonction du microenvironnement stromal des cellules souches limbiques par des maladies comme l'aniridie, la kératodermie congénitale, les déficits endocriniens multiples, les kératopathies neurotrophiques, les inflammations limbiques chroniques (limbites) ou les ulcérations (Puangsricharern and Tseng, 1995 ; Sangwan, 2001).

1.3.1. Les traitements

Les traitements proposés aux patients atteints des syndromes de déficience en cellules souches limbiques sont peu nombreux et comprennent les greffes de limbe/cornée et les greffes d'épithélium cornéen cultivé *in vitro* (Holland et Schwartz, 2000; Gatinel et Hoang-Xuan, 2000; Griffith et al., 2012; Martnez-Osorio et al., 2013; Elisseeff et al., 2013; Wang et al., 2013; Griffith et Harkin, 2014). Ces traitements seront présentés dans les sections suivantes.

1.3.1.1. Greffes de limbe et de cornée

Dans les cas de déficits partiels en cellules souches limbiques, le traitement comprend l'ablation et le débridement mécanique par grattage (scléro-*kératectomie* superficielle) du tissu invasif de l'épithélium d'origine conjonctivale pour permettre aux cellules souches restantes et non affectées de restaurer un épithélium cornéen normal (Dua, 1998 ; Martnez-Osorio et al., 2013). Toutefois, en cas d'échec ou si le déficit en cellules souches limbiques est total et irréversible, une greffe de limbe est nécessaire afin de fournir à l'œil déficient une nouvelle population de cellules souches limbiques saines qui sont capables de régénérer un épithélium cornéen normal. Kenyon et Tseng furent les premiers, en 1989, à proposer une technique d'autogreffe limbo-conjonctivale réalisée chez des patients souffrants d'une atteinte unilatérale. Après avoir retiré le pannus fibrovasculaire cornéen et excisé la conjonctive périlimbique, ils ont greffés deux fragments limbiques provenant de l'œil donneur sain du patient sur environ 2/3 de sa circonférence à l'œil receveur malade afin de reconstituer un capital suffisant de cellules souches limbiques permettant le

renouvellement d'un phénotype épithélial cornéen normal (Kenyon et Tseng, 1989). Les autogreffes limbo-conjonctivales ou kérato-limbiques ne comportent aucun problème de rejet et sont maintenant devenues une procédure standard avec d'excellents résultats pour traiter les déficits en cellules souches limbiques unilatérales (Morgan et Murray, 1996 ; Tan et al., 1996; Moldovan et al., 1999). Cependant, il y a un certain risque de provoquer une déficience en cellules souches limbiques dans l'œil donneur lors du prélèvement pour l'autogreffe (Chen et Tseng, 1990 ; Chen et Tseng, 1991). Dans les cas d'atteinte bilatérale, seulement des allogreffes de limbe sont réalisables (Espana et al., 2004), soit des allogreffes limbo-conjonctivales dans lesquelles le greffon provient de donneurs apparentés vivants (parent génétique) (Rao et al., 1999 ; Daya et Ilari, 2001), ou des allogreffes kératolimbiques où le greffon provient alors d'une banque de donneurs décédés (prélèvement post-mortem sur des cadavres) (Tsai et Tseng, 1994; Tsubota et al., 1995; Tan et al., 1996). Toutefois, les chances de succès des allogreffes sont limitées par les risques majeurs de rejet du greffon, ce qui impose une immunosuppression prolongée (Turgeon et al., 1990; Thorft, 1993; Solomon et al., 2002). Cette procédure d'allogreffe s'accompagne également de risques de transmission de maladies infectieuses.

Les autogreffes ou allogreffes de limbe sont souvent associées simultanément ou après les procédures de repopulation de l'épithélium à des greffes de cornée centrale sur toute son épaisseur (greffe transfixiante) ou à des greffes lamellaires antérieures ou postérieures si le déficit en cellules souches limbiques est accompagné d'une opacité sévère du stroma cornéen et/ou d'une dysfonction endothéliale afin d'améliorer la vision du patient (Martnez-Osorio et al., 2013). Dans des cas d'échecs multiples de greffes et de sécheresse oculaire sévère ou de kératinisation de la surface oculaire, une cornée artificielle ou kératoprothèse peut être l'ultime option du patient. Les types de kératoprothèses les plus utilisées en clinique sont les suivants: les kératoprothèses synthétiques dont celles de Boston types I-II, celles de Alphacor ou les kératoprothèses biologiques comme l'ostéo-odonto-kératoprothèse tibiale (Gomaa et al., 2010; Martnez-Osorio et al., 2013). Le grand problème de pénurie des greffons combiné au risque de provoquer une déficience en cellules souches limbiques dans l'œil du donneur lors de l'autogreffe, ainsi que les risques

de rejet et de transmission de maladies infectieuses lors de l'allogreffe ont amené le développement de traitements alternatifs pour les déficits en cellules souches limbiques.

1.3.1.2. Greffe d'épithélium cornéen cultivé in vitro

Des techniques d'autogreffe ou d'allogreffe d'épithélium cornéen cultivé *in vitro* ont été développées comme traitement alternatif pour traiter les déficiences en cellules souches limbiques ou bilatérales. En 1993, Lindberg et ses collègues ont démontré que les cellules souches limbiques humaines, isolées à partir d'une petite biopsie limbique de 1 mm², pouvaient être cultivées *in vitro* sur une couche nourricière de fibroblastes murins irradiés (cellules 3T3). Après plusieurs passages, le néoépithélium, qui présente un phénotype cornéen composé de 2 à 3 couches de cellules pluristratifiées, a été greffé sous le derme de souris athymiques. Quatre jours après la transplantation, cet épithélium devient pluristratifié de 5 à 6 couches de cellules épithéliales capables de synthétiser une authentique membrane basale, composée de collagènes IV, VII et de laminines (Lindberg et al, 1993). Pelligrini et son équipe ont été les premiers, en 1997, à effectuer une greffe de l'épithélium cornéen cultivé *in vitro* à partir de cellules souches autologues limbiques provenant d'une biopsie limbique d'environ 1mm² prélevée sur l'oeil sain chez deux patientes atteintes d'une déficience limbique unilatérale secondaire à une brûlure chimique (Pelligrini et al., 1997).

Depuis, différentes techniques de culture *ex vivo* de cellules souches épithéliales du limbe pour fins de greffes ont été développées en utilisant différents substrats biologiques comme support de culture afin d'en faciliter le transport, la manipulation, la greffe lors de la chirurgie et la régénération de l'épithélium, dont les plus utilisés en clinique demeurent les membranes amniotiques humaines (Schwab, 1999 ; Schwab et al., 2000 ; Tsai et al., 2000 ; Koizumi et al., 2001 ; Shimazaki et al., 2002 ; Grueterich et al., 2003 ; Sangwan et al., 2003 ; Nakamura et al., 2004a), les gels de fibrine (Rama et al., 2001 ; Han et al., 2002 ; Rama et al., 2010) et les lentilles de contact souples (Di Girolamo et al. 2009 ; Deshpande et al., 2009). D'autres substrats ont néanmoins été testés dont un hydrogel de collagène recombinant humain (Dravida et al., 2008), des surfaces de poly (*N*-isopropylacrylamide)

(PNIPAAm) thermosensible (Nishida et al., 2004a), des membranes de collagènes (Mcintosh Ambrose et al., 2009; Petsch et al., 2014), des myogels (Francis et al., 2009), des fibroïnes de soie (Chirila et al., 2008 ; Bray et al., 2011, Liu et al., 2012) et des stromas cornéens natifs décellularisés (Yoeruek et al., 2012a ; Shafiq et al., 2012). Les risques de rejet pour l'allogreffe de cellules souches limbiques avant subi une expansion *in vitro* sont les mêmes que pour l'allogreffe de limbe. Par ailleurs, la culture de cellules souches épithéliales ou mésenchymateuses autologues provenant d'un autre tissu que le limbe pour être ensuite greffées sur la cornée afin de permettre la reconstruction de la surface oculaire demeure également une autre option valable. Ces sources de cellules souches autologues alternatives comprennent l'épithélium de la muqueuse buccale (le plus fréquemment utilisé) (Nakamura et al., 2004b; Nishida et al., 2004b; Inatomi et al., 2005; Inatomi et al., 2006a ; Inatomi et al., 2006b ; Nakamura et al., 2011), l'épithélium conjonctival (Sangwan et al., 2003 ; Kawasaki et al., 2006 ; Tanioka et al., 2006 ; Ono et al., 2007), les follicules pileux (Blazejewska et al., 2009; Meyer-Blazejewska et al., 2011), le cordon ombilical (Liu et al., 2010; Hayward et al., 2013; Garzon et al., 2014) et la pulpe dentaire (Monteiro et al., 2009; Gomes et al. 2010).

1.3.1.3. Cornées reconstruites in vitro par génie tissulaire

Une nouvelle approche alternative pour répondre à la pénurie de greffons cornéens issus de donneurs pour les greffes de cornées consiste à reconstruire une cornée humaine en laboratoire par génie tissulaire. Au cours des dernières années, plusieurs équipes de recherche ont reconstruit des substituts cornéens *in vitro* tridimensionnels en utilisant les différents types cellulaires de la cornée (les cellules épithéliales, stromales et endothéliales) provenant d'animaux comme le lapin (Zieske et al., 1994 ; Alaminos et al., 2006 ; Xu et al., 2008 ; Fu et al, 2010 ; Pang et al., 2010), le bœuf (Minami et al., 1993 ; Parnigotto et al., 1998 ; Tegtmeyer et al., 2004 ; Mi et al., 2010a ; Mi et Connon, 2013), le porc (Schneider et al., 1999 ; Reichl et al., 2003), le chien (Werner et al., 2008) ou de lignées cellulaires humaines immortalisées (Griffith et al., 1999 ; Reichl et al., 2008) ou encore des cultures primaires de cellules humaines (Germain et al., 1999 ; Orwin et Hubel, 2000 ; Gaudreault et al., 2003 ; Builles et al., 2007a ; Vrana et

al., 2008; Proulx et al., 2010; Lewis et al., 2010; Bray et al. 2012; Bray et al., 2013). Dans ces équivalents cornéens, le stroma est reconstruit en utilisant des fibroblastes incorporés dans des gels de collagènes (Germain et al., 1999; Reichl et al., 2004), des hydrogels de collagènes (Griffith et al., 1999; Griffith et al., 2002), des éponges de collagènes (Orwin et Hubel, 2000 ; Builles et al., 2007a ; Vrana et al., 2008), des gels de collagènes mécaniquement compressés (Lewis et al., 2010; Mi et al., 2010a; Mi et Connon, 2013), des membranes ou éponges de fibroïnes de soie (Lawrence et al., 2009; Harkin et al., 2011; Bray et al., 2012; Bray et al., 2013), des stromas cornéens natifs décellularisés (Fu et al., 2010 ; Pang et al., 2010 ; Shafiq et al., 2012 ; Lynch et Ahearne, 2013 ; Wilson et al., 2013) ou dans une matrice extracellulaire sécrétée et organisée par les fibroblastes eux-mêmes (méthode d'auto-assemblage) (Gaudreault et al., 2003 ; Carrier et al., 2008; Proulx et al., 2010). Le développement de ces substituts de cornées animales ou humaines a permis l'optimisation des conditions de cultures in vitro des différents types cellulaires sur divers substrats, soit l'expansion ex vivo des cellules épithéliales, des fibroblastes du stroma et des cellules endothéliales. Ces équivalents cornéens se révèlent être d'excellents outils pour effectuer des études toxicologiques et pharmacologiques (Tegtmeyer et al., 2001; Reichl et al., 2004; Builles et al., 2007a). Ce sont également des modèles intéressants pour des analyses physiologiques et pathologiques, en particulier l'étude de la cicatrisation de la cornée (Carrier et al., 2008 ; Zaniolo et al., 2013) et celle des interactions cellules-matrices ou cellules-cellules (Zieske et al., 1994 ; Nishimura et al., 1998 ; Orwin et Hubel, 2000 ; Builles et al., 2007b ; Carrier et al., 2009 ; Kobayashi et al., 2015). En outre, les cornées humaines reconstruites démontrent également un potentiel indéniable pour des applications cliniques, entre-autre dans le traitement de plusieurs maladies ou blessures de la cornée (Germain et al., 2000 ; Ruberti et Zieske, 2008 ; Griffith et al., 2009).

L'équipe du Dre Griffith a reconstruit un équivalent cornéen humain complet à l'aide de lignées cellulaires humaines immortalisées par des virus provenant de l'épithélium, du stroma et de l'endothélium de la cornée. Les cellules stromales ont été incorporées dans un hydrogel de collagène de type I et de sulfate de chondroïtine couplé par du glutaraldéhyde. Des cellules épithéliales ont ensuite été ajoutées sur la face supérieure de ces gels et

cultivées en immersion jusqu'à confluence et ensuite à air-liquide pour permettre leur stratification, tandis que la face inférieur était ensemencée avec des cellules endothéliales (Griffith et al., 1999 ; Griffith et al., 2002). L'équipe de Vrana et collaborateurs a modifié cet équivalent cornéen en utilisant une éponge de collagène I et de sulfate de chondroïtine couplé par du carbodiimide (EDC)/N-hydroxysuccinimide esters (NHS) avec des kératocytes humains primaires, des cellules épithéliales humaines primaires dérivées des cellules souches limbiques et des cellules endothéliales humaines transformées à l'aide du virus SV40 (Vrana et al., 2008). Ces équivalents cornéens présentent plusieurs similitudes physiques et physiologiques avec la cornée humaine native et sont très utiles pour des études toxicologiques et pharmacologiques.

L'équipe du Dre Germain a décrit le développement d'une cornée humaine reconstruite où les cellules épithéliales humaines primaires sont cultivées sur des gels de collagène de type I bovin ou de collagènes de types I et III humains contenant des fibroblastes humains primaires. L'histologie et l'expression des intégrines, des composantes de la membrane basale et des protéines de jonctions adhérentes de ces équivalents cornéens se rapprochent de ce qui est observé chez la cornée native (Germain et al., 1999 ; Germain et al., 2000 ; Giasson et al., 2014). Le groupe de Orwin et Hubel a produit des substituts cornéens sur des éponges de collagène de type I bovin avec des cellules épithéliales, des kératocytes et des cellules endothéliales humaines cultivées séparément ou en co-cultures épithéliale/endothéliale et épithéliale/keratocytes (Orwin et Hubel, 2000). Récemment, Mi et Connon ont développé un substitut cornéen bovin avec des kératocytes incorporés dans des gels de collagène de type I de rat mécaniquement compressés et recouvert d'une couche de laminine avant l'ensemencement des cellules épithéliales du limbe, permettant leur expansion pendant 14 jours de culture en immersion et leur stratification pendant 7 jours de culture à l'interface air-liquide (Mi et al., 2010a ; Mi et Connon, 2013). La compression des gels de collagènes permet un meilleur support que les gels de collagènes conventionnels pour la culture des cellules épithéliales-limbales. Les attachements cellules-cellules et cellules-matrices, la stratification et la densité cellulaire sont supérieurs sur les gels de collagènes compressés comparativement aux gels conventionnels (Mi et al., 2010b). Les fibres de collagènes sont denses, de diamètre régulier et orientées de manière semblable aux



Le numero 1 mondial du mémoires

fibres de collagènes d'une cornée native, contrairement aux fibres lâches et irrégulièrement orientées des gels de collagènes conventionnels (Brown et al., 2005 ; Mi et al., 2010b). Les gels de collagènes compressés recouverts de laminine contenant des kératocytes supportent adéquatement l'expansion, la stratification et la différenciation des cellules épithéliales du limbe à un degré comparable aux membranes amniotiques (Mi et al., 2010a; Mi et Connon, 2013). Le groupe de Lewis, Brown et Daniels a développé un équivalent cornéen similaire en utilisant des fibroblastes humains incorporés dans des gels de collagène de type I de rat compressés et des cellules épithéliales limbiques humaines en anticipation pour le développement d'un modèle applicable en clinique. Les caractéristiques morphologiques et histologiques de cet équivalent cornéen humain se rapprochent de celles d'une cornée native, incluant l'expression des protéines de la membrane basale, la stratification de l'épithélium cornéen avec la présence de microvillosités en surface et de desmosomes intracellulaires ainsi que l'expression des marqueurs de différenciation des cellules épithéliales (Lewis et al., 2010). Les méthodes sur gels, hydrogels ou éponges de collagènes sont les premières à démontrer les nombreuses possibilités du génie tissulaire pour la reconstruction d'une cornée in vitro similaire à la cornée in situ. Toutefois, ces équivalents cornéens *in vitro* ne peuvent être utilisés en clinique en ce moment, parce que l'utilisation de cellules animales, de cellules transformées par des virus ou de collagènes provenant d'animaux représente un risque de rejet lors de la greffe chez l'humain et ce sans compter les risques de transmission possible d'agents pathogènes (Griffith et al., 2012 ; Tisato et Cozzy, 2012 ; Vadori et Cozzi, 2014). Par ailleurs, des problèmes au niveau de la résistance mécanique de certains de ces équivalents ont également été observés, notamment pour les gels de collagènes conventionnels (Doillon et al., 2003). Différentes techniques ont été explorées afin d'augmenter la résistance mécanique des gels de collagènes et favoriser leur manipulation, incluant l'association avec d'autres polymères, le pontage chimique ou aux UV ('crosslinking') et/ou la compression mécanique (Doillon et al., 2003 ; Brown et al., 2005; Liu et al., 2009; Mi et al., 2011). La biocompatibilité in vivo du support acellulaire de collagène recombinant humain de type III ponté par du carbodiimide (EDC)/N-hydroxysuccinimide esters (NHS) a été démontrée suite à des greffes cornéennes chez le porc (Merrett et al., 2008; Liu et al., 2008) et chez l'humain (Fagerholm et al., 2010 ; Fagerholm et al., 2014). La biocompatibilité in vivo d'un gel acellulaire de collagène

de type I de rat mécaniquement compressé a également été démontré suite à des greffes au niveau du stroma cornéen chez le lapin (Xiao et al., 2014).

L'utilisation d'une cornée native dévitalisée par diverses méthodes chimiques, physiques ou biologiques est une autre alternative pour la reconstruction d'un substitut cornéen in vitro mimant la cornée in situ (Lynch et Ahearne, 2013; Wilson et al., 2013). Fu et collaborateurs ont reconstruit une cornée de lapin *in vitro* avec des kératocytes ensemencés dans un stroma cornéen porcin décellularisé par le détergent Triton X-100, sur lequel des cellules épithéliales ont ensuite été cultivées sur la face supérieure et des cellules endothéliales sur la face inférieure de ce stroma. Cet équivalent cornéen reconstruit de lapin est composé histologiquement de trois couches : un épithélium stratifié positif à la cytokératine 3, un stroma et un endothélium exprimant l'aquaporine 1 (Fu et al., 2010). Pang et collaborateurs ont également reconstruit un substitut cornéen de lapin in vitro avec des kératocytes injectés dans huit régions différentes d'un stroma cornéen porcin décellularisé par une solution de sodium dodécylsulfate (SDS), sur lequel des cellules épithéliales cornéennes ont été cultivées. Ce substitut cornéen reconstruit de lapin est composé de 2 à 3 couches de cellules épithéliales positives à la cytokératine 3 et de cellules stromales exprimant la vimentine dispersées à l'intérieur d'une matrice de fibrilles de collagènes conservant les propriétés structurales et mécaniques du stroma cornéen porcin natif (Pang et al., 2010). Shafiq et collaborateurs ont démontré que les cornées humaines post-mortem décellularisées par SDS ou par chlorure de sodium (NaCl) avec nucléases supportent la croissance des fibroblastes et des cellules épithéliales cornéennes humaines permettant la reconstruction d'une cornée antérieure in vitro (Shafiq et al., 2012). Yoeruek et collaborateurs ont également démontré que les cornées porcines décellularisées obtenues en utilisant du tampon Tris hypotonique, de l'EDTA 0.1%, de l'aprotinine et une solution de SDS 0.3%, permettent la repopulation ex vivo des trois types de cellules cornéennes humaines (Yoeruek et al., 2012a). La biocompatibilité in vivo des matrices cornéennes porcines décellularisées a été démontré suite à des greffes au niveau du stroma cornéen chez le lapin (Sasaki et al., 2009; Fu et al., 2010; Pang et al., 2010; Zhou et al., 2011; Yoeruek et al., 2012b). Suite à une greffe lamellaire antérieure dans des yeux de lapins, l'équipe de Wu et collaborateurs a démontré une régénération in vivo de l'épithélium

cornéen et une infiltration des cellules stromales de l'hôte sur des greffons de stromas porcins décellularisés par phospholipase A₂ et 0.5% deoxycholate de sodium (Wu et al., 2009). Les substituts cornéens utilisant des cornées natives acellulaires présentent donc un grand potentiel pour des applications cliniques en remplacement des greffes de cornées antérieures ou postérieures provenant de donneurs dans un futur prochain. En effet, l'équipe de Wu et collaborateurs a reconstruit un substitut cornéen antérieur pour une transplantation in vivo (kératoplastie lamellaire antérieure) dans un modèle animal de lapin en utilisant des stromas porcins décellularisés ainsi que des explants cornéens limbiques de lapin pour la formation d'un épithélium ex vivo par culture en immersion, en perfusion et à l'interface air-liquide dynamique. Leurs substituts cornéens antérieurs reconstruits et transplantés in vivo chez le lapin ont démontré des propriétés optiques, des caractéristiques morphologiques et fonctionnelles similaires aux cornées natives greffées (Wu et al., 2014). L'étude de Proulx et collaborateurs présente le succès anatomique et fonctionnel à court terme de transplantations cornéennes in vivo dans des yeux félins d'un endothélium cornéen félin produit in vitro sur une cornée humaine décellularisée par des cycles de gels/dégels (Proulx et al., 2009a ; Proulx et al., 2009b).

L'équipe du Dre Germain a développée également une cornée humaine reconstruite *in vitro* utilisant les trois types cellulaires de la cornée et produite par la méthode innovatrice d'auto-assemblage (Carrier et al., 2008 ; Carrier et al., 2009 ; Proulx et al., 2010) (Figure 1.7). La fabrication des tissus par la méthode d'auto-assemblage repose sur la capacité des cellules à produire et à organiser un tissu tridimensionnel lorsqu'elles sont soumises à des conditions adéquates de culture (Auger et al., 2000 ; Anger et al, 2002). Dans cette méthode, le stroma est reconstruit en cultivant des fibroblastes cornéens humains et/ou des fibroblastes dermiques humains en présence de sérum et d'acide ascorbique pendant 35 jours afin de favoriser la production et l'organisation de leur propre matrice extracellulaire fibreuse riche en collagènes (Carrier et al, 2008 ; Proulx et al., 2010). En effet, il a été démontré que l'acide ascorbique augmente la synthèse d'ARNm du procollagène (types I et III) chez les fibroblastes humains et murins (Geesin et al., 1988 ; Lamande et Bateman, 1993 ; Nusgens et al., 2001). L'acide ascorbique permet également l'hydroxylation post-traductionnelle des résidus lysine et proline sur le procollagène

menant à la formation d'hélices de collagène, à la réticulation du collagène et donc à l'augmentation de la biosynthèse et de la sécrétion des collagènes de types I et III par les cellules en culture (Murad et al., 1983; Hata et Senoo, 1989; Chan et al., 1990; Saika et al., 1992). Le stroma reconstruit est produit en superposant un feuillet fibroblastique cornéen et un feuillet fibroblastique dermique, l'ensemble étant maintenu en culture pendant une semaine supplémentaire. La combinaison des fibroblastes dermiques et cornéens permet la formation d'un épithélium bien différencié montrant un taux de réépithélialisation plus élevé que l'utilisation des fibroblastes cornéens seuls. Les cellules épithéliales provenant du limbe sont ensuite ensemencées à la surface du stroma reconstruit et cultivées en immersion jusqu'à confluence pendant 7 jours. Ces équivalents sont ensuite maintenus en culture à l'interface air-liquide pendant une période de 7 à 10 jours afin de favoriser la stratification et la différenciation de l'épithélium (Carrier et al, 2008 ; Proulx et al., 2010). Pour compléter l'équivalent cornéen, des cellules endothéliales peuvent également être ensemencées sur l'autre face du stroma reconstruit et cultivées pendant 2 à 7 jours afin d'en obtenir une monocouche (Proulx et al., 2010). Les travaux de Guo et collaborateurs ont permis de caractériser les macromolécules matricielles déposées par les fibroblastes cornéens humains dans ces substituts cornéens auto-assemblés. Après 5 semaines de culture, le stroma reconstruit, d'une épaisseur de 36 µm, est constitué de couches multiples parallèles avec beaucoup de cellules et des fibrilles de MEC (27 à 51 nm), une architecture similaire à celle d'un stroma cornéen natif en développement (Guo et al., 2007). Les collagènes de types I, V et VI, associés au stroma cornéen humain, sont présents dans ce stroma reconstruit (Ruggiero et al., 1996 ; Guo et al., 2007 ; Ren et al, 2008). Ces cornées humaines reconstruites par auto-assemblage possèdent des caractéristiques morphologiques, histologiques et fonctionnelles se rapprochant d'une cornée humaine native, telles que la transparence, l'absorption des rayons ultraviolets, l'expression des kératines épithéliales, l'expression des intégrines, la composition de la membrane basale, la matrice de collagènes du stroma, l'expression de Na^+/K^+ -ATPase, la stratification et la différenciation de l'épithélium cornéen (Carrier et al., 2008 ; Carrier et al., 2009 ; Proulx et al., 2010). Cependant, ces équivalents cornéens auto-assemblés utilisant les trois types de cellules cornéennes ne possèdent qu'une fraction de l'épaisseur d'une cornée native, soit $35.0 \pm 9.5 \mu m$. Toutefois, leur épaisseur peut être augmentée en

superposant un plus grand nombre de feuillets matriciels de stroma cornéen et/ou cutané (Proulx et al., 2010). Ces substituts cornéens humains reconstruits peuvent être améliorés en cultivant des cellules épithéliales et endothéliales sur un stroma matriciel aligné. Il a été rapporté par Guillemette et collaborateurs que la culture de fibroblastes cornéens sur un substrat démontrant une topographie de surface spécifique permettait la production d'un stroma avec des feuillets cellules-matrice orientés à 60° par rapport au précédent, tout comme pour le stroma cornéen in vivo, augmentant ainsi les propriétés de transparence des cornées auto-assemblées (Guillemette et al, 2009). Ces équivalents cornéens humains in vitro sont constitués de cellules cornéennes natives et non transformées, entièrement biologiques, sans protéines exogènes, ne présentent aucun risque de rejet ou de réaction inflammatoire, et possédant des propriétés similaires à la cornée humaine native. Ces substituts cornéens auto-assemblés démontrent ainsi un grand potentiel pour remplacer en clinique les greffes de tissus cornéens de donneurs dans le traitement de plusieurs maladies ou blessures de la cornée. En effet, une étude clinique récente démontre pour la première fois la biocompatibilité et la fonctionnalité in vivo de greffes intrastromales chez le félin de stromas cornéens reconstruits in vitro par génie tissulaire en utilisant la méthode d'autoassemblage. Ces résultats suggèrent la possibilité d'applications cliniques de ces stromas auto-assemblés incluant leur utilisation comme support pour la transplantation *in vivo* d'un épithélium cornéen ou d'un endothélium cornéen issus du génie tissulaire (Boulze Pankert et al., 2014). En outre, ces cornées reconstruites par auto-assemblage représentent également un outil tout à fait remarquable afin d'étudier les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans la guérison des plaies cornéennes (Carrier et al., 2008; Zaniolo et al., 2013) ainsi que les interactions épithéliales-stromales des cellules de la cornée (Carrier et al., 2009).



Vue macroscopique

Vue histologique

Figure 1.7. Reconstruction in vitro d'une cornée humaine.

A) Schéma représentant les étapes requises pour la reconstruction d'une cornée humaine *in vitro* par la méthode d'auto-assemblage mise au point au LOEX (Carrier et al, 2008 ; Proulx et al., 2010) ;
B) Vue macroscopique de la cornée humaine produite *in vitro* (Photo fournie par C. Couture) ; et C) Vue histologique (Coloration au Trichrome de Masson où les cellules sont en rose et les collagènes sont en bleu) de la cornée reconstruite *in vitro* avec un épithélium différencié sur le dessus, et une monocouche de cellules endothéliales en-dessous, les deux adhérant au stroma auto-assemblé. Échelle, 50 µm. (Photo tirée de Proulx et al., 2010)

1.4. Cicatrisation cornéenne

La cornée est la structure la plus antérieure du globe oculaire et sa couche épithéliale superficielle est, par conséquent, exposée à l'environnement externe et peut donc être facilement endommagée. Les lésions superficielles ou profondes sont de natures variées : infections virales ou bactériennes, brûlures chimiques, brûlures thermiques, traumas suite à des blessures par corps étrangers ou chirurgies, ou lésions résultant de diverses maladies affectant la cornée (Reims et al., 1997). La cicatrisation d'une plaie cornéenne est donc un processus indispensable qui permet de refermer la plaie le plus rapidement possible afin de protéger les structures internes de la cornée et de lui permettre ainsi de conserver sa transparence, ce qui permet aussi de préserver sa fonction de réfraction de la lumière dans le but d'assurer une bonne vision. La cicatrisation de la cornée est un processus complexe faisant intervenir 2 étapes: i) la cicatrisation de l'épithélium cornéen et ii) la cicatrisation du stroma cornéen, les deux processus étant en étroite coopération.

1.4.1. Les étapes de la cicatrisation de l'épithélium cornéen

La cicatrisation de l'épithélium cornéen s'effectue principalement en 4 phases distinctes, qui, dans les faits, font partie d'un processus continu, soit : 1) la phase latente, 2) la migration cellulaire, 3) la prolifération et la différenciation cellulaire, et finalement 4) l'adhésion cellulaire (Figure 1.8). La taille, la profondeur et la nature de la blessure affectent la contribution de ces mécanismes cellulaires interdépendants durant le processus de cicatrisation (Dua et al., 1994 ; Agrawal et Tsai, 2003). Les prochaines sections porteront sur la description de ces étapes.



Figure 1.8. Cicatrisation de l'épithélium cornéen.

Représentation schématique de la cicatrisation de l'épithélium cornéen, qui s'effectue en 4 phases distinctes faisant partie d'un processus continu, soit : la phase latente en 1, la migration cellulaire en 2, la prolifération en 3 et finalement la différenciation et l'adhésion cellulaire en 4.

1.4.1.1. Phase latente

La phase latente est la période de 4 à 6 heures entre le moment de formation de la blessure et le début de la migration cellulaire (Dua et al., 1994 ; Agrawal et Tsai, 2003). Durant cette phase, la taille de la lésion s'agrandit légèrement à la suite de la mort par nécrose et de la rétraction des cellules épithéliales en bordure de la lésion (Dua et al., 1994). Cette phase latente est caractérisée par une augmentation de l'activité métabolique et de la synthèse protéique ainsi qu'une réorganisation cellulaire (Dua et al., 1994 ; Agrawal et Tsai, 2003). La synthèse des protéines structurales telles la vinculine, l'actine, la taline et les intégrines est augmentée (Zieske et Gipson, 1986; Agrawal et Tsai, 2003). Les filaments d'actine sont polymérisés et réorganisés dans la région basale des cellules épithéliales (Anderson, 1977; Dua et al., 1994). Les jonctions intercellulaires (jonctions serrées, desmosomes, jonctions adhérentes et gap jonctions) sont partiellement altérées et les hémidesmosomes constituant un lien solide permanent entre les cellules basales de l'épithélium et la membrane basale sont désassemblés et remplacés par des complexes d'adhésion focale provisoires et temporaires pour permettre la migration cellulaire (Gipson, 1992; Zieske, 2001 ; Suzuki et al., 2003). Suite à la desquamation des cellules superficielles et à la perte de l'aspect cuboïdal des cellules basales, l'épithélium s'amincit à deux ou trois couches de cellules en bordure de la lésion et diminue au front de migration jusqu'à une seule couche de cellules épithéliales aplaties possédant des prolongements composés de filaments d'actine polymérisés, soit des filopodes et des lamellipodes, qui s'étalent sur la région lésée (Dua et al., 1994). Les constituants matriciels de la membrane basale sont dégradés en réponse à une lésion tant superficielle, n'affectant que l'épithélium cornéen, que profonde, avec dommages au niveau de la membrane basale et du stroma cornéen (Sta Iglesia et Stepp, 2000 ; Zieske, 2001). Différents constituants de la matrice extracellulaire sont alors synthétisés et déposés à la surface du site endommagé dont la fibronectine (FN), la fibrine, la ténascine (TN), le lumican et la laminine 5 (LM-5) non-tronquée, ces composés permettant la formation d'une matrice provisoire dont la fonction consiste à supporter et stimuler la migration et l'adhésion des cellules épithéliales (Zieske, 2001). Plusieurs évidences démontrent que la fibronectine, le ligand de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$, joue un rôle majeur dans la cicatrisation cornéenne en favorisant l'adhésion et la migration des cellules épithéliales sur la matrice provisoire afin de permettre le recouvrement de la lésion (Nishida et al., 1983 ; Murakami et al., 1992 ; Nishida et al., 1990).

1.4.1.2. Migration cellulaire

La seconde phase est celle de la migration linéaire, correspondant à un mouvement horizontal des cellules épithéliales dans le but de recouvrir la plaie. Durant cette phase, les cellules épithéliales basales et suprabasales s'aplatissent, adhèrent à la nouvelle matrice temporaire de fibronectine synthétisée, s'étalent et migrent en une seule couche pour recouvrir complètement la région lésée (Dua et al., 1994 ; Agrawal et Tsai, 2003). Les cellules migrent en feuillet avec un mouvement centripète, du limbe vers le centre de la cornée (Dua et al., 1994), à une vitesse constante d'environ 60 à 80 µm/heure (Matsuda et al., 1985). Ce mouvement centripète de migration du feuillet épithélial peut se faire dans plusieurs directions opposées avec plusieurs fronts de migration convexes de cellules épithéliales migratoires se rejoignant au centre de la cornée (Dua et Forrester, 1987 ; Zagon et al., 2000). La migration cellulaire et la prolifération sont deux processus indépendants, mais qui se complètent mutuellement pendant la ré-épithélialisation. Les cellules migratoires ne se divisent pas, tandis que les cellules qui prolifèrent ne migrent pas (Chung et al., 1999; Zelenka et Arpitha, 2008). En effet, les cellules épithéliales en migration expriment l'inhibiteur de kinase du cycle cellulaire p15^{INK4b} qui supprime la prolifération cellulaire et stimule la migration cellulaire (Zieske, 2000 ; Guo et al., 2004).

La formation de prolongements composés de filaments d'actine polymérisés et réorganisés (filopodes et lamellipodes) sur les cellules épithéliales marque le début de la migration cellulaire (Dua et al., 1994). La migration cellulaire est un processus dynamique et cyclique pouvant se diviser en quatre étapes distinctes (Mitchison et Cramer, 1996). En premier lieu, il y a extension et protrusion de la cellule dans la direction de la migration par polymérisation des filaments d'actine formant des filopodes et des lamellipodes permettant un étalement sur la surface lésée. En second lieu, il y a formation de points d'attachement reliant le cytosquelette d'actine de la cellule à la MEC par le biais des intégrines dans des complexes focaux d'adhésion situés à l'extrémité du filopode ou du lamellipode. Ensuite, il



y a contraction des filaments d'actine/myosine intracellulaires en utilisant les complexes focaux d'adhésion établis aux niveaux des protrusions à l'avant comme point de traction, permettant la mobilité de la cellule. Et finalement, il y a relâchement des points d'adhésions à l'arrière de la cellule et rétraction de la queue (Huttenlocher et al., 1995 ; Mitchison et Cramer, 1996 ; Holly et al., 2000). Ce cycle est répété jusqu'à la fin de la migration lorsque la région endommagée a été recouverte (Dua et al., 1994).

L'intégrine $\alpha 5\beta 1$ et son ligand la FN sont des composants des complexes focaux d'adhésion fournissant l'adhésion nécessaire des cellules épithéliales à leur substrat pour leur permettre de migrer sur la matrice provisoire de FN lors de la cicatrisation de l'épithélium cornéen (Murakami et al., 1992 ; Suzuki et al., 2003 ; Kimura et al., 2010). Dans ces contacts focaux, il se produit un regroupement d'intégrines suite à leur activation par liaison de leur ligand. Par leur domaine cytoplasmique, celles-ci se lient ensuite à des protéines du cytosquelette (taline, vinculine, α -actine, paxiline) ainsi qu'à des protéines de signalisation telles que la FAK (*'focal adhesion kinase'*) et la tyrosine kinase Src qui vont favoriser le recrutement, l'assemblage et la réorganisation des filaments d'actines afin de permettre la migration cellulaire (Giancotti et Ruoslahti, 1999 ; Holly et al., 2000 ; Wozniak et al., 2004 ; Lo, 2006).

1.4.1.3. Prolifération et différenciation cellulaire

La migration et la prolifération cellulaire sont deux processus séparés, mais complémentaires qui se produisent durant la ré-épithélialisation (Chung et al., 1999). La prolifération est associée à un mouvement vertical des cellules épithéliales. Elle permet de restaurer le nombre initial de cellules et la masse cellulaire, reformant un épithélium stratifié d'épaisseur normale comprenant 5 à 7 couches de cellules. En réponse à une lésion épithéliale, les cellules migratoires en bordure de la blessure sont en arrêt mitotique pendant une période de 24 heures, tandis que les cellules plus éloignées de la lésion, au niveau de la périphérie et du limbe, subissent une augmentation du taux de division cellulaire (Hanna, 1966 ; Chung et al., 1999). La fermeture des plaies de l'épithélium cornéen de petites tailles s'effectue par migration sans activité mitotique et la prolifération cellulaire est effectuée

après la ré-épithélialisation afin de permettre une restratification de l'épithélium (Hanna, 1966 ; Cotsarelis et al., 1989 ; Stepp et Zhu, 1997). Pour les plaies de plus grandes tailles, la fermeture implique une induction rapide de la prolifération cellulaire des cellules amplificatrices transitoires situées à proximité du limbe, après la migration initiale des cellules épithéliales en bordure de la lésion, générant ainsi le nombre de cellules nécessaires pour recouvrir la lésion et assurer la restratification (Chung et al., 1995 ; Stepp et Zhu, 1997). Une vague de mitoses se déplace donc de la périphérie vers la lésion afin d'assurer une régénération complète de l'épithélium cornéen (Dua et al., 1994). Seulement les cellules basales (Beebe et Masters, 1996 ; Chang et al., 2008), les cellules amplificatrices transitoires et les cellules souches limbiques (Cotsarelis et al., 1989 ; Chung et al., 1995) participent à la prolifération.

En réponse à une lésion de l'épithélium cornéen, les cellules souches limbiques (SC : 'stem cells') se divisent de façon asymétrique i) en une cellule souche identique et ii) en une cellule amplificatrice transitoire (TAC: 'transient amplifying cells') (Dua et al., 1994; Daniels et al., 2001 ; Castro-Munozledo, 2013). Les cellules TAC précoces (eTAC : 'early TAC') ont une capacité de division cellulaire multiple et sont situées en périphérie de la cornée. Suite à un mouvement de migration centripète de la périphérie vers le centre de la cornée, les cellules TAC deviennent plus matures et acquièrent une capacité proliférative limitée (Lehrer et al., 1998). Les cellules TAC matures (ITAC : 'late TAC') se divisent en un mouvement vertical vers la surface et se différencient éventuellement en cellules postmitotiques (PMC : 'post-mitotic cells') pour finalement entrer en différenciation terminale (TDC: 'terminally differentiated cells') (Dua et al., 1994; Daniels et al., 2001; Castro-Munozledo, 2013) permettant la régénération de l'épithélium (Figure 1.5). Les cellules TAC matures et centrales correspondent aux cellules basales de l'épithélium cornéen, tandis que les cellules PMC et TDC correspondent aux cellules suprabasales, soit les cellules ailées et les cellules superficielles, respectivement (Schermer et al., 1986; Dua et al., 1994).

Plusieurs évidences suggèrent une participation des cellules souches limbiques et de leur progéniture, les cellules TAC précoces ayant un potentiel de divisions fréquentes et rapides,

dans la phase de repopulation de la lésion cornéenne : i) une plaie large où la bordure est située près du limbe guérit plus rapidement qu'une petite plaie (Matsuda et al., 1985) ; ii) la deuxième plaie suite à des débridements répétés de l'épithélium de la cornée centrale guérit plus rapidement que la première (Srinivasan et Eakins, 1979), et iii) la présence de défauts de cicatrisation de l'épithélium cornéen dans les cas de déficience en cellules souches limbiques (Dua et Forrester, 1990; Huang et Tseng, 1991; Chen et Tseng, 1991). En réponse à un trauma, l'épithélium cornéen en régénération dispose de trois moyens afin d'augmenter rapidement sa population cellulaire : i) le recrutement des cellules souches limbiques pour produire plus de cellules TAC ; ii) l'augmentation du nombre de divisions potentielles pouvant être complétées par les cellules TAC et/ou iii) la réduction de la durée du cycle cellulaire des cellules TAC. Collectivement, ces trois voies permettent de produire un grand nombre de cellules TAC (cellules basales), PMC (cellules ailées) et TDC (cellules superficielles) pour permettre la régénération rapide d'un épithélium stratifié en réponse à une blessure (Lehrer et al., 1998; Agrawal et Tsai, 2003). Des observations réalisées sur des cornées humaines en culture d'organe ex vivo semblent démontrer que les cellules épithéliales de la cornée centrale adjacentes à lésion posséderaient une capacité d'autorégénération (migration et prolifération) indépendante de l'influence des cellules souches limbiques pendant les 12 premières heures après la blessure. Ces données suggèrent que les cellules basales sont les principales cellules responsables de la phase proliférative de la cicatrisation cornéenne et qu'un seuil de blessure doit être atteint avant que les cellules souches limbiques deviennent actives (Hardarson et al., 2004; Chang et al., 2008).

1.4.1.4. Adhésion cellulaire

Un prérequis pour la stabilisation de l'épithélium nouvellement régénéré est une adhésion ferme et permanente à la membrane basale et au stroma cornéen. Cette adhésion permanente n'aura lieu que lorsque la lésion sera totalement recouverte (Dua et al., 1994). Dans un épithélium cornéen intact, les cellules basales sont attachées à la membrane basale par des jonctions d'adhésion appelées hémidesmosomes dont un des composants majeurs est l'intégrine α 6 β 4, récepteur de la laminine 5, situé du côté basal des cellules épithéliales (Stepp et al., 1990 ; Jones et al., 1991 ; Gipson, 1992). En réponse à une lésion, les

hémidesmosomes sont désassemblés durant la phase de latence et les intégrines α 6 β 4 sont redistribuées sur toute la surface membranaire de la cellule (Kurpakus et al., 1991 ; Gipson et al., 1993a). Le mouvement cellulaire lors de la migration dépend de cycles d'adhésion et de dé-adhésion des cellules à leur substrat à l'aide des complexes focaux d'adhésion provisoires reliant les filaments d'actine contractiles intracellulaires à la matrice provisoire (FN) via les intégrines (dont α 5 β 1), ce qui permet aux cellules de se déplacer (Huttenlocher et al., 1995 ; Suzuki et al., 2003 ; Kimura et al., 2010). La fibronectine de la matrice provisoire stimule la sécrétion de l'activateur du plasminogène de type urokinase qui convertit le plasminogène en plasmine. La plasmine effectue le clivage de la fibronectine et donc brise l'interaction entre la fibronectine et ses récepteurs, permettant ainsi le détachement de l'arrière de la cellule, son mouvement et la formation de nouvelles adhésions à d'autres molécules de fibronectine (Morimoto et al., 1993 ; Suzuki et al., 2003).

La dernière phase de la cicatrisation cornéenne est le réassemblage des structures d'adhésions permanentes cellules-cellules et cellules-matrices de l'épithélium. Les jonctions serrées sont celles, parmi les divers types de jonctions intercellulaires, qui se reforment le plus rapidement suite à une blessure de l'épithélium cornéen dans le but de rétablir rapidement une fonction de barrière protectrice (McCartney et Cantu-Crouch, 1992 ; Suzuki et al., 2003). Suite à la phosphorylation des tyrosines de la sous-unité β 4 de l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ et de l'antigène-1 de la pemphigoïde bulleuse (collagène XVII), il se produit une redistribution de ces deux composantes à la surface basale des cellules épithéliales permettant aux hémidesmosomes d'être réassemblés (Kurpakus et al., 1991 ; Gipson et al., 1993a ; Payne et al, 2000). Il se produit également un remodelage de la MEC durant la cicatrisation de l'épithélium cornéen. En réponse à un dommage de l'épithélium, on observe une dégradation de la membrane basale et la formation d'une MEC provisoire favorisant la fermeture de la plaie (Zieske, 2001). Pour que la guérison soit complète, la membrane basale doit être reformée. Les cellules épithéliales migratoires synthétisent et déposent la laminine 1, composante de la membrane basale, 24 heures après l'ablation de l'épithélium. Cette réapparition de la membrane basale est coordonnée avec le réassemblage de trois jonctions intercellulaires (desmosomes, jonctions gap et jonctions adhérentes) dans l'épithélium cornéen (Suzuki et al., 2000a ; Suzuki et al., 2003).

1.4.2. Cicatrisation du stroma cornéen

Les kératocytes du stroma jouent également un rôle important dans le processus de guérison des plaies cornéennes. En réponse à une lésion de la cornée, l'apoptose des kératocytes quiescents en marge de la région endommagée constitue un des premiers changements observés dans le stroma, ce qui crée une zone acellulaire et initie la cascade de cicatrisation de la cornée (Wilson et Kim, 1998 ; Wilson et al., 2001 ; West-Mays et Dwivedi, 2006 ; Wilson et al., 2007). Cette mort cellulaire programmée des kératocytes est modulée par des cytokines, soit l'interleukine-1 (IL-1) et TNF-a, sécrétées par les cellules épithéliales, et le ligand Fas, sécrété par les cellules épithéliales et les kératocytes du stroma (Wilson et al., 1996; Mohan et al., 1997; Mohan et al., 2000). Dans la seconde phase, les kératocytes adjacents à la zone d'apoptose cellulaire vont proliférer pour remplacer les cellules mortes. Il se produit également une activation de ces kératocytes qui vont acquérir des caractéristiques morphologiques de fibroblastes, migrer dans la région endommagée et synthétiser des composantes de la matrice extracellulaire (FN, TN, collagènes, protéoglycanes), des enzymes de dégradation de la MEC, telles les métalloprotéinases (MMPs), et des molécules d'adhésion cellules-matrice, telle l'intégrine a5ß1 ayant pour ligand la FN (Fini, 1999; Fini et Stramer, 2005; West-Mays et Dwivedi, 2006). Il y a donc déposition d'une matrice provisoire durant la cicatrisation du stroma cornéen, dont les composantes FN et les protéoglycanes de type chondroïtine sulfate stimulent la migration et l'invasion des fibroblastes dans la région lésée du stroma riche en collagènes (Andresen et al., 2000; Schmidinger et al., 2003). Dans la troisième phase, une sous-population de fibroblastes va se transformer en myofibroblastes qui expriment des fibres de stress composées d'actine- α du muscle lisse favorisant la contraction de la plaie (Jester et al., 1995; Fini, 1999; Jester et al., 1999b). Ces myofibroblastes sont caractérisés par une production accrue des facteurs de croissances HGF et KGF, ce qui va favoriser la prolifération des cellules épithéliales (Weng et al., 1997; Wilson et al., 1999; Wilson et al., 2001), mais également par une augmentation de la synthèse de collagènes, de

protéoglycanes et de MMPs impliqués dans le remodelage de la matrice extracellulaire du stroma (Girard et al., 1991 ; Kaji et al., 1998 ; Powell et al., 1999 ; Wilson, 2012). On observe également une infiltration du stroma par des cellules inflammatoires, soit des monocytes, des macrophages, des cellules T et des cellules polymorphonucléaires provenant des vaisseaux sanguins du limbe et du film lacrymal. Ces cellules inflammatoires ont pour rôle l'élimination des débris apoptotiques et l'élimination d'agents pathogènes (O'Brien et al., 1998 ; Hong et al., 2001 ; Wilson et al., 2001). La phase finale de la cicatrisation du stroma cornéen est le remodelage et la réorganisation de la matrice extracellulaire riche en collagènes et protéoglycanes, un processus qui peut se dérouler sur plusieurs mois ou quelques années dépendant de la nature de la blessure (Cintron et al., 1990 ; Kaji et al., 1998). Ce remodelage est en association avec l'élimination des cellules inflammatoires, des fibroblastes/myofibroblastes et d'un retour à l'état de quiescence des kératocytes dans le stroma (Wilson et al., 2001 ; Wilson et al., 2007).

1.4.3. Cicatrisation de l'endothélium cornéen

Les divisions mitotiques sont extrêmement rares dans l'endothélium cornéen chez l'adulte (Joyce, 2003 ; Mimura et Joyce, 2006), ce qui fait que les cellules endothéliales endommagées à la suite d'un trauma, d'une maladie ou du vieillissement sont rapidement remplacées par l'expansion et l'amincissement des cellules voisines adjacentes et leur migration dans la région blessée. Si la membrane de Descemet est endommagée, les cellules endothéliales migratoires sont requises pour synthétiser et déposer une nouvelle membrane de Descemet dans la région lésée (DelMonte et Kim, 2011 ; Farjo et al., 2014). La cicatrisation de l'endothélium cornéen peut être divisée en trois phases. La première phase se caractérise par la couverture de la lésion par expansion et migration des cellules endothéliales adjacentes de manière à former une barrière temporaire incomplète avec une réduction des sites de pompes Na⁺/K⁺ ATPase et des jonctions serrées incomplètement formées. Dans la seconde phase, les jonctions serrées discontinues (*`leaky tight junctions'*) et le nombre ainsi que la qualité des sites de pompes Na⁺/K⁺ ATPase reviennent à la normale tandis que les cellules endothéliales sont de forme polygonale irrégulière, la cornée retrouvant ainsi son épaisseur normale et sa transparence. Dans la troisième phase, qui peut se poursuivre sur plusieurs mois, il se produit un remodelage des cellules endothéliales qui retrouvent alors leur forme hexagonale régulière (DelMonte et Kim, 2011).

Les cellules de l'endothélium cornéen présentent des formes hexagonales relativement uniformes (Hogan et Alvarado, 1971 ; Beuerman et Pedroza, 1996). Parce que l'endothélium cornéen maintien son intégrité et sa fonction de barrière par expansion et migration des cellules survivantes pour recouvrir la région lésée, il en résulte une diminution de la densité cellulaire (5000 cellules/mm² à 2500 cellules/mm²), une augmentation de la variabilité des formes des cellules (polymorphisme) et une augmentation de la variabilité des tailles des cellules (polymégathisme) avec l'âge (Yee et al., 1985 ; Dawson et al., 2011). Suite à un trauma ou une maladie, la perméabilité de l'endothélium cornéen, résultant des jonctions serrées incomplètes et discontinues ('leaky tight junctions' ou 'macula occludens') qui permettent une fuite d'eau de l'humeur aqueuse vers le stroma, est graduellement augmentée lorsque la densité des cellules endothéliales centrales diminue sous les 2000 cellules/mm². Il existe toutefois des mécanismes compensatoires permettant de conserver la cornée dans son état normal de déshydratation relative, soit par l'augmentation de l'activité des sites de pompes Na⁺/K⁺ ATPase déjà existantes et/ou par l'augmentation du nombre total de sites de pompes Na+/K+ ATPase sur les membranes latérales des cellules endothéliales. À 500 cellules/mm² et moins, la fuite est plus grande que la capacité de pompage métabolique et il en résulte un œdème du stroma compromettant la vision (Geroski et al., 1985; Dawson et al., 2011).

1.4.4. Modèles pour l'étude de la guérison des plaies cornéenne

La guérison des plaies est un processus complexe composé de phases séquentielles qui se chevauchent afin de rendre possible la régénération tissulaire. Plusieurs modèles expérimentaux de cicatrisation *in vivo* et *in vitro/ex vivo* ont été développés pour étudier les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la réparation des plaies cornéennes (Stepp et al., 2014) et aussi afin d'identifier les différents facteurs impliqués dans ce processus, incluant les facteurs de croissances, les cytokines, les facteurs neuraux, les

composantes de la MEC et les métalloprotéinases (MMPs). Ces modèles expérimentaux permettent également d'évaluer les effets sur la ré-épithélialisation de diverses molécules et traitements.

La guérison des plaies cornéenne a été étudiée à l'aide de divers modèles animaux *in vivo*, dont les lapins (Brazzell et al., 1991; Nishida et al., 1992a; Nakamura et al., 1994; Kim et al., 2001), les rats (Nakamura et al., 2003 ; Zieske et al., 2001), les chats (Xie et al., 1997 ; Sweeney et al., 2003; Buhren et al., 2009) et les chevaux (Burling et al., 2000). La cicatrisation cornéenne a également été étudiée en utilisant des modèles de culture d'organe ex vivo avec des cornées complètes ou coupées en blocs, humaines (Collins et al., 1995; Zagon et al., 2000; Daniels et al., 2003a; Hardarson et al., 2004; Janin-Manificat et al., 2012 ; Saghizadeh et al., 2013) ou d'animaux comme le bovin (Foreman et al., 1996 ; Zhao et al., 2003), le lapin (Cameron et al., 1974; Nishida et al., 1990; Tanelian et Bisla, 1992; Chuck et al., 2001) et le porc (Lin et Boehnke, 1997). Dans ces modèles, différents types de plaies sont simulées chirurgicalement par kératectomie superficielle, en enlevant l'épithélium superficiel sur une surface définie, ou par kératectomie antérieure en enlevant l'épithélium, la membrane basale et le stroma antérieur. Des plaies de types brûlures chimiques alcalines (NaOH ou N-Heptanol) ou des brûlures thermiques où il se produit un débridement de l'épithélium peuvent également être provoquées dans ces modèles (Brazell et al., 1991). Les expériences de guérison des plaies cornéennes in vivo avec des modèles animaux vivants permettent une représentation complète de l'environnement cicatriciel avec les différents types cellulaires, les signaux environnementaux et les interactions complexes cellules-cellules et cellules-matrices impliqués dans les multiples phases de la réparation tissulaire. Par contre, les études avec des animaux vivants sont dispendieuses, difficiles à réaliser et généralement longues en raison de la complexité des expériences in vivo (problèmes éthiques) et de la grande variabilité entre les animaux utilisés, ce qui entraîne un manque de reproductibilité. Des différences morphologiques et physiologiques entre les animaux utilisés et l'humain rendent également parfois difficile la transposition de ces études aux mécanismes de cicatrisation chez l'être humain (Stephens et al., 2013). Les modèles de cornées en culture ex vivo, malgré les avantages qu'ils procurent de pouvoir étudier la cicatrisation sur des tissus cornéens en trois dimensions comprenant toutes les

composantes cellulaires-matricielles de la cornée normale et de permettre l'évaluation des effets de différents agents exogènes sur la vitesse de ré-épithélialisation, comprennent également plusieurs désavantages. En effet, la disponibilité de cornées saines de donneurs humains pour la recherche est limitée et le délai post-mortem (2-6 jours) peut influencer de manière négative les résultats obtenus (Zhao et al., 2003). Une réduction du nombre de couches de cellules épithéliales, un œdème du stroma et une ré-épithélialisation incomplète ont occasionnellement été rapportés dans ces modèles de culture d'organe *ex vivo* (Van Horn et al., 1975 ; Richard et al., 1991 ; Tanelian et Bisla, 1994).

Des modèles de cicatrisation de cellules épithéliales cornéennes en culture monocouche in vitro utilisant des cellules humaines (Grant et al., 1992; Maldonado et Furcht, 1995a) ou animales (Simmons et al., 1987; Nelson et al., 1990; Boisjoly et al., 1993) ont été développés pour étudier les mécanismes de ré-épithélialisation lors du recouvrement d'une lésion. Dans ces modèles de monocouches cellulaires, un déficit épithélial est induit en provoquant une lésion continue de type égratignure ('scratch') sur les cellules épithéliales cultivées à confluence par le passage d'une pointe de pipette, d'un scalpel ou par une sonde refroidie avec de l'azote liquide (Jumblatt et Neufeld, 1986). Il est alors possible d'étudier l'adhésion, la migration et la prolifération des cellules épithéliales cornéennes sur différents substrats biologiques (FN, LM, CIV, CI et autres) (Jumblatt et Neufeld, 1986; Nakagawa et al., 1990 ; Suzuki et al., 2003 ; Ahmadiankia et al., 2009 ; Yanez-Soto et al., 2013), ainsi que d'évaluer les facteurs (facteurs de croissance, cytokines, antibiotiques, agents) pouvant stimuler la ré-épithélialisation et la fermeture de la plaie (Simmons et al., 1987; Nelson et al., 1990 ; Grant et al., 1992 ; Wang et al., 1994a ; Nakamura et Nishida, 1999 ; Imanishi et al., 2000 ; Kim et al., 2012). Il est possible également d'effectuer des études similaires avec des kératocytes ou des fibroblastes cornéens en culture sur (matrices 2D) (Doane et al., 1992; Andresen et Ehlers, 1998; Schmidinger et al., 2003) ou à l'intérieur (matrices 3D) (Kim et al., 2010a; Lakshman et al., 2010; Lakshman and Petroll, 2012; Zhou et Petroll, 2014) de différents substrats biologiques et exposés ou non à différents facteurs de croissance ou cytokines afin d'étudier les mécanismes d'adhésion, de migration et de prolifération des cellules du stroma. Un autre modèle pour l'étude des mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans la cicatrisation de l'épithélium cornéen consiste à cultiver des cellules épithéliales cornéennes à différentes densités cellulaires. Les cellules cultivées à faible densité cellulaire (sous-confluence) représentent un contexte d'épithélium en cicatrisation, alors que les cellules cultivées à haute densité cellulaire (post-confluence) correspondent adéquatement à un épithélium cicatrisé ou natif. Ce type de modèle de culture primaire avec des cellules épithéliales cornéennes de lapin cultivées à diverses densités cellulaires a été exploité pour étudier les influences de la FN, du CIV et de la LM sur l'expression des sous-unités d'intégrines $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$ et qui exercent des fonctions importantes dans la cicatrisation (Grushkin-Lerner et al., 1997; Larouche et al., 2000; Gingras et al., 2003; Zaniolo et al., 2004; Gaudreault et al., 2007; Vigneault et al., 2007; Gaudreault et al., 2008; Gingras et al., 2009). Ces modèles de culture *in vitro* de cellules épithéliales cornéennes sont avantageux pour étudier certains aspects de la cicatrisation, mais ils comportent également leurs limitations, dont l'absence d'un épithélium pluristratifié et le manque d'interactions cellule-cellule que l'on observe normalement *in vivo*.

Afin de contrer les désavantages inhérents à ces approches, des modèles tridimensionnels mimant davantage la cornée in vivo et représentant une alternative à l'utilisation des cultures en monocouches, des cultures d'organes ex vivo et, jusqu'à un certain point, également des modèles animaux, devaient être développés. Depuis quelques années, différents groupes de recherche ont développé des équivalents cutanés reconstruits in vitro en cultivant des kératinocytes et/ou des fibroblastes humains sur un derme acellulaire (Geer et al., 2002; Harrison et al., 2006; Xie et al., 2010a) ou par l'utilisation de la méthode d'auto-assemblage (Michel et al, 1999; Laplante et al., 2001; Anger et al., 2004; Auxenfans et al., 2009). Ces substituts humains de peaux reconstruites tridimensionnelles in vitro se rapprochent des caractéristiques morphologiques, structurales et fonctionnelles de l'épiderme et du derme humain et donc permettent d'étudier les mécanismes de réépithélialisation de la peau durant la guérison de plaies cutanées *in vitro* (Laplante et al., 2001 ; Geer et al., 2002 ; Harrison et al., 2006 ; Xie et al., 2010a) ou in vivo après leur greffe sur des souris athymiques (Pouliot et al., 2002; Geer et al., 2004). Des équivalents cornéens tridimensionnels reconstruits in vitro en utilisant des cellules humaines (Griffith et al., 1999; Orwin et Hubel, 2000; Doillon et al., 2003; Germain et al., 2000; Gaudreault et



43

al., 2003; Reichl et al., 2004; Builles et al., 2007a; Vrana et al., 2008; Proulx et al, 2010) ou animales (Minami et al., 1993 ; Zieske et al., 1994 ; Parnigotto et al., 1998 ; Schneider et al., 1999; Tegtmeyer et al., 2001; Reichl et al., 2003; Alaminos et al., 2006; Werner et al., 2008 ; Fu et al, 2010 ; Mi et Connon, 2013) ont aussi été produits par différents groupes de recherche au cours des dernières années et constituent, comme pour les peaux reconstruites, une alternative intéressante pour étudier la guérison des plaies cornéenne. Récemment, un nouveau modèle de cicatrisation in vitro utilisant une cornée humaine reconstruite par la méthode d'auto-assemblage a été développé (Carrier et al., 2008; Zaniolo et al., 2013). Dans ce modèle, l'équivalent cornéen humain, composé d'un épithélium reposant sur un stroma auto-assemblé, est perforé à l'aide d'un trépan de manière à produire une lésion de 6 mm de diamètre, et placé sur un deuxième stroma reconstruit sans épithélium pour lui permettre d'être cultivé à l'interface air-liquide (Figure 1.9) (Zaniolo et al., 2013). Ce modèle tridimensionnel de cicatrisation in vitro est composé d'un épithélium cornéen et d'un stroma avec fibroblastes vivants entièrement naturel permettant les interactions épithéliales-stromales et la ré-épithélialisation par migration des cellules épithéliales sur une matrice naturelle après lésion. Ce modèle montre une apparence histologique similaire à la cornée native avec des changements d'expression des intégrines et des composantes de la membrane basale connus comme étant des facteurs clés dans la guérison des plaies. Il mime plusieurs aspects de la ré-épithélialisation dont la migration collective en feuillet des cellules épithéliales, la prolifération cellulaire et la restauration d'un épithélium stratifié (Figure 1.9) (Carrier et al., 2008). Il est intéressant de noter la présence, dans ce modèle, de fronts de migration convexes des cellules migratoires (Figure 1.9) (Carrier et al., 2008), une caractéristique particulière observée dans la cicatrisation cornéenne in vivo (Dua et Forrester, 1987), dans les modèles ex vivo chez l'humain (Zagon et al., 2000), dans les modèles animaux (Petroutsos et al., 1983) et dans les modèles in vitro de monocouche de cellules épithéliales après lésion (Jumblatt et Neufeld, 1986). De plus, ce modèle a permis de quantifier l'effet positif de l'EGF et de la fibrine sur le taux de ré-épithélialisation, démontrant son utilité pour quantifier les effets positifs ou négatifs de facteurs exogènes variés sur la guérison des plaies (Carrier et al., 2008). Les cornées humaines reconstruites par la méthode d'auto-assemblage permettent également de comprendre les interactions épithéliales-stromales ainsi que l'impact de la

source cellulaire (cornéenne ou cutanée) des cellules épithéliales et des fibroblastes sur les caractéristiques des tissus cornéens reconstruits dont l'épaisseur, la différenciation de l'épithélium, l'absorption des ultraviolets et la transparence (Carrier et al., 2009).



Figure 1.9. Modèle de cicatrisation avec une cornée humaine reconstruite *in vitro* par la méthode d'auto-assemblage.

A) Schéma représentant les différentes étapes du modèle de cicatrisation d'une cornée humaine reconstruite in vitro par la méthode d'auto-assemblage (voir Figure 1.6); Aspect macroscopique de la lésion (perforation de 6 mm de diamètre) à t = 0 jour (en B) ou à t = 2 jours (en C). Les flèches représentent des fronts de migration épithéliaux convexes progressant vers le centre de la plaie. D) Histologie de la cornée reconstruite 3 jours après la lésion. Les sections sont colorées au trichrome de Masson où les cellules sont rosées et les collagènes sont bleutés. Échelle, 100 μ m. (Photos tirées de Carrier et al., 2008)

1.4.5. Facteurs modulant la cicatrisation de la cornée

La guérison des plaies cornéennes est un processus complexe impliquant l'action de plusieurs facteurs modulateurs dont : les facteurs de croissances, les cytokines et les facteurs neuraux, les métalloprotéinases, les protéines de la matrice extracellulaire (MEC) et les intégrines. Les prochaines sections porteront sur la description de ces différents facteurs.

1.4.5.1. Les facteurs de croissance, les cytokines et les facteurs neuraux

La régulation cellulaire et moléculaire de la cicatrisation de l'épithélium et du stroma cornéen implique de nombreux facteurs de croissance et des cytokines sécrétés par les cellules épithéliales, les fibroblastes/myofibroblastes du stroma, les cellules immunitaires et les cellules des glandes lacrymales (Wilson et al., 1999 ; Imanishi et al., 2000 ; Wilson et al., 2001 ; Klenkler et Sheardown, 2004 ; Yu et al., 2010 ; Maycock et Marshall, 2014). Cette régulation implique de nombreuses interactions épithélium-stroma dont les patrons d'expression des cytokines/facteurs de croissance et ceux de leurs récepteurs sont : i) autocrines, affectant le même type cellulaire ou ii) paracrines, exerçant une influence sur un autre type cellulaire.

Li et Tseng ont identifié quatre patrons d'expression paracrine entre 25 facteurs de croisances/cytokines et leurs récepteurs dans des cellules épithéliales et dans des fibroblastes de la cornée centrale ou du limbe en culture primaire (Li et Tseng, 1995). Dans le type I, les cytokines/facteurs de croissance (TGF- α , IL-1 β , PDGF- β) sont sécrétés exclusivement par les cellules épithéliales, mais leurs récepteurs (EGF-R, IL-1R, PDGF-R) sont principalement ou exclusivement exprimés par les fibroblastes. Dans le type II, les cytokines/facteurs de croissance (IGF-1, TGF- β 1, TGF- β 2, LIF, bFGF) et leurs récepteurs sont exprimés par les deux types cellulaires (cellules épithéliales et fibroblastes). Dans le type III, les facteurs de croissance (KGF, HGF) sont exclusivement sécrétés par les fibroblastes, mais leurs récepteurs (KGFR, c-met) sont principalement exprimés par les cellules épithéliales. Dans le type IV, les cytokines (M-CSF, IL-8) sont sécrétées par les fibroblastes et/ou les cellules épithéliales, mais leurs récepteurs sont exprimés par les deux type IV, les cytokines (M-CSF, IL-8) sont sécrétées par les fibroblastes et/ou les cellules épithéliales, mais leurs récepteurs sont exprimés par les cellules épithéliales. Dans le type IV, les cytokines (M-CSF, IL-8) sont sécrétées par les fibroblastes et/ou les cellules épithéliales, mais leurs récepteurs sont exprimés par un autre
type cellulaire, tel les cellules inflammatoires. Il existe également des interactions autocrines où les facteurs de croissance/cytokines sécrétés localement agissent sur leurs récepteurs qui sont exprimés par le même type cellulaire, incluant les systèmes TGF- α /EGF-R, IL-1 β /IL-1R et bFGF/FGF-R1 (Li et Tseng, 1995 ; Lim et al., 2003). Plusieurs facteurs de croissances (EGF, HGF, KGF, TGF- β , PDGF, IGF-1) et cytokines (IL-1, IL-6 et IL-8) sont sécrétés par les cellules des glandes lacrymales et sont donc présents dans le film lacrymal et les larmes (Nakamura et al., 1998a ; Klenkler et al., 2007). Ces interactions autocrines et paracrines entre l'épithélium et le stroma, en association avec les actions exocrines des facteurs de croissance/cytokines sécrétés par les cellules des glandes lacrymales de la cornée en conditions normales et modulent la cicatrisation de la cornée suite à un traumatisme (Lim et al., 2003 ; Klenkler et Sheardown, 2004).

La cytokine interleukine-1 (IL-1) est un régulateur majeur dans la réponse à une blessure de la cornée. IL-1 est relâchée de l'épithélium et du film lacrymal suite à une lésion de la cornée. Elle peut atteindre son récepteur à la surface des kératocytes du stroma cornéen et générer une boucle de régulation autocrine dans les fibroblastes cornéens. IL-1 module l'apoptose des kératocytes, des fibroblastes et des myofibroblastes via l'induction de la synthèse du ligand Fas, qui peut alors se lier à son récepteur sur les cellules du stroma, provoquant un suicide autocrine (Wilson et al., 1999; Wilson et al., 2001; Wilson et Esposito, 2009; Kaur et al., 2009). IL-1 favorise également la production des facteurs de croissance HGF ('hepatocyte growth factor') et KGF ('keratinocyte growth factor') par les fibroblastes/myofibroblastes du stroma, contribuant de manière paracrine à stimuler la cicatrisation de l'épithélium cornéen. HGF et KGF se lient donc à leurs récepteurs sur les cellules épithéliales du limbe, de la cornée périphérique et de la cornée centrale, ce qui favorisera leur prolifération. HGF stimule la migration des cellules épithéliales, mais également l'inhibition de leur différenciation terminale (Wilson et al., 1994 ; Wilson et al., 1999 ; Imanishi et al., 2000 ; Klenkler et Sheardown, 2004 ; Yu et al., 2010). HGF et KGF accélèrent la guérison des plaies cornéennes in vivo (Sotozono et al., 1995) et dans des modèles de culture d'organe ex vivo (Chandrasekher et al., 2001) tandis qu'IL-1 stimule la production des métalloprotéinases (MMPs) par les kératocytes et les fibroblastes,

contribuant ainsi au remodelage du stroma suite à une lésion (Girard et al., 1991 ; West-Mays et al., 1995 ; Wilson et al., 1999). IL-1 participe également à la mobilisation des cellules inflammatoires en augmentant l'expression, dans les fibroblastes, de plusieurs cytokines de type chimiokines (MCAF/MCP-1 et GSF) attirant les monocytes, les granulocytes et les autres cellules immunitaires (Wilson et al., 2001 ; Wilson et Esposito, 2009).

Comme pour HGF et KGF, l'EGF ('epidermal growth factor') est un autre facteur de croissance qui module la cicatrisation de l'épithélium cornéen. Dans la cornée, l'EGF est synthétisé par les trois types cellulaires (Wilson et al., 1992), mais il se retrouve principalement dans les larmes (Van Setten et al., 1992a; Klenkler et al., 2007). Des récepteurs EGF (EGFR) à faible et haute affinité sont présents à la surface des cellules épithéliales et endothéliales, tandis que seul le type à faible affinité est présent sur les kératocytes (Imanishi et al., 2000). EGF stimule la prolifération des cellules épithéliales et endothéliales cornéennes (Wilson et al., 1994 ; Pancholi et al., 1998 ; Nakumura et Nishida, 1999 ; Imanishi et al., 2000). Il favorise également l'attachement des cellules épithéliales à la matrice provisoire de FN et leur migration (Nishida et al., 1990; Grant et al., 1992; Boisjoly et al., 1993 ; Wilson et al., 1994). L'effet positif de l'EGF sur l'attachement à la matrice et sur la migration des cellules épithéliales cornéennes dépend d'un système fibronectine-intégrine et donc stimule le dépôt de FN sur la plaie et la synthèse de l'intégrine α 5 β 1 (Nishida et al., 1990 ; Nishida et al., 1992c ; Maldonado et Furcht, 1995a ; Suzuki et al., 2003). EGF accélère la ré-épithélialisation des plaies cornéennes in vivo (Kitazawa et al., 1990; Brazell et al., 1991; Pastor et Calonge, 1992; Yan et al., 2013), dans des modèles de culture d'organe ex vivo (Foreman et al., 1996) et dans un modèle de cicatrisation in vitro utilisant une cornée humaine reconstruite (Carrier et al., 2008). D'autres membres de la famille des EGF tels TGF- α ('transforming growth factor- α ') et HB-EGF ('heparin-binding EGF-like growth factor') sont également impliqués dans la modulation de la migration, de la prolifération et de la différenciation des cellules épithéliales. Il se produit une activation rapide des récepteurs EGF (EGFR) par divers stimulus en réponse à une blessure à la cornée, leur inhibition ralentissant la réépithélialisation de la plaie. Ces EGFR sont donc des médiateurs clés dans la régulation de la cicatrisation de l'épithélium cornéen (Zieske et al., 2000 ; Nakamura et al., 2001 ; Yu et al., 2010).

L'interleukine-6 (IL-6) est une cytokine inflammatoire dont l'expression est augmentée suite à une lésion de l'épithélium et exerce donc un rôle important dans la cicatrisation de la cornée (Imanishi et al., 2000). Les cytokines IL-1 α et TNF- α (*'tumor necrosis factor-\alpha'*) stimulent la production d'IL-6 par les cellules épithéliales et les kératocytes du stroma (Sakamoto et al., 1991 ; Cubitt et al., 1995). L'IL-6 stimule l'attachement à la matrice de FN et la migration des cellules épithéliales cornéennes *in vitro/ex vivo* (Nishida et al., 1992b ; Wang et al, 1994a ; Nakumura et Nishida, 1999). Cette cytokine accélère la fermeture des plaies cornéennes *in vivo* (Nishida et al., 1992a ; Er et Uzmez, 1998). L'effet positif d'IL-6 peut s'expliquer par le fait que cette cytokine augmente l'expression de l'intégrine α 5 β 1 par les cellules épithéliales cornéennes (Ohashi et al., 1995), ce qui suggère que la stimulation de la migration dépend d'un système fibronectine-intégrine (Nishida et al., 1992b). L'IL-6 sécrétée par les fibroblastes du stroma cornéen joue plusieurs fonctions dont la régulation de l'homéostasie de l'épithélium cornéen, la maintenance de l'intégrité de la cornée (Kinoshita et al., 2001) et les propriétés de stratification et de différenciation des cellules épithéliales de cornée (Carrier et al., 2009).

La Substance P, un facteur neural, en combinaison avec le facteur de croissance IGF-1 ('*insulin-like growth factor-1*') stimule de façon synergique la migration des cellules épithéliales cornéennes dans un modèle de culture d'organe *ex vivo* avec des cornées coupées en blocs (Nishida et al., 1996 ; Nakamura et al., 1997 ; Nishida, 2005). La Substance P combinée à l'IGF-1 accélère également la fermeture des plaies cornéennes *in vivo* (Nakamura et al., 2003 ; Chikama et al., 1998 ; Nakamura et al., 1999 ; Nishida, 2005). La combinaison de Substance P et IGF-1 augmente l'abondance de l'ARNm codant pour les sous-unités d'intégrines α 5 et β 1, ce qui se traduit également par une augmentation dans l'expression des protéines qu'ils encodent et qui, ensemble, forment le récepteur de la FN (α 5 β 1) (Nakamura et al., 1998b ; Chimaka et al., 1999 ; Suzuki et al. 2003). Cette combinaison Substance P/IGF-1 permet donc indirectement la phosphorylation de FAK et

de paxilline (deux protéines de signalisation intracellulaire) dans les cellules épithéliales cornéennes (Nakamura et al., 1998c).

Le facteur de croissance TGF- β (*'transforming growth factor-\beta'*) est associé à la régulation de la cicatrisation de la cornée. Les différentes isoformes, TGF-B1 et TGF-B2, ont été détectées dans les larmes, les cellules épithéliales cornéennes et les cellules du stroma cornéen (Nishida et al., 1994 ; Nishida et al., 1995 ; Imanishi et al., 2000) et ces deux types cellulaires expriment les récepteurs pour TGF-β (Li et Tseng, 1995). TGF-β est un modulateur négatif important dans la cicatrisation de l'épithélium cornéen puisqu'il antagonise les actions positives des facteurs de croissances EGF, KGF et HGF sur les cellules épithéliales cornéennes. En effet, TGF- β inhibe la stimulation de l'adhésion, de la migration et de la prolifération des cellules épithéliales par EGF in vitro/ex vivo, tandis qu'il inhibe fortement la stimulation de la prolifération par KGF et HGF (Mishima et al., 1992; Honma et al., 1997; Pancholi et al., 1998; Imanishi et al., 2000). TGF-β est également un modulateur important dans la cicatrisation du stroma cornéen. Il stimule la migration et la prolifération des fibroblastes du stroma cornéen (Grant et al., 1992 ; Ohji et al., 1993 ; Andresen et al. 1997 ; Andresen et Ehlers, 1998 ; Kay et al., 1998). TGF-β induit la transformation en myofibroblastes des kératocytes cornéens (Jester et al., 1996) et s'oppose à l'effet de IL-1 en inhibant leur apoptose (Barbosa et al., 2012). Il joue un rôle majeur dans le remodelage de la matrice extracellulaire en stimulant la production des protéines de la MEC telles les collagènes de type I et de type III, la FN (Roberts et al., 1990; Ohji et al., 1993) et les protéoglycanes de types dermatane/chondroïtine sulfate et héparane sulfate (Roberts et al., 1990; Brown et al., 1999; Funderburgh et al., 2001) ainsi que leurs récepteurs membranaires (en particulier l'intégrine $\alpha 5\beta 1$) (Roberts et al., 1988 ; Roberts et al., 1990 ; Gailit et al., 1994). TGF-β inhibe également la synthèse des MMPs et stimule la synthèse des inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases (TIMPs) par les fibroblastes/myofibroblastes du stroma cornéen (Roberts et al., 1990; Girard et al., 1991). Les actions du TGF-B doivent être considérées dans le contexte des autres facteurs de croissance/cytokines, puisque c'est la balance de ces différents facteurs qui permet une régulation fine du processus complexe de la guérison des plaies cornéennes.

1.4.5.2. Les sérine-protéases et les métalloprotéinases matricielles (MMPs)

La matrice extracellulaire subit un remodelage important durant la cicatrisation de l'épithélium et du stroma cornéen (Murakami et al., 1992 ; Ljubimov et al., 1998 ; Kaji et al., 1998 ; Tanaka et al., 1999 ; Kang et al., 1999 ; Zieske et al., 2001 ; Saika et al., 2002 ; Vigneault et al., 2007). Le remodelage implique deux événements dont l'équilibre s'avère important : la synthèse et la déposition des constituants de la MEC par les cellules de l'épithélium et du stroma cornéen d'un côté, et la dégradation par clivage protéolytique de ces composantes matricielles par des enzymes protéases de l'autre. Deux classes de protéases sont impliquées dans la dégradation protéolytique de la MEC et donc dans la cicatrisation des plaies, dont les sérine-protéases (principalement les sérine-protéases du système plasminogène/plasmine) et les métalloprotéinases matricielles (MMPs) (Li et al., 2003 ; Moali et Hulmes, 2009).

1.4.5.2.1. Les sérine-protéases

Plus du tiers de toutes les enzymes protéolytiques identifiées sont des sérine-protéases, comportant une sérine (Ser) hautement réactive à leur site actif, celles-ci étant regroupées en 13 clans et 40 familles. La famille S1 (*'trypsin-like serine proteases'*) du clan PA forme le groupe le plus abondant de sérine-protéases. De 699 protéases identifiées chez l'humain, 178 sont des sérine-protéases et 138 d'entre-elles appartiennent à la famille S1, dont les membres sont caractérisés par une triade catalytique histidine (His), aspartate (Asp) et sérine (Ser) dans leur domaine catalytique à leur extrémité C-terminale (Yousef et al., 2004 ; Page et Di Cera, 2008, Di Cera, 2009).

Les enzymes du système plasminogène/plasmine sont des sérine-protéases de la famille S1A. Celles-ci sont les activateurs tissulaires du plasminogène (tPA : *'tissue-type plasminogen activator'*), les activateurs du plasminogène de type urokinase (uPA : *'urokinase-type plasminogen activator'*) et le plasminogène/plasmine (Collen, 1999; Lijnen, 2001; Castellino et Ploplis, 2003; Yousef et al., 2004). La conversion du zymogène inactif, le plasminogène, en une enzyme active, la plasmine, s'effectue suite à un changement de conformation d'une forme fermée à ouverte après interactions avec la

fibrine ou les récepteurs cellulaires du plasminogène qui permet le clivage du lien peptidique entre Arg⁵⁶¹ et Val⁵⁶² dans la boucle d'activation par les activateurs du plasminogène (tPA ou uPA) (Robins et al., 1967 ; Castellino et Ploplis, 2003 ; Law et al., 2012 ; Law et al., 2013). Le Glu¹-plasminogène natif peut subir une pré-activation par clivage du peptide d'activation (Glu¹-Lys⁷⁷) par la Glu¹-plasmine générant le lys⁷⁸plasminogène, une forme ouverte pouvant être clivée plus rapidement par les activateurs du plasminogène sur les surfaces cellulaires (Violand et Castellino, 1976; Castellino et Ploplis, 2003 ; Miles et al., 2003). La sérine-protéase tPA, avec les résidus His³²², Asp³⁷¹ et Ser⁴⁷⁸ dans son site actif, permet la lyse du caillot sanguin de fibrine, tandis que la sérineprotéase uPA, avec les résidus His²⁰⁴, Asp²⁵⁵ et Ser³⁵⁶ dans son site actif et par la liaison avec son récepteur cellulaire uPA (uPAR : 'urokinase-type plasminogen activator receptor'), favorise la migration cellulaire et le remodelage tissulaire (Andreasen et al., 2000 ; Ellis, 2003 ; Cesarman-Maus et Hajjar, 2005). La plasmine est une sérine-protéase active constituée d'une chaîne lourde en N-terminal reliée par un pont disulfure à une chaîne légère en C-terminal portant une triade catalytique His⁶⁰³, Asp⁶⁴⁶, and Ser⁷⁴¹ dans son site actif (Lijnen, 2001; Castellino et Ploplis, 2003). Les clivages protéolytiques par la plasmine du lien peptidique Arg²⁷⁵-Ile²⁷⁶ pour tPA et du lien peptidique Lys¹⁵⁸-Ile¹⁵⁹ pour pro-uPA permettent la conversion des formes simple chaîne en double chaîne qui sont plus actives, ce qui génère des boucles de rétroaction positive pour l'activation du plasminogène (Andreasen et al., 2000; Ellis, 2003; Cesarman-Maus et Hajjar, 2005). La plasmine permet la dissolution des caillots de fibrine, la dégradation des constituants de la MEC (FN, LM, vitronectine (VN), ténascine-C (TN-C), thrombospondine, ostéopontine (OPN)), l'activation de d'autres protéases (MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-13) et l'activation de facteurs de croissance latents (dont TGF- β) (Moali et Hulmes, 2009; Deryugina et Quigley, 2012 ; Law et al., 2013). Ainsi, par leurs différentes actions, les sérine-protéases du système plasminogène/plasmine sont impliquées dans la guérison des plaies (Lund et al, 1999; Li et al., 2003c; Lim et al., 2003; Moali et Hulmes, 2009). L'activateur du plasminogène de type urokinase (uPA) et la plasmine permettent les cycles d'adhésion et de dé-adhésion des cellules épithéliales cornéennes à leur substrat, contribuant ainsi à la migration lors de la cicatrisation de l'épithélium cornéen (Morimoto et al., 1993 ; Suzuki et al., 2003 ; Watanabe et al., 2003).

La superfamille des inhibiteurs de sérine-protéases, les serpines ('serine proteinase inhibitors') est composée de plus de 1 500 membres chez les 5 règnes du vivant qui sont regroupés en 16 clans (A à P). Chez l'humain, 36 serpines ont été identifiées étant regroupées dans les clans A à I (Silverman et al., 2001 ; Van Gent et al., 2003 ; Law et al., 2006 ; Heit et al., 2013). La serpine possède un site RCL ('Reactive Center Loop') mimant le substrat de la sérine-protéase et son mécanisme d'inhibition peut être comparé à celui d'un piège à souris. L'interaction non-covalente de RCL de la serpine avec le site actif de la sérine-protéase entraîne son clivage par cette protéase, suivi par la formation d'une liaison covalente et l'insertion de RCL dans le feuillet β A de la serpine, ce qui entraîne un déplacement de la protéase liée et résulte en la formation d'un complexe serpine-protéase inactif et stable (Silverman et al., 2001 ; Law et al., 2006). Les inhibiteurs des activateurs du plasminogène de type 1 (PAI-1 : 'Plasminogen Activator Inhibitor-1') et de type 2 (PAI-2), membres de la famille des serpines, permettent l'inhibition de tPA et uPA. La serpine α 2-antiplasmine permet l'inhibition de la plasmine dans le sang et les tissus. PAI-1, PAI-2 et α 2-antiplasmine sont donc des régulateurs négatifs de l'activité de la plasmine (Lijnen, 2001 ; Gils et Declerck, 2003 ; Cesarman-Maus et Hajjar, 2005).

1.4.5.2.2. Les métalloprotéinases matricielles (MMPs)

1.4.5.2.2.1. Les membres de la famille des métalloprotéinases matricielles et leurs substrats

À ce jour, la famille des MMPs humaines compte 23 protéines codées par des gènes différents. Les MMPs sont des enzymes protéolytiques qui requièrent la liaison des ions Ca^{2+} et Zn^{2+} comme cofacteurs afin d'acquérir leur activité enzymatique (Visse et Nagase, 2003 ; Nagase et al., 2006). Toutes les MMPs sont constituées de différents domaines structuraux communs, incluant en N-terminal un peptide signal, un prodomaine et un domaine catalytique. Le peptide signal permet de diriger la protéase synthétisée vers sa voie de sécrétion. Le prodomaine contient un résidu cystéine (C) dans le motif '*cystein switch*' PR<u>C</u>GxPD hautement conservé qui interagit directement avec l'ion Zn^{2+} du site catalytique pour maintenir les pro-MMPs sous leur forme inactive en interdisant ainsi l'accès du substrat au site actif de l'enzyme. Le domaine catalytique est caractérisé par un motif de



liaison conservé pour l'ion Zn²⁺ catalytique HExxHxxGxxH. Outre l'ion Zn²⁺ liant trois résidus histidines (H) au niveau du site catalytique, le domaine catalytique des MMPs possède plusieurs ions métalliques structuraux, incluant un ion Zn²⁺ non-échangeable additionnel et deux ou trois ions Ca^{2+} nécessaires à la stabilité et à l'activité de l'enzyme. Les gélatinases (MMP-2 et MMP-9) possèdent une insertion dans leur domaine catalytique composée de trois modules répétés de type II de la fibronectine qui est responsable de leur spécificité à dégrader la gélatine. À l'exception des MMP-7, MMP-23 A/B et MMP-26, les MMPs possèdent une région charnière et un domaine de type hémopexine en C-terminal impliqué dans la reconnaissance du substrat et dans l'interaction avec les TIMPs. Tandis que la plupart des MMPs sont sécrétées, certaines demeurent liées aux membranes cellulaires. Les MMPs membranaires (MT-MMPs) possèdent, en plus à leur extrémité Cterminale, soit un domaine transmembranaire de type I suivi d'une queue cytoplasmique, soit un groupement glycosylphosphatidylinositol (GPI) permettant l'ancrage membranaire de l'enzyme à la surface de la cellule (Figure 1.10) (Nagase et Woessner, 1999 ; Sternlicht et Werb, 2001; Visse et Nagase, 2003; Folgueras et al., 2004; Nagase et al., 2006; Piccard et al., 2007; Löffek et al., 2011). Les MMPs sont produites par les cellules inflammatoires (neutrophiles, macrophages) et par les cellules de la plaie telles que les cellules épithéliales, les fibroblastes et les cellules endothéliales (Parks et al., 1999 ; Sivak et Fini, 2002). Une fois exprimées par les cellules, ces protéases peuvent exister sous trois formes : la forme inactive pro-MMP, la forme active MMP et forme inhibée par les TIMPs (Nagase et Woessner, 1999; Visse et Nagase, 2003; Nagase et al., 2006; Löffek et al., 2011). Les membres de la famille des MMPs sont classés en plusieurs catégories : les collagénases (MMP-1, MMP-8, MMP-13), les gélatinases (MMP-2, MMP-9), les stromélysines (MMP-3, MMP-10, MMP-11), les matrilysines (MMP-7, MMP-26), les Membrane-type MMPs (MT-MMPs: MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-24, MMP-25), la métalloélastase (MMP-12), l'énamélysine (MMP-20) et les autres MMPs (MMP-19, MMP-21, MMP-23A/B, MMP-27, MMP-28) (Tableau 1.1) (Nagase et Woessner, 1999; Visse et Nagase, 2003; Nagase et al., 2006).



Figure 1.10. Les métalloprotéinases matricielles et leurs domaines structuraux.

Toutes les métalloprotéinases matricielles (MMPs) possèdent différents domaines structuraux communs, incluant en N-terminal un peptide signal (PS, en jaune), un prodomaine (Pro, en bleu) et un domaine catalytique (Cat, en orange). Le peptide signal permet de diriger la protéase synthétisée vers sa voie de sécrétion. Le prodomaine contient un résidu cystéine dans le motif 'cystein switch' qui interagit directement avec l'ion zinc (Zn²⁺) catalytique pour maintenir les pro-MMPs sous leur forme inactive. Le domaine catalytique est caractérisé par un motif de liaison conservé pour l'ion Zn^{2+} catalytique. Les gélatinases (MMP-2 et MMP-9) possèdent une insertion dans leur domaine catalytique composée de trois modules répétés de type II de la fibronectine (FN II, en rose). À l'exception de MMP-7, MMP-23 et MMP-26, les MMPs possèdent une région charnière (rectangle gris) et un domaine de type hémopexine (Hpx, en vert) en C-terminal qui est impliqué dans la reconnaissance du substrat et dans l'interaction avec les TIMPs. Les MMPs membranaires (MT-MMPs) contiennent, en plus, soit un domaine transmembranaire de type I (TM I. en mauve) suivi d'un domaine cytoplasmique (Cp, en blanc), soit un groupement glycosylphosphatidylinositol (GPI, en mauve) permettant l'ancrage membranaire de l'enzyme à la surface de la cellule. Certaines MMPs possèdent une séquence de coupure pour la furine (furine-site, rectangle noir) entre leur prodomaine et leur domaine catalytique permettant l'activation intracellulaire de ces protéases. Dans le cas de la MMP-23, la région charnière et le domaine hémopexine sont remplacés en Cterminal par une région riche en cystéines (CysR, en vert-lime) et par des motifs de type immunoglobuline (Ig, en turquoise). La pro-MMP-23 ne possède pas de peptide signal et de 'cvstein switch', mais plutôt un domaine transmembranaire de type II (TM II, en mauve) en N-terminal. (Figure inspirée de Visse et Nagase, 2003)

MMP	Substrats matriciels	Autres substrats
<u>Collagénases</u> MMP-1 (Collagénase-1)	Col (type I, II, III, VII, VIII, X), gélatine, TN-C, entactine, aggrécane, versicane, perlécane	α1-antichymotrypsine, α1-PI, α2-macroglobuline, pro-TNFα, IL1β, caséine, pro-MMP1, pro- MMP2
MMP-8 (Collagénase-2)	Col (type I, II, III, V, VII, VIII, X), gélatine, LM, entactine, aggrécane	α1-PI, fibrine/fibrinogène, α2- macroglobuline, α2- antiplasmine, pro-MMP8
MMP-13 (Collagénase-3)	Col (type I, II, III, IV, V, IX, X, XI), gélatine, FN, LM, TN-C, perlécane, aggrécane	α1-antichymotrypsine, α2- macroglobuline, caséine, fibrine/fibrinogène, pro- MMP9, pro-MMP13
<u>Gélatinases</u> MMP-2 (Gélatinase A)	Col (type I, IV, V, VII, X, XI, XIV), gélatine, FN, LM, VN, entactine, élastine, aggrécane, versicane, décorine	α1-antichymotrypsine, α1-PI, pro-TNFα, IL1β, TGFβ latent, pro-MMP1, pro-MMP2, pro- MMP9, pro-MMP13, plasminogène
MMP-9 (Gélatinase B)	Col (type IV, V, VII, X, XI, XIV), gélatine, FN, LM, entactine, versicane	α1-PI, pro-TNFα, IL1β, pro- TGFβ, fibrine/fibrinogène, plasminogène
Stromélysines		
MMP-3 (Stromélysine-1)	Col (type II, III, IV, V, VII, IX, X, XI), gélatine, FN, LM, VN, TN, entactine, fibuline, aggrécane, versicane, perlécane, décorine	 α1-antichymotrypsine, α1-PI, pro-TNFα, IL1β, plasminogène, E-cadhérine, pro-HB-EGF, fibrine/fibrinogène, α2- antiplasmine, caséine, pro- MMP1, pro-MMP3, pro- MMP7, pro-MMP8, pro- MMP9, pro-MMP13, uPA, PAI-1
MMP-10 (Stromélysine-2)	Col (type III, IV, V), gélatine, FN, LM, entactine	Caséine, Pro-MMP-1, pro- MMP7, pro-MMP-8, pro- MMP9, pro-MMP-10
MMP-11 (Stromélysine-3)	LM, FN, aggrécane	α1-PI, IGFBP-1, caséine
Matrilysines MMP-7 (Matrilysine-1)	Col (type I, II, III, IV, V, X), LM, FN, VN, élastine, aggrécane, versicane, décorine	α1-PI, pro-TNFα, pro-HB- EGF, intégrine β4, E- cadhérine, plasminogène, Fas- L, pro-α-defensine, caséine, pro-MMP1, pro-MMP2, pro- MMP7, pro-MMP9
MMP-26 (Matrilysine-2)	Gélatine, FN, VN, col (type IV)	Fibrine/fibrinogène, α1-PI, caséine, pro-MMP9

Tableau 1.1. Les métallo	protéinases matricielles	s et leurs substrats. ¹

<u>Membrane-type MMPs</u>		
MMP-14 (MT1-MMP)	Col (type I, II, III), gélatine, FN, VN, TN, aggrécane, perlécane	Intégrine αvβ3, CD44, fibrine/fibrinogène, α1-PI, α2- macroglobuline, pro-TNFα, tTG, pro-MMP2, pro-MMP8, pro-MMP13
MMP-15 (MT2-MMP)	FN, TN, LM, entactine, aggrécane, perlécane	pro-TNFα, tTG, pro-MMP2, pro-MMP13
MMP-16 (MT3-MMP)	Col (type I, III), gélatine, FN, VN, LM-1, aggrécane	α1-PI, α2-macroglobuline, pro- TNFα, tTG, caséine, Pro- MMP2
MMP-17 (MT4-MMP)	Gélatine	Fibrine/fibrinogène, pro-TNFα, pro-MMP2
MMP-24 (MT5-MMP)	FN, gélatine, protéoglycanes	pro-MMP2
MMP-25 (MT6-MMP)	Gélatine, Col (type IV), FN, protéoglycanes	Fibrine/fibronogène, α1-PI, pro-MMP2, pro-MMP9
Autres MMPs		
MMP-12 (Métalloélastase)	Élastine, FN, LM, protéoglycanes	fibrine/fibrinogène, caséine, plasminogène, pro-TNFα, α1- PI
MMP-20 (Énamélysine)	Amélogénine, aggrécane, COMP	
MMP-19 (RASI-1)	Col (type IV), gelatin, LM, FN, TN-C, entactine, aggrécane, COMP	Fibrine/fibrinogène, caséine
MMP-21 (X-MMP)	Gélatine	Caséine
MMP-23A/B (CA-MMP)	Gélatine	
MMP-27 (C-MMP)	Gélatine	Caséine
MMP-28 (Épilysine)		Caséine

¹ Informations tirées des références suivantes : McCawley et Matrisian, 2001 ; Somerville et al., 2003 ; Visse et Nagase, 2003 ; Folgueras et al., 2004.

Col : Collagènes, COMP : 'Cartilage Oligomeric Matrix Protein', FN : Fibronectine, Fas-L : 'Fas ligand', HB-EGF : 'Heparinbinding EGF-like growth factor', IL1 β : 'Interleukin 1 beta', IGFBP-1 : 'Insulin-like Growth Factor-Binding Protein 1', LM : Laminines, MMP : Métalloprotéinase, PAI-1 : 'Plasminogen Activator Inhibitor-1', TN-C : Ténascine-C, TNFa : 'Tumor Necrosis Factor alpha', TGF β : 'Transforming Growth Factor beta', tTG : 'tissue transglutaminase', uPA : 'Urokinase-type Plasminogen Activator', VN : Vitronectine, α 1-PI : ' α 1-Proteinase Inhibitor'(α 1-antitrypsin).

Les substrats naturels susceptibles au clivage par les différentes MMPs sont nombreux, dont des protéines matricielles extracellulaires (collagènes, LM, FN, ténascine, élastine et protéoglycanes) ainsi que des substrats non-matriciels (cytokines, facteurs de croissance, récepteurs, sérine-protéases, MMPs, inhibiteurs de protéases, molécules d'adhésion cellulaire) (Tableau 1.1) (McCawley et Matrisian, 2001 ; Somerville et al., 2003 ; Visse et Nagase, 2003 ; Folgueras et al., 2004). Les actions des MMPs sont les suivantes :

dégradation des composantes de la MEC, libération de facteurs liés à la matrice, activation ou inhibition des facteurs de croissance/cytokines et leurs récepteurs, activation ou inhibition de d'autres protéases, destruction des inhibiteurs de protéases, dégradation des molécules d'adhésion cellulaire, et création de fragments actifs possédant de nouvelles activités biologiques (Sternlicht et Werb, 2001 ; McCawley et Matrisian, 2001 ; Sivak et Fini, 2002 ; Somerville et al., 2003 ; Page-McCaw et al., 2007). Les MMPs sont impliquées dans plusieurs processus biologiques et pathologiques, incluant l'angiogénèse, l'inflammation, la signalisation cellulaire, la progression métastasique des cancers et la guérison des plaies (Nagase et Woessner, 1999 ; Sivak et Fini, 2002 ; Moali et Hulmes, 2009 ; Löffek et al., 2011). Les MMPs participent également aux processus de réparation tissulaire en conditions normales ou pathologiques, incluant l'élimination de la matrice endommagée, la régénération épithéliale, le remodelage de la membrane basale, le remodelage et la contraction de la MEC cicatricielle et l'angiogenèse (Sivak et Fini, 2002 ; Moali et Hulmes, 2009 ; Löffek et al., 2011). Elles exercent donc un rôle primordial dans la cicatrisation de l'épithélium et du stroma cornéen (Sivak et Fini, 2002 ; Lim et al., 2003).

1.4.5.2.2.2. La régulation des métalloprotéinases

La régulation des MMPs est effectuée à quatre niveaux permettant que leurs activités soient appliquées selon les besoins, à un endroit et à un moment précis. Cette régulation s'exerce ainsi : i) au niveau de la transcription, ii) de l'activation protéolytique de la forme zymogène, iii) de l'inhibition de l'enzyme active par des inhibiteurs de protéases, et iv) de la localisation et du confinement à la surface cellulaire (Sternlicht et Werb, 2001 ; Sivak et Fini, 2002 ; Stamenkovic, 2003 ; Löffek et al., 2011).

Les MMPs sont intimement régulées au niveau de la transcription, permettant leur expression à un moment et à un endroit précis selon les besoins. Plusieurs cytokines/facteurs de croissance stimulent ou suppriment l'expression des MMPs, dont IL-1, TNF- α , TGF- β , EGF, KGF, NGF, bFGF, VEGF, PDGF et EMMPRIN/CD147 (*'extracellular matrix metalloproteinase inducer'*) (Fini et al., 1998a ; Sternlicht et Werb, 2001 ; Gordon et al., 2009). L'expression des MMPs peut être augmentée ou diminuée par

des signaux dérivés des intégrines, par des protéines de la MEC, par le stress cellulaire ainsi que par des changements au niveau de la forme des cellules (Sternlicht et Werb, 1999 ; Sternlicht et Werb, 2001). Ces différents facteurs positifs ou négatifs influencent de multiples voies de signalisation qui vont moduler l'expression et/ou l'activation des facteurs de transcription régulateurs se liant à des éléments de réponse dans les promoteurs des gènes des MMPs, dont AP-1 (commun pour plusieurs promoteurs des gènes MMPs), AP-2, Sp1, Sp3, NF-κB, PEA3, les membres de la famille Ets (Fini et al., 1998a ; Mohan et al, 1998 ; Yan et Boyd, 2007) et Pax-6 (pour MMP-9) (Sivak et al., 2000 ; Sivak et al., 2004).

Les MMPs sont synthétisées sous forme latente de pro-enzymes inactives (zymogènes ou pro-MMPs). Le prodomaine en N-terminal de la protéase contient un motif 'cystein switch' (PRCGxPD) dont le groupement thiol (SH) du résidu cystéine interagit directement avec l'ion Zn^{2+} du domaine catalytique pour maintenir les pro-MMPs sous leur forme inactive en interdisant l'accès du substrat au site actif de l'enzyme. L'activation des MMPs requiert la disruption de l'interaction cystéine-Zn²⁺ et l'élimination du prodomaine, ce processus pouvant être initié par trois mécanismes : 1) un clivage protéolytique du propeptide, 2) une modification chimique du groupement SH de la cystéine, et 3) une perturbation allostérique du zymogène. Les pro-MMPs sécrétées sont activées à l'extérieur des cellules par d'autres protéases, dont des sérine-protéases (notamment la plasmine) et d'autres MMPs qui découpent le propeptide, permettant l'ouverture du centre actif de la molécule de la MMP et les liaisons à ses substrats (Sternlicht et Werb, 2001; Stamenkovic, 2003; Visse et Nagase, 2003 ; Ra et Parks, 2007 ; Löffek et al., 2011). L'activation des MMPs est régulée par des cascades protéolytiques complexes. Par exemple, l'activation complète de la pro-MMP-1 dans un système de culture cellulaire de fibroblastes dermiques et de kératinocytes s'effectue par une autre MMP, la MMP-3, qui est elle-même activée par clivage protéolytique du prodomaine par la sérine-protéase plasmine, issue de l'action de l'activateur du plasminogène de type urokinase sur le plasminogène (He et al., 1989; Murphy et al., 1992 ; Brinckerhoff et Matrisian, 2002). L'activation à la surface cellulaire de la pro-MMP-2 dépend de la MT1-MMP (MMP-14) et d'un inhibiteur endogène des MMPs, TIMP-2. Il a été démontré que TIMP-2 se lie par son domaine N-terminal

inhibiteur au domaine catalytique d'une MT1-MMP (MMP14, 57 KDa) active à la surface de la cellule, inhibant ainsi cette dernière. Ce complexe MT1-MMP/TIMP-2 se comporte comme un récepteur de la pro-MMP-2 (72 KDa) qui va se fixer par son domaine hémopexine à l'extrémité C-terminale de TIMP-2. Une autre molécule MT1-MMP (MMP14) active, libre de TIMP-2 et à proximité est capable de cliver le lien peptidique Asn³⁷-Leu³⁸ dans le prodomaine de la pro-MMP-2 pour former une protéase inactive de forme intermédiaire (~64 KDa). Par la suite, la portion résiduelle du propeptide est éliminée par auto-clivage intermoléculaire du lien peptidique Asn⁸⁰-Tyr⁸¹, ce qui va donner la forme active et mature de MMP-2 (~62 KDa) (Strongin et al., 1993 ; Strongin et al., 1995 ; Will et al., 1996 ; Murphy et al., 1999 ; Visse et Nagase, 2003). Certaines MMPs, dont les MT-MMPs, la MMP-11, la MMP-21, la MMP-23A/B et la MMP-28 possèdent entre leur prodomaine et leur domaine catalytique un motif Rx(K/R)R caractéristique d'une coupure par la furine, une convertase de pro-hormone associée à l'appareil de Golgi, permettant l'activation intracellulaire de ces protéases avant leur sécrétion à la surface cellulaire ou dans le milieu extracellulaire (Pei et Weiss, 1995 ; Imai et al., 1996 ; Yana et Weiss, 2000; Visse et Nagase, 2003).

Des inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases (TIMPs) peuvent inhiber de manière réversible les MMPs activées en bloquant leur activité protéolytique. Les quatre membres des TIMPs (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, TIMP-4) qui ont été identifiés possèdent des activités inhibitrices envers les MMPs avec des différences au niveau des affinités. Les TIMPs sont constitués structuralement de deux domaines, comportant chacun trois ponts disulfures entre 12 cystéines hautement conservées : un domaine N-terminal inhibiteur et un domaine C-terminal, qui sont capables d'interagir respectivement avec le domaine catalytique et le domaine hémopexine des MMPs (Bode et al., 1999 ; Brew et al., 2000 ; Visse et Nagase, 2003 ; Brew et Nagase, 2010). L'activité inhibitrice des TIMPs est liée à leur extrémité N-terminale pouvant former des liens non covalents avec le domaine catalytique des MMPs. La majorité des interactions (75%) entre le domaine N-terminal inhibiteur de TIMP-1 et le domaine catalytique des MMPs implique les résidus N-terminaux Cys¹-Thr-Cys-Val-Pro⁵ ainsi que les résidus Met⁶⁶-Glu-Ser-Val-Cys⁷⁰, reliés par un pont disulfure entre Cys¹ et Cys⁷⁰, dans TIMP-1. Les 5 premiers résidus de TIMP-1 se

positionnent de facon identique à celle d'un substrat dans le site actif de la MMP pour que la Cys^1 de TIMP-1 soit directement au-dessus du Zn^{2+} catalytique de la MMP entraînant l'inhibition de l'enzyme (Gomis-Ruth et al., 1997 ; Bode et al., 1999 ; Brew et al., 2000 ; Brew et Nagase, 2010). TIMP-2 est un inhibiteur des MMPs, mais il est également impliqué dans l'activation de la pro-MMP-2 aux membranes plasmiques des cellules par MT1-MMP (MMP-14). Ce caractère bivalent du TIMP-2 s'explique par le fait qu'il peut interagir d'un côté par son domaine N-terminal avec le site actif d'une MT1-MMP et qu'il peut se lier de l'autre côté par son domaine C-terminal au domaine hémopexine de la proMMP-2 pour former un complexe trimérique MT1-MMP/TIMP-2/pro-MMP-2 à la surface de la cellule. L'activation de pro-MMP-2 n'est possible qu'à de faibles concentrations de TIMP-2, des concentrations insuffisantes pour inhiber toutes les formes actives des molécules MT1-MMP (MMP-14) permettant le clivage du prodomaine de la pro-MMP-2 du complexe trimérique. Par ailleurs, un excès de TIMP-2 peut inhiber toutes les MT1-MMP (MMP-14) requises pour le clivage protéolytique de la pro-MMP-2 (Strongin et al., 1995; Butler et al., 1998; Kinoshita et al., 1998; Jo et al., 2000; Wang et al., 2000 ; Brew et al., 2000). Des évidences suggèrent que les TIMPs possèdent également des fonctions indépendantes de leur action inhibitrice des MMPs, dont des effets sur la croissance cellulaire, la différenciation cellulaire, l'apoptose cellulaire et l'activité angiogénique, soulignant ainsi le rôle multifonctionnel de ces protéines. Afin d'assurer une bonne cicatrisation des plaies, la balance entre les MMPs et leurs inhibiteurs (TIMPs) doit être finement contrôlée (Gomez et al, 1997; Brew et al., 2000; Visse et Nagase, 2003; Brew et Nagase, 2010).

Un autre mécanisme de contrôle de l'activité des MMPs passe par leur localisation à la surface cellulaire, permettant le confinement aux sites où les MMPs sont nécessaires. Les mécanismes de localisation à la surface cellulaire incluent : i) l'expression des MMPs liées aux membranes cellulaires (MT-MMPs), ii) la liaison des MMPs à des récepteurs de surface cellulaire ou à des molécules d'adhésion, iii) la présence de récepteurs de surface cellulaire pour les enzymes activatrices des MMPs (uPA, plasminogène/plasmine), et iv) l'association et la concentration des MMPs sur les composantes de la MEC et les

protéoglycanes péricellulaires (Werb, 1997; Sternlicht et Werb, 2001; Stamenkovic, 2003; Löffek et al., 2011).

1.4.5.2.2.3. Les métalloprotéinases et la guérison des plaies cornéennes

Plusieurs études ont caractérisé le patron d'expression des MMPs par les cellules épithéliales cornéennes et/ou par les fibroblastes du stroma cornéen lors de la guérison des plaies. On a ainsi montré que l'expression de MMP-1, MMP-3, MMP-7 et MMP-12 est augmentée dans les cellules épithéliales de cornée durant la cicatrisation cornéenne induite par Wnt7a chez le rat (Lyu et Joo, 2005 ; Lyu et Joo, 2006). Par ailleurs, la réparation des plaies après kératectomie est caractérisée par une augmentation d'expression de MMP-1, MMP-2, MMP-3 et MMP-9 dans les cornées de lapin (Matsubara et al., 1991a ; Girard et al., 1993; Mulholland et al., 2005) et de MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9, MMP-13, MMP-14, TIMP-1 et TIMP-2 dans les cornées de rat (Azar et al., 1996 ; Ye et Azar, 1998 ; Lu et al., 1999 ; Ye et al., 2000). Les niveaux d'ARNm sont accrus pour MMP-1a, MMP-1b, MMP-9, MMP-10, MMP-12 et MMP-13 ainsi que TIMP-1 dans l'épithélium en migration dans un modèle de débridement épithélial chez la souris. Après la fermeture de la plaie, les niveaux d'ARNm de ces MMPs diminuent tandis que ceux pour MMP-1a, MMP-1b, MMP-9 et MMP-13 demeurent élevés en comparaison à l'épithélium non lésé (Gordon et al., 2011). Dans des modèles de débridement épithélial unique ou répété sur des cornées canines in vivo, l'expression de MMP9 est augmentée durant la guérison de ces plaies aigues ou chroniques (Carter et al., 2007). Dans un modèle de débridement épithélial sur des cultures de cornées humaines ex vivo, la ré-épithélialisation de l'épithélium cornéen se caractérise également par l'expression accrue de MMP-1, MMP-3, MMP-9, MMP-10 et TIMP-1 par les cellules épithéliales et/ou les fibroblastes du stroma lors du processus de cicatrisation dans des blocs de cornées humaines (Daniels et al, 2003a). Plusieurs études ont démontré que l'IL1- β , le TGF- β et le TNF- α stimulent l'expression et la production de MMP-1, MMP-3, MMP-9, MMP-10, MMP-11 et MMP-13 dans les cellules épithéliales cornéennes (Li et al., 2001; Li et al., 2003a; Kim et al., 2004; Gordon et al., 2009). D'autres travaux ont démontré que l'IL1 stimule l'expression de MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9 par les fibroblastes du stroma cornéen, tandis que le TGF-β supprime

l'expression de ces MMPs, à l'exception de MMP-2 (Girard et al., 1991). Les MMPs exercent ainsi des fonctions clés dans la régénération de l'épithélium cornéen en réponse à une lésion.

1.4.5.2.2.3.1. MMP-1

MMP-1 (collagénase-1), permettant la dégradation des collagènes de types I, II, III, VII, VIII et X (McCawley et Matrisian, 2001 ; Somerville et al., 2003), est sécrétée par les cellules épithéliales migratoires et par les fibroblastes du stroma sous la région lésée (Daniels et al., 2003a). L'expression et la localisation de MMP-1 durant la cicatrisation de l'épithélium cornéen suggèrent que les cellules épithéliales cornéennes utilisent MMP-1 pour migrer sur le collagène de type I (composant principal du stroma cornéen) (Daniels et al., 2003a ; Daniels et al., 2003b). Il a été démontré que MMP-1 est nécessaire et suffisant pour la migration des cellules épithéliales cornéennes modulée par HGF sur le collagène de type I *in vitro* (Daniels et al., 2003b). MMP-1 agit sur le complexe collagène I / intégrine $\alpha 2\beta 1$ en dégradant les fibres de collagène, ce qui provoque une dissociation du complexe d'adhésion (Dumin et al., 2001). MMP-1, produite par les fibroblastes du stroma, est impliquée également dans le remodelage à long terme de la matrice de collagènes du stroma cornéen suite à une lésion pénétrante qui touche l'épithélium et le stroma cornéen (Girard et al., 1993 ; Sivak et Fini, 2002).

1.4.5.2.2.3.2. MMP-3

MMP3 (stromélysine-1), qui permet la dégradation des collagènes types II, IV, IX, X, de la FN, des LM et des protéoglycanes (McCawley et Matrisian, 2001 ; Somerville et al., 2003), est sécrétée exclusivement par les fibroblastes du stroma sous la région lésée au niveau de l'épithélium en migration et en profondeur dans le stroma (Girard et al., 1993 ; Daniels et al., 2003a). L'expression et la localisation de MMP-3 suggèrent des rôles dans le remodelage de la membrane basale et du stroma durant la cicatrisation de la cornée (Girard et al., 1993 ; Sivak et Fini, 2002 ; Daniels et al., 2003a). MMP-3 permet également l'activation de d'autres MMPs ayant des rôles dans la cicatrisation, dont MMP-1, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-9 et MMP-13 (McCawley et Matrisian, 2001 ; Somerville et al.,

Rapport-gratuit.com (Le numero 1 mondial du mémoires

2003). MMP-3 permet l'activation par clivage de cytokines/facteurs de croissance latents ou synthétisés en association avec la membrane, dont IL-1 β (Schonbeck et al., 1998; McCawley et Matrisian, 2001; Somerville et al., 2003) et HB-EGF (Suzuki et al., 1997; McCawley et Matrisian, 2001; Somerville et al., 2003), leur permettant ainsi de se lier à leurs récepteurs et d'exercer leurs fonctions lors de la cicatrisation.

1.4.5.2.2.3.3. MMP-9

MMP-9 (gélatinase B), permettant la dégradation des collagènes dénaturés (gélatine) et des composantes de la membrane basale native (CIV, CVII, FN, LM, fibrine, nidogène) (McCawley et Matrisian, 2001 ; Somerville et al., 2003), est sécrétée par les cellules épithéliales migratoires au front de migration chez le lapin, le rat, l'humain et la souris (Matsubara et al., 1991a; Ye et Azar, 1998; Daniels et al., 2003a; Gordon et al., 2011). Son expression s'étend progressivement sous la monocouche épithéliale suite à la fermeture de la plaie et y demeure jusqu'à la formation d'un épithélium pluristratifié (Matsubara et al., 1991a ; Daniels et al., 2003a). Dans un modèle de souris déficiente en MMP-9, la ré-épithélialisation de la cornée s'effectue plus rapidement que chez la souris normale, suggérant l'inhibition, par MMP-9, du taux de fermeture de la plaie en altérant le taux de prolifération des cellules épithéliales (Mohan et al., 2002). La souris déficiente en MMP-9 est incapable d'éliminer la matrice provisoire (FN, fibrine) dans la lésion, ce qui entrave la reformation de la membrane basale native (Mohan et al., 2002). À l'opposé, la surexpression de MMP-9 mène à un échec de ré-épithélialisation et à la formation d'ulcères cornéens chroniques (Matsubara et al., 1991b; Fini et al., 1996, Fini et al., 1998b; Rayment et al., 2008). L'inhibition de MMP-9 dans des modèles d'ulcères cornéens mène à une accélération de la guérison des plaies cornéennes et à une amélioration de l'intégrité de la membrane basale nouvellement synthétisée (Fini et al., 1996 ; Brooks et Ollivier, 2004). Tous ces résultats supportent un rôle pour MMP-9 dans le contrôle de certains processus impliqués dans la régénération épithéliale, mais également dans le remodelage et le réassemblage de la membrane basale de la cornée, en particulier en éliminant la matrice provisoire favorisant la migration cellulaire (Mohan et al., 2002; Sivak et Fini, 2002; Daniels et al., 2003a ; Gordon et al., 2011). MMP-9 possède également comme substrats

des cytokines/facteurs de croissance latents, dont IL-1 β et TGF- β , qui sont impliqués dans la cicatrisation (McCawley et Matrisian, 2001 ; Somerville et al., 2003).

1.4.5.2.2.3.4. MMP-10

MMP-10 (stromélysine-2) permet la dégradation de plusieurs composantes de la membrane basale cornéenne puisque ses substrats sont le CIV, la FN, les LMs et le nidogène (McCawley et Matrisian, 2001 ; Somerville et al., 2003). L'expression de MMP-10 est accrue dans l'épithélium en migration suite à un débridement épithélial chez la souris *in vivo* (Gordon et al., 2011) et également dans des cultures de cornées humaines *ex vivo* (Daniels et al., 2003a). Dans les cornées de patients diabétiques, l'expression de MMP-10 est significativement élevée et cette surexpression est associée avec une augmentation de la dégradation de plusieurs composantes matricielles de la membrane basale incluant les LMs et les nidogènes (Saghizadeh et al., 2001 ; Kabosova et al., 2003). MMP-10 contribue à l'activation de d'autres MMPs, dont MMP-1, MMP-8 et MMP-10 (McCawley et Matrisian, 2001 ; Somerville et al., 2003).

1.4.5.2.2.3.5. MMP-12

MMP-12 (métalloélastase), qui permet le clivage de l'élastine (McCawley et Matrisian, 2001 ; Somerville et al., 2003), est sécrétée par les cellules épithéliales migratoires et localisée passé le front de migration de l'épithélium cornéen chez la souris (Gordon et al., 2011). L'expression de MMP-12 est augmentée dans l'épithélium périphérique où a lieu la prolifération et est diminuée dans l'épithélium central en migration durant la cicatrisation cornéenne induite par Wnt7a chez le rat. L'inhibition de MMP-12 retarde la prolifération cellulaire induite par Wnt7a dans les cellules épithéliales en culture (Lyu et Joo, 2005 ; Lyu et Joo, 2006). Ces résultats suggèrent que MMP-12 module la prolifération des cellules épithéliales cornéennes durant la cicatrisation de l'épithélium cornéen (Lyu et Joo, 2005 ; Lyu et Joo, 2006 ; Gordon et al., 2011).

1.4.5.3. Les protéines de la matrice extracellulaire (MEC)

L'espace extracellulaire dans les tissus est constitué d'un réseau complexe de macromolécules (protéines, glycoprotéines, polysaccharides) très organisé et en association étroite avec les cellules qui les produisent et qu'on désigne sous le terme de matrice extracellulaire (MEC). Les macromolécules matricielles peuvent être regroupées en 3 catégories: i) les protéines fibreuses, telles que les collagènes et l'élastine ; ii) les glycoprotéines, telles que la fibronectine (FN), les laminines (LM) et la ténascine (TN) ; et iii) les polysaccharides, généralement des glycosaminoglycanes (GAG) reliés de façon covalente à des protéines pour former des protéoglycanes. Les macromolécules matricielles sont synthétisées par les cellules qu'elles entourent ou supportent, tels les fibroblastes situés dans la matrice interstitielle ou les cellules épithéliales et endothéliales reposant sur une membrane basale. Les diverses composantes de la MEC servent de ligands à toute une gamme de récepteurs transmembranaires appartenant à la famille des intégrines. La MEC joue un rôle essentiel dans l'architecture tissulaire, mais participe également à la régulation de plusieurs fonctions cellulaires, dont l'adhésion, la migration, la prolifération, la survie ou l'apoptose cellulaire. Elle est impliquée dans plusieurs mécanismes liés aux intégrines tels que l'adhésion cellule-matrice, la signalisation intracellulaire, la régulation et l'expression des gènes et l'organisation du cytosquelette. Elle sert également de support et de réservoir pour des cytokines/facteurs de croissance (Bosman et Stamenkovic, 2003 ; Frantz et al., 2010 ; Alberts et al., 2011 ; Hynes et Naba, 2012).

La membrane basale de l'épithélium cornéen est une MEC spécialisée en feuillet fin bidimensionnel qui est constituée de différents types de collagènes (le type IV est le composant principal), de laminines (LM-1, LM-5 et LM-10), d'entactine et de perlécane (Ljubimov et al., 1995 ; Tuori et al., 1996 ; Zieske, 2001 ; Kabosova et al., 2007 ; Torricelli et al., 2013). Le stroma cornéen est composé d'une matrice interstitielle qui est une MEC volumineuse et riche en fibrilles de collagènes de type I et V (Zieske, 2001 ; Dawson et al., 2011). Cette MEC joue un rôle important dans le maintien de l'homéostasie de la cornée en condition normale, mais également dans la cicatrisation des plaies cornéennes. En effet, il existe des différences dans la composition de la MEC d'une cornée saine et celle d'une cornée en cours de cicatrisation (Zieske, 2001). Dans les sections suivantes, les principales

protéines matricielles (LM, CI, CIV, TN-C, FN) et leurs fonctions potentielles au cours de la cicatrisation de la cornée seront présentées.



Figure 1.11. Représentation des différents isoformes de laminines.

Les laminines (LM) sont constituées de trois chaînes polypeptidiques nommées α , β et γ formant une structure asymétrique en forme de croix ou de T. Le long bras en C-terminal comprend les trois chaînes super-enroulées (coiled-coil domain) tandis que les deux ou trois petits bras en N-terminal sont composés d'une chaîne séparée. En C-terminal, la chaîne α possède cinq domaines globulaires (LG1 à LG5). Cinq chaînes α (α 1-5), trois chaînes β (β 1-3) et 3 chaînes γ (γ 1-3) ont été répertoriées pouvant former dix-huit combinaisons différentes. * L'existence de certains de ces isoformes reste à confirmer. (Figure inspirée de Aumailley et al., 2005)

1.4.5.3.1. Les Laminines (LM)

Les laminines (LM) sont de grosses glycoprotéines hétérotrimériques flexibles (environ 400 à 900 KDa) constituées de trois longes chaînes polypeptidiques nommées α , β et γ qui sont maintenues ensemble par des ponts disulfures et formant une structure asymétrique en forme de croix ou de T (Figure 1.11). Dans la molécule de LM cruciforme, le long bras en C-terminal comprend les trois chaînes super-enroulées ('a-helical coiled-coil domain') tandis que les deux ou trois petits bras en N-terminal sont composés d'une chaîne séparée. Le long bras de la chaîne α en C-terminal possède également cinq domaines globulaires répétés (LG1 à LG5) (Tunggal et al., 2000 ; Aumailley et al., 2005 ; Tzu and Marinkovich, 2008; Durbeej, 2010). Les LMs portent plusieurs domaines fonctionnels permettant des interactions spécifiques avec les récepteurs transmembranaires des LMs présents à la surface des cellules (intégrines, α -dystroglycane, syndécanes) ainsi qu'avec d'autres composantes de la MEC (collagène de type IV, entactine (nidogène), héparane sulfate du perlécane et de agrine) (Colognato et Yurchenco, 2000; Miner et Yurchenco, 2004; Miyazaki, 2006; Tzu and Marinkovich, 2008; Durbeej, 2010). À ce jour, cinq chaînes α (α 1-5), trois chaînes β (β 1-3) et 3 chaînes γ (γ 1-3) ont été identifiées dont l'association peut théoriquement mener à la formation de dix-huit isoformes différents de LMs. Ces différents isoformes sont nommés LM-1 à 15 ou selon la composition des chaînes $\alpha\beta\gamma$. Par exemple, la LM-1 (LM-111) est composée des chaînes $\alpha 1$, $\beta 1$ et $\gamma 1$ (Figure 1.12A). La LM-5 (LM-332) est composée des chaînes $\alpha 3$, $\beta 3$ et $\gamma 2$ (Figure 1.12B) (Aumailley et al., 2005 ; Durbeej, 2010). Il existe deux variants d'épissage alternatif de la chaîne α 3, soit α 3A (160 KDa sans domaines LG4-LG5) et α3B (335 KDa sans domaines LG4-LG5), pouvant générer des LMs différentes, dont la LM-5A (LM-3A32) et la LM-5B (LM-3B32) (Galliano et al., 1995; Tunggal et al., 2000; Kariya et al., 2004). Plusieurs isoformes de LMs subissent des modifications post-traductionnelles par clivage protéolytique après leur sécrétion. La LM-5 ou LM-5A (LM-3A32) endogène est nouvellement synthétisée et initialement sécrétée sous une forme immature non tronquée de 490 KDa, avec une chaîne α3 de 200-190 KDa, β3 de 140 KDa et γ2 de 150 KDa, qui subit, après sa sécrétion, des clivages protéolytiques spécifiques pour former une protéine mature. La chaîne α 3 est clivée de 200-190 KDa à 160 KDa et 145 KDa, la chaîne y2 est clivée de 150 KDa à 105 KDa et 80 KDa, et la chaîne β 3 de 140 KDa n'est généralement pas modifiée quoiqu'une forme clivée à 80 KDa ait aussi été rapportée (Marinkovich et al., 1992 ; Goldfinger et al., 1998 ; Tunggal et al., 2000 ; Aumailley et al., 2003 ; Ebihara et al., 2000 ; Hintermann et Quaranta, 2004 ; Miyazaki, 2006).





A) Identification schématique des domaines fonctionnels de la laminine-1 et **B**) de la laminine-5 permettant des interactions spécifiques avec des récepteurs transmembranaires à la surface des cellules telles que les intégrines (en bleu), le α -dystroglycane et les syndécanes, et d'autres liaisons avec différentes composantes de la MEC, comme LM-1 pour l'auto-assemblage, l'entactine (nidogène), des héparane sulfate protéoglycanes comme l'agrine et le perlécane, le collagène VII et d'autres laminines (LM-6/LM-7). Les fragments E1', E3 (LG4-5), E4 et E8 (LG1-3) sont encadrés en rouge. Les interactions de faible affinité sont identifiées avec l'astérisque. Les sites de clivage pour LM-5 sont identifiés avec les flèches vertes. (Figure inspirée de Miner et Yurchenco, 2004)

Les différents isoformes de LMs peuvent être liés à la surface des cellules par les intégrines $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 7\beta 1$, $\alpha 9\beta 1$, $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$, $\alpha v\beta 8$ et $\alpha 6\beta 4$ (Mercurio et Shaw, 1991 ; Belkin et Stepp, 2000 ; Colognato et Yurchenco, 2000). Les intégrines $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 7\beta 1$ et α 6 β 4 ont pour ligand spécifique les LMs, tandis que les autres intégrines peuvent également reconnaître des ligands additionnels (Hynes, 1992 ; Sheppard, 1996 ; Plow et al., 2000). Par exemple, les intégrines $\alpha 1\beta 1$ (Tawil et al, 1990; Calderwood et al., 1997) et $\alpha 2\beta 1$ (Elices et Helmer, 1989; Helmer et al., 1990) en plus de lier les LMs, sont également des récepteurs de collagènes. L'intégrine $\alpha 3\beta 1$ est capable de lier des ligands multiples, incluant la FN, le CIV, la LM-1, la LM-5 et les LMs 10/11 (Helmer et al., 1990 ; Elices et al., 1991 ; Kikkawa et al., 1998 ; Eble et al., 1998). Les sites de liaison des intégrines $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 7\beta 1$ et $\alpha 6\beta 4$ aux molécules de LMs sont les domaines LG (fragments E3 et E8) en C-terminal de la chaine α des LMs (Sonnenberg et al., 1990 ; Baker et al., 1996 ; Belkin et Stepp, 2000; Shang et al., 2001; Ido et al., 2004) alors que les sites de liaison des intégrines $\alpha 1\beta 1$ et $\alpha 2\beta 1$ aux molécules de LMs sont en N-terminal des chaînes des LMs (fragments E1' et E4) (Underwood et al., 1995; Colognato et al., 1997; Nomizu et al., 1997 ; Belkin et Stepp, 2000). Les intégrines α 3 β 1 et α 6 β 4 se lient spécifiquement aux LM-5, LM-10 et LM-11, tandis que l'intégrine $\alpha 6\beta 1$ peut se lier à plusieurs LMs, avec, toutefois, une préférence pour les LM-1, LM-5, LM-10 et LM-11 (Nishiuchi et al., 2003 ; Nishiuchi et al., 2006). Les LMs peuvent également être liées par d'autres récepteurs de surface cellulaires, comme le dystroglycane, une glycoprotéine hétérodimérique composée d'une sous-unité α extracellulaire et d'une sous-unité β membranaire, et les syndécanes, des protéoglycanes transmembranaires de type chondroïtine sulfate et héparane sulfate (Salmivirta et al., 1994; Henry et Campbell, 1998; Hoffman et al., 1998; Andac et al., 1999 ; Belkin et Stepp, 2000 ; Henry et al., 2001).

Les LM-1 (LM-111), LM-5 (LM-332) et LM-10 (LM-511) sont les principaux isoformes présents dans la membrane basale de l'épithélium cornéen (Ljubimov et al., 1995 ; Tuori et al., 1996 ; Filenius et al., 2001 ; Kabosova et al., 2007). Avec leurs sites de liaisons pour d'autres protéines, les LM-1, LM-5 et LM-10 jouent un rôle central dans l'assemblage et l'organisation structurale de la membrane basale et son adhésion à l'épithélium par

l'intermédiaire de récepteurs cellulaires comme les intégrines ($\alpha 6\beta 1$ et $\alpha 3\beta 1$), le dystroglycane et les syndécanes (Alberts et al., 2011 ; Yurchenco, 2011 ; Hohenester et Yurchenco, 2013). Les cellules épithéliales sont attachées à la membrane basale par des hémidesmosomes dans lesquels la LM-5 (LM-332) est liée à l'intégrine α6β4 et au CXVII permettant l'ancrage permanent des filaments de kératines des cellules de l'épithélium à la membrane basale et, par association, avec les fibrilles d'ancrage de CVII au stroma sousjacent (Stepp et al., 1990; Jones et al., 1991; Gipson, 1992; Baker et al., 1996; Aumailley et al., 2003). La LM-5 possède une double fonction, soit celle de favoriser l'adhésion cellulaire permanente, et celle opposée de promouvoir la migration cellulaire. Par exemple, la LM-5 immature non-clivée contenant la chaîne α3 200-190 KDa favorise la migration cellulaire via les intégrines $\alpha 3\beta 1/\alpha 6\beta 1$, tandis que la chaîne $\alpha 3$ de 160 KDa mature, après clivage par la plasmine, permet l'assemblage des hémidesmosomes via l'intégrine $\alpha 6\beta 4$, permettant ainsi d'établir une adhésion permanente. Celle-ci inhibe également la migration des cellules épithéliales en culture et dans la peau lésée en cicatrisation (Baker et al., 1996; Goldfinger et al., 1998; Goldfinger et al., 1999; Nguyen et al., 2000; Hintermann et Quaranta, 2004). Le clivage protéolytique par MMP2 et/ou MT1-MMP de la chaîne $\gamma 2$ de la LM-5 du rat, qui passe de 150 KDa à 80 KDa (Giannelli et al., 1997; Koshikawa et al., 2000 ; Hintermann et Quaranta, 2004), et le clivage par des métalloprotéinases de la famille astacine (BMP-1, mTLD) de la chaîne γ 2 de la LM-5 humaine, qui passe de 150 KDa à 105 KDa, stimule l'activité de migration cellulaire et réduit l'activité d'adhésion cellulaire de la LM-5 (Ogawa et al., 2004 ; Miyazaki, 2006). Quant à elle, la forme γ 2 non-tronquée de 150 KDa est impliqué dans l'adhésion cellulaire ainsi que dans la déposition et l'incorporation de la LM-5 dans la MEC (Gagnoux-Palacios et al., 2001 ; Ogawa et al., 2004 ; Hintermann et Quaranta, 2004). La chaîne β3 (140 KDa) est également impliquée dans l'adhésion cellulaire et l'incorporation de la LM-5 dans la MEC par la liaison au CVII des fibrilles d'ancrage et son clivage protéolytique (80 et 100 KDa) peut moduler ces différentes fonctions (Nakashima et al., 2005; Miyazaki, 2006). Des études ont également démontré que la LM-5 endogène non-tronquée (chaînes : α 3=190 kDa, β 3=140 kDa, γ 2=150 kDa) favorise la migration des cellules épithéliales de la cornée via l'intégrine $\alpha \beta \beta$ 1, tandis que la LM-5 exogène clivée (chaînes : α 3=160 kDa, β 3=140 kDa, γ 2=105 kDa) favorise l'adhésion cellulaire via l'intégrine $\alpha 3\beta 1$ et l'assemblage des hémidesmosomes matures en association avec l'intégrine α 6 β 4 (Qin et Kurpakus, 1998 ; Ebihara et al., 2000). Ainsi, la cellule épithéliale régule ces deux comportements opposés, soit l'adhésion permanente et la migration, par clivage protéolytique des différentes chaînes de la LM-5 (par des sérine-protéases, MMPs ou astacine-MMPs) et à l'aide d'interactions avec des récepteurs cellulaires (soit des intégrines (α 3 β 1, α 6 β 1, α 6 β 4) ou d'autres protéines (par exemple, erbB1 et erbB2)) (Hintermann et Quaranta, 2004 ; Miyazaki, 2006).

1.4.5.3.2. Les collagènes

La molécule de collagène est formée de 3 chaînes polypeptidiques, appelées chaînes α , assemblées en une triple hélice super-enroulée et composées d'un triplet de peptides répétés de Gly-X-Y, où X est souvent la proline et Y l'hydroxyproline. À ce jour, 45 chaînes α , chacune codée par un gène différent, ont été identifiées. Vingt-huit différents types de collagènes (CI à CXXVIII) formés par l'association de diverses combinaisons de différentes chaînes α ont été identifiés. Les principales configurations des collagènes sont les suivantes (Figure 1.13) : les collagènes fibrillaires, qui comprennent les types I, II, III, V, XI, XXIV et XXVII ; les collagènes formant un réseau et qui comprennent les types IV (réseau en feuillet), VI (filaments formant des perles), VIII et X (réseaux hexagonaux) ; les collagènes associés aux fibrilles (FACITs) et auxquels appartiennent les types IX, XII, XIV, XVI, XIX, XX, XXI et XXII ; le collagène formant les fibrilles d'ancrage, dont le type VII; les collagènes transmembranaires, qui incluent les types XIII, XVII, XXIII et XXV, et finalement les multiplexines, qui comprennent les types XV et XVIII (Gelse et al., 2003; Ricard-Blum et Ruggiero, 2005; Kadler et al., 2007; Gordon et Hahn, 2010; Ricard-Blum, 2011 ; Birk et Bruckner, 2011). Les récepteurs pour les collagènes sont les intégrines possédant un domaine al responsable de la reconnaissance de la séquence GFOGER (gly-phe-hydroxyproline-gly-glu-arg) des collagènes, soit les intégrines $\alpha 1\beta 1$ et $\alpha 10\beta 1$ qui se lient préférentiellement aux collagènes formant un réseau, dont ceux de types IV, VI, et les intégrines $\alpha 2\beta 1$ et $\alpha 11\beta 1$ qui se lient préférentiellement aux collagènes fibrillaires, dont ceux de types I, II, III, V (Vandenberg et al., 1991; Kern et al., 1993; Heino, 2000; Knight et al., 2000; Nykvist et al., 2000; Tiger et al., 2001; Tulla et al., 2001; Zhang et al., 2003c; Leitinger et Hohenester, 2007). L'intégrine α 3 β 1 est une récepteur pour la LM, mais il peut également se lier au CIV (Elices et al., 1991 ; Maldonado et Furcht, 1995b ; Miles et al., 1995 ; Borza et al., 2006).



Figure 1.13. Organisation structurale des différents types de collagènes.

La molécule de collagène est formée de 3 chaînes α assemblées en une triple hélice super-enroulée s'autoassemblant pour former différentes configurations structurales. Celles-ci comprennent les collagènes qui forment des fibrilles (collagène type I); les collagènes associés aux fibrilles appelés FACITs (collagènes types IX, XII, XIV); le collagène type VII formant les fibrilles d'ancrage; les collagènes qui s'assemblent en réseau dont le réseau en feuillet des trimères du collagène type IV, les réseaux hexagonaux des collagènes types VIII et X, les filaments formant des perles des tétramères du collagène type VI; les collagènes transmembranaires et les multiplexines. (Figure inspirée de Gordon et Hahn, 2010)



Dans la matrice interstitielle du stroma cornéen, le collagène fibrillaire de type I (CI) formé des chaînes $[\alpha 1(I)]_2/\alpha 2(I)$ est le plus abondant, constituant ~ 58% de cette matrice, tandis que le collagène régulateur de type V (CV), constitué des chaînes $[\alpha 1(V)]_2/\alpha 2(V)$ compte pour seulement 15% de celle-ci. Les molécules de collagène de types I et V s'associent pour former de minces fibrilles de collagène (diamètre 25-35 nm) qui sont organisées en lamelles superposées et entrelacées, parallèles à la surface cornéenne (Komai et Ushiki, 1991; Radner et al., 1998; Birk, 2001; Dawson et al., 2011). Les fibrilles de collagène de types I et V sont entourées de protéoglycanes (décorine, lumicane, mimecane et kératocane) et de d'autres molécules de collagènes dont le type VI (filaments formant des perles), les types XII et XIV étant des FACITs contribuant à la croissance et à l'organisation typique des minces fibrilles organisées en lamelles (Scott, 1991 ; Hirsch et al., 2001 ; Dawson et al., 2011; Birk et Bruckner, 2011). Le collagène VII, constituant principal des fibrilles d'ancrage, en association avec les complexes hémidesmosomes-filaments d'ancrage (composés de l'intégrine $\alpha 4\beta 6$, la LM-5 et le collagène transmembranaire de type XVII), relient la membrane basale et l'épithélium cornéen au stroma sous-jacent (Sakai et al., 1986 ; Gipson et al. 1987 ; Gipson, 1992 ; Borradori et Sonnenberg, 1999 ; Torricelli et al., 2013). La fonction principale du stroma est d'être un support structural transparent permettant une réfraction correcte de la lumière indispensable à son rôle optique. L'organisation tridimensionnelle particulière des collagènes (types I/V) du stroma cornéen contribue en partie à cette transparence cornéenne (Meek et al., 2003 ; Hassell et Birk, 2010).

Le collagène de type IV (CIV), présent seulement dans les membranes basales (Yurchenco, 2011 ; Torricelli et al., 2013), possède six chaînes α distinctes nommées $\alpha 1(IV)$ à $\alpha 6(IV)$ pouvant s'assembler en trois différents isoformes hétérotrimériques, dont $[\alpha 1(IV)]_2/\alpha 2(IV)$, $\alpha 3(IV)/\alpha 4(IV)/\alpha 5(IV)$ et $[\alpha 5(IV)]_2/\alpha 6(IV)$ (Borza et al., 2001 ; Khoshnoodi et al., 2008). Chaque chaîne $\alpha(IV)$ comprend un domaine central en triple hélice interrompue en plusieurs endroits, un domaine 7S en N-terminal et un domaine globuleux non-collagéneux NC1 en C-terminal. Les trimères de CIV interagissent par leurs domaines terminaux et s'assemblent en un réseau flexible qui, par ses liaisons avec les nidogènes (entactines) et le perlécane, est également associé aux réseaux des LMs formant la membrane basale (Ortega

et Werb, 2002; Yurchenco, 2011; Alberts et al., 2011; Hohenester and Yurchenco, 2013). Le CIV sert donc à stabiliser la charpente de la membrane basale et à maintenir son intégrité structurale et fonctionnelle (Pöschl et al., 2004 ; Yurchenco, 2011). Le CIV est un constituant majeur de la membrane basale centrale de l'épithélium cornéen chez l'adulte avec la présence des chaînes $\alpha 3(IV)$ à $\alpha 6(IV)$, tandis que la membrane basale du limbe contient les chaînes $\alpha 1(IV)$, $\alpha 2(IV)$, $\alpha 5(IV)$ et $\alpha 6(IV)$ (Zimmermann et al., 1986 ; Ljubimov et al., 1995; Kabosava et al., 2007; Torricelli et al., 2013). Le CIV disparaît durant la phase migratoire du processus de cicatrisation cornéenne et réapparaît une fois la lésion recouverte (Murakami et al., 1992; Anderson et al., 1996; Tanaka et al., 1999). La cicatrisation cornéenne s'accompagne également d'un changement des isoformes de CIV avec l'absence des chaînes $\alpha 3(IV)$, $\alpha 4(IV)$ (présentes dans la cornée normale) et la présence des chaînes $\alpha 1(IV)$, $\alpha 2(IV)$ (présentes dans le limbe normal) au niveau de la membrane basale centrale de l'épithélium cornéen lésé (Maguen et al., 1997 ; Ljubimov et al., 1998). Certaines études ont démontré que le CIV et le CI favorisent l'adhésion et la migration des cellules épithéliales de cornée in vitro/ex vivo (Cameron et al., 1988 ; Cameron et al., 1991 ; Nakagawa et al., 1990; Suzuki et al., 2003; Kimura et al., 2010) et in vivo (Sweeney et al., 2003). Cependant, le changement d'expression du CIV (diminution lors de la migration et augmentation lorsque la migration est terminée) ainsi que les changements du patron 'cornée centrale' ($\alpha 3 - \alpha 4 - \alpha 5 - \alpha 6$) pour un patron 'limbal' ($\alpha 1 - \alpha 2 - \alpha 5 - \alpha 6$) des isoformes de CIV durant la cicatrisation de la cornée suggèrent un rôle pour le CIV dans la modulation de la prolifération cellulaire et de la différenciation afin de reformer un épithélium pluristratifié (Ljubimov et al., 1998; Sweeney et al., 2003; Kabosava et al., 2007; Vigneault et al., 2007).

1.4.5.3.3. La Ténascine (TN)

La ténascine (TN) est une glycoprotéine formée de 6 chaînes polypeptidiques identiques, comportant chacune 4 types de domaines : un domaine d'assemblage de TN en N-terminal, des motifs de type EGF répétés, des domaines similaires au FN type III (FN3) et une extrémité globulaire similaire au fibrinogène en C-terminal (Figure 1.14). Il existe 5 membres de la famille des TNs : TN-C, TN-R, TN-X, TN-Y et TN-W (Jones et Jones,

2000a ; Chiquet-Ehrismann et Tucker, 2011). Les intégrines α 8 β 1 (Schnapp et al., 1995 ; Denda et al., 1998), $\alpha\nu\beta$ 3 (Joshi et al. 1993 ; Prieto et al., 1993 ; Sriramarao et al. 1993 ; Yokoyama et al., 2000) et $\alpha\nu\beta$ 6 (Prieto et al., 1993 ; Ramos et al., 1997) se lient au motif RGD (Arg-Gly-Asp) tandis que l'intégrine α 9 β 1 (Yokosaki et al., 1994 ; Yokosaki et al., 1998) se lie au motif IDG (Ile-Asp-Gly) dans le troisième domaine FN3 présent dans la molécule de TN-C. La TN-C peut se lier à des composantes de la MEC telles que la FN et le perlécane. Outre les intégrines, elle peut également se lier à d'autres récepteurs cellulaires tels que les syndécanes 1 et 4, l'annexine II et EGFR (Orend et Chiquet-Ehrismann, 2006 ; Midwood et Orend, 2009).



Figure 1.14. Structure de la ténascine-C.

La ténascine-C (TN-C) est un hexamère formé de 6 monomères identiques comportant 4 types de domaines : un domaine d'assemblage des monomères de TN en N-terminal (domaine TA) ; des motifs de type EGF répétés (rectangles jaunes) ; des domaines FN3 conservés (losanges roses) et variables par épissage alternatif (losanges rouges) ; une extrémité fibrinogène globulaire en C-terminal (cercle vert). La molécule de TN-C possède des sites de liaison pour des récepteurs cellulaires dont des intégrines (en bleu), le syndécane-4, l'annexine II et EGFR. Elle porte également des sites d'interactions pour des composantes matricielles telles que la FN et le perlécane. (Figure inspirée de Jones et Jones, 2000a)

Une expression élevée de TN-C est associée au développement embryonnaire et tissulaire. à la cicatrisation des plaies ainsi qu'à des situations pathologiques comme l'inflammation chronique et le cancer (Sakakura et Kusano, 1991; Stepp et Zhu, 1997; Jones et Jones, 2000b; Orend et Chiquet-Ehrismann, 2006; Midwood et Orend, 2009). La TN-C est présente dans la cornée en développement (Tucker, 1991 ; Weller et al., 1991 ; Kaplony et al., 1991), mais elle est absente dans la cornée adulte normale sauf au niveau de la jonction cornéo-sclérale et de la région limbale (Tervo et al., 1990; Maseruka et al., 1997; Tuori et al., 1997). La TN-C est une composante de la MEC exprimée de façon transitoire durant la guérison des plaies cutanées (Mackie et al., 1988 ; Betz et al., 1993 ; Latijnhouwers et al., 1996 ; Aukhil et al., 1996) ainsi que durant la cicatrisation de l'épithélium cornéen au niveau de la membrane basale et durant la cicatrisation du stroma cornéen (Tervo et al., 1991b ; Van Setten et al., 1992b ; Latvala et al., 1995 ; Stepp et Zhu, 1997 ; Maguen et al., 1997; Ljubimov et al., 1998; Maguen et al., 2002). Elle est aussi impliquée dans la réparation tissulaire en modulant l'adhésion à la FN, la migration, la prolifération et la différenciation cellulaire, la synthèse et l'assemblage de la MEC, l'angiogenèse, l'inflammation et la contraction de la plaie (Midwood et Orend, 2009; Chiquet-Ehrismann et Tucker, 2011).

1.4.5.3.4. La Fibronectine (FN)

La fibronectine (FN) est un dimère glycoprotéique de grande taille (~450 KDa) formé de 2 sous-unités réunies par une paire de ponts disulfures situés près de leur extrémité C-terminale. Chaque sous-unité de FN est composée de trois types de modules répétés : 12 de type I (FN1), 2 de type II (FN2), 15-17 de type III (FN3) (Figure 1.15). Un gène unique code pour l'ARNm de la FN qui subit ensuite de l'épissage alternatif, la FN étant ellemême sujette à des modifications post-traductionnelles (glycosylation, phosphorylation, sulfatation). Ainsi, de nombreuses isoformes de la FN peuvent être produites (jusqu'à 20 variants pour la FN humaine), celles-ci pouvant présenter différentes propriétés de solubilité, d'adhésion cellulaire et d'affinité de liaison à divers ligands. La FN porte 3 segments sujets à de l'épissage alternatif : les régions extra domaine A (EDA) et extra domaine B (EDB) situées entre les modules ¹¹FN3-¹²FN3 et les modules ⁷FN3-⁸FN3, respectivement, ainsi qu'une région présente dans la région non homologue variable (V) située entre les modules ¹⁴FN3-¹⁵FN3. Il existe deux formes de FN : i) la FN plasmatique (pFN), synthétisée par les hépatocytes et présente sous forme soluble dans le plasma sanguin, et ii) la FN cellulaire (cFN), synthétisée localement par les cellules qui sont responsables de la production de la matrice (fibroblastes, cellules endothéliales, cellules épithéliales) et qui s'assemblent pour former des fibrilles de FN insolubles à la surface des cellules faisant partie de la MEC. La molécule de FN porte plusieurs domaines qui sont des sites d'interactions spécifiques avec les autres constituants de la matrice extracellulaire, tels le collagène, l'héparine / héparine sulfate protéoglycane, la fibrine ou une autre molécule de FN. Ces domaines peuvent aussi interagir avec des récepteurs spécifiques à la surface des cellules dont les intégrines et les syndécanes (Romberger, 1997 ; Pankov et Yamada, 2002 ; Leiss et al., 2008 ; Schwarzbauer et DeSimone, 2011 ; Xu et Mosher, 2011).





La fibronectine (FN) est un dimère formé de deux monomères réunis par une paire de ponts disulfures à leur extrémité C-terminale. Chaque sous-unité de FN est composée de trois types de modules répétés : 12 FN1 (type I), 2 FN2 (type II), 15-17 FN3 (type 3). Il y a 3 segments sujets à de l'épissage alternatif : les régions extra domaine A (EDA) et extra domaine B (EDB) de type FN3 et un autre présent dans la région non homologue variable différente des trois autres types (région V). La molécule de FN est composée de plusieurs domaines représentant des sites de liaison pour des intégrines (en bleu) ainsi qu'avec d'autres protéines matricielles telles l'héparine / héparine sulfate protéoglycanes / syndécanes, le collagène / gélatine, la fibrine ou une autre molécule de FN pour auto-assemblage en matrice fibrillaire. (Figure inspirée de Xu et Mosher, 2011)

La FN est le ligand pour une douzaine de récepteurs cellulaires appartenant à la famille des intégrines, dont $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 4\beta 7$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 8\beta 1$, $\alpha 9\beta 1$, $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$, $\alpha v\beta 6$, $\alpha v\beta 8$ et αIIbβ3 (Plow et al., 2000; Humphries et al., 2006; Leiss et al., 2008; Xu et Mosher, 2011). Il a été montré que le domaine de liaison aux cellules possède un motif RGD (Arg-Gly-Asp) situé dans le module ¹⁰FN3, indispensable à la liaison de la FN aux intégrines $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 8\beta 1$, $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$, $\alpha v\beta 6$, $\alpha v\beta 8$ et $\alpha IIb\beta 3$ (Ruoslahti, 1996; Leiss et al., 2008 ; Xu et Mosher, 2011). Le récepteur principal de la FN demeure l'intégrine α 5 β 1, qui se lie à la FN avec une interaction de haute affinité via le motif RGD retrouvé dans le module ¹⁰FN3 (Pytela et al., 1985; Koivunen et al., 1993; Leiss et al., 2008). Cette interaction s'effectue en collaboration avec le site synergique PHSRN (Pro-His-Ser-Arg-Asn) présent dans le module ⁹FN3 (Nagai et al., 1991 ; Aota et al. 1994 ; Leiss et al., 2008). D'autres motifs pour la liaison des intégrines existent. Par exemple, les intégrines $\alpha 4\beta 1$ et α4β7 lient le motif LDV (Leu-Asp-Val) et le motif REDV (Arg-Glu-Asp-Val) dans la région V (Wayner et al., 1989; Guan and Hynes, 1990; Mould et al., 1991). Des sites additionnels de liaison aux intégrines $\alpha 4\beta 1$ et $\alpha 9\beta 1$ ont également été identifiés dans le module alternatif EDA (Liao et al., 2002a ; Shinde et al., 2008).

Les interactions FN-intégrines sont impliquées dans plusieurs processus biologiques tels que l'adhésion, la migration, la prolifération et la différenciation cellulaire, la survie/apoptose cellulaire, l'organisation du cytosquelette, l'assemblage de la matrice fibrillaire de FN, le maintien du l'intégrité tissulaire, le développement et la cicatrisation des plaies (Hynes, 1990; Yamada et Clark, 1996; Romberger, 1997; To et Midwood, 2011). La FN, par l'intermédiaire de son récepteur α 5 β 1, joue un rôle important dans la cicatrisation de la cornée (Murakami et al., 1992; Gipson et al., 1993b; Suzuki et al., 2003). Suite à une lésion au niveau de la cornée, la sécrétion de FN est fortement accrue par les cellules épithéliales et par les kératocytes du stroma au niveau du site endommagé (Nishida et al., 1982; Fujikawa et al., 1984; Tervo et al., 1991b; Murakami et al., 1992; Anderson et al., 1996; Kang et al., 1999; Tanaka et al., 1999). Cette augmentation de la FN dans les premières phases de la cicatrisation est coordonnée avec une augmentation de l'expression de son récepteur α 5 β 1 (Murakami et al., 1992). La FN stimule l'adhésion et la migration directionnelle des cellules épithéliales cornéennes sur cette matrice provisoire en

permettant la formation de protrusions membranaires, des complexes focaux d'adhésion (présence intégrines α5β1, FAK et paxilline) et des filaments d'actine intracellulaires (Nishida et al., 1983; Nakagawa et al., 1985; Nishida et al., 1990; Murakami et al., 1992; Suzuki et al., 2003 ; Kimura et al., 2010). La FN exerce une influence positive sur l'activité du promoteur du gène α 5 dans des cellules épithéliales de cornée de lapins (CECLs) cultivées à faible densité cellulaire (sous-confluence), une condition s'apparentant à celle d'un épithélium en cicatrisation, et une influence négative sur $\alpha 5$ à haute densité cellulaire (post-confluence), une condition s'apparentant à celle d'un épithélium cicatrisé (Larouche et al., 2000 ; Vigneault et al, 2007 ; Gingras et al., 2009). La FN stimule la sécrétion de l'activateur du plasminogène de type urokinase qui convertit le plasminogène en plasmine, qui, en retour, effectue le clivage de la FN, contribuant au cycles adhésion et dé-adhésion nécessaire au mouvement cellulaire (Morimoto et al., 1993 ; Suzuki et al., 2003). La FN induit la production des MMP-2 et MMP-9 actives (Esparza et al., 1999 ; Yakubenko et al., 2000 ; Das et al., 2008 ; Sen et al., 2010), un processus dépendant des cascades de signalisation intracellulaire activées par la liaison de la FN à son récepteur, l'intégrine α5β1 (Huhtala et al., 1995; Esparza et al., 1999).

1.4.5.3.5. Remodelage de la MEC durant la cicatrisation cornéenne

La composition de la matrice extracellulaire constituant la membrane basale de l'épithélium cornéen varie durant le processus de cicatrisation de la cornée (Murakami et al., 1992 ; Anderson et al., 1996 ; Ljubimov et al., 1998 ; Tanaka et al., 1999 ; Kang et al., 1999 ; Zieske et al., 2001 ; Saika et al., 2002 ; Vigneault et al., 2007). Les constituants matriciels de la membrane basale de la cornée sont dégradés par des protéinases (MMPs et plasmine) en réponse à une lésion endommageant ou non la membrane basale tandis qu'une matrice provisoire est sécrétée et déposée sur la surface lésée (Sta Iglesia et Stepp, 2000 ; Zieske, 2001). Dans les premières heures suivant une lésion à l'épithélium cornéen, d'importantes quantités de FN sont sécrétées par les cellules épithéliales et par les kératocytes du stroma en bordure de la région endommagée (Murakami et al., 1992 ; Anderson et al., 1996 ; Kang et al., 1999). Tandis que l'expression des LMs et du CIV, constituants majeurs et normalement présents dans la membrane basale (Ljubimov et al., 1995 ;

Kabosova et al., 2007; Torricelli et al., 2013), diminue considérablement (Murakami et al., 1992; Tanaka et al., 1999). Cette matrice provisoire, majoritairement enrichie en FN, induit l'expression du gène codant la sous-unité d'intégrine $\alpha 5$ (Larouche et al., 2000 ; Gingras et al., 2003; Vigneault et al., 2007; Gingras et al., 2009) et influence la cicatrisation de l'épithélium cornéen en favorisant l'adhésion cellule-matrice via la formation de complexes focaux d'adhésion impliquant l'intégrine α 5 β 1, et en stimulant la migration directionnelle des cellules épithéliales cornéennes sur la matrice temporaire de FN pour permettre le recouvrement rapide de la lésion (Nishida et al., 1983; Nishida et al., 1990; Murakami et al., 1992; Suzuki et al., 2003; Kimura et al., 2010). Outre la FN, d'autres constituants de la matrice extracellulaire sont synthétisés et déposés à la surface du site endommagé, dont la LM-5 endogène non-tronquée, le lumican et la TN-C (Zieske, 2001). Il a été démontré que la LM-5 endogène non-tronquée (contenant les chaînes α3 de 190 kDa, β 3 de 140 kDa et γ 2 de 150 kDa) sécrétée par les cellules épithéliales cornéennes humaines favorise la migration des cellules épithéliales de la cornée via les intégrines $\alpha 3\beta 1$ et/ou α6β1 (Qin et Kurpakus, 1998; Ebihara et al., 2000; Hintermann et Quaranta, 2004). L'épithélium cornéen lésé exprime l'ARNm et la protéine du lumican après un débridement épithélial chez la souris, et ce jusqu'à guérison complète de la plaie. Un anticorps antilumican retarde la ré-épithélialisation de la cornée dans un modèle de culture d'organe ex *vivo* de souris et la cicatrisation de l'épithélium cornéen est significativement retardée dans une souris déficiente en lumican (lum^{-/-}) in vivo (Saika et al., 2000 ; Saika et al., 2002). Le lumican, sous forme d'une glycoprotéine soluble sans kératane sulfate provenant d'une membrane amniotique humaine, favorise également la ré-épithélialisation de la cornée et stimule la prolifération cellulaire dans un modèle de culture d'organe *ex vivo* de souris et accélère la cicatrisation de l'épithélium cornéen chez des souris déficientes en lumican (lum^{-/}) in vivo (Yeh et al., 2005). Ces données suggèrent que le lumican favorise la migration et la prolifération cellulaire durant la cicatrisation de l'épithélium cornéen (Saika et al., 2000; Saika et al., 2002; Yeh et al., 2005). Par ailleurs, une accumulation de TN-C (généralement absente de la membrane basale de la cornée normale et intacte) a été observée sous les cellules épithéliales migratoires qui expriment l'intégrine α 9 β 1 avec un pic à 6 jours après une lésion à l'épithélium cornéen. Le niveau de TN-C diminue ensuite progressivement jusqu'à un niveau indétectable, dans un modèle de débridement à large

étendue chez la souris, ce qui corrèle avec la prolifération cellulaire durant la restratification épithéliale (Stepp et Zhu, 1997). Dès que la lésion est recouverte, la sécrétion de FN diminue progressivement et est remplacée par une sécrétion accrue des LMs (LM-1 et LM-5) ainsi que par la réapparition du CIV pour permettre la régénération d'une membrane basale normale (Murakami et al., 1992 ; Anderson et al., 1996 ; Tanaka et al., 1999). Il a été démontré que la LM-5 exogène clivée par des protéases après sa synthèse (contenant les chaînes α 3 de 160 kDa, β 3 de 140 kDa et γ 2 de 105 kDa et présent dans la membrane basale normale) favorise l'adhésion cellulaire via l'intégrine α3β1, l'étalement cellulaire et l'assemblage des hémidesmosomes matures en association avec l'intégrine $\alpha 6\beta 4$, mais inhibe aussi la migration des cellules épithéliales cornéennes (Qin et Kurpakus, 1998; Ebihara et al., 2000; Hintermann et Quaranta, 2004). À ce stade, on croit que la LM-5 pourrait constituer un signal freinant la migration des cellules épithéliales en favorisant la dégradation par le protéasome de facteurs de transcription (FTs) indispensables à ce processus, tel que l'activateur Sp1, induisant par conséquent une baisse d'expression de nombreux gènes requis pour l'adhésion, la migration et la prolifération cellulaire (Gaudreault et al., 2007; Vigneault et al., 2007). De plus, il a été suggéré que la LM et le CIV pourraient exercer des fonctions durant les dernières phases de la cicatrisation en stimulant la différenciation et la stratification verticale des cellules épithéliales basales en cellules suprabasales (ailées et superficielles) afin de permettre au tissu de reconstruire un épithélium multicouche intact (Li et al., 2003b; Sweeney et al., 2003; Vigneault et al., 2007).

En réponse à une lésion profonde touchant le stroma, il se produit également une déposition d'une matrice provisoire par les fibroblastes/myofibroblastes durant la cicatrisation du stroma cornéen, incluant des composantes matricielles normalement absentes de la cornée centrale telles la FN, la fibrine, la TN-C, le CVIII, le CXIV et des composantes matricielles normalement présentes seulement dans la membrane basale telles la LM-1, la LM-5, le CIV et le CVII (Malley et al., 1990 ; Maguen et al., 1997 ; Ljubimov et al., 1998 ; Anderson et al., 1996 ; Tanaka et al., 1999 ; Zieske, 2001 ; Maguen et al., 2002). Il se produit également une hausse d'expression des protéoglycanes de type dermatane/chondroïtine sulfate (biglycane) dans le stroma cicatriciel accompagnée d'une baisse d'expression des
protéoglycanes de type kératane sulfate (lumican et kératocane) (Hassell et al., 1983; Carlson et al., 2003 ; Funderburgh et al., 2003 ; Hassell et Birk, 2010). Cette matrice provisoire enrichie en FN et en protéoglycanes de type chondroïtine sulfate stimule la migration et l'invasion des fibroblastes dans la région lésée du stroma riche en collagènes (Andresen et al., 2000; Schmidinger et al., 2003). Il a été démontré que la FN est également requise pour la contraction des gels de collagènes par les fibroblastes/myofibroblastes cornéens, ce qui contribue à préserver la forme de la cornée durant la guérison des plaies du stroma (Taliana et al., 2000; Liu et 2006). On a aussi observé une synthèse de nouveaux collagènes de types I et III par les fibroblastes/myofibroblastes lors du remodelage matriciel du stroma de la plaie cornéenne (Malley et al., 1990; Anderson et al., 1996; Ljubimov et al., 1998; Chen et al., 2000; Zieske, 2001; Funderburgh et al., 2003). Le stroma cicatriciel, dû à la présence de beaucoup de fibrilles de collagènes de type III (en majorité) et de type I ainsi que la présence de collagène non-fibrillaire de type IV et un enrichissement de protéoglycanes de type chondroïtine sulfate (biglycane) avec un bas niveau de protéoglycanes de type kératane sulfate, est une MEC désorganisée avec de grandes distances interfibrillaires et opaque. Suite au remodelage matriciel permettant aux fibrilles de collagènes de type III d'être remplacées par des fibrilles de types I en association avec une synthèse de niveaux élevés de protéoglycanes de type kératane sulfate (lumican et kératocane), la MEC redevient progressivement hautement ordonnée avec des fibrilles de taille régulière à espace interfibrillaire plus petit, restituant ainsi la transparence de la cornée et restaurant également une vision normale (Cintron et al, 1978 ; Hassell et al., 1983 ; Kaji et al., 1998 ; Chen et al., 2000 ; Andresen et al., 2000).

1.4.5.4. Les Intégrines

Les composantes de la MEC servent de ligands à toute une gamme de récepteurs transmembranaires appartenant à la famille des intégrines. Les intégrines font partie de la famille des molécules d'adhésion et sont impliquées dans l'ancrage des cellules entre-elles (interactions cellule-cellule) ou à la matrice extracellulaire (interaction cellule-MEC). Les



Le numero 1 mondial du mémoires

intégrines créent le lien essentiel entre les éléments du cytosquelette intracellulaire de la cellule et la MEC (Hynes, 1987 ; Hynes, 1992 ; Ruoslahti, 1996).

1.4.5.4.1. Généralités, structure et ligands des intégrines

Les intégrines sont des glycoprotéines hétérodimèriques transmembranaires de type I constituées d'une sous-unité α et d'une sous-unité β associées par liaison non covalente. À ce jour, 18 sous-unités α (α 1 à α 11, α v, α L, α M, α X, α D, α E, α IIb) et 8 sous-unités β (β 1 à β 8) ont été identifiées, celles-ci pouvant s'associer entre-elles afin de former l'une ou l'autre des 24 intégrines actuellement répertoriées (Figure 1.16) (Plow et al., 2000 ; Hynes, 2002 ; Vigneault et al., 2007 ; Barczyk et al. 2010). Les intégrines peuvent être groupées en trois familles majeures selon la composition de leurs sous-unités, dont les intégrines β 1, les intégrines β 2 et les intégrines α v (Petruzzelli et al., 1999 ; Stepp, 2006 ; Carter, 2009 ; Barczyk et al. 2010). Les membres de la famille d'intégrines β 1, présents dans la majorité des cellules des vertébrés, peuvent former des hétérodimères avec les sous-unités al jusqu'à all et leur fonction primaire consiste à moduler les interactions cellules-MEC et les interactions cellules-cellules. Les membres de la famille β^2 ($\alpha L\beta^2$, $\alpha M\beta^2$, $\alpha X\beta^2$, $\alpha D\beta^2$) sont des récepteurs spécifiques des leucocytes impliqués dans des interactions intracellulaires et ayant pour ligands principaux des molécules d'adhésion intercellulaires de type immunoglobuline telles que VCAM-1 et ICAM. Les membres de la famille d'intégrines αv sont les seuls à pouvoir lier plusieurs sous-unités β , αv pouvant ainsi mener à la formation de 5 hétérodimères différents en s'associant avec les sous-unités β_1 , β_3 , β_5 , β 6 et β 8. Il existe d'autres intégrines, dont l'intégrine α IIb β 3, présente exclusivement sur les plaquettes sanguines, l'intégrine $\alpha 6\beta 4$, qui est un composant important des hémidesmosomes, et l'intégrine $\alpha E\beta$ 7, qui constitue un récepteur spécifique des leucocytes ayant pour ligand la E-cadhérine (Petruzzelli et al., 1999; Stepp, 2006; Carter, 2009; Barczyk et al. 2010).



Figure 1.16. Les récepteurs de la famille des intégrines.

Les 24 hétérodimères d'intégrines actuellement répertoriés sont illustrés avec leurs sous-unités β (brun pâle) et α . Les sous-unités représentées dans le schéma de l'œil sont exprimées dans cet organe, tandis que les sous-unités illustrées à l'extérieur ne sont pas exprimées dans l'œil. Les couleurs des sous-unités d'intégrines α illustrent leur ligand principal, soit en vert pâle celles reconnaissant le motif RGD dans la FN, en mauve celles reconnaissant le motif LDV et ses homologues dans la FN, en rouge celles se liant aux collagènes et en jaune celles se liant aux laminines. Les sous-unités d'intégrines α en bleu représentent les récepteurs des leucocytes (Figure tirée de Vigneault et al., 2007).

Les sous-unités $\alpha\beta$ des intégrines possèdent un large exodomaine extracellulaire en Nterminal, un domaine transmembranaire ainsi qu'un court domaine cytoplasmique intracellulaire en C-terminal (Figure 1.17) (Arnaout et al., 2005 ; Srichai et Zent, 2010 ; Campbell et Humphries, 2011). La partie extracellulaire des sous-unités α est composée d'un domaine α I (pour 9 des 18 sous-unités α), d'un domaine en forme d'hélice β à 7 lames (' β -propeller'), d'un domaine '*tight*' et de deux domaines '*calf*' (Xiong et al., 2001 ; Arnaout et al., 2005 ; Xie et al., 2010b ; Campbell et Humphries, 2011). Les sous-unités $\alpha1$, $\alpha2$, $\alpha10$, $\alpha11$, α L, α M, α X, α D et α E possèdent un domaine α I (ou domaine α A) inséré sur la face supérieure entre les lames 2 et 3 de l'hélice β à 7 lames (' β -propeller') qui est le site spécifique de liaison du ligand. Ce domaine α I contient aussi un site crucial d'adhérence dépendant des ions métalliques (motif MIDAS) qui lie le Mg²⁺. De plus, le domaine ' β - propeller' contient des sites potentiels de liaison pour des cations divalents comme le Ca²⁺, affectant par conséquent l'affinité de liaison de l'intégrine à son ligand (Larson et al., 1989; Lee et al., 1995; Arnaout et al., 2005; Campbell et Humphries, 2011). La partie extracellulaire des sous-unités β est composée d'un domaine β I (ou domaine β A), d'un domaine PSI (plexin/semaphorin/integrin), d'un domaine hybride, de quatre modules EGF riches en résidus cystéines et d'un domaine β TD (*'membrane proximal \beta tail domain'*) (Xiong et al., 2001; Arnaout et al., 2005; Xie et al., 2010b; Campbell et Humphries, 2011). Le domaine β I contient un site MIDAS liant le Mg²⁺, un site adjacent à MIDAS (ADMIDAS) liant un ion Ca²⁺ inhibiteur, et un site de liaison synergique des ions métalliques (SyMBS) liant le Ca²⁺ qui sont impliqués dans la liaison du ligand. Pour les sous-unités α ne possédant pas de domaine α I, dont α 3, α 4, α 5, α 6, α 7, α 8, α 9, α v et α IIb, la liaison du ligand se fait au niveau de l'interface entre le domaine ' β -propeller' de la sousunité α et le domaine β I de la sous-unité β . La liaison ligand/intégrine dépend des cations divalents, dont le Mg²⁺, Mn²⁺ et Ca²⁺. Cette liaison nécessite également un résidu aspartate ou glutamate au niveau du ligand pour coordonner la liaison des cations divalents (Xiong et al., 2002; Humphries et al., 2003; Arnaout et al., 2005; Zhu et al., 2008; Xie et al., 2010b ; Campbell et Humphries, 2011). Les courtes queues cytoplasmiques des sous-unités α sont divergentes, tandis que celles des sous-unités β sont homologues. Dans les courtes régions cytoplasmiques au niveau des régions juxta-membranaires, les séquences conservées GFFKR de la sous-unité α et LLxxIHDR(R/K)E de la sous-unités β interagissent pour former un pont salin entre l'arginine (R) de la sous-unité α et l'acide aspartique (D) de la sous-unité β , permettant de préserver la forme inactive et jouant un rôle dans la régulation de l'activation des intégrines (Vinogradova et al., 2002 ; Weljie et al., 2002 ; Arnaout et al., 2005). Les régions cytoplasmiques des sous-unités β possèdent deux motifs conservés pouvant être liés par les domaines PTB ('phosphotyrosine-binding *domain'*) des protéines du cytosquelette liant les queues β des intégrines, soit : le motif NpxY proximal à la membrane lié par la taline (Garcia-Alvarez et al., 2003 ; Wegener et al., 2007 ; Wegener et Campbell, 2008) et le motif NxxY distal à la membrane lié par la kindline (Moser et al., 2008; Harburger et al., 2009).



Figure 1.17. Représentation schématique de la structure des intégrines.

Les intégrines sont des hétérodimères transmembranaires constitués d'une sous-unité α (en bleu-turquoise) et d'une sous-unité β (en rouge-rose) associées par liaison non covalente. Dans leur forme inactive, les intégrines ont une conformation repliée avec leurs régions cytoplasmiques (pont salin) et transmembranaires étroitement associées. Dans leur forme active, les intégrines ont une conformation dépliée et étendue avec une séparation des régions cytoplasmiques et transmembranaires et une extension des domaines extracellulaires exposant le site de liaison au ligand. Pour les sous-unités α possédant un domaine αI , celui-ci est le site de liaison au ligand. Pour les sous-unités α ne possédant pas de domaine αI , le site de liaison du ligand est au niveau de l'interface entre le domaine β -propeller de la sous-unité α et le domaine βI de la sous-unité β (Figure inspirée de Campbell et Humphries, 2011).

La partie extracellulaire de la sous-unité α est donc principalement impliquée dans la spécificité de liaison du ligand à l'intégrine (Humphries et al., 2003 ; Arnaout et al., 2005). La région cytoplasmique de la sous-unité α intervient dans la régulation de la fonction de l'intégrine en modulant les interactions des protéines cytoplasmiques avec son domaine cytoplasmique ou avec celui de la sous-unité β , ces interactions pouvant aussi être signalétiques (Liu et al., 2000 ; Giancotti, 2000). La partie extracellulaire de la sous-unité β joue également un rôle dans l'affinité et la stabilité de la liaison du ligand (Humphries et al., 2003 ; Arnaout et al., 2005). La région cytoplasmique de la sous-unité β peut se lier à

des protéines du cytosquelette telles la taline, la filamine, la vinculine, la kindline et l'aactinine, permettant une connexion avec les filaments du cytosquelette d'actine (Giancotti et Ruoslahti, 1999; Liu et al., 2000; Van der Flier et Sonnenberg, 2001; Brakebusch et Fässler, 2003). À l'exception de l'intégrine $\alpha 4\beta 6$, la sous-unité $\beta 4$ est liée aux filaments intermédiaires de kératine par l'intermédiaire des protéines d'ancrage intracellulaires telles que la plectine et la dystonine (BP230) (Gipson, 1992 ; Jones et al., 1998 ; Nievers et al., 1999 ; Van der Flier et Sonnenberg, 2001). Le domaine cytoplasmique de la sous-unité β est donc important dans l'adhésion cellulaire et s'avère nécessaire afin de cibler les intégrines aux zones d'adhésion focale. La queue cytoplasmique de la sous-unité β , en plus de promouvoir la liaison avec le cytosquelette d'actine, est particulièrement importante dans l'activation des voies de signalisation intracellulaires impliquant des protéines de signalisation dont FAK ('Focal Adhesion Kinase'), la protéine tyrosine kinase Src et ILK ('integrin-linked kinase') et des protéines adaptatrices telles que la paxilline, GRB2 ('growth factor receptor-binding protein 2') et la protéine adaptatrice Shc (Giancotti et Ruoslahti, 1999; Liu et al., 2000; Van der Flier et Sonnenberg, 2001; Brakebusch et Fässler, 2003).

Les intégrines sont des protéines transmembranaires subissant une régulation allostérique, donc pouvant changer de conformation suite à la liaison des ligands extracellulaires et/ou des protéines du cytosquelette intracellulaires permettant de passer d'un état inactif à un état actif et inversement (Figure 1.17). Dans leur forme inactive, les intégrines ont une conformation repliée avec leurs régions cytoplasmiques et transmembranaires étroitement associées. Dans la portion extracellulaire, les jambes de l'hétérodimère sont repliées et la tête globuleuse de l'hétérodimère est située près de la membrane plasmique, ce qui défavorise la liaison du ligand. Dans leur forme active, les intégrines ont une conformation dépliée et étendue avec une séparation des régions cytoplasmiques et transmembranaires et une extension des domaines extracellulaires exposant le site de liaison au ligand (Arnaout et al., 2005 ; Luo et al., 2007 ; Campbell et Humphries, 2011). La tête globuleuse de l'hétérodimère $\alpha\beta$ contenant le site de liaison au ligand, en particulier le domaine α I (pour 9 intégrines) et les domaines β I/hybride, peut subir des changements de conformation majeurs affectant l'affinité de liaison du ligand. Les domaines I peuvent être présents sous forme fermée (faible affinité) ou sous forme ouverte (haute affinité) (Xiao et al. 2004 ; Arnaout et al., 2005 ; Luo et al. 2007 ; Xie et al., 2010b). Les protéines intracellulaires taline et kindline, qui se lient aux motifs NxPY des queues cytoplasmiques de la sous-unité β , déstabilisent le pont salin α - β et permettent ainsi la séparation des régions cytoplasmiques et transmembranaires, ce qui va entrainer un changement de conformation des parties extracellulaires vers celle étendue et mener à l'activation des intégrines (Calderwood et al., 2002 ; Tadokoro et al., 2003 ; Moser et al., 2009). Les intégrines activées vont lier leur ligand et cette liaison va conduire à l'assemblage des intégrines (*'clustering'*) permettant la formation des adhésions focales, l'assemblage du cytosquelette d'actine et l'activation des voies de signalisation intracellulaires (Giancotti et Ruoslahti, 1999 ; Legate et al., 2009 ; Srichai et Zent, 2010).

Chaque intégrine se lie à un répertoire spécifique de ligands, incluant des protéines de la MEC (collagènes, FN, LMs, TN-C, vitronectine), des composantes du système de coagulation sanguine (fibrinogène, iC3b), des molécules d'adhésion intercellulaires de type immunoglobuline (ICAM, VCAM-1, MAdCAM-1) et la protéine d'adhésion transmembranaire E-cadhérine (Figure 1.16 et Tableau 1.2). Certaines intégrines ne se lient qu'à un seul type de ligand alors que d'autres ont une spécificité plus large et peuvent ainsi s'associer à plusieurs ligands. Un ligand peut être reconnu par plusieurs intégrines différentes. Les intégrines $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 10\beta 1$ et $\alpha 11\beta 1$ sont des récepteurs primaires des collagènes et leur site de liaison au ligand est leur domaine al responsable de la reconnaissance du motif GFOGER présent dans les molécules de collagènes. Les intégrines $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 6\beta 4$ et $\alpha 7\beta 1$ sont des récepteurs majeurs des LMs et leur site d'interaction prototypique sont les domaines LG en C-terminal de la chaine α des molécules de LMs. Les intégrines $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 8\beta 1$, $\alpha IIb\beta 3$ et les 5 intégrines $\alpha \nu\beta$ sont des récepteurs de la FN se liant à un motif RGD présent dans la molécule de FN et leur site d'interaction est le domaine ' β *propeller*' de la sous-unité α ainsi que le domaine β I de la sous-unité β des intégrines. Les intégrines α4β1 et α4β7 lient les motifs LDV et REDV présents dans la molécule de FN tandis que les intégrines β^2 et $\alpha E\beta^7$ reconnaissent également le motif LDV présent dans leurs ligands VCAM-1 et ICAM (Plow et al., 2000; Van der Flier et Sonnenberg, 2001; Humphries et al., 2006 ; Barczyk et al. 2010).

Intégrines	Ligands (motif de reconnaissance)
α1β1	Col (GFOGER) ; LM
α2β1	Col (GFOGER) ; LM ; E-cadhérine
α3β1	LM; Col; FN (RGD); TSP; entactine
α4β1	FN (LDV, REDV, IDAPS) ; TSP ; OPN ; VCAM-1 (LDV)
α4β7	FN (LDV) ; OPN ; VCAM-1 (LDV) ; MAdCAM-1 (LDV)
α5β1	FN (RGD) ; fibrinogène (RGD)
α6β1	LM ; entactine
α6β4	LM
α7βl	LM
α8β1	FN (RGD); VN (RGD); TN-C (RGD); néphronectin
α9β1	TN-C (IDG) ; FN ; LM ; OPN ; VCAM-1 (LDV)
α10β1	Col (GFOGER)
α11β1	Col (GFOGER)
ανβ1	FN (RGD) ; VN (RGD) ; OPN
ανβ3	FN (RGD) ; fibrinogène ; VN (RGD) ; TN-C (RGD) ; OPN ; TSP ; LM ; entactine
ανβ5	FN (RGD) ; VN (RGD) ; OPN
ανβ6	FN (RGD) ; TN-C (RGD)
ανβ8	FN (RGD) ; VN (RGD)
αLβ2	ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, ICAM-4 et ICAM-5
αΜβ2	iC3b ; fibrinogène ; facteur X ; ICAM-1 et ICAM-4 ; VCAM-1 (LDV)
αΧβ2	iC3b ; fibrinogène ; ICAM-1 et ICAM-4
αDβ2	ICAM-3 ; VCAM-1 (LDV)
αΕβ7	E-cadhérine
αΠbβ3	FN (RGD) ; Fibrinogène ; VN (RGD) ; TSP

Tableau 1.2. Les 24 hétérodimères d'intégrines et leurs principaux ligands.¹

¹ Informations tirées des références suivantes : Plow et al., 2000 ; Van der Flier et Sonnenberg, 2001 ; Humphries et al., 2006 ; Barczyk et al. 2010.

Col : Collagènes, FN : Fibronectine, ICAM : 'intercellular adhesion molecule', LM : Laminines, MAdCAM : 'mucosal addressin cell adhesion molecule', OPN : ostéopontine, TSP : thrombospondine, TN-C : Ténascine-C, VN : Vitronectine, VCAM-1 : 'vascular cell adhesion molecule-1'.



Figure 1.18. Représentation schématique de l'adhésion focale.

La liaison du ligand matriciel extracellulaire à son intégrine conduit au regroupement des intégrines ('*clustering*') permettant la formation de petits agrégats d'intégrines transitoires et dynamiques regroupés au bout des filipodes et des lamillipodes qu'on désigne complexes focaux d'adhésion. Les complexes focaux d'adhésion contiennent, en plus des intégrines ($\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha \nu \beta 3$), des protéines structurales liant directement ou indirectement les filaments d'actine (taline, vinculine, kindline), des protéines adaptatrices (paxilline, p130CAS), des protéines de signalisation (FAK, Src), des protéines associées à la polymérisation de l'actine (VASP, complexe Arp2/3), la GTPase Rac et ses régulateurs. Ces complexes focaux peuvent maturer en adhésions focales (ou plaques d'adhésion), de gros agrégats stables d'intégrines situés aux extrémités des fibres de tension. Ces adhésions focales sont constituées de très nombreuses protéines dont des protéines aturcturales associées au cytosquelette (taline, kindline, vinculine, α -actinine, zyxine, tensine, parvine, filamine, myosine II), des protéines adaptatrices (paxilline, Grb2), des protéines de signalisation (FAK, Src, ILK), des régulateurs de la polymérisation de l'actine (formine mDia1), la GTPase RhoA et ses régulateurs. Des adhésions fibrillaires peuvent être observées sur des matrices fibrillaires de fibronectine. Les adhésions fibrillaires sont appauvries en taline, paxilline, α -actinine mais enrichies en tensine et intégrine $\alpha 5\beta 1$ (Zamir et Geiger, 2001 ; Clainche et Carlier, 2008 ; Legate et al., 2009).

1.4.5.4.2. Les fonctions des intégrines

Les intégrines exercent deux fonctions principales : elles permettent : i) l'adhésion cellulaire et ii) la signalisation cellulaire. Les intégrines sont impliquées dans les adhésions cellule-MEC. En effet, le premier rôle des intégrines est d'établir le lien entre la MEC à l'extérieur et le cytosquelette d'actine à l'intérieur de la cellule (Hynes, 1992 ; Hynes,

2002). La liaison du ligand matriciel extracellulaire à son intégrine conduit au regroupement des intégrines ('clustering') permettant la formation de petits agrégats d'intégrines transitoires et dynamiques regroupés au bout des filipodes et des lamillipodes qu'on désigne complexes focaux d'adhésion. Ces complexes focaux peuvent maturer en adhésions focales (ou plaques d'adhésion), de gros agrégats stables d'intégrines situés aux extrémités des fibres de tension (Zamir et Geiger, 2001 ; Clainche et Carlier, 2008 ; Legate et al., 2009 ; Geiger et al., 2009). Ces complexes d'adhésion cellulaire sont composés des intégrines ($\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$) associées à leur ligand (CI/CIV, LMs, FN), des protéines structurales associées au cytosquelette (taline, kindline, vinculine, filamine, α -actinine), des protéines adaptatrices (paxilline, GR2B) et des kinases cytoplasmiques (FAK, ILK, Src) permettant l'attachement aux filaments d'actine (Figure 1.18) (Giancotti et Ruoslahti, 1999 ; Liu et al., 2000 ; Van der Flier et Sonnenberg, 2001 ; Brakebusch et Fässler, 2003). L'intégrine $\alpha 4\beta 6$ est une exception, car celle-ci assure le lien entre la LM-5 de la membrane basale et les filaments intermédiaires de kératine des cellules épithéliales dans les hémidesmosomes (Gipson, 1992 ; Jones et al., 1998 ; Nievers et al., 1999 ; Van der Flier et Sonnenberg, 2001). Certaines intégrines sont impliquées également dans les adhésions cellule-cellule (Larjava et al., 1990 ; Symington et al., 1993).

Les intégrines jouent un rôle central dans la signalisation cellulaire. La signalisation par les intégrines est bidirectionnelle, c'est-à-dire qu'elles peuvent transmettre un signal de l'intérieur vers l'extérieur (signalisation *'inside-out'*) ou de l'extérieur vers l'intérieur (signalisation *'outside-in'*) (Hynes, 2002 ; Delon et Brown, 2007 ; Harburger et Calderwood, 2009 ; Legate et al., 2009). Des signaux intracellulaires sont capables de moduler l'état d'activation des intégrines et donc leur affinité pour leurs ligands extracellulaires, ce qui permet de réguler l'assemblage et l'organisation de la MEC, le regroupement des intégrines (*'clustering'*) pour former les adhésions focales et les réponses cellules-cellules (Hughes et Pfaff, 1998 ; Calderwood et al., 2000 ; Calderwood, 2004). L'activation des intégrines est un exemple de signalisation *'inside-out'*. Les liaisons des protéines taline et kindline aux domaines cytoplasmiques des sous-unités β des intégrines provoquent un changement de conformation, qui passe d'un état inactif à un état actif, ce qui permet la liaison du ligand à un site de haute affinité (Calderwood et al., 2002 ;

Tadokoro et al., 2003 ; Moser et al., 2009). Les messagers intracellulaires PIP₂ ('Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate') peuvent réguler l'activation de la taline et donc activer les intégrines (Martel et al., 2001 ; Goksoy et al., 2008). La liaison du ligand de la matrice extracellulaire aux intégrines permet la génération des adhésions focales, l'assemblage et la réorganisation du cytosquelette d'actine ainsi que la transmission d'une grande variété de signaux intracellulaires (signalisation 'outside-in') modulant différents comportements cellulaires dont l'adhésion, la migration, la morphologie, la polarité, la prolifération, l'apoptose ou la survie, la différenciation et la modification de l'expression des gènes (Giancotti et Ruoslahti, 1999 ; Hynes, 2002 ; Lee et Juliano, 2004 ; Legate et al., 2009). Par conséquent, il n'est donc pas surprenant que les intégrines soient impliquées dans une multitude de processus physiologiques et pathologiques, dont le maintien de l'intégrité tissulaire, le développement, l'inflammation, la cicatrisation des plaies, le remodelage tissulaire, la transformation oncogénique, la croissance des cellules tumorales et la formation des métastases (Albelda, 1991 ; Clark et Brugge, 1995 ; Gahmberg et al., 1998 ; Berman et Kozlova, 2000 ; Danen, 2005 ; Jin et Varner, 2004 ; Kuphal et al., 2005 ; Vigneault et al., 2007 ; Carter, 2009 ; Koivisto et al., 2014).

1.4.5.4.3. Les voies de signalisation intracellulaires modulées par les intégrines

La liaison de ligands matriciels aux intégrines permet le regroupement des intégrines et la création des adhésions focales, formant un complexe dynamique composé de plus de 150 protéines intracellulaires structurales, adaptatrices et de signalisation. Ce complexe multiprotéique permet la réorganisation du cytosquelette d'actine et une signalisation intracellulaire (*'outside-in'*) qui, en retour, exerce un impact sur l'expression génique et le comportement cellulaire (Liu et al., 2000 ; Van der Flier et Sonnenberg, 2001 ; Zaidel-Bar et al. 2007 ; Legate et al., 2009). La FAK (*'Focal Adhesion Kinase'*) est un élément important dans l'intégration de la signalisation par les intégrines et/ou des facteurs de croissance/cytokines. Les liaisons entre les intégrines et leurs ligands permettent l'activation de FAK par autophosphorylation sur le résidu Tyr397 et la liaison du domaine SH2 de la tyrosine kinase Src. Ce complexe de kinases FAK-Src actif permet le

Rapport-gratuit.com 🏹 Le numero 1 mondial du mémoires

recrutement de d'autres protéines adaptatrices et kinases contribuant à l'activation en cascade de plusieurs voies de signalisation intracellulaires (Figure 1.19) : la voie MAPK ERK1/2 ('Extracellular signal-Regulated Kinase'), la voie JNK ('c-Jun N-terminal *Kinase'*) et la voie PI3-Kinase/Akt modulant la survie, la migration, la prolifération et la différenciation cellulaire en affectant la régulation transcriptionnelle des gènes impliqués dans ces processus (Giancotti et Ruoslahti, 1999 ; Juliano, 2002 ; Cornillon et al., 2003 ; Lee et Juliano, 2004 ; Legate et al., 2009 ; Srichai et Zent, 2010). Par exemple, l'activation de ERK1/2 par phosphorylation permet sa translocation au noyau où cette kinase favorise la phosphorylation de divers facteurs de transcription dont Sp1, ELK, c-Jun (AP-1), c-Myc et PEA3 (Ets) affectant ainsi l'expression des gènes cibles impliqués dans le comportement cellulaire (Whitmarsh et al., 1995; Hill et Treisman, 1995; Treisman, 1996; O'Hagan et al., 1996; Fukunaga and Hunter, 1997; Larouche et al., 2000; Jin et al., 2011). Ce complexe FAK-Src permet également l'activation des Rho GTPases (Rac, Cdc42 et RhoA) modulant la réorganisation du cytosquelette d'actine et qui exerce des influences régulatrices sur l'adhésion, la motilité et la polarité cellulaire (Boudreau et Jones, 1999 ; Juliano, 2002; Giancotti et Ruoslahti, 1999; Lee et Juliano, 2004; Legate et al., 2009; Srichai et Zent, 2010).

1.4.5.4.4. Modification de l'expression des intégrines durant la cicatrisation cornéenne

Des études ont rapporté l'expression des sous-unités d'intégrines $\beta 1$, $\beta 4$, $\beta 5$ ainsi que $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha 9$ et αv dans l'épithélium cornéen. Les principaux récepteurs pour les collagènes à la surface des cellules épithéliales cornéennes sont les intégrines $\alpha 2\beta 1$ et $\alpha 3\beta 1$; ceux pour les laminines sont $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$ et $\alpha 6\beta 4$; et ceux pour la FN sont $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha v\beta 1$, $\alpha v\beta 5$ ainsi que $\alpha v\beta 6$ et $\alpha 9\beta 1$ (présentes seulement chez l'épithélium lésé) (Tervo et al., 1991a; Lauweryns et al., 1991; Paallysaho et al., 1992; Stepp et al., 1993; Maldonado and Furcht, 1995b; Stepp et al., 1995; Stepp, 2006; Vigneault et al., 2007; Carter, 2009). Les intégrines $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$ et $\alpha 5\beta 1$, avec leurs ligands respectifs (CI/CIV, LM-5 et FN, respectivement), sont des composantes des complexes focaux d'adhésion lors de la migration des cellules épithéliales (Carter et al., 1990; Suzuki et al., 2003). L'intégrine

 α 6β4 liant la LM-5 est un composant des hémidesmosomes matures (Stepp et al., 1990 ; Jones et al., 1991 ; Gipson, 1992 ; Baker et al., 1996 ; Aumailley et al., 2003). Les intégrines α2β1 et α3β1 sont impliquées dans les interactions cellules-cellules nécessaires pour maintenir l'intégrité de l'épithélium (Larjava et al., 1990 ; Symington et al., 1993). Les kératocytes du stroma cornéen expriment, quant à eux, les intégrines αvβ3, α2β1, α3β1, α4β1, α6β1 et les fibroblastes/myofibroblastes en culture ou dans le stroma lésé expriment, en plus, l'intégrine α5β1 (Masur et al., 1993 ; Jester et al., 1994 ; Stepp, 2006 ; Carter, 2009).



Figure 1.19. Voies de signalisation intracellulaire activées par les intégrines.

Représentation schématique des principales voies de signalisation intracellulaire (outside-in) activées par les intégrines suite à la liaison de leur ligand matriciel dont la voie JAK/STAT (en mauve), la voie MAPK ERK1/2 (en bleu), la voie JNK (en orange) et la voie PI3K/Akt (en vert) modulant la survie, la migration, la prolifération et la différenciation cellulaire. L'activation de ERK1/2 permet sa translocation au noyau où cette kinase favorise la phosphorylation (P) de divers facteurs de transcription dont Sp1, c-Jun/c-Fos affectant l'expression des gènes cibles impliqués dans le comportement cellulaire. (Figure fournie par K. Zaniolo)

Il se produit d'importants changements au niveau de la composition de la MEC durant le processus de cicatrisation cornéenne et ce remodelage matriciel s'accompagne également par des changements similaires dans l'expression de plusieurs sous-unités d'intégrines exprimées à la surface des cellules épithéliales de la cornée, dont $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha 9$, αv , $\beta 4$ et $\beta 6$. En effet, l'augmentation de la synthèse des composantes FN, TN-C et LMs qui se produit durant la guérison des plaies cornéennes est aussi coordonnée avec une expression considérablement accrue de leurs récepteurs tels, a5\beta1 (FN), a9\beta1 (TN-C), a6\beta1 et a6\beta4 (LMs) (Lauweryns et al., 1991; Murakami et al, 1992; Stepp and Zhu, 1997). De hauts niveaux d'a5 ont été observés à la surface des cellules épithéliales de la cornée au front de migration lors de la cicatrisation (Nishida et Tanaka, 1996), l'intégrine α5β1 et son ligand (FN) faisant partie des complexes d'adhésion focaux lors de la migration (Suzuki et al., 2003). L'intégrine α5β1 a également été montrée comme présente durant la cicatrisation cornéenne après une kératectomie radiaire (Garana et al., 1992). L'expression des sousunités d'intégrines $\alpha 6$, $\alpha 9$ et $\beta 4$ est étroitement associée à la guérison des plaies cornéennes puisque leur expression augmente, tant au niveau de leurs ARN messagers (ARNm) que des protéines qu'ils encodent, dans un modèle de débridement des plaies (Stepp et al., 1996 ; Stepp et Zhu, 1997). Dans un modèle de cicatrisation utilisant une cornée humaine reconstruite, il se produit une augmentation de l'expression de l'intégrine $\alpha\nu\beta6$ dans les cellules basales de l'épithélium en migration (Carrier et al., 2008). Après une kératectomie ou un débridement épithélial, l'expression de avß6 est augmentée dans l'épithélium en migration (Hutcheon et al., 2005; Blanco-Mezquita et al., 2011) et les souris déficientes en avß6 présentent des défauts sévères dans la régénération de la membrane basale et l'assemblage des hémidesmosomes matures (Blanco-Mezquita et al., 2011). Les changements d'expression des sous-unités d'intégrines $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha 9$, αv , $\beta 4$ et $\beta 6$ durant la cicatrisation cornéenne, en association avec le remodelage de la MEC (leurs ligands FN, LM, TN-C, collagènes), suggèrent que ces intégrines exercent des fonctions clés durant la guérison des plaies cornéennes.

1.5. Intégrine α5β1

1.5.1. Généralités

L'intégrine a5\beta1 est composée d'une sous-unité a5 de 1008 acides aminés et d'une sousunité β 1 de 778 acides aminés. Les sous-unités α 5 et β 1 possèdent un domaine extracellulaire volumineux, un domaine transmembranaire et un court domaine cytoplasmique (Argraves et al., 1987). L'intégrine α 5 β 1 est dépourvue d'un domaine α I ; l'interface entre le domaine ' β -propeller' de la sous-unité $\alpha 5$ et le domaine βI de la sousunité ß1 constitue donc son site de liaison du ligand (Mould et al., 1997 ; Mould et al., 2003). Le seul ligand de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ est la FN (Pytela et al., 1985) et l'interaction intégrine α5β1/FN à haute affinité s'effectue via plusieurs séquences localisées dans la molécule de FN, soit le motif RGD dans le module ¹⁰FN3 (Pytela et al., 1985 ; Koivunen et al., 1993) et le site synergique PHSRN dans le module ⁹FN3 (Nagai et al., 1991 : Aota et al. 1994 ; Mould et al., 1997 ; Mould et al., 2003). La sous-unité β1 se lie au motif RGD et la sous-unité α5 au site synergique PHSRN (Mould et al., 1997; Mould et al., 2003). L'interaction intégrine $\alpha 5\beta 1/FN$ est régulée par les cations divalents, dont le Mg²⁺ et Mn²⁺ qui favorisent la liaison du ligand à cette intégrine alors que le Ca²⁺ réprime la liaison (Mould et al., 1995). Plusieurs tissus expriment l'intégrine α 5 β 1, incluant la peau, les poumons, le foie, les reins, le pancréas, les intestins, le cortex cérébral, la rate, les amygdales, le muscle cardiaque, les vaisseaux sanguins, les nerfs périphériques et les yeux (Sincock et al., 1997). Au niveau de l'œil, l'intégrine α5β1 est exprimée dans la chambre antérieure, la choroïde, la conjonctive, la cornée, le cristallin et la rétine (Vigneault et al., 2007). Différentes études ont rapporté l'expression des sous-unités d'intégrines $\alpha 5$ et $\beta 1$ dans l'épithélium cornéen (Tervo et al., 1991a ; Lauweryns et al., 1991 ; Paallysaho et al., 1992; Stepp et al., 1993; Maldonado and Furcht, 1995a; Maldonado and Furcht, 1995b; Stepp et al., 1995; Stepp, 2006; Vigneault et al., 2007; Carter, 2009).

1.5.2. Les fonctions de l'intégrine α5β1

La liaison de l'intégrine α 5 β 1 à la FN est impliquée dans plusieurs processus biologiques incluant l'assemblage de la matrice fibreuse de FN (Fogerty et al., 1990 ; Pankov et al., 2000 ; Danen et al., 2002), l'organisation du cytosquelette d'actine (Nakagawa et al., 1985 ; Danen et al., 2002), l'adhésion cellulaire (Akiyama et al., 1989 ; Hynes, 1992), la migration cellulaire (Kim et al., 1992 ; Urbich et al., 2002 ; Suzuki et al., 2003), la prolifération cellulaire (Symington, 1995 ; Kuwada et Li, 2000 ; Mettouchi et al., 2001), la survie/apoptose cellulaire (Zhang et al., 1995 ; Pulai et al., 2002), le maintien du l'intégrité tissulaire (Robinson et al., 2003 ; Robinson et al., 2004), le développement (Yang et al., 1993a) et la cicatrisation des plaies (Murakami et al., 1992 ; Stepp et al., 1993 ; Suzuki et al., 2003). Dans le cas de la cicatrisation de l'épithélium cornéen, par exemple, l'intégrine α 5 β 1 liée à la FN favorise l'adhésion et la migration des cellules épithéliales sur la matrice temporaire de FN par l'intermédiaire des cycles de formation et de déformation de complexes focaux d'adhésion, permettant la motilité cellulaire (Nishida et al., 2010).

1.5.3. Le gène de la sous-unité d'intégrine α5

Le gène humain de la sous-unité d'intégrine α 5 (ITGA5) code pour un ARNm d'environ 3200 nucléotides traduit en une protéine mature de 1008 acides aminés (Argraves et al., 1987). La caractérisation du promoteur du gène α 5 (Figure 1.20) indique que ce dernier est très riche en résidus GC (70%) et qu'il ne possède pas de boîtes TATA et CCAAT. Il possède un site majeur d'initiation de la transcription (position +1) et un élément initiateur (Inr) (Birkenmeier et al, 1991). Le promoteur α 5 contient des sites potentiels de liaison à l'ADN pour plusieurs facteurs de transcription (FTs) tels: Sp1 (positions -93/-98), AP-1 (positions -45/-51), Ets (positions -297/-302) et AP-2 (positions +77/+84) (Birkenmeier et al, 1991). Les sites pour Sp1 (-52/-60) et AP1 (-45/-51) ont été démontrés comme étant occupés dans le promoteur α 5 par ces FTs *in vitro* et ceux-ci exercent des effets positifs sur son activité transcriptionnelle (Corbi et al., 2000 ; Larouche et al., 2000 ; Gingras et al., 2009). C/EBP α et C/EBP β (*CCAAT/enhancer binding protein*') peuvent se lier au promoteur du gène α 5 in *vitro* entre les positions -66/-73 (Corbi et al.,

2000). Par ailleurs, KGF induit l'expression du gène α 5 par phosphorylation de C/EBP β favorisant ainsi sa liaison au site C/EBP (-66/-73) dans un épiderme reconstruit stratifié (Koria et Andreadis, 2007). Cependant la surexpression de C/EBP α ou C/EBP β active l'activité du promoteur $\alpha 5$ dans des cellules de carcinome hépatocellulaire (*HepG2 cells*), mais réprime l'activité de ce promoteur dans des kératinocytes humains en culture primaire, cet effet négatif étant modulé par un ou des sites distincts non identifiés ainsi que par interactions avec d'autres protéines régulatrices (Corbi et al., 2000). On a également démontré que Pax-6 peut se lier au promoteur du gène a5 in vitro (dans la région -672/-701) et exercer une influence positive sur l'activité de ce promoteur (Duncan et al., 2000). Il a également été rapporté que Ets-1 augmente l'expression de la sous-unité α5 (Kita et al., 2001) bien que son site de liaison sur le promoteur α 5 demeure toujours inconnu. Certains travaux réalisés dans notre laboratoire ont permis d'identifier un élément de réponse à la FN (FRE : 'FN responsive element') composé d'une séquence parfaite inversée répétée (5'-GGAGTTTG-3') et situé entre les positions -82 et -56 sur le promoteur basal du gène $\alpha 5$. Cette région contient un site de liaison proximal pour Sp1 (-50/-71) qui serait responsable de l'influence positive de la FN sur l'activité du promoteur α5 (Larouche et al., 2000). Sp1 et Sp3, deux régulateurs positifs, interagissent directement avec ce site proximal aux positions -71 à -50 (GGCAAACTCCTCCCGCGTTGA), mais aussi avec un site distal localisé aux positions -117 à -101 (CCGCCAGCCCCTCGGC) (Gingras et al., 2003). Des sites de liaison avec une séquence cible TGAGTCA pour AP-1 (-45/-51) et une séquence cible TTGGCA pour NFI (-67/-71) ont également été identifiés dans l'élément FRE (Gingras et al., 2009). AP-1 et Sp1 fonctionnent comme des activateurs de l'expression du gène α 5 tandis que NFI est un répresseur de ce gène (Corbi et al., 2000 ; Larouche et al., 2000 ; Gingras et al., 2003 ; Gingras et al., 2009). Par ailleurs, la coopération entre les FTs Sp1 et ZEB2 ('Zinc E-box Binding factor 2') a été démontrée comme étant importante pour moduler l'expression du gène α5 durant la transition épithéliale-mésenchymateuse des cellules cancéreuses lors de l'invasion, un processus qui est aussi impliqué dans la cicatrisation des plaies (Nam et al., 2012 ; Nam et al., 2014). Le 17β -estradiol (E2), en se liant au récepteur de l'oestrogène alpha (ERa: 'estrogen receptor alpha'), augmente l'expression du gène α 5 par interaction du récepteur ER α avec un site Sp1 riche en résidus GC (-399/-404) situé à proximité d'un élément de réponse aux oestrogènes (ERE : '*estrogen responsive element*') présent dans le promoteur de ce gène (-388/-393), ce qui réduit la motilité cellulaire et l'invasion des cellules cancéreuses du sein ERα-positives (Sisci et al., 2010). Le coactivateur transcriptionnel SRC-1 ('*Steroid receptor coactivator-1*') augmente également l'expression du gène ITGA5 en collaboration avec c-Jun liant un site AP-1 proximal sur le promoteur de ce gène, ce qui favorise l'adhésion et la migration des cellules cancéreuses du sein (Quin et al., 2011).



Figure 1.20. Organisation du promoteur du gène de la sous-unité d'intégrine a5.

A) Représentation schématique des sites de liaison pour les facteurs de transcription (FTs) qui exercent une influence sur l'activité transcriptionnelle du promoteur α 5. Plusieurs séquences cibles pour des FTs ont été identifiées sur le promoteur α 5, dont Sp1/Sp3 (en vert pâle), NFI (en bleu pâle), AP-1 (en rose) et Pax-6 (en gris). La coopération entre les FTs Sp1 et ZEB2 (en mauve) a également été démontrée dans la modulation de l'expression du gène α 5. La position de chacun de ces sites de liaison est indiquée sur le schéma. L'élément de réponse à la FN (FRE) entre les positions -82 et -56 sur le promoteur α 5 est également illustré sur le schéma (Figure inspirée de Vigneault et al., 2007). B) Les séquences cibles identifiées pour la liaison de Sp1/Sp3, NFI et AP-1 sont représentées sur la séquence d'ADN du promoteur α 5 (Figure adaptée de Gingras et al., 2009).

1.5.4. Le gène de la sous-unité d'intégrine β1

Le gène humain de la sous-unité d'intégrine β 1 (ITGB1) code pour un ARNm de 2394 nucléotides menant à la production d'une protéine mature de 778 acides aminés (Argraves et al., 1987). Le gène ITGB est régulé par deux promoteurs indépendants, un proximal et un distal, séparés par 261 nucléotides (Cervella et al., 1993). Les deux régions promotrices sont très riches en résidus GC et sont dépourvus de boîtes TATA et/ou CCAAT. L'expression du transcrit à partir du promoteur distal est ubiquitaire et vingt fois plus élevé que celui démarrant au promoteur proximal. Ces promoteurs contiennent plusieurs sites de liaison potentiels pour des FTs tels que plusieurs sites pour Sp1, 3 sites pour AP-1 et 3 sites pour NFI (Cervella et al., 1993 ; Vigneault et al., 2007). Pax-6 peut se lier au promoteur du gène β1 in vitro (dans région -1398/-1358 du promoteur distal) et exercer une influence positive sur l'activité de celui-ci (Duncan et al., 2000 ; Chauhan et al., 2002). Le FT N-myc agit comme un répresseur de la transcription du gène β1 dans des cellules provenant d'un neuroblastome (Judware et Culp, 1995 ; Judware et Culp, 1997). Il est à noter que deux sites potentiels pour la liaison de N-myc, un site consensus (E-box : CACGTG) et un second site non consensus (CATGCG), ont été identifiés dans le promoteur du gène β 1 (Judware et Culp, 1997). Il a également été rapporté que SIPA1 nucléaire ('signal-induced proliferation-associated protein 1') interagit indirectement avec le promoteur de la sousunité ß1 et active la transcription de cette sous-unité d'intégrine, ce qui contribue à la régulation de la migration et de l'invasion des cellules cancéreuses du sein via la voie de signalisation FAK/Akt-MMP9 (Zhang et al., 2015). La radiation ionisante induit la progression d'un phénotype invasif dans un modèle de culture de cellules cancéreuses du sein dans une MEC 3D riche en LM via la translocation nucléaire et la liaison du facteur NF- κ B sur sa séquence cible (GGGAGGCCCC) présente dans le promoteur du gène β 1 aux positions -87 à -96, ce qui est associé à une augmentation de l'expression de la sous-unité d'intégrine ß1 (Ahmed et al., 2013 ; Nam et al., 2013). Il a été démontré que l'hypoxie stimule l'expression du gène ITGB1 dans des fibroblastes du colon par l'intermédiaire du FT HIF ('hypoxia-inducible factor') liant son site potentiel de liaison (5'-CACGTGG-3') localisé aux positions -548 à -555 par rapport au site d'initiation de la transcription (Keely et al., 2009). Le FT Foxc2 ('forkhead box C2 protein') active aussi l'expression de l'intégrine ß1 par liaison directe à un élément de liaison 'forkhead' (FBE : 'Forkhead*binding element*') (-1345/-1483), ce qui induit la survie, la prolifération et la différenciation des ostéoblastes (Park et al., 2011).

1.5.5. La régulation de l'expression de l'intégrine α5β1

L'expression de la sous-unité β 1 est modulée par le facteur de croissance TGF- β dans différents types cellulaires *in vitro* (Roberts et al., 1988 ; Heino et Massagué, 1989 ; Heino et al., 1989 ; Cervella et al., 1993). Les niveaux d'ARNm contenant l'exon 1 de la sousunité β 1 provenant du promoteur proximal et du promoteur distal sont augmentés suite à l'induction par TGF- β (augmentation de 4- et 0.5 fois, respectivement) (Cervella et al., 1993). Il a été rapporté que TGF- β 1 agît par l'intermédiaire de la voie PI3K/Akt permettant l'activation par phosphorylation de IKK α/β et NF- κ B (p65 ou ReIA), ce qui augmente l'expression de l'intégrine β 1 et contribue à la migration des cellules cancéreuses de poumon (Fong et al., 2009). TGF- β 1, dérivé des ostéoblastes, active l'expression des intégrines β 1 et β 3 par l'intermédiaire de la voie de signalisation Akt, ERK, IKK α/β et NF- κ B, ce qui augmente la motilité des cellules cancéreuses du sein (Wei et al., 2008). L'expression de la sous-unité β 1 est régulée également par les composantes de la MEC, incluant la FN (Murakami et al., 1992 ; Delcommenne et Streuli, 1995). Par ailleurs, l'hypoxie semble être un régulateur positif de l'expression fibroblastique de l'intégrine β 1 par l'intermédiaire d'un mécanisme transcriptionnel dépendant de HIF (Keely et al., 2009).

Pour sa part, l'expression de la sous-unité $\alpha 5$ est modulée par différents facteurs de croissance, cytokines et facteurs neuraux. TGF- β induit l'expression de l'ARNm $\alpha 5$ dans des fibroblastes *in vitro* (Roberts et al., 1988 ; Heino et al., 1989). En présence de TGF- β , une augmentation de l'expression des sous-unités $\alpha 5$ et $\beta 1$, ainsi que de la FN a été démontrée, au niveau de l'ARNm et de la protéine, dans des ostéoblastes *in vitro* (Nesti et al., 2002). De plus, TGF- β stimule l'expression des sous-unités d'intégrines $\alpha 5$, αv et $\beta 5$ par les kératinocytes durant la ré-épithélialisation des plaies cutanées (Gailit et al., 1994). Il est intéressant de noter que TGF- β et bFGF (*'basic fibroblast growth factor'*) exercent un effet synergique sur l'expression de la sous-unité $\alpha 5$ dans des cellules endothéliales (Collo et Pepper, 1999). Par ailleurs, l'EGF stimule l'expression protéique des sous-unités

d'intégrines $\alpha 5$ et $\beta 1$ dans les cellules épithéliales de la cornée, ce qui peut expliquer l'effet positif de l'EGF sur l'adhésion à la matrice de FN et sur la migration des cellules épithéliales cornéennes (Nishida et al., 1990 ; Nishida et al., 1992c ; Maldonado et Furcht, 1995a; Suzuki et al., 2003). Pour sa part, il a été rapporté que le KGF augmente les niveaux de l'ARNm et de la protéine α 5 par phosphorylation du facteur de transcription C/EBPB dans un épiderme reconstruit stratifié (Koria et Andreadis, 2007). Par ailleurs, TNF- α accélère la transdifférenciation des monocytes en cellules de phénotype endothélial dans les tumeurs par une induction de l'expression de l'intégrine $\alpha 5$, ce mécanisme transitant par l'activation de la voie de signalisation TNFR2/NF-κB, ce qui mène à une augmentation de l'adhésion à la FN (Li et al., 2011). L'interleukine-6 augmente également l'expression des ARNm $\alpha 5$ et $\beta 1$ dans les cellules épithéliales cornéennes (Ohashi et al., 1995) suggérant ainsi que la stimulation de la migration cellulaire par IL-6 dépend d'un système fibronectine-intégrine (Nishida et al., 1992b). Par ailleurs, l'effet positif de la Substance P et de l'IGF-1 sur la migration des cellules épithéliales cornéennes pourrait s'expliquer par le fait qu'en combinaison, ces deux composés augmenteraient l'abondance des ARNm $\alpha 5$ et $\beta 1$, ainsi que la protéine $\alpha 5$ dans ces cellules (Nishida et al, 1996; Nakamura et al., 1998b ; Chimaka et al., 1999 ; Suzuki et al. 2003 ; Nishida et al., 2005).

Il a été démontré que la surexpression oncogénique du récepteur à activité tyrosine kinase ErbB2, membre de la famille des récepteurs à l'EGF (EGFR), stimule l'expression des gènes ITGA5 et ITGB1 codant l'intégrine α 5 β 1, ce qui augmente l'adhésion à la FN et promeut la survie des cellules tumorales d'un carcinome de sein ErbB2-positives sous des conditions hostiles. Cette signalisation oncogénique ErbB2 utilise le régulateur transcriptionnel HIF pour activer la transcription dirigée par le promoteur du gène α 5 (Spangenberg et al., 2006). La surexpression du récepteur ErbB2 dans des cellules ErbB2positives stimule l'expression de l'intégrine α 5 via la voie de signalisation MEK-ERK. L'intégrine α 5 est un médiateur dans le couplage des activités tyrosines kinases ErbB2 et Src qui mène à l'activation de la voie MEK-ERK, causant la répression de Bim et une résistance à l'anoikis dans des cellules épithéliales mammaires ErbB2-positives (Haenssen et al., 2010).



Le numero 1 mondial du mémoires

La cavéoline-1, une protéine transmembranaire structurale des cavéoles, est un répresseur transcriptionnel des intégrines $\alpha 5\beta 1$. Il a été démontré que la déplétion de la cavéoline-1 mène à l'activation de la voie de signalisation TGF- β /TGF- β -RI/Smad2 qui induit l'expression des intégrines $\alpha 5\beta 1$ dans des cellules et des tumeurs de type glioblastome entraînant l'acquisition d'un phénotype plus agressif (Martin et al., 2009; Cosset et al., 2012). Le perte de E-cadhérine stimule l'expression de α 5 par l'activation de la voie de signalisation EGFR/FAK/ERK1 MAPK, ce qui favorise la progression tumorale des cellules cancéreuses ovariennes (Sawada et al., 2008). L'activation oncogénique de cette voie signalétique réprime la transcription de BRM ('SWI/SNF chromatin remodeling enzyme Brahma') en augmentant l'expression du FT c-myc. Cette perte de BRM, en retour, induit, par régulation épigénétique, la transcription du FT C/EBPB, lequel active directement la transcription de l'intégrine $\alpha 5$, ce qui contribue à la transformation maligne dans le cancer du sein (Damiano et al., 2014). TMPRSS4, une sérine-protéase transmembranaire de type II, induit l'invasion et la transition épithéliale-mésenchymateuse (TEM) des cellules cancéreuses de colon via une diminution de l'expression de Ecadhérine, une augmentation de l'expression de l'intégrine $\alpha 5$ et l'activation de la voie de signalisation FAK-ERK (Kim et al., 2010b). Il a été rapporté qu'une diminution de TMPRSS4 est associée à une augmentation de l'expression du micro-ARN miR-205. En retour, miR-205 inhibe l'expression de α5 ainsi que celle des FTs ZEB1 et ZEB2, ce qui mène à une perte des caractéristiques TEM et inhibe la migration, l'adhésion à la fibronectine et la formation de métastases in vivo chez les cellules cancéreuses de poumon (Larzabal et al., 2014). Dans le même ordre d'idée, on a aussi rapporté que la transcription du gène ITGA5 pouvait être modulée négativement par le micro-ARN miR-92a, la surexpression de miR-92a inhibant l'adhésion, l'invasion, la prolifération et la dissémination péritonéale in vivo des cellules cancéreuses ovariennes par une réduction de l'expression de l'intégrine α5 (Ohyagi-Hara et al., 2013).

Un élément de réponse au PMA (*'phorbol 12-myristate 13-acetate'*), un carcinogène promoteur de tumeur, a été identifié dans le promoteur du gène α 5 entre les positions -92 et -42. Il a été démontré que le PMA augmente l'expression du gène α 5 de manière dépendante de la dose et de la durée via l'activation de la protéine kinase C dans la lignée

cellulaire humaine promonocytaire U-937, bien que les FTs impliqués n'aient pas encore été identifiés (Boles et al., 2000). Il a également été rapporté que les ligands de PPAR γ (*'peroxisome proliferator-activated receptor-* γ ') répriment l'expression du gène α 5 dans les cellules humaines NSCLC (*'non small cell lung carcinoma'*) par l'activation de ERK, provoquant ainsi une réduction de l'activité de liaison de Sp1 et AP-1 au segment -92 à -42 du promoteur α 5 (Han et al., 2005). Par ailleurs, d'autres travaux ont permis de démontrer que les inhibiteurs COX-2 répriment l'expression de l'intégrine α 5 β 1 dans les cellules NSCLC via : i) l'activation de ERK, ii) une augmentation de l'expression et de l'activité de liaison de Sp1 (dans ce cas-ci, Sp1 agit comme un répresseur), iii) une diminution de l'activité de liaison de AP-1 au segment -92 à -42 du promoteur α 5 et iv) l'inactivation de JNK (Han et Roman, 2005).

Certains travaux ont permis de démontrer que la suppression de l'expression de la FN à l'aide d'un ARN anti-sens entraine également une diminution de la synthèse des récepteurs FN et suggèrent que la FN module positivement l'expression de l'intégrine α 5 β 1, tant au niveau de l'ARNm que des protéines constituant ce récepteur (Huang et al., 1994; Rajagopal et al., 1997). Les travaux réalisés dans notre laboratoire au cours des dernières années ont permis de mieux comprendre le mode de régulation du promoteur $\alpha 5$ dans le contexte de la cicatrisation de l'épithélium cornéen. Nous avons identifié un élément de réponse à la FN (FRE) situé entre les positions -82 et -56 sur le promoteur basal du gène α5 avec la présence d'un site de liaison proximal pour Sp1 (-50/-71) qui serait responsable de l'influence positive de la FN sur l'activité de ce promoteur dans les cellules épithéliales de cornées de lapin (CECLs). Par ailleurs, l'activation de la transcription du gène α5 semble également dépendre, du moins en partie, de l'état de phosphorylation du facteur Sp1 par des protéines de la famille MAPK, telles que ERK-1 et ERK-2, ce qui affecte les propriétés de liaison à ADN de ce FT (Larouche et al., 2000). Il est intéressant de noter que l'influence de Sp1 semble dépendante de la densité cellulaire dans les CECLs (Gingras et al., 2003) ainsi que dans les cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR) (Proulx et al., 2003 ; Proulx et al., 2004). En effet, une forte activité du promoteur α 5 est observée lorsque les CECLs et les cellules de l'EPR sont sous-confluentes, tandis qu'une forte répression est observée à post-confluence (Gingras et al., 2003 ; Proulx et al., 2003 ; Proulx

et al., 2004). Les FTs Sp1, AP-1 et NFI interagissent avec leurs séquences cibles sur le promoteur du gène α 5 permettant ainsi sa régulation. À faible densité cellulaire, la FN augmente l'activité de liaison à l'ADN de ces trois FTs, mais avec une prédominance du facteur positif AP-1, ce qui permet d'expliquer la haute expression de $\alpha 5$ à sous-confluence dans les CECLs. La disparition des facteurs positifs Sp1 et AP-1 à haute densité cellulaire combinée à la liaison accrue du répresseur NFI au promoteur du gène a5 explique l'extinction de l'expression de ce gène à post-confluence en présence de FN dans les CECLs (Gingras et al., 2003; Gingras et al., 2009). Les composantes de la matrice extracellulaire (MEC), dont la FN, régulent donc l'expression de la sous-unité α5 en modifiant l'expression ou l'affinité de liaison à l'ADN des FTs qui activent, comme AP-1 et Sp1, ou qui répriment, comme NFI, la transcription de ce gène dans les cellules épithéliales de cornée (Larouche et al., 2000 ; Vigneault et al., 2007 ; Gingras et al., 2009). Il a été démontré récemment que la TN-C, le ligand de l'intégrine $\alpha 9\beta 1$, augmente l'expression du gène de la sous-unité d'intégrine a9 mais diminue simultanément l'expression du gène α5 dans des CECHs cultivées en présence de TN-C, modulant ainsi leurs propriétés adhésives et migratoires (Duval et al., 2015).

1.5.6. Les facteurs de transcription importants dans la modulation de la transcription du gène ITGA5

La régulation génique des intégrines est orchestrée par l'action combinatoire de différents FTs liant l'ADN à des séquences spécifiques au niveau du promoteur et de la région 5'-en amont des gènes qu'ils contrôlent. La modulation de la transcription du gène ITGA5 codant pour la sous-unité α 5 s'effectue dans la région du promoteur basal par les régulateurs transcriptionnels Sp1 (*'Specificity protein 1'*), AP-1 (*'Activator Protein 1'*) qui sont des activateurs de ce gène, et NFI (*'Nuclear Factor I'*), un puissant répresseur de ce gène. En effet, le promoteur basal du gène α 5 possède : i) des séquences cibles (une proximale (en position -50/-71) et une distale (-101/-117)) riches en résidus GC qui permettent la liaison de Sp1/Sp3, ii) une séquence cible (TTGGC en position -67/-71) pour les protéines appartenant à la famille NFI et iii) une séquence consensus TGAGTCA pour la liaison de AP-1 (en position -45/-51) (Corbi et al., 2000 ; Gingras et al., 2003 ; Gingras et al., 2009).

1.5.6.1. Le facteur de transcription Sp1

Sp1 fait partie du sous-groupe Sp comprenant 9 membres (Sp1 à Sp9) de la grande famille des facteurs de transcription Sp/XKLF (*'Specificity protein / Kruppel-Like Factor'*) et qui partagent tous une combinaison particulière de trois motifs en doigts de zinc de type Cys₂-His₂ formant le domaine spécifique de liaison à l'ADN de ces facteurs (Philipsen et Suske, 1999 ; Bouwman et Philipsen, 2002 ; Kaczynski et al., 2003 ; Suske et al., 2005). Sp1 se lie spécifiquement, avec haute affinité, à des séquences consensus riches en résidus GC (5'-GGGGCGGGG-3') et avec moins d'affinité à des séquences riches en GT (GGTGTGGGGG) ou aux séquences CACCC (Philipsen et Suske, 1999 ; Suske, 1999 ; Bouwman et Philipsen, 2002).

La protéine Sp1 est constituée de domaines distincts possédant des fonctions spécifiques (domaines A à D et domaine de liaison à ADN) (Figure 1.21). En N-terminal, Sp1 contient deux domaines d'activation riches en glutamines désignés domaines A et B, qui sont essentiels pour stimuler la transcription. Adjacents aux domaines A et B se trouvent également des régions riches en sérines/thréonines sujette à des modifications posttraductionnelles. Le domaine C est riche en acides animés chargés et joue un rôle dans la fonction du facteur de transcription. La boîte 'Buttonhead' dans le domaine C contribue à la transactivation potentielle d'autres FTs. La séquence putative PEST dans le domaine C est une cible potentielle pour la protéolyse induite. Le domaine de liaison à l'ADN est composé de trois motifs en doigts de zinc de type Cys₂-His₂ (ZF1, ZF2 et ZF3) qui sont requis pour la liaison spécifique au motif GC ou GT dans les régions promotrices des gènes. En C-terminal, le domaine D est nécessaire pour la formation de multimères de Sp1 (ou avec d'autres protéines) et pour l'activation synergique en collaboration avec les domaines A et B. Une boîte Sp (SPLALLAATCSR/KI) en N-terminal contient un site de clivage endoprotéolytique situé près d'une région cible pour la dégradation par le protéasome. La région inhibitrice de Sp1 est située en N-terminal (Suske, 1999 ; Bouwman et Philipsen, 2002 ; Li et al., 2004 ; Li et Davie, 2010).



Figure 1.21. Structure du facteur de transcription Sp1.

A) Sp1 possède différents domaines fonctionnels impliqués dans l'activation transcriptionnelle et identifiés A, B, C, D (marqués par des lignes noires) et un domaine de liaison à l'ADN composé de trois motifs en doigts de zinc de type Cys₂-His₂ (ZF1, ZF2 et ZF3 en boîtes noires). Les régions riches en glutamines (Q, boîte bleue pâle), les régions riches en sérines/thréonines (S/T, boîte verte pâle), les domaines d'activation (DA), le domaine d'inhibition (DI, boîte blanche), le domaine C hautement chargé (-/+, boîte bleue), la boîte Sp1 (Sp1 box en gris pâle), la boîte Buttonhead (Btd box en bleu foncé) et la séquence putative PEST (en jaune) sont représentés sur le schéma de Sp1. Les sites de modifications post-traductionnelles de Sp1, comme la phosphorylation (P), la glycosylation (Glc), la sumoylation (SUMO), l'acétylation (Ac) et l'ubiquitination (Ub) sont indiqués avec les résidus d'acides aminés (aa) modifiés (S : sérine, T : thréonine et K : lysine) (www.uniprot.org/uniprot/P08047; www.phosphosite.org; Tan et Khachigian, 2009; Chu, 2012). (Figure inspirée de Li et Davie, 2010) ; B) Représentation schématique de la structure du domaine de liaison à l'ADN des trois doigts de zinc de Sp1. Chaque doigt de zinc est composé de deux feuillets β antiparrallèles (flèches) et d'une hélice α (cylindre) liant un ion zinc (Zn) par une paire de résidus cystéines (Cys_2) provenant d'un feuillet β et une paire de résidus histidines (His₂) provenant de l'hélice α . Sp1 lie le motif riche en GC de l'ADN (5'GGGGCGGGG3') par chaque hélice α du doigt de zinc (ZF) et par l'intermédiaire des acides animés KHA dans ZF1, RER dans ZF2 et RHK dans ZF3. (Figure adaptée de Bouwman et Philipsen, 2002)

Sp1 est exprimé de facon ubiquitaire dans les cellules de mammifères (Suske, 1999 ; Saffer et al., 1991). Il est exprimé de façon différentielle lors du développement, de la progression du cycle cellulaire et de la différenciation cellulaire (Saffer et al., 1991; Grinstein et al., 2002 ; Gaudreault et al., 2003 ; Gingras et al., 2003). Sp1 est reconnue comme étant principalement un activateur de la transcription d'un grand nombre de gènes eucaryotes impliqués dans différents processus cellulaires dont la prolifération (Black et al., 2001; Wierstra, 2008), la différenciation, le développement (Zhao et Meng, 2005) et la survie/apoptose (Kavurma et al., 2001; Kavurma et Khachigian, 2003). Ce facteur module l'expression de plusieurs gènes constitutifs de type 'housekeeping' dépourvus de boîte TATA (β-globuline, SV40) (Gidoni et al., 1985; Giglioni et al., 1989). Sp1 régule également l'expression de plusieurs gènes inductibles incluant des régulateurs du cycle cellulaire permettant sa progression (cycline D1, cyclin E, Cdk2, E2F-1, c-Myc) (Nagata et al., 2001; Wierstra, 2008) ou son arrêt (p15^{INK4B}, p16^{INK4A}, p18^{INK4C}, p19^{INK4D}, p21^{WAF1/CIP1}, p27^{KIP1}, p57^{KIP2}) (Koutsodontis et al., 2002; Wierstra, 2008), ainsi que des gènes impliqués dans la biosynthèse de l'ADN (TK, DHFR) (Birnbaum et al., 1995; Rotheneder et al., 1999; Wierstra, 2008). Sp1 est un activateur transcriptionnel pour plusieurs gènes ayant un rôle majeur dans la cicatrisation des plaies dont plusieurs codent pour des intégrines (par exemple, ceux codant les sous-unités $\alpha 5$ et αy) (Vigneault et al., 2007), des MMPs (par exemple, MMP-9) (Murthy et al., 2012; Li et al., 2014a) et des protéines de la MEC (par exemple, TN-C et FN) (Shirasaki et al., 1999; Tseng et al., 2003).

La régulation de l'activité transcriptionnelle de Sp1 s'effectue par des interactions avec d'autres protéines et par des modifications post-traductionnelles. Sp1, via son domaine D ou les domaines A/B, peut interagir avec d'autres protéines qui contribuent à moduler son activité transcriptionnelle (positive ou négative), dont des facteurs de transcription généraux (TBP, TAF1, hTAFII130, dTAFII110), des régulateurs transcriptionnels accessoires (Sp1, p53, E2F1, NF-κB, c-jun, YY1, Smad), des protéines du cycle cellulaire (pRb, cycline D1, p21, cdk2) et des protéines de remodelage de la chromatine (HDAC1, p300/CBP, SWI/SNF) (Opitz et Rustgi, 2000; Bouwman et Philipsen, 2002; Li et al., 2004; Tapias et al., 2008; Wierstra, 2008). Sp1 peut subir différentes modifications post-

traductionnelles dont la phosphorylation, la glycosylation, l'acétylation, la sumoylation et l'ubiquitination (Bouwman et Philipsen, 2002 ; Li et al., 2004 ; Tan et Khachigian, 2009 ; Li et Davie, 2010). Plusieurs protéines kinases sont responsables de la phosphorylation de Sp1, telles que CDK2 (cyclin-dependent kinase 2), PKC- ζ (atypical protein kinase C- ζ), ERK (extracellular signal-regulated kinase), CKII (casein kinase II), DNA-PK (DNAdependent protein kinase), ATM (ATM kinase-dependent), PKA (protein kinase A), GSK- 3β (glycogen synthase kinase- 3β), JNK (c-Jun N-terminal kinase) et p38 MAPK (p38) mitogen-activated protein kinase). Les protéines phosphatases 1 et 2A (PP1 et PP2A) permettent la déphosphorylation de Sp1 et contribuent donc à la régulation de l'état de phosphorylation de ce facteur. La protéine Sp1 possède plusieurs sites potentiels de phosphorylation sur les résidus sérines (Ser) et thréonines (Thr), dont les résidus Ser56, Ser59, Ser101, Ser131, Ser220, Thr278, Thr355, Thr453, Ser641, Thr668, Ser670, Thr681, Ser728, Ser732 et Thr739 (Chu et Ferro, 2005 ; Tan et Khachigian, 2009 ; Chu, 2012). La phosphorylation de certains de ces résidus peut influencer de manière positive (par exemple Ser59 par CyclineA/CDK2 (Fojas et al., 2001), Thr453 et Thr739 par ERK1/2 (Milanini-Mongiat et al., 2002), Thr668, Ser670 et Thr681 par PKC-ζ (Tan et al., 2008)) ou de manière négative (par exemple, Thr668 par CKII (Armstrong et al., 1997)) l'activité de liaison à l'ADN de Sp1 et son pouvoir d'activation de la transcription des gènes cibles Sp1 (Chu et Ferro, 2005; Tan et Khachigian, 2009; Chu, 2012). Certaines modifications par phosphorylation peuvent favoriser la stabilité de Sp1 et donc le protéger contre sa dégradation ubiquitine-dépendante par le protéasome (par exemple, Thr278 et Thr739 par JNK (Chuang et al., 2008; Wang et al., 2011)), tandis que la phosphorylation de d'autres résidus exerce l'effet inverse, favorisant le processus protéolytique et/ou la dégradation de Sp1 (par exemple, Ser59 par CyclineA/CDK2 (Spengler et al., 2008), Thr739 par ERK avec Ser728 et Ser732 par GSK-3ß (Wei et al., 2009)) (Chu, 2012). De plus, la protéine Sp1 possède plusieurs sites potentiels de glycolysation sur les résidus Ser et Thr. Les modifications de type 'O-glycolysation' peuvent affecter la localisation nucléaire, le potentiel de transactivation, la stabilité ou la dégradation de la protéine Sp1 (Bouwman et Philipsen, 2002 ; Li et al., 2004). Une augmentation de O-glycolysation de Sp1 mène à une translocation au noyau (Brasse-Lagnel et al., 2003; Majumdar et al., 2003; Majumdar et al., 2006). La glycolysation de Sp1 peut activer (Du et al., 2000 ; Majumdar et al., 2003 ;

Brasse-Lagnel et al., 2003 ; Vij et Zeitlin, 2006) ou réprimer (Roos et al., 1997 ; Yang et al., 2001a) la transcription des gènes cibles. Un faible niveau de glycolysation de Sp1 est associé à une plus grande susceptibilité à la dégradation par le protéasome, tandis qu'un haut niveau de glycolysation permet la stabilisation de Sp1 (Han et Kudlow, 1997; Masson-Gadais et al., 2006). L'acétylation dans le domaine de liaison à ADN de Sp1 par le co-activateur p300 ayant une activité acétyltransférase intrinsèque a été démontrée (Suzuki et al., 2000b). On a ainsi rapporté qu'une augmentation de l'acétylation de Sp1 (Lys703) réduisait son activité de liaison à ADN et donc atténuait le recrutement de Sp1, c-jun et p300 au promoteur 12(S)-lipoxygénase, inhibant ainsi son expression (Chen et al., 2008). On a démontré, dans le cas du gène codant la 12(S)-lipoxygénase, que la dé-acétylation de Sp1 (Lys703) permet le recrutement du co-activateur p300, qui reconnait Sp1 dé-acétylé, au promoteur de ce gène, ce qui conduit à une augmentation de son expression (Hung et al., 2006). La sumoylation par SUMO-1 ('Small ubiquitin-related modifier') de la protéine Sp1 sur le résidu Lysine 16 (Lys16) dans la région inhibitrice de Sp1 en N-terminal inhibe son clivage protéolytique et réprime l'activité transcriptionnelle de Sp1 (Spengler et Brattain, 2006). Cette modification post-traductionnelle de Sp1 altère sa localisation cellulaire au cytosol et augmente son interaction pour la sous-unité rpt6 du protéasome 26S, favorisant par conséquent l'ubiquitination et la dégradation de Sp1 (Wang et al., 2008). La sumoylation de Sp1 sur la Lys16 permet son interaction avec RNF4, une ubiquitine-ligase E3 reconnaissant les protéines sumoylées et qui permet l'ubiquitination et la dégradation par le protéasome, tandis que la phosphorylation sur la Thr739 de Sp1 par JNK abolit l'interaction Sp1-RNF4 et protège Sp1 contre la dégradation (Wang et al., 2011).

1.5.6.2. Le facteur de transcription AP-1

AP-1 est un homodimère ou hétérodimère protéique de type glissière de leucines ou bZIP (*'basic region-leucine zipper'*) dont les deux sous-unités peuvent provenir des membres de la famille Jun (c-Jun, JunB, JunD), de la famille Fos (c-Fos, FosB, Fra-1, Fra-2), de la famille Maf (c-Maf, MafB, MafA, MafG/F/K and Nrl), de la famille ATF (ATFa, ATF-2, LRF1/ATF-3, ATF-4, B-ATF) ou de la famille JDP (JDP1, JDP2) (Angel et Karin, 1991 ; Hai et Curran, 1991 ; Kerppola and Curran, 1994 ; Kataoka et al., 1994 ; Aronheim et al.,

1997; Chinenov et Kerppola, 2001). Les protéines Jun peuvent former des homodimères avec elles-mêmes ou des hétérodimères avec un membre de la famille Fos, tandis que les protéines Fos ne peuvent former d'homodimères (O'Shea et al., 1992; Chinenov et Kerppola, 2001). L'affinité de liaison du facteur de transcription AP-1 aux séquences promotrices cibles dépend de la composition du dimère et de la séquence cible de l'ADN. Les dimères Jun-Jun et Jun-Fos se lient avec une haute affinité au motif TRE constitué de la séquence palindromique 5'-TGA(G/C)TCA-3' (TRE : 'TPA (12-0tetradecanoylphorbol-13-acetate) response element'), tandis que les dimères ATF-ATF, Fos-ATF et Jun-ATF se lient avec une haute affinité au motif CRE constituée de la séquence 5'-TGACGTCA-3' (CRE: 'cAMP response element') (Hai et Curran, 1991; Chinenov et Kerppola, 2001; Elferl et Wagner, 2003; Seldeen et al., 2009). Les homodimères de la famille Maf se lient à la séquence palindromique TGCTGACGTCAGCA, tandis que ceux formés de Fos et Jun se lient à des séquences asymétriques composées d'un demi-site AP-1 (TGAC) et d'un demi-site Maf (TGCTGAC) (Kataoka et al., 1994 ; Kerppola et Curran, 1994 ; Chinenov et Kerppola, 2001). Les membres JDP1 et JDP2 forment des hétérodimères avec c-Jun et se lient au motifs TRE et CRE (Aronheim et al., 1997).

Une caractéristique commune de toutes les sous-unités AP-1 est la présence d'un domaine bZIP (*'basic region-leucine zipper'*) ou de type fermeture à glissière de leucines qui peut être sous-divisé en : i) un domaine de liaison à l'ADN contenant des résidus aminobasiques tels que l'arginine et la lysine et désigné région basique (RB), et ii) une région leucine zipper (LZ), soit un domaine de dimérisation en hélice α contenant une signature de 5 leucines séparées par intervalles de 7 résidus qui permet la formation d'homo- et d'hétérodimères, étant un prérequis pour la liaison à ADN. La protéine c-Jun possède un domaine bZIP en C-terminal, un domaine d'activation en N-terminal et un site d'ancrage pour JNK (δ -domaine). La protéine c-Fos possède un domaine bZIP central, des domaines d'activation en N- et C-terminal, un domaine de répression en C-terminal et un site d'ancrage pour JNK (domaine DEF) (Figure 1.22) (Abate et al., 1991; Elferl et Wagner, 2003; Hess et al., 2004; Ozanne et al., 2007; Seldeen et al., 2009).



Figure 1.22. Structure de l'hétérodimère c-Jun/c-Fos du facteur de transcription AP-1. A) Les protéines c-Jun et c-Fos possèdent différents domaines fonctionnels, incluant un domaine bZIP sousdivisé en une région basique (RB, boîte verte pâle), constituant un domaine de liaison à l'ADN, et une région leucine zipper (LZ, boîte verte), étant un domaine de dimérisation en hélice α , des domaines d'activation (DA, boîte bleue pâle) et d'inhibition (DI, boîte blanche) de la transcription, des sites d'ancrage pour des kinases comme JNK (boîte bleue) ou ERK (boîte mauve). Les sites de modifications post-traductionnelles de c-Jun et c-Fos, comme la phosphorylation (P), la sumoylation (SUMO) et l'acétylation (Ac) sont indiqués avec les résidus d'acides aminés modifiés (S : sérine, T : thréonine et K : lysine). JNK permet la phosphorylation des résidus S63 et S73 de Jun. Jun peut aussi être phosphorylé par d'autres kinases, telles que CKII (T231, S243, S249), GSK-3β (T239, S243, S249) et ERK (S243). ERK1/2 permet la phosphorylation des résidus T325, T331 et S374 de Fos. Par ailleurs, d'autres kinases peuvent phosphoryler Fos dont FRK ('Fos-related kinase') sur le résidu T232 et RSK sur le résidu S362 (www.uniprot.org/uniprot/P05412 ou P01100 ; www.phosphosite.org). (Figure inspirée de Hess et al., 2004); B) Domaine de liaison à l'ADN et de dimérisation de type bZIP de l'hétérodimère Jun/Fos. Les domaines bZIP de Jun (en bleu) et de Fos (en rouge) forme une structure en hélices α ressemblant à une fermeture à glissière liant la séquence palindromique 5'-TGA(G/C)TCA-3' de l'ADN (en jaune). (Figure tirée de Chinenov et Kerppola, 2001)

AP-1 régule positivement ou négativement la transcription d'une multitude de gènes en réponse à divers stimuli physiologiques et environnementaux (cytokines, facteurs de croissance, hormones, interactions cellules-MEC, infections virales et bactériennes, stress physiques et chimiques) contrôlant ainsi plusieurs fonctions cellulaires dont la prolifération, la différenciation, la survie/apoptose et la transformation tumorale (Mechta-Grigoriou et al., 2001 ; Shaulian et Karin, 2001 ; Shaulian et Karin, 2001 ; Shaulian et Karin, 2002 ; Hess et al., 2004). Par exemple,



Le numero 1 mondial du mémoires

Ap-1 module l'expression de plusieurs gènes qui sont des régulateurs du cycle cellulaire incluant la cycline D1 (Bakiri et al., 2000 ; Shaulian et Karin, 2001), p53 (Schreiber et al., 1999), p16^{INK4A} (Passegue et Wagner, 2000), des gènes impliqués dans l'apoptose comme FasL et Fas (Shaulian et Karin, 2002), des gènes impliqués dans l'adhésion, la migration et le remodelage matriciel incluant des intégrines (par exemple, ITGA5) (Gingras et al., 2009) et des MMPs (par exemple, MMP1, MMP3, MMP9) (Angel et al., 1987 ; Benbow et Brinckerhoff, 1997 ; Han et al., 2006).

La régulation de l'activité de AP1 se fait en niveau de son abondance et de son activité transcriptionnelle. Les sous-unités AP1 modulent leur propre transcription avec la présence, par exemple, d'un motif TRE lié par c-Jun/ATF2 dans le promoteur c-Jun et d'un motif CRE lié par un dimère ATF dans le promoteur c-Fos (Karin, 1995 ; Karin et al., 1997). La régulation de l'activité transcriptionnelle de AP-1 s'effectue par la composition du dimère, par des interactions avec d'autres protéines et par des modifications post-traductionnelles (Karin, 1995; Karin et al., 1997; Kaminska et al., 2000; Chinenov et Kerppola, 2001; Wisniewska et al., 2007). Les protéines c-Jun, c-Fos et FosB sont considérées comme des activateurs forts de la transcription, tandis que JunB, JunD, Fra-1 et Fra-2 sont considérées en tant qu'activateurs faibles pouvant même agir comme répresseurs par compétition pour la liaison aux sites AP-1 ou par formation d'hétérodimères inactifs. Cependant, l'activité transcriptionnelle positive ou négative de chaque protéine AP-1 peut être dramatiquement affectée par la nature du promoteur du gène portant la séquence cible pour AP-1, par le contexte cellulaire, par la composition du dimère ainsi que par les interactions avec d'autres protéines régulatrices (Kaminska et al., 2000 ; Bakiri et al., 2002 ; Mechta-Grigoriou et al., 2003 ; Wisniewska et al., 2007). Les membres de la famille Jun et Fos peuvent interagir avec une cinquantaine de protéines régulatrices différentes pouvant modifier positivement ou négativement leur influence sur l'expression des gènes cibles AP-1, dont plusieurs FTs tels que les membres de la famille Ets, les membres de la famille Smad, les membres de NFAT, NF-kB et Sp1 (Chinenov et Kerppola, 2001). AP-1 peut être phosphorylé par différents membres de la famille des MAPKs (*'mitogen-activated protein kinases'*) (Karin, 1995 ; Karin et al., 1997 ; Hess et al., 2004). La protéine JNK active peut phosphoryler les résidus Ser63 et Ser73 dans le domaine d'activation en N-terminal de la protéine c-Jun, ce

qui augmente son potentiel pour activer la transcription de ses gènes cibles sous forme d'homodimères c-Jun ou d'hétérodimères c-Jun/c-Fos (Hibi et al., 1993 ; Dérijard et al., 1994; Smeal et al., 1994; Karin, 1995; Bogoyevitch et Kobe, 2006). Ces phosphorylations par JNK augmentent la stabilité de la protéine c-Jun, répriment la multi-ubitiquination et protègent contre la dégradation par le protéasome (Musti et al., 1997 ; Karin et al., 1997). La protéine Jun peut aussi être phosphorylée par d'autres kinases (Eferl et Wagner, 2003), telles que CKII (résidus Thr231, Ser243 et Ser249) (Lin et al., 1992), GSK-3β (résidus Thr239, Ser243 et Ser249) (Boyle et al., 1991) et ERK (résidu Ser243) (Chou et al., 1992) ; des phosphorylations qui réduisent sa capacité de liaison à l'ADN. Les protéines JunB (résidus Thr 102 et Thr104), JunD (résidus Ser90 et Ser100 sur JunD situé dans l'hétérodimère c-Jun/JunD) et ATF-2 (résidus Thr69 et Thr71) peuvent également subir la phosphorylation par JNK dans leur domaine d'activation en N-terminal, ce qui augmente leur pouvoir d'activation de la transcription (Kallunki et al., 1996; Livingstone et al., 1995; Gupta et al., 1995; Li et al., 1999; Yazgan et Pfarr, 2002; Bogoyevitch et Kobe, 2006). Dans l'extrémité C-terminale de la protéine c-Fos, le résidu Ser374 est phosphorylé par ERK1/2 et le résidu Ser362 par Rsk1/2 (Ribosomal S6 protein kinases) facilitant l'ancrage de ERK1/2 au domaine DEF et permettant les phosphorylations subséquentes des Thr325 et Thr331 (Murphy et al., 2002; Murphy et al., 2004). La phosphorylation des résidus Ser362 et Ser374 mène à la stabilisation de la protéine c-Fos, qui devient protégée contre la dégradation (Murphy et al., 2002 ; Okazaki et Sagata, 1995 ; Chen et al., 1996). La phosphorylation des résidus Thr325 et Thr331 augmente l'activité de liaison à l'ADN et le potentiel d'activation de c-Fos (Murphy et al., 2002 ; Monje et al., 2003 ; Monje et al., 2005). Fra-1 peut également subir la phosphorylation (résidus Ser252 et Ser265) par des kinases de la voie ERK1/2, augmentant ainsi sa stabilité et défavorisant sa dégradation par le protéasome (Basbous et al., 2007). Des modifications par sumoylation des résidus lysines 226 et 254 sur la protéine c-jun, et sur le résidu lysine 265 sur la protéine c-Fos, répriment l'activation de la transcription par l'hétérodimère c-Jun/c-Fos AP-1 (Muller et al., 2000 ; Bossis et al., 2005 ; Tempé et al., 2014).

1.5.6.3. Les facteurs de transcription NFI

Chez les vertébrés, la famille NFI compte 4 membres issus de quatre gènes différents, soit les isoformes NFI-A, NFI-B, NFI-C et NFI-X (Qian et al., 1995; Gronostajski, 2000; Murtagh et al., 2003). Les membres appartenant à cette famille sont constitués de domaines distincts possédant des fonctions spécifiques. La région N-terminale est une séquence hautement conservée entre les quatre membres NFI et porte le domaine de liaison à l'ADN et de dimérisation comprenant quatre résidus cystéines conservés, dont trois essentiels pour la liaison à l'ADN. La région C-terminal est plus variable entre les quatre membres NFI et constitue un domaine transcriptionnel d'activation et/ou de répression riche en prolines nécessaire pour la régulation de l'expression génique (Figure 1.23) (Mermod et al., 1989 ; Novak et al., 1992; Gronostajski, 2000; Mason et al., 2009). Les membres NFI peuvent former des homo- et hétérodimères nécessaires à la liaison à l'ADN (Kruse et Sippel, 1994 ; Armentero et al., 1994). L'épissage alternatif dans la région 3' des quatre gènes NFI entraine la production de plusieurs variants NFI avec des domaines d'activation et/ou de répression en C-terminal variables (Gronostajski, 2000 ; Grunder et al., 2003). Les facteurs de transcription NFI, grâce à leur domaine de liaison à l'ADN, peuvent se lier à la séquence consensus palindromique (C/G/T)TGG(C/A) N5 (G/T)CCA(A/C/G) avec une haute affinité, mais ils peuvent également se lier au demi-palindrome (C/G/T)TGG(C/A) ou à la séquence (G/T)CCA(A/C/G) avec moins d'affinité (65% d'affinité) (Gronostajski, 1986; Osada et al., 1996 ; Roulet et al., 2000 ; Roulet et al., 2002).





Les protéines NFI sont constituées d'un domaine de liaison à l'ADN et de dimérisation (boîte rose) comprenant quatre résidus cystéines (C) conservés ainsi qu'un domaine transcriptionnel d'activation et/ou de répression riches en prolines (P, boîte turquoise). La région C-terminal est plus variable entre les quatre membres NFI (NFI-A, NFI-B, NFI-C et NFI-X). L'épissage alternatif dans la région 3' des quatre gènes NFI produit plusieurs variants NFI avec des domaines d'activation et/ou de répression variables en C-terminal. Les protéines NFI sont sensibles aux modifications post-traductionnelles comme la phosphorylation (P) sur des résidus sérines / thréonines / tyrosines ainsi que la glycolysation (Glc) sur des résidus sérines / thréonines. Une des cystéines conservées est également sensible à l'oxydation (Ox). (Figure inspirée de Gronostajski, 2000)

Plus de 60,000 séquences cibles potentielles pour NFI ont été identifiées dans le génome humain (Gronostajski et al., 1984 ; Gronostajski et al., 1985). NFI peut activer ou réprimer la transcription de plusieurs gènes ayant des sites NFI dans leur promoteur (Gronostajski, 2000). Les membres de la famille NFI sont connus pour agir comme des puissants répresseurs de la transcription de plusieurs gènes, incluant, par exemple, le gène codant pour la poly(ADP-ribose) polymérase (PARP-1) (Laniel et al, 2001; Laniel et al, 1997), les gènes codant pour les sous-unités d'intégrines $\alpha 2$, $\alpha 5$ et $\alpha 6$ (Zutter et al., 1994; Gingras et al., 2009; Gaudreault et al., 2008), le gène p21^{WAF1/CIP1} (Ouellet et al., 2006), le gène gadd153 (Nakamura et al., 2001), le gène collagène α1(I) (Nehls et al., 1992) et le gène GLUT4 (Cooke et Lane, 1999). Certains membres de la famille NFI peuvent fonctionner également comme des activateurs de la transcription de certains gènes, par exemple le gène $\alpha_{1b}AR$ (Gao et al., 1996), le gène de la myéline basique (Clark et al., 2002), le gène WAP (Mukhopadhyay et Rosen, 2007) et le gène de la β-globine (Starnes et al., 2009). Les mécanismes d'activation de la transcription par NFI sont multiples (Gronostajski, 2000), tels que des interactions directes du domaine d'activation riche en prolines de NFI avec des facteurs de transcription généraux comme TFIIB ou TBP (Kim et Roeder, 1994 ; Xiao et al., 1994), des interactions spécifiques avec des protéines coactivatrices comme des TAFs ou p300/CBP (Dusserre et Mermod, 1992; Leahy et al., 1999), par le déplacement d'histones répressives suite à leur interaction avec le domaine d'activation riche en prolines de NFI ou par compétition au niveau de la liaison au site NFI (Ristiniemi et Oikarinen, 1989 ; Dusserre et Mermod, 1992 ; Gao et al., 1998). Les mécanismes de répression de la transcription par NFI sont multiples (Gronostajski, 2000), et incluent : i) la compétition directe de NFI avec des FTs activateurs comme Sp1 pour la liaison aux promoteurs possédant des sites de liaison à l'ADN Sp1/NFI qui se chevauchent ou alors situés très près l'un de l'autre (Nehls et al., 1992 ; Laniel et al., 2001 ; Gingras et al., 2009), ii) par des interactions directes de NFI avec des FTs activateurs (séquestration), les empêchant ainsi d'occuper leurs séquences cibles (par exemple, NFI-X et Sp1) (Rafty et al., 2002), iii) par répression directe, associée au domaine de répression en C-terminal de certaines isoformes NFI, et iv) en interagissant avec des corépresseurs (Hanna-Rose et Hansen, 1996; Gronostajski, 2000).

Les activités transcriptionnelles (positive ou négative) des différents facteurs de transcription NFI sont déterminées par le type de l'isoforme NFI, par les variants d'épissage alternatif, par la composition des homo- ou hétérodimères, par les interactions avec d'autres protéines régulatrices, par des modifications post-traductionnelles, mais aussi par le type cellulaire étudié et par l'organisation du promoteur du gène modulé (Chaudhry et al., 1998; Gao et Kunos, 1998; Gronostajski, 2000; Murtagh et al. 2003; Mason et al., 2009). Tout comme pour les FTs Sp1 et AP-1, les protéines NFI sont également sujettes à des modifications post-traductionnelles. La phosphorylation a été démontrée pour les protéines NFI et cette modification semble favoriser leur affinité de liaison à l'ADN et leur activité transcriptionnelle (Cooke et Lane, 1999 ; Yang et al., 1993b ; Reifel-Miller et al., 1994; Duval et al., 2012). La phosphorylation tyrosine de NFI-C par Jak2 ('Janus kinase 2') empêche sa dégradation par le protéasome (Nilsson et al., 2006) tandis que la glycolysation a été rapportée comme stimulant l'affinité de liaison à l'ADN et l'activité transcriptionnelle des protéines NFI-B et NFI-C (Kane et al., 2002; Mukhopadhyay et Rosen, 2007). L'hyper-glycosylation de NFI semble également protéger cette protéine de la dégradation par le protéasome (Duval et al., 2012). Le quatrième des quatre résidus cystéines conservés dans le domaine de liaison à l'ADN et de dimérisation des protéines NFI est sujet à l'oxydation, ce type de modification réduisant fortement la capacité de NFI à lier l'ADN (Bandyopadhyay et Gronostajski 1994 ; Bandyopadhyay et al., 1998).

1.6. Problématique et Objectifs de recherche

Mes travaux de doctorat visaient à étudier l'influence des composantes de la matrice extracellulaire sur l'expression du gène codant la sous-unité $\alpha 5$ de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ par les cellules épithéliales de la cornée dans un contexte de cicatrisation cornéenne. Ce projet a été divisé en quatre études répondant aux objectifs généraux suivants:

1) Déterminer l'influence des composantes combinées de la matrice extracellulaire sur l'expression du gène α 5 dans les cellules épithéliales de cornée à l'aide de matrices extracellulaires complexes reconstruites (Chapitre II et Annexe 1-2).
Évaluer l'influence des matrices simples de collagènes (CI ou CIV) sur l'expression du gène α5 dans les cellules épithéliales de cornée (Chapitre III).

3) Étudier l'influence régulatrice d'un segment d'ADN conservé (50 et 300 nucléotides) et identifié dans la région 5'-en amont des gènes $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 9$ et αv sur la transcription du gène $\alpha 5$ (Chapitre IV et Annexe 3).

4) Étudier l'influence des composantes de la matrice extracellulaire sur l'expression de gènes autres que les intégrines dans les cellules épithéliales de cornée dont l'expression pourrait contribuer à la cicatrisation cornéenne (Chapitre V et Annexe 2).

1.6.1. Déterminer l'influence des composantes combinées de la matrice extracellulaire sur la sous-unité α5 dans les cellules épithéliales de cornée

La composition de la MEC change lors de la guérison des plaies cornéennes. À la suite d'une lésion de l'épithélium cornéen, d'importantes quantités de FN sont sécrétées alors que l'expression de la LM et des différents types de collagènes (principalement type IV), présents dans la membrane basale, diminue (Murakami et al., 1992 ; Kang et al., 1999). L'intégrine α 5 β 1 favorise l'adhésion et la migration des cellules épithéliales sur la matrice temporaire de FN afin de permettre le recouvrement de la lésion (Murakami et al., 1992; Suzuki et al., 2003 ; Kimura et al., 2010). Une fois celle-ci refermée, la sécrétion de FN diminue progressivement et est remplacée par une sécrétion accrue de LM ainsi que par la réapparition des collagènes (Murakami et al., 1992 ; Ljubimov et al., 1998 ; Tanaka et al., 1999). La FN augmente l'activité du promoteur du gène α 5 dans des CECLs à faible densité cellulaire, un contexte s'apparentant à celui d'un épithélium en cicatrisation (Larouche et al., 2000 ; Gingras et al., 2009). Toutefois, cette composante matricielle a été évaluée individuellement et aucune étude n'a été effectuée sur des matrices complexes composées de plusieurs composantes matricielles (FN, LM, collagènes). Dans cette étude, nous avons évalué l'influence de matrices extracellulaires complexes reconstruites par autoassemblage sur l'expression du gène a5 dans les cellules épithéliales de cornée. Notre hypothèse de recherche veut que les changements dans la composition de la MEC (individuelle ou en combinaison) modifient l'expression de sous-unités spécifiques de gènes d'intégrines, comme la sous-unité α 5, en réponse à des modifications dans les propriétés de liaison ou les niveaux d'expression endogènes des FTs (AP-1, NFI et Sp1) qui participent à la transcription du gène α 5 dans la cornée. Les objectifs spécifiques de cette première étude (Chapitre II et Annexes 1-2) étaient les suivants:

- Identifier les constituants des matrices extracellulaires complexes sécrétés par les kératocytes du stroma cornéen humain (ECM20d et ECM35d);
- Déterminer l'influence des matrices extracellulaires complexes reconstruites (ECM35d/keratocytes±) sur l'activité du promoteur du gène α5 dans des CECLs et CECHs;
- Évaluer l'influence des matrices extracellulaires complexes reconstruites (ECM35d/keratocytes±) sur l'expression et l'activité de liaison à ADN des FTs qui modulent l'expression du gène α5 (Sp1/Sp3, NFI, AP-1 et Pax-6) dans des CECLs et CECHs;
- Étudier l'influence des matrices extracellulaires complexes reconstruites (ECM35d/keratocytes±) sur l'expression du gène α5 (au niveau de l'ARNm et de la protéine) dans des CECHs.

1.6.2. Évaluer l'influence des matrices simples de collagènes (Cl ou CIV) sur l'expression du gène α5 dans les cellules épithéliales de cornée

Le remodelage important de la MEC qui se produit lors de la guérison des plaies cornéennes s'accompagne simultanément de changements dans l'expression de plusieurs sous-unités d'intégrines (notamment α 5) à la surface des cellules épithéliales de la cornée (Murakami et al., 1992 ; Garana et al., 1992; Stepp et al., 1996 ; Stepp et Zhu, 1997). Lors de la cicatrisation de l'épithélium cornéen, l'expression du CIV et des autres collagènes varie de façon opposée à celle de la FN (ligand de l'intégrine α 5 β 1) (Ljubimov et al., 1998 ; Tanaka et al., 1999 ; Vigneault et al., 2007). Comme la FN exerce une influence positive

sur l'activité du promoteur du gène α 5 (Larouche et al., 2000 ; Gingras et al., 2009), nous nous sommes demandé quelle pouvait être l'effet exercé par les collagènes (CI et CIV) sur l'activité du promoteur du gène α 5 dans les cellules épithéliales de cornée. Les objectifs spécifiques de cette deuxième étude (Chapitre III) étaient les suivants:

- Déterminer l'influence des gels de collagènes (CI ou CIV) sur l'activité du promoteur du gène α5 dans des CECLs et des CECHs;
- Évaluer l'influence des gels de collagènes (CI ou CIV) sur l'expression et l'activité de liaison à l'ADN des FTs modulant l'expression du gène α5 (Sp1/Sp3, NFI, AP-1) dans des CECLs et des CECHs;
- Étudier l'influence des gels de collagènes (CI ou CIV) sur l'expression du gène α5 (au niveau de l'ARNm et de la protéine) dans des CECHs.

1.6.3. Étudier l'influence régulatrice du segment d'ADN conservé (50 et 300 nucléotides) entre les gènes α 3, α 5, α 9 et α v sur la transcription du gène α 5

Une analyse détaillée des régions régulatrices 5' en amont des promoteurs des gènes codant les sous-unités d'intégrines α 3, α 5, α 9 et α v a permis d'identifier un segment conservé de 300pb dans lequel est présent un sous-segment de 50pb hautement conservé entre ces quatre gènes (Vigneault et al., 2007). Ces sous-unités α d'intégrines sont toutes exprimées à la surface de l'épithélium cornéen (Lauweryns et al., 1991; Stepp, 2006 ; Vigneault et al., 2007) et leur expression est augmentée durant la cicatrisation des plaies (Garana et al., 1992 ; Stepp and Zhu, 1997 ; Vigneault et al., 2007 ; Liu et al., 2006 ; Blanco-Mezquita et al., 2011). L'hypothèse de cette étude est qu'un nombre restreint de FTs module l'expression des sous-unités d'intégrines α 3, α 5, α 9 et α v pendant les réponses associées au processus de cicatrisation cornéenne et que le segment conservé de 300 nucléotides partagé par les régions régulatrices de ces quatre gènes (ITGA3, ITGA5, ITGA9 et ITGAV) contribue à une co-expression de ces intégrines dans les cellules épithéliales de cornée. Nous avons donc évalué l'influence régulatrice exercée par l'élément conservé (50pb ou 300pb) dans les promoteurs des gènes $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 9$ et αv sur la transcription du gène $\alpha 5$. Les objectifs spécifiques de cette troisième étude (Chapitre IV et Annexe 3) étaient les suivants:

- Déterminer l'influence régulatrice de l'élément conservé de 300 nucléotides et du sous-élément de 50 nucléotides provenant des gènes α3, α5, α9 et αv sur l'activité du promoteur du gène α5 dans des CECHs, des kératinocytes de peau et la lignée de mélanome uvéal T115;
- Identifier les FTs qui sont impliqués dans la régulation d'expression des sous-unités d'intégrines α3, α5, α9 et αv par l'élément conservé en 5' présent dans le promoteur de ces gènes d'intégrines α.

1.6.4. Étudier l'influence des composantes de la MEC sur l'expression d'autres gènes susceptibles de participer à la cicatrisation cornéenne dans les cellules épithéliales de cornée

La MEC contrôle plusieurs fonctions fondamentales intégrines-dépendantes comme l'adhésion, la migration et la maintenance de l'intégrité tissulaire (Van der Flier and Sonnenberg, 2001 ; Ruoslahti and Reed, 1994). En outre, l'adhésion et la migration des cellules épithéliales de cornée aux composantes de la MEC modifient l'expression de gènes qui ne codent pas des intégrines mais qui pourraient s'avérer essentiels au processus de guérison des plaies cornéennes, notamment les MMPs matricielles qui sont des enzymes impliquées dans le remodelage de la MEC et qui exercent un rôle important dans le processus de cicatrisation (Sivak et Fini, 2002 ; Ollivier et al., 2007). Dans cette quatrième et dernière étude, nous avons identifié des gènes additionnels autres que les intégrines, en particulier les MMPs, qui sont différentiellement régulés par les composantes de la MEC. L'objectif spécifique de cette quatrième étude exploratoire (Chapitre V et Annexe 2) était le suivant:

 Étudier la modulation d'expression de gènes, dont les MMPs, par les composantes de la MEC dans des CECHs à l'aide de matrices extracellulaires complexes reconstruites (ECM35d/keratocytes±) et de matrices simples de collagènes (CI ou CIV).

Chapitre II

Modulation de l'expression du gène de la sousunité d'intégrine α5 dans les cellules épithéliales de cornée par des matrices extracellulaires humaines reconstruites

Jennifer Lake, Karine Zaniolo, Manon Gaudreault, Patrick Carrier, Alexandre Deschambault, Richard Bazin, Lucie Germain, Christian Salesse et Sylvain L. Guérin

Article publié dans *Biomaterials*, 2013; 34(27):6367-6376. Facteur d'impact : 8.312

2.1. Résumé

L'intégrine $\alpha 5\beta 1$ joue un rôle majeur dans la cicatrisation cornéenne en favorisant l'adhésion et la migration des cellules épithéliales sur la matrice temporaire de fibronectine sécrétée suite à une lésion. Nous avons démontré que l'expression du gène $\alpha 5$ est augmentée par la fibronectine dans des cellules épithéliales de cornées de lapins (CECLs). Toutefois, les effets combinés des composantes qui constituent les matrices complexes n'ont pas été déterminés. Dans cette étude, nous avons évalué l'influence d'une matrice extracellulaire complexe produite par génie tissulaire sur l'expression du gène $\alpha 5$ dans des CECLs ou des cellules épithéliales de cornées humaines (CECHs). Des analyses par immunofluorescence indirecte et par spectrométrie de masse ont révélées que la matrice complexe obtenue en cultivant des fibroblastes humains de cornée en présence d'acide



ascorbique (ECM/35d) est composée de plusieurs types de collagènes, de fibronectine, de ténascine et de protéoglycanes. Les résultats des transfections de plasmides recombinants portant le gène rapporteur CAT fusionné à différents segments du promoteur α 5, des analyses en buvardage Western, en retard sur gel (EMSA), sur biopuces à ADN et qPCR ont révélé une augmentation significative de l'expression de α 5 par la matrice ECM/35d dans les CECHs. Nous avons montré que ces variations résultent de modifications dans l'expression et les activités de liaison à l'ADN des facteurs de transcriptions NFI, Sp1, AP-1 et Pax-6. Ces matrices complexes reconstruites représentent donc un modèle intéressant afin d'étudier l'expression du gène α 5, nous permettant ainsi de mieux comprendre le rôle de l'intégrine α 5 β 1 durant la guérison des plaies cornéennes.

Expression of the α 5 integrin gene in corneal epithelial cells cultured on tissue-engineered human extracellular matrices

Jennifer Lake^{a,b,c}, Karine Zaniolo^{a,b,c}, Manon Gaudreault^{a,b,c}, Patrick Carrier^{b,c}, Alexandre Deschambault^{b,c}, Richard Bazin^{d,e}, Lucie Germain^{b,c,f}, Christian Salesse^{a,b,c,e}, and Sylvain L. Guérin^{a,b,c,e,*}

^aCUO-Recherche, Centre de recherche FRQS du CHU de Québec, Québec, Canada.
^bMédecine Régénératrice, Centre de recherche FRQS du CHU de Québec, Québec, Canada.
^cCentre LOEX de l'Université Laval, CHU de Québec, Hôpital du St-Sacrement, Québec, Canada.
^dCentre universitaire d'ophtalmologie, CHU de Québec, Hôpital du St-Sacrement, Québec, Canada.
^eDépartement d'Ophtalmologie, Faculté de médecine, Université Laval, Québec, QC, Canada.
^fDépartement de Chirurgie, Faculté de médecine, Université Laval, Québec, QC, Canada.

*Corresponding author:

Dr. Sylvain L. Guérin CUO-Recherche, Hôpital du Saint-Sacrement, Centre de recherche du CHU de Québec, Québec, QC, Canada Tel.: (418) 682-7565; Fax: (418) 682-8000 E-mail address: Sylvain.Guerin@fmed.ulaval.ca

Abbreviated Title : Regulation of $\alpha 5$ gene expression by a tissue-engineered ECM

Biomaterials, 2013; 34(27):6367-6376.

2.3. Abstract

The integrin α 5 β 1 plays a major role in corneal wound healing by promoting epithelial cell adhesion and migration over the fibronectin matrix secreted as a cellular response to corneal damage. Expression of α 5 is induced when rabbit corneal epithelial cells (RCECs) are grown in the presence of fibronectin. Here, we examined whether α 5 expression is similarly altered when RCECs or human corneal epithelial cells (HCECs) are grown on a reconstructed stromal matrix used as an underlying biomaterial. Mass spectrometry and immunofluorescence analyses revealed that the biomaterial matrix produced by culturing human corneal fibroblasts with ascorbic acid (ECM/35d) contains several types of collagens, fibronectin, tenascin and proteoglycans. Results from transfection of CAT/ α 5promoter plasmids, Western blot and EMSA analyses indicated that ECM/35d significantly increase expression of α 5 in HCECs as a result of alteration in the expression and DNA binding of the transcription factors NFI, Sp1, AP-1 and PAX6. The biological significance of this biomaterial substitute on the expression of the α 5 gene may therefore contribute to better understand the function played by the α 5 β 1 integrin during corneal wound healing.

Keywords:

Transcription factors, Extracellular matrix, Corneal wound healing, Integrin, Tissue engineering, Biomaterial substitute

2.4. Introduction

Tissue engineering has led to enormous progresses in the development of technologies allowing reconstruction of autologous tissues and the development of new in vitro models to study both the cellular and molecular mechanisms that are critical to proper wound healing of damaged tissues. The reconstruction of corneas in vitro using all three corneal cell types (epithelial, stromal and endothelial cells), mostly with immortalized cell lines or animal cells, has been previously reported [1-7]. Of the corneas developed as potential tissue substitutes for transplantation, the model developed by the Laboratoire d'Organogenèse Expérimentale (LOEX) uses a self-assembly approach for the reconstruction of human tissue-engineered corneas using all three native corneal cell types [8-10]. Such fully biologic corneal substitutes developed from untransformed human corneal cells without the addition of any synthetic material have been reported to show excellent corneal morphology and histological properties such as expression of epithelial keratins, integrins, basement membrane (BM) components, collagenous matrix (stroma), Na^{+}/K^{+} -ATPase [8-10]. These reconstructed corneal biomaterial characteristics are very close to those of human native corneas. Besides being a future treatment for many corneal disorders, such a tissue-engineered cornea also represents an outstanding biomaterial to study corneal wound healing [9].

Because of its position in the eye, the corneal epithelium is continuously exposed to several types of injuries. Damages to the corneal epithelium will rapidly activate wound healing in order to maintain a proper visual acuity. Cell–cell and cell–matrix interactions play important roles in the maintenance of the stratified structure of the corneal epithelium. Corneal wound healing is primarily regulated by growth factors, cytokines as well as components from the extracellular matrix (ECM) [11-14]. Integrins, a large family of transmembrane receptors that mediate inside-out signaling between the ECM and the cell, play a major role in this process [15-17]. To date, 18 α and 8 β integrin subunits that can heterodimerize into 24 integrin receptors have been reported [15, 16, 18, 19]. Although many integrins have been identified in the corneal epithelium [20, 21] (also reviewed in Ref. [13]), only a few (including integrin subunits α 5, α 6, α 9 and β 4) have been firmly

documented to seek their expression altered in response to the rapid changes in the composition of the ECM occurring during the wounding process [22-24].

Damage to the cornea causes a rapid healing response that also alters the composition of the corneal epithelial basement membrane, a specialized ECM enriched in collagen type IV (CIV) and VII, laminin (LM) type-1 (LM-111), -5 (LM-332) and -10 (LM-511), entactin, and heparin sulfate proteoglycan [25-28] that separates epithelial and endothelial cells from the corneal stroma (recently reviewed in Ref. [13]). In the early steps of the corneal wound healing process, cells surrounding the wound secrete a temporary matrix that promotes epithelial cell adhesion and migration [29-31]. Both the stromal keratocytes and the basal epithelial cells contribute to the production of this temporary ECM mostly enriched with fibronectin (FN). On the other hand, collagen types I (CI) and IV (CIV) and LM temporarily disappear until the denuded area is covered, and then sequentially reappear beneath the newly reconstructed epithelium as the FN staining progressively diminishes [26, 30-32]. It is now well established that the FN binding integrin $\alpha 5\beta 1$ plays a major role in corneal wound healing by promoting epithelial cell adhesion and migration [29, 33].

Over the past few years, we investigated how the ECM components FN and LM may alter the expression of the integrin subunits $\alpha 5$ and $\alpha 6$ at the gene promoter level. We previously demonstrated that FN positively regulates in a cell density-dependent manner the activity directed by the human $\alpha 5$ and $\alpha 6$ integrin genes in primary cultured rabbit corneal epithelial cells (RCECs) by improving both the expression and DNA binding of transcription factors (TFs), such as Sp1 and AP-1, that are critical to transcriptional activation of these genes [34-36]. On the other hand, LM was found to suppress expression of both $\alpha 5$ and $\alpha 6$ in corneal epithelial cells by reducing the nuclear concentration of the TFs Sp1 and AP-1 and by improving the expression of members from the NFI family of TFs that act as transcriptional repressors of these genes [37, 38]. Consequently, different components from the ECM appear to exert totally different regulatory influences on the expression of the $\alpha 5$ gene in corneal epithelial cells when taken individually. However, their combinatorial influence has yet to be determined. In the present study, we determined the precise composition of the ECM secreted by human corneal fibroblasts following the auto-assembling model [10] and evaluated to which extent this reconstructed, complex biomaterial affects the expression of the α 5 integrin subunit gene at both the protein and mRNA level in human corneal epithelial cells.

2.5. Materials and Methods

All experiments described in this study were conducted in voluntary compliance with the ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research, and all procedures were approved by the Laval University Animal Care and Use Committee. This study was also conducted in accordance with our institution's guidelines and the Declaration of Helsinki. The protocols were approved by the hospital and Laval University Committees for the Protection of Human Subjects.

2.5.1. Cell culture and matrix production

Human corneal epithelial cells (HCECs) were isolated from the limbal area of normal eyes of a 52 year old donor (for transfection, Western blot or EMSA analysis) or 44-, 52- and 61 year old donors (for gene expression profiling and qPCR) following a procedure previously described [39, 40]; the eyes were obtained from the Banque d'Yeux Nationale of the Centre Universitaire d'Ophtalmologie (CHU de Québec, QC, Canada). HCECs were primary cultured with a feeder layer of irradiated murine Swiss-3T3 fibroblasts (ATCC, Rockville, MD) as previously reported [40]. Rabbit corneal epithelial cells (RCECs) were obtained from the central area of freshly dissected rabbit corneas and grown into supplemented hormonal epithelial medium (SHEM) as described [38, 41]. Human corneal fibroblasts were isolated from the stromal portion of a cornea (from a 26 days-old donor) left after dispase digestion and removal of both the endothelium and epithelium, and primary cultured and subcultured as previously reported [40, 42]. All cells were grown under 5% CO_2 at 37 °C and culture medium was changed after 2-3 days.

The tissue-engineered, 3D human corneal matrix that has been used as a biomaterial on which corneal epithelial cells were cultured was produced following the self-assembly approach [9, 10]. Corneal fibroblasts were seeded and cultured in fibroblast growth medium supplemented with 50 μ g/ml ascorbic acid (Sigma) for either 20 or 35 days. Ascorbic acid allows fibroblasts to secrete and lay down their own ECM [9]. Fibroblasts were either left into the reconstructed matrix (living ECM; ECM/keratocytes⁺) or removed from the 35-days ECM (devitalized ECM; ECM/keratocytes⁻) by a deoxycholate treatment. These reconstructed biomaterial matrices were then stored at 4 °C until use.

2.5.2. Plasmids and oligonucleotides

The plasmid -132 α 5-CAT that bear the chloramphenicol acetyltransferase (CAT) reporter gene fused to a DNA fragment from the human α 5 gene upstream regulatory sequence extending up to 5' position -132 has been previously described [43, 44]. The plasmid PXGH5, which bears a secreted version of the human growth hormone (hGH), is a kind gift of David D. Moore (Department of Molecular and Cell Biology, Baylor College of Medicine, Houston, TX). The double-stranded oligonucleotides bearing the DNA binding sites for Sp1, NFI, AP-1 and PAX6 have all been described previously [35]. Their DNA sequence is listed on Table 2.2.

2.5.3. Mass spectrometry

The digest and mass spectrometry experiments were performed by the Proteomics platform of the Eastern Quebec Genomics Center, CHU de Quebec, Canada. Punch biopsies (7.5 mm diameter) taken from either the devitalized ECM/20d or ECM/35d reconstructed 3D biomaterial matrices were first dissolved in ammonium bicarbonate 50 mM (10 μ l), reduced and alkylated with DTT 45 mM and iodoacetamide 100 mM, then digested with trypsin (0.2 μ g) in 30% acetonitrile. The digest was then vacuum centrifuge dried and desalted using stage tip before analysis by mass spectrometry. Peptide samples were separated by online reversed-phase (RP) nanoscale capillary liquid chromatography and analyzed by electrospray mass spectrometry (ES MS/MS). The experiments were performed with a Thermo Surveyor MS pump connected to a LTQ linear ion trap mass

spectrometer equipped with a nanoelectrospray ion source (ThermoFisher, San Jose, Ca USA). Peptide separation took place on a self-packed PicoFrit column (New Objective, Woburn, MA) packed with Jupiter (Phenomenex) 5µ, 300A C18, 10 cm x 0.075 mm internal diameter. Peptides were eluted with a linear gradient from 2 to 50% solvent B (acetonitrile, 0.1% formic acid) in 30 min, at 200 nL/min (obtained by flow-splitting). Mass spectra were acquired using a data dependent acquisition mode with Xcalibur software version 2.0. Each full scan mass spectrum (400-2000 m/z) was followed by collisioninduced dissociation of the seven most intense ions. The dynamic exclusion (30 s exclusion duration) function was enabled, and the relative collisional fragmentation energy was set to 35%. All MS/MS samples were analyzed using Mascot (Matrix Science, London, UK; version 2.3.0). Mascot was searched with a fragment ion mass tolerance of 0.50 Da and a parent ion tolerance of 2.0 Da. Iodoacetamide derivative of cysteine was specified as a fixed modification and oxidation of methionine was specified as a variable Two missed cleavage were allowed. Scaffold (version 3) (Proteome modification. 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 % probability as specified by the Peptide Prophet algorithm [45]. Protein probabilities were assigned by the Protein Prophet algorithm [46].

2.5.4. Transfections and chloramphenicol acetyltransferase (CAT) assays

The -132 α 5-CAT recombinant plasmid was transiently transfected into RCECs grown to subconfluence (60% coverage of the culture plate) or complete confluence (100% coverage of the culture plate) into 6-wells tissue-culture plates coated with ECM/keratocytes⁻ or 2% BSA (as a negative control) using the polycationic detergent Lipofectamine (Gibco BRL) following a procedure we previously described [34, 36]. Each Lipofectamine-transfected well received 1 µg of the -132 α 5-CAT test plasmid and 0.5 µg of the hGH-encoding plasmid pXGH5 [47]. RCECs were harvested 48 h following transfection. Primary cultured HCECs were grown into 6-wells tissue-culture plates on either ECM/35d (keratocytes⁺ or keratocytes⁻) or 2% BSA and transfected by electroporation (Neon Transfection System; Invitrogen) following the supplier's recommendations. For each triplicate, 1.2x10⁶ HCECs

were resuspended in 300 μ l of the appropriate Resuspension Buffer (included with Neon Kits) and added 45 μ g of the -132 α 5-CAT test plasmid and 15 μ g pXGH5. The optimal electroporation parameters selected were the following: 100 μ l Neon Tip, 4x10⁵ cells/well, Electrolytic Buffer E², pulse voltage of 1150 V, pulse width of 30 ms and pulse number of 2. HCECs were harvested 48 h following electroporation or until the desired coverage of the culture plate was achieved. CAT activities were determined and normalized to the amount of hGH secreted into the culture media and assayed using a kit for quantitative measurement of hGH (Medicorp, Montréal, Québec) [47, 48]. Each CAT value corresponded to the mean of at least three separate transfections done in triplicate.

2.5.5. Nuclear extracts and electrophoretic mobility shift assays (EMSA)

Nuclear extracts were prepared from confluent (100% coverage of the culture plate) HCECs grown on culture plates in the presence of either devitalized ECM/35d, living ECM/35d or 2% BSA as previously reported [36, 49]. DNA binding of the transcription factors Sp1, AP-1, NFI and PAX6 was monitored by EMSAs as recently described [35] by incubating 5.0 µg (for Sp1) or 7.5 µg (for NFI) or 10.0 µg (for AP-1 and PAX6) nuclear proteins with 5' ³²P-end-labeled, double-stranded oligonucleotides bearing the binding sites for the TFs Sp1, NFI, AP-1 or PAX6. Formation of DNA/protein complexes was then monitored by gel electrophoresis on 6%, 8% or 10% native polyacrylamide gels run against Tris-glycine buffer [50]. Competitions in EMSA were performed as above except that 150-fold or 250-fold molar excesses of unlabeled oligonucleotides bearing the Sp1, NFI, AP-1 or PAX6 site were added to the reaction. Gels were dried and autoradiographed at -80 °C for 6 h to reveal the position of the shifted DNA–protein complexes generated.

2.5.6. Western Blots

Western blots were conducted as described [36] using the following primary antibodies (all from Santa Cruz Biotechnology): rabbit polyclonal antibodies against Sp1 (1:2000), Sp3 (1:2000), NFI (1:2000), c-Jun (1:2000), JunD (1:2000), FosB (1:2000), c-Fos (1:2000), FOSL1 (1:2000), FOSL2 (1:2000) or PAX6 (1/1000), or mouse monoclonal antibodies against JunB (1:2000), and actin (CLT 9001; 1:40000) as well as a peroxidase-conjugated

AffiniPure Goat secondary antibody against either mouse or rabbit IgG (1:1000 dilution). The labeling was revealed using a Detection Kit (Amersham, Baie d'Urfé, Canada) as described [34, 38]. For detection of the α 5 integrin subunit in HCECs grown on ECM/35d, a monoclonal antibody (final concentration of 10 µg/ml) directed against the human integrin subunits α 5 (P1D6; Chemicon, Temecula, CA) was selected as the primary antibody.

2.5.7. Gene expression profiling

Total RNA was isolated from HCECs grown to 100% confluence on either 2% BSA or 35days ECM/keratocytes⁺ or ECM/keratocytes⁻ using the RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Toronto, ON, CA). Biological replicates were as follow: for the experiment on BSA, total RNA was obtained from 5 different preparations of HCECs cultured from 3 different donors (44-, 52- and 61-year old); for the experiment with ECM/keratocytes, total RNA was isolated from 3 preparations of HCECs cultured from 3 different donors (44-, 52- and 61-year old); for the experiment with ECM/keratocytes⁺, total RNA was isolated from 2 preparations of HCECs cultured from 2 different donors (44- and 52-year old). Biotinylated (Ilumina protocol) or cyanine 3-CTP (Agilent protocol) labeled cRNA targets were prepared from 150 ng (Ilumina protocol) or 25 ng (Agilent protocol) of total RNA, using either the Illumina TotalPrep RNA Amplification Kit (Ambion, Austin, TX, USA) or the Agilent One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis kit (Agilent Technologies), respectively. Then either 1.5 μ g or 600 ng cRNA was incubated on a HumanHT-12 v3 Expression BeadChip arrays (48,804 probes, Illumina, San Diego, CA, USA) or a G4851A SurePrint G3 Human GE 8x60K array slide (60,000 probes, Agilent Technologies), respectively. Slides were then hybridized (Agilent protocol), washed, stained (Ilumina protocol) and scanned on either an Illumina BeadStation 500 or an Agilent SureScan Scanner according to the manufacturer's instructions. Data were finally analyzed using the ArrayStar V4.1 (DNASTAR, Madison, WI, USA) software for scatter plots and generation of the heat maps of selected genes of interest. All data generated from the arrays were also analyzed by RMA ('Robust Multiarray Analysis') for background correction of the raw values. They were then transformed in Log2 base and quantile normalized before a



Le numero 1 mondial du mémoires

linear model was fitted to the normalized data to obtain an expression measure for each probe set on each array. All microarray data presented in this study comply with the *Minimum Information About a Microarray Experiment* (MIAME) requirements.

2.5.8. Quantitative PCR (qRT-PCR)

Quantity and quality of total RNA from HCECs grown to 100% confluence on either 2% BSA or ECM/keratocytes⁻ was assessed using an Agilent Technologies 2100 bioanalyzer and RNA 6000 Nano LabChip kit (Agilent Technologies). Reverse transcription was performed using random hexamer primers following the manufacturer's protocol for synthesis the first strand cDNA (Superscript II; Invitrogen Canada Inc). Equal amounts of cDNA were run in quadruplicate and amplified in a 20 µl reaction containing 10 µL of 2X Brillant III Ultra-Fast SYBR Green QPCR Master Mix (Agilent Technologies), 250 nM of upstream and downstream primers, and 10 ng of cDNA target. No-template controls were also used as recommended. The mixture was incubated at 95 °C for 3 min, and then cycled at 95 °C for 5 s and at 60 °C for 10 s 40 times using the QIAGEN Rotor-Gene Q real-time cycler. Amplification efficiencies were validated and normalized to the actin mRNA transcript and quantity of target genes were calculated according to a standard curve. Primers were designed using Primer3 (v.0.4.0) and contained the specific sequences on a G4851A SurePrint G3 Human GE 8x60K array slide (Agilent Technologies). The specific primers used are listed in Table 2.2.

2.5.9. Indirect immunofluorescence

Biopsies from human cornea and the bioengineered human corneal stroma (35 days) were embedded in frozen tissue embedding medium (OCT compound, Tissue-Tek, Bayers Canada, Etobicoke, Ontario, Canada), frozen in liquid nitrogen, and stored at -70 °C until use. Indirect immunofluorescence assays were performed on acetone-fixed cryosections as previously reported [8, 9]. Sections were incubated with primary antibodies against the integrin α 5 (MAB1969, Chemicon, Temecula, CA), collagen I to VII, XII, and XIV (CI (MAB1340, Chemicon); CII (MAB1330, Chemicon); CIII (MAB1343, Chemicon); CIV (AB748, Chemicon); CV and CVI (a generous gift from Dr. Robert Garonne, IBCP, Lyon, France); CVII (MAB1345, Chemicon); CXII and CXIV (a gift from Claire Lethias, IBCP, Lyon, France), fibronectin (cloneHFN7.1, ATCC, Manassas, VA), tenascin (Abcam) and laminin (MAB1975, Chemicon) for 45 min, followed by incubation with the appropriate conjugated secondary antibody for 30 min (goat anti-mouse IgG-IgM and goat anti-rabbit IgG conjugated with rhodamin (TRITC) (Chemicon)). Cell nuclei were also labeled with Hoechst reagent 33258 (Sigma) following immunofluorescence staining. They were then observed under a Nikon Optiphot microscope, equipped with epifluorescence, and photographed with a numeric CCD camera. Negligible background was observed for controls (primary antibodies omitted).

2.5.10. Statistical analyses

Student's t-test was performed for comparison of the groups in both transfection and qRT-PCR analyses. Differences were considered to be statistically significant at P < 0.05. All data are also expressed as mean \pm SD.

2.6. Results

2.6.1. Analysis of the extracellular matrix secreted *in vitro* by human corneal fibroblasts

We previously validated the ability of primary cultured human fibroblasts isolated from the corneal stroma to secrete and organize their own stromal ECM and used this as a biomaterial that is similar in structure to the corneal stroma. Corneal epithelial and endothelial cells were cultured over this biomaterial [10]. However, the precise composition of this reconstructed stroma has never been determined and compared to that of native human corneal stroma. Therefore, human corneal fibroblasts were cultured in the presence of ascorbic acid and let to secrete their own ECM for either 20- (ECM/20d) or 35-days (ECM/35d). Punch biopsies were then taken and analyzed by mass spectrometry. As shown on Figure 2.1A, although CVI and CXII are clearly present early (with ECM/20d) during the process of matrix secretion, FN remains the predominant component of these

ECMs. However, as this biomaterial is left maturing up to 35 days (with ECM/35d), its complexity clearly increased as FN was progressively replaced with various types of collagens (predominantly CVI but CI, CV, CXII and CXIV were also present at varying concentrations) (Figure 2.1B). In addition, tenascin (TN) and proteoglycans were present in the 35-day ECM. These results were further validated by indirect immunofluorescence analyses conducted on either native or tissue-engineered corneas. Indeed, the reconstructed corneal stroma was found to stain positive for CI, CVI, CXII and FN (Figure 2.1C), as well as for CV, CXIV and TN (Table 2.1). In addition, a weak signal was also observed for CIV and CVII, as well as for laminin (Table 2.1). Except for CXIV and TN, the pattern of ECM components expressed by the reconstructed stromal biomaterial was very similar to that observed with native corneal stromas (Figure 2.1C and Table 2.1).

2.6.2. Influence of the reconstructed extracellular matrix biomaterial on the activity of the human α 5 integrin gene promoter

We previously demonstrated that ECM components such as FN and LM profoundly influence, either positively or negatively, the transcription directed by the promoter of various integrin subunit genes in vitro [13, 35, 36, 38]. However, these components were evaluated individually and no study has ever been conducted using a more complete biomaterial matrix whose composition is closer to that of the native corneal stroma. We therefore examined whether the activity directed by the $\alpha 5$ gene promoter would be altered when corneal epithelial cells are grown in the presence of the biomaterial stroma. To that purpose, RCECs were grown to varying cell densities (subconfluent (SC) and confluent (C), corresponding to 60% and 100% coverage of the culture plates, respectively) on tissueculture plates coated with BSA or with ECM/35d depleted of their keratocytes (ECM/keratocytes; we also refer to this condition as 'devitalized ECM') and then transiently transfected with a recombinant construct bearing the CAT reporter gene fused to the basal promoter from the human $\alpha 5$ gene (-132 $\alpha 5$ /CAT). Culturing RCECs at subconfluence on a devitalized ECM reduced promoter activity directed by the plasmid - 132α 5/CAT by approximately 50% compared to BSA (Figure 2.2A; Annexe 1). Increasing further the cell density to complete confluence almost entirely abolished the activity of -

132 α 5/CAT when RCECs were grown on the keratocytes-depleted ECM (Figure 2.2A; Annexe 1). We then conducted similar transfection experiments by substituting RCECs with HCECs. Surprisingly, transfection of the basal α 5 promoter contained on -132 α 5/CAT in HCECs grown on the devitalized ECM did not yield repression as seen in RCECs but rather caused a near 70% increase at both cell densities (Figure 2.2B). As the stromal matrix from native corneas also contains keratocytes, we also repeated these transfections in HCECs grown on a reconstructed biomaterial matrix that still contained living keratocytes (referred to as 'living ECM' (ECM/keratocytes⁺)). As Figure 2.2B indicates, basal α 5 promoter activity was highly repressed at subconfluence (SC60%) in HCECs grown on ECM/keratocytes⁺ but then increased beyond the level observed on BSA (40% increase) as they reached confluence (C100%). Therefore, the human α 5 promoter does not respond the same way toward the reconstructed biomaterial matrix depending on whether it is transfected into RCECs or HCECs. Consequently, HCECs have been selected as the cell source for the remaining of this study.

2.6.3. Influence of the reconstructed stromal biomaterial on the expression of the transcription factors that regulate expression of the α 5 gene

We previously reported that basal α 5 promoter activity was ensured by the combinatorial action of transcription factors with opposite regulatory influences: Sp1, AP-1 (both of which were found to be potent activators of α 5 gene transcription) and NFI (a strong repressor of α 5 gene transcription) [35]. We therefore examined whether the ECM/35d reconstructed biomaterial matrix exerts its regulatory influence on the α 5 promoter by altering the expression and (or) DNA binding properties of any of these TFs. As shown on Figure 2.3A, culturing HCECs at confluence strongly reduced or entirely abolished the DNA binding of NFI when cultured on ECM/keratocytes⁻ or ECM/keratocytes⁺, respectively. A similar reduction in the binding of AP-1 was also observed whereas binding of Sp1 and Sp3 were the least affected by the reconstructed biomaterial ECM (ECM/keratocytes⁻ or ECM/keratocytes⁺). Interestingly, the TF PAX6 that has been reported to positively influence α 5 gene expression in lens fiber cells [51] also seeks its DNA binding unaffected by ECM/keratocytes⁻, but decreased when HCECs are grown on

ECM/keratocytes⁺, a pattern similar to that observed for Sp1 (Figure 2.3A). Western blot analyses revealed weak reductions in Sp1 and Sp3 when HCECs are grown on ECM/keratocytes⁺ (52% reduction for both proteins relative to the level on BSA, as measured by densitometric analysis of the band intensities) at the protein level (Figure 2.3B), further validating the results of the EMSAs. However, significant increases in PAX6 expression (270% and 228% increase in HCECs grown on ECM/keratocytes and ECM/keratocytes⁺, respectively) were noted when HCECs are grown on the reconstructed ECM. As no corresponding increases in the binding of PAX6 are observed in the EMSA, it is then likely that additional post-translational modifications, such as phosphorylation or glycosylation, is occurring that also negatively modulate the binding of this transcription factor to its target sites in HCECs grown on the reconstructed matrices. Interestingly, not all the AP-1 subunits were affected the same way by the reconstructed biomaterial ECM. Indeed, whereas expression of c-Jun, c-Fos and FOSL1 (Fra-1) was significantly reduced in HCECs grown on ECM/keratocytes⁺ (63%, 53% and 85% reduction, respectively) that of JunB, JunD, FosB and FOSL2 (Fra-2) remained unchanged (Figure 2.3B). It is also noteworthy that none of the genes encoding the various AP-1 subunits seek its expression significantly altered by ECM/keratocytes, which is also consistent with the sustained AP-1 DNA binding observed under that condition in Figure 2.3A. NFI expression was substantially reduced in HCECs grown on ECM/keratocytes⁺ (73% reduction relative to the level observed in HCECs grown on BSA, Figure 2.3B) indicating that the lack of NFI binding in the EMSA (Figure 2.3A) most likely results from both the reduced expression of this transcription factor at the protein level and changes in the post-translational modification of this TF, as we recently reported [52]. This strong reduction in the DNA binding of the repressor NFI and the maintenance of significant levels of the activators Sp1/Sp3 and PAX6 is consistent with the increased α 5 promoter activity directed by - $132\alpha5/CAT$ upon transfection of HCECs grown on either the living or devitalized ECM (Figure 2.2B).

To further validate the variations in the pattern of expression of the α 5 subunit gene between HCECs grown on BSA or on either ECM/keratocytes⁻ and ECM/keratocytes⁺, gene expression profiling by microarray analyses was next conducted on total RNAs

isolated from HCECs grown under each of these culture conditions. A scatter plot analysis of the 60,000 different transcripts contained on the SurePrint G3 Human GE 8x60K arrays indicates clearly that HCECs grown on the reconstructed ECM have patterns of expressed genes very distinctive from those yielded by HCECs grown solely on BSA as revealed by the dispersion of the normalized signals that appear as a cloud of dots in Figure 2.4A. This is particularly noticeable when HCECs are grown on ECM/keratocytes⁺, as a substantial proportion of expressed genes seek their transcription increased under this culture condition and also revealed by examination of the linear regression curve (purple line on the middle panel of Figure 2.4A). In an attempt to visualize the variations between HCECs grown with or without ECM/35d, a heatmap was generated for all the genes showing a 2-fold or more expression variation unique to HCECs grown on BSA paired against the expression profile of HCECs grown either on ECM/keratocytes-) and 2930 genes (for HCECs grown on ECM/keratocytes) fitted into that category of differentially regulated genes (Figure 2.4B).

Clustering of the *in vivo* microarray data for all α -integrin genes in HCECs grown at confluence on BSA or on either ECM/keratocytes⁻ and ECM/keratocytes⁺ into an heatmap indicated clearly that expression of $\alpha 5$ increases when HCECs are grown on ECM/keratocytes⁻ (3-fold increase) and ECM/keratocytes⁺ (2-fold increase) (Figure 2.4C; Annexe 2). This result prompted us to repeat the gene profiling analysis using total RNAs obtained from HCECs of a different human donor that have been analyzed on microarrays from an other source (for this experiment, we used a HumanHT-12 v3 Expression BeadChip array (48,804 probes) from Illumina). The data yielded by the analysis on the BeadChip arrays also revealed an increase in α 5 expression (average of 2.6-fold increase; Supplementary Table 2.2) and therefore validated those measured above using the Agilent arrays. This increase in $\alpha 5$ expression when HCECs are grown on the reconstructed biomaterial matrix was further validated by qPCR (Figure 2.4D). Consistent with the data from the microarrays, HCECs cultured on the biomaterial matrix also produced considerably more α 5 proteins than when they are grown solely on BSA, as revealed by Western blot analysis (Figure 2.4E). In addition, indirect immunofluorescence analyses revealed that expression of $\alpha 5$, which could be detected in HCECs grown as a monolayer

on BSA (Figure 2.4F, top panel), was maintained in HCECs grown on ECM/keratocvtes⁺ (Figure 2.4F, middle panel) with a pattern of expression very similar to that seen with the native cornea (Figure 2.4F, bottom panel). Interestingly, integrin subunits other than $\alpha 5$ also seek their expression increased on these biomaterial matrices. These include α subunits $\alpha 1$, $\alpha 4$ and $\alpha 11$ (whose expression increased very specifically on ECM/keratocytes⁺), $\alpha 2$ and αE . On the other hand, only very weak alterations in the expression of the β -subunits was observed between HCECs grown on BSA or on the biomaterial matrices with the exception of β 7, whose expression decreased by 4-fold on ECM/keratocytes⁺, and both β 6 and ß8, whose transcription increased by approximately 2-fold on ECM/keratocytes (Figure 2.4C, bottom). A similar heatmap analysis of the TFs that participate to the expression of the $\alpha 5$ gene revealed a weak increase in the expression of both Sp1 and Sp3 when HCECs are grown on ECM/keratocytes⁻ but a weak reduction when they are grown on ECM/keratocytes⁺, a result also consistent with those from Figure 2.3. Despite that the basal level of each of the NFI transcripts remains low in HCECs, yet each of the four isoforms (NFIA, -B, -C and -X) had its expression weakly reduced (from 1.5- to 2.2-fold) when HCECs are grown on ECM/keratocytes⁻ or ECM/keratocytes⁺ (Figure 2.4G). These results are also consistent with the significant decrease observed in both the DNA binding (in EMSA) and expression (in Western blot) of NFI observed when HCECs are grown on the biomaterial matrix (Figure 2.3). Expression of the AP-1 subunits JUN, JUNB, FOSL1 and FOSL2 significantly increased when HCECs are grown on ECM/keratocytes⁻ whereas a strong reduction of FOSL1 was the most noticeable alteration observed when HCECs are grown on ECM/keratocytes⁺ (Figure 2.4G). Interestingly, although weakly expressed in HCECs grown on BSA, expression of PAX6 is also increased by the biomaterial matrix (Figure 2.4G), a result that is also validated by Western blot (Figure 2.3B).

2.7. Discussion

Besides the obvious change in the surrounding cell's behavior, wound healing of the cornea is also characterized by important, transitory changes in the composition of the ECM on which corneal epithelial cells migrate. As the ECM is changing, so is the expression of certain integrin subunits genes that recognize the ECM components as their ligands. We previously demonstrated that ECM components FN and LM do exert opposite regulatory influences (positive and negative, respectively) on the transcription of their corresponding integrin receptor α subunit gene *in vitro* when taken individually [13, 36, 38]. In the present study, besides validating the use of HCECs as a more appropriate *in vitro* model than RCECs to study expression of the α 5 integrin gene promoter, we also examined the regulatory influence exerted by tissue-engineered, complex ECMs used as biomaterials that are also much closer to that normally found in native corneas, on the expression of the human α 5 gene.

Data from mass spectrometry revealed that when compared to ECM/20d, ECM/35d is clearly a more complex and matured ECM that is also much closer to the matrix found in native corneas. This is assumed by the fact that staining for FN, which is normally absent from the corneal stroma, is dramatically reduced in the reconstructed stroma at 35 days of maturation (with ECM/35d) compared to 20-days stroma (with ECM/20d). However, the elevated levels of TN and collagen XIV still present in the ECM/35d suggests that although closer to the composition of the ECM from native cornea, yet maturation of the reconstructed matrix beyond 35 days might be desired. TN was found to accumulate beneath the migrating epithelial cells after damage to the corneal epithelium [24]. Its accumulation in the corneal basement membrane peaks 6 days after injury and then decreases to normal levels [24]. Abnormally elevated levels of both TN and collagen XIV have been observed in human corneas with bullous keratopathy [53] as well as around and beneath the epithelial plugs and the keratotomy scars after refractive surgery [32, 54, 55]. Based on these observations, it is then clear that both TN and collagen XIV expression correlates with wound healing, and also suggests that the reconstructed ECM/35d, although more complex and matured than ECM/20d, still share characteristics of wounded tissues. More works have yet to be conducted in order to verify whether further maturing the reconstructed stroma beyond 35 days will prove sufficient to restore normal levels of TN and collagen XIV.

Similar to the influence exerted by FN alone [13, 36], the reconstructed biomaterial matrix exerted a positive influence on the activity directed by the α 5 promoter when HCECs are grown to confluence. We may therefore assume that the strong repression observed in the activity of the α 5 promoter when RCECs, but not HCECs, are grown on the reconstructed corneal ECM is resulting from species-specific influences. Basal transcription of the $\alpha 5$ gene has been shown to rely on the combinatorial actions of multiple transcription factors: the transcriptional activators Sp1, Sp3, AP-1 and PAX6, and the repressor NFI [35, 51]. The almost complete loss of NFI binding combined to a sustained expression of Sp1, Sp3, AP-1 and PAX6 are consistent with the increase α 5 expression observed when HCECs are grown on the ECM/35d. Interestingly, the strong reduction in the DNA binding properties of NFI when HCECs are grown on the biomaterial matrix (on ECM/keratocytes⁺) apparently does not entirely rely on corresponding changes in the level to which this gene is transcribed or its mRNA translated into proteins as only weak reductions are observed in microarray and Western blot analyses for this TF. We recently demonstrated that the efficiency of NFI to bind its target sites in DNA was highly dependent on its level of phosphorylation in vitro [52]. Therefore, the reconstructed ECM may somehow alter the level to which this TF is phosphorylated in HCECs. The collagen-enriched ECM/35d therefore dictates alterations in the cellular ratio, and most likely the post-translation modification status (at least for NFI), of the transcription factors Sp1/Sp3, AP-1, PAX6 and NF1 that favors the predominant positive activity of Sp1/Sp3, AP-1 and PAX6 over the repressive influence of NFI.

When compared to cells grown on BSA, the data from gene profiling analyses indicated that 2214- and 2930 genes were deregulated by more than 2-fold between HCECs grown on ECM/keratocytes⁻ and ECM/keratocytes⁺, respectively, of which 877 genes are common to both conditions. This result also indicates that 2053 genes seek their expression profoundly affected solely by the fact that stromal keratocytes are preserved alive into the biomaterial matrix. Among the 52 most deregulated genes between HCECs grown on BSA

and ECM/keratocytes⁺, it is remarkable that eleven of them encode various components from the ECM (FN1, COL1A1, COL1A2, COL3A1, COL5A1, COL5A2, COL6A1, COL8A2, EDIL3, TNC, MFAP4), four encode MMPs (MMP-2, -3, -12 and -13), two encode cytokines (IL6, IL11), and a few others encode proteoglycans or proteins related to them (such as LUM and SPOCK1) (Supplementary Table 2.1). It is noteworthy that most of the proteins encoded by these genes have indeed been observed by mass spectrometry or immunofluorescence analyses in the reconstructed ECM (Figure 2.1 and Table 2.1). We already demonstrated the critical function played by stromal keratocytes on the stratification and differentiation properties of HCECs in tissue engineered corneas, and the function IL-6 may have to play in that mechanism [8]. Interestingly, our results suggest that IL-6 expression is not solely determined by stromal keratocytes as it is also expressed by HCECs when exposed to the biomaterial matrix (Supplementary Table 2.1). Both type II collagen alpha 1 and FN secretion were reported to increase in response to IL-6 [56, 57], a result consistent with our observations. Conversely, the 25-fold increase in IL-6 expression noted in HCECs grown on the biomaterial matrix (Supplementary Table 2.1) may as well have resulted from the increase in the expression of the integrin subunit genes $\alpha 2$ and $\alpha 5$ integrins as both were reported to be required for an increased secretion and/or expression of IL-6 in connective tissue mast cells and human glioma xenograft cell lines [58, 59]. However, additional experiments will have to be conducted before one may decipher which of these mechanisms accounts for the reconstructed biomaterial matrix-dependent increase in IL-6 expression noted in the present study.

2.8. Conclusion

In this study, we demonstrated that the tissue-engineered ECM used as a biomaterial on which corneal epithelial cells are grown exert very distinctive regulatory influences (either positive or negative) on the expression of genes that play pivotal functions during adhesion and migration of the corneal epithelial cells (such as the gene encoding the α 5 integrin subunit). We believe culturing human cells on a complex, tissue-engineered extracellular matrix biomaterial might prove an interesting option to recover the appropriate pattern of expressed genes that typically characterizes such cells in their natural environment. As the



worldwide demand for human donor's corneas for corneal transplantation presently exceeds the supply, it is expected that the results presented in this study will help design better tissue-engineered corneas that will be useful as biomaterial substitutes for corneal grafting in a near future, a very promising avenue as an alternative to donor tissues.

2.9. Acknowledgments

This study was supported by grants from the 'Canadian Institutes of Health Research' (CIHR) to C.S. and S.L.G, and to L.G., S.L.G. and F.A.A. The Banque d'yeux Nationale is partly supported by the Réseau de Recherche en Santé de la Vision from the 'Fonds de Recherche du Québec-Santé' (FRQS). J.L. was supported by a studentship from the CIHR. L.G. is the recipient of a Canadian Research Chair on Stem Cell and Tissue Engineering.

2.10. References

- [1] Alaminos M, Del Carmen Sanchez-Quevedo M, Munoz-Avila JI, Serrano D, Medialdea S, Carreras I, et al. Construction of a complete rabbit cornea substitute using a fibrin-agarose scaffold. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2006;47:3311-7.
- [2] Doillon CJ, Watsky MA, Hakim M, Wang J, Munger R, Laycock N, et al. A collagen-based scaffold for a tissue engineered human cornea: physical and physiological properties. Int J Artif Organs. 2003;26:764-73.
- [3] Griffith M, Osborne R, Munger R, Xiong X, Doillon CJ, Laycock NL, et al. Functional human corneal equivalents constructed from cell lines. Science. 1999;286:2169-72.
- [4] Minami Y, Sugihara H, Oono S. Reconstruction of cornea in three-dimensional collagen gel matrix culture. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1993;34:2316-24.
- [5] Schneider AI, Maier-Reif K, Graeve T. Constructing an in vitro cornea from cultures of the three specific corneal cell types. In Vitro Cell Dev Biol Anim. 1999;35:515-26.
- [6] Vrana NE, Builles N, Justin V, Bednarz J, Pellegrini G, Ferrari B, et al. Development of a reconstructed cornea from collagen-chondroitin sulfate foams and human cell cultures. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2008;49:5325-31.
- [7] Werner A, Braun M, Reichl S, Kietzmann M. Establishing and functional testing of a canine corneal construct. Vet Ophthalmol. 2008;11:280-9.
- [8] Carrier P, Deschambeault A, Audet C, Talbot M, Gauvin R, Giasson CJ, et al. Impact of cell source on human cornea reconstructed by tissue engineering. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2009;50:2645-52.
- [9] Carrier P, Deschambeault A, Talbot M, Giasson CJ, Auger FA, Guerin SL, et al. Characterization of wound reepithelialization using a new human tissue-engineered corneal wound healing model. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2008;49:1376-85.
- [10] Proulx S, d'Arc Uwamaliya J, Carrier P, Deschambeault A, Audet C, Giasson CJ, et al. Reconstruction of a human cornea by the self-assembly approach of tissue engineering using the three native cell types. Mol Vis. 2010;16:2192-201.
- [11] Lu L, Reinach PS, Kao WW. Corneal epithelial wound healing. Exp Biol Med (Maywood). 2001;226:653-64.
- [12] Nishida T, Tanaka T. Extracellular matrix and growth factors in corneal wound healing. Curr Opin Ophthalmol. 1996;7:2-11.

- [13] Vigneault F, Zaniolo K, Gaudreault M, Gingras ME, Guerin SL. Control of integrin genes expression in the eye. Prog Retin Eye Res. 2007;26:99-161.
- [14] Zieske JD. Extracellular matrix and wound healing. Curr Opin Ophthalmol. 2001;12:237-41.
- [15] Hynes RO. Integrins: a family of cell surface receptors. Cell. 1987;48:549-54.
- [16] Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. Cell. 1992;69:11-25.
- [17] Suzuki K, Saito J, Yanai R, Yamada N, Chikama T, Seki K, et al. Cell-matrix and cell-cell interactions during corneal epithelial wound healing. Prog Retin Eye Res. 2003;22:113-33.
- [18] Clark EA, Brugge JS. Integrins and signal transduction pathways: the road taken. Science. 1995;268:233-9.
- [19] Plow EF, Haas TA, Zhang L, Loftus J, Smith JW. Ligand binding to integrins. J Biol Chem. 2000;275:21785-8.
- [20] Lauweryns B, van den Oord JJ, Volpes R, Foets B, Missotten L. Distribution of very late activation integrins in the human cornea. An immunohistochemical study using monoclonal antibodies. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1991;32:2079-85.
- [21] Stepp MA. Corneal integrins and their functions. Exp Eye Res. 2006;83:3-15.
- [22] Garana RM, Petroll WM, Chen WT, Herman IM, Barry P, Andrews P, et al. Radial keratotomy. II. Role of the myofibroblast in corneal wound contraction. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1992;33:3271-82.
- [23] Liu Y, Yanai R, Lu Y, Kimura K, Nishida T. Promotion by fibronectin of collagen gel contraction mediated by human corneal fibroblasts. Exp Eye Res. 2006;83:1196-204.
- [24] Stepp MA, Zhu L. Upregulation of alpha 9 integrin and tenascin during epithelial regeneration after debridement in the cornea. J Histochem Cytochem. 1997;45:189-201.
- [25] Martin GR, Timpl R. Laminin and other basement membrane components. Annu Rev Cell Biol. 1987;3:57-85.
- [26] Nakayasu K, Tanaka M, Konomi H, Hayashi T. Distribution of types I, II, III, IV and V collagen in normal and keratoconus corneas. Ophthalmic Res. 1986;18:1-10.

- [27] Tuori A, Uusitalo H, Burgeson RE, Terttunen J, Virtanen I. The immunohistochemical composition of the human corneal basement membrane. Cornea. 1996;15:286-94.
- [28] Zimmermann DR, Trueb B, Winterhalter KH, Witmer R, Fischer RW. Type VI collagen is a major component of the human cornea. FEBS Lett. 1986;197:55-8.
- [29] Kang SJ, Kim EK, Kim HB. Expression and distribution of extracellular matrices during corneal wound healing after keratomileusis in rabbits. Ophthalmologica. 1999;213:20-4.
- [30] Murakami J, Nishida T, Otori T. Coordinated appearance of beta 1 integrins and fibronectin during corneal wound healing. J Lab Clin Med. 1992;120:86-93.
- [31] Tanaka T, Furutani S, Nakamura M, Nishida T. Changes in extracellular matrix components after excimer laser photoablation in rat cornea. Jpn J Ophthalmol. 1999;43:348-54.
- [32] Ljubimov AV, Alba SA, Burgeson RE, Ninomiya Y, Sado Y, Sun TT, et al. Extracellular matrix changes in human corneas after radial keratotomy. Exp Eye Res. 1998;67:265-72.
- [33] Nishida T, Nakamura M, Mishima H, Otori T. Differential modes of action of fibronectin and epidermal growth factor on rabbit corneal epithelial migration. J Cell Physiol. 1990;145:549-54.
- [34] Gingras ME, Larouche K, Larouche N, Leclerc S, Salesse C, Guerin SL. Regulation of the integrin subunit alpha5 gene promoter by the transcription factors Sp1/Sp3 is influenced by the cell density in rabbit corneal epithelial cells. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2003;44:3742-55.
- [35] Gingras ME, Masson-Gadais B, Zaniolo K, Leclerc S, Drouin R, Germain L, et al. Differential binding of the transcription factors Sp1, AP-1, and NFI to the promoter of the human alpha5 integrin gene dictates its transcriptional activity. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2009;50:57-67.
- [36] Larouche K, Leclerc S, Salesse C, Guerin SL. Expression of the alpha 5 integrin subunit gene promoter is positively regulated by the extracellular matrix component fibronectin through the transcription factor Sp1 in corneal epithelial cells in vitro. J Biol Chem. 2000;275:39182-92.
- [37] Gaudreault M, Vigneault F, Gingras ME, Leclerc S, Carrier P, Germain L, et al. Transcriptional regulation of the human alpha6 integrin gene by the transcription factor NFI during corneal wound healing. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2008;49:3758-67.

- [38] Gaudreault M, Vigneault F, Leclerc S, Guerin SL. Laminin reduces expression of the human alpha6 integrin subunit gene by altering the level of the transcription factors Sp1 and Sp3. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2007;48:3490-505.
- [39] Gaudreault M, Carrier P, Larouche K, Leclerc S, Giasson M, Germain L, et al. Influence of sp1/sp3 expression on corneal epithelial cells proliferation and differentiation properties in reconstructed tissues. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2003;44:1447-57.
- [40] Germain L, Auger FA, Grandbois E, Guignard R, Giasson M, Boisjoly H, et al. Reconstructed human cornea produced in vitro by tissue engineering. Pathobiology. 1999;67:140-7.
- [41] Boisjoly HM, Laplante C, Bernatchez SF, Salesse C, Giasson M, Joly MC. Effects of EGF, IL-1 and their combination on in vitro corneal epithelial wound closure and cell chemotaxis. Exp Eye Res. 1993;57:293-300.
- [42] Germain L, Giasson C, Carrier P, Guérin SL, Salesse C, Auger FA. Tissue engineering of human cornea. In: Wnek GE, Bowlin GL, editors. Encyclopedia of biomaterials and biomedical engineering. New York: Marcel Dekker; 2004. pp. 1534-44.
- [43] Beliveau A, Leclerc S, Rouleau M, Guerin SL. Multiple cloning sites from mammalian expression vectors interfere with gene promoter studies in vitro. Eur J Biochem. 1999;261:585-90.
- [44] Birkenmeier TM, McQuillan JJ, Boedeker ED, Argraves WS, Ruoslahti E, Dean DC. The alpha 5 beta 1 fibronectin receptor. Characterization of the alpha 5 gene promoter. J Biol Chem. 1991;266:20544-9.
- [45] Keller A, Nesvizhskii AI, Kolker E, Aebersold R. Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search. Anal Chem. 2002;74:5383-92.
- [46] Nesvizhskii AI, Keller A, Kolker E, Aebersold R. A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. Anal Chem. 2003;75:4646-58.
- [47] Selden RF, Howie KB, Rowe ME, Goodman HM, Moore DD. Human growth hormone as a reporter gene in regulation studies employing transient gene expression. Mol Cell Biol. 1986;6:3173-9.
- [48] Pothier F, Ouellet M, Julien JP, Guerin SL. An improved CAT assay for promoter analysis in either transgenic mice or tissue culture cells. DNA Cell Biol. 1992;11:83-90.
- [49] Roy RJ, Gosselin P, Guerin SL. A short protocol for micro-purification of nuclear proteins from whole animal tissue. Biotechniques. 1991;11:770-7.

- [50] Schneider R, Gander I, Muller U, Mertz R, Winnacker EL. A sensitive and rapid gel retention assay for nuclear factor I and other DNA-binding proteins in crude nuclear extracts. Nucleic Acids Res. 1986;14:1303-17.
- [51] Duncan MK, Kozmik Z, Cveklova K, Piatigorsky J, Cvekl A. Overexpression of PAX6(5a) in lens fiber cells results in cataract and upregulation of (alpha)5(beta)1 integrin expression. J Cell Sci. 2000;113 (Pt 18):3173-85.
- [52] Duval C, Gaudreault M, Vigneault F, Touzel-Deschenes L, Rochette PJ, Masson-Gadais B, et al. Rescue of the transcription factors Sp1 and NFI in human skin keratinocytes through a feeder-layer-dependent suppression of the proteasome activity. J Mol Biol. 2012;418:281-99.
- [53] Ljubimov AV, Burgeson RE, Butkowski RJ, Couchman JR, Wu RR, Ninomiya Y, et al. Extracellular matrix alterations in human corneas with bullous keratopathy. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1996;37:997-1007.
- [54] Maguen E, Alba SA, Burgeson RE, Butkowski RJ, Michael AF, Kenney MC, et al. Alterations of corneal extracellular matrix after multiple refractive procedures: a clinical and immunohistochemical study. Cornea. 1997;16:675-82.
- [55] Maguen E, Zorapapel NC, Zieske JD, Ninomiya Y, Sado Y, Kenney MC, et al. Extracellular matrix and matrix metalloproteinase changes in human corneas after complicated laser-assisted in situ keratomileusis (LASIK). Cornea. 2002;21:95-100.
- [56] Suhr KB, Tsuboi R, Seo EY, Piao YJ, Lee JH, Park JK, et al. Sphingosylphosphorylcholine stimulates cellular fibronectin expression through upregulation of IL-6 in cultured human dermal fibroblasts. Arch Dermatol Res. 2003;294:433-7.
- [57] Poree B, Kypriotou M, Chadjichristos C, Beauchef G, Renard E, Legendre F, et al. Interleukin-6 (IL-6) and/or soluble IL-6 receptor down-regulation of human type II collagen gene expression in articular chondrocytes requires a decrease of Sp1.Sp3 ratio and of the binding activity of both factors to the COL2A1 promoter. J Biol Chem. 2008;283:4850-65.
- [58] Kesanakurti D, Chetty C, Dinh DH, Gujrati M, Rao JS. Role of MMP-2 in the regulation of IL-6/Stat3 survival signaling via interaction with alpha5beta1 integrin in glioma. Oncogene. 2013;32:327-40.
- [59] McCall-Culbreath KD, Li Z, Zhang Z, Lu LX, Orear L, Zutter MM. Selective, alpha2beta1 integrin-dependent secretion of IL-6 by connective tissue mast cells. J Innate Immun. 2011;3:459-70.

2.11. Tables

ECM component	Bioengineered cornea*	Native cornea
Collagen I	+	+
Collagen II	_	_
Collagen III	-	-
Collagen IV	+	+
Collagen V	++	+
Collagen VI	++	++
Collagen VII	+	+
Collagen XII	++	+
Collagen XIV	++	-
Fibronectin	+++	+
Laminin	+	+
Tenascin	+++	_

Table 2.1. Immunofluorescence analysis of the ECM components from the cornealstroma of bioengineered and native human corneas.

* Bioengineered cornea: 2 sheets of ECM/35d on which HCECs were seeded.

Table 2.2. DNA sequence of the primers and double-stranded oligonucleotides.

Oligonucleotide	Top strand (5'-3')/ Bottom strand (5'-3')
Sp1	GATCATATCTGCGGGGGGGGGGGGAGACACAG GATCCTGTGTCTGCCCCGCCCGCAGATAT
NFI	TTATTTTGGATTGAAGCCAATATGAG CTCATATTGGCTTCAATCCAAAATAA
AP-1	GATCCCCGCGTTGAGTCATTCGCCTC GATCGAGGCGAATGACTCAACGCGGG
PAX6	GATCATCCAGGTCTACTACATTAGTTCCAGGTCAG GATCCTGACCTGGAACTAATGTAGTAGACCTGGAT

Oligonucleotides used as labeled probes or competitors in the EMSAs

Primers for qPCR analyses

Gene	Forward Primer (5'-3')/ Reverse Primer (5'-3')	Genebank #
α5	CCATTCACAGTTCTTTGGG GAGCTGCCAGGTCTTAACTC	NM_002205
MMP9	GACGGGTATCCCTTCGAC CCGAGTTGGAACCACGAC	NM_004994
MMP10	GCTCTGCCTATCCTCTGAG CACATCCTTTTCGAGGTTG	NM_002425
АСТВ	CAAGATGAGATTGGCATGG GGCCACATTGTGAACTTTG	NM_001101

2.12. Figure legends

Figure 2.1. Composition of the reconstructed human corneal fibroblast matrix.

The composition of the reconstructed matrix secreted by human corneal fibroblasts, following their depletion from the reconstructed ECM, was determined by mass spectrometry after (A) 20-days (ECM20d/keratocytes⁻) or (B) 35-days of maturation (ECM35d/keratocytes⁻). (C) The components from the corneal stroma were also determined by indirect immunofluorescence analyses conducted on bioengineered corneas (2 sheets of ECM/35d on which HCECs were deposited and cultured under air-liquid condition for 8 days) and native human corneas (used as controls). Typical results for CI, CVI, CXII and FN are presented; a positive staining appears in red (results for the other ECM components are shown in Table 2.1). Nuclei were counterstained with Hoechst 33258 reagent and appear in blue. Both the corneal epithelium (E) and stroma (S) are shown. All the immunofluorescence data presented for the native corneas were from the central area of the cornea except for FN that targets the area between the limbal and central region of this tissue.

Figure 2.2. Activity of the basal promoter from the $\alpha 5$ gene in corneal epithelial cells grown on reconstructed matrices.

The plasmid -132 α 5 that bears the basal promoter from the human α 5 gene inserted upstream from the CAT reporter gene was transfected into subconfluent (SC60%) or confluent (C100%) RCECs (Panel **A**) or HCECs (Panel **B**) seeded on tissue-culture plates coated with the reconstructed extracellular matrix depleted (ECM/keratocytes⁻; also referred to as 'devitalized ECM') or not (ECM/keratocytes⁺; also referred to as 'living ECM') of its keratocytes. Cells were also grown on culture plates coated with 2% BSA as negative controls. Values are expressed as CAT activities ((%CAT activity/4h/100 µg proteins)/ng hGH) relative to the level measured on BSA (100%). Asterisks (*) indicate CAT activities considered to be statistically significant relative to the CAT activities measured in cells grown on BSA (P < 0.05; Student's t-test). Standard deviation is also indicated.

Figure 2.3. Influence of the ECM/35d matrix on the DNA binding and expression of Sp1, Sp3, NFI, AP-1 and PAX6 in HCECs

(A) Crude nuclear proteins from confluent (C100%) HCECs grown on BSA, ECM/keratocytes⁻ or ECM/keratocytes⁺ were incubated with 5' end-labeled oligomers bearing the high affinity binding sites for AP-1, NFI, Sp1 and PAX6. Formation of DNA/protein complexes was then monitored by EMSA on native polyacrylamide gels. When indicated, 150- and 250-fold molar excesses of unlabeled oligonucleotides for AP-1, Sp1, NFI or PAX6 were also added as unlabeled competitors. Furthermore, the identity of the protein binding the PAX6 labeled probe was further confirmed by the almost complete disappearance of the DNA-protein complex when an antibody against PAX6 was added to the reaction mix prior to separation of the complex on gel (the PAX6 antibody used in this study does not cause the formation of a supershifted complex, but rather interfere with DNA binding of this TF). The position of the Sp1/Sp3, AP-1, NFI and PAX6 complexes is indicated. P: labeled probe alone, U: free probe. (B) Western blots conducted on the nuclear extracts from panel A using antibodies against the TFs NFI, Sp1, Sp3, PAX6 and the AP-1 subunits c-Jun, JunB, JunD, c-Fos, FosB, FOSL1 (FRA-1) and FOSL2 (FRA-2). Actin expression was also monitored as a normalization control. The position of the nearest molecular mass markers is shown.

Figure 2.4. Microarray analysis of integrins gene expression in HCECs grown on the reconstructed matrices.

(A) Scatter plots of \log_2 of signal intensity from 60,000 different targets covering the entire human transcriptome of HCECs grown on BSA (y-axis) plotted against HCECs grown on ECM/keratocytes⁻ (x-axis; left panel) or ECM/keratocytes⁺ (x-axis; middle panel) at confluence. The right panel shows the scatter plot between HCECs grown on ECM/keratocytes (y-axis) against HCECs grown on ECM/keratocytes⁺ (x-axis). (B) Heatmap representation of genes whose expression is differentially regulated by at least 2-fold in HCECs grown on BSA against HCECs grown on ECM/keratocytes⁻ or ECM/keratocytes⁺. The color scale used to display the log₂ expression level values is 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 representation of all α and β integrin subunit genes expressed by HCECs grown at confluence on BSA or ECM/35d (ECM/keratocytes⁻ or ECM/keratocytes⁺). (**D**, **E**) qPCR (panel **D**) and Western blot analysis (panel E) of α 5 expression in HCECs grown on BSA or ECM/35d (ECM/keratocytes⁻). Actin expression was monitored as a normalization control. (F) Immunofluorescence analysis of a5 expression in HCECs grown as a monolayer on BSA (left panel) or on the reconstructed ECM/35d (ECM/keratocytes⁺; middle panel). Expression of $\alpha 5$ (appearing in red) was also monitored in native human cornea (right panel). Nuclei were counterstained with Hoechst 33258 reagent and appear in blue. E: epithelium; S: stroma. Scale bar: 20µM. (G) Heatmap representation of the transcriptional profiles of HCECs grown at confluence on BSA or ECM/35d (ECM/keratocytes or ECM/keratocytes⁺) for 15 selected genes of interest.

Rapport-gratuit.com

Le numero 1 mondial du mémoires



Figure 2.1. Composition of the reconstructed human corneal fibroblast matrix.


Figure 2.2. Activity of the basal promoter from the α 5 gene in corneal epithelial cells grown on reconstructed matrices.



Figure 2.3. Influence of the ECM/35d matrix on the DNA binding and expression of Sp1, Sp3, NFI, AP-1 and PAX6 in HCECs.



Figure 2.4. Microarray analysis of integrins gene expression in HCECs grown on the reconstructed matrices.

2.13. Supplementary data

Supplementary Table 2.1. Biological functions of the proteins encoded by the differentially expressed genes in HCECs grown on BSA and ECM/ keratocytes⁺.

Gene Name	Protein name	BSA	ECM/ keratocytes+	Fold change	Functions	
	Nicotinamide N-			689,316	Catalyzes the N-methylation of nicotinamide and other pyridines to form pyridinium ions. This activity is important for	
NNMT	methyltransfera-se	3,877	2672,262	up 231 122	biotransformation of many drugs and xenobiotic compounds.	
POSTN	Periostin	4,545	1050,518	up	matrix mineralization.	
IGFBP5	Insulin-like growth factor-binding protein 5	3,728	595,456	159,711 up	IGF-binding proteins prolong the half-life of the IGFs and have been shown to either inhibit or stimulate the growth promoting effects of the IGFs on cell culture. They alter the interaction of IGFs with their cell surface receptors.	
CNN1	cDNA FLJ59763, highly similar to Calponin-1; cDNA, FLJ79305, highly similar to Calponin- 1	3,328	418,737	125,806 up	Thin filament-associated protein that is implicated in the regulation and modulation of smooth muscle contraction. It is capable of binding to actin, calmodulin, troponin C and tropomyosin. The interaction of calponin with actin inhibits the actomyosin Mg-ATPase activity. Proteins of the matrix metalloproteinase (MMP) family are involved in the breakdown of extracellular matrix in normal	
MMP3	Stromelvsin-1	2.717	299.083	110,091 up	physiological processes, such as embryonic development, reproduction, and tissue remodeling, as well as in disease processes, such as arthritis and metastasis. Most MMP's are secreted as inactive proproteins which are activated when cleaved by extracellular proteinases. This gene encodes an enzyme which degrades fibronectin, laminin, collagens III, IV, IX, and X, and cartilage proteoglycans. The enzyme is thought to be involved in wound repair, progression of atherosclerosis, and tumor initiation.	
		,	,		Fibronectin is involved in cell adhesion and migration processes including embryogenesis, wound healing, blood	
FN1	Fibronectin	28.643	3120.05	108,928 up	coagulation, host defense, and metastasis. Fibronectins bind cell surfaces and various compounds including collagen, fibrin, heparin, DNA, and actin.	
	. Interfection	20,010	0.20,00		May play a role in cell-cell and cell-matrix interactions. May contribute to various neuronal mechanisms in the central	
SPOCK1	Testican-1	20.328	2202.187	108,334 up	nervous system. Testican although similarity to thyropin-type cysteine protease-inhibitors suggests its function may be related to protease inhibition.	
CTHRC1	Collagen triple helix repeat-containing protein 1; Collagen triple helix repeat containing 1, isoform CRA_c	5,372	581,478	108,240 up	May play a role in the cellular response to arterial injury through involvement in vascular remodeling. May act as a negative regulator of collagen matrix deposition.	
CCI 2	C-C motif	3 965	400 201	105,917	Chemotactic factor that attracts monocytes and basophils but not neutrophils or eosinophils. Augments monocyte anti- tumor activity. Has been implicated in the pathogenesis of diseases characterized by monocytic infiltrates, like psoriasis, meumatoid arthritis or atherosclerosis. May be involved in the recruitment of monocytes into the arterial wall during the	
0012	Macrophage	3,000	409,321	up 86,702	May be involved in tissue injury and remodeling. Has significant elastolytic activity. It may play a role in aneurysm	
MMP12	metalloelastase	2,948	255,561	up	formation and studies in mice suggest a role in the development of emphysema.	
COL1A2	Collagen alpha-2(l) chain	53,319	4579,047	85,879 up	torung in most connective uses and is abundant in bone, comea, dermis and tendon. Mutations in this gene are associated with osteogenesis imperfecta types I-IV, Ehlers-Danlos syndrome type VIIB, recessive Ehlers-Danlos syndrome Classical type, idiopathic osteoporosis, and atypical Marfan syndrome. Symptoma associated with mutations in this gene, however, tend to be less severe than mutations in the gene for the alpha1 chain of type I collagen (COL1A1) reflecting the different role of alpha2 chains in matrix integrity.	
THY1	glycoprotein	64,674	5514,953	05,275 up	May play a role in cell-cell or cell-ligand interactions during synaptogenesis and other events in the brain	
FBLN5	Fibulin-5; Fibulin 5, isoform CRA_a	5,098	411,571	80,735 up	Promotes adhesion of endothelial cells through interaction of integrins and the RGD vascular ligand for integrin receptors and may play a role in vascular development and remodeling motif. Could be a vascular ligand for integrin receptors and may play a role in vascular development and remodeling.	
PDGFRB	Platelet-derived growth factor receptor beta	3,139	252,648	80,489 up	Ivrosine-protein kinase that acts as cell-surface receptor for homodimenc PUCi-B and PDGFD and for heterodimers formed by PDGFA and PDGFB, and plays an essential role in the regulation of embryonic development, cell proliferation, survival, differentiation, chemotaxis and migration. Plays an essential role in blood vessel development by promoting proliferation, migration and recruitment of pericytes and smooth muscle cells to endothelial cells. Plays a role in the migration of vascular smooth muscle cells and the formation of neointima at vascular injury sites. Required for normal development of the cardiovascular system. Required for normal recruitment of pericytes (mesangial cells) in the kidney glomerulus, and for normal formation of a branched network of capillaries in kidney glomeruli. Promotes rearrangement of the actin cytoskeleton and the formation of membrane ruffles.	
II 11	Interleukin 11	13 12	920 578	70,111	Directly stimulates the proliferation of hematopoietic stem cells and megakaryocyte progenitor cells and induces	
COL5A2	Collagen alpha- 2(V) chain	95.37	5321.157	55,794 υρ	Type V collagen is a member of group I collagen (fibrillar forming collagen). It is a minor connective tissue component of nearly ubiquitous distribution. Type V collagen binds to DNA, heparan sulfate, thrombospondin, heparin, and insulin. Type V collagen is a key determinant in the assembly of tissue-specific matrices. Mutations in this gene are associated with Ehlers-Danlos syndrome, types I and II.	
COL5A1	Collagen alpha- 1(V) chain	11,663	642,098	55,053 up	Type V collagen is a member of group I collagen (fibrillar forming collagen). It is a minor connective tissue component of nearly ubiquitous distribution. Type V collagen binds to DNA, heparan sulfate, thrombospondin, heparin, and insulin. Type V collagen is a key determinant in the assembly of tissue-specific matrices. Mutations in this gene are associated with Ehlers-Danlos syndrome, types I and II.	
ITGB3	Integrin beta, Integrin beta-3	3,029	164,57	54,336 up	The TLGBX protein product is the integrin beta chain beta 3. Integrins are integral cell-surface proteins composed of an alpha chain and a beta chain. A given chain may combine with multiple partners resulting in different integrins. Integrin beta 3 is found along with the alpha IIb chain in platelets. Integrins are known to participate in cell adhesion as well as cell- surface mediated signalling.	
COL3A1	Collagen alpha- 1(III) chain	2,775	137,278	49,470 up	Collagen type III occurs in most soft connective tissues along with type I collagen, a fibrillar collagen that is found in extensible connective tissues such as skin, lung, uterus, intestine and the vascular system. Mutations in this gene are associated with Ehlers-Danlos syndrome types IV, and with aortic and arterial aneurysms.	
SULF1	Extracellular sulfatase Sulf-1	15.936	780.593	48,981 up	Heparan suitate proteoglycans (HSPGs) act as coreceptors for numerous heparin-binding growth factors and cytokines and are involved in cell signaling. Heparan sulfate 6-O-endosulfatases, such as SULF1, selectively remove 6-O-sulfate groups	

					from heparan sulfate. This activity modulates the effects of heparan sulfate by altering binding sites for signaling molecules. Diminishes HSPG (heparan sulfate proteoglycans) sulfation, inhibits signaling by heparin-dependent growth factors, diminishes proliferation, and facilitates apoptosis in response to exogenous stimulation.
	Actin, gamma-			47.000	Action are highly appropriate protoing that are involved in various takes of all wallful and in the weights are of the
ACTG2	muscle	37,668	1802,915	47,863 up	Actins are nightly conserved proteins that are involved in various types of cell motility and in the maintenance of the cytoskeleton.
FMOD	Fibromodulin	13,643	652,666	47,040 up	fibrillogenesis in vitro. It may also regulate TGF-beta activities by sequestering TGF-beta into the extracellular matrix.
	EGF-like repeat				
	domain-containing			46,582	alpha-v/beta-3 integrin receptor. Inhibits formation of vascular-like structures. May be involved in regulation of vascular-
EDIL3	protein 3	3,878	180,665	up	morphogenesis of remodeling in embryonic development.
					Ubiquitinous metalloproteinase that is involved in diverse functions such as remodeling of the vasculature, angiogenesis, tissue repair, tumor invasion, inflammation, and atherosclerotic plaque rupture. As well as degrading extracellular matrix
					proteins, can also act on several nonmatrix proteins such as big endothelial 1 and beta-type CGRP promoting
					vasoconstriction. Also cleaves KISS at a GlyLeu bond. Appears to have a role in myocardial cell death pathways. Contributes to myocardial ovidative stress by regulating the activity of GSK3beta. Cleaves GSK3beta in vitro. PEX the C-
	PEX, 72 kDa type			46,032	terminal non-catalytic fragment of MMP2, posseses anti-angiogenic and anti-tumor properties and inhibits cell migration
MMPZ	IV collagenase	6,996	322,033	up	and cell adhesion to FGF2 and vitronectin. Ligand for integrinv/beta3 on the surface of blood vessels. Type Lis a fibril-forming collagen found in most connective tissues and is abundant in hone, cornea, dermis and tendon
	Collagen alpha-1(I)			45,944	Mutations in this gene are associated with osteogenesis imperfecta types I-IV, Ehlers-Danlos syndrome type VIIA, Ehlers-
COL1A1	chain	284,916	13090,322	up	Danlos syndrome Classical type, Caffey Disease and idiopathic osteoporosis.
					fibromodulin, keratocan, epiphycan, and osteoglycin. In these bifunctional molecules, the protein moiety binds collagen
					fibrils and the highly charged hydrophilic glycosaminoglycans regulate interfibrillar spacings. Lumican is the major keratan sulfate proteoplycan of the comea but is also distributed in interstitial collagenous matrices throughout the body. Lumican
				45,199	may regulate collagen fibril organization and circumferential growth, corneal transparency, and epithelial cell migration and
LUM	Lumican Fin bud initiation	13,649	616,914	up 44.176	tissue repair.
FIBIN	factor homolog	3,47	153,29	up	Potentially acts downstream of retinoic acid and wnt signaling and is essential for tbx5 expression.
	A disintegrin and				
	with				
	thrombospondin motifs 4: ADAM				
	metallopeptidase				
	with thrombospondin			38 338	Cleaves aggrecan, a cartilage proteoglycan, and may be involved in its turnover. May play an important role in the destruction of aggrecan in arthritic diseases. Could also be a critical factor in the exacerbation of neurodeceneration in
ADAMTS4	type 1 motif, 4	7,562	289,893	up	Alzheimer disease. Cleaves aggrecan at the '392-GluAla-393' site.
					Catalyzes the first step in biosynthesis of glycosaminoglycan. Transfers D-xylose from UDP-D-xylose to specific serine residues of the core protein. Initial enzyme in the biosynthesis of chondroitin sulfate and dermatan sulfate proteoplycans in
	Xylosyltransferase			37,269	fibroblasts and chondrocytes. Mutations in this gene have been associated with increased severity of pseudoxanthoma
AILII	1 Complement C1s	4,013	149,58	up	elasticum.
C18	subcomponent		40.44.000	36,654	C1s B chain is a serine protease that combines with C1q and C1r to form C1, the first component of the classical pathway
010	A disintegrin and	36,603	1341,000	up	of the complement system. C Ir activates C is so that it can, in turn, activate C2 and C4.
	metalloproteinase				han alasta barta da ante da Cara ante da Cara ante de Cara da Cara da Cara ante de cara da cara da el esta da T
	with thrombospondin			36,486	product of this gene plays a major role in growth and in skin, lens, and heart development. It is also a candidate gene for
ADAMTS10	motifs 10	4,716	172,077	up	autosomal recessive Weill-Marchesani syndrome.
TAGLN	Transgelin	141,791	4672,098	32,950 up	to replicative senescence.
					Membrane glycoproteins that mediate homophilic cell-cell adhesion and play critical roles in cell differentiation and
				32,829	endometrium and placenta formation. Decreased expression of this gene may be associated with tumor growth and
CDH6	Cadherin-6	3,918	128,634	up	metastasis.
DACT1	Dapper homolog 1	3,556	115,728	32,340 up	of CTNNB1/beta-catenin, thereby enhancing the transcriptional activation of target genes of the Wnt signaling pathway.
COI 6A1	Collagen alpha-	207 772	6520 021	31,468	Collagen VI acts as a cell-binding protein. Collagen VI is a major structural component of microfibrils. Mutations in the
		201,113	0000,201	up	Angiopoletin-like, also known as angiopoletin-related proteins, are structurally related to the angiopoletins. They are
ΔΝΩΡΤΙ 7	Angiopoietin-	4 004	125 607	31,390	secreted proteins with N-terminal coiled-coil domains and C-terminal fibrinogen-like domains. Unlike the angiopoietins,
		7,004	120,001	up	Acts as a transcription factor and regulates procollagen lysyl hydroxylase gene expression. Controls cell proliferation in a
	Pituitary homeoboy			30 330	tissue-specific manner and is involved in morphogenesis. During embryonic development, exerts a role in the expansion of muscle properties. May play a role in the proper localization of asymmetric organs such as the heart and stomach
PITX2	2	2,923	88,653	up	Isoform PTX2C is involved in left-right asymmetry the developing embryo.
PAMR1	Inactive serine	11 70	353 108	29,957	May play a role in regeneration of skeletal muscle
	p.otodoo i Awitti	11,15	000,100	<u></u>	Extracellular matrix protein implicated in guidance of migrating neurons as well as axons during development, synaptic
TNC	Tenascin	30 817	916 597	29,743	plasticity as well as neuronal regeneration. Promotes neurite outgrowth from cortical neurons grown on a monolayer of astrocytes Linand for integrins alpha-8/beta-1 alpha-9/beta-1 alpha-9/beta-3 and alpha-1//beta-6
011101-4	Chitinase-3-like	00,017	0.0,007	29,731	Carbohydrate-binding lectin with a preference for chitin. May play a role in defense against pathogens, or in tissue
CHI3L1	protein 1 Potassium voltage-	6,321	187,932	up	remodeling. May play an important role in the capacity of cells to respond to and cope with changes in their environment.
	gated channel				Ancillary protein that assembles as a beta subunit with a voltage-gated potassium channel complex of pore-forming alpha
KCNE4	subfamily E member 4	4.314	127,179	29,479 up	subunits. Modulates the gating kinetics and enhances stability of the channel complex. May associate with KCNQ1/KVLTQ1 and inhibit potassium current.
-	Glucosamine	,	,	-r	a i i i i i i i i i i i i i i i i i i i
	tructose-6- phosphate				
GEDTO	aminotransferase	2.000	440.070	27,766	Controls the flux of glucose into the hexosamine pathway. Most likely involved in regulating the availability of precursors for
ULL I	[isomerizing] 2 Paired mesoderm	3,986	110,679	up 27,164	in- and u-mined glycosylation of proteins. Acts as a transcriptional regulator of muscle creatine kinase (MCK) and so has a role in the establishment of diverse
PRRX1	homeobox protein 1	3,499	95,046	up	mesodermal muscle types. The protein binds to an A/T-rich element in the muscle creatine enhancer.
	Chloride intracellular			25,914	Member of the chloride intracellular channel family of proteins who may insert into membranes and form chloride ion
CLIC6	channel protein 6	13,623	353,04	up	channels. May play a critical role in water-secreting cells, possibly through the regulation of chloride ion transport.
	Collagen alpha- 2(VIII) chain.			25,436	wacromolecular component of the subendothelium. Major component of the Descemet's membrane (basement membrane) of corneal endothelial cells. Also component of the endothelia of blood vessels. Necessary for migration and proliferation of
	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·		470 570	-,	use allowed by the set of the set

					particular in atherogenesis.
IL6	Interleukin-6	61,175	1539,097	25,159 up	Cytokine with a wide variety of biological functions. It is a potent inducer of the acute phase response. Plays an essential role in the final differentiation of B-cells into Ig-secreting cells Involved in lymphocyte and monocyte differentiation. It induces myeloma and plasmacytoma growth and induces nerve cells differentiation Acts on B-cells, T-cells, hepatocytes, hematopoietic progenitor cells and cells of the CNS. Also acts as a myokine. It is discharged into the bloodstream after muscle contraction and acts to increase the breakdown of fats and to improve insulin resistance.
MFAP4	Microfibril- associated glycoprotein 4	13,922	335,783	24,119 up	Extracellular matrix protein which is involved in cell adhesion or intercellular interactions. The gene is located within the Smith-Magenis syndrome region.
TNFAIP6	Tumor necrosis factor-inducible gene 6 protein	4,781	114,539	23,954 up	Its hyaluronan-binding domain is known to be involved in extracellular matrix stability and cell migration. Possibly involved in cell-cell and cell-matrix interactions during inflammation and tumorigenesis. Enhanced levels of this protein are found in the synovial fluid of patients with osteoarthritis and heumatoid arthritis.
PTX3	Pentraxin-related protein PTX3	7,08	142,318	20,101 up	Plays a role in the regulation of innate resistance to pathogens, inflammatory reactions, possibly clearance of self- components and female fertility.
MYOC	Myocilin	3,921	77,927	19,874 up	Plays a role in cytoskeletal function. MYOC is expressed in many occular tissues, including the trabecular meshwork, and was revealed to be the trabecular meshwork glucocorticoid-inducible response protein (TIGR). The trabecular meshwork is a specialized eye tissue essential inregulating intraocular pressure, and mutations in MYOC have been identified as the cause of hereditary iuvenile-onset open-angle caluacoma.
SOX11	Transcription factor SOX-11	2,673	49,38	18,473 up	Transcription factors involved in the regulation of embryonic development and in the determination of the cell fate. The encoded protein may act as a transcriptional regulator after forming a protein complex with other proteins. The protein may function in the developing nervous system and play a role in tumorigenesis.
MMP13	Collagenase 3, Collagenase-3 deletion variant COL3-DEL	4,853	89,037	18,345 up	Degrades collagen type I. Does not act on gelatin or casein. Could have a role in tumoral process.
VMO1	Vitelline membrane outer layer protein 1 homolog	31,513	551,833	17,511 up	prevent the mixing of the yolk and albumen and also act as an important anti-microbial barrier, as indicated by the high content of lysozyme in the outer. layer
KAL1	Anosmin-1	4,551	73,25	16,096 up	The encoded protein is similar in sequence to proteins known to function in neural cell adhesion and axonal migration. In addition, this cell surface protein is N-glycosylated and may have anti-protease activity. Has a dual branch-promoting and guidance activity, which may play an important role in the patterning of mitral and tufted cell collaterals to the olfactory cortex. Chemoattractant for fetal olfactory epithelial cells.

Supplementary Table 2.2. Data from gene profiling on Human HT-12 v3 Expression BeadChip array (Illumina) in HCECs grown with or without ECM/35d.

Matrix		Ratio ECM/BSA				
	BSA	(ctrl -)	ECM/35d (ECI			
-	SC	С	SC	С	SC	С
Gene						
α5	1239	2895	4560	4224	3,7	1,5

SC: sub-confluent HCECs C: confluent HCECs

Chapitre III

Impact fonctionnel des collagènes sur l'activité transcriptionnelle dirigée par le promoteur du gène de la sous-unité d'intégrine α5 dans les cellules épithéliales de la cornée

Jennifer Lake, Karine Zaniolo, Marie-Êve Gingras, Camille Couture, Christian Salesse et Sylvain L. Guérin

Article accepté avec révisions en 2015 dans *Investigative Ophthalmology* & *Visual Science (IOVS)* ; Facteur d'impact : 3.661

3.1. Résumé

Objectif : Le remodelage de la matrice extracellulaire est une caractéristique de la cicatrisation des plaies cornéennes. Outre la sécrétion massive de fibronectine (FN) durant la première phase de ce processus, des altérations au niveau de la sécrétion des collagènes se produisent également durant la réponse cicatricielle. Dans cette étude, nous avons évalué si l'expression du gène codant pour la sous-unité d'intégrine α 5 de l'intégrine α 5 β 1 change lorsque les cellules épithéliales de cornées (CECs) sont cultivées en présence de collagènes.

Méthodes : La réponse du gène α 5 envers les collagènes a été déterminée par des analyses de transfection avec des plasmides recombinants portant le gène rapporteur CAT sous le contrôle de différents segments du promoteur α 5 humain dans des cellules épithéliales de cornées de lapins (CECLs) ou humaines (CECHs) cultivées sur BSA ou sur différents types

de collagènes (CI, CIII, CIV and CVI). Des buvardages de type Western et des analyses de retard sur gel (EMSA) ont été réalisés pour évaluer respectivement l'expression et l'activité de liaison à l'ADN des facteurs de transcription requis afin d'assurer la transcription basale du gène α 5. L'influence du CI et du CIV sur le patron d'expression génique dans les CECHs a également été analysée par profilage génique sur biopuces à ADN.

Résultats : Tous les types de collagènes répriment l'activité transcriptionnelle dirigée par le plasmide portant le long segment promoteur α 5/CAT dans les CECs cultivées à confluence. Une augmentation modérée de l'activité du promoteur α 5 a été observée dans les CECLs cultivées à sous-confluence sur CIV. Ces influences régulatrices des collagènes sont associées à des altérations au niveau de l'expression ou de l'activité de liaison à l'ADN des facteurs de transcription Sp1/Sp3, NFI et AP-1 qui participent à la transcription basale du gène α 5. Les analyses sur biopuces à ADN ont révélé que le CI modifie de manière plus importante le patron d'expression génique que le CIV dans les CECHs.

Conclusions : Les collagènes exercent une forte influence négative sur l'expression du gène α 5 dans les CECs cultivées à confluence suggérant ainsi que la sécrétion accrue des collagènes lorsque la lésion de l'épithélium cornéen est recouverte pourrait avoir un rôle important à jouer dans le contrôle de l'adhésion et de la différenciation verticale des CECs en cellules épithéliales suprabasales durant le processus de guérison des plaies cornéennes.

Functional impact of collagens on the activity directed by the promoter of the α 5 integrin subunit gene in corneal epithelial cells

Jennifer Lake^{1,2,3}, Karine Zaniolo^{1,2,3}, Marie-Êve Gingras^{1,†}, Camille Couture^{1,2,3}, Christian Salesse^{1,2,3,4}, and Sylvain L. Guérin^{1,2,3,4*}

¹CUO-Recherche and ²Médecine Régénératrice - Centre de recherche FRQS du CHU de Québec, Québec, Canada ; ³Centre de recherche en organogénèse expérimentale de l'Université Laval/LOEX ; ⁴ Département d'Ophtalmologie, Faculté de médecine, Université Laval, Québec, QC, Canada.

[†] Present address: CSPQ, Département de biochimie, Hôpital Maisonneuve-Rosemont, Montréal, QC, Canada

* Corresponding author:

Dr. Sylvain L. Guérin, CUO-Recherche, Hôpital du Saint-Sacrement, Centre de recherche du CHU de Québec, Québec (QC) G1S4L8, Canada Phone: (418) 682-7565; Fax: (418) 682-8000 E-mail address: Sylvain.Guerin@fmed.ulaval.ca

Grant support

This study was supported by a grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) (SLG #138624-2012). J.L. and M.E.G. were supported by studentships from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR). C.C. was supported by a studentship from the 'Fonds de Recherche du Québec-Santé' (FRQS). The Banque d'yeux Nationale is partly supported by the Réseau de Recherche en Santé de la Vision from the FRQS.



3.3. Abstract

Purpose: The early step of corneal wound healing is characterized by the massive production of fibronectin (FN) whose secretion is progressively replaced by collagens from the basal membrane as wound healing proceeds. Here, we examined whether expression of the gene encoding the α 5 subunit from the FN binding integrin α 5 β 1, changes as corneal epithelial cells (CECs) are cultured in the presence of collagen type-I (CI) or type-IV (CIV).

Methods: Responsiveness of the α 5 gene toward collagen was determined by transfection of α 5-promoter/CAT plasmids into rabbit and human CECs cultured on BSA or collagens. Electrophoretic mobility shift assays (EMSAs) and Western blots were used to monitor the transcription factors required for basal α 5 gene transcription in the presence of collagens. Gene profiling on microarrays was used to determine the impact of collagens on the patterns of genes expressed by CECs.

Results: All collagen types repressed the full-length α 5/CAT promoter activity in confluent CECs. A moderate increase was observed in subconfluent rabbit CECs grown on CIV but not on CI. These collagen-dependent regulatory influences also correlated with alterations in the transcription factors Sp1/Sp3, NFI and AP-1 that ensure α 5 gene basal transcription. Microarray analyses revealed that CI more profoundly altered the pattern of genes expressed by human CECs than CIV.

Conclusions: Collagens considerably suppressed $\alpha 5$ gene expression in CECs suggesting that during wound healing, they may interfere with the influence FN exerts on CECs by altering their adhesive and migratory properties through a mechanism involving a reduction in $\alpha 5$ gene expression.

Keywords:

Integrin, Collagen, Promoter, Corneal epithelium, Wound healing

3.4. Introduction

The corneal epithelium is exposed to the external environment and serves as the frontal barrier of the anterior segment of the eye. The integrity and smoothness of the corneal epithelium is absolutely required for appropriate light refraction and the maintenance of a good visual acuity.¹ Once damaged, corneal epithelial cells (CECs) must raise a rapid healing response in order to preserve these properties. Cell-cell and cell-matrix interactions play important roles in the maintenance of the stratified structure of the corneal epithelium.² Corneal wound healing is primarily regulated by growth factors, cytokines as well as components from the extracellular matrix (ECM).³⁻⁶ The corneal epithelial basement membrane (BM) is a specialized ECM constituted of a variety of different collagen types, entactin, and heparin sulfate proteoglycan⁷⁻¹⁰ that separates epithelial from the corneal stroma (reviewed in refs.^{5, 11}) and whose composition changes depending on whether it is located beneath the epithelial cells from the limbus or from those of the central cornea. Indeed, the BM from the corneal limbus, which is also the niche of the corneal stem cells, is enriched with collagen IV $\alpha 1(IV)$ and $\alpha 2(IV)$ chains but has a reduced amount of $\alpha 3(IV)$ chain. Besides collagens, the limbal BM also contains various laminin chains ($\alpha 2$ - $\alpha 5$, $\beta 1$ - β 3, γ 1- γ 3) and tenascin C. On the other hand, the BM from the central cornea is enriched in α 3(IV) and α 4(IV) collagen IV, collagen V and collagen XII.^{9, 12, 13} Other components, such as type IV collagen a5 and a6 chains, collagen types VII, XV, XVII, and XVIII, laminin-111, laminin-332, laminin chains $\alpha 3$, $\beta 3$, and $\gamma 2$, as well as fibronectin have been found to be part of the BM from the entire ocular surface epithelia.^{12, 13} The particularly distinctive composition of the limbal BM, which is clearly different from that of the central cornea, was suggested to constitute a specialized micro-environment whose specific function is to maintain the corneal stem cells in a quiescent, undifferentiated state, thereby preserving their proliferative abilities.

Corneal injury is known to cause a rapid healing response that may transitorily alter the composition of the BM's constituents to facilitate adhesion and migration of the epithelial cells, a process particularly important in order to ensure proper repair of the damaged cornea.^{4, 14} For instance, small wounds (less than 1.5 mm) have been shown to completely heal within 24 hours in a mouse debridement model without significant loss of the

basement membrane protein. On the other hand, larger wounds required 48 hours for complete closure of the damaged area and were also characterized by partial to complete loss of the typical BM constituents.^{15, 16} Besides the massive secretion of a temporary matrix mostly enriched with fibronectin (FN) that occurs early during corneal wound healing, CI, CIV and LM are also subjected to profound alterations during the entire repair process.^{7, 8, 10} Indeed, they temporarily disappear during the early steps of the wounding process until the denuded area is completely covered, and then sequentially reappear beneath the newly produced epithelium as the FN staining progressively diminishes in the BM.^{8, 17, 18} Depending on the depth of the wound, the migrating epithelial cells may also become in contact with different types of collagens. For instance, as non-penetrating injuries leave the BM intact, the migrating epithelial cells will be exposed to CIV, a major component of this membrane.¹⁹ However, much deeper, penetrating injuries also damage the BM and expose the migrating cells to CI that is abundantly present in the corneal stroma.²⁰ Consequently, the adhesive and migrating properties of the migrating epithelial cells may differ depending on whether they are exposed to CI (in deeper injury) or CIV (in superficial injury).

The rapid changes in the composition of the ECM occurring during the wounding process are also accompanied by similar changes in the expression of a few integrin subunits at the cell surface of CECs, which have been reported to normally express the integrin subunits $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, αv , $\alpha 9$, $\beta 1$, $\beta 4$ and $\beta 5$.^{21, 22} Integrins, a large family of transmembrane receptors that mediate signaling between the ECM and the cell,²³⁻²⁵ are made up of an α and a β subunit picked out among the 18 α and 8 β integrin subunits that can heterodimerize into one of the 24 integrin receptors reported to date.^{23, 24, 26, 27} Only the integrin subunits $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha 9$, αv , $\beta 4$ and $\beta 6$ have been firmly documented to seek their expression altered during the rapid changes in the composition of the ECM that occur during the corneal wounding process.²⁸⁻³¹ The FN binding integrin $\alpha 5\beta 1$ plays a major role in corneal wound healing by promoting epithelial cell adhesion and migration over this remodeled ECM.^{32, 33}

For several years, we investigated how the ECM components FN and LM may alter the expression of the integrin subunits $\alpha 5$ and $\alpha 6$ at the gene promoter level. We demonstrated

that FN positively influences the activity directed by the human α 5 and α 6 integrin genes in primary cultures of rabbit corneal epithelial cells (RCECs) by improving both the expression and DNA binding of transcription factors (TFs), such as Sp1 and AP-1, that are required in order to ensure proper transcription of the α 5 gene.³⁴⁻³⁶ On the other hand, LM was found to suppress expression of both α 5 and α 6 integrin subunits by reducing the nuclear concentration of the TFs Sp1 and AP-1 and by increasing the expression of members from the NFI family among which some members are strong repressors of the α 5 and α 6 genes.^{37, 38} The chronological events that are typical of ECM remodeling, meaning the early appearance of FN that is then progressively replaced by collagens and laminins, also suggest that the need for corneal epithelial cells to express the FN binding integrin α 5 β 1 may also change as wound healing proceeds. Indeed, besides FN, expression of the α 5 gene may as well respond to the collagens present in the BM of the wounded cornea through a signal transduction cascade involving binding of collagens to their corresponding integrin receptors.

In the present study, we therefore investigated whether collagens may alter the expression of the α 5 integrin subunit gene in CECs despite that α 5 β 1 is an FN, but not a collagen binding integrin.

3.5. Methods

All experiments described in this study were conducted in compliance with the ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research, and all procedures were approved by the Laval University Animal Care and Use Committee. This study was also conducted in accordance with our institution's guidelines and the Declaration of Helsinki. The protocols were approved by the institution's Committee for the Protection of Human Subjects.

3.5.1. Cell culture and matrix production

Human corneal epithelial cells (HCECs) were isolated from the limbal area of normal eyes of a 52 year-old donor (for transfection, Western blot or EMSA analysis) or 37, 44, 45, 52 and 61 year-old donors (for gene expression profiling, qPCR and Western blot analyses), and obtained from the Banque d'Yeux Nationale of the Centre Universitaire d'Ophtalmologie (CHU de Québec, QC, Canada), following a procedure previously described.^{39, 40} HCECs were primary cultured with a feeder layer of irradiated murine Swiss-3T3 (i3T3) fibroblasts (ATCC, Rockville, MD) as previously reported.⁴⁰ Rabbit corneal epithelial cells (RCECs) were obtained from the entire corneal surface (central and limbal areas) of freshly dissected corneas from pathogen-free albinos rabbits obtained from a local slaughterhouse and grown into SHEM medium as described.^{38, 41} All cells were grown under 5% CO₂ at 37°C, except for HCECs that were maintained under 8% CO₂, and culture medium was changed after 2-3 days. When indicated, tissue culture plates were coated as described^{36, 38, 42} either with BSA or collagen (types I, III, IV and VI (Sigma, Oakville, Ont., Canada)) at concentrations ranging from 2- to 200 µg/cm² (as specified in the figure's legends) before they were seeded with CECs.

3.5.2. Indirect immunofluorescence

Indirect immunofluorescence assays were performed on tissue cultured cells (HCECs) grown on glass coverslips coated either with BSA, CI or CIV and fixed with acetone (10 min at -20 °C). Cells were incubated for 45 min with a primary antibody directed against

human integrins α1 (Orb18042, Biorbyt, San Francisco, CA, USA), α2 (NBP1-96715, Novus Bio, Oakville, ON, Canada), α10 (PAC096Hu01, Cloud-Clone Corp., Houston, TX, USA) and $\alpha 11$ (ESAP13588, Elabsciences, Burlington, ON, Canada) at an optimal dilution of 1:200 in phosphate-buffered saline (PBS; 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 6,5 mM Na₂HPO₄ and 1,5mM KH₂PO₄) containing 1% BSA (the antibodies directed against the $\alpha 1$, $\alpha 10$ and $\alpha 11$ subunits were produced in rabbit whereas the $\alpha 2$ antibody was produced in mouse). Samples were washed four times with PBS before addition of the secondary antibody (rabbit or mouse anti-mouse IgG (H+L) conjugated with Alexa-fluor® 488 (1:400; Molecular Probes, Burlington, ON, Canada)) and further incubation for 30 min. Isotypic non-immune antibodies (either normal rabbit (1:100; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA) or normal mouse anti-IgG (1:100; DAKO, Burlington ON, Canada) were also used as negative controls. Cell nuclei were also labeled with Hoechst reagent 33258 (1:100; Sigma) following immunofluorescence staining. Tissue samples were then observed with an epifluorescence microscope (Zeiss Imager.Z2; Zeiss Canada Ltd, North York, ON, Canada). They were photographed with a numeric CCD camera (AxioCam MRm; Zeiss). Negligible background was observed for controls (primary antibodies omitted).

3.5.3. Plasmids and oligonucleotides

The plasmids -954α5-CAT, -178α5-CAT, -132α5-CAT, -92α5-CAT and -42α5-CAT that bear the chloramphenicol acetyltransferase (CAT) reporter gene fused to DNA fragments from the human α5 gene upstream regulatory sequence extending up to 5' positions -954, - 178, -132, -92 and -42 have been previously described.^{43, 44} The plasmid PXGH5, which bears a secreted version of the human growth hormone (hGH), is a kind gift of David D. Moore (Department of Molecular and Cell Biology, Baylor College of Medicine, Houston, TX). The double-stranded oligonucleotides bearing the DNA binding sites for Sp1, NFI, AP-1 and PAX6 have all been described previously.³⁵ Their DNA sequence is listed on Supplementary Table 3.1.

3.5.4. Transfections and chloramphenicol acetyltransferase (CAT) assays

The -954a5-CAT, -178a5-CAT, -132a5-CAT, -92a5-CAT or -42a5-CAT recombinant plasmids were transiently transfected into RCECs grown to sub-confluence (60% coverage of the culture plate) or complete confluence (100% coverage of the culture plate) into 6wells tissue-culture plates coated with different types of collagens (CI, CIII, CIV and CVI) or 2% BSA (as a negative control) using the polycationic detergent Lipofectamine (Life Technologies, Burlington, ON, Canada) following a procedure we previously described³⁶ according to the manufacturer's recommendations. Each Lipofectamine-transfected well received 1 µg of the test plasmid and 0.5 µg of the hGH-encoding plasmid PXGH5. RCECs were harvested 48 hrs following transfection. HCECs can only be transfected with a good efficiency by electroporation (Neon Transfection System; Invitrogen) and not by any of the other procedures in use in our laboratory (including lipofection or transfection through the formation of a calcium phosphate precipitate). We therefore used this procedure to transfect HCECs with the -954 α 5-CAT and -132 α 5-CAT recombinant plasmids prior to the addition of i3T3 feeder cells to the culture plates. Transfected HCECs were then grown to subconfluence (SC60%) or complete confluence (C100%) into 6-wells tissue-culture plates coated with either collagens (CI or CIV) or 2% BSA (as a negative control). For each triplicate, 1.2×10^6 HCECs were resuspended in 300 µl of the appropriate Resuspension Buffer (included with the Neon transfection kits) and to which 45 μ g of the α 5-CAT test plasmid and 15 µg PXGH5 were added. The optimal electroporation parameters selected were the following: 100 μ l Neon Tip, 4x10⁵ cells/well, Electrolytic Buffer E², pulse voltage of 1150 volts, pulse width of 30 ms and pulse number of 2. HCECs were harvested 48 h following electroporation or until the desired coverage of the culture plate was achieved. CAT activities were determined and normalized to the amount of hGH secreted into the culture media and assayed using a kit for quantitative measurement of hGH (Medicorp, Montréal, Québec).^{45, 46} Each CAT value corresponded to the mean of at least three separate transfections done in triplicate.

3.5.5. Nuclear extracts and electrophoretic mobility shift assays (EMSA)

Nuclear extracts were prepared from RCECs grown to sub-confluence (70 % coverage) and to confluence (100% coverage) on culture dishes coated either with CIV or 2% BSA and also from HCECs grown to confluence (100% coverage) on culture dishes coated either with collagens (CI or CIV) or 2% BSA as previously reported.^{36, 47} EMSAs were conducted as described³⁵ by incubating 7.5 µg nuclear proteins from RCECs and 5.0 µg (for Sp1) or 10.0 µg (for AP-1, NFI and PAX6) nuclear proteins from HCECs with ³²P-end-labeled, double-stranded oligonucleotides bearing the binding sites for the transcription factors Sp1, NFI, AP-1 or PAX6. Formation of DNA/protein complexes was then monitored by gel electrophoresis on native polyacrylamide gels run against Tris-glycine buffer.⁴⁸ Gels were dried and autoradiographed at -80 °C for six hours to reveal the position of the shifted DNA-protein complexes generated.^{34-38, 49}

3.5.6. Western Blots

Western blots were conducted as described³⁶ using 10 µg (HCECs) or 30 µg (RCECs) from each nuclear protein extract and the membranes were blotted with the following primary antibodies (all from Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA): rabbit polyclonal antibodies against Sp1 (diluted 1:2000), Sp3 (1:2000), NFI (1:2000), c-Jun (1:2000), JunD (1:2000), FosB (1:2000), c-Fos (1:2000), FOSL1 (1:2000), FOSL2 (1:2000), PAX6 (1:2000), or mouse monoclonal antibodies against JunB (1:2000), and actin (CLT 9001; 1:40000). For detection of the α 5 integrin subunit in HCECs grown to sub-confluence (SC60%) and post-confluence for 5 days (PC-5d) on collagens or 2% BSA, a monoclonal antibody (final concentration of 10 µg/ml) directed against the human integrin subunit α 5 (P1D6; Chemicon, Temecula, CA) was selected as the primary antibody. The blots were then incubated with a 1:1000 dilution of a peroxidase-conjugated AffiniPure Goat secondary antibody against either mouse or rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Baltimore, PA, USA) and the labeling was revealed using a Western blot Detection Kit (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) as described.^{34, 38}

3.5.7. Gene expression profiling

Total RNA was isolated from HCECs grown to 100% confluence on either 2% BSA or collagen gels (CI or CIV) using the RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Toronto, ON, CA). Biological replicates were as follow: for the experiment on BSA, total RNA was obtained from 2 different preparations of HCECs cultured from 2 different donors (44- and 61-year old); for the experiment with CI, total RNA was isolated from 2 preparations of HCECs cultured from 2 different donors (52- and 61-year old); for the experiment with CIV, total RNA was isolated from 2 preparations of HCECs cultured from 2 different donors (44- and 45-year old). Cyanine 3-CTP labeled cRNA targets were prepared from 25 ng of total RNA, using the Agilent One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis kit (Agilent Technologies). Then 600 ng cRNA was incubated on a G4851A SurePrint G3 Human GE 8x60K array slide (60 000 probes, Agilent Technologies). Slides were then hybridized (Agilent protocol), washed and scanned on an Agilent SureScan Scanner according to the manufacturer's instructions. Data were finally analyzed using the ArrayStar V4.1 (DNASTAR, Madison, WI, USA) software for scatter plots and generation of the heat maps of selected genes of interest. All data generated from the arrays were also analyzed by RMA ('Robust Multiarray Analysis') for background correction of the raw values. They were then transformed in Log2 base and quantile normalized before a linear model was fitted to the normalized data to obtain an expression measure for each probe set on each array. All microarray data presented in this study comply with the Minimum Information About a Microarray Experiment (MIAME) requirements. The gene expression data have been deposited NCBIs Gene Expression Omnibus (GEO, in http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/) and are accessible through GEO Series accession number (GSE65421).

3.5.8. Semi-quantitative RT-PCR assays

Total RNA was isolated from RCECs and HCECs at the indicated cell densities using the TRI REAGENT (Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, OH), reverse-transcribed and used for PCR amplification of the human α 5 and 18S ribosomal RNA. The DNA sequence of both the 5' and 3' template primers for human α 5 are listed in Supplementary

Table 3.1. The oligonucleotide primers used for the amplification of the 18S ribosomal RNA were provided in the Quantum RNA 18S Internal Standards kit (Ambion Inc., Austin, TX). Taq polymerase (Pharmacia-LKB) was selected for PCR amplification. Cycle parameters were the same for all primers used (denaturation 94°C, 30 sec; annealing 60°C, 30 sec; extension 72°C, 30 sec) with an identical number of cycles (26, 28, 30, 32, 34, and 36 cycles) for both sets of primers. The PCR-amplified DNAs were fractionated on a 10% polyacrylamide gel and their position revealed by ethidium bromide staining. The gel photograph was scanned using a Visage 110S Bioimage analyzer (Millipore, USA) in order to quantify the alterations in the amount of the α 5 and 18S PCR-amplified fragments at the various cell culture conditions selected.

3.5.9. Quantitative PCR (qRT-PCR)

Quantity and quality of total RNA from HCECs grown to 60% sub-confluence and to postconfluence for 5 days on either 2% BSA or collagens (CI or CIV) was assessed using an Agilent Technologies 2100 bioanalyzer and RNA 6000 Nano LabChip kit (Agilent Technologies). Reverse transcription was performed using random hexamer primers following the manufacturer's protocol for synthesis of the first strand cDNA (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit; Applied Biosystem, Foster City, CA, USA). Equal amounts of cDNA were run in quadruplicate and amplified in a 20 µl reaction containing 10 µl of 2X Brillant III Ultra-Fast SYBR Green QPCR Master Mix (Agilent Technologies), 250 nM of upstream and downstream primers, and 10 ng of cDNA target. No-template controls were also used as recommended. The mixture was incubated at 95°C for 3 min, and then cycled at 95°C for 10 sec and at 60°C for 20 sec 35 times using the QIAGEN Rotor-Gene Q real-time cycler. Amplification efficiencies were validated and normalized to the GAPDH mRNA transcript and quantity of target genes were calculated according to a standard curve. Primers were designed using Primer3 (v.0.4.0) and are listed in Supplementary Table 3.1.

Rapport-gratuit.com LE NUMERO I MONDIAL DU MÉMOIRES.

3.5.10. Statistical analyses

Statistical analysis of the data was performed using a one-way ANOVA and Dunnett's post-test were applied to analyze the significant variations. All global tests were statistically significant at a 95% confidence interval and significant variations were analyzed in relation to the control (*P < 0.05) (Prism 6.0; GraphPad Software, La Jolla, CA). Differences were considered to be statistically significant at P < 0.05. All data are also expressed as mean \pm SD.

3.6. Results

3.6.1. Collagens exert different regulatory influences on the human α 5 gene promoter in RCECs

As the corneal BM is constituted of several types of collagens,⁶ we examined whether some of them would influence the activity directed by the α 5 promoter *in vitro*. RCECs were therefore seeded on tissue culture plates coated either with BSA (as a negative control) or with various types of collagens (CI, CIII, CIV and CVI; 3 µg/cm²) and grown to confluence (100% coverage of the culture plate). They were then transfected with the recombinant construct -132 α 5-CAT that bears only the basal α 5 promoter.^{35, 36} As shown on Figure 3.1A, all collagen types suppressed the activity directed by the α 5 promoter in confluent cultures of RCECs, with both CI and CIV being the most effective at repressing $\alpha 5$ promoter activity (4- and 5-fold repression, respectively). Because CI but mostly CIV are predominantly expressed during corneal wound healing^{8, 10, 50, 51}, we therefore conducted all the remaining experiments using these latter types of collagens. To more precisely delineate the area from the $\alpha 5$ promoter that mediates the negative regulatory influence of collagens, RCECs were seeded on CIV (which proved to be the most potent suppressor of a5 promoter activity; see Figure 3.1A) and grown to confluence prior to their transfection with recombinant constructs bearing 5'-deletions from the α 5 promoter. Transfection of -954 α 5-CAT in RCECs grown on CIV yielded CAT activities that were more than 6-fold lower than those obtained with cells grown on BSA (Figure 3.1B). Deletion of the α 5 promoter down to position -132 (in -132 α 5-CAT) did not significantly alter the repressive influence

of CIV. However, CIV caused only a 2.2-fold repression when the α 5 promoter was deleted to position -92 (in -92 α 5-CAT). Further deletion of the α 5 promoter segment comprised between position -92 to -42 (in -42α5-CAT) entirely abolished CIV-mediated repression in RCECs indicating that the -132/-42 area is sufficient to ensure full responsiveness of the $\alpha 5$ promoter toward CIV. We next examined the response of the α 5 basal promoter toward different concentrations of CIV by transfecting RCECs seeded on tissue culture plates coated either with BSA (negative control) or with increasing concentrations of CIV (2-50 μ g/cm²) and grown to confluence (near 100% coverage of the culture plate) prior to their transfection with the recombinant construct $-132\alpha5$ -CAT. As shown on Figure 3.1C, as little as 2 μ g/cm² was sufficient to repress by approximately 5-fold the activity directed by the α 5 promoter. Increasing the concentration of CIV up to 50 µg/cm² did not raise further the repression of the α 5 promoter. On the other hand, increasing the concentration of CI caused a dramatic repression in the activity directed by the α 5 promoter that reached a plateau at 100 µg/cm² (for a near 170-fold repression) (Figure 3.1D). We therefore conclude that collagens negatively regulate the activity of the $\alpha 5$ gene promoter in RCECs grown to confluence via a segment from the α 5 basal promoter located between positions -132 to -42.

We then evaluated whether the cell density reached by RCECs may alter the cell's response toward both CI and CIV. RCECs were therefore seeded on tissue culture plates coated either with BSA (negative control), or with CI and CIV and grown to varying cell densities (sub-confluent (SC) and confluent (C), corresponding to 60% and 100% coverage of the culture plates, respectively). They were then transfected with either the $-132\alpha5/CAT$ construct that bears only the α 5 basal promoter, or the $-954\alpha5/CAT$ plasmid that extend beyond the basal promoter to include 5' flanking sequences up to position -954 relative to the α 5 mRNA start site. Consistent with the data from Figure 3.1, transfections of - $132\alpha5/CAT$ in confluent RCECs grown on either CI (CI_C) or CIV (CIV_C) caused a 5- to 6fold reduction in α 5 activity compared to BSA (Figure 3.2A). When transfected in subconfluent RCECs, a 7-fold repression was again observed for CI (CIV_{SC}). Similar results were also observed when the $-954\alpha5/CAT$ construct was transfected in both confluent and sub-confluent RCECs (Figure 3.2B). RT-PCR analyses confirmed the increased α 5 gene transcription when RCECs are grown to sub-confluence (4-fold increase upon normalization to the 18S mRNA), and its repression when they reach confluence (10-fold reduction upon normalization to the 18S mRNA) (Figure 3.2C). CIV has therefore the ability to either repress or activate α 5 promoter activity in a cell-density dependent manner. CIV has thus been selected for the remaining studies and compared with the influences of CI.

3.6.2. CIV alters both expression and DNA binding of the transcription factors that regulate expression of the α 5 gene

As we previously demonstrated that transcription directed by the α 5 promoter was essentially dictated by interaction of the transcription factors NFI (a strong repressor of a5 gene transcription), AP-1 (a strong activator of $\alpha 5$ gene expression), and Sp1/Sp3 (weak activators of $\alpha 5$ gene transcription) with the $\alpha 5$ basal promoter³⁴⁻³⁶, we next examined whether the expression and (or) DNA binding properties of these TFs might be altered by CIV. EMSA experiments were therefore conducted using nuclear extracts from RCECs grown to both sub-confluence and confluence in the presence of BSA (negative control) or CIV. As shown on Figure 3.3A, culturing RCECs at sub-confluence in the presence of CIV clearly improved the DNA binding capacity of Sp1 (compare lanes 2 and 3), NFI (compare lanes 5 and 6) and AP-1 (compare lanes 8 and 9), toward their respective high affinity target site (used as the labeled probe in these experiments) (Figure 3.3A, left panel). These increases in Sp1, NFI and AP-1 DNA binding also correlate with corresponding increases at the protein level, as revealed by Western blot analyses (Figure 3.3B, left panel). On the other hand, CIV caused a dramatic change in the electrophoretic mobility of the Sp1, Sp3 and AP-1 DNA-protein complexes, and in the almost complete disappearance of NFI binding when RCECs are grown to confluence (Figure 3.3A, right panel) which is exactly the opposite effect that FN exerts on both Sp1 and NFI in RCECs.⁴² This result is consistent with the disappearance of Sp1 and most of the AP-1 constituting subunits at the protein level (Figure 3.3B, right panel). On the other hand, the total amount of NFI proteins increased in RCECs grown to confluence on CIV suggesting that NFI proteins lack their

ability to bind their DNA target sites probably due to change in their post-translational modification status. We recently reported that DNA binding of NFI was entirely dependent on its phosphorylation⁵², which suggest that the lack of NFI binding observed when RCECs are grown to confluence on CIV may also rely on the lack of proper phosphorylation of this transcription factor.

3.6.3. The influence of collagens is different in human corneal epithelial cells

Because HCECs show characteristics that distinguish them from RCECs (such as the need for co-culture with a feeder layer), we therefore evaluated whether both CI and CIV would exert influences in HCECs similar to those observed in RCECs. To that purpose, HCECs were cultured on CI or CIV to either sub-confluence (SC) or complete confluence (C) and then transfected with the α 5 promoter bearing construct -132 α 5/CAT and -954 α 5/CAT. As shown on Figure 3.4A, CI had little influence, if any, on the activity directed by the α 5 promoter contained on the $-132\alpha 5/CAT$ plasmid in either sub-confluent (CI_{SC}) or confluent (CI_C) HCECs. On the other hand, CIV caused a significant increase in the CAT activity in a cell-density independent manner (2.5- and 2.2-fold increase in sub-confluent (CIV_{SC}) and confluent (CIV_c) HCECs compared to BSA, respectively). When the $-132\alpha 5/CAT$ construct was substituted by the -954 α 5/CAT plasmid, repression of α 5 promoter activity was observed using either CI or CIV at any cell density (Figure 3.4B). Quantitative PCR analyses further supported repression of the endogenous $\alpha 5$ gene transcription by both CI and CIV relative to BSA in HCECs grown to sub- or post-confluence (Figure 3.4C). These CI and CIV-dependent repressions of endogenous $\alpha 5$ gene transcription also translated into corresponding reductions in the amount of $\alpha 5$ integrin subunit at the protein level (reduction ranging from 2.5- to 15.5-fold upon normalization to actin levels), as revealed by Western blot analyses (Figure 3.4D). The reduced α 5 promoter activities observed in HCECs grown on collagens also correlate with reduced DNA binding interaction of Sp1 (Figure 3.5A, compare lanes 2 and 3) and NFI (Figure 3.5A, compare lanes 6 and 7) by CI, and AP-1 by CIV (Figure 3.5A, compare lanes 10 and 12). Interestingly, DNA binding of PAX-6, a transcription factor expressed in the cornea⁵³ that has been shown to participate to α 5 gene transcription⁵⁴ is also reduced by CIV (Figure 3.5A, compare lanes 14 with 16). However, very little change in the nuclear content of these transcription factors was observed by Western blot, with the exception of a weak decrease in the expression of the AP-1 subunits c-Fos and FosB in cells grown on CI, and c-Fos and Fra2 in cells grown on CIV (Figure 3.5B). Therefore, the reduced binding of these TFs to their respective target sites is more likely to be related to changes in their posttranslational status, as previously reported^{49, 52}, rather than to corresponding changes in their protein concentration. In addition, α 5 gene promoter repression in HCECs (Figure 3.2), which is also consistent with the less massive alterations in the expression of the transcription factors that drive expression of α 5 gene transcription in HCECs (Figure 3.5) compared with that observed in RCECs (Figure 3.3).

3.6.4. The genes signature of human corneal epithelial cells is influenced by collagens

We next conducted gene expression profiling on microarray using total RNA prepared from HCECs grown to confluence on either CI or CIV gels and compared their pattern of expressed genes to that of HCECs grown on BSA. Scatter plot analysis revealed moderate changes in the pattern of genes expressed by HCECs grown on either CI or CIV relative to those grown on BSA as indicated by the minor variations noted in the slope of the regression curves (R^2 =0.97 and 0.97 for HCECs grown on CI (Figure 3.6A, left panel) and CIV (Figure 3.6A, right panel), respectively).

A heatmap for all the genes showing a 2-fold or more expression variation unique to HCECs grown on CI and CIV compared to when they are grown solely on BSA was then generated (Figure 3.6B). A total of 3252 genes fitted into that category of differentially regulated genes when HCECs are grown on CI, which is consistent with the clearly different pattern obtained on the heatmap when cells grown on CI are compared with those grown on BSA (Figure 3.6B). On the other hand, the pattern obtained for HCECs grown on CIV is very similar to that of cells grown on BSA as there are only 349 genes whose expression is deregulated by more than 2-fold between these two conditions (Figure 3.6A).

and B). Of all these genes, 138 are commonly deregulated by both CI and CIV, which also correspond to ~40% of all those deregulated in HCECs grown on CIV (Figure 3.6C).

We next examined the data files from the microarrays to sort out genes, beside $\alpha 5$, whose expression is the most deregulated in HCECs grown on CI and CIV. The filters from the Arraystar program were set to restrict the search to only the 55 most deregulated genes in HCECs grown either on CI or CIV relative to their expression level in HCECs grown on BSA. Of the 55 genes identified as deregulated in HCECs grown under each culture condition, 13 were similarly influenced (all repressed) by both CI and CIV (identified in red in panel D) (Figure 3.6D and Supplementary Table 3.2). We then randomly selected candidate genes among those that are repressed by CI and/or CIV (IGFBP6, ALOX15B, TNNT1, ALDH1A1, TMEM91, ALDH3A1, TXLNG, FOS and FOSB) among the 55 genes shown on panel D and validated their expression by qPCR. As shown on Figure 3.6E, analysis of the expression behavior for each of these randomly selected genes perfectly matched that observed by gene profiling on microarrays (Figure 3.6D). As AP-1 is a key regulator of $\alpha 5$ gene expression³⁵ and that both FOS (that encodes the AP-1 subunit c-Fos) and FOSB (that encodes the AP-1 subunit FosB) were among the 55 genes that are the most deregulated when HCECs are grown on CI (c-Fos, but not FosB, is also downregulated to a lesser level on CIV (see Supplementary Table 3.2)), we also examined whether these alterations also translate into similar changes at the protein level by Western blot. As is shown on Figure 3.6F, and consistent with the data from the microarray and Western blots from Figure 3.5B, expression of the c-Fos protein is considerably reduced (by 64%) in HCECs grown on CI and moderately reduced (by 27%) when they are grown on CIV, relative to their level in HCECs grown on BSA. Similarly, expression of FosB is reduced by 73% in HCECs grown on CI but not when they are grown on CIV, a result also consistent with the microarrays (Figure 3.6D) and Western blot analyses presented on Figure 3.5B.

3.6.5. Expression of the collagen binding integrins changes in HCECs grown on CI and CIV

Cells can adhere to the various collagens primarily through the integrins $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 10\beta 1$ or $\alpha 11\beta 1$ (reviewed in ref.⁵⁵). We therefore examined which of these integrins are expressed by HCECs and whether their expression is influenced by CI or CIV. HCECs cultured on CIV had morphological characteristics similar to those of HCECs grown on BSA with a large proportion of very small, highly proliferative cells (Figure 3.7A). On the other hand, many cells presented a round morphology when HCECs were grown on CIcoated culture plates indicating clearly that they were detaching from the coated surface. In addition, there were fewer small, less differentiated and highly proliferative cells on CI than on CIV. Examination of the microarray data indicates that expression of the al integrin subunit gene is barely detectable in HCECs whereas moderate levels are observed for the $\alpha 2$, $\alpha 10$ and $\alpha 11$ genes (Figure 3.7B). Interestingly, transcription of these integrin subunit genes was significantly reduced when HCECs were maintained on CI but not when grown on CIV. However, only the reduced expression noted for the $\alpha 10$ gene on CI could be validated by qPCR (Figure 3.7C). All four integrin subunits were found to be present at the cell surface of HCECs, as revealed by indirect immunofluorescence analyses, although both α^2 and α^{11} were clearly the predominant forms (Figure 3.7D). In addition, although expression of these integrin subunits may be subjected to alterations at the mRNA level when HCECs are grown on CI or CIV, no such alterations are obvious at the protein level.

3.7. Discussion

Corneal wound healing involves the integrated actions of multiple growth factors, cytokines and proteases produced by epithelial cells, stromal keratocytes, inflammatory cells and lacrimal gland cells. The remodeling of the corneal architecture that takes place after injury also requires proteins from the ECM, whose numerous interactions with specific cell surface integrin receptors trigger very critical signal transduction pathways that regulate various cellular responses during that mechanism. Alterations in the expression of some of the components from the ECM during the wound healing process can lead to corneal scarring or else alter corneal transparency, that would ultimately cause a reduction of the visual acuity.⁵⁶ The α 5 β 1 integrin is a major participant to corneal wound healing as it allows the attachment and migration of the epithelial cells to FN, whose secretion is dramatically increased during the early steps of that process.^{32, 57} Transcription of the gene encoding the α 5 subunit from the α 5 β 1 integrin has been demonstrated to be positively regulated by FN.³⁶ Besides FN, both CI and CIV are also subjected to profound alterations during the repair process of injured cornea.^{7, 8, 10} In this study, we verified whether culturing primary cultures of both RCECs and HCECs on collagen coated tissue-culture plates influences expression of the α 5 integrin subunit gene despite that the α 5 β 1 integrin is not a collagen-binding receptor.

Comparing the results between RCECs and HCECs grown on collagen-coated culture plates was well justified as the histological origin of both types of CECs is still a matter of debate. Indeed, most of the epithelial cells from the central area of human corneas are derived and continuously replaced by the epithelial stem cells from the limbal epithelial crypts, a special niche at the peripheral edge of the cornea.⁵⁸⁻⁶⁰ Upon request, such as during wound healing, these cells will undergo asymmetric division and give rise to transient amplifying cells (TACs). TACs then differentiate into mature HCECs that lose their ability to proliferate.^{61, 62} However, this scenario is far from being that simple with RCECs. Indeed, animal studies have shown that there are only approximately 100 progenitor cells that give rise to CECs.⁶³ A recent study by Haddad and Faria-e-Sousa suggested that rabbit corneal epithelial stem cells reside in the corneal basal layer rather than in the basal layer of the limbal area and that it is this cell population rather than those

from the limbus that have the task of renewing the rabbit corneal epithelium.⁶⁴ Their observations are consistent with the fact that HCECs from the central cornea can not be expanded efficiently in culture even when grown in the presence of a feeder layer,^{65, 66} unlike those from the central area of rabbit corneas (RCECs) that are easily cultured without any such feeder cells.^{67, 68} It can also explain why the amplitude of the α 5/CAT promoter response toward collagens differs between RCECs and HCECs. In addition, the difference in the response toward collagen noted between rabbit and human CECs may also rely on the fact that RCECs may express a pattern of collagen binding integrins quite different from that of HCECs. Although unlikely, HCECs from human donors of different ages or with varying post-mortem delays before they are put in culture may yield results that differ slightly when they are grown on collagen. In spite of this, our results demonstrated that both CI and CIV frequently acted negatively on the expression directed by the α 5 promoter in CECs especially when they reach confluence.

Our results demonstrate that the negative regulatory influence exerted by collagens in RCECs but not in HCECs, is determined by the α 5 promoter sequences located between positions -132 and -42 relative to the α 5 mRNA start site. Interestingly, this DNA region, which is required to ensure basal transcription of that gene, is also the same that we previously reported to bind the transcription factors Sp1/Sp3, AP-1 and NFI.³⁵ It is also this particular sequence that confers responsiveness of the $\alpha 5$ gene promoter toward FN.³⁶ In RCECs grown on CIV (that causes a more severe repression of α 5 promoter activity), both the expression and DNA binding of these transcription factors was dramatically reduced when they reached cell confluence. On the other hand, the significant increase in $\alpha 5$ promoter activity observed when RCECs are cultured to subconfluence on CIV also correlates with the increased DNA binding and expression of these transcription factors. Interestingly, a study by Takahra et al. reported that gels of collagen type I increased DNA binding of both Sp1 and AP-1 to the basal promoter of the MMP-9 gene in subconfluent rat hepatic stellate cells (HSCs), as revealed by EMSA analyses.⁶⁹ These observations further validate our hypothesis that collagens impact on the expression of the $\alpha 5$ gene by altering the expression and/or DNA binding properties of the transcription factors required to ensure expression of that gene during the progression of wound healing. Although we

could not observe a similar repression by the basal α 5 promoter (contained in the -132 α 5-CAT construct) when transfections were conducted in HCECs (Figure 3.4A), both the longer a5 promoter bearing construct -954a5-CAT (2.3-fold repression; Figure 3.4B) and the endogenous $\alpha 5$ gene (4.2-fold repression; Figure 3.4C) were consistently repressed in these cells when grown on either CI or CIV providing evidence that further upstream located negative regulatory elements are required to repress $\alpha 5$ gene transcription in HCECs.

Suppression of $\alpha 5$ gene expression has been reported to severely reduce cell adhesion and migration of both normal and cancer cells.⁷⁰⁻⁷² Consequently, the reduced expression of $\alpha 5$ when both RCECs and HCECs are cultured on collagen would then be expected to reduce the adhesion/migration properties of these cells. Indeed, attachment of fibroblasts to polymerized collagen was demonstrated to promote the formation of a β 1 integrin-protein phosphatase 2A (PP2A)-tuberous sclerosis complex 2 (TSC2) complex that represses S6K1 kinase activity and leads to repression of the G₁/S cell cycle transition phase thereby suppressing fibroblast proliferation.⁷³ More recently, culturing highly aggressive human breast cancer cells in 3-dimensional (3D) collagen type I was reported to suppress their proliferative properties by delaying S phase entry from G1 phase of the cell cycle and increasing the proportion of cells in G0.⁷⁴ Upon corneal injury, it is the massive secretion of FN that characterizes the very first changes occurring in the ECM, while in the mean time, CI and CIV temporarily disappear from the BM.^{8, 17, 18} This first step, that has been shown to require the interaction of $\alpha 5\beta 1$ with this temporary FN-enriched ECM, promotes cell adhesion and migration of CECs in order to completely cover the denuded corneal surface. Once completely covered, FN expression returns to normal level whereas both CI and CIV reappear beneath the newly produced epithelium.^{8, 17, 18} One can then speculate that a particularly important function of the corneal BM collagens would consist to inform CECs that cell migration is no longer required, allowing them to differentiate vertically into suprabasal epithelial cells. However, more in depth analyses will be required to validate this hypothesis.



Microarray analyses revealed that CI obviously altered a much greater number of genes (3252) than CIV (349) in HCECs, a difference that is also highlighted by the much divergent pattern of genes whose expression is deregulated by more than 2-fold in HCECs grown on CI, whereas cells grown on CIV have a pattern closer to HCECs grown on BSA (Figure 3.6B). Interestingly, the genes encoding the AP-1 subunits c-Fos and FosB are among the 55 genes whose expression is the most deregulated when HCECs are grown on CI (Figure 3.6D and Supplementary Table 3.2), a result that is consistent with a reduction of both these proteins in Western blot (Figures 3.5B and 3.6F). Of the transcription factors that participate to basal transcription of the α 5 gene, AP-1 was found to be the most important positively-acting regulator of that gene.³⁵ Although not considered statistically significant as its expression level did not reach the more than 2-fold variation in gene expression settled as the lower limit, there is, however, an increased expression tendency for the gene encoding NFIA (1.5-fold increase), one out of four members from the NFI family that have been reported to act as strong negative regulators of α 5 gene expression.³⁵

Of the 55 genes identified as the most deregulated when HCECs are grown on CI and CIV, 13 (IGFBP6, ALOX15B, TNNT1, MAFA, ALDH1A1, ALDH3A1, SYT8, LSP1, TMEM91, PADI1, CRLF1, COL5A2 and TXLNG) are commonly deregulated (all repressed, with the exception of TXLNG) by both types of collagens, of which a few may be of importance in the wound healing process. For instance, aldehyde dehydrogenase (ALDH) is a family of enzymes that comprises 19 proteins in human that are involved in maintaining cellular homeostasis by metabolizing reactive aldehydes. They modulate several cellular functions such as proliferation, differentiation, survival as well as cellular response to oxidative stress. The protein encoded by the Aldehyde dehydrogenase 1 family, member A1 gene (ALDH1A1) which also belongs to the corneal crystallins family, also helps maintaining the transparency and refractory aspects of the cornea.⁷⁵ In addition, the protein encoded by the aldehyde dehydrogenase 3A1 (ALDH3A1) gene, reported to be expressed in the cornea, was suggested to contribute to the protection of the cornea against UV-induced oxidative damage.⁷⁶ Elevated levels of ALDH1A1 and ALDH3A1 are associated with poor clinical outcome and chemoresistance in a wide variety of human malignancies⁷⁷⁻⁷⁹ suggesting that the product of these genes may contribute to tumor

growth. Therefore, down-regulating ALDH1A1 and ALDH3A1 gene expression by a molecular mechanism involving intracellular signaling by CI and CIV, as reported in this study, might be required to restrict the growth ability of HCECs and prompt them to differentiate into suprabasal cells.

Besides, the gene coding for Arachidonate 15-Lipoxygenase (ALOX15B) has also been shown to be expressed by human corneal epithelial cells.⁸⁰ The 15-LOX-2 protein is a nonheme, iron-containing lipid peroxidizing enzyme that dioxygenates arachidonic acid. 15-LOX-2 has a very restricted expression pattern limited to prostate, lung, skin, and cornea.⁸¹ ⁸² Because of this tissue-restricted pattern of expression, it has been proposed that 15-LOX-2 may play a role in the normal development of these tissues, and any abnormality in its expression/function could contribute to their progression toward tumorigenesis. Therefore, signaling through collagens may also participate in the fine-tuned expression of the ALOX15B gene. Interestingly, the MAFA gene, whose expression is similarly co-repressed by both CI and CIV in microarray analysis, encodes for a bZIP transcription factor (mafA) that can induce sustained proliferation of postmitotic quail neuroretinal cells.⁸³ MafA was reported as sufficient to induce lens-specific crystallin expression in the head ectoderm of the chick.⁸⁴⁻⁸⁶ As of today, no study ever reported the expression of MafA in the cornea. Therefore, one of the many functions of CI and CIV might as well be to maintain low levels of expression of the MAFA gene in the cornea as it is not intended to be expressed in that tissue.

The varying influences of CI and CIV on the pattern of genes expressed by HCECs observed in the present study may depend on outside-in signaling through the use of different integrin-mediated signal transduction pathways. Our results demonstrated clearly that the predominant collagen-binding integrins expressed by HCECs are $\alpha 2\beta 1$ and $\alpha 11\beta 1$, although they also express both the $\alpha 1\beta 1$ and $\alpha 10\beta 1$ integrins to low levels. Collagen Type IV has been reported to trigger activation of the MAPK pathway through its interaction with the $\alpha 1\beta 1$ integrin.⁸⁷ In addition, culturing human colon cancer GEO cells on CIV was also demonstrated to activate the FAK/ERK/ μ -calpain pathway through interaction with the $\alpha 2\beta 1$ integrin, a signaling route thought to be particularly important for tumor cell

motility.⁸⁸ Furthermore, culturing LNCaP prostate cancer cells on CI led to activation of an intracellular signalization route, the FAK/src/paxillin/Rac/JNK transduction pathway,⁸⁹ very distinctive from that mentioned above for CIV, thus further supporting the possibility that different types of collagens may also activate different transduction pathways. In avian embryonic corneal epithelia, actin reorganization in response to exposition to collagen type I was found to be influenced by integrin-dependent signalization through the PI-3K and MAPK/MEK/ERK pathways.⁹⁰ Interestingly, expression of the α 11 β 1 integrin has been shown to be positively regulated by a TGF- β 2 signaling pathway when cardiac fibroblasts are cultured on glycated collagen. This TGF- β 2-dependent increase in expression is apparently mediated by a regulatory mechanism involving the positive action of the transcription factors Sp1 and Smad3.⁹¹ TGF- β (especially the TGF- β 1 isoform) is well known to be of importance during corneal wound healing,⁹² as are cytokines,⁹³ that often have opposite effects to those of the TGF- β isoforms.^{92, 94} Furthermore, both cytokines and growth factors have been recently shown to considerably improve immune tolerance after corneal transplantation.^{95, 96}

Taken together, these results demonstrate that along with FN, the changes occurring in the ECM's secretion of collagens also has an impact on the pattern of genes, that also comprises the α 5 integrin subunit gene, which become deregulated in response to corneal wound healing. Further studies using pharmacological inhibitors of key modulators from the major signal transduction pathways, or blocking antibodies directed against the collagen binding integrins expressed by HCECs, will be needed to precisely determine which signal transduction cascades become activated when these cells are grown on either CI and CIV.

3.8. Acknowledgments

The authors wish to thank Patrick Carrier (CUO-Recherche, Hôpital du Saint-Sacrement, Centre de recherche du CHU de Québec, Québec, QC, Canada) for his help with the primary culture of HCECs and Dr. Caroline Diorio (CHU de Québec, Hôpital du Saint-Sacrement, Québec (Qc), Canada) for her contribution to the statistical analysis of the data.

3.9. References

- 1. Espana EM, Ti SE, Grueterich M, Touhami A, Tseng SC. Corneal stromal changes following reconstruction by ex vivo expanded limbal epithelial cells in rabbits with total limbal stem cell deficiency. *Br J Ophthalmol* 2003;87:1509-1514.
- 2. Carter RT. The role of integrins in corneal wound healing. *Vet Ophthalmol* 2009;12 Suppl 1:2-9.
- 3. Lu L, Reinach PS, Kao WW. Corneal epithelial wound healing. *Exp Biol Med* (*Maywood*) 2001;226:653-664.
- 4. Nishida T, Tanaka T. Extracellular matrix and growth factors in corneal wound healing. *Curr Opin Ophthalmol* 1996;7:2-11.
- 5. Vigneault F, Zaniolo K, Gaudreault M, Gingras ME, Guerin SL. Control of integrin genes expression in the eye. *Prog Retin Eye Res* 2007;26:99-161.
- 6. Zieske JD. Extracellular matrix and wound healing. *Curr Opin Ophthalmol* 2001;12:237-241.
- 7. Martin GR, Timpl R. Laminin and other basement membrane components. *Annu Rev Cell Biol* 1987;3:57-85.
- 8. Nakayasu K, Tanaka M, Konomi H, Hayashi T. Distribution of types I, II, III, IV and V collagen in normal and keratoconus corneas. *Ophthalmic Res* 1986;18:1-10.
- 9. Tuori A, Uusitalo H, Burgeson RE, Terttunen J, Virtanen I. The immunohistochemical composition of the human corneal basement membrane. *Cornea* 1996;15:286-294.
- 10. Zimmermann DR, Trueb B, Winterhalter KH, Witmer R, Fischer RW. Type VI collagen is a major component of the human cornea. *FEBS letters* 1986;197:55-58.
- 11. Castro-Munozledo F. Review: corneal epithelial stem cells, their niche and wound healing. *Mol Vis* 2013;19:1600-1613.
- 12. Kabosova A, Azar DT, Bannikov GA, et al. Compositional differences between infant and adult human corneal basement membranes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48:4989-4999.
- 13. Schlotzer-Schrehardt U, Dietrich T, Saito K, et al. Characterization of extracellular matrix components in the limbal epithelial stem cell compartment. *Exp Eye Res* 2007;85:845-860.
- 14. Kuo IC. Corneal wound healing. *Curr Opin Ophthalmol* 2004;15:311-315.

- 15. Sta Iglesia DD, Stepp MA. Disruption of the basement membrane after corneal debridement. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:1045-1053.
- 16. Stepp MA, Zieske JD, Trinkaus-Randall V, et al. Wounding the cornea to learn how it heals. *Exp Eye Res* 2014;121:178-193.
- 17. Tanaka T, Furutani S, Nakamura M, Nishida T. Changes in extracellular matrix components after excimer laser photoablation in rat cornea. *Jpn J Ophthalmol* 1999;43:348-354.
- 18. Ljubimov AV, Alba SA, Burgeson RE, et al. Extracellular matrix changes in human corneas after radial keratotomy. *Exp Eye Res* 1998;67:265-272.
- 19. Ljubimov AV, Burgeson RE, Butkowski RJ, et al. Extracellular matrix alterations in human corneas with bullous keratopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996;37:997-1007.
- 20. Dyrlund TF, Poulsen ET, Scavenius C, et al. Human cornea proteome: identification and quantitation of the proteins of the three main layers including epithelium, stroma, and endothelium. *J Proteome Res* 2012;11:4231-4239.
- 21. Lauweryns B, van den Oord JJ, Volpes R, Foets B, Missotten L. Distribution of very late activation integrins in the human cornea. An immunohistochemical study using monoclonal antibodies. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991;32:2079-2085.
- 22. Stepp MA. Corneal integrins and their functions. *Exp Eye Res* 2006;83:3-15.
- 23. Hynes RO. Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell* 1987;48:549-554.
- 24. Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 1992;69:11-25.
- 25. Suzuki K, Saito J, Yanai R, et al. Cell-matrix and cell-cell interactions during corneal epithelial wound healing. *Prog Retin Eye Res* 2003;22:113-133.
- 26. Clark EA, Brugge JS. Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science* 1995;268:233-239.
- 27. Plow EF, Haas TA, Zhang L, Loftus J, Smith JW. Ligand binding to integrins. *J Biol Chem* 2000;275:21785-21788.
- 28. Garana RM, Petroll WM, Chen WT, et al. Radial keratotomy. II. Role of the myofibroblast in corneal wound contraction. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1992;33:3271-3282.

- 29. Liu Y, Yanai R, Lu Y, Kimura K, Nishida T. Promotion by fibronectin of collagen gel contraction mediated by human corneal fibroblasts. *Exp Eye Res* 2006;83:1196-1204.
- 30. Stepp MA, Zhu L. Upregulation of alpha 9 integrin and tenascin during epithelial regeneration after debridement in the cornea. *J Histochem Cytochem* 1997;45:189-201.
- 31. Blanco-Mezquita JT, Hutcheon AE, Stepp MA, Zieske JD. alphaVbeta6 integrin promotes corneal wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52:8505-8513.
- 32. Murakami J, Nishida T, Otori T. Coordinated appearance of beta 1 integrins and fibronectin during corneal wound healing. *J Lab Clin Med* 1992;120:86-93.
- 33. Nishida T, Nakamura M, Mishima H, Otori T. Differential modes of action of fibronectin and epidermal growth factor on rabbit corneal epithelial migration. *J Cell Physiol* 1990;145:549-554.
- 34. Gingras ME, Larouche K, Larouche N, Leclerc S, Salesse C, Guerin SL. Regulation of the integrin subunit alpha5 gene promoter by the transcription factors Sp1/Sp3 is influenced by the cell density in rabbit corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:3742-3755.
- 35. Gingras ME, Masson-Gadais B, Zaniolo K, et al. Differential binding of the transcription factors Sp1, AP-1, and NFI to the promoter of the human alpha5 integrin gene dictates its transcriptional activity. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50:57-67.
- 36. Larouche K, Leclerc S, Salesse C, Guerin SL. Expression of the alpha 5 integrin subunit gene promoter is positively regulated by the extracellular matrix component fibronectin through the transcription factor Sp1 in corneal epithelial cells in vitro. *J Biol Chem* 2000;275:39182-39192.
- 37. Gaudreault M, Vigneault F, Gingras ME, et al. Transcriptional regulation of the human alpha6 integrin gene by the transcription factor NFI during corneal wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008; 49:3758-3767.
- 38. Gaudreault M, Vigneault F, Leclerc S, Guerin SL. Laminin reduces expression of the human alpha6 integrin subunit gene by altering the level of the transcription factors Sp1 and Sp3. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48:3490-3505.
- 39. Gaudreault M, Carrier P, Larouche K, et al. Influence of sp1/sp3 expression on corneal epithelial cells proliferation and differentiation properties in reconstructed tissues. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:1447-1457.
- 40. Germain L, Auger FA, Grandbois E, et al. Reconstructed human cornea produced in vitro by tissue engineering. *Pathobiology* 1999;67:140-147.

- 41. Boisjoly HM, Laplante C, Bernatchez SF, Salesse C, Giasson M, Joly MC. Effects of EGF, IL-1 and their combination on in vitro corneal epithelial wound closure and cell chemotaxis. *Exp Eye Res* 1993;57:293-300.
- 42. Zaniolo K, Gingras ME, Audette M, Guerin SL. Expression of the gene encoding poly(ADP-ribose) polymerase-1 is modulated by fibronectin during corneal wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47:4199-4210.
- 43. Beliveau A, Leclerc S, Rouleau M, Guerin SL. Multiple cloning sites from mammalian expression vectors interfere with gene promoter studies in vitro. *Eur J Biochem* 1999;261:585-590.
- 44. Birkenmeier TM, McQuillan JJ, Boedeker ED, Argraves WS, Ruoslahti E, Dean DC. The alpha 5 beta 1 fibronectin receptor. Characterization of the alpha 5 gene promoter. *J Biol Chem* 1991;266:20544-20549.
- 45. Selden RF, Howie KB, Rowe ME, Goodman HM, Moore DD. Human growth hormone as a reporter gene in regulation studies employing transient gene expression. *Mol Cell Biol* 1986;6:3173-3179.
- 46. Pothier F, Ouellet M, Julien JP, Guerin SL. An improved CAT assay for promoter analysis in either transgenic mice or tissue culture cells. *DNA Cell Biol* 1992;11:83-90.
- 47. Roy RJ, Gosselin P, Guerin SL. A short protocol for micro-purification of nuclear proteins from whole animal tissue. *BioTechniques* 1991;11:770-777.
- 48. Schneider R, Gander I, Muller U, Mertz R, Winnacker EL. A sensitive and rapid gel retention assay for nuclear factor I and other DNA-binding proteins in crude nuclear extracts. *Nucleic Acids Res* 1986;14:1303-1317.
- 49. Lake J, Zaniolo K, Gaudreault M, et al. Expression of the alpha5 integrin gene in corneal epithelial cells cultured on tissue-engineered human extracellular matrices. *Biomaterials* 2013;34:6367-6376.
- 50. Sato N, Nakamura M, Chikama T, Nishida T. Abnormal deposition of laminin and type IV collagen at corneal epithelial basement membrane during wound healing in diabetic rats. *Jpn J Ophthalmol* 1999;43:343-347.
- 51. Katakami C, Fujisawa K, Sahori A, et al. Localization of collagen (I) and collagenase mRNA by in situ hybridization during corneal wound healing after epikeratophakia or alkali-burn. *Jpn J Ophthalmol* 1992;36:10-22.
- 52. Duval C, Gaudreault M, Vigneault F, et al. Rescue of the transcription factors Sp1 and NFI in human skin keratinocytes through a feeder-layer-dependent suppression of the proteasome activity. *J Mol Biol* 2012;418:281-299.
- 53. Zhang W, Cveklova K, Oppermann B, Kantorow M, Cvekl A. Quantitation of PAX6 and PAX6(5a) transcript levels in adult human lens, cornea, and monkey retina. *Mol Vis* 2001;7:1-5.
- 54. Duncan MK, Kozmik Z, Cveklova K, Piatigorsky J, Cvekl A. Overexpression of PAX6(5a) in lens fiber cells results in cataract and upregulation of (alpha)5(beta)1 integrin expression. *J Cell Sci* 2000;113 (Pt 18):3173-3185.
- 55. Zeltz C, Orgel J, Gullberg D. Molecular composition and function of integrin-based collagen glues-introducing COLINBRIS. *Biochim Biophys Acta* 2014;1840:2533-2548.
- 56. Jester JV, Moller-Pedersen T, Huang J, et al. The cellular basis of corneal transparency: evidence for 'corneal crystallins'. *J Cell Sci* 1999;112 (Pt 5):613-622.
- 57. Kang SJ, Kim EK, Kim HB. Expression and distribution of extracellular matrices during corneal wound healing after keratomileusis in rabbits. *Ophthalmologica* 1999;213:20-24.
- 58. Dua HS, Shanmuganathan VA, Powell-Richards AO, Tighe PJ, Joseph A. Limbal epithelial crypts: a novel anatomical structure and a putative limbal stem cell niche. *Br J Ophthalmol* 2005;89:529-532.
- 59. Kulkarni BB, Tighe PJ, Mohammed I, et al. Comparative transcriptional profiling of the limbal epithelial crypt demonstrates its putative stem cell niche characteristics. *BMC Genomics* 2010;11:526.
- 60. Sun TT, Tseng SC, Lavker RM. Location of corneal epithelial stem cells. *Nature* 2010;463:E10-11; discussion E11.
- 61. Castro-Munozledo F, Gomez-Flores E. Challenges to the study of asymmetric cell division in corneal and limbal epithelia. *Exp Eye Res* 2011;92:4-9.
- 62. Ordonez P, Di Girolamo N. Limbal epithelial stem cells: role of the niche microenvironment. *Stem Cells* 2012;30:100-107.
- 63. Mort RL, Ramaesh T, Kleinjan DA, Morley SD, West JD. Mosaic analysis of stem cell function and wound healing in the mouse corneal epithelium. *BMC Dev Biol* 2009;9:4.
- 64. Haddad A, Faria-e-Sousa SJ. Maintenance of the corneal epithelium is carried out by germinative cells of its basal stratum and not by presumed stem cells of the limbus. *Braz J Med Biol Res* 2014;47:470-477.
- 65. Ebato B, Friend J, Thoft RA. Comparison of central and peripheral human corneal epithelium in tissue culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1987;28:1450-1456.

- 66. Lindberg K, Brown ME, Chaves HV, Kenyon KR, Rheinwald JG. In vitro propagation of human ocular surface epithelial cells for transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993;34:2672-2679.
- 67. Hackworth LA, Faraji-Shadan F, Schuschereba ST, Bowman PD. Serum-free culture of porcine and rabbit corneal epithelial cells. *Curr Eye Res* 1990;9:919-923.
- 68. Mimura T, Yamagami S, Uchida S, et al. Isolation of adult progenitor cells with neuronal potential from rabbit corneal epithelial cells in serum- and feeder layer-free culture conditions. *Mol Vis* 2010;16:1712-1719.
- 69. Takahra T, Smart DE, Oakley F, Mann DA. Induction of myofibroblast MMP-9 transcription in three-dimensional collagen I gel cultures: regulation by NF-kappaB, AP-1 and Sp1. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36:353-363.
- 70. Linhares-Lacerda L, Ribeiro-Alves M, Nogueira AC, et al. RNA interferencemediated knockdown of CD49e (alpha5 integrin chain) in human thymic epithelial cells modulates the expression of multiple genes and decreases thymocyte adhesion. *BMC Genomics* 2010;11 Suppl 5:S2.
- 71. White LR, Blanchette JB, Ren L, Awn A, Trpkov K, Muruve DA. The characterization of alpha5-integrin expression on tubular epithelium during renal injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007;292:F567-576.
- 72. Mierke CT, Frey B, Fellner M, Herrmann M, Fabry B. Integrin alpha5beta1 facilitates cancer cell invasion through enhanced contractile forces. *J Cell Sci* 2011;124:369-383.
- 73. Xia H, Nho R, Kleidon J, Kahm J, Henke CA. Polymerized collagen inhibits fibroblast proliferation via a mechanism involving the formation of a beta1 integrinprotein phosphatase 2A-tuberous sclerosis complex 2 complex that suppresses S6K1 activity. *J Biol Chem* 2008;283:20350-20360.
- 74. Wu Y, Guo X, Brandt Y, Hathaway HJ, Hartley RS. Three-dimensional collagen represses cyclin E1 via beta1 integrin in invasive breast cancer cells. *Breast cancer Res Treat* 2011;127:397-406.
- 75. Lassen N, Black WJ, Estey T, Vasiliou V. The role of corneal crystallins in the cellular defense mechanisms against oxidative stress. *Semin Cell Dev Biol* 2008;19:100-112.
- 76. Estey T, Chen Y, Carpenter JF, Vasiliou V. Structural and functional modifications of corneal crystallin ALDH3A1 by UVB light. *PloS One* 2010;5:e15218.
- 77. Croker AK, Allan AL. Inhibition of aldehyde dehydrogenase (ALDH) activity reduces chemotherapy and radiation resistance of stem-like ALDHhiCD44(+) human breast cancer cells. *Breast cancer Res Treat* 2012;133:75-87.

- 78. Sun QL, Sha HF, Yang XH, Bao GL, Lu J, Xie YY. Comparative proteomic analysis of paclitaxel sensitive A549 lung adenocarcinoma cell line and its resistant counterpart A549-Taxol. *J Cancer Res Clin Oncol* 2011;137:521-532.
- 79. Xing Y, Luo DY, Long MY, Zeng SL, Li HH. High ALDH1A1 expression correlates with poor survival in papillary thyroid carcinoma. *World J Surg Oncol* 2014;12:29.
- 80. Liminga M, Hornsten L, Sprecher HW, Oliw EH. Arachidonate 15-lipoxygenase in human corneal epithelium and 12- and 15-lipoxygenases in bovine corneal epithelium: comparison with other bovine 12-lipoxygenases. *Biochim Biophys Acta* 1994;1210:288-296.
- 81. Brash AR, Boeglin WE, Chang MS. Discovery of a second 15S-lipoxygenase in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:6148-6152.
- 82. Kilty I, Logan A, Vickers PJ. Differential characteristics of human 15-lipoxygenase isozymes and a novel splice variant of 15S-lipoxygenase. *Eur J Biochem* 1999;266:83-93.
- 83. Benkhelifa S, Provot S, Lecoq O, Pouponnot C, Calothy G, Felder-Schmittbuhl MP. mafA, a novel member of the maf proto-oncogene family, displays developmental regulation and mitogenic capacity in avian neuroretina cells. *Oncogene* 1998;17:247-254.
- 84. Ogino H, Yasuda K. Induction of lens differentiation by activation of a bZIP transcription factor, L-Maf. *Science* 1998;280:115-118.
- 85. Shimada N, Aya-Murata T, Reza HM, Yasuda K. Cooperative action between L-Maf and Sox2 on delta-crystallin gene expression during chick lens development. *Mech Dev* 2003;120:455-465.
- 86. Yoshida T, Yasuda K. Characterization of the chicken L-Maf, MafB and c-Maf in crystallin gene regulation and lens differentiation. *Genes Cells* 2002;7:693-706.
- 87. Sudhakar A, Nyberg P, Keshamouni VG, et al. Human alpha1 type IV collagen NC1 domain exhibits distinct antiangiogenic activity mediated by alpha1beta1 integrin. *J Clin Invest* 2005;115:2801-2810.
- 88. Sawhney RS, Cookson MM, Omar Y, Hauser J, Brattain MG. Integrin alpha2mediated ERK and calpain activation play a critical role in cell adhesion and motility via focal adhesion kinase signaling: identification of a novel signaling pathway. *J Biol Chem* 2006;281:8497-8510.
- 89. Van Slambrouck S, Jenkins AR, Romero AE, Steelant WF. Reorganization of the integrin alpha2 subunit controls cell adhesion and cancer cell invasion in prostate cancer. *Int J Oncol* 2009;34:1717-1726.



- 90. Chu CL, Reenstra WR, Orlow DL, Svoboda KK. Erk and PI-3 kinase are necessary for collagen binding and actin reorganization in corneal epithelia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:3374-3382.
- 91. Talior-Volodarsky I, Arora PD, Wang Y, et al. Glycated collagen induces alpha11 integrin expression through TGF-beta2 and Smad3. *J Cell Physiol* 2015;230:327-336.
- 92. Carrington LM, Albon J, Anderson I, Kamma C, Boulton M. Differential regulation of key stages in early corneal wound healing by TGF-beta isoforms and their inhibitors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47:1886-1894.
- 93. Pal-Ghosh S, Pajoohesh-Ganji A, Menko AS, et al. Cytokine deposition alters leukocyte morphology and initial recruitment of monocytes and gammadeltaT cells after corneal injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014;55:2757-2765.
- 94. Kaur H, Chaurasia SS, Agrawal V, Suto C, Wilson SE. Corneal myofibroblast viability: opposing effects of IL-1 and TGF beta1. *Exp Eye Res* 2009;89:152-158.
- 95. Li B, Tian L, Diao Y, Li X, Zhao L, Wang X. Exogenous IL-10 induces corneal transplantation immune tolerance by a mechanism associated with the altered Th1/Th2 cytokine ratio and the increased expression of TGF-beta. *Mol Med Rep* 2014b;9:2245-2250.
- 96. Wang X, Wang W, Xu J, Wu S, Le Q. All-trans retinoid acid promotes allogeneic corneal graft survival in mice by regulating Treg-Th17 balance in the presence of TGF-beta. *BMC Immunol* 2015;16:17.

3.10. Figure legends

Figure 3.1. Activity of the α 5 promoter in RCECs grown on culture plates coated with collagens

(A) The plasmid -132 α 5 was transfected into confluent RCECs seeded on tissue-culture plates coated with 2% BSA (used as a negative control) or on collagen types I, III, IV and VI (CI, CIII, CIV and CVI, respectively). Values are expressed as the ratio of CAT activities from cells grown with collagen over that from cells grown on BSA. (B) Recombinant plasmids bearing 5'-deletions of the α 5 promoter were transfected in confluent RCECs grown on CIV (3 µg/cm²). CAT activities were normalized as in panel A. (C) RCECs were seeded on culture plates coated with varying concentrations of CIV (2 to 50 µg/cm²) and transfected at confluence with the plasmid -132 α 5. CAT activities were normalized as in panel A. (D) RCECs were seeded on culture plates containing increasing concentrations of CI (25 to 200 µg/cm²) and transfected at confluence with the plasmid -132 α 5. For all panels, asterisks (*) indicate CAT activities considered to be statistically significant relative to those measured in cells grown on BSA (one-way ANOVA, Dunnett's post-test ; P < 0.05). Standard deviation is also indicated.

Figure 3.2. Influence of collagens on α5 promoter activity in RCECs grown to varying cell densities

(A and B) RCECs were seeded on culture plates containing CI (75 μ g/cm²) or CIV (50 μ g/cm²) and transfected at both sub-confluence (SC) and confluence (C) with the plasmids -132 α 5 (panel A) and -954 α 5 (panel B). CAT activities are expressed as the ratio of cells grown on collagen over that from cells grown on BSA. Asterisks (*) indicate CAT activities from transfected RCECs grown on either CI or CIV that are statistically different from those measured in transfected cells grown on BSA (one-way ANOVA, Dunnett's post-test; P < 0.05). (C) Total RNAs extracted from RCECs grown on BSA or on CIV-coated culture plates were reverse-transcribed and PCR amplified using synthetic, oligonucleotide primers specific to both the α 5 and 18S ribosomal RNAs. Values shown correspond to the α 5 signal intensity normalized to that of 18S RNA.

Figure 3.3. Influence of CIV on the expression and DNA binding properties of Sp1, NFI and AP-1.

(A) Nuclear proteins (7.5µg) from both subconfluent (SC) and confluent (C) RCECs grown on BSA or on CIV-coated culture plates (3 μ g/cm²) were incubated with 5'-end labeled oligonucleotides bearing the high affinity binding site for Sp1, AP-1 and NFI. Formation of the DNA-protein complexes was then monitored by EMSA. The position of the Sp1/Sp3, AP-1 and NFI complexes is indicated. U: unbound fraction of the probe. P: labeled probe with no added proteins. (B) Approximately 30 µg nuclear proteins from the extracts used in panel A were Western blotted with antibodies against the TFs Sp1, Sp3, NFI, JunB, c-Jun, JunD, FosB, c-Fos, Fra-1 and Fra-2. Actin expression was also monitored as a normalization control. The position of the nearest molecular mass markers is indicated.

Figure 3.4. Activity of the α5 promoter in HCECs grown to varying cell densities on collagen coated culture plates

(A and B) HCECs were seeded on culture plates containing CI (75 μ g/cm²) or CIV (50 μ g/cm²) and transfected at both sub-confluence (SC) and confluence (C) with the plasmids -132 α 5 (panel A) and -954 α 5 (panel B). CAT activities are expressed as the ratio of cells grown on collagen over that from cells grown on BSA. Asterisks (*) indicate CAT activities from transfected HCECs grown on either CI or CIV that are statistically different from those measured in transfected cells grown on BSA (one-way ANOVA, Dunnett's post-test; P < 0.05). (C) qPCR analysis of α 5 gene expression conducted on total RNA extracted from sub-confluent (SC) or post-confluent (PC) HCECs grown on BSA or on either CI- or CIV-coated culture plates. Data were normalized to GAPDH and their statistical relevance analyzed by one-way ANOVA (Dunnett's post-test; P < 0.05). (D) Western blots conducted on total proteins extracted from HCECs grown to sub-confluence (SC) or post-confluence (PC) on BSA or either CI- or CIV-coated culture plates using antibodies against the α 5 integrin subunit and actin (loading control). Signal intensities were determined by densitometric analysis and are presented as the ratio of α 5 protein over that of actin.

Figure 3.5. Influence of CI and CIV on the expression and DNA binding properties of Sp1, NFI, AP-1 and PAX-6 in HCECs.

(A) Nuclear proteins (5μ g or 10μ g) from confluent HCECs grown on culture plates containing CI ($75 \ \mu$ g/cm²) or CIV ($50 \ \mu$ g/cm²) were incubated with 5'-end labeled oligonucleotides bearing the high affinity binding site for Sp1, AP-1, NFI and PAX-6. Formation of the DNA-protein complexes was then monitored by EMSA as in Figure 3.3. NS: non-specific complex. (**B**) Approximately 10 μ g nuclear proteins from the extracts used in panel A were Western blotted with antibodies against the TFs Sp1, Sp3, NFI, PAX-6 and the AP-1 subunits JunB, c-Jun, JunD, FosB, c-Fos, Fra-1 and Fra-2. Actin expression was also monitored as a normalization control. The position of the nearest molecular mass markers is indicated.

Figure 3.6. Microarray analysis of gene expression patterns in HCECs grown on collagens I and IV

(A) Scatter plots of \log_2 of signal intensity from 60 000 different targets covering the entire human transcriptome of HCECs grown on BSA (y-axis) plotted against HCECs grown on CI (x-axis; left panel) or CIV (x-axis; right panel) at confluence. (B) Heatmap representation of genes whose expression is differentially regulated by at least 2-fold in HCECs grown on BSA against cells grown on collagen (CI or CIV). The color scale used to display the log₂ expression level values is 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) Vein diagram that depicts the number of deregulated genes in HCECs grown on CI (red circle) or CIV (green circle) relative to cells grown on BSA. Deregulated genes common to both culture conditions (CI and CIV) are also indicated (in yellow). (D) Heatmap representation of the 55 most deregulated genes expressed by HCECs grown at confluence on collagen (CI and CIV) relative to their levels in HCECs grown on BSA. Deregulated genes common to both culture conditions (CI and CIV) are indicated in red. (E) qPCR analysis of randomly selected genes whose expression has been found to be altered by CI and/or CIV by microarray. Data were normalized to GAPDH and their statistical relevance analyzed by one-way ANOVA (Dunnett's post-test; P < 0.05). (F) Western blots conducted on total proteins extracted from HCECs grown on BSA or either CI- or CIV culture plates using antibodies against the proteins c-Fos, FosB and actin (loading control). Signal intensities were determined by densitometric analysis and are presented as the ratio of the target protein over that of actin.

Figure 3.7. Collagen binding integrins expressed by HCECs grown on collagens I and IV

(A) Phase contrast micrographs of HCECs grown on BSA or on either CI or CIV (magnification: 4x or 10x; scale bar: 20 μ M). (B) Heatmap representation of all α integrin subunit genes reported to bind collagens and expressed by HCECs grown on BSA against cells grown on either CI or CIV. (C) qPCR analysis of α 1, α 2, α 10 and α 11 integrin mRNA transcript in HCECs grown on BSA (control) or on either CI or CIV. Data were normalized to GAPDH and their statistical relevance analyzed by one-way ANOVA (Dunnett's post-test; P < 0.05). (D) Immunofluorescence analysis of α 1, α 2, α 10 and α 11 integrin expression (in green) in HCECs grown on BSA or on either CI or CIV. Isotypic non-immune antibodies (either rabbit or mouse anti-IgG) were also used as negative controls. Nuclei were counterstained with Hoechst 33258 reagent and appear in blue. Scale bar: 20 μ M.



Figure 3.1. Activity of the α 5 promoter in RCECs grown on culture plates coated with collagens.



Figure 3.2. Influence of collagens on $\alpha 5$ promoter activity in RCECs grown to varying cell densities.



Figure 3.3. Influence of CIV on the expression and DNA binding properties of Sp1, NFI and AP-1.



Figure 3.4. Activity of the α 5 promoter in HCECs grown to varying cell densities on collagen coated culture plates.



Figure 3.5. Influence of CI and CIV on the expression and DNA binding properties of Sp1, NFI, AP-1 and PAX-6 in HCECs.



Figure 3.6. Microarray analysis of gene expression patterns in HCECs grown on collagens I and IV.

Rapport-gratuit.com Le numero 1 mondial du mémoires

203



Figure 3.7. Collagen binding integrins expressed by HCECs grown on collagens I and IV.

3.11. Supplementary data

Supplementary Table 3.1. DNA sequence of the primers and double-stranded oligonucleotides.

Carra	Forward Primer (5'-3')	Genebank
Gene	Reverse Primer (5'-3')	#
	CCATTCACAGTTCTTTGGG	NIM 002205
IIGAS	GAGCTGCCAGGTCTTAACTC	INIVI_002205
	ACAGTCAGCACTCGTAAATGC	NM 191501
IIGAI	GTACTTTCCAATCACCTTGGG	INIVI_101301
	ACTGTTTCCAGGGAGTAGTTG	NM 073105
IIGAZ	GTAGCTAGAGGCCAGGAATG	
	TTGGGTCATGGACAGTAAAGG	NM 003637
IIGAIU	TAGTCAACCACCCAATCAGGT	INIVI_003037
	GTCCTGAGATGAGAGGTAGC	NIM 0001004430
	GCAAGAAGACGTGGGAATGC	1111_0001004439
ICERP6	GCTGTTGCAGAGGAGAATCC	NM 002178
	CTGAGTCCAGATGTCTACGG	
AL OVR5	TTATGGTCACCCAACTCAAGG	NM 001141
ALUADS	TTGGTAGAGGTGGAGTCTCG	
TNNT1	GCTGGAGTCTGAGAAGTTCG	NM 003283
	ACCGATGGGACAAACACTCC	INIVI_003283
AI DH1A1	ATCCAGGGCCGTACAATACC	NM 000680
ALDIIIAI	GAGCAGTGAGAGGAGTTTGC	
TMFM01	GGGTTTGCAGTTCCTGTCAC	NM 001098821
	CCAGAAACAACACAGCATGGA	1001070021
AT DH3A1	AAGAAATCCCGGGACTATGG	NM 000691
ALDIIJAI	AGATCTCCTCTTGCATCACC	
FOS	GCTGGTGCATTACAGAGAGG	NM 005252
rus	CTCCGGAAGAGGTAAGGAC	
FOSR	GAGTGAGACTGAGGGATCG	NM 006732
FOSD	CCACAAGTACAGCATGGG	
САРДН	AAGGTCGGAGTCAACGGAT	NM 002046
UAI DII	GGAAGATGGTGATGGGATTTC	11111_002040

Primers for qPCR analyses

Primers for RT-PCR analyses

Gene	Forward Primer (5'-3') Reverse Primer (5'-3')	Genebank #
ITGA5	GGCAGCTATGGCGTCCCACTGTGG GGCATCAGAGGTGGCTGGAGGCTT	NM_002205

Oligonucleotides used as labeled probes in the EMSAs

Oligonucleotide	Top strand (5'-3') Bottom strand (5'-3')
Sp1	GATCATATCTGCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
NFI	TTATTTTGGATTGAAGCCAATATGAG
	CTCATATTGGCTTCAATCCAAAATAA
AP-1	GATCGAGGCGAATGACTCAACGCGGG
PAX-6	GATCATCCAGGTCTACTACATTAGTTCCAGGTCAG
	GATCCTGACCTGGAACTAATGTAGTAGACCTGGAT

Supplementary Table 3.2. Biological functions of the proteins encoded by the differentially expressed genes in HCECs grown on BSA, CI and CIV.

1. Integrin genes

Integrin Gene Name	Protein Name	BSA	CI	CIV	Fold Change BSA/CI	Fold Change BSA/CIV	Functions
ITGA1	Integrin alpha-1	17.5	17.4	12.8	1.006 down	1.365 down	Integrin alpha-1/beta-1 is a receptor for laminin and collagen. It recognizes the proline- hydroxylated sequence G-F-P-G-E-R in collagen. Involved in anchorage-dependent, negative regulation of EGF-stimulated cell growth. The heterodimeric receptor is involved in cell-cell adhesion and may play a role in inflammation and fibrosis.
		,•	,.	,.	.,		Integrin alpha-2/beta-1 is a receptor for laminin, collagen, collagen C-propeptides, fibronectin and E-cadherin. It recognizes the proline-hydroxylated sequence G-F-P-G-E-R in collagen. It is responsible for adhesion of platelets and other cells to collagens, modulation of collagen and collagenase gene expression, force generation and organization of newly synthesized extracellular matrix. Loss of the encoded protein is
ITGA2	Integrin alpha-2	110,9	63,8	95,4	1,739 down	1,163 down	Integrin alpha-IIb/beta-3 is a receptor for fibronectin, fibrinogen, plasminogen, prothrombin, thrombospondin and vitronectin. It recognizes the sequence R-G-D in a wide array of ligands. It recognizes thesequence H-H-L-G-G-G-A-K-Q-A-G-D-V in fibrinogen gamma chain. Following activation integrin alpha-IIb/beta-3 brings about platelet/platelet interaction through binding of soluble fibrinogen. This step leads to rapid platelet aggregation which physically plugs ruptured endothelial cell surface. Mutations that interfere with this role result in thrombasthenia. In addition to adhesion, integrins are
ITGA2B	Integrin alpha-Ilb	26,5	12,6	27,0	2,100 down	1,017 up	known to participate in cell-surface mediated signalling.
							thrombospondin and CSPG4. Alpha-3/beta-1 may mediate with LGALS3 the stimulation
ITGA3	Integrin alpha-3	6894,2	2541,5	5136,0	2,712 down	1,342 down	by CSPG4 of endothelial cells migration.
							recognize one or more domains within the alternatively spliced CS-1 and CS-5 regions of fibronectin. They are also receptors for VCAM1. Integrin alpha-4/beta-1 recognizes the sequence Q-I-D-S in VCAM1. Integrin alpha-4/beta-7 is also a receptor for MADCAM1. It recognizes the sequence L-D-T in MADCAM1. On activated endothelial cells integrin VLA-4 triggers homotypic aggregation for most VLA-4-positive leukocyte cell lines. It may
ITGA4	Integrin alpha-4	17,3	3,9	9,4	4,468 down	1,832 down	also participate in cytolytic T-cell interactions with target cells.
							Integrin alpha-s/beta-1 is a receptor for hibronectin and horinogen. It recognizes the sequence R-G-D in its ligands. In addition to adhesion, integrins are known to participate in cell-surface mediated signalling. In case of HIV-1 infection, the interaction with extracellular viral Tat protein seems to enhance angiogenesis in Kaposi's sarcoma
ITGA5	Integrin alpha-5	1435,9	1144,5	949,1	1,254 down	1,512 down	lesions.
							receptor for laminin in epithelial cells and it plays a critical structural role in the
ITGA6	Integrin alpha-6	11111,9	4361,6	8451,6	2,547 down	1,314 down	hemidesmosome.
ITGA7	Integrin alpha-7;	171,7	67,0	200,0	2,563 down	1,165 up	Integrin alpha-//beta-1 is the primary laminin receptor on skeletal myoblasts and adult myofibers. During myogenic differentiation, it may induce changes in the shape and mobility of myoblasts, and facilitate their localization at laminin-rich sites of secondary fiber formation. It is involved in the maintenance of the myofibers cytoarchitecture as well as for their anchorage, viability and functional integrity. Isoform Alpha-7X2B and isoform Alpha-7X1B promote myoblast migration on laminin 1 and laminin 2/4, but isoform Alpha- 7X1B is less active on laminin 1 (In vitro). Acts as Schwann cell receptor for laminin-2. Acts as a receptor of COMP and mediates its effect on vascular smooth muscle cells (VSMCs) maturation (By similarity). Required to promote contractile phenotype acquisition in differentiated airway smooth muscle (ASM) cells.
	- ·						Integrin alpha-8/beta-1 functions in the genesis of kidney and probably of other organs by
ITGA8	Integrin alpha-8	2 5	31	94	1 229 un	3 741 un	regulating the recruitment of mesenchymal cells into epithelial structures. It recognizes the sequence R-G-D in a wide array of ligands including TNC, FN1, SPP1 TGFB1, TGFB3 and VTN. NPNT is probably its functional ligand in kidney genesis. Neuronal receptor for TNC it mediates cell-cell interactions and regulates neurite outgrowth of sensory and motor neurons.
11040	integrin alpha-o	2,5	5,1	5,4	1,223 up	5,741 up	Integrin alpha-9/beta-1 is a receptor for VCAM1, cytotactin and osteopontin. It recognizes
ITCAD	Integrin olaha 0	106.0	60.0	145 0	2 902 down	1 244 down	the sequence A-E-I-D-G-I-E-L in cytotactin. The protein encoded by this gene, when bound to the beta 1 chain, forms an integrin that is a receptor for VCAM1, cytotactin and osteopontin. Expression of this gene has been found to be upregulated in small cell lung
ПОАЭ	integrin alpha-9	190,0	09,9	140,0	2,003 00011	1,544 down	The I-domain containing alpha 10 combines with the integrin beta 1 chain (ITGB1) to form
ITGA10	Integrin alpha-10	67,7	36,4	99,5	1,858 down	1,469 up	a novel collagen type II-binding integrin expressed in cartilage tissue.
ITGA11	Integrin alpha-11	34,2	19,3	48,7	1,77 <u>4 dow</u> n	1,425 up	protein-coding gene. Diseases associated with ITGA11 include tick infestation.
							Integrin alpha-D/beta-2 is a receptor for ICAM3 and VCAM1. May play a role in the
ITGAD	Integrin alpha-D	3,3	3,1	9,0	1,065 down	2,692 up	blood-borne pathogens, particulate matter, and senescent erythrocytes from the blood.
	¥ !					· 1	In combination with the beta 7 integrin, this protein forms the E-cadherin binding integrin,
ITGAE	Integrin alpha-E	683,4	369,4	1369,4	1,850 down	2,003 up	expressed in human intestinal intraepithelial lymphocytes (IEL), and in addition to a role in

							adhesion, it may serve as an accessory molecule for IEL activation.
ITGAL	Integrin alpha-L	4,0	3,6	5,5	1,130 down	1,358 up	Integrin alpha-L/beta-2 is a receptor for ICAM1, ICAM2, ICAM3 and ICAM4. It is involved in a variety of immune phenomena including leukocyte-endothelial cell interaction, cytotoxic T-cell mediated killing, and antibody dependent killing by granulocytes and monocytes.
	<u> </u>	· · · · ·	· · · · ·		·	I	Integrin alpha-M/beta-2 is implicated in various adhesive interactions of monocytes, macrophages and granulocytes as well as in mediating the uptake of complement-coated particles. It is identical with CR-3, the receptor for the iC3b fragment of the third complement component. It probably recognizes the R-G-D peptide in C3b. Integrin alpha- M/beta-2 is also a receptor for fibrinogen, factor X and ICAM1. It recognizes P1 and P2
ITGAM	Integrin alpha-M	16,2	8,5	21,2	1,906 down	1,307 up	peptides of fibrinogen gamma chain.
		1005 7		1071 7		1 000 1	Immediate applies are receiptors for vitronectin, cytotactin, toronectin, mornogen, laminin, matrix metalloproteinase-2, osteopontin, osteomodulin, prothrombin, thrombospondin and WVF. They recognize the sequence R-G-D in a wide array of ligands. In case of HIV-1 infection, the interaction with extracellular viral Tat protein
IIGAV	Integrin alpha-v	4685,7	4118,2	4671,7	1,137 down	1,002 down	seems to enhance anglogenesis in Kaposi's sarcoma lesions.
ITGAX	Integrin alpha-X	7,1	6,6	9,2	1,075 down	1,310 up	fibrinogen. It mediates cell-cell interaction during inflammatory responses. It is especially important in monocyte adhesion and chemotaxis. Albha-V/beta-1 is a receptor for vitronectin. Beta-1 integrins recognize the sequence R-G-
	Integrin						D in a wide array of ligands. Isoform 2 interferes with isoform 1 resulting in a dominant negative effect on cell adhesion and migration (in vitro). In case of HIV-1 infection, the interaction with extracellular viral Tat protein seems to enhance angiogenesis in Kaposi's sarcoma lesions. When associated with alpha-7/beta-1 integrin, regulates cell adhesion and laminin matrix deposition. Involved in promoting endothelial cell motility and angiogenesis. Involved in osteoblast compaction through the fibronectin fibrillogenesis cell-mediated matrix assembly process and the formation of mineralized bone nodules. May be involved in up regulation of the activity of kinases such as PKC via binding to KRT1. Together with KRT1 and GNB2L1/RACK1, serves as a platform for SRC activation or inactivation. Plays a mechanistic adhesive role during telophase, required for the
ITGB1	beta-1	2175,2	1048,5	2367,9	2,074 down	1,088 up	successful completion of cytokinesis.
ITGB2	Integrin beta-2	44,3	36,0	25,7	1,231 down	1,724 down	alpha-M/beta-2 and alpha-X/beta-2 are receptors for the iC3b fragment of the third complement component and for fibrinogen. Integrin alpha-X/beta-2 recognizes the sequence G-P-R in fibrinogen alpha-chain. Integrin alpha-M/beta-2 is complexed peptides of fibrinogen gamma chain. Integrin alpha-M/beta-2 is also a receptor for factor X. Integrin alpha-D/beta-2 is a receptor for ICAM3 and VCAM1. Triggers neutrophil transmigration during lung injury through PTK2B/PYK2-mediated activation.
ITCD2	Integrin	2 7	2.4	7.2	1 007 down	1.064 up	integrin alpha-Vibeta-3 is a receptor for cytotactin, noronectin, taminin, matrix metalloproteinase-2, osteopontin, osteomodulin, prothrombin, thrombospondin, vitronectin and von Willebrand factor. Integrinnalpha-IIb/beta-3 is a receptor for fibronectin, fibrinogen, plasminogen, prothrombin, thrombospondin and vitronectin. Integrins alpha-IIb/beta-3 and alpha-V/beta-3 recognize the sequence R-G-D in a wide array of ligands. Integrin alpha-IIb/beta-3 recognizes the sequence H-H-L-G-G-A-K-Q-A-G-D-V in fibrinogen gamma chain. Following activation integrin alpha-IIb/beta-3 brings about platelet/platelet interaction through binding of soluble fibrinogen. This step leads to rapid platelet aggregation which physically plugs ruptured endothelial surface. In case of HIV-1 infection, the interaction with extracellular viral Tat protein seems to enhance approach is Kongelia comparison for the set of the interaction set of the interaction for the extracellular viral Tat protein seems to enhance approach is Kongelia comparison for the set of the interaction through labout platelet platelet plate the interaction through binding of soluble fibrinogen. This step leads to rapid platelet aggregation which physically plugs ruptured endothelial surface. In case of HIV-1 infection, the interaction glatened labout platelet platelet aggregation which physically plugs ruptured endothelial surface.
TIGB3	Deta-3	3,7	3,4	7,3	1,097 down	1,961 up	Integrin alpha-6/beta-4 is a recentor for laminin. Plays a critical structural role in the
ITGB4	Integrin beta-4	52641,1	24725,5	39174,2	2,129 down	1,343 down	heridesmosome of epithelial cells. Is required for the regulation of keratinocyte polarity and motility.
ITGB5	beta-5	1427,8	945,8	1716,7	1,509 down	1,202 up	its ligand
ITGB6	Integrin beta-6	1024,0	525,3	1098,8	1,949 down	1,073 up	Integrin alpha-V/beta-6 is a receptor for fibronectin and cytotactin. It recognizes the sequence R-G-D in its ligands. Internalisation of integrin alpha-V/beta-6 via clathrin- mediated endocytosis promotes carcinoma cell invasion.
ITGB7	Integrin beta-7	1468,5	670,5	903,4	2,190 down	1,625 down	Integrin alpha-4/beta-7 (Peyer patches-specific homing receptor LPAM-1) is an adhesion molecule that mediates lymphocyte migration and homing to gut associated lymphoid tissue (GALT). Integrin alpha-4/beta-7 interacts with the cell surface adhesion molecules MADCAM1 which is normally expressed by the vascular endothelium of the gastrointestinal tract. Interacts also with VCAM1 and fibronectin, an extracellular matrix component. It recognizes one or more domains within the alternatively spliced CS-1 region of fibronectin. Interactions involves the tripeptide L-D-T in MADCAM1, and L-D-V in fibronectin. Binds to HIV-1 gp120, thereby allowing the virus to enter GALT, which is thought to be the major trigger of AIDS disease. Interaction would involve a tripeptide L-D-I in HIV-1 gp120. Integrin alpha-E/beta-7 (HML-1) is a receptor for E-cadherin. Integrin alpha-V/beta-8 is a receptor for fibronectin. It has been shown to interact with
ITGB8	Integrin beta-8	1301,3	930,6	1407,1	1,398 down	1,081 up	RhoGDI1 to alter the activation of Rho GTPases to promote Glioblastoma cell invasiveness. Uncoupling the αvβ8-RhoGDI1 interaction has been seen to block GBM cell invasion by hyperactivating Rho GTPases. High expression levels of ITGB8 are associated with high angiogenic and poorly invasive glioblastoma tumors. Conversely low expression of ITGB8 correlates with highly invasive but low angiogenic tumors.

2. Most deregulated genes

Most Deregulatd	Protein				Fold Change	Fold Change	
Genes	Name	BSA	CI	CIV	BSA/CI	BSA/CIV	Functions
	Adenylosuccinate						Component of the purine nucleotide cycle (PNC), which interconverts IMP and AMP to
ADSSL1	isozyme 1	580,8	143,4	166,7	4,049 down	3,483 down	ammoniagenesis. Catalyzes the first committed step in the biosynthesis of AMP from IMP.
AKP1B10	Aldo-keto reductase	2038 5	263.3	2515.0	7 7/3 down	1 233 un	Acts as all-trans-retinaldehyde reductase. Can efficiently reduce aliphatic and aromatic aldehydes, and is less active on hexoses (in vitro). May be responsible for detoxification of reactive aldehydes in the digested food before the nutrients are passed on to other organs. It is highly expressed in adrenal gland, small intestine, and colon, and may play an important role in liter carcinopropesies.
ARKIDIU		2030,3	200,0	2313,0	7,745 down	1,255 up	Possesses weak oxidoreductase activity. Works in concert with the 5-alpha/5-beta-steroid
AKR1B15	Aldo-keto reductase family 1 member B15	1127,6	156,5	1123,6	7,203 down	1,003 down	reductases to convert steroid hormones into the 3-alpha/5-alpha and 3-alpha/5-beta-tetrahydrosteroids. Catalyzes the inactivation of the most potent androgen 5-alpha-dihydrotestosterone (5-alpha-DHT) to 5-alpha-androstane- 3-alpha,17-beta-diol (3-alpha-diol). Has a high bile-binding ability.
ALDH1A1	dehydrogenase 1; Aldehyde dehydrogenase 1 family, member A1	3014,9	321,7	956,5	9,372 down	3,152 down	Binds free retinal and cellular retinol-binding protein-bound retinal. Can convert/oxidize retinaldehyde to retinoic acid. ALDH1A1 also belongs to the group of corneal crystallins that help maintain the transparency of the cornea.
ALDH3A1	Aldehyde dehydrogenase, dimeric NADP- preferring	1306,7	119,0	544,1	10,984 down	2,401 down	ALDHs play a major role in the detoxification of alcohol-derived acetaldehyde. They are involved in the metabolism of corticosteroids, biogenic amines, neurotransmitters, and lipid peroxidation. This protein preferentially oxidizes aromatic aldehyde substrates. It may play a role in the oxidation of toxic aldehydes. Diseases associated with ALDH3A1 include sjogren-larsson syndrome, and breast adenocarcinoma.
ALOX15B	Arachidonate 15-	7044.4	1224.5	2769.5	5.752 down	2.543 down	Non-heme iron-containing dioxygenase that catalyzes the stereo-specific peroxidation of free and esterified polyunsaturated fatty acids generating a spectrum of bioactive lipid mediators. Converts arachidonic acid to 15S-hydroperoxyeicosatetraenoic acid/(15S)- HPETE. Also acts on linoleic acid to produce 13-hydroxyoctadecadienoic acid/(15A)- HPODE. Has no detectable 8S-lipoxygenase activity but reacts with (8S)-HPETE to produce (8S,15S)-diHPETE. May regulate progression through the cell cycle and cell proliferation. May also regulate cytokine secretion by macrophages and therefore play a role in the immune response. May also regulate macrophages differentiation into proatherogenic foam cells.
ARI 4D	ADP-ribosylation	3225.8	716 7	3235.8	4 501 down	1.003 up	Small GTP-binding protein which cycles between an inactive GDP-bound and an active GTP-bound form, and the rate of cycling is regulated by guanine nucleotide exchange factors (GEF) and GTPase-activating proteins (GAP). GTP-binding protein that does not act as an allosteric activator of the cholera toxin catalytic subunit. Recruits CYTH1, CYTH2, CYTH3 and CYTH4 to the plasma membrane in GDP-bound form. This protein may play a role in membrane-associated intracellular trafficking. Mutations in this gene have been associated with Bartel-Bindl syndrome (BBS).
		0220,0	110,1	0200,0	4,001 00011	1,000 up	May be a substrate-recognition component of a SCF-like ECS (Elongin-Cullin-SOCS-box
ASB16	Ankyrin repeat and SOCS box protein 16	527.3	158 5	247 4	3 327 down	2 131 down	protein) E3 ubiquitin-protein ligase complex which mediates the ubiquitination and subsequent proteasomal degradation of target proteins. he SOCS box serves to couple suppressor of cytokine signalling (SOCS) proteins and their binding partners with the elonoin B and C complex possible targeting them for degradation
//0010		021,0	100,0	217,1	0,021 0000	2,101 down	The protein encoded by this gene is involved in the synthesis of asparagine. This gene
ASNS	Asparagine synthetase [glutamine- bydrolyzing]	11658 /	175/ 3	21107 1	6 645 down	1 810 up	complements a mutation in the temperature-sensitive hamster mutant ts11, which blocks progression through the G1 phase of the cell cycle at nonpermissive temperature. Alternatively spliced transcript variants have been described for this gene. ASNS (asparagine synthetase (glutamine-hydrolyzing)) is a protein-coding gene. Diseases associated with ASNS include asparagine synthetase deficiency.
AGNO	Cyclic AMP-	11030,4	17.54,5	21107,1	0,045 00011	1,010 up	Transcriptional factor that acts in the unfolded protein response (UPR) pathway by
ATF6B	dependent transcription factor ATF-6 beta	402,6	127,4	140,1	3,159 down	2,873 down	activating UPR target genes induced during ER stress. Binds DNA on the 5'-CCAC[GA]-3' half of the ER stress response element (ERSE) (5'-CCAATN(9)CCAC[GA]-3') when NF-Y is bound to ERSE.
B3GNT8	beta-1,3-N- acetylglucosaminyltra	2202 7	591.3	791 4	3 725 down	2 783 down	branch structures of multiantennary N-glycans. Has strong activity towards tetraantennary N-glycans and 2,6 triantennary glycans. It plays dominant roles in L-selectinligand biosynthesis. Iumphocyte homing and lymphocyte trafficking
Boolino	Putative	2202,1	001,0	101,1	0,720 0000	2,100 0000	biogranouo, rymphogia noming and rymphogia damoung.
C10orf99	uncharacterized	709 3	213.0	297.8	3 329 down	2 381 down	Incharacterized funtion
C4orf49	Protein MGARP	1271,1	203,4	1650,8	6,248 down	1,298 up	Plays a role in the trafficking of mitochondria along microtubules. Regulates the kinesin- mediated axonal transport of mitochondria to nerve terminals along microtubules during hypoxia. Participates in the translocation of TRAK2/GRIF1 from the cytoplasm to the mitochondrion. Also plays a role in steroidogenesis through maintenance of mitochondrial abundance and morphology.
	Carbonic	740.0	400 7	404.0	4.004	4 770 '	Carbonic anhydrases (CAs) are a large family of zinc metalloenzymes that catalyze the reversible hydration of carbon dioxide. They participate in a variety of biological processes, including respiration, calcification, acid-base balance, bone resorption, and the formation of aqueous humor, cerebrospinal fluid, saliva, and gastric acid. They show extensive diversity in tissue distribution and in their subcellular localization. CA IX is a
CA9	anhydrase 9	749,8	160,7	421,6	4,664 down	1,778 down	transmembrane protein and the only tumor-associated carbonic anhydrase isoenzyme

							known. It is expressed in all clear-cell renal cell carcinoma, but is not detected in normal kidney or most other normal tissues. It may be involved in cell proliferation and transformation. Appears to be a novel specific biomarker for a cervical neoplasia.
CAV3	Caveolin-3	898,7	177,0	485,8	5,078 down	1,850 down	May act as a scaffolding protein within caveolar membranes. Interacts directly with G- protein alpha subunits and can functionally regulate their activity. May also regulate voltage-gated potassium channels. Plays a role in the sarcolemma repair mechanism of both skeletal muscle and cardiomyocytes that permits rapid resealing of membranes disrupted by mechanical stress. Mutations identified in this gene lead to interference with protein oligomerization or intra-cellular routing, disrupting caveolae formation and resulting in Limb-Girdle muscular dystrophy type-1C (LGMD-1C), hyperCKemia or rippling muscle disease (RMD).
	Cysteine synthase.						Only known pyridoxal phosphate-dependent enzyme that contains heme. Important regulator of hydrogen sulfide, especially in the brain, utilizing cysteine instead of serine to catalyze the formation of hydrogen sulfide. Hydrogen sulfide is a gastratransmitter with signaling and cytoprotective effects such as acting as a neuromodulator in the brain to protect neurons against hypoxic injury. Defects in this gene can cause cystathionine beta-synthase deficiency (CBSD), which can lead to
CBS	Cystathionine beta-	6102.2	888 /	7/02 3	6 970 down	1 200 un	homocystinuria. Multiple alternatively spliced transcript variants have been found for this
000	Coiled-coil domain-	0152,2	000,4	7452,5	0,570 00001	1,203 up	gene.
CCDC3	containing protein 3 Carcinoembryonic	152,7	15,5	571,7	9,833 down	3,744 up	unknown physiological role
CEACAM20	adhesion molecule 20	4083,0	1031,8	1814,2	3,957 down	2,250 down	is down regulated in protate cancer.
CECR1	Adenosine deaminase CECR1	433,4	87,2	166,3	4,968 down	2,605 down	Adenosine deaminase that may contribute to the degradation of extracellular adenosine, a signaling molecule that controls a variety of cellular responses. Requires elevated adenosine levels for optimal enzyme activity. Binds to cell surfaces via proteoglycans and may play a role in the regulation of cell proliferation and differentiation, independently of its enzyme activity. This gene may be responsible for some of the phenotypic features associated with cat eye syndrome.
CHAC1	Cation transport regulator-like protein 1	914,1	186,6	839,8	4,897 down	1,088 down	Negative regulator of Notch signaling pathway involved in embryonic neurogenesis: acts by inhibiting Notch cleavage by furin, maintaining Notch in an immature inactive form, thereby promoting neurogenesis in embryos. May also act as a pro-apoptotic component of the unfolded protein response pathway by mediating the pro-apoptotic effects of the ATF4-ATF3-DDIT3/CHOP cascade.
	Choline O-						Catalyzes the reversible synthesis of acetylcholine (ACh) from acetyl CoA and choline at cholinergic synapses. This gene product is a characteristic feature of cholinergic neurons, and changes in these neurons may explain some of the symptoms of Alzheimer's disease. Polymorphisms in this gene have been associated with Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. Mutations in this gene are associated with congenital
CHAT	acetyltransferase	332,7	58,9	157,3	5,646 down	2,115 down	myasthenic syndrome associated with episodic apnea.
	Calcium-activated chloride channel						
CLCA4	regulator 4	443,4	38,6	111,1	11,486 down	3,989 down	May be involved in mediating calcium-activated chloride conductance.
COI 5A2	Collagen alpha-2(V) chain	655 5	110 4	281.9	5 936 down	2 325 down	Type V collagen is a member of group I collagen (inbiliar forming collagen). It is a minor connective tissue component of nearly ubiquitous distribution. Type V collagen binds to DNA, heparan sulfate, thrombospondin, heparin, and insulin. Type V collagen is a key determinant in the assembly of tissue-specific matrices. Mutations inthis gene are associated with Fhlers-Danlos syndrome types I and II
	Cytokine receptor-like			201,0	0,000 0000	1,010 0000	Cytokine receptor subunit, possibly playing a regulatory role in the immune system and during fetal development. May be involved in nervous system development. The complex can promote survival of neuronal cells. Mutations in this gene result in Crisponi syndrome
CRLF1	factor 1	905,9	181,0	437,0	5,004 down	2,072 down	and cold-induced sweating syndrome.
	CREB-regulated transcription						consensus and variant cAMP response element (CRE) sites. Acts as a coactivator, in the SIK/TORC signaling pathway, being active when dephosphorylated and acts independently of CREB1 'Ser-133' phosphorylation. Enhances the interaction of CREB1 with TAF4. Regulates the expression of specific CREB-activated genes such as the steroidogenic gene, StAR. Potent coactivator of PGC1alpha and inducer of mitochondrial biogenesis in muscle cells. Also coactivator for TAX activation of the human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) long terminal repeats (LTR). In the hippocampus, involved in late-phase long-term potentiation (L-LTP) maintenance at the Schaffer collateral-CA1 synapses. May be required for dendritic growth of developing cortical neurons. Diseases associated with CRTC1 include
CRTC1	coactivator 1	427,4	88,9	206,6	4,806 down	2,069 down	clear cell hidradenoma, and mucoepidermoid salivary gland carcinoma.
CTSH	Cathepsin H, Pro- cathepsin H	5763,4	1661,9	2227,2	3,467 down	2,587 down	heavy and light chains, both produced from a single protein a dimer of disulfide-linked heavy and light chains, both produced from a single protein precursor. The encoded protein, which belongs to the peptidase C1 protein family, can act both as an aminopeptidase and as an endopeptidase. Increased expression of this gene has been correlated with malignant progression of prostate tumors.
	Cytochrome b	000 0	405.4	457.5	0.444	4.000	Ferric-chelate reductase that reduces Fe(3+) to Fe(2+). Present at the brush border of duodenal enterocytes where it probably reduces dietary Fe(3+) thereby facilitating its transport into the mucosal cells. Uses ascorbate as electron donor. May be involved in extracellular ascorbate recycling in erythrocyte membranes.
CYBRD1	reductase 1 Death-associated	633,2	185,4	157,5	3,414 down	4,020 down	May also act as a terrireductase in airway epithelial cells.
DAPL1	protein-like 1	853,2	76,7	407,1	11,131 down	2,095 down	May play a role in the early stages of epithelial differentiation or in apoptosis.
DBP	D site-binding protein	523,6	139,3	228,4	3,759 down	2,291 down	This transcriptional activator recognizes and binds to the sequence 5'-RTTAYGTAAY-3'

							found in the promoter of genes such as albumin, CYP2A4 and CYP2A5. It is not essential for circadian rhythm generation, but modulates important clock output genes. May be a direct target for regulation by the circadian pacemaker component clock. May affect circadian period and sleep regulation.
	Protein delta homolog	11017 1	1000 5	8187 0	5 797 down	1 3/15 down	Regulates adinogenesis
DUSP8	2 Dual specificity protein phosphatase 8	548,5	157,3	198,3	3,487 down	2,766 down	The protein encoded by this gene is a member of the dual specificity protein phosphatase subfamily. These phosphatases inactivate their target kinases by dephosphorylating both the phosphoserine/threonine and phosphotyrosine residues. They negatively regulate members of the mitogen-activated protein (MAP) kinase superfamily (MAPK/ERK, SAPK/JNK, p38), which is associated with cellular proliferation and differentiation. Different members of the family of dual specificity phosphatases show distinct substrate specificities for various MAP kinases, different tissue distribution and subcellular localization, and different modes of inducibility of their expression by extracellular stimuli. This gene product inactivates SAPK/JNK and p38, is expressed predominantly in the adult brain, heart, and skeletal muscle, is localized in the cytoplasm, and is induced by nerve growth factor and insulin.
	Endoplasmic reticulum						generation of most HLA class I-binding peptides. Peptide trimming is essential to customize longer precursor peptides to fit them to the correct length required for presentation on MHC class I molecules. Preferentially hydrolyzes the basic residues Arg
ERAP2	aminopeptidase 2	444,8	1720,3	136,0	3,867 up	3,269 down	and Lys.
EREG	Proepiregulin	1173,6	304,4	449,7	3,855 down	2,609 down	Ligand of the EGF receptor/EGFR and ERBB4. May be a mediator of localized cell proliferation. As a mitogen it may stimulate cell proliferation and/or angiogenesis. Diseases associated with EREG include <i>hypopharynx cancer</i> , and <i>erythropoietic</i> <i>protoporphyria</i> . GO annotations related to this gene include <i>epidermal growth factor</i> <i>receptor binding</i> and <i>growth factor</i> activity.
						0	mitochondrial matrix. Hydrogen sulfide (H(2)S) is first oxidized by SQRDL, giving rise to cysteine persulfide residues. ETHE1 consumes molecular oxygen to catalyze the oxidation of the persulfide, once it has been transferred to a thiophilic acceptor, such as glutathione (R-SSH). Plays an important role in metabolic homeostasis in mitochondria by metabolizing hydrogen sulfide and preventing the accumulation of supraphysiological H(2)S levels that have toxic effects, due to the inhibition of cytochrome c oxidase. First described as a protein that can shuttle between the nucleus and the cytoplasm and suppress p53-induced apoptosis by sequestering the transcription factor RELA/NEKB3 in the cytoplasm and preventing its is described as a proteinting its and the cytoplasm and suppress p53-induced apoptosis by sequestering the transcription factor RELA/NEKB3 in the cytoplasm and preventing its is described as a proteinting its and the cytoplasm and suppress p53-induced apoptosis by sequestering the transcription factor RELA/NEKB3 in the cytoplasm and preventing its is described as a protein bart can shuttle between the nucleus and the cytoplasm and suppress p53-induced apoptosis by sequestering the transcription factor RELA/NEKB3 in the cytoplasm and preventing its is described as a protein bart can shuttle between the nucleus and the cytoplasm and preventing its is described apopton bart of the cytoplasm and preventing its is described bart of the cytoplasm a
FTHF1	Protein ETHE1, mitochondrial	8377 0	2627 5	3758 8	3 188 down	2 228 down	accumulation in the nucleus. Diseases associated with ETHE1 include ethylmalonic encephalopathy
FKBP5	Peptidyl-prolyl cis- trans isomerase FKBP5	710,3	136,8	387,9	5,192 down	1,831 down	Immunophilin protein with PPIase and co-chaperone activities. Component of unligated steroid receptors heterocomplexes through interaction with heat-shock protein 90 (HSP90). Plays a role in the intracellular trafficking of heterooligomeric forms of steroid hormone receptors maintaining the complex into the cytoplasmwhen unliganded. Diseases associated with FKBP5 include major depressive disorder and accelerated response to antidepressant drug treatment, and major depressive disorder.
FKSG2	Putative apoptosis inhibitor FKSG2	1049,3	162,1	606,0	6,473 down	1,731 down	TPT1P8 (tumor protein, translationally-controlled 1 pseudogene 8) is a pseudogene.
FOS	V-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog, isoform CRA_b; Proto-oncogene c-Fos	15057,5	2638,5	9134,3	5,706 down	1,648 down	Nuclear phosphoprotein which forms a tight but non-covalently linked complex with the JUN/AP-1 transcription factor. In the heterodimer, FOS and JUN/AP-1 basic regions each seems to interact with symmetrical DNA half sites. On TGF-beta activation, forms a multimeric SMAD3/SMAD4/JUN/FOS complex at the AP1/SMAD-binding site to regulate TGF-beta-mediated signaling. Has a critical function in regulating the development of cells destined to form and maintain the skeleton. It is thought to have an important role in signal transduction, cellproliferation and differentiation. In growing cells, activates phospholipid synthesis, possibly by activating CDS1 and PI4K2A. This activity requires Tyr-dephosphorylation and association with the endoplasmic reticulum. In some cases, expression of the FOS gene has also been associated with apoptotic cell death.
			<				This gene encodes leucine zipper proteins that can dimerize with proteins of the JUN family, thereby forming the transcription factor complex AP-1. As such, the FOS proteins have been implicated as regulators of cell proliferation, differentiation, and transformation. Diseases associated with FOSB include osteosarcoma. GO annotations related to this gene include <i>transcription factor binding</i> and <i>sequence-specific DNA binding transcription</i>
FOSB	Protein fosB	975,2	187,5	1110,0	5,200 down	1,138 up	factor activity.
GAMT	Guanidinoacetate-N- methyttrans-ferase	861,6	164,5	478,8	5,236 down	1,799 down	The protein encoded by this gene is a methyltransferase that converts guarnicodecetate to creatine, using S-adenosylmethionine as the methyl donor. Defects in this gene have been implicated in neurologic syndromes and muscular hypotonia, probably due to creatine deficiency and accumulation of guanidinoacetate in the brain of affected individuals. Diseases associated with GAMT include movement disease, and cerebral creatine deficiency syndrome. GO annotations related to this gene include guanidinoacetate N-methyltransferase activity and methyltransferase activity.
	Guanine nucleotide- binding protein G(olf)			- 1-		,	Guanine nucleotide-binding proteins (G proteins) are involved as modulators or transducers in various transmembrane signaling systems. G(olf) alpha mediates signal transduction within the olfactory neuroepithelium and the basal ganglia. May be involved in some aspect of visual transduction, and in mediating the effect of one or more hormones/neurotransmitters. Mutations in this gene have been associated with dystonia 25 and this gene is located in a susceptibility region for bipolar disorder and
GNAL	subunit alpha	311,6	80,0	114,1	3,893 down	2,730 down	schizophrenia.
GNG8	binding protein	294.7	100.8	130.0	2 923 down	2.267 down	transducer in various transmembrane signaling systems. The beta and damma chains are

	G(I)/G(S)/G(O) subunit gamma-8						required for the GTPase activity, for replacement of GDP by GTP, and for G protein- effector interaction.
	Glutathione S-						Cytosolic and membrane-bound forms of glutathione S-transferase are encoded by two distinct supergene families. These enzymes are involved in cellular defense against toxic, carcinogenic, and pharmacologically active electrophilic compounds. At present, eight distinct classes of the soluble cytoplasmic mammalian glutathione S-transferases have been identified: alpha, kappa, mu, omega, pi, sigma, theta and zeta. This gene encodes a glutathione S-transferase belonging to the alpha class. The alpha class genes, which are located in a cluster on chromosome 6, are highly related and encode enzymes with glutathione peroxidase activity that function in the detoxification of lipid peroxidation products. Reactive electrophiles produced by oxidative metabolism have been linked to a number of degenerative diseases including Parkinson's disease. Alzheimer's disease.
GSTA4	transferase A4	631,3	114,6	479,5	5,506 down	1,316 down	cataract formation, and atherosclerosis.
GSTM3	Glutathione S- transferase Mu 3	3932.4	513.1	3591.6	7.663 down	1.094 down	class of enzymes functions in the detoxification of electrophilic compounds, including carcinogens, therapeutic drugs, environmental toxins and products of oxidative stress, by conjugation with glutathione. These genetic variations can change an individual's susceptibility to carcinogens and toxins as well as affect the toxicity and efficacy of certain drugs. Mutations of this class mu gene have been linked with a slight increase in a number of cancers, likely due to exposure with environmental toxins.
			,.		.,	.,	Exhibits glutathione-dependent thiol transferase activity. Has high dehydroascorbate
GST02	Glutathione S- transferase omega-2	1709,3	387,2	1169,0	4,414 down	1,462 down	reductase activity and may contribute to the recycling of ascoroic acid. Participates in the biotransformation of inorganic arsenic and reduces monomethylarsonic acid (MMA). GSTs are involved in the metabolism of xenobiotics and carcinogens. iseases associated with GSTO2 include <i>barrett's</i> <i>adenocarcinoma</i> , and <i>parkinson's disease</i> .
		070.0	040.0	0000 0	0.000 /	0.005	Histone H1 protein binds to linker DNA between nucleosomes forming the macromolecular structure known as the chromatin fiber. Histones H1 are necessary for the condensation of nucleosome chains into higher-order structured fibers. Acts also as a regulator of individual gene transcription through chromatin remodeling, nucleosome spacing and DNA methylation. Diseases associated with HIST1H1B include <i>human t-cell</i>
<u>HISTINIB</u>		979,2	248,9	2029,2	3,933 down	_2,065 Up	DNA binding proteins that associates with chromatin and has the ability to bend DNA. Binds preferentially single-stranded DNA. Involved in V(D)J recombination by acting as a cofactor of the RAG complex. Acts by stimulating cleavage and RAG protein binding at the 23 bp spacer of conserved recombination signal sequences (RSS). In vitro studies have demonstrated that this protein is able to efficiently bend DNA and form DNA circles. These studies suggest a role in facilitating cooperative interactions between cis-acting proteins by promoting DNA flexibility. This protein was also reported to be involved in the final ligation step in DNA end-joining processes of DNA double-strand breaks repair and
HMGB2	High mobility group protein B2	3849,4	796,2	4215,7	4,834 down	1,095 up	V(D)J recombination. Diseases associated with HMGB2 include juvenile meumatoid arthritis.
IGFBP6	Insulin-like growth factor-binding protein 6	18542,7	4023,0	6642,9	4,609 down	2,791 down	GF-binding proteins prolong the half-life of the IGFs and have been shown to either inhibit or stimulate the growth promoting effects of the IGFs on cell culture. They alter the interaction of IGFs with their cell surface receptors. Diseases associated with IGFBP6 include <i>pheochromocytoma</i> .
KRT12	Keratin, type I cytoskeletal 12	761.5	1015	000.0	5 000 1	4.440	May play a unique role in maintaining the normal corneal epithelial function. Together with KRT3, essential for the maintenance of corneal epithelium integrity. Diseases associated
		, .	134,5	868,6	5,660 down	1,140 up	with KRT12 include recurrent corneal erosion, and meesmann corneal dystrophy.
KRT24	Keratin, type I cytoskeletal 24 Keratin, type II cytoskeletal 4	3330,3 9530,6	134,5 484,3 1552,2	3412,4 16380,2	6,876 down	1,140 up 1,024 up 1,718 up	with KRT12 include recurrent corneal erosion, and meesmann corneal dystrophy. This gene encodes a member of the type I (acidic) keratin family, which belongs to the superfamily of intermediate filament (IF) proteins. Keratins are heteropolymeric structural proteins which form the intermediate filament. These filaments, along with actin microfilaments and microtubules, compose the cytoskeleton of epithelial cells. Diseases associated with KRT24 include hypohidrosis. The protein encoded by this gene is a member of the keratin gene family. The type II cytokeratins consist of basic or neutral proteins which are arranged in pairs of heterotypic keratin chains coexpressed during differentiation of simple and stratified epithelial tissues. This type II cytokeratin is specifically expressed in differentiated layers of the mucosal and esophageal epithelia with family member KRT13. Mutations in these genes have beenassociated with White Sponge Nevus, characterized by oral, esophageal, and anal leukoplakia.
KRT24 KRT4	Keratin, type I cytoskeletal 24 Keratin, type II cytoskeletal 4 LEM domain-	3330,3 9530,6	<u>134,5</u> <u>484,3</u> <u>1552,2</u>	3412,4 16380,2	6,876 down	1,140 up 1,024 up 1,718 up	 with KRT12 include recurrent corneal erosion, and meesmann corneal dystrophy. This gene encodes a member of the type I (acidic) keratin family, which belongs to the superfamily of intermediate filament (IF) proteins. Keratins are heteropolymeric structural proteins which form the intermediate filament. These filaments, along with actin microfilaments and microtubules, compose the cytoskeleton of epithelial cells. Diseases associated with KRT24 include hypohidrosis. The protein encoded by this gene is a member of the keratin gene family. The type II cytokeratins consist of basic or neutral proteins which are arranged in pairs of heterotypic keratin chains coexpressed during differentiation of simple and stratified epithelial tissues. This type II cytokeratin is specifically expressed in differentiated layers of the mucosal and esophageal epithelia with family member KRT13. Mutations in these genes have beenassociated with White Sponge Nevus, characterized by oral, esophageal, and anal leukoplakia. Proteins are expected to localize in various compartments (membrane, integral to membrane, nuclear envelope). No phenotype has yet been reported to our knowledae:
KRT24 KRT4 LEMD1	Keratin, type I cytoskeletal 24 Keratin, type II cytoskeletal 4 LEM domain- containing protein1	3330,3 9530,6 3491,5	134,5 484,3 1552,2 1059,1	3412,4 16380,2 1139,1	6,876 down 6,140 down 3,296 down	1,140 up 1,024 up 1,718 up 3,065 down	 with KRT12 include recurrent corneal erosion, and meesmann corneal dystrophy. This gene encodes a member of the type I (acidic) keratin family, which belongs to the superfamily of intermediate filament (IF) proteins. Keratins are heteropolymeric structural proteins which form the intermediate filament. These filaments, along with actin microfilaments and microtubules, compose the cytoskeleton of epithelial cells. Diseases associated with KRT24 include hypohidrosis. The protein encoded by this gene is a member of the keratin gene family. The type II cytokeratin is specifically expressed in differentiated layers of the encodeal and esophageal epithelia with family member KRT13. Mutations in these genes have beenassociated with White Sponge Nevus, characterized by oral, esophageal, and anal leukoplakia. Proteins are expected to localize in various compartments (membrane, integral to membrane, nuclear envelope). No phenotype has yet been reported to our knowledge: this gene is in vivo function is yet unknown. This gene encodes a member of the prolVi 3-hydroxylase subfamily of 2-oxo-nutrarate-
KRT24 KRT4 LEMD1 LEPREL1	Keratin, type I cytoskeletal 24 Keratin, type II cytoskeletal 4 LEM domain- containing protein1 Prolyl 3-hydroxylase 2	3330,3 9530,6 3491,5 14291,5	134,5 484,3 1552,2 1059,1 2660,2	3412,4 16380,2 1139,1 10083,5	5,660 down 6,876 down 6,140 down 3,296 down 5,372 down	1,140 up 1,024 up 1,718 up 3,065 down 1,417 down	 with KRT12 include recurrent corneal erosion, and meesmann corneal dystrophy. This gene encodes a member of the type I (acidic) keratin family, which belongs to the superfamily of intermediate filament (IF) proteins. Keratins are heteropolymeric structural proteins which form the intermediate filament. These filaments, along with actin microfilaments and microtubules, compose the cytoskeleton of epithelial cells. Diseases associated with KRT24 include <i>hypohidrosis</i>. The protein encoded by this gene is a member of the keratin gene family. The type II cytokeratins consist of basic or neutral proteins which are arranged in pairs of heterotypic keratin chains coexpressed during differentiation of simple and stratified epithelial tissues. This type II cytokeratin is specifically expressed in differentiated layers of the mucosal and esophageal epithelia with family member KRT13. Mutations in these genes have beenassociated with White Sponge Nevus, characterized by oral, esophageal, and anal leukoplakia. Proteins are expected to localize in various compartments (membrane, integral to membrane, nuclear envelope). No phenotype has yet been reported to our knowledge: this gene's in vivo function is yet unknown. This gene encodes a member of the prolyl 3-hydroxylase subfamily of 2-oxo-glutaratedependent dioxygenases. These enzymes play a critical role in collagen chain assembly, stability and cross-linking by catalyzing post-translational 3-hydroxylation of proline residues. Mutations in this gene are associated with nonsyndromic severe myopia with cataract and vitreoretinal degeneration, and downregulation of this gene may play a role in breast cancer. The galectins are a family of beta-galactoside-binding proteins implicated in modulating cell-cell and cell-matrix interactions. Differential and in situ hybridization studies indicate that this lectin is specifically expressed in keratinocytes and found mainly in stratified squamou
KRT24 KRT4 LEMD1 LEPREL1	Keratin, type I cytoskeletal 24 Keratin, type II cytoskeletal 4 LEM domain- containing protein1 Prolyl 3-hydroxylase 2 Galectin-7	3330,3 9530,6 3491,5 14291,5 70143,4	134,5 484,3 1552,2 1059,1 2660,2 8277,8	3412,4 16380,2 1139,1 10083,5 41820,8	5,660 down 6,876 down 6,140 down 3,296 down 5,372 down 8,473 down	1,140 up 1,024 up 1,718 up 3,065 down 1,417 down 1,677 down	 with KRT12 include recurrent corneal erosion, and meesmann corneal dystrophy. This gene encodes a member of the type I (acidic) keratin family, which belongs to the superfamily of intermediate filament (IF) proteins. Keratins are heteropolymeric structural proteins which form the intermediate filament. These filaments, along with actin microfilaments and microtubules, compose the cytoskeleton of epithelial cells. Diseases associated with KRT24 include hypohidrosis. The protein encoded by this gene is a member of the keratin gene family. The type II cytokeratins consist of basic or neutral proteins which are arranged in pairs of heterotypic keratin chains coexpressed during differentiation of simple and stratified epithelial tissues. This type II cytokeratin is specifically expressed in differentiated layers of the mucosal and esophageal epithelia with family member KRT13. Mutations in these genes have beenassociated with White Sponge Nevus, characterized by oral, esophageal, and anal leukoplakia. Proteins are expected to localize in various compartments (membrane, integral to membrane, nuclear envelope). No phenotype has yet been reported to our knowledge: this gene's in vivo function is yet unknown. This gene encodes a member of the prolyl 3-hydroxylase subfamily of 2-oxo-glutarate-dependent dioxygenases. These enzymes play a critical role in collagen chain assembly, stability and cross-linking by catalyzing post-translational 3-hydroxylation of proline residues. Mutations in this gene are associated with nonsyndromic severe myopia with cataract and vitreoretinal degeneration, and downregulation of this gene may play a role in breast cancer. The galectins are a family of beta-galactoside-binding proteins implicated in modulating cell-cell and cell-matrix interactions. Differential and in situ hybridization studies indicate that this lectin is specifically expressed in keratinocytes and found mainly in stratified squamous

							serine/threonine kinase activity, protein tyrosine kinase activity, transferase activity) and
							to localize in various compartments (memorane, integral to memorane). Transfers the acyl group from the sp-1 position of phosphatidylcholine to all-trans retinol
							producing all-trans retinyl esters. Retinyl esters are storage forms of vitamin A. LRAT
							plays a critical role in vision. It provides the all-trans retinyl ester substrates for the
							isomerohydrolase which processes the esters into 11-cis-retinol in the retinal pigment
							epithelium; due to a membrane-associated alcohol dehydrogenase, 11 cis-retinol is
	Lecithin retinol						and the cone photopigments. Diseases associated with LRAT include <i>lrat-related leber</i>
LRAT	acyltransferase	896,7	294,7	439,8	3,042 down	2,039 down	congenital amaurosis, and retinal dystrophy, early-onset, severe.
							The protein is expressed in lymphocytes, neutrophils, macrophages, and endothelium and
							may regulate neutrophil motility, adhesion to fibrinogen matrix proteins, and
1 501	Lymphocyte-specific	12/2 2	183 7	350 5	6 768 down	3 457 down	transendotnellal migration. May play a role in mediating neutrophil activation and
LOFT	protein	1243,5	103,7	559,5	0,700 0001	5,457 down	Acts as a transcriptional factor. Specifically binds the insulin enhancer element RIPE3b
							and activates insulin gene expression. Cooperates synergistically with NEUROD1 and
							PDX1. Phosphorylation by GSK3 increases its transcriptional activity and is required for
	Transprintion faster						its oncogenic activity. Involved either as an oncogene or as a tumor suppressor,
ΜΔΕΔ	Mafa	3177 1	676 3	1452 5	4 697 down	2 187 down	monogenic diabetes
	Wall Y	0111,1	010,0	1402,0	4,007 00001	2,107 0001	This kinase is activated by mitogenic and environmental stress, and participates in the
							MAP kinase-mediated signaling cascade. It phosphorylates and thus activates
							MAPK14/p38-MAPK. This kinase can be activated by insulin, and is necessary for the
	Dual-specificity						expression of glucose transporter. Expression of RAS oncogene is found to result in the
	protein kinase kinase						activation of MAPK14, and confers oncogenic transformation of primary cells. Dual
	3, Dual specificity						specificity kinase. Is activated by cytokines and environmental stress in vivo. Catalyzes
	mitogen-activated						the concomitant phosphorylation of a threonine and a tyrosine residue in the MAP kinase
	protein kinase kinase	4740.0	400.0	002.4	2 C 47 dawa	0.000 dawa	p38. The inhibition of this kinase is involved in the pathogenesis of Yersina
MAPZKJ	3	1712,8	469,6	823,4	3,647 down	2,080 down	pseudotuberculosis. This gene encodes a member of the alpha/beta hydrolase superfamily. It is imprinted
							exhibiting preferential expression from the paternal allele in fetal tissues, and isoform-
							specific imprinting in lymphocytes. The loss of imprinting of this gene has been linked to
	Mesoderm-specific						certain types of cancer and may be due to promotor switching. The encoded protein may
MEST	transcript homolog	178 7	107 1	171 1	1 171 down	1.008 down	play a role in development. Diseases associated with MEST include silver-russell
MLJI	Methyltransferase-like	470,7	107,1	4/4,4	4,471 00011	1,000 00011	Syndrome.
METTL7A	protein 7A	630,1	127,6	1043,5	4,937 down	1,656 up	Probable methyltransferase.
							Mammalian mitochondrial ribosomal proteins are encoded by nuclear genes and help in
							protein synthesis within the mitochondrion. Mitochondrial ribosomes (mitoribosomes)
							They have an estimated 75% protein to rRNA composition compared to prokarvotic
							ribosomes, where this ratio is reversed. Another difference between mammalian
							mitoribosomes and prokaryotic ribosomes is that the latter contain a 5S rRNA. Among
							different species, the proteins comprising the mitoribosome differ greatly in sequence, and
	28S ribosomal protein						homology This gene encodes a 28S subunit protein that may be a functional partner of
MRPS27	S27, mitochondrial	502,0	61,7	111,4	8,128 down	4,505 down	the death associated protein 3 (DAP3).
							Acts as a guanine nucleotide exchange factor (GEF) which differentially activates the
							GTPases RHOA, RAC1 and CDC42. Plays a role in axon guidance regulating ephrin-
	Neuronal quanine						induced growth cone collapse and dendritic spine morphogenesis. Upon activation by
	nucleotide exchange						Activated RHOA promotes cone retraction at the expense of RAC1- and CDC42-
NGEF	factor	866,4	162,5	682,2	5,332 down	1,270 down	stimulated growth cone extension.
							Plays a role in the regulation of the translocation of GLUT4 to the cell surface in
							adipocytes and skeletal muscle cells in response to insulin, probably by regulating RAB31
	Tumor necrosis factor						similarity). Low affinity receptor which can bind to NGF. BDNF. NT-3. and NT-4. Can
	receptor superfamily						mediate cell survival as well as cell death of neural cells. Diseases associated with NGFR
NGFR	member 16	886,2	107,3	608,9	8,256 down	1,455 down	include infiltrative basal cell carcinoma, and noma.
							I he encoded protein is a ligand-sensitive transcription factor that negatively regulates the
	Nuclear receptor						transcription factor arv hydrocarbon recentor nuclear translocator-like protein 1 (ARNT)
	subfamily 1 group D						This protein may also be involved in regulating genes that function in metabolic,
NR1D1	member 1	444,9	135,6	181,6	3,281 down	2,450 down	inflammatory and cardiovascular processes.
							Chromatin-binding protein that converts stress signals into a program of gene expression
							that empowers cells with resistance to the stress induced by a change in their microenvironment interacts with MSL1 and inhibits its activity on historie H4 1 vs.16
							acetylation (H4K16ac). Binds the RELB promoter and activates its transcription. leading to
							the transactivation of IER3. The NUPR1/RELB/IER3 survival pathway may provide
							pancreatic ductal adenocarcinoma with remarkable resistance to cell stress, such as
							starvation or gemcitabine treatment. In breast cancer cells, NUPR1 overexpression leads
							relocalization from the nucleus to the cytoplasm leading to resistance to
NUPR1	Nuclear protein 1	11136,2	<u>1</u> 307,1	8627,9	8,519 down	1,290 down	chemotherapeutic agents, such as doxorubicin.
	•						This gene encodes a member of the peptidyl arginine deiminase family of enzymes, which
							catalyze the post-translational deimination of proteins by converting arginine residues into
	Protein-argining						citruilines in the presence of calcium ions. The family members have distinct substrate
ΡΔΠΙ1	deiminase type_1	1240 /	133.6	386.8	9 281 down	3 206 down	apeonomics and issue-specific expression patterns. The type renzyme is involved in the

Rapport-gratuit.com

							maintains hydration of the stratum corneum, and hence the cutaneous barrier function. This enzyme may also play a role in hair follicle formation.
							Involved in plasma membrane dynamics and cell process formation. Isoform 1 and
DALM	Developmenta 4	4400.0	205.2	270.2	0.400 dawa	0.407 dawa	isoform 2 are necessary for axonal and dendritic filopodia induction, for dendritic spine
PALW	Paralemmin-I Perovisomal	1198,2	385,3	378,3	3,109 down	3,167 down	The protein encoded by this gene is a member of the PEX11 family. This family is
	membrane						reported to regulate the number and size of peroxisomes in evolutionarily distant
PEX11G	protein 11C	308,2	96,9	141,8	3,180 down	2,173 down	organisms. The protein encoded by this gene may induce clustering of peroxisomes.
							This gene encodes the enzyme which is involved in the early steps of L-serine synthesis
							In animal cells. L-serine is required for D-serine and other amino acid synthesis. The enzyme requires NAD/NADH as a cofactor and forms homotetramers for activity.
	D-3-phosphoglycerate						Mutations in this gene have been found in a family with congenital microcephaly,
PHGDH	dehydrogenase	4591,9	688,2	4277,7	6,672 down	1,073 down	psychomotor retardation and other symptoms.
							The protein has a physiological function in regulation of water transport mainly in apocrine
							glands in the axina, vulva, eyelid and ear canal, serous cells of the submandbular salivary gland, serous cells of the submucosal glands of the bronchi, and accessory lacrimal
							glands as well as cutaneous eccrine glands. PIP has the ability to bind immunoglobulin G
							(IgG), IgG-Fc, CD4-T cell receptor suggesting a wide range of immunological functions.
DID	Prolactin-inducible	213.0	1471 4	74.0	6 007 up	2 878 down	Diseases associated with PIP include fox fordyce disease, and florid papillomatosis of the
FIF	protein	213,0	1471,4	74,0	0,907 up	2,070 00001	Transcriptional coregulator of NE-kappa-B which facilitates binding of NE-kappa-B
							proteins to target kappa-B genes in a redox-state-dependent manner. May be required for
							efficient terminal myeloid maturation of hematopoietic cells. Has quercetin 2,3-
							dioxygenase activity (in vitro). Interactions with nuclear factor I/CCAAI box transcription
							may act as a transcriptional cofactor and be involved in the regulation of DNA
PIR	Pirin	6622,0	1331,1	4894,7	4,974 down	1,352 down	transcription and replication.
							Transcriptional coregulator of NF-kappa-B which facilitates binding of NF-kappa-B
							proteins to target kappa-B genes in a redox-state-dependent manner. May be required for
							dioxygenase activity (in vitro). Interactions with nuclear factor I/CCAAT box transcription
							factor as well as B cell lymphoma 3-encoded oncoprotein suggest the encoded protein
							may act as a transcriptional cofactor and be involved in the regulation of DNA
							transcription and replication. Facilitates the transfer of a spectrum of different lipid
							phosphatidylcholine, phosphatidylglycerol, cerebroside and phosphatidyl ethanolamine.
							Essential for the transfer of excess surface lipids from triglyceride-rich lipoproteins to
							HDL, thereby facilitating the formation of smaller lipoprotein remnants, contributing to the
							role in the untake of cholesterol from peripheral cells and tissues that is subsequently
							transported to the liver for degradation and excretion. Two distinct forms of PLTP exist in
							plasma: an active form that can transfer PC from phospholipid vesicles to high-density
рі тр	Phospholipid transfer	2/61.6	706 5	1173.0	3 181 down	2 006 down	lipoproteins (HDL), and an inactive form that lacks this capability. Diseases associated with PLTP include hyperalphalipoprateinamia, and hyperalphalipoprateinamia.
	Nuclear envelope	2401,0	700,5	1175,5	3,404 d0wii	2,030 00011	Essential component of the nuclear pore complex (NPC). The repeat-containing domain
	pore membrane						may be involved in anchoring components of the pore complex to the pore membrane.
POM121	protein POM 121	286,0	56,0	124,6	5,106 down	2,295 down	When overexpressed in cells induces the formation of cytoplasmic annulate lamellae (AL).
							I his gene encodes a member of the trypsin family of serine proteases. Studies in mouse
							associated with learning and memory. The enzyme is also expressed in Levdig cells in
							the testis, but its function in this tissue is unknown. Defects in this gene are a cause of
PRSS12	Neurotrypsin	937,3	292,5	454,9	3,205 down	2,060 down	mental retardation autosomal recessive type 1 (MRT1).
							This gene encodes a member of the class-V pyridoxal-phosphate-dependent
	Phosphoserine						decreased expression may be associated with schizophrenia. Mutations in this gene are
PSAT1	aminotransferase	9108,7	1588,8	15108,6	5,733 down	1,658 up	also associated with phosphoserine aminotransferase deficiency.
							The protein encoded by this gene is a member of the protein tyrosine phosphatase (PTP)
							tamily. PTPs are known to be signaling molecules that regulate a variety of cellular processes including cell growth differentiation mitotic cycle and opcogenic
							transformation. This PTP contains an extracellular region, a single transmembrane
							segment and two tandem intracytoplasmic catalytic domains, and thus represents a
							receptor-type PTP. The extracellular region of this protein is composed of multiple Ig-like
							and incronectin type in-like domains. Studies of the similar gene in mice suggested that this PTP may be involved in cell-cell interaction primary avongenesis and avon
	Receptor-type						guidance during embryogenesis. This PTP has been also implicated in the molecular
	tyrosine-protein						control of adult nerve repair. Diseases associated with PTPRS include pineal gland
PTPRS	phosphatase S	4075,9	959,9	2012,4	4,246 down	2,025 down	cancer, and ureterocele.
							Controls vesicular trafficking from endosomes to the trans-Golgi network (IGN). Acts as a negative regulator of TLR9 signaling and can suppress TLR9-triggered TNEA. II 6, and
							IFNB production in macrophages by promoting TLR9 lysosomal degradation. Also
							negatively regulates TLR4 signaling in macrophages by promoting lysosomal degradation
							of TLR4. Promotes megakaryocytic differentiation by increasing NF-kappa-B-dependent
	Ras-related protein						inco production and subsequently enhancing the association of STAT3 with GATA1. Not
RAB7B	Rab-7b	986,1	194,4	1198,7	5,072 down	1,215 up	associated with RAB7B include acute promyelocytic leukemia.
			,	,		. 1	The protein encoded by this gene is a member of the RAMP family of single-
							transmembrane-domain proteins, called receptor (calcitonin) activity modifying proteins
							(RAIVIPS). RAIVIPS are type I transmembrane proteins with an extracellular N terminus and
	Receptor activity-						a cytoplasmic C terminus. RAMPs are required to transport calcitonin-recentor-like

							domains, can function as either a calcitonin-gene-related peptide (CGRP) receptor or an adrenomedullin receptor, depending on which members of the RAMP family are expressed. In the presence of this (RAMP1) protein, CRLR functions as a CGRP receptor. The RAMP1 protein is involved in the terminal glycosylation, maturation, and presentation of the CGRP recentor to the cell surface.
	Rap guanine nucleotide exchange						Participates in processes (G-protein coupled receptor protein signaling pathway, nervous system development, small GTPase mediated signal transduction). Proteins are expected
RAPGEFL1	factor-like 1	402,2	98,7	195,2	4,074 down	2,060 down	to have molecular function (guanyl-nucleotide exchange factor activity). Ras effector protein, which may serve as an inhibitory modulator of neuronal plasticity in aversive memory formation. Can affect Ras signaling at different levels. First, by competing with RAF1 protein for binding to activated Ras. Second, by enhancing signaling from ABL1 and ABL2, which regulate cytoskeletal remodeling. Third, by activating RAB5A, possibly by functioning as a guanine nucleotide exchange factor (GEF) for RAB5A, by exchanging bound GDP for free GTP, and facilitating Ras-activated receptor endocytosis. Diseases associated with RIN1 include <i>acute promyelocytic</i>
RIN1	interactor 1	7028,0	1399,5	4798,1	5,021 down	1,464 down	leukemia.
RPS4Y1	40S ribosomal protein S4, Y isoform 1	225,0	3121,9	4,6	13,872 up	48,609 down	Cytoplasmic noosomes, organelies that catalyze protein synthesis, consist of a small 402 subunit and a large 60S subunit. Together these subunits are composed of 4 RNA species and approximately 80 structurally distinct proteins. This gene encodes ribosomal protein S4, a component of the 40S subunit. Ribosomal protein S4 is the only ribosomal protein known to be encoded by more than one gene, namely this gene and ribosomal protein S4, X-linked (RPS4X). The 2 isoforms encoded by these genes are not identical, but are functionally equivalent. Ribosomal protein S4 belongs to the S4E family of ribosomal proteins. It has been suggested that haploinsufficiency of the ribosomal protein S4 genes plays a role in Turner syndrome; however, this hypothesis is controversial.
RPS4Y2	40S ribosomal protein S4_V isoform 2	226.0	2860.2	62	12 653 un	36 475 down	The protein encoded by this gene is a ribosomal protein that is highly similar to RPS4Y1.
CEMAOD		4724.0	2000,2	0.2	6 1/5 Jam	1 054 J	The protein encoded by this gene belongs to the class-3 semaphorin/collapsin family, whose members function in growth cone guidance during neuronal development. This family member inhibits axonal extension and has been shown to act as a tumor suppressor by inducing apoptosis. Diseases associated with SEMA3B include phonomic functions of the statement of the sta
SEMAJB	Semaphorin-3B	1734,9	282,3	887,7	6,145 down	1,954 down	The protein encoded by this gene was identified in a yeast two-hybrid assay employing
	SERTA domain-						the second subunit of human replication protein A as bait. It is localized to the nucleus
SERTAD3	protein 3	763,5	207,0	194,6	3,688 down	3,922 down	This protein has also been shown to be a strong transcriptional co-activator.
SIK1	Serine/threonine- protein kinase SIK1	2183,7	645,0	1064,0	3,385 down	2,052 down	regulation, gluconeogenesis and lipogenesis regulation, muscle growth and differentiation and tumor suppression. Phosphorylates HDAC4, HDAC5, PPME1, SREBF1, TORC1/CRTC1 and TORC2/CRTC2. Acts as a tumor suppressor and plays a key role in p53/TP53-dependent anoikis, a type of apoptosis triggered by cell detachment: required for phosphorylation of p53/TP53 in response to loss of adhesion and is able to suppress metastasis. Part of a sodium-sensing signaling network, probably by mediating phosphorylation of PPME1: following increases in intracellular sodium, SIK1 is activated by CaMK1 and phosphorylates PPME1 subunit of protein phosphatase 2A (PP2A), leading to dephosphorylation of sodium/potassium-transporting ATPase ATP1A1 and subsequent increase activity of ATP1A1. Acts as a regulator of muscle cells by phosphorylating and inhibiting class II histone deacetylases HDAC4 and HDAC5, leading to promote expression of MEF2 target genes in myocytes. Also required during cardiomyogenesis by regulating the exit of cardiomyoblasts from the cell cycle via down- regulation of CDKN1C/p57Kip2. Acts as a regulator of hepatic gluconeogenesis by phosphorylating and repressing the CREB-specific coactivators TORC1/CRTC1 and TORC2/CRTC2, leading to inhibit CREB activity. Also regulates hepatic lipogenesis by phosphorylating and inhibiting SREBF1. Serine/threonine-protein kinase involved in various processes such as cell cycle regulation, gluconeogenesis and lipogenesis regulation, muscle growth and differentiation and tumor suppression. Phosphorylates HDAC4, HDAC5, PPME1, SREBF1, TORC1/CRTC1 and TORC2/CRTC2. Acts as a tumor suppressor and plays a key role in
SLC7A5	Large neutral amino acids transporter small subunit 1	5871,4	1280,2	7228,7	4,586 down	1,231 up	p53/TP53-dependent anoikis, a type of apoptosis triggered by cell detachment: required for phosphorylation of p53/TP53 in response to loss of adhesion and is able to suppress metastasis. Part of a sodium-sensing signaling network, probably by mediating phosphorylation of PPME1: following increases in intracellular sodium, SIK1 is activated by CaMK1 and phosphorylates PPME1 subunit of protein phosphatase 2A (PP2A), leading to dephosphorylation of sodium/potassium-transporting ATPase ATP1A1 and subsequent increase activity of ATP1A1. Acts as a regulator of muscle cells by phosphorylating and inhibiting class II histone deacetylases HDAC4 and HDAC5, leading to promote expression of MEF2 target genes in myocytes. Also required during cardiomyogenesis by regulating the exit of cardiomyoblasts from the cell cycle via down- regulation of CDKN1C/p57Kip2. Acts as a regulator of hepatic gluconeogenesis by phosphorylating and repressing the CREB-specific coactivators TORC1/CRTC1 and TORC2/CRTC2, leading to inhibit CREB activity. Also regulates hepatic lipogenesis by phosphorylating and inhibiting SREBF1.
	Serine protease inhibitor						Efficiently inhibits KLK4, KLK5, KLK6, KLK7, KLK12, KLK13 and KLK14. Doesn't inhibit KLK8. Diseases associated with SPINK6 include
SPINK6	Kazal-type 6	626,8	94,0	2010,6	6,667 down	3,207 up	dyshidrosis. Isoform 4 may play a role in the trafficking and exocytosis of secretory vesicles in pop-
SYT8	Synaptotagmin-8	1175,7	219,3	252,4	5,362 down	4,657 down	neuronal tissues. Mediates Ca(2+)-regulation of exocytosis acrosomal reaction in sperm. May mediate Ca(2+)-regulation of exocytosis in insulin secreted cells.

	Transcription						
	elongation factor A						Necessary for efficient RNA polymerase II transcription elongation past template-encoded
	protein 2;						arresting sites. The arresting sites in DNA have the property of trapping a certain fraction
	Transcription						of elongating RNA polymerases that pass through, resulting in locked ternary complexes.
	elongation factor A						Cleavage of the nascent transcript by S-II allows the resumption of elongation from the
	(SII), 2; TCEA2						new 3'-terminus. The encoded protein has been shown to interact with general
TCEA2	protein	400,0	72,3	123,1	5,531 down	3,249 down	transcription factor IIB, a basal transcription factor.
	Transmembrane						
TMEM91	protein 91	1027,1	190,0	331,9	5,405 down	3,094 down	The function of this protein is unknown.
	Transmembrane				·	·	
TMEM95	protein 95	3450,3	635,1	1891,5	5,433 down	1,824 down	The function of this protein is unknown.
	•				·	·	The encoded protein is postulated to play a regulatory role in suppressing FasL- and
							LIGHT-mediated cell death. It acts as a decoy receptor that competes with death
							receptors for ligand binding. Over-expression of this gene has been noted in
	Tumor necrosis factor						gastrointestinal tract tumors. Read-through transcription into this gene from the
	receptor superfamily						neighboring upstream gene, which encodes regulator of telomere elongation helicase 1
TNFRSF6B	member 6B	1506.4	446.3	615.0	3.375 down	2.449 down	(RTEL1), generates a non-coding transcript.
			- , -			1	Troponin I is the inhibitory subunit of troponin, the thin filament regulatory complex which
							confers calcium-sensitivity to striated muscle actomyosin ATPase activity. In addition to
							muscle tissues this protein is found in corneal epithelium cartilage where it is an inhibitor
							of angiogenesis to inhibit tumor growth and metastasis and mammary gland where it
							functions as a co-activator of estronen recentor-related recentor alpha. This protein also
	Troponin L fast						suppresses tumor growth in human ovarian carcinoma. Mutations in this gene cause
TNNI2	skeletal muscle	1421.4	346.1	481.8	4.106 down	2.950 down	myopathy and distal arthrogryposis type 2B.
		,.	• • • • • • •		.,	_,	This gene encodes a protein that is a subunit of troponin which is a regulatory complex
							located on the thin filament of the sarcomere. This complex regulates striated muscle
							contraction in response to fluctuations in intracellular calcium concentration. Troponin T is
							the tropomyosin-binding subunit of troponin, the thin filament regulatory complex which
							confers calcium-sensitivity to striated muscle actomyosin ATPase activity Diseases
	Troponin T. slow						associated with TNNT1 include nemaline myopathy 5, and nemaline myopathy 5, amish
TNNT1	skeletal muscle	6416.8	965.8	2118.5	6.643 down	3.029 down	type.
			,.	- / -			May be involved in intracellular vesicle traffic. Inhibits ATF4-mediated transcription.
							possibly by dimerizing with ATF4 to form inactive dimers that cannot bind DNA. May be
							involved in regulating bone mass density through an ATF4-dependent pathway. This gene
							is up-regulated by lipopolysaccharide and the gene product may be involved in cell cycle
							regulation, he related mouse protein was also shown to inhibit activating transcription
							factor 4-mediated transcription and thus regulate bone mass accrual. Diseases
TXLNG	Gamma-taxilin	628.0	208.6	1595.0	3.009 down	2.539 up	associated with TXLNG include scarlet fever, and antisocial personality disorder.
			, -		,	F	This gene encodes a lipoprotein receptor that is a member of the LDLR family and plays
							important roles in VLDL-triglyceride metabolism and the reelin signaling pathway, inds
	Very low-density						VLDL and transports it into cells by endocytosis. In order to be internalized, the receptor-
	lipoprotein receptor.						ligand complexes must first cluster into clathrin-coated pits. Binding to Reelin induces
	Very low density						tyrosine phosphorylation of Dab1 and modulation of Tau phosphorylation. Diseases
VLDLR	lipoprotein receptor	537.3	183.9	263.1	2.922 down	2.042 down	associated with VLDLR include dysequilibrium syndrome, and cerebellar hypoplasia.
	tot to teacher.		,,,,,		,	,	Ligand for members of the frizzled family of seven transmembrane receptors. Probable
							developmental protein. May be a signaling molecule important in CNS development. Is
	Protein Wnt, Protein						likely to signal over only few cell diameters. Diseases associated with WNT10A include
WNT10A	Wnt-10a	733,3	126,0	367,9	5,818 down	1,993 down	odontoonychodermal dysplasia, and extratemporal epilepsy.
· · · · · ·							
XKR9	XK-related protein 9	1132,8	219,7	659,4	5,156 down	1,717 down	The function of this protein is unknown.

CHAPITRE IV

Modulation de l'expression du gène de la sousunité α 5 de l'intégrine α 5 β 1 par l'élément conservé identifié en amont des promoteurs des gènes α 3, α 5, α 9 et α v

4.1. Introduction

Le principal récepteur de la fibronectine (FN) est l'intégrine α 5 β 1 (Pytela et al., 1985) qui participe à la cicatrisation cornéenne en favorisant l'adhésion et la migration des cellules épithéliales sur la matrice temporaire de FN (Murakami et al, 1992 ; Nishida et al., 1992 ; Stepp et al., 1993 ; Suzuki et al., 2003 ; Kimura et al., 2010). La caractérisation du promoteur du gène α 5 indique que ce dernier est très riche en résidus GC (70%) et qu'il ne possède pas de boîtes TATA et CCAAT. Il possède néanmoins deux sites d'initiation de la transcription (positions -45 et +1) et un élément initiateur (Inr) (Birkenmeier et al, 1991). Le promoteur α 5 contient des sites potentiels de liaison à l'ADN pour plusieurs facteurs de transcription (FTs) tels: Sp1 (positions -93/-98), AP-1 (positions -45/-51), Ets (positions -297/-302) et AP-2 (positions +77/+84) (Birkenmeier et al, 1991). Les sites proximaux pour Sp1 (-52/-60) et AP1 (-45/-51) ont été démontrés comme étant occupés dans le promoteur α5 par ces FTs in vitro, ceux-ci exercant des effets positifs sur son activité transcriptionnelle (Corbi et al., 2000 ; Larouche et al., 2000 ; Gingras et al., 2003 ; Gingras et al., 2009). Un site NFI (-67/-71) a également été identifié dans le promoteur α 5 et ce facteur agit comme un puissant répresseur de ce gène (Gingras et al., 2009). Des études ont également démontrées que les FTs Pax-6, C/EBP et Ets-1 sont des modulateurs de la transcription du gène $\alpha 5$ (Voir Section 1.5.3 pour le détail).

De facon inattendue, une analyse détaillée des séquences régulatrices de tous les gènes codant pour une sous-unités α d'intégrines humaines ayant la capacité de s'associer avec la sous-unité β 1 (CHAOS+DIALIGN algorithm) nous a permis d'identifier un segment de 300 nucléotides hautement conservé entre les sous-unités d'intégrines α 3, α 5, α 9 et α v (\geq 83%) et localisé loin en amont du site d'initiation de la transcription de ces gènes (>1 Kpb). Une analyse fine de cette région de 300 nucléotides conservée a révélé la présence d'un sous-segment d'environ 50 nucléotides presqu'entièrement conservé (jusqu'à 93%) entre les promoteurs des gènes ITGA3, ITGA5, ITGA9 et ITGAV (Vigneault et al., 2007) (Figure 4.1). Ces sous-unités α d'intégrines sont exprimées dans l'épithélium cornéen (Lauweryns et al., 1991; Stepp, 2006; Vigneault et al., 2007) et leur expression a été démontrée comme étant accrue durant la cicatrisation des plaies (Garana et al., 1992 ; Stepp and Zhu, 1997; Vigneault et al., 2007; Liu et al., 2006; Blanco-Mezquita et al., 2011). Nous avons émis l'hypothèse que ces éléments conservés entre les sous-unités $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 9$ et av pourraient exercer une fonction régulatrice particulièrement importante durant la guérison des plaies cornéennes. Dans ce chapitre, nous avons tenté de vérifier l'influence régulatrice du segment d'ADN conservé distant (50pb et 300pb) en amont des promoteurs des gènes $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 9$ et αv sur la transcription du gène $\alpha 5$ ainsi que les FTs qui participent à ces influences régulatrices.



Figure 4.1. Alignement des séquences régulatrices des gènes des sous-unités α d'intégrines α 3, α 5, α 9 et α v.

Des alignements par paires et multiples de séquences génomiques des régions promotrices 5' en amont des gènes codant pour les sous-unités α d'intégrines humaines interagissant avec la sous-unité β 1 ont été réalisés en utilisant l'algorithme *CHAOS+DIALIGN*. Pour chaque sous-unité α , les séquences comprises entre le site d'initiation de la transcription (position +1) et un point situé 2000 pb en amont de ce site (position -2000) ont été soumises à des alignements et visualisées avec *ABC Java software*. Cette analyse détaillée des régions régulatrices 5' en amont des gènes codant les sous-unités d'intégrines α 3, α 5, α 9 et α v (\geq 83%). Une comparaison plus stricte de cette région de 300 nucléotides a révélé la présence d'un sous-segment d'environ 50 nucléotides presqu'entièrement conservé (homologies d'identités jusqu'à 93%) entre les gènes ITGA3, ITGA5, ITGA9 et ITGAV.

4.2. Matériel et Méthodes

4.2.1. Culture cellulaire

Les cellules épithéliales de cornées humaines (CECHs) ont été isolées du limbe d'yeux humains normaux provenant d'un donneur de 29 ans (pour EMSA) ou de 3, 44, 52, 71 et 82 ans (pour les transfections ou les analyses sur biopuces à ADN) obtenus par l'intermédiaire de la Banque d'Yeux Nationale du Centre Universitaire d'Ophtalmologie (CHU de Québec, QC, Canada) et cultivées selon la procédure décrite précédemment (Germain et al., 1999 ; Gaudreault et al., 2003). Les kératinocytes de peau proviennent de la dissection d'une biopsie mammaire de donneurs de 37 et 45 ans (pour les transfections) ou de 1 et 36 ans (pour les biopuces à ADN) et ont été cultivés selon la procédure décrite précédemment (Masson-Gadais et al., 2006). Les cultures primaires de CECHs et de kératinocytes sont cultivées en présence de cellules nourricières (fibroblastes murins Swiss-3T3 irradiés) dans du milieu DME-HAM avec sérum de veau reconstitué 5% (Carrier et al., 2009). Les lignées cellulaires mixtes (épithélioïdes et fusiformes) SP6.5, SP8.0, TP31, T97, T98, T108 et T115 sont dérivées de tumeurs primaires isolées de patients ayant développés un mélanome uvéal choroïdien (Beliveau et al. 2000; Landreville et al., 2011) alors que la lignée cellulaire épithélioïde H79 est dérivée de métastases secondaires hépatiques provenant d'un patient atteint d'un mélanome uvéal primaire et décédé des suites des lésions hépatiques (Bérubé et al. 2005). Toutes les lignées cellulaires de mélanome uvéal ont été mises en culture dans du milieu DMEM (Dulbecco' s modified Eagle's medium; Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada) additionné de 10% de FBS (fetal bovine serum; Gibco, Invitrogen). Toutes les cellules ont été cultivées sous des conditions de 5% de CO₂ à 37°C et le milieu de culture fut changé deux à trois fois par semaine selon le type cellulaire.

4.2.2. Identification des séquences conservés et des facteurs de transcription potentiels

Des alignements par paires et multiples de séquences génomiques des promoteurs des gènes encodant les sous-unités α d'intégrines humaines interagissant avec la sousunité β 1 ont été réalisés en utilisant l'algorithme *'CHAOS+DIALIGN'* (http://dialign.gobics.de/chaos-dialign-submission) (Brudno et al., 2003; Brudno et al., 2004). Pour chaque sous-unité α , les séquences régulatrices situées entre le site d'initiation de la transcription et une position située 2000pb en amont de ce site ont été soumises à des alignements et visualisées avec '*ABC Java software*' (http://mendel.stanford.edu/sidowlab/downloads/ABC_GERP/abcgerp.html) (Cooper et al., 2004).

Les sites de liaison potentiels pour les facteurs de transcription (FTs) contenus dans la séquence conservée de 50 nucléotides du gène α 3 (Postions -1171/-1118) ont été identifiés à l'aide des outils de recherche *TFSearch* (http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html) et *JASPAR* (http://jaspar.genereg.net) (Vlieghe et al., 2006 ; Portales-Casamar et al., 2010). Les sites de liaison potentiels pour les FTs contenus dans les séquences conservées de 300 nucléotides des gènes α 5 (Positions - 1181/-866) et α 9 (Positions -1951/-1725) ont également été identifiés à l'aide des programmes *TFSearch* et *JASPAR*.

4.2.3. Construction des plasmides et oligonucléotides

La construction des plasmides -132 α 5/CAT et -954 α 5/CAT, qui contiennent différents segments du promoteur α 5 (-132 à +23 et -954 à +23, respectivement) couplés au gène rapporteur chloramphénicol acétyltransférase (CAT) dans le vecteur pCAT-basic a été rapportée dans Béliveau et al. (Béliveau et al., 1999). Des oligonucléotides synthétiques double-brins portant la séquence du segment conservé distant de 50pb identifié pour les gènes α 3, α 5, α 9 et α v (50pb: Cons α 3, positions -1171/-1118; Cons α 5, positions -1095/-1042; Cons α 9, positions -1951/-1900; Cons α v, positions -1725/-1672) ont été clonés dans leur orientation 'sens' en amont du promoteur du gène α 5 dans les plasmides -132 α 5/CAT et -954 α 5/CAT. Les segments conservés distants de 300pb (orientation sens) pour les gènes α 5 et α 9 (300pb: Cons α 5, positions -1181/-866; Cons α 9, positions -1951/-1725), qui ont été obtenus par amplification par PCR (*'polymerase chain reaction'*) et digestion enzymatique à l'aide des enzymes de restriction SacII et PstI, ont également été clonés en amont du promoteur -132 α 5/CAT. Les séquences des éléments conservés de 300 nucléotides et des sous-régions hautement conservées de 50 nucléotides

de ces 4 gènes (α 3, α 5, α 9 et α v) sont illustrées à la Figure 4.1. Le plasmide pXGH5, qui code pour un variant sécrété de l'hormone de croissance humaine (hGH), a été fourni par Dr. David D. Moore (Departement of Molecular and Cell Biology, Baylor College of Medicine, Houston, TX).

Les oligonucléotides double-brins utilisés dans cette étude ont été chimiquement synthétisés (Biosearch 8700 apparatus; Millipore, Billerica, ME). Ceux-ci portent la séquence des segments conservés de 50pb des positions -1171 à -1118 du gène α 3, des positions -1095 à -1042 du gène α 5, des positions -1951 à -1900 du gène α 9 et des positions -1725 à -1672 du gène α v ou les séquences des sites de liaison à l'ADN à haute affinité pour les FTs Sp1, AP1 et Ets. Les séquences d'ADN des oligonucléotides doubles-brins et des amorces pour PCR sont présentées dans le Tableau 4.1.

4.2.4. Transfections transitoires

Les plasmides parentaux -132a5/CAT et -954a5/CAT ainsi que les versions modifiées de ces plasmides portant les éléments conservés de 50 nucléotides (Consa3, Consa5, Consa9 et Consav) et de 300 nucléotides (Consa5 et Consa9) ont été utilisés pour réaliser les transfections transitoires dans trois lignées cellulaires différentes, soit des CECHs, la lignée de mélanome uvéal T115 et des Kératinocytes de peau humaine. Les CECHs et les Kératinocytes sous-confluents ont été transfectés de façon transitoire, dans des plaques à 6 puits, par électroporation (100ul Neon Tip; Neon Transfection system, Invitrogen) selon les recommendations du manufacturier. Pour chaque triplicata, 1.2x10⁶ cellules (4x10⁵ cellules/puit) ont été resuspendues dans 300ul de tampon de resuspension (inclus dans la trousse) en ajoutant 45ug du plasmide test α 5/CAT et 15ug de pXGH5. Les paramètres utilisés du Neon sont les suivants: 1150 volts, 30 ms et 2 pulses pour les CECHs ; 1300 volts, 30 ms et 1 pulse pour les kératinocytes. Les cellules T115 ont été transfectés de façon transitoire à sous-confluence, dans des plaques à 6 puits, à l'aide d'un lipide polycationique, la lipofectamine (Gibco BRL), selon les recommandations du manufacturier. Le plasmide test α 5/CAT (1.5µg) et le plasmide pXGH5 (0.5µg) ont été ajoutés à chaque puit en présence de 4ul de lipofectamine. Pour toutes les transfections, l'activité CAT a été mesurée (Selden et al., 1986 ; Pothier et al., 1992) et normalisée par rapport à la quantité de hGH sécrétée dans le milieu de culture (Medicorp, Montréal, Québec) ainsi qu'à la quantité de protéine utilisée pour chaque mesure (dosage Bradford). Les valeurs d'activités CAT représentent la moyenne (\pm écart-type) d'au moins trois transfections effectuées chacunes en triplicata. Des analyses statistiques (Student's t-test) ont été réalisées pour la comparaison des groupes et les différences ont été considérées statistiquement significatives lorsque P < 0.05.

Tableau 4.1. Séquence d'ADN des oligonucléotides doubles-brins et des amorces.

Oligonucléotide	Brin du haut (5'-3')/ Brin du bas (5'-3')
Cons a3	GATCTTCAAGCGATTCTCCTGCCCCAGCCTCCCAAATAGCTGGAACTACAGGCGC GATCGCGCCTGTAGTTCCAGCTATTTGGGAGGCTGGGGCAGGAGAATCGCTTGAA
Cons a5	GATCTTCAAGTAATTATCCTGCCTCAGCTTCCCGAGTAGCTGGGATTACAGGTGC GATCGCACCTGTAATCCCAGCTACTCGGGAAGCTGAGGCAGGATAATTACTTGAA
Cons a9	GATCTTCAAGCGATTCTCCTGCCTCAGCCTCCCAAGTAGCTGGAATTACAGGCAT GATCATGCCTGTAATTCCAGCTACTTGGGAGGCTGAGGCAGGAGAATCGCTTGAA
Cons av	GATCTTCAAGCAATTCTCCTGCCTCAGCCTCCTGAGTAGCTGGGACTGCAGGCGC GATCGCGCCTGCAGTCCCAGCTACTCAGGAGGCTGAGGCAGGAGAATTGCTTGAA
Sp1	GATCATATCTGCGGGGCGGGGCAGACACAG GATCCTGTGTCTGCCCCGCCCGCAGATAT
AP-1	GATCCCCGCGTTGAGTCATTCGCCTC GATCGAGGCGAATGACTCAACGCGGG
Ets	CTCTAGTACCAGGGAATTTAACACCCTCTTC GAAGAGGGTGTTAAATTCCCTGGTACTACAG

Oligonucléotides doubles-brins utilisés dans les retards sur gel (EMSA)

Amorces pour PCR des régions conservées 300pb pour clonage dans plasmide -132a5/CAT

Promoteur	Amorce sens (5'-3')/ Amorce anti-sens (5'-3')
ITGA5Cons300pb	GATCGACCGCGGAGTCTTGCTCTGTCACCCAG GATCGACTGCAGTAATGGCTGTAAACGCTGG
ITGA9Cons300pb	GATCGACCGCGGGAGTCTTGCTCAGTCACCC GATCGACTGCAGCTTAAACATTGTTGAAAG



4.2.5. Extraits nucléaires et Retards sur gel de polyacrylamide (EMSA)

Les extraits nucléaires ont été préparés à partir de CECHs et différentes lignées de mélanomes uvéaux (H79, SP6.5, SP8.0, TP31, T97, T98, T108, T115) cultivées à sousconfluence selon la procédure décrite antérieurement (Roy et al., 1991; Larouche et al., 2000). Les analyses de retards sur gel (EMSA) ont été réalisées selon le protocole décrit précédemment (Gingras et al., 2003) en utilisant, en guise de sonde radiomarquée en 5', un oligonucléotide synthétique double brin portant la séquence de 50pb de l'élément conservé α 3 (Cons α 3, positions -1171/-1118) qui fut incubé avec les différents extraits de protéines nucléaires (10ug). Pour les essais de compétition, des oligonucléotides non-marqués (Sp1, Ap1, Ets, Cons α 3, Cons α 5, Cons α 9, Cons α v) ont été ajoutés au mélange réactionnel en excès (50- à 1000x d'excès molaire). Dans les essais de super-rétentions en gel, des anticorps (4ul) dirigés contre les FTs Sp1, Ets-1, PU.1, JunB ou C/EBP ont aussi été utilisés. Les complexes ADN-protéines ont été séparés par électrophorèse sur des gels de polyacrylamide natifs de 6% ou 8% (Schneider et al., 1986). Les gels ont par la suite été séchés et exposés à -80°C pour révéler la positions des complexes ADN-protéines générés.

4.2.6. Profilage d'expression génique (Agilent)

L'ARN total des CECHs, T115 et des kératinocytes a été isolé à l'aide de la trousse *RNeasy Mini Kit* (QIAGEN, Toronto, ON, CA). Pour les CECHs, 8 réplicats biologiques ont été utilisés provenant de donneurs de 3, 44, 52 et 71 ans. Pour les kératinocytes (peau), 4 réplicats biologiques ont été utilisés provenant de donneurs de 1 et 36 ans. Pour les T115, 3 réplicats biologiques ont été utilisés provenant de cette lignée de mélanome uvéal en bas passage. Des cibles ARNc marquées au Cyanine 3-CTP ont été préparées à partir de 25 ng d'ARN total en utilisant la trousse *Agilent One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis kit* (Agilent Technologies). Par la suite, 600 ng ARNc ont été incubés sur un biopuce à ADN de type G4851A SurePrint G3 Human GE 8x60K (60 000 sondes, Agilent Technologies). Les lames ont été hybridées, lavées et balayées à l'aide du *Agilent SureScan Scanner* selon les instructions du manufacturier. Les données ont été finalement analysées et normalisées à l'aide du programme *ArrayStar V4.1* (DNASTAR, Madison, WI, USA) pour la production des cartes à nuage de points ('*scatterplots*') et des cartes thermiques de type '*heatmaps*' de gènes sélectionnés selon la méthode décrite précédemment (Lake et al., 2013).

4.3. Résultats

4.3.1. Influence de l'élément conservé en amont des gènes des sous-unités d'intégrines α 3, α 5, α 9 et α v sur l'activité du promoteur du gène α 5

L'analyse détaillée des régions régulatrices 5' en amont des gènes codant les sous-unités d'intégrines (CHAOS+DIALIGN algorithm) a permis d'identifier un segment distant de 300 nucléotides hautement conservé entre les gènes des sous-unités $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 9$ et αv (\geq 83%). Une comparaison plus stricte de cette région de 300 nucléotides a révélé la présence d'un sous-segment d'environ 50 nucléotides presqu'entièrement conservé (homologie d'identité jusqu'à 93%) entre les gènes ITGA3, ITGA5, ITGA9 et ITGAV (Vigneault et al., 2007) (Figure 4.1). Pour évaluer la contribution de cet élément distal conservé dans la régulation de l'activité du promoteur $\alpha 5$, des transfections transitoires ont été réalisées en utilisant des plasmides contenant le fragment conservé entier de 300pb provenant des gènes α 5 et α 9 (dans le plasmide -132 α 5/CAT), et le sous-fragment conservé de 50pb des gènes α 3, α 5, α 9 et α v cloné en amont du promoteur basal (dans le plasmide -132 α 5/CAT) et du promoteur long (dans le plasmide -954 α 5/CAT) du gène α 5. Ces plasmides recombinants ont ainsi été introduits dans des CECHs, dans la lignée de mélanome uvéal T115 ainsi que dans des kératinocytes de peau humaine qui sont trois types cellulaires en culture où nous avons précédemment démontré l'expression du gène α5 (Landreville et al., 2011 ; Lake et al., 2013 ; Duval et al., 2015). Les plasmides parentaux sans le segment conservé ont été utilisés en guise de contrôles. Les transfections réalisées dans les CECHs ont démontré que l'insertion de l'élément conservé de 300pb provenant des gènes a5 et a9 en amont du promoteur basal $\alpha 5$ (dans -132 $\alpha 5$ /CAT) entrainait une répression de 7- et 2-fois, respectivement de l'activité du gène CAT (Figure 4.2A). Dans la lignée du mélanome uvéal T115, les éléments conservés de 300pb des gènes α 5 et α 9 causent l'effet inverse, soit une activation d'environ 3.1 fois de l'activité du promoteur basal α 5 (Figure 4.2B). Dans les kératinocytes de peau humaine, l'élément conservé de 300pb du gène α9 cause une

activation d'environ 3.3 fois de l'activité du promoteur basal α 5, tandis que celui du gène α5 n'affecte pas de façon significative l'activité de ce promoteur (Figure 4.2C). De façon inattendue, l'insertion de la sous-région de 50pb hautement conservée dans le plasmide - $132\alpha5/CAT$ provoque l'effet inverse du segment conservé de 300pb, soit une augmentation significative de l'activité du promoteur $\alpha 5$ d'environ 1.7 fois pour Cons $\alpha 3$, 1.6 fois pour Consa5, 3.4 fois pour Consa9 et 2.1 fois pour Consav dans les CECHs (Figure 4.3A). L'élément conservé de 50pb inséré dans le plasmide -954a5/CAT augmente également l'activité du promoteur a5, mais seulement pour la région Consa9 (5.4 fois) dans les CECHs (Figure 4.3B). Les éléments conservés de 50pb insérés dans les plasmides - $132\alpha5/CAT$ et -954 $\alpha5/CAT$ exercent également une influence positive significative sur l'activité du promoteur α5 dans les cellules T115 pour les 4 sous-unités d'intégrines (à l'exception de Consa3/-132a5CAT) (Figure 4.3C-D). Dans les kératinocytes de peau humaine, l'élément conservé de 50pb du gène α 3 inséré dans le plasmide -132 α 5/CAT diminue l'activité du promoteur $\alpha 5$ d'environ 2.2 fois, tandis que celui du gène $\alpha 5$ augmente l'activité CAT d'environ 1.7 fois (Figure 4.3E). Les éléments conservés de 50pb des gènes $\alpha 3$, $\alpha 9$ et αv insérés dans le plasmide -954 $\alpha 5$ /CAT augmentent l'activité du promoteur a5 d'environ 2.4-, 1.9- et 2.4 fois, respectivement, alors que l'élément 50bp a5 ne semble exercer aucun effet dans ce type cellulaire (Figure 4.3F). Par conséquent, l'élément conservé distant de 300pb peut avoir une influence positive (T115 et kératinocytes) ou négative (CECHs) sur l'activité du promoteur du gène α5 dépendamment du type cellulaire, tandis que le sous-segment conservé de 50pb exerce généralement une influence positive sur l'activité de ce promoteur génique (sauf quelques exceptions). Ces résultats suggèrent que les éléments conservés de 300 nucléotides sont composés de multiples éléments de régulation (éléments composites) certains étant des activateurs alors que d'autres sont des répresseurs de la transcription du gène de leur sous-unité d'intégrine respective.


Figure 4.2. Influence de l'élément conservé de 300 nucléotides provenant des gènes α5 et α9 sur l'activité du promoteur du gène α5.

Les segments conservés distants de 300pb provenant des gènes $\alpha 5$ (300Cons $\alpha 5$; positions -1181/-866) et $\alpha 9$ (300Cons $\alpha 9$; positions -1951/-1725) ont été clonés (orientation sens) en amont du promoteur du gène $\alpha 5$ (dans le plasmide -132 $\alpha 5$ /CAT) et transfectés dans des CECHs (**A**), dans la lignée de mélanome uvéal T115 (**B**) et dans des Kératinocytes de peau (**C**). Les valeurs des graphiques représentent les moyennes des activités CAT normalisées ((% d'activité CAT/4h/100 μ g de protéines)/ng hGH). Les astérisques (*) indiquent les activités CAT des éléments conservés considérées statistiquement significatives par rapport aux activités CAT mesurées avec le plasmide parental -132 α 5/CAT (Student's t-test ; P < 0.05). Les écart-types sont également indiqués.



Figure 4.3. Influence de l'élément conservé de 50 nucléotides provenant des gènes α3, α5, α9 et αv sur l'activité du promoteur du gène α5.

Les sous-fragments de 50pb hautement conservés identifiés dans les gènes $\alpha 3$ (Cons $\alpha 3$; positions -1171/-1118), $\alpha 5$ (Cons $\alpha 5$; positions -1095/-1042), $\alpha 9$ (Cons $\alpha 9$; positions -1951/-1900) et αv (Cons αv ; positions -1725/-1672) ont été clonés (orientation sens) en amont du promoteur du gène $\alpha 5$ dans les plasmides -132 α 5/CAT (**A**, **C** et **E**) et -954 α 5/CAT (**B**, **D** et **F**). Les plasmides parentaux ainsi que ceux portant les éléments conservés de 50 nucléotides ont été transfectés dans des CECHs (**A** et **B**), dans la lignée de mélanome uvéal T115 (**C** et **D**) et dans des Kératinocytes de peau (**E** et **F**). Les valeurs des graphiques représentent les moyennes des activités CAT normalisées ((% d'activité CAT/4h/100µg de protéines)/ng hGH). Les astérisques (*) indiquent les activités CAT des éléments conservés considérées statistiquement significatives par rapport aux activités CAT mesurées avec les plasmides parentaux (Student's t-test ; P < 0.05). Les écart-types sont également indiqués.

4.3.2. Facteurs de transcription impliqués dans la modulation de l'expression du gène α 5 par l'élément conservé en amont des gènes de sous-unités d'intégrines α 3, α 5, α 9 et α v

Les influences régulatrices négatives ou positives sur l'activité du promoteur du gène a5 exercées par les éléments conservés provenant des gènes $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 9$ et αv résultent probablement de leur reconnaissance par un nombre limité de FTs communs contribuant à la co-expression ou à la co-répression de ces intégrines dans les cellules épithéliales. Quelques séquences cibles potentielles pour différents FTs connus ont été identifiées dans l'élément conservé de 50pb du gène a3 (positions -1171/-1118) à l'aide des programmes *TFSearch* et de *JASPAR*. Celles-ci comprennent les séquences reconnues par les FTs HSF2, GATA, Sp1, Lyf-1, c-Ets et NFI (Figure 4.4A). Plusieurs de ces sites potentiels ont également été identifiés dans l'élément conservé de 50pb des autres gènes d'intégrines $\alpha 5$, α 9 et α v (voir Annexe 3). Ceux-ci comprennent entre autres des séquences cibles pour les FTs Sp1, c-Ets et AP-1 dans l'élément conservé de 50pb de ces quatre gènes d'intégrines α, à l'exception du segment conservé du gène α 3 qui ne possède pas de site pour AP-1. Des essais en retard sur gel (EMSA) ont été réalisés en utilisant le segment conservé α3 (-1171/-1118) comme sonde radiomarquée. Cette sonde a ainsi été incubée en présence d'extraits de protéines nucléaires préparées à partir de cultures de CECH cultivées à sous-confluence ou de différentes lignées de mélanome uvéal (H79, SP6.5, SP8.0, TP31, T97, T98, T108, T115) afin de démontrer la liaison des protéines nucléaires à cette région conservée. Ces analyses ont permis de démontrer la formation de trois complexes ADN-protéine (C1, C2, C3) avec la plupart des extraits nucléaires préparés des lignées cellulaires examinées (Figure 4.4B). Des analyses de compétitions utilisant la sonde radiomarquée de 50pb de l'élément conservé α 3 (-1171/-1118) incubée avec des protéines nucléaires provenant des cellules H79 seules ou en présence des segments conservés de 50pb non-marqués provenant des gènes a3, a5, a9 et av (50- à 1000x d'excès molaire) ont permis de démontrer qu'en dépit des différences mineures dans leur composition, ces 4 éléments conservés compétitionnent de manière très similaire, bien que quelques différences subtiles aient été notées. En effet, l'élément conservé du gène a3 s'avère le plus efficace pour compétitionner la formation du complexe ADN-protéine C2, tandis que la formation des complexes C1 et C3 est altérée de manière identique par les 4 oligonucléotides de 50pb (Figure 4.5). Des analyses de compétitions avec un excès d'oligonucléotide compétiteur non-marqué portant la séquence prototypique pour le FT Sp1 combiné à des analyses de super-rétentions sur gel réalisées à l'aide d'un anticorps dirigé contre Sp1 ont démontré que le segment conservé de 50pb du gène α3 est lié par le FT Sp1 puisque les complexes diminuent ou disparaissent en compétition et qu'il y a la formation d'un complexe super-retardé (*'supershift'*) avec l'anticorps Sp1 du complexe C3 sur le gel (Figure 4.4C). Des analyses de compétitions avec un excès d'oligonucléotides compétiteurs non-marqués AP-1 ou Ets suggèrent la liaison possible des membres des familles AP-1 et Ets au segment conservé de 50pb puisque la formation de certains complexes ADN-protéine diminuent en présence de ces FTs sur le gel (Figure 4.4C).

Des séquences cibles potentielles pour différents FTs présentes dans les séquences conservées de 300pb des gènes a5 et a9 ont été identifiées à l'aide des programmes TFSearch et JASPAR. Seize FTs potentiels ont été identifiés comme pouvant lier les régions conservées du gène α 5 et du gène α 9, soit : Sp1, AP-1, c-Ets, NFI, GATA-X, C/EBP, Oct-1, Sox-5, c-Rel, p300, MyoD, c-Myc, N-Myc, Lyf-1, HSF2 et CREB (Figure 4.6A). De surcroit, la région conservée de 315 nucléotides du gène α 5 (-1181/-866) possède entre autres 2 sites de liaison potentiels pour Sp1, 3 sites pour AP-1 et 4 sites pour c-Ets qui sont tous connus comme des activateurs dans la régulation du gène $\alpha 5$ (Corbi et al., 2000 ; Larouche et al., 2000 ; Kita et al., 2001 ; Gingras et al., 2003 ; Gingras et al., 2009). De plus, 8 sites de liaison potentiels pour NFI, un puissant répresseur du gène α 5 (Gingras et al., 2009), ont été identifiés dans cette séquence conservée. La séquence conservée de 226 nucléotides du gène α 9 (-1951/-1725) possède, quant à elle, 3 sites de liaison potentiels pour Sp1, 2 pour AP-1, 1 pour c-Ets et 6 pour NFI (Figure 4.6A et Annexe 3). Nous avons ensuite réalisé des analyses de l'expression génique sur biopuces à ADN afin d'analyser les profils d'expression de tous les FTs pouvant potentiellement lier les éléments conservés identifiés précédemment. Ces données, présentées sous forme de cartes thermiques 'heatmap', ont été réalisées à partir de l'ARN isolé de cultures primaires de CECHs et de Kératinocytes de peau, ainsi que de la lignée de mélanome uvéal T115. Les données de profilage génique indiquent que certains de ces FTs potentiels ne sont pas exprimés (GATA-1, GATA-2, MyoD, Sox-5, Lyf-1) alors que d'autres sont exprimés faiblement (Ets-1, NFI-C), modérément (NFI-A, NFI-B, NFI-X, JUND, JUNB, FOSB, FOSL1 (Fra-1), Ets-2, Oct-1, C/EBP α , c-Rel) ou fortement (Sp1, Sp3, FOS, JUN, FOSL2 (Fra-2), c-Myc, C/EBP β) dans les CECHs (Figure 4.6B). Certaines différences sont observées dans la lignée de mélanome uvéal T115. En effet, lorsqu'ils sont comparés aux CECHs, les niveaux d'expression des transcrits pour les FTs JUN, JUND et C/EBP α sont considérablement augmentés dans les cellules T115. À l'inverse, l'expression des ARNm codant pour les isoformes NFI-A, NFI-B et NFI-X diminue, ainsi que celle des transcrits codant pour les autres sous-unités de AP-1, soit FOS, FOSL1, FOSL2 et JUNB. L'expression des gènes Ets-1, Ets-2 et C/EBP β diminue également dans les T115 en comparaison avec les CECHs (Figure 4.6B). Dans les Kératinocytes de peau, l'expression des transcrits FOS, FOSL1, NFI-A, Ets-2 et C/EBP α est augmentée par comparaison aux CECHs (Figure 4.6B). Ces résultats suggèrent que les éléments conservés distants en amont des gènes ITGA3, ITGA5, ITGA9 et ITGAV sont composés de multiples éléments de régulation et que c'est le ratio entre les activateurs (par exemple, Sp1, Ets et AP-1) et les répresseurs (par exemple, les isoformes NFI) qui module la transcription fine du gène α 5.



Figure 4.4. Analyse de la liaison de protéines nucléaires à l'élément conservé de 50pb par retards sur gel (EMSA).

A: Séquence du segment conservé de 50pb identifié en amont du gène a3 et couvrant les régions -1171 à -1118. Les sites de liaison potentiels pour certains FTs identifiés à l'aide des véhicules de recherche TFSearch et JASPAR (GATA-1, HSF2, Sp1, Lyf-1, c-Ets, NFI) sont également indiqués. B: Un oligonucléotide synthétique double brin portant la séquence de 50pb de l'élément conservé du gène α 3 (-1171/-1118) et marqué à ses extrémités 5' a été incubé en présence d'extraits nucléaires (10µg) provenant de CECHs (HCEC/SC) et de différentes lignées de mélanome uvéal (H79, SP6.5, SP8.0, TP31, T97, T98, T108, T115) cultivées à sous-conflence. Les complexes ADN-protéine (dénotés C1, C2 et C3) ont été séparés par électrophorèse sur gels de polyacrylamide natifs (6% ou 8%). C: La sonde radiomarquée utilisée en B a été incubée avec des protéines nucléaires provenant de cellules T108 seules (T108) ou en présence de 50x ou 250x d'excès molaires d'oligonucléotides synthétiques non-marqués (compétiteurs) portant des sites de liaison pour les FTs Sp1, Ets et AP-1. Des essias de super-rétentions en gel ont également été réalisés à l'aide d'anticorps (4ul) dirigés contre les FTs Sp1 (Sp1 ab), Ets-1 (Ets-1 ab), PU.1 (PU-1 ab), JunB (Jun B ab) ou C/EBP (C/EBP ab) et ajoutés avant la réaction de séparation des complexes ADN-protéine (C1, C2 et C3) sur gel. P: sonde radiomarquée sans addition de protéines nucléaires; U : fraction non-retenue de la sonde; SSC: complexe super-retardé (supershift) obtenu avec l'anticorps anti-Sp1.



Cons a3 probe

Figure 4.5. Affinité des protéines contenues dans les complexes C1, C2 et C3 visà-vis les éléments conservés des gènes a5, av, a3 et a9.

La sonde radiomarquée utilisée en figure 4.4 et portant la séquence de l'élément conservé du gène α 3 (-1171/-1118) a été incubée avec 10µg d'extraits de protéines nucléaires provenant de cellules H79 seules (H79) ou en présence de concentrations croissantes (50- à 1000x d'excès molaires) d'oligonucléotides synthétiques non-marqués (compétiteurs) portant la séquence de 50pb de l'élément conservé identifié en amont des gènes α 5 (Cons α 5, positions -1095/-1042), α v (Cons α v, positions -1725/-1672) (Panneau A), α 3 (Cons α 3, positions -1171/-1118) et α 9 (Cons α 9, positions -1951/-1900) (Panneau B). La position des 3 complexes ADN-protéine est indiquée (C1, C2 et C3) ainsi que la fraction non-retenue de la sonde (U).





Figure 4.6. Facteurs de transcription potentiels pouvant se lier aux éléments conservés de 300 nucléotides en amont des gènes $\alpha 5$ et $\alpha 9$ et leur patron d'expression dans les CECHs, T115 et les kératinocytes.

A: Représentation schématique des éléments conservés de 300 nucléotides en amont des gènes $\alpha 5$ (positions 1181/-866) et $\alpha 9$ (positions -1951/-1725) et des différents sites de liaisons potentiels pour les FTs (Sp1, AP-1, c-Ets, NFI, GATA-X, C/EBP, Oct-1, Sox-5, c-Rel, p300, MyoD, c-Myc, N-Myc, Lyf-1, HSF2 et CREB) identifiés à l'aide de *TFSearch* et *JASPAR*. **B:** Représentation sous forme de *'heatmap'* du patron d'expression transcriptionnel de tous les FTs potentiels identifiés en A.

4.4. Discussion

La régulation de la transcription requiert la contribution de FTs liant des séquences cibles de l'ADN localisées près ou à une certaine distance du promoteur basal de chaque gène transcrit par la PolII. Depuis les dernières années, notre laboratoire a publié plusieurs ouvrages traitant de l'organisation du promoteur basal du gène α5, qui porte des sites de liaison pour les FTs Sp1, AP1 et NFI (Larouche et al., 2000; Gingras et al., 2003; Gingras et al., 2009). Même si le promoteur basal du gène α5 a été étudié et s'avère aujourd'hui bien caractérisé, aucune étude n'a, à ce jour, examiné l'influence régulatrice des séquences d'ADN situées loin en amont du promoteur basal du gène α5 sur la transcription de celui-ci. Récemment, une analyse détaillée (CHAOS+DIALIGN algorithm) des séquences régulatrices des gènes codant les sous-unités α d'intégrines a été réalisée (Vigneault et al., 2007). De façon inattendue, un segment de 300 nucléotides hautement conservé a été identifié en amont des gènes ITGA3, ITGA5, ITGA9 et ITGAV. Ce segment conservé est localisé entre les positions -866 à -1181 par rapport au site d'initiation de la transcription du gène $\alpha 5$, ainsi qu'entre les positions -941 à -1257 dans le promoteur $\alpha 3$, entre les positions -1725 à -1951 dans le promoteur α9 et entre les positions -1495 à -1811 dans le promoteur αν. Une comparaison plus stricte de cette région conservée a permis d'identifier un soussegment d'environ 50 nucléotides presqu'entièrement conservé entre les régions régulatrices des gènes de ces sous-unités α d'intégrines avec une homologie d'identité avoisinant 93% entre a3 et a9. Ce sous-segment conservé est localisé entre les positions -1042 à -1095 par rapport au site d'initiation du gène $\alpha 5$, ainsi qu'entre les positions -1118 à -1171 pour le gène α 3, entre les positions -1900 à -1951 pour le gène α 9 et entre les positions -1672 à -1725 pour le gène αν (Vigneault et al., 2007) (Figure 4.1).

Les sous-unités d'intégrines $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 9$ et αv possédant des séquences conservées dans les séquences régulatrices de leur gène respectif sont exprimées par l'épithélium cornéen (Lauweryns et al., 1991; Stepp, 2006 ; Vigneault et al., 2007) et leur expression a été démontrée comme étant augmentée durant la cicatrisation de ce tissu en association avec le remodelage de la MEC (Garana et al., 1992 ; Stepp and Zhu, 1997 ; Vigneault et al., 2007 ; Blanco-Mezquita et al., 2011) suggérant que ces intégrines exercent des fonctions clés durant la guérison des plaies cornéennes. Les promoteurs de plusieurs sous-unités α

d'intégrines possèdent un ou plusieurs sites de liaison pour des FTs communs. Par exemple, les promoteurs des sous-unités d'intégrines $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$ et αv possèdent un ou plusieurs sites de liaison pour les activateurs Sp1 et Sp3, tandis que des sites pour le FT Ets ont été identifiés dans le promoteur des sous-unités d'intégrines a3, a4, a5 et av. Les promoteurs des gènes codant les sous-unités $\alpha 2$, $\alpha 4$ et $\alpha 5$ possèdent un ou plusieurs sites de liaison pour AP-1 tandis que les promoteurs des gènes $\alpha 2$, $\alpha 5$ et $\alpha 6$ portent des sites pour NFI (Zutter et al., 1994; Donahue et al., 1994; Kambe et al., 1998; Corbi et al., 2000; Kita et al., 2001; Kato et al., 2002; Katabami et al., 2006; Vigneault et al., 2007; Gaudreault et al., 2007 ; Gaudreault et al., 2008 ; Gingras et al., 2009 ; Kamoshida et al., 2012). Le promoteur basal du gène α 5 possède un site de liaison proximal (-50/-71) et distal (-101/-117) pour les FTs Sp1 et Sp3, ainsi qu'une séquence cible TGAGTCA reconnue par AP-1 (-45/-51), ces facteurs ayant été démontré pour exercer des influences positives sur l'expression du gène α 5 dans les cellules épithéliales de la cornée (Larouche et al., 2000 ; Gingras et al., 2003; Gingras et al., 2009). Le promoteur basal du gène a5 possède également une séquence cible pour les protéines appartenant à la famille NFI, celles-ci exerçant une influence négative sur l'expression du gène $\alpha 5$ dans les cellules épithéliales de la cornée (Gingras et al., 2009). NFI peut se lier à la séquence consensus palindromique (C/G/T)TGG(C/A) N5 (G/T)CCA(A/C/G) avec une haute affinité, mais il peut également se lier à un demi palindrome, soit (C/G/T)TGG(C/A) ou (G/T)CCA(A/C/G) avec un peu moins d'affinité (65% d'affinité) (Gronostajski, 1986 ; Osada et al., 1996 ; Roulet et al., 2000; Roulet et al., 2002). Sur le promoteur basal α 5, la séquence NFI identifiée correspond à un demi palindrome, soit TTGGC (Gingras et al., 2009). Il a été démontré que Pax-6 exerce son influence positive en se liant à une séquence cible située entre les positions -672 et -701 du promoteur α 5 dans les cellules fibreuses du cristallin (Duncan et al., 2000). Il a également été rapporté que Ets-1 augmente l'expression de la sous-unité a5 en interragissant avec un site de liaison indéterminé dans la lignée cellulaire du glioblastome U-251 (Kita et al., 2001). Par ailleurs, on a démontré que les FTs Sp3 (qui lie un motif riche en GC identifié à la position -69 dans le promoteur α3 de souris) et Ets-1 qui est un membre de la famille des Ets (qui reconnaît un motif central GGAA identifié à la position -133 dans le promoteur α 3 de souris et conservé chez l'humain à la position -460) exercent une régulation positive de manière coopérative sur l'expression du gène α 3, la

contribution de chacun des éléments variant entre différents types de cellules tumorales (Kato et al., 2002; Katabami et al., 2006; Kamoshida et al., 2012). Le promoteur du gène αv humain possède plusieurs sites de liaison potentiels pour des FTs, tels que 4 sites pour Sp1, 2 pour Ets et 1 pour GATA-1 (Donahue et al., 1994). Il a été rapporté que les FTs Sp1 et Ets coopéraient pour activer le promoteur du gène de la sous-unité d'intégrine αv dans les cellules de mélanome (Tajima et al., 2000). Des analyses in vitro par cartographie à la DNaseI et in vivo par immunoprécipitation de chromatine (ChIP) ont démontré que les FTs Sp1/Sp3, c-Myb et NFI se lient au promoteur du gène α9 humain (Duval et al., 2015). La présence de ces sites de liaison pour des FTs communs dans les promoteurs des gènes de ces sous-unités α d'intégrines exprimées dans l'épithélium cornéen ainsi que la présence des séquences conservées distales dans leurs régions régulatrices suggèrent la possibilité d'une régulation commune (co-expression ou co-répression) de ces intégrines. Dans cette étude, nous avons donc tenté : i) de vérifier l'influence régulatrice du segment d'ADN conservé distant (50pb et 300pb) localisé en amont des gènes $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 9$ et αv sur la transcription du gène de la sous-unité d'intégrine a5 et ii) d'identifier les FTs qui participent à ces influences régulatrices.

Les analyses en transfections ont révélé que le segment conservé de 50 nucléotides distant dans les promoteurs des gènes $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 9$ et αv exerce généralement une influence régulatrice positive sur l'activité du promoteur du gène $\alpha 5$ dans les CECHs, dans la lignée de mélanome uvéal T115 ainsi que dans les kératinocytes de peau humaine (sauf quelques exceptions). Des sites potentiels de liaison à l'ADN pour divers FTs ont été identifiés à l'aide de *TFSearch* et de *JASPAR* dans l'élément conservé de 50pb des gènes d'intégrines $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 9$ et αv . Ceux-ci comprennent entre autres des séquences cibles pour les FTs Sp1 (motif riche en résidus GC), Ets (motif central GGA(A/T)) et AP-1 (motif TGCCTCA, sauf absent pour $\alpha 3$) démontrés comme étant des activateurs du gène $\alpha 5$ (Corbi et al., 2000; Larouche et al., 2000; Gingras et al., 2003; Kita et al., 2001; Gingras et al., 2009). Ces observations théoriques sont en accord avec les analyses en retard sur gel (EMSA), qui ont permis de démontrer la formation de trois complexes ADN-protéine (C1, C2, C3) lorsque cette région conservée de 50 nucléotides est utilisée en guise de sonde radiomarquée et incubée en présence d'extraits de protéines nucléaires obtenus de CECH cultivées à sous-

confluence ou de lignées de mélanome uvéal. En effet, ces résultats suggèrent que ce segment conservé est probablement lié in vitro par les FTs Sp1, ainsi que des membres des familles AP-1 et Ets. Plusieurs travaux ont précédemment démontrés que les membres de la famille Ets coopéraient avec le FT Sp1 et/ou Sp3 pour activer le promoteur de plusieurs gènes d'intégrines, dont celui du gène α3 (Katabami et al., 2005), αν (Tajima et al., 2000), β2 (Rosmarin et al., 1998) et αIIb (Block et al., 1996). Il a été rapporté qu'une interaction entre Ets/Sp1 sur les séquences cibles du promoteur du gène aIIb permettrait de stabiliser la liaison de Sp1 à son site non consensus de faible affinité et que celle-ci serait essentielle pour l'expression de ce gène dépourvu de boîte TATA (Block et al., 1996). Des travaux ont également démontré que les membres de la famille Ets interragissaient fonctionnellement et physiquement avec les membres de la famille AP-1 pour activer de manière coopérative et synergique le promoteur de plusieurs gènes (Bassuck et Leiden, 1995), incluant l'expression du gène TIMP-1 (Logan et al., 1996), du gène GM-CSF (Granulocytemacrophage colony stimulating factor) (Wang et al., 1994b; Thomas et al., 1997), du gène codant la sous-unité d'intégrine αX (Noti et al., 1996), ainsi que des gènes MMP-1 et MMP-3 (Butticè et al., 1996; Basuyaux et al., 1997). D'autres études ont démontré que l'interaction directe entre les protéines AP-1 (notamment c-Jun) et Sp1, qui lie ses sites de liaisons riches en en résidus GC (GC box), contribue à l'activation de la transcription des gènes 12(S)-lipoxygénase (Chen et Chang, 2000 ; Chang, 2003 ; Chang et Chen, 2005) et p21^{WAF/CIP1} (Kardassis et al., 1999). Les promoteurs de ces gènes ne contiennent pas de sites AP-1, mais possèdent des boîtes riches en résidus GC. D'autre part, les promoteurs des gènes vimentine (Wu et al., 2003a), kératine 16 (Wang et Chang, 2003) et SPARC (osteonectin) (Briggs et al., 2002) contiennent des sites AP1 et une boîte GC qui permettent l'activation de ces gènes par deux méthodes : 1) par liaison des homo- ou hétérodimères AP-1 aux sites AP-1 dans leurs promoteurs respectifs et/ou 2) par interaction directe synergique de c-Jun avec Sp1 liant sa boîte GC dans leurs promoteurs respectifs. Ces observations sont en accord avec nos résultats en transfection et en retard sur gel (EMSA) suggérant que la région distante contenant l'élément conservé de 50pb est composée de plusieurs éléments de régulation positifs permettant l'association d'un complexe multiprotéique de FTs activateurs (Sp1/Ets/AP-1) régulant l'expression du gène α5 et permettant possiblement une co-régulation avec les autres gènes d'intégrines $\alpha 3$, $\alpha 9$ et αv dans les cellules épithéliales de la cornée.

Contrairement à l'élément conservé de 50 nucléotides, les analyses en transfections ont révélé que le segment entier de l'élément conservé de 300 nucléotides distant dans les promoteurs des gènes $\alpha 5$ et $\alpha 9$ exerce une influence régulatrice négative sur l'activité du promoteur a5 dans les CECHs. Ces résultats suggèrent ainsi qu'un ou des éléments de régulation négatifs seraient également présents sur la séquence de ces segments conservés de 300pb, donc dans le voisinage immédiat du segment hautement conservé de 50pb. Des sites de liaison potentiels pour plusieurs FTs (au moins 16) ont été identifiés à l'aide de TFSearch et de JASPAR dans l'élément conservé d'environ 300 nucléotides des gènes a5 et α 9. Il est intéressant de noter que plusieurs séquences cibles potentielles pour les membres de la famille des FTs NFI ont été identifiées dans la région conservée de 315 nucléotides du gène α 5 (-1181/-866) ainsi que dans celle de 226 nucléotides du gène α 9 (-1951/-1725). Les membres de la famille NFI sont bien connus pour agir comme de puissants répresseurs de la transcription de plusieurs gènes, incluant le gène PARP-1 (Laniel et al, 1997; Laniel et al, 2001), les gènes pour les intégrines $\alpha 2$, $\alpha 5$ et $\alpha 6$ (Zutter et al., 1994; Gingras et al., 2009; Gaudreault et al, 2008), le gène p21^{WAF1/CIP1} (Ouellet et al., 2006), le gène gadd153 (Nakamura et al., 2001), le gène collagène α1(I) (Nehls et al., 1992) et le gène GLUT4 (Cooke et Lane, 1999). NFI peut se lier à la moitié de sa séquence consensus, soit (C/G/T)TGG(C/A) ou (G/T)CCA(A/C/G) avec 65% d'affinité (Roulet et al., 2000 ; Roulet et al., 2002). La région conservée de 315 nucléotides du gène α5 possède 8 sites de liaison potentiels pour NFI dont la séquence correspond à une des moitiés de la séquence palindromique NFI tandis que celle de 226 nucléotides du gène a9 possède 6 sites pour NFI. Contrairement à la répression observée dans les CECHs, les éléments conservés de 300pb du gène α 5 et du gène α 9 causent une activation de l'activité du promoteur α 5 dans la lignée du mélanome uvéal T115. Récemment, une forte et faible expression de α 5 a été observée dans les cellules de mélanome uvéal présentant un potentiel tumorigène faible (T108/T115) ou élevé (T97/T98), respectivement. Ces changements importants dans l'expression du gène α5 ont été associés à une expression et une activité de liaison à l'ADN élevées pour NFI dans les lignées cellulaires agressives T97 et T98, tandis qu'elles sont très

faibles dans les lignées cellulaires non-agressives T108 et T115 (Landreville et al., 2011). Ces observations sont ainsi en accord avec l'augmentation de l'activité du promoteur du gène a5 par l'élément conservé de 300pb observée dans la lignée T115 en transfection et la forte diminution des niveaux des ARNm qui codent pour les isoformes NFI-A, NFI-B et NFI-X dans les T115 comparativement au CECHs en analyse de type 'heatmap' (Figure 4.6B). Elles sont également en accord avec la présence d'éléments positifs additionnels, comme ceux identifiés sur le fragment conservé de 50pb interne au segment de 300pb. En effet, l'élément 300pb du gène α5 comprend entre autres 2 sites de liaison potentiels pour Sp1, 3 pour AP-1 et 4 pour c-Ets alors que l'élément 300pb du gène α9 porte entre autres 3 sites de liaison potentiels pour Sp1, 2 pour AP-1 et 1 pour c-Ets, qui sont tous des activateurs du gène α5 (Corbi et al., 2000; Larouche et al., 2000; Kita et al., 2001; Gingras et al., 2003 ; Gingras et al., 2009). Certaines études ont tenté de classer les hétérodimères AP-1 en activateurs de la transcription forts (c-Fos, FosB, c-Jun) ou faibles (Fra-1, Fra-2, JunD). Cette tâche est néanmoins difficile puisque l'activité transcriptionnelle de chaque protéine AP-1 peut être dramatiquement affectée par la nature du promoteur du gène portant le site cible pour AP-1, par le contexte cellulaire, par la composition du dimère ainsi que par les interactions avec d'autres protéines régulatrices (Kaminska et al., 2000 ; Bakiri et al., 2002 ; Wisniewska et al., 2007). Cette tâche est complexe également pour les 4 isoformes NFI-A, NFI-B, NFI-C et NFI-X qui peuvent fonctionner comme activateurs (Gao et al., 1996; Clark et al., 2002; Mukhopadhyay et Rosen, 2007) ou répresseurs (Laniel et al., 2001; Nakamura et al., 2001; Ouellet et al., 2006) de la transcription génique, leur influence régulatrice positive ou négative étant en grande partie dictée par le type cellulaire étudié et par le promoteur du gène dont ils modulent la transcription (Chaudhry et al., 1998; Gao et Kunos, 1998; Murtagh et al., 2003). Certains membres de la famille C/EBP pour lesquels des séquences cibles ont été identifiées dans les éléments conservés, en l'occurance C/EBP α et C/EBP β , sont également fortement exprimés dans les lignées cellulaires analysées. On a ainsi rapporté que le KGF pouvait induire l'expression du gène α5 par phosphorylation de C/EBPβ permettant sa liaison au site de liaison C/EBP entre les positions -66 et -73 du promoteur dans un épiderme reconstruit stratifié (Koria et Andreadis, 2007). La surexpression de C/EBPα ou C/EBP β active l'activité des promoteurs des gènes d'intégrine $\alpha 2$ et $\alpha 5$ dans des cellules de

carcinome hépatocellulaire (HepG2 cells), mais réprime l'activité de ces promoteurs dans des kératinocytes de peau humaine et cet effet négatif est modulé par un ou des sites distincts non identifiés ainsi que par interactions avec d'autres protéines régulatrices (Corbi et al., 2000). La surexpression de C/EBPB active l'expression de HPV18 URR (Human papillomavirus type 18 upstream regulatory region) dans des cellules HepG2, mais réprime l'expression dans des cellules HeLa de manière indépendante de sa liaison à l'ADN et par interaction avec le FT YY1 (Yin Yang 1) (Bauknecht et al., 1996; Bauknecht et Shi, 1998). Par ailleurs, C/EBPβ réprime l'expression de HPV11 URR (Human papillomavirus type 11 upstream regulatory region) dans des kératinocytes de peau humaine de manière indépendante de sa liaison à l'ADN et par son interaction avec le FT YY1 liant son site de liaison proximal dans le promoteur (Ralph et al., 2006). Il a également été démontré que C/EBPß réprime l'expression de HPV16 URR (Human papillomavirus type 16 upstream regulatory region) par la liaison à des sites C/EBP et par compétition directe avec des FTs activateurs (par exemple, AP-1) pour leur liaison à des sites adjacents dans la région régulatrice (Kyo et al., 1993). Ainsi, puisque C/EBPβ peut s'avérer être un activateur ou un répresseur du gène α5 selon le contexte cellulaire, il est intéressant de noter la présence de 3 sites cibles potentiels pour C/EBP dans la région conservée de 300pb du gène α 5 ainsi que 2 sites dans celle du gène a9. Les membres de la famille des FTs Myc (notamment, c-myc et N-myc) sont connus pour agir comme des répresseurs de la transcription de plusieurs gènes (Herkert et Eilers, 2010), incluant les gènes d'arrêt de croissance p15^{Ink4b}, p21^{Cip1}, p27^{Kip1} et p57^{Kip2} (Seoane et al., 2001 ; Staller et al., 2001 ; Yang et al., 2001b ; Herold et al., 2002 ; Seoane et al., 2002 ; Wu et al., 2003b ; Gartel et Shchors, 2003 ; Adhikary et al., 2003) ainsi que les gènes pour les intégrines $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 6$, $\beta 1$, αL et αX (Judware et Culp, 1995 ; Judware et Culp, 1997 ; López-Rodríguez et al., 2000 ; Gebhardt et al., 2006 ; Nigris et al., 2007). On a proposé qu'une coopération entre YY1 et le complexe Myc/Max permettrait de réprimer la transcription du gène de l'intégrine α3 dans les cellules tumorales d'un ostéosarcome (Saos-2 cells) et que ce mécanisme de répression pourrait dépendre des liaisons des FTs Myc et YY1 à leurs séquences cibles identifiées sur l'ADN entre les positions -454 à -700 du promoteur α 3 humain (Nigris et al., 2007). De ce point de vue, il est intéressant de noter que les éléments conservés de 300pb du gène a5 et du gène a9 comprennent chacun 2 sites de liaison potentiels pour Myc, un répresseur transcriptionnel.

Il est pertinent de noter la présence d'un site cible potentiel pour c-Rel, un activateur transcriptionnel, dans le segment conservé de 300pb du gène α5. Les protéines NF-κB/Rel contribuent positivement à l'expression d'une multitude de gènes (Pahl, 1999), incluant les gènes de la vitronectine et de la fibronectine (Ritchie et al., 2000; Lee et al., 2002; Reuning, 2011; Stanisavljevic et al., 2011), le gène uPA (human urokinase type plasminogen activator) (Novak et al., 1991; Hansen et al., 1992), le gène MMP9 (Eberhardt et al., 2000; Wu et al., 2004; Cheng et al., 2012; Wu et al., 2013) ainsi que les gènes pour les intégrines αv et $\beta 3$ (Sharma et al., 1995 ; Ritchie et al., 2000). Des études utilisant un anti-sens de RelA ont menées à l'identification d'un motif potentiel kB présent dans le promoteur av qui se rapproche des séquences cibles de liaison RelA/c-Rel suggérant un rôle des FTs NF-κB/Rel dans la régulation de ce gène (Sharma et al., 1995). L'élément conservé de 300pb du gène α 9 cause une activation de l'activité du promoteur du gène $\alpha 5$, tandis que celui du gène $\alpha 5$ n'a pas d'effet sur ce promoteur dans les kératinocytes. Les différences observées dans les kératinocytes (cellules épithéliales de peau humaine) par rapport au CECHs sont probablement dues à des influences de nature tissu-spécifique. Il demeure également possible que des FTs autres que ceux identifiés dans cette étude soient impliqués dans la régulation du gène $\alpha 5$. Ces résultats suggèrent que la région distante conservé de 300pb est composée de multiples éléments de régulation et que le ratio entre les activateurs (par exemple, Sp1, Ets, AP-1, c-rel et C/EBP) et les répresseurs (par exemple, NFI, C/EBP et c-myc) module la transcription du gène α 5 selon le contexte cellulaire.

En conclusion, nous avons démontré dans cette étude la présence d'une région distale conservée de 300 nucléotides (incluant une sous-région interne hautement conservée de 50 nucléotides) située en amont des gènes codant pour les sous-unités d'intégrines $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 9$ et αv qui est composée de plusieurs éléments de régulation (positifs et négatifs) et qui participe à la modulation fine de l'expression du gène $\alpha 5$. Il reste cependant à déterminer la fonctionnalité et l'importance des sites potentiels de liaison identifiés pour plusieurs FTs dans ces segments conservées dans la régulation de l'activité du promoteur $\alpha 5$ dans les cellules épithéliales de la cornée.

CHAPITRE V

Modulation de l'expression génique par les composantes de la matrice extracellulaire

5.1. Introduction

Les chapitres précédents ont démontré que les composantes de la matrice extracellulaire (MEC) modifient l'expression de plusieurs intégrines, en particulier celle de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ jouant un rôle majeur dans l'adhésion et la migration des cellules épithéliales de la cornée lors de la cicatrisation de ce tissu. L'adhésion et la migration des cellules épithéliales de cornées humaines (CECHs) sur la MEC affectent également l'expression de gènes autres que ceux codant pour certaines intégrines. Ce chapitre présente les résultats d'analyses sur biopuces à ADN qui nous ont permis d'identifier d'autres gènes dont l'expression est modulée par les composantes de la MEC. Ces analyses présentent des résultats complémentaires à ceux décrits dans les chapitres précédents de cette thèse et qui ouvrent de nouvelles pistes de recherche sur les gènes autres que les intégrines qui pourraient exercer des rôles importants durant le processus de la cicatrisation cornéenne.

5.2. Matériel et Méthodes

Les CECHs ont été cultivées jusqu'à confluence sur des matrices complexes (ECM35d \pm keratocytes) produites par génie tissulaire en utilisant la méthode d'auto-assemblage, sur des matrices simples de collagènes (CI et CIV) et sur du BSA 2% (contrôle) tel que présenté dans les chapitres II et III. Toutes les analyses sur biopuces à ADN de type Agilent (G4851A SurePrint G3 Human GE 8x60K array slide) et en qPCR ont été réalisées tel que mentionné dans les sections *Matériel et Méthodes* présentées dans les chapitres II et III. Les surnageants de culture des CECHs cultivées sur BSA ou sur matrices 35jours dévitalisées (ECM35d/keratocytes-) ont été récoltés pour évaluer l'activité des gélatinases (MMP-2 et



MMP-9) par zymographie sur gel de gélatine (Beliveau et al., 2000 ; Toth et Fridman, 2001). Les analyses zymographiques ont été effectuées par électrophorèse sur gels de polyacrylamide à 8%, contenant 1 mg/ml de gélatine. Les gels ont subi deux lavages de 30 minutes dans une solution de Triton X-100 à 2.5% dans 50 mM Tris (pH 7.4) et deux lavages de 15 minutes dans 50 mM Tris (pH 7.4). Ensuite, les gels ont été incubés pendant toute la nuit dans un tampon 50 mM Tris (pH 7.4) contenant 10 mM CaCl₂. Suivant ce traitement, les gels ont été colorés au bleu de Coomassie afin de mettre en évidence l'activité des gélatinases.

5.3. Résultats

5.3.1. Influence des matrices extracellulaires reconstruites et des matrices simples de collagènes sur l'expression de gènes autres que les gènes des intégrines dans les CECHs

Des analyses en profilage d'expression génique ont été effectuées à l'aide de biopuces à ADN afin d'identifier les gènes possédant un patron d'expression le plus dérégulé dans les CECHs cultivées à confluence sur les matrices extracellulaires reconstruites. Suite à cette analyse, 53 gènes dont l'expression diffère par plus de 4 fois (activation ou répression) dans les CECHs cultivées à confluence sur les matrices 35 jours avec ou sans kératocytes (ECM/keratocytes+ ou vivante; ECM/keratocytes- ou dévitalisée) par rapport à l'expression des CECHs cultivées sur BSA ont été identifiés (Figure 5.1A). Parmi ceux-ci, 4 gènes codent pour des composantes de la MEC, dont la ténascine-C (TNC), la fibronectine (FN1), le collagène de type 22 (COL22A1) et une protéine appartenant à la famille des protéoglycanes (SPOCK1), leur expression étant considérablement accrue dans les CECHs sur matrices \pm kératocytes (Figure 5.1A). Une analyse plus spécifique de tous les gènes codant pour des composantes de la MEC dans les CECHs cultivées à confluence sur des matrices simples de collagènes (CI ou CIV) ou sur des matrices extracellulaires reconstruites sans kératocytes nous indique que tout comme pour les matrices complexes reconstruites, les matrices simples de collagènes (CI et CIV) provoquent également une augmentation notable de l'expression du gène TNC (Figure 5.2A). La matrice simple de CI, mais pas celle de CIV, provoque également une augmentation significative de l'expression du gène FN1 dans les CECHs à confluence (Figure 5.2A). Le CI semble toutefois réprimer l'expression de plusieurs gènes de différents types de collagènes (COL1A2, COL4A2, COL4A5, COL4A6, COL5A2, COL6A1, COL7A1, COL8A1, COL9A3, COL13A1, COL16A1, COL17A1, COL18A1, COL23A1), tandis que le gène COL5A2 est réprimé également par le CIV dans les CECHs (Figure 5.2B). L'expression des gènes COL4A4 et COL22A1 est accrue seulement en présence des matrices ECM35d/keratocytes- (Figure 5.2B). Les matrices reconstruites \pm kératocytes provoquent aussi une forte augmentation de l'expression de 4 métalloprotéinases matricielles (MMPs) : MMP-1, MMP-9, MMP-10 et MMP-12 (Figure 5.1A). L'expression de 3 gènes codant pour des cytokines est également augmentée par les matrices complexes \pm kératocytes, dont IL6, IL8 et IL1 β (Figure 5.1A). Des résultats similaires ont été obtenus pour plusieurs de ces gènes (MMP-9, MMP-10, FN1, SPOCK1 et IL6 ; voir Annexe 2: Figure A2.2) lorsque les CECHs sont cultivées sur les matrices 35 jours dévitalisées à sous-confluence par comparaison aux CECHs cultivées sur BSA.

Afin d'identifier des gènes qui pourraient être dérégulés uniquement par la matrice vivante, une analyse similaire a été effectuée pour identifier ceux dont les niveaux d'expression diffèrent d'au moins 16 fois dans les CECHs cultivées à confluence uniquement sur les matrices avec kératocytes par comparaison à leur expression dans les CECHs cultivées sur BSA. Parmi les 53 gènes les plus dérégulés par la matrice avec kératocytes, 7 (indiqués en rouge) avaient également été identifiés dans les CECHs cultivées sur matrices dévitalisées (Figure 5.1A). Ainsi, 46 gènes dérégulés par la condition ECM/keratocytes+ et non par ECM/keratocytes- ont pu être identifiés (Figure 5.1B; Section 2.13: Supplementary Table 2.1). Douze de ces gènes codent pour différentes composantes de la MEC (FN1, COL1A1, COL1A2, COL3A1, COL5A1, COL5A2, COL6A1, COL8A2, TNC, FBLN5, EDIL3, MFAP4), 2 gènes pour des cytokines (IL6 et IL11) et deux pour des protéoglycanes ou des protéines associées (comme LUM et SPOCK1). En outre, 4 différents gènes MMPs (MMP-2, MMP-3, MMP-12 et MMP-13) voient leur expression considérablement augmentée par les matrices avec kératocytes (Figure 5.1B; Section 2.13: Supplementary Table 2.1). L'expression des gènes MMP-9 et MMP-10 est également accrue par la matrice ECM/keratocytes+ (6- et 9 fois d'activation, respectivement) (Figure 5.1A).



Housekeeping control genes

Figure 5.1. Patron d'expression des gènes les plus dérégulés des CECHs cultivées sur les matrices reconstruites.

A: Analyse de type '*heatmap*' du patron d'expression des 53 gènes dérégulés par plus de 4 fois (> 4-fold change of \log_6 of signal intensity) dans les CECHs cultivées à confluence sur BSA 2% ou sur matrices 35 jours reconstruites dévitalisées ou non (ECM/keratocytes- ou ECM/keratocytes+). L'échelle de couleur utilisée permet de comparer les gènes peu ou pas exprimés (en bleu) de ceux fortement exprimés (en rouge). **B:** Profil d'expression des 53 gènes dérégulés par plus de 16 fois (> 16-fold change of \log_6 of signal intensity) dans les CECHs cultivées à confluence sur matrice ECM/keratocytes+ par comparaison aux CECHs cultivées sur BSA 2%. Les gènes marqués en rouge ont également été identifiés dans le panneau A.



Figure 5.2. Patron d'expression des gènes codant pour des composantes de la MEC dans des CECHs cultivées sur matrices reconstruites ou sur matrices simples de collagènes.

Analyse de type '*heatmap*' du patron d'expression des gènes codant pour les diverses composantes de la MEC et comprenant, entre-autre : (A) des glycoprotéines (celles identifiées par spectrométrie de masse dans les ECM35d/keratocytes-) et (B) tous les types de collagènes entre les CECHs cultivées à confluence sur BSA 2% et les CECHs cultivées sur matrices simples de collagènes (CI: 75 μ g/cm² ou CIV: 50 μ g/cm²) ou sur matrices complexes reconstruites (ECM35d/keratocytes-).

5.3.2. Influence des matrices extracellulaires reconstruites et des matrices simples de collagènes sur l'expression des gènes MMPs dans les CECHs

Les données obtenues à partir des biopuces à ADN ont permis une analyse globale du patron d'expression de tous les gènes MMPs dans les CECHs cultivées à confluence sur les matrices extracellulaires reconstruites en absence de kératocytes. Plusieurs métalloprotéinases voient leur expression augmentée par la matrice dévitalisée, dont MMP-1, MMP-7, MMP-9, MMP-10, MMP-15, MMP-23 et MMP-25 (Figure 5.3A). Toutefois, les gènes MMP9 et MMP10 apparaissent clairement comme les plus dérégulés par les matrices 35jours en absence de kératocytes (28- et 17 fois d'activation, respectivement). Ces variations observées sur biopuces à ADN ont également été validées par des augmentations significatives dans l'expression des gènes MMP-9 (18 fois) et MMP-10 (7 fois) en qPCR (Figure 5.3B). Les protéines MMP-2 et MMP-9 sont des gélatinases sécrétées sous formes latentes telles qu'une pro-MMP-2 de 72 KDa et une pro-MMP-9 de 92 KDa. Après activation, les formes actives sont une MMP-2 de 62 KDa et une MMP-9 de 82 KDa. L'activité enzymatique de ces gélatinases peut être déterminée par zymographie en gel (Toth et Fridman, 2001). L'analyse zymographique sur gel de gélatine confirme que le changement d'expression génique observé pour MMP-9 par biopuces à ADN et qPCR se traduit également par un changement au niveau de l'activité enzymatique de cette enzyme. En effet, les cellules cultivées à confluence sur les matrices 35 jours possèdent une activité enzymatique MMP-9 nettement plus élevée que les cellules cultivées sur BSA (Figure 5.3C). Toutefois, aucune altération dans l'activité enzymatique MMP-2 n'a été observée (Figure 5.3C), ce qui est en accord avec le niveau d'expression faible et stable de MMP-2 dans les CECHs cultivées sur ECM/keratocytes-. Des résultats similaires ont également été obtenus avec les CECHs cultivés à sous-confluence sur les matrices sans kératocytes (voir Annexe 2: Figure A2.3).

L'analyse des profils d'expression génique sur biopuces à ADN a également permis de visualiser l'expression de tous les gènes MMPs dans les CECHs cultivées à confluence sur des matrices simples de collagènes (CI et CIV) et de comparer ces niveaux avec ceux de CECHs cultivées sur BSA. Les matrices simples de collagènes semblent modifier également l'expression de certains gènes MMPs. En effet, alors que l'expression de MMP-

9 est accrue (3.8 fois) par le CI, celle des gènes MMP-17 et MMP-28 diminue (répression de 3.3- et 3.9 fois respectivement). Lorsque les CECHs sont cultivées sur le CIV, une augmentation d'expression est observée pour le gène MMP-1 (2.3 fois) et des diminutions d'expression sont observées pour les gènes MMP-7 (4.7 fois) et MMP-28 (2 fois) (Figure 5.4).



Figure 5.3. Patron d'expression des gènes des métalloprotéinases matricielles dans des CECHs cultivées sur matrices reconstruites dévitalisées.

A: Analyse de type 'heatmap' du patron d'expression de tous les gènes MMPs humains entre les CECHs cultivées à confluence sur BSA 2% ou sur matrice ECM35d/keratocytes-. B: Analyses en qPCR de l'expression des transcrits MMP9 et MMP10 dans des CECHs cultivées à confluence sur BSA 2% ou sur matrice ECM35d/keratocytes-. Les niveaux des transcrits MMP9 et MMP10 ont été normalisés par les niveaux du transcrit d'actine. *P < 0.05; Student's t-test. C: Les surnageants de culture des CECHs cultivées à confluence en présence de BSA 2% ou de matrice ECM35d/keratocytes- ont été récoltés pour évaluer l'activité enzymatique des gélatinases MMP2 et MMP9 par zymographie sur gel de gélatine. Les formes latentes (pro-MMP2, 72 KDa) et actives (MMP2, 62 KDA et MMP9, 82 KDa) sont identifiées. La masse moléculaire (kDa) des marqueurs protéiques les plus pertinents est indiquée à gauche de la figure.



Figure 5.4. Patron des gènes des métalloprotéinases matricielles exprimés dans des CECHs cultivées sur matrices simples de collagènes.

Analyse de type '*heatmap*' du patron d'expression de tous les gènes MMPs humains entre les CECHs cultivées à confluence sur BSA 2% ou sur matrices simples de collagènes (CI: 75 μ g/cm² ou CIV: 50 μ g/cm²).

5.4. Discussion

Dans le chapitre II, les analyses par spectrométrie de masse et par immunofluorescence indirecte ont révélées que la composition des matrices reconstruites ECM/35d est constituée de 57% de différents types de collagènes (CI, CV, CVI, CXII et CXIV), de 14% de FN, de 7% de TN et de 22% de diverses glycoprotéines et protéoglycanes (Section 2.12: Figure 2.1 et Section 2.11: Table 2.1). La matrice ECM35d sécrétée par des kératocytes humains provenant du stroma est plus complexe, plus mature et également plus près de la composition de la MEC d'une cornée native que la matrice ECM20d (68% de FN et 28% de collagènes types VI et XII), bien qu'elle démontre néanmoins des caractéristiques de

tissus cicatriciels dont l'expression de FN, TN et CXIV (Murakami et al., 1992 ; Stepp et Zhu, 1997 ; Ljubimov et al., 1998). Similaire à l'influence exercée par la FN seule (Larouche et al., 2000 ; Vigneault et al., 2007 ; Gingras et al., 2009), les matrices reconstruites 35 jours exercent une influence régulatrice positive sur l'expression du gène codant pour la sous-unité α 5 de l'intégrine α 5 β 1 dans les CECHs grâce au maintien de l'expression des FTs activateurs Sp1/Sp3, Pax-6 et de AP-1 jumelé à une forte réduction de l'expression et de la capacité de liaison à l'ADN du FT répresseur NFI (voir chapitre II). À l'opposé, les matrices simples de collagènes (CI ou CIV) exercent une influence régulatrice négative sur l'expression du gène α 5 dans les cellules épithéliales de cornée (CECs) à confluence (voir Chapitre III). Outre le gène ITGA5, les matrices complexes 35 jours et les matrices simples de collagènes modifient profondément les patrons d'expression génique des CECHs. Dans cette étude, les influences régulatrices de ECM35d, du CI ou du CIV sur l'expression des gènes autres que ceux codant pour les intégrines et pouvant exercer des fonctions importantes durant la guérison des plaies cornéennes ont été examinées.

Des gènes les plus dérégulés par les matrices reconstruites 35 jours dans les CECHs, plusieurs codent pour des protéines qui sont des composantes de la membrane basale de la cornée ou du stroma cornéen incluant divers types de collagènes (CI, CIII, CV, CVI, CVIII, CXXII), la FN, la TN, la fibuline (FBLN5) et des protéoglycanes ou des protéines associées (Lumican et Textican-1) (Figure 5.1 et Section 2.13: Supplementary Table 2.1). La plupart de ces protéines ont été observées par des analyses de spectrométrie de masse et par immunofluorescence indirecte dans les matrices reconstruites sécrétées par les kératocytes du stroma (Section 2.12: Figure 2.1 et Section 2.11: Table 2.1). Ces données suggèrent que dans un contexte de cicatrisation, les cellules épithéliales de la cornée participent également à l'expression de ces diverses composantes matricielles. Nos données de profilage génique suggèrent également que les matrices complexes (combinaison de FN et de collagènes) et les matrices simples de collagène (CI ou CIV individuel) ont des effets distincts (positif ou négatif) sur l'expression des gènes codant pour divers constituants de la MEC dans les CECs (Figure 5.2).

Les matrices complexes reconstruites ainsi que les matrices simples de CI modifient profondément les patrons d'expression génique des CECHs. En effet, les analyses de profilage génique démontrent que le CI modifie plus profondément le patron d'expression des gènes (3252 gènes dérégulés) que le CIV (349 gènes dérégulés) dans les CECHs cultivées sur ces matrices simples de collagène par rapport aux cellules cultivées sur BSA (Section 3.10: Figure 3.6 et Section 3.11: Supplementary Table 3.2). Les analyses de profilage génique, incluant les graphiques de type nuages de points (Scatter Plots, Section 2.12: Figure 2.4A) ainsi que la carte d'expression génique (*Heatmap* > 2-Fold change gene expression, Section 2.12: Figure 2.4B), indiquent également que 2214 gènes sont dérégulés par plus de 2 fois lorsque les CECHs sont cultivés sur matrice dépourvue de kératocytes (ECM/keratocytes-) tandis que ce nombre grimpe à 2930 gènes lorsque ces cellules sont cultivées sur matrice vivante (ECM/keratocytes+) par référence aux cellules cultivées sur BSA. Parmi ceux-ci, 877 gènes sont communs aux deux conditions ; par conséquent, 2053 gènes voient leur expression profondément modifiée uniquement par la présence des kératocytes du stroma préservés vivants dans les matrices reconstruites et parmi lesquels on retrouve plusieurs composantes de la MEC, des métalloprotéinases matricielles (MMPs) et des cytokines (Figure 5.1 et Section 2.13: Supplementary Table 2.1). Les interactions entre les cellules épithéliales et les kératocytes du stroma constituent un facteur particulièrement important dans la guérison des plaies cornéennes (Mishima et al., 1998 ; Daniels et Khaw, 2000 ; Nakamura et al., 2002 ; Lim et al., 2003). La signalisation provenant des kératocytes du stroma joue un rôle important dans la migration, la prolifération et la croissance de l'épithélium cornéen (Wilson et al., 1999; Nakamura et Nishida, 1999; Imanishi et al., 2000). Nous avons précédemment démontré que l'origine tissulaire (cornée ou peau) des fibroblastes du stroma qui sont utilisés pour produire la MEC sur laquelle les CECHs sont ensemencées dicte les propriétés de stratification et de différenciation de ces cellules épithéliales dans les cornées reconstruites, ainsi que la fonction probable jouée par l'interleukine 6 (IL-6) dans ce mécanisme, que nous avons démontrée être également anormalement exprimée par les CECHs cultivées sur les matrices reconstruites (Carrier et al., 2009). En plus des réponses immunitaires spécifiques (Cubitt et al., 1995), l'IL-6 sécrétée par les fibroblastes de cornée joue plusieurs fonctions dans l'épithélium cornéen, dont la stimulation de la migration (Nishida et al., 1992b; Nakamura et Nishida, 1999), la régulation de l'homéostasie de l'épithélium, la maintenance de l'intégrité de la cornée (Kinoshita et al., 2001) et les propriétés de stratification et de différenciation des cellules épithéliales de cornée (Carrier et al., 2009). Dans cette étude, nos résultats suggèrent que l'expression de IL-6 est déterminée non seulement par les kératocytes du stroma (Cubitt et al., 1995; Carrier et al., 2009), mais est également par les CECHs cultivées sur les matrices reconstruites ECM35d/keratocytes+ avec 25 fois d'activation en comparaison au niveau produit par les CECHs cultivées sur BSA (Figure 5.1B). En outre, plusieurs gènes codant pour des MMPs impliquées dans le remodelage de la MEC durant la cicatrisation (Sivak et Fini, 2002) sont considérablement sur-exprimés en présence des matrices complexes reconstruites composées de collagènes et de FN, notamment MMP-9 et MMP-10. La matrice simple de CI semble également induire l'expression de MMP-9 dans les CECHs.

La matrice extracellulaire subit un remodelage important durant le processus de cicatrisation cornéenne (Murakami et al., 1992 ; Anderson et al., 1996 ; Ljubimov et al., 1998 ; Tanaka et al., 1999 ; Kang et al., 1999 ; Zieske et al., 2001 ; Saika et al., 2002 ; Vigneault et al., 2007). Le remodelage implique deux événements importants : la synthèse et la déposition des composantes de la MEC par les kératocytes et les cellules épithéliales d'un côté, et la dégradation par clivage protéolytique des ces composantes par des protéases de l'autre. Plusieurs protéases sont impliquées dans la dégradation protéolytique de la MEC, dont les plus importantes sont celles appartenant à la famille des métalloprotéinases matricielles (MMPs). Les MMPs sont impliquées dans les processus de réparation tissulaire en conditions normales ou pathologiques, incluant l'élimination de la matrice endommagée, la régénération épithéliale, le remodelage de la cicatrice et l'angiogenèse (Sivak et Fini, 2002). La reconstitution de la transparence de la cornée dans la cicatrisation des plaies dépend d'une fine régulation des activités de biosynthèse des fibroblastes de la plaie et du remodelage matriciel attribué principalement aux activités protéolytiques des MMPs (Sivak et Fini, 2002). Les activités accrues des MMPs, en particulier MMP-9, jouent un rôle primordial dans la cicatrisation des plaies ainsi que l'inflammation (Ollivier et al., 2007) et sont responsables des altérations pathologiques de la surface oculaire menant à un disfonctionnement du film lacrymal (Sambursky et O'Brien, 2011). Des études ont démontré que plusieurs MMPs sont activées dans les



253

cellules épithéliales de cornée lors de la cicatrisation. Par exemple, l'expression de MMP-1, MMP-3, MMP-7 et MMP-12 est augmentée dans les cellules épithéliales de cornée durant la cicatrisation cornéenne induite par Wnt7a chez le rat (Lyu et Joo, 2005 ; Lyu et Joo, 2006). En outre, la réparation des plaies après kératectomie est caractérisée par une augmentation d'expression de MMP-1, MMP-2, MMP-3 et MMP-9 dans les cornées de lapin (Matsubara et al., 1991a ; Girard et al., 1993 ; Mulholland et al., 2005) et de MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9, MMP-13, MMP-14 dans les cornées de rat (Azar et al., 1996; Ye et Azar, 1998 ; Lu et al., 1999 ; Ye et al., 2000). Il a également été observé que les niveaux d'ARNm sont accrus pour MMP-1a, MMP-1b, MMP-9, MMP-10, MMP-12 et MMP-13 dans l'épithélium cornéen en migration dans un modèle de débridement épithélial chez la souris (Gordon et al., 2011). Dans un modèle de débridement épithélial sur des cultures de cornées humaines ex vivo, la ré-épithélialisation de l'épithélium cornéen est aussi caractérisée par l'expression accrue de MMP-1, MMP-3, MMP-9 et MMP-10 par les cellules épithéliales et/ou les fibroblastes du stroma lors du processus de cicatrisation dans des blocs de cornées humaines (Daniels et al, 2003a). Dans notre étude, l'expression de plusieurs de ces MMPs est considérablement augmentée par les matrices reconstruites \pm kératocytes dans les CECHs, dont MMP-1, MMP-7, MMP-9, MMP-10 et MMP-2, MMP-3, MMP-12, MMP-13 (où leur expression augmente spécifiquement dans les CECHs cultivées sur matrice ECM/kératocytes+) (Figures 5.1 et 5.3). Il est à noter que la transcription du gène MMP-10, mais en particulier celle de MMP-9, est considérablement augmentée dans les CECHs cultivées sur les matrices 35 jours. Il est intéressant de noter que ces enzymes (MMP-9 et MMP-10) ont pour substrats primaires la FN ainsi que certains collagènes (Werb, 1997; McCawley et Matrisian, 2001; Somerville et al., 2003; Gioia et al., 2009).

Durant la migration des cellules épithéliales cornéennes, l'expression de MMP-2 et MMP-9 dépend de l'activité de MMP-14 faisant partie de la sous-classe Membrane-type MMPs qui est impliquée dans l'activation de ces MMPs (Will et al., 1996 ; Stanton et al., 1998 ; Chakraborti et al., 2003 ; Toth et al., 2003). Par ailleurs, leur transcription est modulée positivement par les cytokines IL-8 (Chakrabarti et Patel, 2005 ; Jovanovic et al., 2010), IL1- β et TGF- β (Li et al., 2001 ; Kim et al., 2004 ; Joo et Seomun, 2008 ; Lockwood et al.,

2008 ; Gordon et al., 2009). TGF-β régule la production de MMP-9 par les voies NF-κB, Smad3 et JNK, tandis que IL1-β le fait par l'intermédiaire des voies NF-κB et p38 en modulant l'expression et les propriétés de liaison des FTs impliqués dans la régulation du gène MMP-9 (AP-1, NF-κB et Sp1) dans les CECs (Fini et al., 1994 ; Gordon et al., 2009). IL-8 régule la production de MMP-9 par la voie PKC – ERK1/2 ou celle des kinases de la famille Src dans les neutrophiles humains (Chakrabarti et Patel, 2005). Différents travaux ont démontré que IL1-β, TGF-β et TNF-α stimulent l'expression et la production de MMP-9 (Li et al., 2001; Kim et al., 2004; Gordon et al., 2009), mais également de d'autres MMPs, dont MMP-1, MMP-3, MMP-10, MMP-11 et MMP-13 (Li et al., 2003a; Kim et al., 2004) dans les CECs. Ces données sont en accord avec les résultats de notre étude dans laquelle l'expression des cytokines IL1- β et IL- β est sur-exprimée (Figure 5.1A), ainsi que celle de plusieurs MMPs, en particulier MMP9, dans les CECHs cultivées à confluence en présence de matrices ECM35d. L'induction de l'expression et de la production des formes actives de MMP-2 et MMP-9 par la FN est un fait bien démontré (Esparza et al., 1999 ; Yakubenko et al., 2000 ; Das et al., 2008 ; Sen et al., 2010 ; Jin et al., 2011), un processus qui dépend des cascades de signalisation intracellulaire activées par la liaison de la FN à son récepteur, l'intégrine α5β1 (Huhtala et al., 1995 ; Esparza et al., 1999 ; Jin et al., 2011). Il est probable que le niveau anormalement élevé de FN dans les matrices 35 jours (14%) est responsable de l'augmentation d'expression de MMP-9 dans les CECHs par un mécanisme moléculaire impliquant l'action de IL-8 et IL1- β (individuellement ou en combinaison). L'expression de Pax6 est augmentée dans les cellules épithéliales de cornée situées au front de migration qui permet de recouvrir la lésion suite à une blessure (Sivak et al., 2000) et contribue ainsi au processus de cicatrisation cornéenne en modulant l'expression des gènes Pax6-dépendants. Plusieurs gènes sont régulés par Pax-6 dans les cellules épithéliales de cornée, incluant ceux codant pour les sous-unités d'intégrines $\alpha 4$ (Zaniolo et al., 2004), α5 et β1 (Duncan et al., 2000). Par ailleurs, Pax-6 module également l'expression du gène codant la MMP-9 (Gélatinase B) (Sivak et al., 2000 ; Sivak et al., 2004) et la kératine K12 (Shiraishi et al., 1998 ; Liu et al., 1999). Pax-6, en interaction avec AP-2α, contrôle l'expression de MMP-9 spécifiquement dans les cellules épithéliales en réépithélialisation (Sivak et al., 2004). La phosphorylation du domaine de transactivation de Pax-6 par les kinases ERK et p38 a été démontrée, cette modification post-traductionnelle entraînant une augmentation du potentiel activateur de ce FT (Mikkola et al., 1999). Il est à noter que dans notre étude présentée au Chapitre II, les niveaux d'ARNm (Section 2.12: Figure 2.4G) et de protéine (Section 2.12: Figure 2.3B) du FT Pax-6 sont considérablement augmentés dans les CECHs cultivées à confluence sur les matrices reconstruites ECM35d/keratocytes+ et ECM35d/keratocytes- par comparaison aux CECHs cultivées sur BSA. Par ailleurs, son activité de liaison à l'ADN n'est pas affectée par la matrice ECM35d/keratocytes-, mais diminue dans les CECHs cultivées en présence de matrice ECM35d/keratocytes+ (Section 2.12: Figure 2.3A). Pour toutes ces raisons, Pax-6 représente un candidat intéressant pour la régulation spécifique du gène MMP-9 dans les CECHs cultivées sur ECM35d (28 fois et 6 fois d'activation du gène MMP-9 par ECM/keratocytes- et par ECM/keratocytes+, respectivement). Cependant, des expériences additionnelles devront être réalisées avant de définir avec précision la nature des mécanismes moléculaires qui modulent l'augmentation de l'expression de MMP-9 observée dans cette étude en présence des matrices complexes extracellulaires reconstruites que nous avons démontré être composées de FN et de collagènes.

En conclusion, nous avons démontré que les matrices extracellulaires complexes reconstruites ainsi que les matrices simples de collagènes sur lesquelles les cellules épithéliales de cornée sont cultivées exercent des influences régulatrices distinctes (positive ou négative) sur l'expression des gènes qui exercent un rôle majeur dans l'adhésion et la migration des cellules de l'épithélium cornéen (en particulier le gène codant pour la sousunité α 5 de l'intégrine α 5 β 1) ainsi que ceux impliqués dans le remodelage de la MEC nouvellement synthétisée suite à la cicatrisation (notamment MMP-9). Ces matrices complexes reconstruites représentent donc un modèle intéressant pour étudier les gènes des intégrines et des MMPs ainsi que leurs rôles dans la guérison des plaies cornéennes. Éventuellement, les résultats présentés dans cette étude pourront aider au développement de meilleurs substituts de cornées humaines en tant qu'outil thérapeutique dans les greffes de ce tissu.

Chapitre VI:

Conclusions et Perspectives de recherche

6. Conclusions

Mes travaux consistaient à évaluer les influences des composantes de la matrice extracellulaire sur l'expression du gène de la sous-unité $\alpha 5$ de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans des cellules épithéliales de cornée (CECs) et ce dans un contexte de cicatrisation de la cornée. Ces différentes études ont démontrées que : 1) les matrices extracellulaires complexes reconstruites (ECM35d/keratocytes±) par la méthode d'auto-assemblage ont une influence positive sur l'expression du gène α 5 dans les CECHs qui résulte de modifications dans l'expression et les activités de liaison à l'ADN des FTs NFI, Sp1, AP-1 et Pax-6 (Chapitre II et Annexe 2); 2) les matrices simples de collagènes (CI ou CIV) exercent une influence négative sur l'expression du gène α5 dans les CECs à confluence (Chapitre III); 3) la région distale conservée de 300pb en amont des gènes des sous-unités d'intégrines α 3, α 5, α 9 et α v est composée de plusieurs éléments potentiels de régulation pouvant exercer des influences régulatrices positives (AP-1, Sp1, Ets et c-Rel) ou négatives (NFI, C/EBP et cmyc) sur la transcription du gène α 5 dans les cellules épithéliales (Chapitre IV et Annexe 3); et 4) les composantes de la MEC modifient profondément l'expression de gènes ne codant pas pour des intégrines dans les CECHs, incluant des composantes de la matrice extracellulaire, des métalloprotéinases matricielles (MMPs) et des cytokines (Chapitre V et Annexe 2).

6.1. Modulation de l'expression du gène de la sous-unité d'intégrine α5 par des matrices extracellulaires humaines reconstruites (Chapitre II)

Cette étude a démontré que la composition de la matrice extracellulaire reconstruite de 35 jours (ECM/35d) sécrétée par des kératocytes humains provenant du stroma cornéen est enrichie en différents types de collagènes (CI, CV, CVI, CXII et CXIV), de FN, de TN et de protéoglycanes. La matrice ECM/35d est plus complexe, plus mature et également plus près de la composition de la MEC d'une cornée native que la matrice ECM/20d (enrichie en majorité de FN) (Figure 2.1 et Table 2.1). Cependant, cette matrice ECM/35d possède encore des caractéristiques identifiées dans des tissus cicatriciels cornéens dont l'expression de FN, de TN et de CXIV (Murakami et al., 1992 ; Stepp et Zhu, 1997 ; Ljubimov et al., 1998). Des travaux réalisés précédemment ont permis de démontrer que la matrice simple de FN (ligand de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$) exerce une influence régulatrice positive sur l'activité du promoteur du gène α 5 dans des CECLs cultivées *in vitro* (Larouche et al., 2000; Vigneault et al., 2007; Gingras et al., 2009). Similaire à l'influence exercée par la FN seule, les matrices complexes reconstruites (composées de collagènes (57%) et de FN (14%)) exercent une influence régulatrice positive sur l'expression du gène α 5 dans les CECHs résultant de modifications dans l'expression et les activités de liaison à l'ADN des FTs NFI, Sp1, AP-1 et Pax-6 (Figures 2.2B, 2.3 et 2.4). Des travaux réalisés précédemment ont montré que l'activité du promoteur basal de la sous-unité d'intégrine α5 est modulée par les activateurs transcriptionnels Sp1/Sp3, AP-1 et Pax-6, et par le répresseur transcriptionnel NFI (Gingras et al., 2009; Duncan et al., 2000). Dans les CECHs en présence de matrice ECM/35d, il se produit une maintenance de l'expression des FTs activateurs Sp1/Sp3, Pax-6 et de AP-1 combinée à une forte réduction de l'expression et de la capacité de liaison à l'ADN du répresseur NFI, ce qui est en accord avec l'augmentation d'expression de α 5 dans les CECs cultivées sur cette matrice complexe (Figures 2.3 et 2.4).

6.2. Impacts fonctionnels des matrices simples de collagènes sur l'expression du gène de la sous-unité d'intégrine α 5 (Chapitre III)

L'expression des collagènes et celle des LMs (présents dans la membrane basale native) varie de façon opposée à celle de la FN (matrice cicatricielle) lors de la cicatrisation de l'épithélium cornéen. En effet, suite à une lésion de l'épithélium cornéen, les collagènes (principalement type IV) et les LMs de la membrane basale sont dégradés pour être remplacés par une matrice temporaire principalement constituée de FN (Murakami et al., 1992 ; Kang et al., 1999). Lorsque la lésion est recouverte, cette matrice temporaire est progressivement remplacée par une membrane basale nouvellement synthétisée (Murakami et al., 1992; Anderson et al., 1996; Ljubimov et al., 1998; Tanaka et al., 1999). L'intégrine $\alpha 5\beta 1$ participe au processus de guérison des plaies cornéennes en interagissant avec son ligand la FN, favorisant ainsi l'adhésion et la migration des cellules épithéliales sur la matrice provisoire de FN (Murakami et al., 1992; Suzuki et al., 2003; Kimura et al., 2010). Nos travaux ont permis de démontrer que les matrices simples de CIV ont un effet positif sur l'expression du gène a5 dans les CECLs à faible densité cellulaire. Cette augmentation semble être la conséquence d'une augmentation de l'expression et de l'activité de liaison à l'ADN des FTs Sp1/Sp3, AP-1 et NFI modulant l'activité du promoteur de ce gène via un segment situé entre les positions -132 à -42. Toutefois, les matrices simples de CIV ont un effet négatif sur a5 dans les CECLs à haute densité cellulaire associé à une diminution de l'expression et de l'activité de liaison à l'ADN de ces trois FTs (Figures 3.1, 3.2 et 3.3; Vigneault et al., 2007). En outre, les matrices simples de collagènes (CI et CIV) répriment toutes deux l'expression du gène a5 dans les CECHs indépendamment de la densité en altérant modérément et négativement l'activité de liaison à l'ADN des FTs Sp1/Sp3 et NFI pour CI, et AP-1 et Pax-6 pour CIV, ainsi que l'expression de certains membres de la famille des AP-1 (c-Fos, FosB pour CI et c-Fos, Fra-2 pour CIV) (Figures 3.4 et 3.5). Cependant, les résultats des analyses réalisées lors de la transfection des CECHs suggèrent qu'il existe probablement des éléments de régulation négatifs, autres que ceux identifiés dans le promoteur basal, modulant l'expression du gène α 5 et qui seraient situés entre les positions -954 à -132. Outre l'intégrine α 5, les analyses réalisées en profilage génique sur biopuces à ADN démontrent que le CI modifie plus

profondément le patron d'expression des gènes (3252 gènes dérégulés par plus de 2 fois) que le CIV (349 gènes dérégulés) dans les CECHs cultivées sur ces matrices simples de collagène par référence à des CECHs cultivées sur BSA (Figure 3.6 et Section 3.11: Supplementary Table 3.2). En somme, les résultats obtenus dans cette étude suggèrent que les collagènes agissent comme un frein à la migration et à la prolifération (via la suppression de l'expression du gène α 5) des CECs lorsque la lésion est recouverte (à haute densité cellulaire) et servent possiblement de signal de différenciation verticale des cellules épithéliales durant le processus de cicatrisation des plaies cornéennes.

6.3. Modulation de la transcription du gène α 5 par la région distante conservée en amont des gènes α 3, α 5, α 9 et α v (Chapitre IV)

La régulation génique des intégrines est orchestrée par la collaboration de différents FTs liant l'ADN à des sites spécifiques de liaison au niveau du promoteur et de la région 5'-en amont des gènes qu'ils contrôlent. La modulation de la transcription du gène α5 s'effectue dans la région du promoteur basal par les facteurs Sp1 (-50/-71) et AP-1 (-45/-51), tous deux des activateurs de ce gène, et NFI (-67/-71), un puissant répresseur de celui-ci (Gingras et al., 2009). Le promoteur basal peut agir de concert avec d'autres séquences régulatrices distales et éloignées de quelques centaines de pb jusqu'à plusieurs Kb (séquences 'enhancer' et 'silencer', par exemple) pouvant agir à distance sur la transcription génique. Une analyse détaillée de la séquence des régions éloignées situées 5'-en amont du promoteur basal de tous les gènes codant pour des sous-unités α d'intégrines humaines a permis d'identifier un segment distant d'une longueur d'environ 300 nucléotides hautement conservé (\geq 83%). Cette région contient un sous-segment de 50 nucléotides presqu'entièrement conservé (jusqu'à 93%) entre les gènes des sous-unités d'intégrines $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 9$ et αv . Ce segment conservé de 315 pb est localisé entre les positions -866 à -1181 par rapport au site d'initiation de la transcription dans le promoteur α 5 et le sous-segment de 53 pb entre les positions -1042 et -1095 (Vigneault et al., 2007 ; Figure 4.1). Il est intéressant de noter que les sous-unités α d'intégrines qui contiennent ce segment conservé (α 3, α 5, α 9 et α v) sont toutes exprimées dans les CECs (Lauweryns et

al., 1991; Stepp, 2006; Vigneault et al., 2007) et leur expression semble également augmentée durant la cicatrisation cornéenne (Garana et al., 1992; Stepp and Zhu, 1997; Vigneault et al., 2007 ; Liu et al., 2006 ; Blanco-Mezquita et al., 2011) suggérant que leur transcription est co-régulée durant ce processus. Les travaux rapportés dans cette thèse ont permis de démontrer que la région distale conservée d'environ 300 pb située en amont des promoteurs des gènes ITGA3, ITGA5, ITGA9 et ITGAV est composée de multiples éléments potentiels communs de régulation de la transcription (facteurs positifs et négatifs) de ces gènes. La région activatrice de 50 pb possède des sites fonctionnels permettant l'association d'un complexe multi-protéique comprenant les FTs AP-1, Sp1 et Ets modulant positivement la transcription du gène α 5 dans les cellules épithéliales (Figues 4.3, 4.4 et 4.5; Annexe 3). La région de 300 pb semble pouvoir agir autant comme un activateur (dans les cellules de mélanome uvéal T115 et les kératinocytes de peau) que comme un répresseur (dans les CECHs). Des sites potentiels pour des FTs répresseurs comme NFI, C/EBP (isoformes α ou β) et c-myc contribuent probablement à la modulation négative de la transcription du gène α5 par cet élément conservé dans les CECHs (Figures 4.2 et 4.6 ; Annexe 3). Toutefois, l'importance et la fonctionnalité respectives de ces sites dans la régulation de la transcription du gène α 5 restent à démontrer.

6.4. Modulation de l'expression des autres gènes que les intégrines par les composantes de la matrice extracellulaire (Chapitre V)

L'adhésion et la migration des CECHs sur la MEC affectent également l'expression de gènes autres que ceux codant pour des intégrines. Cette étude a démontré que les matrices complexes reconstruites avec ou sans kératocytes (ECM35d/kératocytes±), enrichies en différents types de collagènes, de FN, de TN et de protéoglycanes, modifient profondément l'expression (diffère d'au moins 4 fois) de gènes autres que ceux codant pour des intégrines. Ceux-ci comprennent, entre-autre, des gènes codant pour des composantes de la matrice extracellulaire (FN1, TNC, COL22A1, SPOCK1), des métalloprotéinases matricielles (MMP1, MMP9 et MMP10) et des cytokines (IL6, IL8 et IL1 β) qui voient leur expression s'accroitre considérablement dans les CECHs cultivées sur ces matrices

complexes (Figures 5.1 et 5.3). Les protéines de la MEC, les cytokines et les MMPs sont tous des facteurs modulateurs importants requis durant la guérison des plaies cornéennes (Nishida et Tanaka, 1996 ; Lu et al., 2001 ; Zieske, 2001 ; Sivak et Fini, 2002 ; Lim et al., 2003 ; Vigneault et al., 2007). Les interactions entre les cellules épithéliales et les kératocytes du stroma représentent également un facteur important durant ce processus (Mishima et al., 1998; Daniels et Khaw, 2000; Nakamura et al., 2002; Lim et al., 2003). Des travaux réalisés précédemment par notre laboratoire ont montré que l'origine tissulaire (cornée ou peau) des fibroblastes du stroma qui sont utilisés pour produire la MEC sur laquelle les CECHs sont ensemencées dicte également les propriétés de stratification et de différenciation de ces cellules épithéliales (Carrier et al., 2009). La présence des kératocytes du stroma dans les matrices complexes reconstruites (ECM/keratocytes+) modifie profondément l'expression de plusieurs gènes, dont les plus dérégulés (> 16 fois d'activation) dans les CECHs comprennent des gènes codant pour des composantes de la MEC (FN1, COL1A1, COL1A2, COL3A1, COL5A1, COL5A2, COL6A1, COL8A2, TNC, FBLN5, EDIL3, MFAP4), des gènes codant pour des protéoglycanes (comme LUM et SPOCK1), des gènes codant pour des cytokines (IL6 et IL11) et des gènes codant pour des MMPs (MMP2, MMP3, MMP12 et MMP13) (Figure 5.1B ; Section 2.13: Supplementary Table 2.1). Nos données en profilage génique suggèrent également que le CI provoque une faible augmentation des gènes TNC et FN1, tandis que le CIV augmente faiblement seulement TNC dans les CECHs. En outre, le CI réprime l'expression de plusieurs gènes codant différents types de collagènes (COL1A2, COL4A2, COL4A5, COL4A6, COL5A2, COL6A1, COL7A1, COL8A1, COL9A3, COL13A1, COL16A1, COL17A1, COL18A1, COL23A1), tandis que le gène COL5A2 est réprimé également par le CIV dans les CECHs (Figure 5.2). Les MMPs sont des protéases exerçant des fonctions importantes dans le remodelage de la MEC durant la cicatrisation de l'épithélium et du stroma cornéen (Sivak et Fini, 2002 ; Lim et al., 2003). La MMP-9 (gélatinase B) permet la dégradation des collagènes dénaturés (gélatine) et des composantes de la membrane basale incluant la FN (Werb, 1997; McCawley et Matrisian, 2001; Somerville et al., 2003; Visse et Nagase, 2003). La MMP-9 est impliquée dans la régénération épithéliale, ainsi que dans le remodelage et le réassemblage de la membrane basale cornéenne, en éliminant la matrice provisoire de FN (Mohan et al., 2002 ; Sivak et Fini, 2002 ; Daniels et al., 2003a ; Gordon
et al., 2011). La liaison de la FN à son récepteur α 5β1 déclenche des cascades de signalisation intracellulaire permettant l'induction de la production de formes actives de MMP-2 et de MMP-9 (Huhtali et al., 1995 ; Esparza et al., 1999 ; Yakubenko et al., 2000 ; Das et al., 2008 ; Sen et al., 2010). Dans cette étude, la transcription du gène MMP-9 est considérablement augmentée dans les CECHs cultivées sur les matrices complexes reconstruites de 35 jours, un effet probablement dû au niveau anormalement élevé de FN (14%) encore présent dans ces matrices complexes et par un mécanisme moléculaire impliquant l'action des cytokines IL-8 et IL1-β (individuellement ou en combinaison). Tout comme avec la FN, la matrice simple de CI semble également induire l'expression de MMP-9 dans les CECHs (Figures 5.3 et 5.4).

6.5. Élaboration d'un modèle d'action de la matrice extracellulaire sur l'expression du gène α 5

Les résultats des travaux antérieurs combinés à ceux présentés dans cette thèse de doctorat nous permettent d'élaborer un modèle d'action de la matrice extracellulaire sur l'expression du gène α 5 dans l'épithélium cornéen en cicatrisation (Figure 6.1). Dans ce modèle, les diverses composantes de la MEC (individuelles (matrices simples) ou en combinaison (matrices complexes reconstruites)), par l'intermédiaire de leurs récepteurs membranaires spécifiques appartenant à la famille des intégrines, exercent des influences régulatrices (positive ou négative) sur l'expression du gène α 5 en altérant l'expression et les activités de liaison à l'ADN des FTs régulateurs (Sp1, NFI, Pax-6 et AP-1) qui participent à sa transcription. Ces FTs régulateurs contrôlent également l'expression de plusieurs gènes codant pour des métalloprotéinases, notamment MMP-9. L'intégrine α 5 β 1, ligand de la FN, joue un rôle majeur dans l'adhésion et la migration des CECs lors de la cicatrisation et des changements dans son niveau d'expression modifient l'abondance de l'intégrine α 5 β 1 à la surface des cellules épithéliales et par conséquent ses propriétés adhésives et migratrices. Les MMPs possèdent comme substrats naturels différentes protéines matricielles extracellulaires. Par exemple, la MMP-1 permet la dégradation des collagènes (types I, II, III, VII, VIII et X). La MMP-3 permet la dégradation des collagènes (types II, IV, IX, X), mais également celle de la FN, des LM et des protéoglycanes. Les enzymes MMP-9 et

Rapport-gratuit.com { Le numero 1 mondial du mémoires

MMP-10 permettent la dégradation des collagènes dénaturés (gélatine) et des composantes de la membrane basale native (CIV, LM, entactine) incluant la FN. Ces MMPs, ayant une production accrue, sont donc impliquées dans le remodelage de la MEC favorisant l'adhésion et la migration cellulaire ainsi que dans l'élimination de la MEC cicatricielle une fois la lésion recouverte, ce qui permet à la membrane basale normale de l'épithélium cornéen de se reformer lors de la cicatrisation des plaies cornéennes.



Figure 6.1. Modèle d'action de la matrice extracellulaire sur l'expression du gène a5.

Par l'intermédiaire des récepteurs membranaires de la famille des intégrines qui leur sont spécifiques, les diverses composantes de la matrice extracellulaire (MEC) peuvent influer sur l'expression et les activités de liaison à l'ADN des facteurs de transcription (Sp1, NFI, Pax-6 et AP-1) qui modulent l'expression du gène α 5 de l'intégrine α 5 β 1, ligand de la FN. Ces facteurs de transcription contrôlent également l'expression de plusieurs gènes qui codent pour diverses métalloprotéinases matricielles (MMPs), notamment MMP-9. L'expression ainsi modifiée de α 5 modifie l'abondance de l'intégrine α 5 β 1 à la surface de la cellule épithéliale et par conséquent ses propriétés adhésives et migratrices. Par ailleurs, la production accrue de certaines MMPs permet le remodelage de la MEC requis pour favoriser l'adhésion et la migration cellulaire ainsi que l'élimination de la MEC cicatricielle une fois la lésion refermée pour permettre la reformation de la membrane basale normale dans l'épithélium cornéen en cicatrisation.

Les différents éléments de la MEC exercent des actions distinctes (positive ou négative) sur l'expression du gène α 5 dans les cellules épithéliales en culture primaire *in vitro*. En effet, des travaux réalisés précédemment ont montré que la FN et la LM exercent des influences régulatrices respectivement positives et négatives sur l'activité transcriptionnelle des promoteurs des gènes codant pour les sous-unités d'intégrines $\alpha 4$, $\alpha 5$ et $\alpha 6$ dans des CECLs en culture primaire in vitro (Grushkin-Lerner et al., 1997 ; Larouche et al., 2000 ; Vigneault et al., 2007; Gaudreault et al., 2007; Gaudreault et al., 2008; Gingras et al., 2009). La FN est un régulateur positif de l'activité du promoteur α5 dans les CECLs à faible densité cellulaire (SC70% à C100%), une condition favorisant l'adhésion et la migration des cellules épithéliales. Toutefois, à haute densité cellulaire, une condition où les cellules ne prolifèrent plus (PC-3 jours à PC-5 jours), la FN devient un régulateur négatif de l'expression de ce gène (Larouche et al., 2000; Vigneault et al., 2007; Gingras et al., 2009). Tout comme l'influence exercée par une matrice simple de FN, les matrices complexes reconstruites (composées de collagènes (57%) et de FN (14%)) exercent une influence régulatrice positive sur l'expression du gène a5 dans les CECHs à sous-confluence (SC70%) et à confluence (C100%) (Lake et al., 2013 (Chap. II); Annexe 2). La matrice complexe reconstruite favoriserait ainsi l'adhésion, via l'intégrine α 5 β 1, et la migration directionnelle des CECs sur la FN contenue dans cette matrice (Nishida et al., 1983; Nishida et al., 1990; Murakami et al., 1992; Suzuki et al., 2003; Kimura et al., 2010). Cependant, les matrices simples de collagènes (CI et CIV) exercent un effet contraire à celui de la FN et s'avèrent des régulateurs négatifs (comme la LM) de l'activité du promoteur α 5 dans les CECLs et les CECHs à haute densité cellulaire (C100% et PC-5 jours) (voir Chap. III; Vigneault et al., 2007). Il semblerait donc que de petites quantités de FN (14%) soient suffisantes pour court-circuiter les effets négatifs des collagènes (57%) présents dans la matrice complexe reconstruite. La suppression de l'expression du gène α 5 a été rapportée pour réduire fortement l'adhésion et la migration des cellules normales et cancéreuses (White et al., 2007; Linhares-Lacerda et al., 2010; Mierke et al., 2011). Ainsi, en contribuant à supprimer l'expression du gène α 5, les LMs et les collagènes (CI et CIV) agiraient probablement comme un frein à la migration et à la prolifération des CECs lorsque la lésion est recouverte (à confluence). Par ailleurs, ces composantes de la MEC pourraient également agir en tant que signaux cellulaires afin de stimuler la différenciation

des cellules épithéliales basales en cellules suprabasales (ailées et superficielles) afin de compléter la reconstruction d'un épithélium stratifié. Ces résultats sont en accord avec l'étude de Sweeney et collaborateurs concernant l'implantation de membranes polycarbonates recouvertes avec diverses composantes de la MEC sur des cornées lésées de chats. En effet, dans cette étude, la FN s'est avérée très efficace afin de stimuler la fermeture de la lésion, mais ne supporte pas une surcroissance de l'épithélium, tandis que la LM, le CI et le CIV permettent la croissance d'un épithélium stratifié et différencié in vivo (Sweeney et al., 2003). L'étude de Li et collaborateurs démontre que l'attachement d'un motif d'adhésion de la LM à des matrices biosynthétiques (hydrogels) favorise la stratification épithéliale et la croissance des nerfs dans un modèle cornéen (Li et al., 2003b). Par ailleurs, Yuen et collaborateurs ont démontré que la suppression de la LM-5 (LM-332) par de petits ARN interférents (siRNA) augmente les propriétés migratoires, tumorigéniques et invasives des cellules cancéreuses de type carcinome (Yuen et al., 2005). La LM-5 exogène clivée (chaînes α 3 160 kDa, β 3 140 kDa et γ 2 105 kDa) favorise l'adhésion cellulaire via l'intégrine $\alpha 3\beta 1$, l'étalement cellulaire et l'assemblage des hémidesmosomes matures en association avec l'intégrine $\alpha 6\beta 4$; elle inhibe néanmoins la migration des cellules épithéliales (Qin et Kurpakus, 1998 ; Ebihara et al., 2000 ; Hintermann et Quaranta, 2004). En outre, certaines études démontrent que les LMs (LM-1 ou LM-5) suppriment la croissance cellulaire des kératinocytes (Natarajan et al., 2005 ; Natarajan et al., 2006) et des cellules cancéreuses de type carcinome (Clarke et al., 1995 ; Arita et al., 1997), tandis que les gels de CI répriment la prolifération des fibroblastes (Xia et al., 2008) et les propriétés prolifératives des cellules cancéreuses du sein humaines in vitro (Wu et al., 2011). Ces différents travaux supportent l'hypothèse que les LMs et les collagènes de la membrane basale ont pour fonction : i) d'indiquer à la cellule épithéliale qu'elle doit stopper sa migration et/ou prolifération et ii) de lui signaler qu'elle doit amorcer le processus de différenciation, permettant ainsi la stratification verticale de l'épithélium cornéen.

Le remodelage important de la MEC est une caractéristique de la guérison d'une plaie cornéenne. Suivant une lésion de l'épithélium cornéen, il se produit une sécrétion massive de FN, tandis que l'expression des LMs (LM-1, LM-5 et LM-10) et des différents types de

collagènes (principalement type IV), qui sont présents dans la membrane basale, diminue. Une fois la lésion recouverte, la sécrétion de FN diminue progressivement pour être remplacée par des sécrétions accrues de LMs et des collagènes (Murakami et al., 1992 ; Anderson et al., 1996 ; Kang et al., 1999 ; Tanaka et al., 1999). L'expression des LMs et des collagènes varie donc de façon opposée à celle de la FN lors de la cicatrisation de l'épithélium cornéen. Ces données sont en accord avec nos résultats qui démontrent que les composantes de la MEC qui sont exprimées durant les phases migratoires et prolifératives (FN) de la cicatrisation cornéenne et celles qui sont exprimées une fois la lésion recouverte pour favoriser la différenciation et la stratification de l'épithélium cornéen (LM, CI, CIV) possèdent des influences régulatrices différentes (positive et négative, respectivement) sur l'expression du gène α 5 dans les CECs.

Les principaux récepteurs pour les collagènes à la surface des cellules épithéliales cornéennes sont les intégrines $\alpha 2\beta 1$ et $\alpha 3\beta 1$, ceux pour les laminines sont $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$ et $\alpha 6\beta 4$ tandis que ceux pour la FN sont $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 9\beta 1$, $\alpha \nu \beta 1$, $\alpha \nu \beta 5$ et $\alpha \nu \beta 6$ (Tervo et al., 1991a ; Lauweryns et al., 1991 ; Paallysaho et al., 1992 ; Stepp et al., 1993 ; Maldonado and Furcht, 1995b ; Stepp et al., 1995; Stepp, 2006 ; Vigneault et al., 2007 ; Carter, 2009). Cependant, le principal ligand de l'intégrine α 5 β 1 demeure la FN (Pytela et al., 1985). Les promoteurs des gènes codant pour les sous-unités d'intégrines $\alpha 2$, $\alpha 5$ et $\alpha 6$ possèdent un ou plusieurs sites de liaison pour des FTs communs, dont des sites pour Sp1/Sp3 et pour NFI. Les promoteurs α^2 et α^5 possèdent également un ou plusieurs sites de liaison pour AP-1. Le promoteur a3 possède aussi un site de liaison pour Sp1/Sp3 et des sites pour Ets (potentiellement présents également dans promoteur α 5) (Zutter et al., 1994 ; Corbi et al., 2000 ; Kato et al., 2002 ; Katabami et al., 2006 ; Vigneault et al., 2007 ; Gaudreault et al., 2007; Gaudreault et al., 2008; Gingras et al., 2009). Une composante de la MEC peut donc influencer l'expression de son récepteur, mais également celle de d'autres sous-unités d'intégrines en modifiant les FTs communs qui participent à la transcription de ces gènes. Nos travaux antérieurs ainsi que ceux présentés dans cette thèse, rapportent que la FN, le CIV, le CI et la LM influencent individuellement l'expression du gène α 5 par des modifications dans l'expression et/ou l'activité de liaison à l'ADN des facteurs Sp1, AP-1, NFI et Pax-6 modulant l'expression basale de ce gène (Larouche et al., 2000 ; Vigneault et

al., 2007; Gingras et al., 2009; Lake et al., 2013; voir Chap. III). Plusieurs études ont démontré que la FN, par sa liaison à l'intégrine $\alpha 5\beta 1$, active les voies de signalisation intracellulaire PI3K, MAPK (dont la voie ERK1/2), JNK et p38 dans des cellules épithéliales, des cellules endothéliales et dans des cellules cancéreuses (Larouche et al., 2000 ; Thant et al., 2000 ; Forsyth et al., 2002 ; Wilson et al., 2003 ; Zaniolo et al., 2006 ; Sen et al., 2010 ; Jin et al., 2011). Par exemple, la FN, par sa liaison avec l'intégrine $\alpha 5\beta 1$, induit l'activation de la voie des MAPK dans les CECLs qui, en retour, entraine l'activation de la transcription du gène $\alpha 5$. Cette activation de $\alpha 5$ est elle-même dépendante d'altérations dans l'état de phosphorylation de Sp1 par des protéines de la famille MAPK, telles que ERK-1 et ERK-2, qui affectent positivement ses propriétés de liaison à l'ADN (Larouche et al., 2000). L'induction de l'expression du gène PARP-1 par la FN entraîne également l'activation de la voie MAPK ou de la voie PI3K qui mène à l'activation de ERK1/ERK2, ce qui altère alors l'état de phosphorylation de Sp1 et favorise ainsi son activité de liaison et son potentiel activateur de la transcription de ce gène dans les CECLs (Zaniolo et al., 2006). La FN induit également l'expression du gène MMP-9 en augmentant les activités de liaison à l'ADN des FTs NF-kB, AP-1 et Sp1 sur le promoteur du gène MMP-9 probablement par l'intermédiaire des voies de signalisation ERK et PI3K dans des cellules humaines HEp-2 de type carcinome du larynx (Sen et al., 2010). Par ailleurs, la FN, via les intégrines α 5 β 1 et α v β 3, stimule l'expression de MMP-9 par l'augmentation des activités de liaison des FTs de la famille AP-1 (incluant c-Jun, JunB, and JunD) via les voies de signalisation PI3K/Akt, ERK et JNK dans des cellules endothéliales humaines provenant d'une veine du cordon ombilical (HUVECs) (Jin et al., 2011). Des études ont démontré que le CI, le CIV et les LMs induisent les voies des MAPKs (dont celles de ERK), p38 et JNK dans les cellules épithéliales humaines de l'intestin CaCo-2 (Sanders et Basson, 2000; Zhang et al., 2003a; Zhang et al., 2003b; Sanders et Basson, 2004). L'étude de Takahra et collaborateurs rapporte que les gels 3D de CI augmentent les activités de liaison à l'ADN des FTs NF-kB, AP-1 et Sp1 sur le promoteur du gène MMP-9 provoquant ainsi l'activation de sa transcription dans les cellules stellaires hépatiques (HSCs) de rat à sous-confluence (Takahra et al. 2004). Par ailleurs, l'induction de l'expression et de la production de la forme active de la MMP-9 nécessite l'activation de ERK1/2 via sa liaison avec l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ (Takahara et al. 2003). La LM induit

également l'expression et l'activation de MMP-9 en augmentant les activités de liaison à l'ADN de NF-kB et AP-1 au promoteur du gène MMP-9 dans des cellules SiHa issues d'un carcinome cervical humain possiblement par les voies ERK et PI3K via son interaction avec α2β1 (Maity et al., 2011). Par ailleurs, les FTs AP-1 (c-Jun/c-Fos), Sp1 et NFI sont des cibles pour des modifications post-traductionnelles (notamment la phosphorylation) affectant leur activité de liaison à ADN et/ou leur potentiel transcriptionnel par l'activation des voies de signalisation intracellulaire des MAPKs suite à l'interaction entre la MEC et leurs récepteurs d'intégrines. En effet, plusieurs protéines kinases sont responsables de la phosphorylation de Sp1, dont, par exemple, MAPK ERK1/2, JNK et p38 tandis que les protéines phosphatases 1 et 2A (PP1 et PP2A) permettent la déphosphorylation de Sp1 et participent donc à la régulation de l'état de phosphorylation de cette protéine. Certains de ces évènements de phosphorylation peuvent influencer de manière positive ou négative l'activité de liaison à l'ADN de Sp1 et son pouvoir d'activation de la transcription de ses gènes cibles. De plus, certaines modifications par phosphorylation pourraient protéger Sp1 de la dégradation par le protéasome, tandis que d'autres, au contraire, semblent favoriser celle-ci (Chu et Ferro, 2005; Tan et Khachigian, 2009; Chu, 2012). Les membres de la famille AP-1 peuvent subir la phosphorylation par différents membres de la famille des MAPKs (Karin, 1995; Karin et al., 1997; Hess et al., 2004). Par exemple, l'activation de JNK permet la phosphorylation de la protéine c-Jun augmentant ainsi son potentiel à activer la transcription de ses gènes cibles sous forme d'homodimères ou d'hétérodimères avec c-Fos (Hibi et al., 1993 ; Dérijard et al., 1994 ; Smeal et al., 1994 ; Karin, 1995). La protéine c-Fos peut également être phosphorylée par ERK1/2, ce qui conduit à stabiliser la protéine c-Fos, augmentant ainsi son activité de liaison à l'ADN et son potentiel d'activation (Okazaki et Sagata, 1995; Chen et al., 1996; Murphy et al., 2002; Monje et al., 2003; Murphy et al., 2004 ; Monje et al., 2005). Le FT Pax-6, exprimé dans la cornée (Zhang et al., 2001), a été démontré comme un activateur de la transcription du gène $\alpha 5$ (Duncan et al., 2000). Pax-6, en interaction avec AP-2a, contrôle également l'expression du gène MMP-9 spécifiquement dans les cellules épithéliales cornéennes en ré-épithélialisation (Sivak et al., 2004). La phosphorylation du domaine de transactivation de Pax-6 par les kinases ERK et p38 a été démontrée, cette modification post-traductionnelle augmentant le potentiel activateur de ce facteur de transcription (Mikkola et al., 1999). La phosphorylation a aussi été démontrée pour les protéines appartenant à la famille NFI, cette modification semblant favoriser leur affinité de liaison à l'ADN et leur activité transcriptionnelle (Cooke et Lane, 1999 ; Yang et al., 1993b ; Reifel-Miller et al., 1994 ; Duval et al., 2012). Une étude récente a démontré que la capacité de NFI à lier ses sites cibles dans l'ADN dépend entièrement de son état de phosphorylation (Duval et al., 2012). Ces différentes études suggèrent un lien entre les protéines de la MEC (FN, CI, CIV, LM), les voies signalétiques des MAPKs et les FTs Sp1, AP-1, NFI et Pax-6. Ces observations valident nos conclusions suggérant que les différentes composantes de la MEC (FN, CI, CIV, LM), individuellement ou en combinaison, altèrent l'expression du gène α 5 en modifications post-traductionnelles comme la phosphorylation) des FTs (Sp1, AP-1, NFI et Pax-6) requis pour l'expression de ce gène durant la cicatrisation de l'épithélium cornéen.

6.6. Perspectives de recherche

Dans ce projet, le modèle de cicatrisation en culture monocouche de CECs primaires à différentes densités cellulaires sur diverses composantes de la MEC a été utilisé pour étudier leur influence sur l'expression du gène $\alpha 5$, où les cellules cultivées à faible densité cellulaire (sous-confluence) représentent adéquatement un épithélium en cicatrisation, alors que celles à haute densité cellulaire (post-confluence) représentent un épithélium cicatrisé ou natif. Ce type de modèle a été exploité précédemment pour étudier les influences de la FN et de la LM sur l'expression des gènes codant pour les sous-unités d'intégrines $\alpha 4$, $\alpha 5$, α6 (Larouche et al., 2000; Gingras et al., 2003; Zaniolo et al., 2004; Gaudreault et al., 2007 ; Vigneault et al., 2007 ; Gaudreault et al., 2008 ; Gingras et al., 2009). Ces modèles de culture en monocouche comportent néanmoins plusieurs limites, dont l'absence d'un épithélium pluristratifié et l'absence d'interaction entre les cellules épithéliales et les kératocytes. Récemment, un nouveau modèle de cicatrisation in vitro utilisant une cornée humaine reconstruite par la méthode d'auto-assemblage a été développé (Carrier et al., 2008 ; Zaniolo et al., 2013). Dans celui-ci, l'équivalent cornéen humain composé d'un épithélium stratifié reposant sur un stroma auto-assemblé (avec kératocytes) est perforé à l'aide d'un trépan pour créer une lésion de 8 mm de diamètre et placé sur un deuxième stroma reconstruit sans épithélium pour être cultivé à l'interface air-liquide pendant 5 jours afin de permettre la fermeture de la plaie in vitro (Figures 1.6 et 1.8) (Zaniolo et al., 2013). Après la fermeture des plaies, trois régions distinctes de cet épithélium cornéen reconstruit peuvent être récoltées pour effectuer différentes analyses : la région centrale lésée (anneau central, 8 mm), la région interne des cellules intactes situées près de la région lésée (anneau interne, 14 mm) et la région externe non lésée (anneau externe, 19 mm). En perspective, il serait donc intéressant de poursuivre ces travaux de recherche en exploitant ce modèle novateur de cornée humaine reconstruite afin d'étudier l'expression des intégrines (en particulier, a5 et a6), des FTs régulateurs, des MMPs (notamment MMP-9), des facteurs croissance/cytokines, des composantes de la MEC et des principaux médiateurs des voies de signalisation intracellulaire durant la guérison des plaies cornéennes. Des analyses sur biopuces à ADN et en qPCR pourraient être effectuées pour permettre d'évaluer l'expression de ces gènes d'intérêt en utilisant les échantillons récoltés des épithéliums cornéens de la région centrale lésée, de la région interne et de la région externe non lésée de ces cornées reconstruites. Des analyses en buvardage Western pourraient également être réalisées pour évaluer leur expression au niveau protéique pour ces mêmes échantillons. De plus, les activités de liaison à l'ADN des FTs régulateurs (Sp1/Sp3, AP-1, NFI et Pax-6) pourraient être analysées par retard sur gel (EMSA) sur ces mêmes échantillons (Lake et al., 2013). Les surnageants de culture de ces cornées reconstruites pourraient être récoltés durant la fermeture de la plaie pour évaluer l'activité enzymatique de MMP-9 et des autres MMPs par des analyses zymographiques (Beliveau et al., 2000; Toth et Fridman, 2001). Des buvardages Western pourraient également être réalisés pour déterminer l'expression de ces enzymes lors de la cicatrisation. L'expression des facteurs de croissance et des cytokines sécrétées dans le milieu de culture lors de la fermeture de la plaie pourrait être évaluée à l'aide de membranes contenant des anticorps capteurs de diverses cytokines/facteurs de croissance (Human Cytokine Array V kit; Cedarlane Laboratories) (Carrier et al., 2009). L'expression des différentes kinases et médiateurs phosphorylés dans un épithélium en cicatrisation pourrait être analysée à l'aide de membranes contenant des anticorps reconnaissant ces kinases activées à partir d'extraits provenant des épithéliums de la région centrale lésée et de la région externe non lésée des cornées reconstruites (Human Phospho-kinase Antibody Array, R&D Systems).

En perspective, il serait également intéressant de poursuivre ces travaux de recherche en étudiant les principaux médiateurs des voies de signalisation intracellulaire activées par les différentes composantes de la MEC, soit les matrices simples (collagènes, LMs ou FN) et les matrices complexes reconstruites (composées de collagènes et de FN), dans les CECHs sous-confluentes, confluentes et post-confluentes. Pour identifier les voies activées par ces diverses composantes de la MEC impliquées dans la régulation de l'expression du gène $\alpha 5$, des inhibiteurs pharmacologiques des voies de signalisation MAPK ERK1/ERK2, PI3K, p38 et JNK pourraient être utilisés dans des CECHs en culture à différentes densités sur ces diverses matrices. Ces analyses pourraient également être validées par le suivi, en buvardage Western, des protéines α5, ERK1/2, Phospho-ERK1/2, p38, phospho-p38, PI3K, phospho-PI3K, JNK et phospho-JNK. Des analyses de retard sur gel (EMSA) ainsi que des analyses de transfection avec des plasmides CAT/promoteur a5 pourraient également s'avérer intéressantes afin d'évaluer l'influence de ces inhibiteurs sur les activités de liaison à l'ADN des FTs régulateurs (pour Sp1/Sp3, AP-1 et NFI) et sur l'expression du gène α 5 dans les CECHs (Larouche et al., 2000 ; Zaniolo et al., 2006 ; Sen et al., 2010 ; Jin et al., 2011). Des anticorps bloqueurs contre les différentes sous-unités d'intégrines $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$ et α 6 seraient également utilisés pour identifier lesquels de ces récepteurs, par leur interaction avec leur ligand matriciel, sont impliqués dans l'activation des voies signalétiques qui conduisent à une modification de l'expression du gène $\alpha 5$ (Sen et al., 2010 ; Jin et al., 2011). Comme pour la FN, des analyses de transfection avec des plasmides recombinants portant des délétions du promoteur $\alpha 5$ (-42, -92, -132, -178 et -954 $\alpha 5$) ou des mutations (simples ou doubles) des sites pour les FTs Sp1, AP-1 et NFI dans le promoteur α 5 pourront être effectuées dans le but d'identifier les éléments de réponse au CI, au CIV et à la LM sur le promoteur a5 et de déterminer l'importance des FTs régulateurs dans l'expression du gène α5 dans les CECHs en présence de collagènes ou de LMs (Larouche et al., 2000 ; Gingras et al., 2009). Par ailleurs, pour confirmer l'hypothèse que de petites quantités de FN sont suffisantes pour court-circuiter l'influence négative des collagènes sur l'expression du gène α 5, des analyses de transfection avec des plasmides CAT/promoteur a5 pourront être effectuées dans des CECHs cultivées sur des gels de collagènes (CI ou CIV) combinés avec des doses croissantes de FN.

Une autre étude intéressante à effectuer consisterait à évaluer l'impact des divers éléments matriciels sur l'état de la chromatine par modifications épigénétiques et les mécanismes possiblement impliqués dans l'activation ou la répression transcriptionnelle du gène α 5 dans le contexte d'une chromatine assemblée dans des cellules épithéliales cornéennes. L'acétylation de certains résidus lysine sur les queues d'histones (par exemple, H3-K⁹ et H3-K¹⁴) des nucléosomes, régulée par les histones acétyltransférases (HATs : 'histone acetyltransferases'), est associée à une chromatine relâchée et à l'activation transcriptionnelle. En revanche, la désacétylation des histones, régulée par les histones déacétylases (HDACs: 'histone deacetylases'), est associée à une chromatine condensée et à la répression transcriptionnelle (Luo et Dean, 1999 ; Fukuda et al., 2006). L'étude de Rose et collaborateurs a démontré que l'engagement des intégrines β 1 régulait la structure de la chromatine via l'augmentation de l'acétylation des histories H3 couplée à une réduction de l'association des histones H1 à l'ADN dans des cellules endothéliales murines de poumon (Rose et al., 2005). Par conséquent, des approches permettant de mesurer l'acétylation des histones H3 dans des CECHs cultivées sur divers éléments matriciels (FN, CI, CIV, LM et ECM/35d) pourraient être utilisées afin d'évaluer leur impact sur la structure de la chromatine associé à la régulation épigénétique de la transcription du gène α 5. Des analyses en buvardage Western à l'aide d'anticorps dirigés contre les acétyl-Histone H3 (Lys⁹ ou Lys¹⁴) pourraient être réalisées dans le but d'évaluer l'acétylation des histones H3 dans des CECHs cultivées en présence de ces diverses matrices (Rose et al., 2005 ; Kim et al., 2005). Des analyses par immunoprécipitation de chromatine (ChIP) avec ces mêmes anticorps pourraient également être réalisées pour évaluer l'acétylation des histones H3 au niveau du promoteur du gène α 5 pour ces différentes conditions matricielles (Rose et al., 2005; Lin et al., 2005). Pour déterminer les enzymes impliquées dans ces modifications d'histones, des inhibiteurs HATs (par exemple, C646, un inhibiteur de p300/CBP) ou des inhibiteurs HDACs (par exemple, la trichostatine A) pourraient être utilisés dans des CECHs en culture sur ces diverses matrices afin d'évaluer l'effet sur la transcription du gène α 5 par qPCR et buvardage Western. En outre, des essais d'activités enzymatiques HATs ou HDACs pourraient également être effectués pour chacune de ces conditions matricielles (Rose et al., 2005; Kim et al., 2005).



LE NUMERO I MONDIAL DU MÉMOIRES.

L'étude présentée au Chapitre IV a démontré que les régions distales conservées de 300pb localisées en 5' des gènes a3, a5, a9 et av sont composées de plusieurs éléments de régulation positifs (AP-1, Sp1 et Ets) et négatifs (NFI, C/EBP et c-myc) permettant une régulation fine de l'expression du gène α5 dans les cellules épithéliales. Il reste néanmoins à déterminer la fonctionnalité de ces sites potentiels de liaisons pour ces FTs et à définir leur importance dans la régulation de l'activité du promoteur du gène α 5. Les régions du segment conservé de 300pb auxquelles se lient ces FTs pourraient être identifiées in vitro par cartographie à la DNaseI et *in vivo* par immunoprécipitation de chromatine (ChIP) (Gaudreault et al., 2007; Ouellet et al., 2006). De plus, l'identité des FTs qui lient ces régions régulatrices pourrait être confirmée par compétitions et super-rétentions en gel (EMSA) en utilisant des extraits nucléaires des CECHs et T115 en guise de source de matériel biologique (Gingras et al., 2009). Une analyse LMPCR (ligation-mediated PCR) (Ouellet et al., 2006; Gingras et al., 2009) pourra également être complétée afin de préciser les interactions ADN-protéines en conditions physiologiques in vivo. Par la suite, les séquences cibles identifiées et positionnées pour ces FTs sur le segment conservé de 315 pb du gène a5 seront altérées par mutagénèse dirigée ou par délétion afin de démontrer leur influence régulatrice (positive ou négative) sur la transcription du promoteur du gène α 5 (Gingras et al., 2003; Gingras et al., 2009). Pour démontrer si l'élément conservé de 315 pb joue un rôle dans la cicatrisation cornéenne, son influence régulatrice pourrait également être évaluée dans des CECHs cultivées à différentes densités cellulaires (sous-confluence jusqu'à 5 jours post-confluence) avec ou sans MEC.

Il serait intéressant de caractériser la régulation de l'expression du gène MMP-9 dans un contexte de cicatrisation de l'épithélium cornéen à l'aide de CECHs cultivées à différentes densités sur FN, sur des gels de CI ou sur des matrices complexes reconstruites (ECM35d / \pm keratocytes). Les voies de signalisation impliquées dans la régulation de l'expression de MMP-9 dans les CECs ont été déterminées, mais l'identité des FTs liant le promoteur MMP-9 demeure encore incertaine. Chez l'humain, une petite région du promoteur MMP-9 (-440 à -522) est requise pour que les cytokines IL-1 et TGF- β modulent l'expression de MMP-9. Cette région contient des sites potentiels pour la liaison des FTs NF- κ B, Pax-6, Sp1, PEA-3 et AP-1 (Gordon et al., 2009). Les interactions de ces FTs avec le segment -

440/-522 du gène MMP-9 doivent cependant être démontrées en exploitant différentes techniques de détection des interactions ADN-protéines *in vitro* (DNaseI et EMSA) et *in vivo* (ChIP et LMPCR) (Gaudreault et al., 2007; Ouellet et al., 2006 ; Gingras et al., 2009) à partir d'extraits nucléaires provenant de CECHs cultivés à différentes densités sur ces diverses matrices. En outre, la suppression de IL-1, IL-8 et TGF- β (individuellement ou en combinaison) par ARN interférence (ARNi) dans des CECHs avant leur culture sur les matrices reconstruites pourra être effectuée afin d'analyser l'occupation des FTs sur l'élément -440/-522 du promoteur MMP-9 selon chacune de ces conditions de culture.

En conséquence, les études antérieures, celles présentées dans cette thèse de doctorat et celles qui suivront permettront d'accroître nos connaissances sur la compréhension des mécanismes moléculaires qui modulent l'expression des gènes des intégrines et des MMPs dans un épithélium cornéen humain en cicatrisation, en particulier les influences régulatrices des composantes de la MEC sur l'expression des gènes α5 et MMP-9 dans les CECHs. Cette régulation de l'expression de α 5 par la MEC est d'une importance primordiale dans la cicatrisation cornéenne, puisque l'expression membranaire de cette intégrine permet aux cellules de l'épithélium d'adhérer et de migrer correctement durant ce processus. Une meilleure compréhension des mécanismes de régulation des intégrines par la MEC est un prérequis afin d'améliorer nos connaissances en matière de guérison des plaies cornéennes. Nos matrices simples et complexes reconstruites par génie tissulaire sont particulièrement intéressantes afin d'étudier les gènes des intégrines, mais aussi d'autres gènes tels les MMPs, notamment MMP-9, qui joue un rôle important dans le remodelage de la MEC durant la cicatrisation cornéenne. L'identification des facteurs contrôlant la transcription des gènes a5 et MMP-9 pourrait ainsi identifier des cibles thérapeutiques potentielles dont nous pourrions modifier l'expression (par exemple, par ARNi) afin d'améliorer la guérison des plaies cornéennes en clinique. La reconstruction cornéenne par génie tissulaire est une avenue prometteuse pour répondre à la demande croissante de greffes de cornée et à la pénurie de greffons de tissus cornéens de donneurs humains. Une bonne régénération tissulaire nécessite toutefois une très bonne compréhension des signaux qui guident ce mécanisme. Nos études sur les influences individuelles ou combinées des composantes de la MEC sur l'expression du gène α 5 dans les CECs contribuent à mieux comprendre la régénération cornéenne, ce qui pourrait mener au développement de meilleurs substituts cornéens. Ces équivalents cornéens pourront contribuer au développement de meilleurs modèles pour étudier la cicatrisation *in vitro* ou pour effectuer des études toxicologiques et pharmacologiques. Par ailleurs, ces substituts cornéens pourront éventuellement être utilisés comme outil thérapeutique en remplacement des greffes de cornées provenant de donneurs chez l'humain pour la guérison des plaies cornéennes *in vivo* dans un futur prochain.

Bibliographie

Abate, C., D. Luk, et al. (1991). "Transcriptional regulation by Fos and Jun in vitro: interaction among multiple activator and regulatory domains." <u>Mol Cell Biol</u> **11**(7): 3624-3632.

Abib, F. C. and J. Barreto Junior (2001). "Behavior of corneal endothelial density over a lifetime." J <u>Cataract Refract Surg</u> **27**(10): 1574-1578.

Adhikary, S., K. Peukert, et al. (2003). "Miz1 is required for early embryonic development during gastrulation." <u>Mol Cell Biol</u> **23**(21): 7648-7657.

Agrawal, V. B. and R. J. Tsai (2003). "Corneal epithelial wound healing." <u>Indian J Ophthalmol</u> **51**(1): 5-15.

Ahmadiankia, N., M. Ebrahimi, et al. (2009). "Effects of different extracellular matrices and cocultures on human limbal stem cell expansion in vitro." <u>Cell Biol Int</u> **33**(9): 978-987.

Ahmed, K. M., H. Zhang, et al. (2013). "NF-kappaB regulates radioresistance mediated by beta1-integrin in three-dimensional culture of breast cancer cells." <u>Cancer Res</u> **73**(12): 3737-3748.

Akiyama, S. K., S. S. Yamada, et al. (1989). "Analysis of fibronectin receptor function with monoclonal antibodies: roles in cell adhesion, migration, matrix assembly, and cytoskeletal organization." J Cell Biol 109(2): 863-875.

Alaminos, M., M. Del Carmen Sanchez-Quevedo, et al. (2006). "Construction of a complete rabbit cornea substitute using a fibrin-agarose scaffold." <u>Invest Ophthalmol Vis Sci</u> **47**(8): 3311-3317.

Albelda, S. M. (1991). "Endothelial and epithelial cell adhesion molecules." <u>Am J Respir Cell Mol</u> <u>Biol</u> 4(3): 195-203.

Alberts, B., J. H. Wilson, et al. (2011). <u>Biologie moléculaire de la cellule (5e Édition)</u>. Paris, Médecine Sciences Publications.

Andac, Z., T. Sasaki, et al. (1999). "Analysis of heparin, alpha-dystroglycan and sulfatide binding to the G domain of the laminin alpha1 chain by site-directed mutagenesis." J Mol Biol **287**(2): 253-264.

Anderson, J. A., P. S. Binder, et al. (1996). "Human excimer laser keratectomy. Immunohistochemical analysis of healing." <u>Arch Ophthalmol</u> **114**(1): 54-60.

Anderson, R. A. (1977). "Actin filaments in normal and migrating corneal epithelial cells." <u>Invest</u> <u>Ophthalmol Vis Sci</u> 16(2): 161-166.

Andreasen, P. A., R. Egelund, et al. (2000). "The plasminogen activation system in tumor growth, invasion, and metastasis." <u>Cell Mol Life Sci</u> 57(1): 25-40.

Andresen, J. L. and N. Ehlers (1998). "Chemotaxis of human keratocytes is increased by plateletderived growth factor-BB, epidermal growth factor, transforming growth factor-alpha, acidic fibroblast growth factor, insulin-like growth factor-I, and transforming growth factor-beta." <u>Curr</u> <u>Eye Res</u> 17(1): 79-87. Andresen, J. L., T. Ledet, et al. (1997). "Keratocyte migration and peptide growth factors: the effect of PDGF, bFGF, EGF, IGF-I, aFGF and TGF-beta on human keratocyte migration in a collagen gel." <u>Curr Eye Res</u> **16**(6): 605-613.

Andresen, J. L., T. Ledet, et al. (2000). "The influence of corneal stromal matrix proteins on the migration of human corneal fibroblasts." Exp Eye Res 71(1): 33-43.

Angel, P., M. Imagawa, et al. (1987). "Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor." <u>Cell</u> **49**(6): 729-739.

Angel, P. and M. Karin (1991). "The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation." <u>Biochim Biophys Acta</u> **1072**(2-3): 129-157.

Aota, S., M. Nomizu, et al. (1994). "The short amino acid sequence Pro-His-Ser-Arg-Asn in human fibronectin enhances cell-adhesive function." J Biol Chem **269**(40): 24756-24761.

Argraves, W. S., S. Suzuki, et al. (1987). "Amino acid sequence of the human fibronectin receptor." <u>J Cell Biol</u> **105**(3): 1183-1190.

Arita, A., G. Asano, et al. (1997). "[Laminin-dependent growth arrest of human hepatic carcinoma cell line, HuH-7, in association with expression of p21/WAF-1 protein]." <u>Nihon Ika Daigaku Zasshi</u> **64**(2): 147-153.

Armentero, M. T., M. Horwitz, et al. (1994). "Targeting of DNA polymerase to the adenovirus origin of DNA replication by interaction with nuclear factor I." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **91**(24): 11537-11541.

Armstrong, S. A., D. A. Barry, et al. (1997). "Casein kinase II-mediated phosphorylation of the C terminus of Sp1 decreases its DNA binding activity." J Biol Chem **272**(21): 13489-13495.

Arnaout, M. A., B. Mahalingam, et al. (2005). "Integrin structure, allostery, and bidirectional signaling." <u>Annu Rev Cell Dev Biol</u> **21**: 381-410.

Aronheim, A., E. Zandi, et al. (1997). "Isolation of an AP-1 repressor by a novel method for detecting protein-protein interactions." <u>Mol Cell Biol</u> **17**(6): 3094-3102.

Auger, F. A., F. Berthod, et al. (2004). "Tissue-engineered skin substitutes: from in vitro constructs to in vivo applications." <u>Biotechnol Appl Biochem</u> **39**(Pt 3): 263-275.

Auger, F. A., M. Remy-Zolghadri, et al. (2002). "A truly new approach for tissue engineering: the LOEX self-assembly technique." <u>Ernst Schering Res Found Workshop (35)</u>: 73-88.

Auger, F. A., M. Rémy-Zolghadri, et al. (2000). "Review: The Self-Assembly Approach for Organ Reconstruction by Tissue Engineering." <u>e-biomed</u> **1**(5): 75-86.

Aukhil, I., C. Sahlberg, et al. (1996). "Basal layer of epithelium expresses tenascin mRNA during healing of incisional skin wounds." <u>J Periodontal Res</u> **31**(2): 105-112.

Aumailley, M., L. Bruckner-Tuderman, et al. (2005). "A simplified laminin nomenclature." <u>Matrix</u> <u>Biol</u> 24(5): 326-332. Aumailley, M., A. El Khal, et al. (2003). "Laminin 5 processing and its integration into the ECM." <u>Matrix Biol</u> **22**(1): 49-54.

Auxenfans, C., J. Fradette, et al. (2009). "Evolution of three dimensional skin equivalent models reconstructed in vitro by tissue engineering." <u>Eur J Dermatol</u> **19**(2): 107-113.

Azar, D. T., T. W. Hahn, et al. (1996). "Matrix metalloproteinases are expressed during wound healing after excimer laser keratectomy." <u>Cornea</u> **15**(1): 18-24.

Baker, S. E., S. B. Hopkinson, et al. (1996). "Laminin-5 and hemidesmosomes: role of the alpha 3 chain subunit in hemidesmosome stability and assembly." J Cell Sci **109 (Pt 10)**: 2509-2520.

Bakiri, L., D. Lallemand, et al. (2000). "Cell cycle-dependent variations in c-Jun and JunB phosphorylation: a role in the control of cyclin D1 expression." <u>EMBO J</u> **19**(9): 2056-2068.

Bakiri, L., K. Matsuo, et al. (2002). "Promoter specificity and biological activity of tethered AP-1 dimers." <u>Mol Cell Biol</u> **22**(13): 4952-4964.

Bandyopadhyay, S. and R. M. Gronostajski (1994). "Identification of a conserved oxidationsensitive cysteine residue in the NFI family of DNA-binding proteins." J Biol Chem **269**(47): 29949-29955.

Bandyopadhyay, S., D. W. Starke, et al. (1998). "Thioltransferase (glutaredoxin) reactivates the DNA-binding activity of oxidation-inactivated nuclear factor I." J Biol Chem **273**(1): 392-397.

Barbosa, F. L., M. Lin, et al. (2012). "Interleukin-1 receptor role in the viability of corneal myofibroblasts." <u>Exp Eye Res</u> **96**(1): 65-69.

Barczyk, M., S. Carracedo, et al. (2010). "Integrins." Cell Tissue Res 339(1): 269-280.

Basbous, J., D. Chalbos, et al. (2007). "Ubiquitin-independent proteasomal degradation of Fra-1 is antagonized by Erk1/2 pathway-mediated phosphorylation of a unique C-terminal destabilizer." <u>Mol Cell Biol</u> **27**(11): 3936-3950.

Bassuk, A. G. and J. M. Leiden (1995). "A direct physical association between ETS and AP-1 transcription factors in normal human T cells." <u>Immunity</u> **3**(2): 223-237.

Basuyaux, J. P., E. Ferreira, et al. (1997). "The Ets transcription factors interact with each other and with the c-Fos/c-Jun complex via distinct protein domains in a DNA-dependent and -independent manner." J Biol Chem **272**(42): 26188-26195.

Bauknecht, T., R. H. See, et al. (1996). "A novel C/EBP beta-YY1 complex controls the cell-type-specific activity of the human papillomavirus type 18 upstream regulatory region." J Virol **70**(11): 7695-7705.

Bauknecht, T. and Y. Shi (1998). "Overexpression of C/EBPbeta represses human papillomavirus type 18 upstream regulatory region activity in HeLa cells by interfering with the binding of TATA-binding protein." J Virol 72(3): 2113-2124.

Baum, J. L. (1970). "Melanocyte and Langerhans cell population of the cornea and limbus in the albino animal." <u>Am J Ophthalmol **69**(4)</u>: 669-676.

Beebe, D. C. and B. R. Masters (1996). "Cell lineage and the differentiation of corneal epithelial cells." Invest Ophthalmol Vis Sci **37**(9): 1815-1825.

Beliveau, A., M. Berube, et al. (2000). "Expression of integrin alpha5beta1 and MMPs associated with epithelioid morphology and malignancy of uveal melanoma." <u>Invest Ophthalmol Vis Sci</u> **41**(8): 2363-2372.

Beliveau, A., S. Leclerc, et al. (1999). "Multiple cloning sites from mammalian expression vectors interfere with gene promoter studies in vitro." <u>Eur J Biochem</u> **261**(2): 585-590.

Belkin, A. M. and M. A. Stepp (2000). "Integrins as receptors for laminins." <u>Microsc Res Tech</u> **51**(3): 280-301.

Benbow, U. and C. E. Brinckerhoff (1997). "The AP-1 site and MMP gene regulation: what is all the fuss about?" <u>Matrix Biol</u> **15**(8-9): 519-526.

Benkhelifa, S., S. Provot, et al. (1998). "mafA, a novel member of the maf proto-oncogene family, displays developmental regulation and mitogenic capacity in avian neuroretina cells." <u>Oncogene</u> **17**(2): 247-254.

Bentley, A. J., T. Nakamura, et al. (2007). "Characterization of human corneal stem cells by synchrotron infrared micro-spectroscopy." <u>Mol Vis</u> **13**: 237-242.

Bergmanson, J. P., J. Horne, et al. (2005). "Assessment of the number of lamellae in the central region of the normal human corneal stroma at the resolution of the transmission electron microscope." Eye Contact Lens **31**(6): 281-287.

Berman, A. E. and N. I. Kozlova (2000). "Integrins: structure and functions." <u>Membr Cell Biol</u> 13(2): 207-244.

Berube, M., A. Deschambeault, et al. (2005). "MMP-2 expression in uveal melanoma: differential activation status dictated by the cellular environment." <u>Mol Vis</u> **11**: 1101-1111.

Betz, P., A. Nerlich, et al. (1993). "Localization of tenascin in human skin wounds--an immunohistochemical study." Int J Legal Med **105**(6): 325-328.

Beuerman, R. W. and L. Pedroza (1996). "Ultrastructure of the human cornea." <u>Microsc Res Tech</u> **33**(4): 320-335.

Birk, D. E. (2001). "Type V collagen: heterotypic type I/V collagen interactions in the regulation of fibril assembly." <u>Micron</u> **32**(3): 223-237.

Birk, D. E. and P. Brückner (2011). Collagens, Suprastructures, and Collagen Fibril Assembly. <u>In:</u> <u>The Extracellular Matrix: an Overview (Biology of Extracellular Matrix)</u>. R. P. Mecham, Springer Berlin Heidelberg: p. 77-115.

Birkenmeier, T. M., J. J. McQuillan, et al. (1991). "The alpha 5 beta 1 fibronectin receptor. Characterization of the alpha 5 gene promoter." <u>J Biol Chem</u> **266**(30): 20544-20549.

Birnbaum, M. J., A. J. van Wijnen, et al. (1995). "Sp1 trans-activation of cell cycle regulated promoters is selectively repressed by Sp3." <u>Biochemistry</u> **34**(50): 16503-16508.

Black, A. R., J. D. Black, et al. (2001). "Sp1 and kruppel-like factor family of transcription factors in cell growth regulation and cancer." <u>J Cell Physiol</u> **188**(2): 143-160.

Blanco-Mezquita, J. T., A. E. Hutcheon, et al. (2011). "alphaVbeta6 integrin promotes corneal wound healing." <u>Invest Ophthalmol Vis Sci</u> **52**(11): 8505-8513.

Blazejewska, E. A., U. Schlotzer-Schrehardt, et al. (2009). "Corneal limbal microenvironment can induce transdifferentiation of hair follicle stem cells into corneal epithelial-like cells." <u>Stem Cells</u> **27**(3): 642-652.

Block, K. L., Y. Shou, et al. (1996). "An Ets/Sp1 interaction in the 5'-flanking region of the megakaryocyte-specific alpha IIb gene appears to stabilize Sp1 binding and is essential for expression of this TATA-less gene." <u>Blood</u> **88**(6): 2071-2080.

Bode, W., C. Fernandez-Catalan, et al. (1999). "Insights into MMP-TIMP interactions." <u>Ann N Y</u> <u>Acad Sci</u> 878: 73-91.

Bogoyevitch, M. A. and B. Kobe (2006). "Uses for JNK: the many and varied substrates of the c-Jun N-terminal kinases." <u>Microbiol Mol Biol Rev</u> **70**(4): 1061-1095.

Boisjoly, H. M., C. Laplante, et al. (1993). "Effects of EGF, IL-1 and their combination on in vitro corneal epithelial wound closure and cell chemotaxis." <u>Exp Eye Res</u> **57**(3): 293-300.

Boles, B. K., J. Ritzenthaler, et al. (2000). "Phorbol ester-induced U-937 differentiation: effects on integrin alpha(5) gene transcription." <u>Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol</u> **278**(4): L703-712.

Bonanno, J. A. (2003). "Identity and regulation of ion transport mechanisms in the corneal endothelium." <u>Prog Retin Eye Res</u> 22(1): 69-94.

Bonanno, J. A. (2012). "Molecular mechanisms underlying the corneal endothelial pump." <u>Exp Eye</u> <u>Res</u> **95**(1): 2-7.

Borradori, L. and A. Sonnenberg (1999). "Structure and function of hemidesmosomes: more than simple adhesion complexes." J Invest Dermatol **112**(4): 411-418.

Borza, C. M., A. Pozzi, et al. (2006). "Integrin alpha3beta1, a novel receptor for alpha3(IV) noncollagenous domain and a trans-dominant Inhibitor for integrin alphavbeta3." J Biol Chem **281**(30): 20932-20939.

Borza, D. B., O. Bondar, et al. (2001). "The NC1 domain of collagen IV encodes a novel network composed of the alpha 1, alpha 2, alpha 5, and alpha 6 chains in smooth muscle basement membranes." J Biol Chem **276**(30): 28532-28540.

Bosman, F. T. and I. Stamenkovic (2003). "Functional structure and composition of the extracellular matrix." <u>J Pathol</u> **200**(4): 423-428.

Bossis, G., C. E. Malnou, et al. (2005). "Down-regulation of c-Fos/c-Jun AP-1 dimer activity by sumoylation." <u>Mol Cell Biol</u> **25**(16): 6964-6979.

Boudreau, N. J. and P. L. Jones (1999). "Extracellular matrix and integrin signalling: the shape of things to come." <u>Biochem J</u> **339 (Pt 3)**: 481-488.

Boulze Pankert, M., B. Goyer, et al. (2014). "Biocompatibility and functionality of a tissueengineered living corneal stroma transplanted in the feline eye." <u>Invest Ophthalmol Vis Sci</u> 55(10): 6908-6920.

Bouwman, P. and S. Philipsen (2002). "Regulation of the activity of Sp1-related transcription factors." <u>Mol Cell Endocrinol</u> **195**(1-2): 27-38.

Boyle, W. J., T. Smeal, et al. (1991). "Activation of protein kinase C decreases phosphorylation of c-Jun at sites that negatively regulate its DNA-binding activity." <u>Cell</u> **64**(3): 573-584.

Brakebusch, C. and R. Fassler (2003). "The integrin-actin connection, an eternal love affair." <u>EMBO J 22(10)</u>: 2324-2333.

Brash, A. R., W. E. Boeglin, et al. (1997). "Discovery of a second 15S-lipoxygenase in humans." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> 94(12): 6148-6152.

Brasse-Lagnel, C., A. Fairand, et al. (2003). "Glutamine stimulates argininosuccinate synthetase gene expression through cytosolic O-glycosylation of Sp1 in Caco-2 cells." J Biol Chem **278**(52): 52504-52510.

Bray, L., K. George, et al. (2013). Fabrication of a Corneal-Limbal Tissue Substitute Using Silk Fibroin. <u>In: Corneal Regenerative Medicine (Methods in Molecular Biology)</u>. B. Wright and C. J. Connon. New York City, Humana Press. **1014:** p. 165-178.

Bray, L. J., K. A. George, et al. (2011). "Human corneal epithelial equivalents constructed on Bombyx mori silk fibroin membranes." <u>Biomaterials</u> **32**(22): 5086-5091.

Bray, L. J., K. A. George, et al. (2012). "A dual-layer silk fibroin scaffold for reconstructing the human corneal limbus." <u>Biomaterials</u> **33**(13): 3529-3538.

Brazzell, R. K., M. E. Stern, et al. (1991). "Human recombinant epidermal growth factor in experimental corneal wound healing." <u>Invest Ophthalmol Vis Sci</u> **32**(2): 336-340.

Brew, K., D. Dinakarpandian, et al. (2000). "Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function." <u>Biochim Biophys Acta</u> 1477(1-2): 267-283.

Brew, K. and H. Nagase (2010). "The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): an ancient family with structural and functional diversity." <u>Biochim Biophys Acta</u> **1803**(1): 55-71.

Briggs, J., S. Chamboredon, et al. (2002). "Transcriptional upregulation of SPARC, in response to c-Jun overexpression, contributes to increased motility and invasion of MCF7 breast cancer cells." <u>Oncogene</u> **21**(46): 7077-7091.

Brinckerhoff, C. E. and L. M. Matrisian (2002). "Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince." <u>Nat Rev Mol Cell Biol</u> **3**(3): 207-214.

Brooks, D. E. and F. J. Ollivier (2004). "Matrix metalloproteinase inhibition in corneal ulceration." <u>Vet Clin North Am Small Anim Pract</u> **34**(3): 611-622.

Brown, C. T., M. A. Nugent, et al. (1999). "Characterization of proteoglycans synthesized by cultured corneal fibroblasts in response to transforming growth factor beta and fetal calf serum." J Biol Chem **274**(11): 7111-7119.

Brown, R. A., M. Wiseman, et al. (2005). "Ultrarapid Engineering of Biomimetic Materials and Tissues: Fabrication of Nano- and Microstructures by Plastic Compression." <u>Adv Funct Mater</u> **15**(11): 1762-1770.

Brudno, M., M. Chapman, et al. (2003). "Fast and sensitive multiple alignment of large genomic sequences." <u>BMC Bioinformatics</u> 4: 66.

Brudno, M., R. Steinkamp, et al. (2004). "The CHAOS/DIALIGN WWW server for multiple alignment of genomic sequences." <u>Nucleic Acids Res</u> **32**(Web Server issue): W41-44.

Buhren, J., L. Nagy, et al. (2009). "Optical effects of anti-TGFbeta treatment after photorefractive keratectomy in a cat model." <u>Invest Ophthalmol Vis Sci</u> **50**(2): 634-643.

Builles, N., N. Bechetoille, et al. (2007a). "Development of a hemicornea from human primary cell cultures for pharmacotoxicology testing." <u>Cell Biol Toxicol</u> **23**(4): 279-292.

Builles, N., V. Justin, et al. (2007b). "Reconstructed corneas: effect of three-dimensional culture, epithelium, and tetracycline hydrochloride on newly synthesized extracellular matrix." <u>Cornea</u> **26**(10): 1239-1248.

Burling, K., M. A. Seguin, et al. (2000). "Effect of topical administration of epidermal growth factor on healing of corneal epithelial defects in horses." <u>Am J Vet Res</u> **61**(9): 1150-1155.

Butler, G. S., M. J. Butler, et al. (1998). "The TIMP2 membrane type 1 metalloproteinase "receptor" regulates the concentration and efficient activation of progelatinase A. A kinetic study." <u>J Biol</u> <u>Chem</u> **273**(2): 871-880.

Buttice, G., M. Duterque-Coquillaud, et al. (1996). "Erg, an Ets-family member, differentially regulates human collagenase1 (MMP1) and stromelysin1 (MMP3) gene expression by physically interacting with the Fos/Jun complex." <u>Oncogene</u> **13**(11): 2297-2306.

Calderwood, D. A. (2004). "Integrin activation." J Cell Sci 117(Pt 5): 657-666.

Calderwood, D. A., S. J. Shattil, et al. (2000). "Integrins and actin filaments: reciprocal regulation of cell adhesion and signaling." <u>J Biol Chem</u> **275**(30): 22607-22610.

Calderwood, D. A., D. S. Tuckwell, et al. (1997). "The integrin alpha1 A-domain is a ligand binding site for collagens and laminin." J Biol Chem 272(19): 12311-12317.

Calderwood, D. A., B. Yan, et al. (2002). "The phosphotyrosine binding-like domain of talin activates integrins." J Biol Chem 277(24): 21749-21758.

Cameron, J. D., B. A. Flaxman, et al. (1974). "In vitro studies of corneal wound healing: epithelialendothelial interactions." <u>Invest Ophthalmol</u> **13**(8): 575-579.

Cameron, J. D., S. T. Hagen, et al. (1988). "Effects of matrix proteins on rabbit corneal epithelial cell adhesion and migration." <u>Curr Eye Res</u> 7(3): 293-301.

Cameron, J. D., A. P. Skubitz, et al. (1991). "Type IV collagen and corneal epithelial adhesion and migration. Effects of type IV collagen fragments and synthetic peptides on rabbit corneal epithelial cell adhesion and migration in vitro." <u>Invest Ophthalmol Vis Sci</u> **32**(10): 2766-2773.

Rapport-gratuit.com

Le numero 1 mondial du mémoires

Campbell, I. D. and M. J. Humphries (2011). "Integrin structure, activation, and interactions." <u>Cold</u> <u>Spring Harb Perspect Biol</u> **3**(3): a004994.

Carlson, E. C., I. J. Wang, et al. (2003). "Altered KSPG expression by keratocytes following corneal injury." <u>Mol Vis</u> **9**: 615-623.

Carrier, P., A. Deschambeault, et al. (2009). "Impact of cell source on human cornea reconstructed by tissue engineering." <u>Invest Ophthalmol Vis Sci</u> **50**(6): 2645-2652.

Carrier, P., A. Deschambeault, et al. (2008). "Characterization of wound reepithelialization using a new human tissue-engineered corneal wound healing model." <u>Invest Ophthalmol Vis Sci</u> **49**(4): 1376-1385.

Carrington, L. M., J. Albon, et al. (2006). "Differential regulation of key stages in early corneal wound healing by TGF-beta isoforms and their inhibitors." <u>Invest Ophthalmol Vis Sci</u> 47(5): 1886-1894.

Carter, R. T. (2009). "The role of integrins in corneal wound healing." <u>Vet Ophthalmol</u> **12 Suppl 1**: 2-9.

Carter, R. T., R. Kambampati, et al. (2007). "Expression of matrix metalloproteinase 2 and 9 in experimentally wounded canine corneas and spontaneous chronic corneal epithelial defects." <u>Cornea</u> **26**(10): 1213-1219.

Carter, W. G., E. A. Wayner, et al. (1990). "The role of integrins alpha 2 beta 1 and alpha 3 beta 1 in cell-cell and cell-substrate adhesion of human epidermal cells." <u>J Cell Biol</u> **110**(4): 1387-1404.

Castellino, F. J. and V. A. Ploplis (2003). Human Plasminogen: Structure, Activation, and Function. In: Plasminogen: Structure, Activation, and Regulation. D. M. Waisman, Springer US, New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers: p. 3-17.

Castro-Munozledo, F. (2013). "Review: corneal epithelial stem cells, their niche and wound healing." <u>Mol Vis</u> **19**: 1600-1613.

Castro-Munozledo, F. and E. Gomez-Flores (2011). "Challenges to the study of asymmetric cell division in corneal and limbal epithelia." Exp Eye Res 92(1): 4-9.

Cervella, P., L. Silengo, et al. (1993). "Human beta 1-integrin gene expression is regulated by two promoter regions." J Biol Chem **268**(7): 5148-5155.

Cesarman-Maus, G. and K. A. Hajjar (2005). "Molecular mechanisms of fibrinolysis." <u>Br J</u> <u>Haematol</u> **129**(3): 307-321.

Chakrabarti, S. and K. D. Patel (2005). "Regulation of matrix metalloproteinase-9 release from IL-8-stimulated human neutrophils." <u>J Leukoc Biol</u> **78**(1): 279-288.

Chakraborti, S., M. Mandal, et al. (2003). "Regulation of matrix metalloproteinases: an overview." <u>Mol Cell Biochem</u> **253**(1-2): 269-285.

Chan, D., S. R. Lamande, et al. (1990). "Regulation of procollagen synthesis and processing during ascorbate-induced extracellular matrix accumulation in vitro." <u>Biochem J</u> **269**(1): 175-181.

Chandrasekher, G., A. H. Kakazu, et al. (2001). "HGF- and KGF-induced activation of PI-3K/p70 s6 kinase pathway in corneal epithelial cells: its relevance in wound healing." <u>Exp Eye Res</u> **73**(2): 191-202.

Chang, C. Y., C. R. Green, et al. (2008). "Acute wound healing in the human central corneal epithelium appears to be independent of limbal stem cell influence." <u>Invest Ophthalmol Vis Sci</u> **49**(12): 5279-5286.

Chang, W. C. (2003). "Cell signaling and gene regulation of human 12(S)-lipoxygenase expression." <u>Prostaglandins Other Lipid Mediat</u> 71(3-4): 277-285.

Chang, W. C. and B. K. Chen (2005). "Transcription factor Sp1 functions as an anchor protein in gene transcription of human 12(S)-lipoxygenase." <u>Biochem Biophys Res Commun</u> **338**(1): 117-121.

Chaudhry, A. Z., A. D. Vitullo, et al. (1998). "Nuclear factor I (NFI) isoforms differentially activate simple versus complex NFI-responsive promoters." J Biol Chem **273**(29): 18538-18546.

Chauhan, B. K., N. A. Reed, et al. (2002). "A comparative cDNA microarray analysis reveals a spectrum of genes regulated by Pax6 in mouse lens." <u>Genes Cells</u> 7(12): 1267-1283.

Chee, K. Y., A. Kicic, et al. (2006). "Limbal stem cells: the search for a marker." <u>Clin Experiment</u> <u>Ophthalmol</u> **34**(1): 64-73.

Chen, B. K. and W. C. Chang (2000). "Functional interaction between c-Jun and promoter factor Sp1 in epidermal growth factor-induced gene expression of human 12(S)-lipoxygenase." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> 97(19): 10406-10411.

Chen, C., B. Michelini-Norris, et al. (2000). "Measurement of mRNAs for TGFss and extracellular matrix proteins in corneas of rats after PRK." <u>Invest Ophthalmol Vis Sci</u> **41**(13): 4108-4116.

Chen, C. J., W. C. Chang, et al. (2008). "Attenuation of c-Jun and Sp1 expression and p300 recruitment to gene promoter confers the trichostatin A-induced inhibition of 12(S)-lipoxygenase expression in EGF-treated A431 cells." <u>Eur J Pharmacol</u> **591**(1-3): 36-42.

Chen, J. J. and S. C. Tseng (1990). "Corneal epithelial wound healing in partial limbal deficiency." Invest Ophthalmol Vis Sci **31**(7): 1301-1314.

Chen, J. J. and S. C. Tseng (1991). "Abnormal corneal epithelial wound healing in partial-thickness removal of limbal epithelium." <u>Invest Ophthalmol Vis Sci</u> **32**(8): 2219-2233.

Chen, R. H., P. C. Juo, et al. (1996). "Phosphorylation of c-Fos at the C-terminus enhances its transforming activity." <u>Oncogene</u> **12**(7): 1493-1502.

Cheng, C. Y., H. L. Hsieh, et al. (2012). "PI3-K/Akt/JNK/NF-kappaB is essential for MMP-9 expression and outgrowth in human limbal epithelial cells on intact amniotic membrane." <u>Stem Cell</u> <u>Res</u> **9**(1): 9-23.

Chikama, T., K. Fukuda, et al. (1998). "Treatment of neurotrophic keratopathy with substance-P-derived peptide (FGLM) and insulin-like growth factor I." <u>Lancet</u> **351**(9118): 1783-1784.

Chikama, T., M. Nakamura, et al. (1999). "Up-regulation of integrin alpha5 by a C-terminus fouramino-acid sequence of substance P (phenylalanine-glycine-leucine-methionine- amide) synergistically with insulin-like growth factor-1 in SV-40 transformed human corneal epithelial cells." <u>Biochem Biophys Res Commun</u> **255**(3): 692-697.

Chinenov, Y. and T. K. Kerppola (2001). "Close encounters of many kinds: Fos-Jun interactions that mediate transcription regulatory specificity." <u>Oncogene</u> **20**(19): 2438-2452.

Chiquet-Ehrismann, R. and R. P. Tucker (2011). "Tenascins and the importance of adhesion modulation." <u>Cold Spring Harb Perspect Biol</u> **3**(5): a004960.

Chirila, T., Z. Barnard, et al. (2008). "Bombyx mori silk fibroin membranes as potential substrata for epithelial constructs used in the management of ocular surface disorders." <u>Tissue Eng Part A</u> **14**(7): 1203-1211.

Chou, S. Y., V. Baichwal, et al. (1992). "Inhibition of c-Jun DNA binding by mitogen-activated protein kinase." <u>Mol Biol Cell</u> **3**(10): 1117-1130.

Chu, C. L., W. R. Reenstra, et al. (2000). "Erk and PI-3 kinase are necessary for collagen binding and actin reorganization in corneal epithelia." <u>Invest Ophthalmol Vis Sci</u> **41**(11): 3374-3382.

Chu, S. (2012). "Transcriptional regulation by post-transcriptional modification--role of phosphorylation in Sp1 transcriptional activity." <u>Gene</u> **508**(1): 1-8.

Chu, S. and T. J. Ferro (2005). "Sp1: regulation of gene expression by phosphorylation." <u>Gene 348</u>: 1-11.

Chuang, J. Y., Y. T. Wang, et al. (2008). "Phosphorylation by c-Jun NH2-terminal kinase 1 regulates the stability of transcription factor Sp1 during mitosis." <u>Mol Biol Cell</u> **19**(3): 1139-1151.

Chuck, R. S., A. Behrens, et al. (2001). "Re-epithelialization in cornea organ culture after chemical burns and excimer laser treatment." <u>Arch Ophthalmol</u> **119**(11): 1637-1642.

Chung, E. H., P. G. DeGregorio, et al. (1995). "Epithelial regeneration after limbus-to-limbus debridement. Expression of alpha-enolase in stem and transient amplifying cells." <u>Invest</u> <u>Ophthalmol Vis Sci</u> **36**(7): 1336-1343.

Chung, E. H., A. E. Hutcheon, et al. (1999). "Synchronization of the G1/S transition in response to corneal debridement." <u>Invest Ophthalmol Vis Sci</u> **40**(9): 1952-1958.

Cintron, C., H. I. Covington, et al. (1990). "Morphologic analyses of proteoglycans in rabbit corneal scars." <u>Invest Ophthalmol Vis Sci</u> **31**(9): 1789-1798.

Cintron, C., L. C. Hassinger, et al. (1978). "Biochemical and ultrastructural changes in collagen during corneal wound healing." <u>J Ultrastruct Res</u> **65**(1): 13-22.

Clark, E. A. and J. S. Brugge (1995). "Integrins and signal transduction pathways: the road taken." <u>Science</u> **268**(5208): 233-239.

Clark, R. E., Jr., W. K. Miskimins, et al. (2002). "Cyclic AMP inducibility of the myelin basic protein gene promoter requires the NF1 site." Int J Dev Neurosci **20**(2): 103-111.

Clarke, A. S., M. M. Lotz, et al. (1995). "Activation of the p21 pathway of growth arrest and apoptosis by the beta 4 integrin cytoplasmic domain." J Biol Chem **270**(39): 22673-22676.

Collen, D. (1999). "The plasminogen (fibrinolytic) system." <u>Thromb Haemost</u> 82(2): 259-270.

Collin, H. B., J. A. Anderson, et al. (1995). "In vitro model for corneal wound healing; organcultured human corneas." <u>Curr Eye Res</u> 14(5): 331-339.

Collo, G. and M. S. Pepper (1999). "Endothelial cell integrin alpha5beta1 expression is modulated by cytokines and during migration in vitro." <u>J Cell Sci</u> **112** (Pt 4): 569-578.

Colognato, H., M. MacCarrick, et al. (1997). "The laminin alpha2-chain short arm mediates cell adhesion through both the alpha1beta1 and alpha2beta1 integrins." J Biol Chem **272**(46): 29330-29336.

Colognato, H. and P. D. Yurchenco (2000). "Form and function: the laminin family of heterotrimers." Dev Dyn **218**(2): 213-234.

Cooke, D. W. and M. D. Lane (1999). "The transcription factor nuclear factor I mediates repression of the GLUT4 promoter by insulin." J Biol Chem 274(18): 12917-12924.

Cooper, G. M., S. A. Singaravelu, et al. (2004). "ABC: software for interactive browsing of genomic multiple sequence alignment data." <u>BMC Bioinformatics</u> **5**: 192.

Corbi, A. L., U. B. Jensen, et al. (2000). "The alpha2 and alpha5 integrin genes: identification of transcription factors that regulate promoter activity in epidermal keratinocytes." <u>FEBS Lett</u> **474**(2-3): 201-207.

Cornillon, J., L. Campos, et al. (2003). "Focal adhesion kinase (FAK), une protéine aux fonctions multiples" <u>Médecine/sciences</u> **19**(6-7): 743-752.

Cosset, E. C., J. Godet, et al. (2012). "Involvement of the TGFbeta pathway in the regulation of alpha5 beta1 integrins by caveolin-1 in human glioblastoma." Int J Cancer **131**(3): 601-611.

Cotsarelis, G., S. Z. Cheng, et al. (1989). "Existence of slow-cycling limbal epithelial basal cells that can be preferentially stimulated to proliferate: implications on epithelial stem cells." <u>Cell</u> **57**(2): 201-209.

Croker, A. K. and A. L. Allan (2012). "Inhibition of aldehyde dehydrogenase (ALDH) activity reduces chemotherapy and radiation resistance of stem-like ALDHhiCD44(+) human breast cancer cells." <u>Breast Cancer Res Treat</u> **133**(1): 75-87.

Cubitt, C. L., R. N. Lausch, et al. (1995). "Differences in interleukin-6 gene expression between cultured human corneal epithelial cells and keratocytes." <u>Invest Ophthalmol Vis Sci</u> **36**(2): 330-336.

Damiano, L., K. M. Stewart, et al. (2014). "Oncogenic targeting of BRM drives malignancy through C/EBPbeta-dependent induction of alpha5 integrin." <u>Oncogene</u> **33**(19): 2441-2453.

Danen, E. H. (2005). "Integrins: regulators of tissue function and cancer progression." <u>Curr Pharm</u> <u>Des</u> **11**(7): 881-891.

Danen, E. H., P. Sonneveld, et al. (2002). "The fibronectin-binding integrins alpha5beta1 and alphavbeta3 differentially modulate RhoA-GTP loading, organization of cell matrix adhesions, and fibronectin fibrillogenesis." J Cell Biol **159**(6): 1071-1086.

Daniels, J. T., J. K. Dart, et al. (2001). "Corneal stem cells in review." <u>Wound Repair Regen</u> 9(6): 483-494.

Daniels, J. T., G. Geerling, et al. (2003a). "Temporal and spatial expression of matrix metalloproteinases during wound healing of human corneal tissue." <u>Exp Eye Res</u> 77(6): 653-664.

Daniels, J. T. and P. T. Khaw (2000). "Temporal stimulation of corneal fibroblast wound healing activity by differentiating epithelium in vitro." <u>Invest Ophthalmol Vis Sci</u> **41**(12): 3754-3762.

Daniels, J. T., G. A. Limb, et al. (2003b). "Human corneal epithelial cells require MMP-1 for HGFmediated migration on collagen I." <u>Invest Ophthalmol Vis Sci</u> **44**(3): 1048-1055.

Das, S., A. Banerji, et al. (2008). "Rapid expression and activation of MMP-2 and MMP-9 upon exposure of human breast cancer cells (MCF-7) to fibronectin in serum free medium." <u>Life Sci</u> **82**(9-10): 467-476.

Das, S. and B. Seitz (2008). "Recurrent corneal erosion syndrome." Surv Ophthalmol 53(1): 3-15.

Dawson, D. G., J. L. Ubels, et al. (2011). Cornea and Sclera. <u>In: Adler's physiology of the eye (11th Edition)</u>. P. L. Kaufman, A. Alm, et al. Edinburgh, Saunders/Elsevier: p. 71-130.

Daya, S. M. and F. A. Ilari (2001). "Living related conjunctival limbal allograft for the treatment of stem cell deficiency." <u>Ophthalmology</u> **108**(1): 126-133; discussion 133-124.

De Nigris, F., C. Botti, et al. (2007). "Cooperation between Myc and YY1 provides novel silencing transcriptional targets of alpha3beta1-integrin in tumour cells." <u>Oncogene</u> **26**(3): 382-394.

Delcommenne, M. and C. H. Streuli (1995). "Control of integrin expression by extracellular matrix." J Biol Chem **270**(45): 26794-26801.

DelMonte, D. W. and T. Kim (2011). "Anatomy and physiology of the cornea." <u>J Cataract Refract</u> Surg **37**(3): 588-598.

Delon, I. and N. H. Brown (2007). "Integrins and the actin cytoskeleton." <u>Curr Opin Cell Biol</u> **19**(1): 43-50.

Denda, S., U. Muller, et al. (1998). "Utilization of a soluble integrin-alkaline phosphatase chimera to characterize integrin alpha 8 beta 1 receptor interactions with tenascin: murine alpha 8 beta 1 binds to the RGD site in tenascin-C fragments, but not to native tenascin-C." <u>Biochemistry</u> **37**(16): 5464-5474.

Derijard, B., M. Hibi, et al. (1994). "JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain." <u>Cell</u> **76**(6): 1025-1037.

Deryugina, E. I. and J. P. Quigley (2012). "Cell surface remodeling by plasmin: a new function for an old enzyme." J Biomed Biotechnol **2012**: 564259.

Deshpande, P., M. Notara, et al. (2009). "Development of a surface-modified contact lens for the transfer of cultured limbal epithelial cells to the cornea for ocular surface diseases." <u>Tissue Eng Part</u> <u>A</u> 15(10): 2889-2902.

Di Cera, E. (2009). "Serine proteases." <u>IUBMB Life</u> 61(5): 510-515.

Di Girolamo, N., M. Bosch, et al. (2009). "A contact lens-based technique for expansion and transplantation of autologous epithelial progenitors for ocular surface reconstruction." <u>Transplantation</u> **87**(10): 1571-1578.

Dieckow, J. and P. Argüeso (2013). The Human Tear Film. <u>In: Ocular surface : anatomy and physiology, disorders and therapeutic care</u>. R. M. Herranz and R. M. Corrales Herran. Boca Raton, FL, CRC Press: p. 22-31.

Dilly, P. N. (1994). Structure and Function of the Tear Film. <u>In: Lacrimal Gland, Tear Film, and</u> <u>Dry Eye Syndromes (Advances in Experimental Medicine and Biology)</u>. D. A. Sullivan. New York City, Springer US. **350:** p. 239-247.

Doane, K. J., G. Yang, et al. (1992). "Corneal cell-matrix interactions: type VI collagen promotes adhesion and spreading of corneal fibroblasts." <u>Exp Cell Res</u> **200**(2): 490-499.

Doillon, C. J., M. A. Watsky, et al. (2003). "A collagen-based scaffold for a tissue engineered human cornea: physical and physiological properties." Int J Artif Organs **26**(8): 764-773.

Donahue, J. P., N. Sugg, et al. (1994). "The integrin alpha v gene: identification and characterization of the promoter region." <u>Biochim Biophys Acta</u> **1219**(1): 228-232.

Dravida, S., S. Gaddipati, et al. (2008). "A biomimetic scaffold for culturing limbal stem cells: a promising alternative for clinical transplantation." <u>J Tissue Eng Regen Med</u> **2**(5): 263-271.

Du, X. L., D. Edelstein, et al. (2000). "Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **97**(22): 12222-12226.

Dua, H. S. (1998). "The conjunctiva in corneal epithelial wound healing." <u>Br J Ophthalmol</u> **82**(12): 1407-1411.

Dua, H. S. and A. Azuara-Blanco (2000). "Limbal stem cells of the corneal epithelium." <u>Surv</u> <u>Ophthalmol</u> 44(5): 415-425.

Dua, H. S. and J. V. Forrester (1987). "Clinical patterns of corneal epithelial wound healing." <u>Am J</u> <u>Ophthalmol</u> **104**(5): 481-489.

Dua, H. S. and J. V. Forrester (1990). "The corneoscleral limbus in human corneal epithelial wound healing." <u>Am J Ophthalmol</u> **110**(6): 646-656.

Dua, H. S., J. A. Gomes, et al. (1994). "Corneal epithelial wound healing." <u>Br J Ophthalmol</u> 78(5): 401-408.

Dua, H. S., V. A. Shanmuganathan, et al. (2005). "Limbal epithelial crypts: a novel anatomical structure and a putative limbal stem cell niche." <u>Br J Ophthalmol</u> **89**(5): 529-532.

Dumin, J. A., S. K. Dickeson, et al. (2001). "Pro-collagenase-1 (matrix metalloproteinase-1) binds the alpha(2)beta(1) integrin upon release from keratinocytes migrating on type I collagen." <u>J Biol</u> <u>Chem</u> **276**(31): 29368-29374.

Duncan, M. K., Z. Kozmik, et al. (2000). "Overexpression of PAX6(5a) in lens fiber cells results in cataract and upregulation of (alpha)5(beta)1 integrin expression." J Cell Sci 113 (Pt 18): 3173-3185.

Durbeej, M. (2010). "Laminins." Cell Tissue Res 339(1): 259-268.

Dusserre, Y. and N. Mermod (1992). "Purified cofactors and histone H1 mediate transcriptional regulation by CTF/NF-I." <u>Mol Cell Biol</u> **12**(11): 5228-5237.

Duval, C., M. Gaudreault, et al. (2012). "Rescue of the transcription factors Sp1 and NFI in human skin keratinocytes through a feeder-layer-dependent suppression of the proteasome activity." <u>J Mol Biol</u> **418**(5): 281-299.

Duval, C., K. Zaniolo, et al. (2015). "Characterization of the human alpha9 integrin subunit gene: Promoter analysis and transcriptional regulation in ocular cells." <u>Exp Eye Res</u> **135**: 146-163.

Dyrlund, T. F., E. T. Poulsen, et al. (2012). "Human cornea proteome: identification and quantitation of the proteins of the three main layers including epithelium, stroma, and endothelium." J Proteome Res 11(8): 4231-4239.

Ebato, B., J. Friend, et al. (1987). "Comparison of central and peripheral human corneal epithelium in tissue culture." <u>Invest Ophthalmol Vis Sci</u> **28**(9): 1450-1456.

Eberhardt, W., A. Huwiler, et al. (2000). "Amplification of IL-1 beta-induced matrix metalloproteinase-9 expression by superoxide in rat glomerular mesangial cells is mediated by increased activities of NF-kappa B and activating protein-1 and involves activation of the mitogenactivated protein kinase pathways." J Immunol 165(10): 5788-5797.

Ebihara, N., H. Mizushima, et al. (2000). "The functions of exogenous and endogenous laminin-5 on corneal epithelial cells." <u>Exp Eye Res</u> **71**(1): 69-79.

Eble, J. A., K. W. Wucherpfennig, et al. (1998). "Recombinant soluble human alpha 3 beta 1 integrin: purification, processing, regulation, and specific binding to laminin-5 and invasin in a mutually exclusive manner." <u>Biochemistry</u> **37**(31): 10945-10955.

Edelhauser, H. F. (2006). "The balance between corneal transparency and edema: the Proctor Lecture." <u>Invest Ophthalmol Vis Sci</u> 47(5): 1754-1767.

Eferl, R. and E. F. Wagner (2003). "AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis." <u>Nat Rev Cancer</u> **3**(11): 859-868.

Ehlers, N. (1965). "The Precorneal Film. Biomicroscopical, Histological and Chemical Investigations." <u>Acta Ophthalmol Suppl</u>: SUPPL 81:81-134.

Ehlers, N. and J. Hjortdal (2005). The Cornea: Epithelium and Stroma. <u>In: Advances in Organ</u> <u>Biology</u>. J. Fischbarg. Amsterdam, Elsevier. **10:** p. 83-111. Elices, M. J. and M. E. Hemler (1989). "The human integrin VLA-2 is a collagen receptor on some cells and a collagen/laminin receptor on others." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **86**(24): 9906-9910.

Elices, M. J., L. A. Urry, et al. (1991). "Receptor functions for the integrin VLA-3: fibronectin, collagen, and laminin binding are differentially influenced by Arg-Gly-Asp peptide and by divalent cations." J Cell Biol **112**(1): 169-181.

Elisseeff, J., M. G. Madrid, et al. (2013). "Future perspectives for regenerative medicine in ophthalmology." <u>Middle East Afr J Ophthalmol **20**(1): 38-45</u>.

Ellis, V. (2003). Plasminogen Activators: Structure and Function. <u>In: Plasminogen : Structure,</u> <u>Activation, and Regulation</u>. D. M. Waisman, Springer US, New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers: p. 19-45.

Er, H. and E. Uzmez (1998). "Effects of transforming growth factor-beta 2, interleukin 6 and fibronectin on corneal epithelial wound healing." <u>Eur J Ophthalmol</u> **8**(4): 224-229.

Espana, E. M., M. Di Pascuale, et al. (2004). "Keratolimbal allograft in corneal reconstruction." Eye (Lond) **18**(4): 406-417.

Espana, E. M., S. E. Ti, et al. (2003). "Corneal stromal changes following reconstruction by ex vivo expanded limbal epithelial cells in rabbits with total limbal stem cell deficiency." <u>Br J Ophthalmol</u> **87**(12): 1509-1514.

Esparza, J., C. Vilardell, et al. (1999). "Fibronectin upregulates gelatinase B (MMP-9) and induces coordinated expression of gelatinase A (MMP-2) and its activator MT1-MMP (MMP-14) by human T lymphocyte cell lines. A process repressed through RAS/MAP kinase signaling pathways." <u>Blood</u> **94**(8): 2754-2766.

Estey, T., Y. Chen, et al. (2010). "Structural and functional modifications of corneal crystallin ALDH3A1 by UVB light." <u>PLoS One</u> **5**(12): e15218.

Fagerholm, P. (2003). "Phototherapeutic keratectomy: 12 years of experience." <u>Acta Ophthalmol</u> <u>Scand</u> **81**(1): 19-32.

Fagerholm, P., N. S. Lagali, et al. (2010). "A biosynthetic alternative to human donor tissue for inducing corneal regeneration: 24-month follow-up of a phase 1 clinical study." <u>Sci Transl Med</u> 2(46): 46ra61.

Fagerholm, P., N. S. Lagali, et al. (2014). "Stable corneal regeneration four years after implantation of a cell-free recombinant human collagen scaffold." <u>Biomaterials</u> **35**(8): 2420-2427.

Farjo, A. A., M. V. Brumm, et al. (2014). Corneal Anatomy, Physiology, and Wound Healing. <u>In:</u> <u>Ophthalmology (4th Edition)</u>. M. Yanoff and J. S. Duker. Philadelphia, Saunders Elsevier: p. 163-167.

Filenius, S., M. Hormia, et al. (2001). "Laminin synthesis and the adhesion characteristics of immortalized human corneal epithelial cells to laminin isoforms." <u>Exp Eye Res</u> **72**(1): 93-103.

Fini, M. E. (1999). "Keratocyte and fibroblast phenotypes in the repairing cornea." <u>Prog Retin Eye</u> <u>Res</u> **18**(4): 529-551.

Fini, M. E., J. D. Bartlett, et al. (1994). "The rabbit gene for 92-kDa matrix metalloproteinase. Role of AP1 and AP2 in cell type-specific transcription." <u>J Biol Chem</u> **269**(46): 28620-28628.

Fini, M. E., J. R. Cook, et al. (1998b). "Proteolytic mechanisms in corneal ulceration and repair." Arch Dermatol Res **290 Suppl**: S12-23.

Fini, M. E., J. R. Cook, et al. (1998a). Regulation of Matrix Metalloproteinase Gene Expression. <u>In:</u> <u>Matrix Metalloproteinases</u>. W. C. Parks and R. P. Mecham. San Diego, Academic Press: p. 299-356.

Fini, M. E., W. C. Parks, et al. (1996). "Role of matrix metalloproteinases in failure to reepithelialize after corneal injury." <u>Am J Pathol</u> **149**(4): 1287-1302.

Fini, M. E. and B. M. Stramer (2005). "How the cornea heals: cornea-specific repair mechanisms affecting surgical outcomes." <u>Cornea</u> 24(8 Suppl. 1): S2-S11.

Fischbarg, J. (2003). "On the mechanism of fluid transport across corneal endothelium and epithelia in general." J Exp Zool A Comp Exp Biol **300**(1): 30-40.

Fischbarg, J. (2005). The Corneal Endothelium. <u>In: Advances in Organ Biology</u>. J. Fischbarg. Amsterdam, Elsevier. **10:** p. 113-125.

Fogerty, F. J., S. K. Akiyama, et al. (1990). "Inhibition of binding of fibronectin to matrix assembly sites by anti-integrin (alpha 5 beta 1) antibodies." <u>J Cell Biol</u> **111**(2): 699-708.

Fojas de Borja, P., N. K. Collins, et al. (2001). "Cyclin A-CDK phosphorylates Sp1 and enhances Sp1-mediated transcription." <u>EMBO J</u> **20**(20): 5737-5747.

Folgueras, A. R., A. M. Pendas, et al. (2004). "Matrix metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies." Int J Dev Biol **48**(5-6): 411-424.

Fong, Y. C., S. F. Hsu, et al. (2009). "Transforming growth factor-beta1 increases cell migration and beta1 integrin up-regulation in human lung cancer cells." <u>Lung Cancer</u> **64**(1): 13-21.

Foreman, D. M., S. Pancholi, et al. (1996). "A simple organ culture model for assessing the effects of growth factors on corneal re-epithelialization." <u>Exp Eye Res</u> **62**(5): 555-564.

Forsyth, C. B., J. Pulai, et al. (2002). "Fibronectin fragments and blocking antibodies to alpha2beta1 and alpha5beta1 integrins stimulate mitogen-activated protein kinase signaling and increase collagenase 3 (matrix metalloproteinase 13) production by human articular chondrocytes." <u>Arthritis Rheum</u> **46**(9): 2368-2376.

Foster, A. and S. Resnikoff (2005). "The impact of Vision 2020 on global blindness." Eye (Lond) **19**(10): 1133-1135.

Francis, D., K. Abberton, et al. (2009). "Myogel supports the ex-vivo amplification of corneal epithelial cells." <u>Exp Eye Res</u> **88**(3): 339-346.

Frantz, C., K. M. Stewart, et al. (2010). "The extracellular matrix at a glance." <u>J Cell Sci</u> **123**(Pt 24): 4195-4200.

Fu, Y., X. Fan, et al. (2010). "Reconstruction of a tissue-engineered cornea with porcine corneal acellular matrix as the scaffold." <u>Cells Tissues Organs</u> **191**(3): 193-202.

Fujikawa, L. S., C. S. Foster, et al. (1984). "Basement membrane components in healing rabbit corneal epithelial wounds: immunofluorescence and ultrastructural studies." <u>J Cell Biol</u> **98**(1): 128-138.

Fukuda, H., N. Sano, et al. (2006). "Simple histone acetylation plays a complex role in the regulation of gene expression." <u>Brief Funct Genomic Proteomic</u> **5**(3): 190-208.

Fukunaga, R. and T. Hunter (1997). "MNK1, a new MAP kinase-activated protein kinase, isolated by a novel expression screening method for identifying protein kinase substrates." <u>EMBO J</u> **16**(8): 1921-1933.

Funderburgh, J. L., M. L. Funderburgh, et al. (2001). "Proteoglycan expression during transforming growth factor beta -induced keratocyte-myofibroblast transdifferentiation." J Biol Chem 276(47): 44173-44178.

Funderburgh, J. L., M. M. Mann, et al. (2003). "Keratocyte phenotype mediates proteoglycan structure: a role for fibroblasts in corneal fibrosis." J Biol Chem **278**(46): 45629-45637.

Gagnoux-Palacios, L., M. Allegra, et al. (2001). "The short arm of the laminin gamma2 chain plays a pivotal role in the incorporation of laminin 5 into the extracellular matrix and in cell adhesion." J Cell Biol **153**(4): 835-850.

Gahmberg, C. G., L. Valmu, et al. (1998). "Leukocyte integrins and inflammation." <u>Cell Mol Life</u> <u>Sci 54(6)</u>: 549-555.

Gailit, J., M. P. Welch, et al. (1994). "TGF-beta 1 stimulates expression of keratinocyte integrins during re-epithelialization of cutaneous wounds." J Invest Dermatol **103**(2): 221-227.

Galliano, M. F., D. Aberdam, et al. (1995). "Cloning and complete primary structure of the mouse laminin alpha 3 chain. Distinct expression pattern of the laminin alpha 3A and alpha 3B chain isoforms." J Biol Chem **270**(37): 21820-21826.

Gao, B., H. Jaffe, et al. (1998). "Histone H1 isoforms purified from rat liver bind nonspecifically to the nuclear factor 1 recognition sequence and serve as generalized transcriptional repressors." <u>Mol</u> <u>Cell Biochem</u> **178**(1-2): 187-196.

Gao, B., L. Jiang, et al. (1996). "Transcriptional regulation of alpha(1b) adrenergic receptors (alpha(1b)AR) by nuclear factor 1 (NF1): a decline in the concentration of NF1 correlates with the downregulation of alpha(1b)AR gene expression in regenerating liver." <u>Mol Cell Biol</u> **16**(11): 5997-6008.

Gao, B. and G. Kunos (1998). "Cell type-specific transcriptional activation and suppression of the alpha1B adrenergic receptor gene middle promoter by nuclear factor 1." J Biol Chem 273(48): 31784-31787.

Garana, R. M., W. M. Petroll, et al. (1992). "Radial keratotomy. II. Role of the myofibroblast in corneal wound contraction." <u>Invest Ophthalmol Vis Sci</u> **33**(12): 3271-3282.

Rapport-gratuit.com

Le numero 1 mondial du mémoires

Garcia-Alvarez, B., J. M. de Pereda, et al. (2003). "Structural determinants of integrin recognition by talin." <u>Mol Cell</u> **11**(1): 49-58.

Garg, P., P. V. Krishna, et al. (2005). "The value of corneal transplantation in reducing blindness." <u>Eye (Lond)</u> **19**(10): 1106-1114.

Gartel, A. L. and K. Shchors (2003). "Mechanisms of c-myc-mediated transcriptional repression of growth arrest genes." <u>Exp Cell Res</u> 283(1): 17-21.

Garzon, I., M. A. Martin-Piedra, et al. (2014). "Generation of a biomimetic human artificial cornea model using Wharton's jelly mesenchymal stem cells." <u>Invest Ophthalmol Vis Sci</u> 55(7): 4073-4083.

Gatinel, D. and T. Hoang-Xuan (2000). "[Limbal stem cell deficiency]." J Fr Ophtalmol 23(7): 718-728.

Gaudreault, M., P. Carrier, et al. (2003). "Influence of sp1/sp3 expression on corneal epithelial cells proliferation and differentiation properties in reconstructed tissues." <u>Invest Ophthalmol Vis Sci</u> **44**(4): 1447-1457.

Gaudreault, M., F. Vigneault, et al. (2008). "Transcriptional regulation of the human alpha6 integrin gene by the transcription factor NFI during corneal wound healing." <u>Invest Ophthalmol Vis Sci</u> **49**(9): 3758-3767.

Gaudreault, M., F. Vigneault, et al. (2007). "Laminin reduces expression of the human alpha6 integrin subunit gene by altering the level of the transcription factors Sp1 and Sp3." <u>Invest</u> <u>Ophthalmol Vis Sci</u> **48**(8): 3490-3505.

Gebhardt, A., M. Frye, et al. (2006). "Myc regulates keratinocyte adhesion and differentiation via complex formation with Miz1." <u>J Cell Biol</u> **172**(1): 139-149.

Geer, D. J., D. D. Swartz, et al. (2002). "Fibrin promotes migration in a three-dimensional in vitro model of wound regeneration." <u>Tissue Eng</u> **8**(5): 787-798.

Geer, D. J., D. D. Swartz, et al. (2004). "In vivo model of wound healing based on transplanted tissue-engineered skin." <u>Tissue Eng</u> **10**(7-8): 1006-1017.

Geesin, J. C., D. Darr, et al. (1988). "Ascorbic acid specifically increases type I and type III procollagen messenger RNA levels in human skin fibroblast." J Invest Dermatol **90**(4): 420-424.

Geiger, B., J. P. Spatz, et al. (2009). "Environmental sensing through focal adhesions." <u>Nat Rev</u> <u>Mol Cell Biol</u> **10**(1): 21-33.

Gelse, K., E. Poschl, et al. (2003). "Collagens--structure, function, and biosynthesis." <u>Adv Drug</u> <u>Deliv Rev</u> 55(12): 1531-1546.

Germain, L., F. A. Auger, et al. (1999). "Reconstructed human cornea produced in vitro by tissue engineering." <u>Pathobiology</u> 67(3): 140-147.

Germain, L., P. Carrier, et al. (2000). "Can we produce a human corneal equivalent by tissue engineering?" <u>Prog Retin Eye Res</u> **19**(5): 497-527.

Germain, L., C. J. Giasson, et al. (2004). Tissue engineering of human cornea. <u>In: Encyclopedia of biomaterials and biomedical engineering</u>. G. E. Wnek and G. L. Bowlin. New York, Marcel Dekker: p. 1534-1544.

Geroski, D. H., M. Matsuda, et al. (1985). "Pump function of the human corneal endothelium. Effects of age and cornea guttata." <u>Ophthalmology</u> **92**(6): 759-763.

Giancotti, F. G. (2000). "Complexity and specificity of integrin signalling." <u>Nat Cell Biol</u> 2(1): E13-14.

Giancotti, F. G. and E. Ruoslahti (1999). "Integrin signaling." Science 285(5430): 1028-1032.

Giannelli, G., J. Falk-Marzillier, et al. (1997). "Induction of cell migration by matrix metalloprotease-2 cleavage of laminin-5." <u>Science</u> **277**(5323): 225-228.

Giasson, C. J., A. Deschambeault, et al. (2014). "Adherens junction proteins are expressed in collagen corneal equivalents produced in vitro with human cells." <u>Mol Vis</u> **20**: 386-394.

Gidoni, D., J. T. Kadonaga, et al. (1985). "Bidirectional SV40 transcription mediated by tandem Sp1 binding interactions." <u>Science</u> **230**(4725): 511-517.

Giglioni, B., P. Comi, et al. (1989). "The same nuclear proteins bind the proximal CACCC box of the human beta-globin promoter and a similar sequence in the enhancer." <u>Biochem Biophys Res</u> <u>Commun</u> **164**(1): 149-155.

Gils, A. and P. J. Declerck (2003). Plasminogen Activators Inhibitors. <u>In: Plasminogen: Structure</u>, <u>Activation, and Regulation</u>. D. M. Waisman, Springer US, New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers: p. 47-66.

Gingras, M. E., K. Larouche, et al. (2003). "Regulation of the integrin subunit alpha5 gene promoter by the transcription factors Sp1/Sp3 is influenced by the cell density in rabbit corneal epithelial cells." <u>Invest Ophthalmol Vis Sci</u> 44(9): 3742-3755.

Gingras, M. E., B. Masson-Gadais, et al. (2009). "Differential binding of the transcription factors Sp1, AP-1, and NFI to the promoter of the human alpha5 integrin gene dictates its transcriptional activity." <u>Invest Ophthalmol Vis Sci</u> **50**(1): 57-67.

Gioia, M., S. Monaco, et al. (2009). "The collagen binding domain of gelatinase A modulates degradation of collagen IV by gelatinase B." <u>J Mol Biol</u> **386**(2): 419-434.

Gipson, I. K. (1992). "Adhesive mechanisms of the corneal epithelium." <u>Acta Ophthalmol</u> <u>Suppl(202)</u>: 13-17.

Gipson, I. K. and P. Argueso (2003). "Role of mucins in the function of the corneal and conjunctival epithelia." Int Rev Cytol **231**: 1-49.

Gipson, I. K., S. Spurr-Michaud, et al. (1993a). "Redistribution of the hemidesmosome components alpha 6 beta 4 integrin and bullous pemphigoid antigens during epithelial wound healing." <u>Exp Cell</u> <u>Res</u> **207**(1): 86-98.

Gipson, I. K., S. J. Spurr-Michaud, et al. (1987). "Anchoring fibrils form a complex network in human and rabbit cornea." <u>Invest Ophthalmol Vis Sci</u> **28**(2): 212-220.

Gipson, I. K., H. Watanabe, et al. (1993b). "Corneal wound healing and fibronectin." Int Ophthalmol Clin **33**(4): 149-163.

Girard, M. T., M. Matsubara, et al. (1991). "Transforming growth factor-beta and interleukin-1 modulate metalloproteinase expression by corneal stromal cells." <u>Invest Ophthalmol Vis Sci</u> **32**(9): 2441-2454.

Girard, M. T., M. Matsubara, et al. (1993). "Stromal fibroblasts synthesize collagenase and stromelysin during long-term tissue remodeling." <u>J Cell Sci</u> **104 (Pt 4)**: 1001-1011.

Goksoy, E., Y. Q. Ma, et al. (2008). "Structural basis for the autoinhibition of talin in regulating integrin activation." <u>Mol Cell</u> **31**(1): 124-133.

Goldberg, M. F. and A. J. Bron (1982). "Limbal palisades of Vogt." <u>Trans Am Ophthalmol Soc</u> 80: 155-171.

Goldfinger, L. E., S. B. Hopkinson, et al. (1999). "The alpha3 laminin subunit, alpha6beta4 and alpha3beta1 integrin coordinately regulate wound healing in cultured epithelial cells and in the skin." <u>J Cell Sci</u> **112** (Pt 16): 2615-2629.

Goldfinger, L. E., M. S. Stack, et al. (1998). "Processing of laminin-5 and its functional consequences: role of plasmin and tissue-type plasminogen activator." J Cell Biol 141(1): 255-265.

Gomaa, A., O. Comyn, et al. (2010). "Keratoprostheses in clinical practice - a review." <u>Clin</u> <u>Experiment Ophthalmol</u> **38**(2): 211-224.

Gomes, J. A., B. Geraldes Monteiro, et al. (2010). "Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of human immature dental pulp stem cells." <u>Invest Ophthalmol Vis Sci</u> **51**(3): 1408-1414.

Gomez, D. E., D. F. Alonso, et al. (1997). "Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions." <u>Eur J Cell Biol</u> 74(2): 111-122.

Gomis-Ruth, F. X., K. Maskos, et al. (1997). "Mechanism of inhibition of the human matrix metalloproteinase stromelysin-1 by TIMP-1." <u>Nature</u> **389**(6646): 77-81.

Gordon, G. M., J. S. Austin, et al. (2011). "Comprehensive gene expression profiling and functional analysis of matrix metalloproteinases and TIMPs, and identification of ADAM-10 gene expression, in a corneal model of epithelial resurfacing." <u>J Cell Physiol</u> **226**(6): 1461-1470.

Gordon, G. M., D. R. Ledee, et al. (2009). "Cytokines and signaling pathways regulating matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) expression in corneal epithelial cells." <u>J Cell Physiol</u> **221**(2): 402-411.

Gordon, M. K. and R. A. Hahn (2010). "Collagens." Cell Tissue Res 339(1): 247-257.

Grant, M. B., P. T. Khaw, et al. (1992). "Effects of epidermal growth factor, fibroblast growth factor, and transforming growth factor-beta on corneal cell chemotaxis." <u>Invest Ophthalmol Vis Sci</u> **33**(12): 3292-3301.

Griffith, M., M. Hakim, et al. (2002). "Artificial human corneas: scaffolds for transplantation and host regeneration." <u>Cornea</u> **21**(7 Suppl. 2): S54-61.

Griffith, M. and D. G. Harkin (2014). "Recent advances in the design of artificial corneas." <u>Curr</u> <u>Opin Ophthalmol</u> **25**(3): 240-247.

Griffith, M., W. B. Jackson, et al. (2009). "Artificial corneas: a regenerative medicine approach." Eve (Lond) 23(10): 1985-1989.

Griffith, M., R. Osborne, et al. (1999). "Functional human corneal equivalents constructed from cell lines." <u>Science</u> **286**(5447): 2169-2172.

Griffith, M., N. Polisetti, et al. (2012). "Regenerative approaches as alternatives to donor allografting for restoration of corneal function." <u>Ocul Surf</u> 10(3): 170-183.

Grinstein, E., F. Jundt, et al. (2002). "Sp1 as G1 cell cycle phase specific transcription factor in epithelial cells." <u>Oncogene</u> **21**(10): 1485-1492.

Gronostajski, R. M. (1986). "Analysis of nuclear factor I binding to DNA using degenerate oligonucleotides." <u>Nucleic Acids Res</u> 14(22): 9117-9132.

Gronostajski, R. M. (2000). "Roles of the NFI/CTF gene family in transcription and development." <u>Gene</u> **249**(1-2): 31-45.

Gronostajski, R. M., S. Adhya, et al. (1985). "Site-specific DNA binding of nuclear factor I: analyses of cellular binding sites." <u>Mol Cell Biol</u> **5**(5): 964-971.

Gronostajski, R. M., K. Nagata, et al. (1984). "Isolation of human DNA sequences that bind to nuclear factor I, a host protein involved in adenovirus DNA replication." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **81**(13): 4013-4017.

Grueterich, M., E. M. Espana, et al. (2003). "Ex vivo expansion of limbal epithelial stem cells: amniotic membrane serving as a stem cell niche." <u>Surv Ophthalmol</u> **48**(6): 631-646.

Grunder, A., F. Qian, et al. (2003). "Genomic organization, splice products and mouse chromosomal localization of genes for transcription factor Nuclear Factor One." <u>Gene</u> **304**: 171-181.

Grushkin-Lerner, L. S., R. Kewalramani, et al. (1997). "Expression of integrin receptors on plasma membranes of primary corneal epithelial cells is matrix specific." <u>Exp Eye Res</u> **64**(3): 323-334.

Guan, J. L. and R. O. Hynes (1990). "Lymphoid cells recognize an alternatively spliced segment of fibronectin via the integrin receptor alpha 4 beta 1." <u>Cell</u> **60**(1): 53-61.

Guillemette, M. D., B. Cui, et al. (2009). "Surface topography induces 3D self-orientation of cells and extracellular matrix resulting in improved tissue function." Integr Biol (Camb) 1(2): 196-204.

Guo, X., A. E. Hutcheon, et al. (2007). "Morphologic characterization of organized extracellular matrix deposition by ascorbic acid-stimulated human corneal fibroblasts." <u>Invest Ophthalmol Vis</u> <u>Sci</u> **48**(9): 4050-4060.

Guo, X., A. E. Hutcheon, et al. (2004). "TAT-mediated protein transduction into human corneal epithelial cells: p15(INK4b) inhibits cell proliferation and stimulates cell migration." <u>Invest</u> <u>Ophthalmol Vis Sci</u> **45**(6): 1804-1811.

Gupta, S., D. Campbell, et al. (1995). "Transcription factor ATF2 regulation by the JNK signal transduction pathway." <u>Science</u> **267**(5196): 389-393.

Hackworth, L. A., F. Faraji-Shadan, et al. (1990). "Serum-free culture of porcine and rabbit corneal epithelial cells." <u>Curr Eye Res</u> **9**(9): 919-923.

Haddad, A. and S. J. Faria-e-Sousa (2014). "Maintenance of the corneal epithelium is carried out by germinative cells of its basal stratum and not by presumed stem cells of the limbus." <u>Braz J Med Biol Res</u> **47**(6): 470-477.

Haenssen, K. K., S. A. Caldwell, et al. (2010). "ErbB2 requires integrin alpha5 for anoikis resistance via Src regulation of receptor activity in human mammary epithelial cells." <u>J Cell Sci</u> **123**(Pt 8): 1373-1382.

Hahnel, C., S. Somodi, et al. (2000). "The keratocyte network of human cornea: a three-dimensional study using confocal laser scanning fluorescence microscopy." <u>Cornea</u> **19**(2): 185-193.

Hai, T. and T. Curran (1991). "Cross-family dimerization of transcription factors Fos/Jun and ATF/CREB alters DNA binding specificity." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **88**(9): 3720-3724.

Hamada, R., J. P. Giraud, et al. (1972). "[Analytical and statistical study of the lamellae, keratocytes and collagen fibrils of the central region of the normal human cornea. (Light and electron microscopy)]." <u>Arch Ophtalmol Rev Gen Ophtalmol 32(8)</u>: 563-570.

Han, B., I. R. Schwab, et al. (2002). "A fibrin-based bioengineered ocular surface with human corneal epithelial stem cells." <u>Cornea</u> **21**(5): 505-510.

Han, I. and J. E. Kudlow (1997). "Reduced O glycosylation of Sp1 is associated with increased proteasome susceptibility." <u>Mol Cell Biol</u> **17**(5): 2550-2558.

Han, S., J. D. Ritzenthaler, et al. (2006). "Fibronectin increases matrix metalloproteinase 9 expression through activation of c-Fos via extracellular-regulated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase pathways in human lung carcinoma cells." J Biol Chem **281**(40): 29614-29624.

Han, S., H. N. Rivera, et al. (2005). "Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands inhibit alpha5 integrin gene transcription in non-small cell lung carcinoma cells." <u>Am J Respir Cell</u> <u>Mol Biol</u> **32**(4): 350-359.

Han, S. and J. Roman (2005). "COX-2 inhibitors suppress integrin alpha5 expression in human lung carcinoma cells through activation of Erk: involvement of Sp1 and AP-1 sites." Int J Cancer **116**(4): 536-546.

Hanna, C. (1966). "Proliferation and migration of epithelial cells during corneal wound repair in the rabbit and the rat." <u>Am J Ophthalmol 61(1)</u>: 55-63.

Hanna, C., D. S. Bicknell, et al. (1961). "Cell turnover in the adult human eye." <u>Arch Ophthalmol</u> **65**: 695-698.

Hanna-Rose, W. and U. Hansen (1996). "Active repression mechanisms of eukaryotic transcription repressors." <u>Trends Genet</u> **12**(6): 229-234.
Hansen, S. K., C. Nerlov, et al. (1992). "A novel complex between the p65 subunit of NF-kappa B and c-Rel binds to a DNA element involved in the phorbol ester induction of the human urokinase gene." <u>EMBO J 11(1)</u>: 205-213.

Harburger, D. S., M. Bouaouina, et al. (2009). "Kindlin-1 and -2 directly bind the C-terminal region of beta integrin cytoplasmic tails and exert integrin-specific activation effects." J Biol Chem **284**(17): 11485-11497.

Harburger, D. S. and D. A. Calderwood (2009). "Integrin signalling at a glance." <u>J Cell Sci</u> **122**(Pt 2): 159-163.

Hardarson, T., C. Hanson, et al. (2004). "Time-lapse recordings of human corneal epithelial healing." <u>Acta Ophthalmol Scand</u> 82(2): 184-188.

Harkin, D. G., K. A. George, et al. (2011). "Silk fibroin in ocular tissue reconstruction." <u>Biomaterials</u> **32**(10): 2445-2458.

Harrison, C. A., M. J. Heaton, et al. (2006). "Use of an in vitro model of tissue-engineered human skin to study keratinocyte attachment and migration in the process of reepithelialization." <u>Wound Repair Regen</u> 14(2): 203-209.

Hassell, J. R. and D. E. Birk (2010). "The molecular basis of corneal transparency." <u>Exp Eye Res</u> **91**(3): 326-335.

Hassell, J. R., C. Cintron, et al. (1983). "Proteoglycan changes during restoration of transparency in corneal scars." <u>Arch Biochem Biophys</u> **222**(2): 362-369.

Hata, R. and H. Senoo (1989). "L-ascorbic acid 2-phosphate stimulates collagen accumulation, cell proliferation, and formation of a three-dimensional tissuelike substance by skin fibroblasts." <u>J Cell Physiol</u> **138**(1): 8-16.

Hayward, C. J., J. Fradette, et al. (2013). "Harvesting the potential of the human umbilical cord: isolation and characterisation of four cell types for tissue engineering applications." <u>Cells Tissues</u> Organs **197**(1): 37-54.

He, C. S., S. M. Wilhelm, et al. (1989). "Tissue cooperation in a proteolytic cascade activating human interstitial collagenase." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(8): 2632-2636.

Heino, J. (2000). "The collagen receptor integrins have distinct ligand recognition and signaling functions." <u>Matrix Biol</u> **19**(4): 319-323.

Heino, J., R. A. Ignotz, et al. (1989). "Regulation of cell adhesion receptors by transforming growth factor-beta. Concomitant regulation of integrins that share a common beta 1 subunit." J Biol Chem **264**(1): 380-388.

Heino, J. and J. Massague (1989). "Transforming growth factor-beta switches the pattern of integrins expressed in MG-63 human osteosarcoma cells and causes a selective loss of cell adhesion to laminin." J Biol Chem **264**(36): 21806-21811.

Heit, C., B. C. Jackson, et al. (2013). "Update of the human and mouse SERPIN gene superfamily." <u>Hum Genomics</u> 7: 22.

Hemler, M. E., M. J. Elices, et al. (1990). "Multiple ligand binding functions for VLA-2 (alpha 2 beta 1) and VLA-3 (alpha 3 beta 1) in the integrin family." <u>Cell Differ Dev</u> **32**(3): 229-238.

Henry, M. D. and K. P. Campbell (1998). "A role for dystroglycan in basement membrane assembly." <u>Cell</u> **95**(6): 859-870.

Henry, M. D., J. S. Satz, et al. (2001). "Distinct roles for dystroglycan, beta1 integrin and perlecan in cell surface laminin organization." <u>J Cell Sci</u> **114**(Pt 6): 1137-1144.

Herkert, B. and M. Eilers (2010). "Transcriptional repression: the dark side of myc." <u>Genes Cancer</u> 1(6): 580-586.

Herold, S., M. Wanzel, et al. (2002). "Negative regulation of the mammalian UV response by Myc through association with Miz-1." <u>Mol Cell</u> **10**(3): 509-521.

Hess, J., P. Angel, et al. (2004). "AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings." <u>J Cell Sci</u> **117**(Pt 25): 5965-5973.

Hibi, M., A. Lin, et al. (1993). "Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain." <u>Genes Dev</u> 7(11): 2135-2148.

Higa, K., S. Shimmura, et al. (2005). "Melanocytes in the corneal limbus interact with K19-positive basal epithelial cells." Exp Eye Res **81**(2): 218-223.

Hill, C. S. and R. Treisman (1995). "Transcriptional regulation by extracellular signals: mechanisms and specificity." <u>Cell</u> **80**(2): 199-211.

Hintermann, E. and V. Quaranta (2004). "Epithelial cell motility on laminin-5: regulation by matrix assembly, proteolysis, integrins and erbB receptors." <u>Matrix Biol</u> **23**(2): 75-85.

Hirsch, M., G. Prenant, et al. (2001). "Three-dimensional supramolecular organization of the extracellular matrix in human and rabbit corneal stroma, as revealed by ultrarapid-freezing and deep-etching methods." <u>Exp Eye Res</u> 72(2): 123-135.

Hirsch, M., G. Renard, et al. (1977). "Study of the ultrastructure of the rabbit corneal endothelium by the freeze-fracture technique: apical and lateral junctions." <u>Exp Eye Res</u> **25**(3): 277-288.

Hoang-Xuan, T. (1998). "Restauration de l'épithélium cornéen à partir des cellules souches limbiques." <u>Médecine/sciences</u> 14: 1375-1377.

Hoffman, M. P., M. Nomizu, et al. (1998). "Laminin-1 and laminin-2 G-domain synthetic peptides bind syndecan-1 and are involved in acinar formation of a human submandibular gland cell line." J Biol Chem **273**(44): 28633-28641.

Hogan, M. J. and J. A. Alvarado (1971). The Cornea. <u>In: Histology of the human eye - an Atlas and Textbook M. J. Hogan, J. A. Alvarado and J. E. Weddel. Philadelphia, W.B. Saunders: p. 55-111.</u>

Hohenester, E. and P. D. Yurchenco (2013). "Laminins in basement membrane assembly." <u>Cell Adh</u> <u>Migr</u> 7(1): 56-63.

Holland, E. J. and G. S. Schwartz (2000). "Changing concepts in the management of severe ocular surface disease over twenty-five years." <u>Cornea</u> **19**(5): 688-698.

Holly, F. J. and M. A. Lemp (1977). "Tear physiology and dry eyes." <u>Surv Ophthalmol</u> 22(2): 69-87.

Holly, S. P., M. K. Larson, et al. (2000). "Multiple roles of integrins in cell motility." <u>Exp Cell Res</u> **261**(1): 69-74.

Hong, J. W., J. J. Liu, et al. (2001). "Proinflammatory chemokine induction in keratocytes and inflammatory cell infiltration into the cornea." <u>Invest Ophthalmol Vis Sci</u> **42**(12): 2795-2803.

Honma, Y., K. Nishida, et al. (1997). "Effect of transforming growth factor-beta1 and -beta2 on in vitro rabbit corneal epithelial cell proliferation promoted by epidermal growth factor, keratinocyte growth factor, or hepatocyte growth factor." <u>Exp Eye Res</u> **65**(3): 391-396.

Huang, A. J. and S. C. Tseng (1991). "Corneal epithelial wound healing in the absence of limbal epithelium." <u>Invest Ophthalmol Vis Sci</u> **32**(1): 96-105.

Huang, S., J. Varani, et al. (1994). "Control of AKR fibroblast phenotype by fibronectin: regulation of cell-surface fibronectin binding receptor by fibronectin." J Cell Physiol **161**(3): 470-482.

Hughes, P. E. and M. Pfaff (1998). "Integrin affinity modulation." Trends Cell Biol 8(9): 359-364.

Huhtala, P., M. J. Humphries, et al. (1995). "Cooperative signaling by alpha 5 beta 1 and alpha 4 beta 1 integrins regulates metalloproteinase gene expression in fibroblasts adhering to fibronectin." J Cell Biol **129**(3): 867-879.

Humphries, J. D., A. Byron, et al. (2006). "Integrin ligands at a glance." <u>J Cell Sci</u> 119(Pt 19): 3901-3903.

Humphries, M. J., P. A. McEwan, et al. (2003). "Integrin structure: heady advances in ligand binding, but activation still makes the knees wobble." <u>Trends Biochem Sci</u> **28**(6): 313-320.

Hung, J. J., Y. T. Wang, et al. (2006). "Sp1 deacetylation induced by phorbol ester recruits p300 to activate 12(S)-lipoxygenase gene transcription." <u>Mol Cell Biol</u> **26**(5): 1770-1785.

Hutcheon, A. E., X. Q. Guo, et al. (2005). "Effect of wound type on Smad 2 and 4 translocation." Invest Ophthalmol Vis Sci 46(7): 2362-2368.

Huttenlocher, A., R. R. Sandborg, et al. (1995). "Adhesion in cell migration." <u>Curr Opin Cell Biol</u> 7(5): 697-706.

Hynes, R. O. (1987). "Integrins: a family of cell surface receptors." Cell 48(4): 549-554.

Hynes, R. O. (1990). Fibronectins. New York, Springer-Verlag.

Hynes, R. O. (1992). "Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion." <u>Cell</u> **69**(1): 11-25.

Hynes, R. O. (2002). "Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines." Cell 110(6): 673-687.

Hynes, R. O. and A. Naba (2012). "Overview of the matrisome--an inventory of extracellular matrix constituents and functions." <u>Cold Spring Harb Perspect Biol</u> **4**(1): a004903.

Ido, H., K. Harada, et al. (2004). "Molecular dissection of the alpha-dystroglycan- and integrinbinding sites within the globular domain of human laminin-10." J Biol Chem **279**(12): 10946-10954.

Imai, K., E. Ohuchi, et al. (1996). "Membrane-type matrix metalloproteinase 1 is a gelatinolytic enzyme and is secreted in a complex with tissue inhibitor of metalloproteinases 2." <u>Cancer Res</u> 56(12): 2707-2710.

Imanishi, J., K. Kamiyama, et al. (2000). "Growth factors: importance in wound healing and maintenance of transparency of the cornea." Prog Retin Eye Res **19**(1): 113-129.

Inatomi, T., T. Nakamura, et al. (2005). "Current concepts and challenges in ocular surface reconstruction using cultivated mucosal epithelial transplantation." <u>Cornea</u> **24**(8 Suppl): S32-S38.

Inatomi, T., T. Nakamura, et al. (2006a). "Midterm results on ocular surface reconstruction using cultivated autologous oral mucosal epithelial transplantation." <u>Am J Ophthalmol</u> **141**(2): 267-275.

Inatomi, T., T. Nakamura, et al. (2006b). "Ocular surface reconstruction with combination of cultivated autologous oral mucosal epithelial transplantation and penetrating keratoplasty." <u>Am J</u> <u>Ophthalmol</u> **142**(5): 757-764.

Jacobsen, I. E., O. A. Jensen, et al. (1984). "Structure and composition of Bowman's membrane. Study by frozen resin cracking." <u>Acta Ophthalmol (Copenh)</u> **62**(1): 39-53.

Janin-Manificat, H., M. R. Rovere, et al. (2012). "Development of ex vivo organ culture models to mimic human corneal scarring." <u>Mol Vis</u> 18: 2896-2908.

Jester, J. V. (2008). "Corneal crystallins and the development of cellular transparency." <u>Semin Cell</u> <u>Dev Biol</u> **19**(2): 82-93.

Jester, J. V., P. A. Barry, et al. (1994). "Corneal keratocytes: in situ and in vitro organization of cytoskeletal contractile proteins." <u>Invest Ophthalmol Vis Sci</u> **35**(2): 730-743.

Jester, J. V., P. A. Barry-Lane, et al. (1996). "Induction of alpha-smooth muscle actin expression and myofibroblast transformation in cultured corneal keratocytes." <u>Cornea</u> **15**(5): 505-516.

Jester, J. V., T. Moller-Pedersen, et al. (1999a). "The cellular basis of corneal transparency: evidence for 'corneal crystallins'." J Cell Sci 112 (Pt 5): 613-622.

Jester, J. V., W. M. Petroll, et al. (1995). "Expression of alpha-smooth muscle (alpha-SM) actin during corneal stromal wound healing." <u>Invest Ophthalmol Vis Sci</u> **36**(5): 809-819.

Jester, J. V., W. M. Petroll, et al. (1999b). "Corneal stromal wound healing in refractive surgery: the role of myofibroblasts." <u>Prog Retin Eye Res</u> **18**(3): 311-356.

Jin, H. and J. Varner (2004). "Integrins: roles in cancer development and as treatment targets." <u>Br J</u> <u>Cancer</u> **90**(3): 561-565.

Jin, Y. J., I. Park, et al. (2011). "Fibronectin and vitronectin induce AP-1-mediated matrix metalloproteinase-9 expression through integrin alpha(5)beta(1)/alpha(v)beta(3)-dependent Akt, ERK and JNK signaling pathways in human umbilical vein endothelial cells." <u>Cell Signal</u> **23**(1): 125-134.

Jo, Y., J. Yeon, et al. (2000). "Analysis of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 effect on promatrix metalloproteinase-2 activation by membrane-type 1 matrix metalloproteinase using baculovirus/insect-cell expression system." <u>Biochem J</u> **345** Pt **3**: 511-519.

Johnson, D. H., W. M. Bourne, et al. (1982). "The ultrastructure of Descemet's membrane. I. Changes with age in normal corneas." <u>Arch Ophthalmol</u> **100**(12): 1942-1947.

Jones, F. S. and P. L. Jones (2000a). "The tenascin family of ECM glycoproteins: structure, function, and regulation during embryonic development and tissue remodeling." <u>Dev Dyn</u> **218**(2): 235-259.

Jones, J. C., J. Asmuth, et al. (1994). "Hemidesmosomes: extracellular matrix/intermediate filament connectors." Exp Cell Res **213**(1): 1-11.

Jones, J. C., S. B. Hopkinson, et al. (1998). "Structure and assembly of hemidesmosomes." Bioessays 20(6): 488-494.

Jones, J. C., M. A. Kurpakus, et al. (1991). "A function for the integrin alpha 6 beta 4 in the hemidesmosome." Cell Regul 2(6): 427-438.

Jones, P. L. and F. S. Jones (2000b). "Tenascin-C in development and disease: gene regulation and cell function." <u>Matrix Biol</u> **19**(7): 581-596.

Joo, C. K. and Y. Seomun (2008). "Matrix metalloproteinase (MMP) and TGF beta 1-stimulated cell migration in skin and cornea wound healing." <u>Cell Adh Migr</u> **2**(4): 252-253.

Joshi, P., C. Y. Chung, et al. (1993). "Endothelial cells adhere to the RGD domain and the fibrinogen-like terminal knob of tenascin." J Cell Sci 106 (Pt 1): 389-400.

Jovanovic, M., I. Stefanoska, et al. (2010). "Interleukin-8 (CXCL8) stimulates trophoblast cell migration and invasion by increasing levels of matrix metalloproteinase (MMP)2 and MMP9 and integrins alpha5 and beta1." <u>Reproduction</u> **139**(4): 789-798.

Joyce, N. C. (2003). "Proliferative capacity of the corneal endothelium." <u>Prog Retin Eye Res</u> 22(3): 359-389.

Joyce, N. C. (2005). "Cell cycle status in human corneal endothelium." Exp Eye Res 81(6): 629-638.

Judware, R. and L. A. Culp (1995). "Over-expression of transfected N-myc oncogene in human SKNSH neuroblastoma cells down-regulates expression of beta 1 integrin subunit." <u>Oncogene</u> **11**(12): 2599-2607.

Judware, R. and L. A. Culp (1997). "Concomitant down-regulation of expression of integrin subunits by N-myc in human neuroblastoma cells: differential regulation of alpha2, alpha3 and beta1." Oncogene **14**(11): 1341-1350.

Juliano, R. L. (2002). "Signal transduction by cell adhesion receptors and the cytoskeleton: functions of integrins, cadherins, selectins, and immunoglobulin-superfamily members." <u>Annu Rev</u> <u>Pharmacol Toxicol</u> **42**: 283-323.

Rapport-gratuit.com

Le numero 1 mondial du mémoires

Jumblatt, M. M. and A. H. Neufeld (1986). "A tissue culture assay of corneal epithelial wound closure." <u>Invest Ophthalmol Vis Sci</u> 27(1): 8-13.

Kabosova, A., D. T. Azar, et al. (2007). "Compositional differences between infant and adult human corneal basement membranes." <u>Invest Ophthalmol Vis Sci</u> **48**(11): 4989-4999.

Kabosova, A., A. A. Kramerov, et al. (2003). "Human diabetic corneas preserve wound healing, basement membrane, integrin and MMP-10 differences from normal corneas in organ culture." <u>Exp</u> <u>Eye Res</u> 77(2): 211-217.

Kaczynski, J., T. Cook, et al. (2003). "Sp1- and Kruppel-like transcription factors." <u>Genome Biol</u> **4**(2): 206.

Kadler, K. E., C. Baldock, et al. (2007). "Collagens at a glance." J Cell Sci 120(Pt 12): 1955-1958.

Kaji, Y., H. Obata, et al. (1998). "Three-dimensional organization of collagen fibrils during corneal stromal wound healing after excimer laser keratectomy." J Cataract Refract Surg 24(11): 1441-1446.

Kallunki, T., T. Deng, et al. (1996). "c-Jun can recruit JNK to phosphorylate dimerization partners via specific docking interactions." <u>Cell</u> **87**(5): 929-939.

Kambe, M., Y. Miyamoto, et al. (1998). "Characterization of the integrin alpha(v) gene promoter in mice." <u>Biochim Biophys Acta</u> **1395**(2): 209-219.

Kaminska, B., B. Pyrzynska, et al. (2000). "Modulation of the composition of AP-1 complex and its impact on transcriptional activity." <u>Acta Neurobiol Exp (Wars)</u> **60**(3): 395-402.

Kamoshida, G., A. Matsuda, et al. (2012). "Involvement of transcription factor Ets-1 in the expression of the alpha3 integrin subunit gene." <u>FEBS J</u> **279**(24): 4535-4546.

Kane, R., J. Murtagh, et al. (2002). "Transcription factor NFIC undergoes N-glycosylation during early mammary gland involution." J Biol Chem 277(29): 25893-25903.

Kang, S. J., E. K. Kim, et al. (1999). "Expression and distribution of extracellular matrices during corneal wound healing after keratomileusis in rabbits." <u>Ophthalmologica</u> **213**(1): 20-24.

Kaplony, A., D. R. Zimmermann, et al. (1991). "Tenascin Mr 220,000 isoform expression correlates with corneal cell migration." <u>Development</u> **112**(2): 605-614.

Kardassis, D., P. Papakosta, et al. (1999). "c-Jun transactivates the promoter of the human p21(WAF1/Cip1) gene by acting as a superactivator of the ubiquitous transcription factor Sp1." J Biol Chem **274**(41): 29572-29581.

Karin, M. (1995). "The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases." J Biol Chem **270**(28): 16483-16486.

Karin, M., Z. Liu, et al. (1997). "AP-1 function and regulation." Curr Opin Cell Biol 9(2): 240-246.

Kariya, Y., C. Yasuda, et al. (2004). "Characterization of laminin 5B and NH2-terminal proteolytic fragment of its alpha3B chain: promotion of cellular adhesion, migration, and proliferation." J Biol Chem **279**(23): 24774-24784.

Katabami, K., T. Kato, et al. (2006). "Characterization of the promoter for the alpha3 integrin gene in various tumor cell lines: roles of the Ets- and Sp-family of transcription factors." <u>J Cell Biochem</u> **97**(3): 530-543.

Katakami, C., K. Fujisawa, et al. (1992). "Localization of collagen (I) and collagenase mRNA by in situ hybridization during corneal wound healing after epikeratophakia or alkali-burn." Jpn J Ophthalmol **36**(1): 10-22.

Kataoka, K., M. Noda, et al. (1994). "Maf nuclear oncoprotein recognizes sequences related to an AP-1 site and forms heterodimers with both Fos and Jun." <u>Mol Cell Biol</u> **14**(1): 700-712.

Kato, T., K. Katabami, et al. (2002). "Characterization of the promoter for the mouse alpha 3 integrin gene." <u>Eur J Biochem</u> **269**(18): 4524-4532.

Kaur, H., S. S. Chaurasia, et al. (2009). "Corneal myofibroblast viability: opposing effects of IL-1 and TGF beta1." <u>Exp Eye Res</u> **89**(2): 152-158.

Kavurma, M. M. and L. M. Khachigian (2003). "Sp1 inhibits proliferation and induces apoptosis in vascular smooth muscle cells by repressing p21WAF1/Cip1 transcription and cyclin D1-Cdk4-p21WAF1/Cip1 complex formation." J Biol Chem **278**(35): 32537-32543.

Kavurma, M. M., F. S. Santiago, et al. (2001). "Sp1 phosphorylation regulates apoptosis via extracellular FasL-Fas engagement." J Biol Chem 276(7): 4964-4971.

Kawasaki, S., H. Tanioka, et al. (2006). "Clusters of corneal epithelial cells reside ectopically in human conjunctival epithelium." <u>Invest Ophthalmol Vis Sci</u> **47**(4): 1359-1367.

Kay, E. P., M. S. Lee, et al. (1998). "TGF-beta s stimulate cell proliferation via an autocrine production of FGF-2 in corneal stromal fibroblasts." <u>Curr Eye Res</u> **17**(3): 286-293.

Keely, S., L. E. Glover, et al. (2009). "Selective induction of integrin beta1 by hypoxia-inducible factor: implications for wound healing." <u>FASEB J</u> 23(5): 1338-1346.

Keller, A., A. I. Nesvizhskii, et al. (2002). "Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search." <u>Anal Chem</u> **74**(20): 5383-5392.

Kenyon, K. R. and S. C. Tseng (1989). "Limbal autograft transplantation for ocular surface disorders." <u>Ophthalmology</u> **96**(5): 709-722; discussion 722-703.

Kern, A., J. Eble, et al. (1993). "Interaction of type IV collagen with the isolated integrins alpha 1 beta 1 and alpha 2 beta 1." <u>Eur J Biochem</u> **215**(1): 151-159.

Kerppola, T. K. and T. Curran (1994). "Maf and Nrl can bind to AP-1 sites and form heterodimers with Fos and Jun." <u>Oncogene</u> **9**(3): 675-684.

Kesanakurti, D., C. Chetty, et al. (2013). "Role of MMP-2 in the regulation of IL-6/Stat3 survival signaling via interaction with alpha5beta1 integrin in glioma." <u>Oncogene</u> **32**(3): 327-340.

Khoshnoodi, J., V. Pedchenko, et al. (2008). "Mammalian collagen IV." Microsc Res Tech 71(5): 357-370.

Kikkawa, Y., N. Sanzen, et al. (1998). "Isolation and characterization of laminin-10/11 secreted by human lung carcinoma cells. laminin-10/11 mediates cell adhesion through integrin alpha3 beta1." <u>J</u> <u>Biol Chem</u> **273**(25): 15854-15859.

Kilty, I., A. Logan, et al. (1999). "Differential characteristics of human 15-lipoxygenase isozymes and a novel splice variant of 15S-lipoxygenase." <u>Eur J Biochem</u> **266**(1): 83-93.

Kim, A. and R. S. Chuck (2008). "Wavefront-guided customized corneal ablation." <u>Curr Opin</u> <u>Ophthalmol</u> **19**(4): 314-320.

Kim, A., N. Lakshman, et al. (2010a). "Growth factor regulation of corneal keratocyte differentiation and migration in compressed collagen matrices." <u>Invest Ophthalmol Vis Sci</u> **51**(2): 864-875.

Kim, H. S., T. Shang, et al. (2004). "TGF-beta1 stimulates production of gelatinase (MMP-9), collagenases (MMP-1, -13) and stromelysins (MMP-3, -10, -11) by human corneal epithelial cells." <u>Exp Eye Res</u> **79**(2): 263-274.

Kim, J. P., K. Zhang, et al. (1992). "Mechanism of human keratinocyte migration on fibronectin: unique roles of RGD site and integrins." <u>J Cell Physiol</u> **151**(3): 443-450.

Kim, M. J., R. M. Jun, et al. (2001). "Optimal concentration of human epidermal growth factor (hEGF) for epithelial healing in experimental corneal alkali wounds." <u>Curr Eye Res</u> **22**(4): 272-279.

Kim, S., H. Y. Kang, et al. (2010b). "TMPRSS4 induces invasion and epithelial-mesenchymal transition through upregulation of integrin alpha5 and its signaling pathways." <u>Carcinogenesis</u> **31**(4): 597-606.

Kim, S. W., K. Y. Seo, et al. (2012). "Effect of retinoic acid on epithelial differentiation and mucin expression in primary human corneal limbal epithelial cells." <u>Curr Eye Res</u> **37**(1): 33-42.

Kim, T. K. and R. G. Roeder (1994). "Proline-rich activator CTF1 targets the TFIIB assembly step during transcriptional activation." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **91**(10): 4170-4174.

Kim, Y. B., J. Yu, et al. (2005). "Cell adhesion status-dependent histone acetylation is regulated through intracellular contractility-related signaling activities." *J Biol Chem* **280**(31): 28357-28364.

Kimura, K., S. Kawano, et al. (2010). "Quantitative analysis of the effects of extracellular matrix proteins on membrane dynamics associated with corneal epithelial cell motility." <u>Invest Ophthalmol</u> <u>Vis Sci</u> **51**(9): 4492-4499.

Kinoshita, S., W. Adachi, et al. (2001). "Characteristics of the human ocular surface epithelium." <u>Prog Retin Eye Res</u> **20**(5): 639-673.

Kinoshita, T., H. Sato, et al. (1998). "TIMP-2 promotes activation of progelatinase A by membranetype 1 matrix metalloproteinase immobilized on agarose beads." J Biol Chem 273(26): 16098-16103.

Kita, D., T. Takino, et al. (2001). "Expression of dominant-negative form of Ets-1 suppresses fibronectin-stimulated cell adhesion and migration through down-regulation of integrin alpha5 expression in U251 glioma cell line." <u>Cancer Res</u> **61**(21): 7985-7991.

Kitazawa, T., S. Kinoshita, et al. (1990). "The mechanism of accelerated corneal epithelial healing by human epidermal growth factor." Invest Ophthalmol Vis Sci **31**(9): 1773-1778.

Klenkler, B. and H. Sheardown (2004). "Growth factors in the anterior segment: role in tissue maintenance, wound healing and ocular pathology." <u>Exp Eye Res</u> **79**(5): 677-688.

Klenkler, B., H. Sheardown, et al. (2007). "Growth factors in the tear film: role in tissue maintenance, wound healing, and ocular pathology." <u>Ocul Surf</u> 5(3): 228-239.

Klyce, S. D. and R. W. Beuermann (1998). Structure and function of the cornea. <u>In: The cornea</u> (<u>2nd Edition</u>). H. E. Kaufman, B. A. Barron and M. B. McDonald. Boston, Butterworth-Heinemann: p. 3-50.

Knight, C. G., L. F. Morton, et al. (2000). "The collagen-binding A-domains of integrins alpha(1)beta(1) and alpha(2)beta(1) recognize the same specific amino acid sequence, GFOGER, in native (triple-helical) collagens." J Biol Chem **275**(1): 35-40.

Kobayashi, T., A. Shiraishi, et al. (2015). "Stromal-epithelial interaction study: The effect of corneal epithelial cells on growth factor expression in stromal cells using organotypic culture model." <u>Exp Eye Res</u> **135**: 109-117.

Koivisto, L., J. Heino, et al. (2014). "Integrins in Wound Healing." <u>Adv Wound Care (New Rochelle)</u> **3**(12): 762-783.

Koivunen, E., D. A. Gay, et al. (1993). "Selection of peptides binding to the alpha 5 beta 1 integrin from phage display library." J Biol Chem **268**(27): 20205-20210.

Koizumi, N., T. Inatomi, et al. (2001). "Cultivated corneal epithelial stem cell transplantation in ocular surface disorders." <u>Ophthalmology</u> **108**(9): 1569-1574.

Komai, Y. and T. Ushiki (1991). "The three-dimensional organization of collagen fibrils in the human cornea and sclera." Invest Ophthalmol Vis Sci **32**(8): 2244-2258.

Koria, P. and S. T. Andreadis (2007). "KGF promotes integrin alpha5 expression through CCAAT/enhancer-binding protein-beta." <u>Am J Physiol Cell Physiol **293**(3)</u>: C1020-1031.

Koshikawa, N., G. Giannelli, et al. (2000). "Role of cell surface metalloprotease MT1-MMP in epithelial cell migration over laminin-5." J Cell Biol **148**(3): 615-624.

Koutsodontis, G., A. Moustakas, et al. (2002). "The role of Sp1 family members, the proximal GC-rich motifs, and the upstream enhancer region in the regulation of the human cell cycle inhibitor p21WAF-1/Cip1 gene promoter." <u>Biochemistry</u> **41**(42): 12771-12784.

Kruse, F. E. (1994). "Stem cells and corneal epithelial regeneration." Eye (Lond) 8 (Pt 2): 170-183.

Kruse, U. and A. E. Sippel (1994). "Transcription factor nuclear factor I proteins form stable homoand heterodimers." <u>FEBS Lett</u> **348**(1): 46-50.

Kulkarni, B. B., P. J. Tighe, et al. (2010). "Comparative transcriptional profiling of the limbal epithelial crypt demonstrates its putative stem cell niche characteristics." <u>BMC Genomics</u> **11**: 526.

Kuo, I. C. (2004). "Corneal wound healing." Curr Opin Ophthalmol 15(4): 311-315.

Kuphal, S., R. Bauer, et al. (2005). "Integrin signaling in malignant melanoma." <u>Cancer Metastasis</u> <u>Rev</u> 24(2): 195-222.

Kurpakus, M. A., V. Quaranta, et al. (1991). "Surface relocation of alpha 6 beta 4 integrins and assembly of hemidesmosomes in an in vitro model of wound healing." <u>J Cell Biol</u> **115**(6): 1737-1750.

Kurpakus, M. A., E. L. Stock, et al. (1990). "Expression of the 55-kD/64-kD corneal keratins in ocular surface epithelium." <u>Invest Ophthalmol Vis Sci</u> **31**(3): 448-456.

Kurpakus-Wheater, M., K. A. Kernacki, et al. (2001). "Maintaining corneal integrity how the "window" stays clear." <u>Prog Histochem Cytochem</u> **36**(3): 185-259.

Kuwada, S. K. and X. Li (2000). "Integrin alpha5/beta1 mediates fibronectin-dependent epithelial cell proliferation through epidermal growth factor receptor activation." <u>Mol Biol Cell</u> **11**(7): 2485-2496.

Kyo, S., M. Inoue, et al. (1993). "NF-IL6 represses early gene expression of human papillomavirus type 16 through binding to the noncoding region." <u>J Virol</u> **67**(2): 1058-1066.

Lake, J., K. Zaniolo, et al. (2013). "Expression of the alpha5 integrin gene in corneal epithelial cells cultured on tissue-engineered human extracellular matrices." <u>Biomaterials</u> **34**(27): 6367-6376.

Lakshman, N., A. Kim, et al. (2010). "Characterization of corneal keratocyte morphology and mechanical activity within 3-D collagen matrices." <u>Exp Eye Res</u> **90**(2): 350-359.

Lakshman, N. and W. M. Petroll (2012). "Growth factor regulation of corneal keratocyte mechanical phenotypes in 3-D collagen matrices." <u>Invest Ophthalmol Vis Sci</u> **53**(3): 1077-1086.

Lamande, S. R. and J. F. Bateman (1993). "A mouse 3T6 fibroblast cell culture model for the study of normal and protein-engineered collagen synthesis and deposition into the extracellular matrix." <u>Matrix</u> **13**(4): 323-330.

Landreville, S., F. Vigneault, et al. (2011). "Suppression of alpha5 gene expression is closely related to the tumorigenic properties of uveal melanoma cell lines." <u>Pigment Cell Melanoma Res</u> **24**(4): 643-655.

Laniel, M. A., M. J. Bergeron, et al. (1997). "A nuclear factor other than Sp1 binds the GC-rich promoter of the gene encoding rat poly(ADP-ribose) polymerase in vitro." <u>Biochem Cell Biol</u> **75**(4): 427-434.

Laniel, M. A., G. G. Poirier, et al. (2001). "Nuclear factor 1 interferes with Sp1 binding through a composite element on the rat poly(ADP-ribose) polymerase promoter to modulate its activity in vitro." J Biol Chem 276(23): 20766-20773.

Laplante, A. F., L. Germain, et al. (2001). "Mechanisms of wound reepithelialization: hints from a tissue-engineered reconstructed skin to long-standing questions." <u>FASEB J</u> **15**(13): 2377-2389.

Larjava, H., J. Peltonen, et al. (1990). "Novel function for beta 1 integrins in keratinocyte cell-cell interactions." <u>J Cell Biol</u> **110**(3): 803-815.

Larouche, K., S. Leclerc, et al. (2000). "Expression of the alpha 5 integrin subunit gene promoter is positively regulated by the extracellular matrix component fibronectin through the transcription factor Sp1 in corneal epithelial cells in vitro." J Biol Chem **275**(50): 39182-39192.

Larson, R. S., A. L. Corbi, et al. (1989). "Primary structure of the leukocyte function-associated molecule-1 alpha subunit: an integrin with an embedded domain defining a protein superfamily." <u>J</u> <u>Cell Biol</u> **108**(2): 703-712.

Larzabal, L., A. L. de Aberasturi, et al. (2014). "TMPRSS4 regulates levels of integrin alpha5 in NSCLC through miR-205 activity to promote metastasis." <u>Br J Cancer</u> **110**(3): 764-774.

Lassen, N., W. J. Black, et al. (2008). "The role of corneal crystallins in the cellular defense mechanisms against oxidative stress." <u>Semin Cell Dev Biol</u> **19**(2): 100-112.

Latijnhouwers, M. A., M. Bergers, et al. (1996). "Tenascin expression during wound healing in human skin." J Pathol 178(1): 30-35.

Latvala, T., K. Tervo, et al. (1995). "Expression of cellular fibronectin and tenascin in the rabbit cornea after excimer laser photorefractive keratectomy: a 12 month study." <u>Br J Ophthalmol</u> **79**(1): 65-69.

Lauweryns, B., J. J. van den Oord, et al. (1991). "Distribution of very late activation integrins in the human cornea. An immunohistochemical study using monoclonal antibodies." <u>Invest Ophthalmol</u> <u>Vis Sci</u> **32**(7): 2079-2085.

Law, R. H., D. Abu-Ssaydeh, et al. (2013). "New insights into the structure and function of the plasminogen/plasmin system." <u>Curr Opin Struct Biol</u> **23**(6): 836-841.

Law, R. H., T. Caradoc-Davies, et al. (2012). "The X-ray crystal structure of full-length human plasminogen." <u>Cell Rep</u> 1(3): 185-190.

Law, R. H., Q. Zhang, et al. (2006). "An overview of the serpin superfamily." <u>Genome Biol</u> 7(5): 216.

Lawrence, B. D., J. K. Marchant, et al. (2009). "Silk film biomaterials for cornea tissue engineering." <u>Biomaterials</u> **30**(7): 1299-1308.

Lawrenson, J. G. and G. L. Ruskell (1991). "The structure of corpuscular nerve endings in the limbal conjunctiva of the human eye." J Anat 177: 75-84.

Le Clainche, C. and M. F. Carlier (2008). "Regulation of actin assembly associated with protrusion and adhesion in cell migration." <u>Physiol Rev</u> **88**(2): 489-513.

Leahy, P., D. R. Crawford, et al. (1999). "CREB binding protein coordinates the function of multiple transcription factors including nuclear factor I to regulate phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene transcription." J Biol Chem 274(13): 8813-8822.

Lee, B. H., S. Y. Park, et al. (2002). "NF-kappaB activates fibronectin gene expression in rat hepatocytes." <u>Biochem Biophys Res Commun</u> **297**(5): 1218-1224.

Lee, J. O., P. Rieu, et al. (1995). "Crystal structure of the A domain from the alpha subunit of integrin CR3 (CD11b/CD18)." <u>Cell</u> **80**(4): 631-638.

Lee, J. W. and R. Juliano (2004). "Mitogenic signal transduction by integrin- and growth factor receptor-mediated pathways." <u>Mol Cells</u> **17**(2): 188-202.

Legate, K. R., S. A. Wickstrom, et al. (2009). "Genetic and cell biological analysis of integrin outside-in signaling." <u>Genes Dev</u> 23(4): 397-418.

Lehrer, M. S., T. T. Sun, et al. (1998). "Strategies of epithelial repair: modulation of stem cell and transit amplifying cell proliferation." <u>J Cell Sci</u> **111 (Pt 19)**: 2867-2875.

Leiss, M., K. Beckmann, et al. (2008). "The role of integrin binding sites in fibronectin matrix assembly in vivo." <u>Curr Opin Cell Biol</u> **20**(5): 502-507.

Leitinger, B. and E. Hohenester (2007). "Mammalian collagen receptors." <u>Matrix Biol</u> 26(3): 146-155.

Levis, H. J., R. A. Brown, et al. (2010). "Plastic compressed collagen as a biomimetic substrate for human limbal epithelial cell culture." <u>Biomaterials</u> **31**(30): 7726-7737.

Li, B., A. Pozzi, et al. (2011). "TNFalpha accelerates monocyte to endothelial transdifferentiation in tumors by the induction of integrin alpha5 expression and adhesion to fibronectin." <u>Mol Cancer Res</u> **9**(6): 702-711.

Li, B., L. Tian, et al. (2014b). "Exogenous IL-10 induces corneal transplantation immune tolerance by a mechanism associated with the altered Th1/Th2 cytokine ratio and the increased expression of TGF-beta." <u>Mol Med Rep</u> **9**(6): 2245-2250.

Li, B., C. Tournier, et al. (1999). "Regulation of IL-4 expression by the transcription factor JunB during T helper cell differentiation." <u>EMBO J</u> **18**(2): 420-432.

Li, D. Q., B. L. Lokeshwar, et al. (2001). "Regulation of MMP-9 production by human corneal epithelial cells." <u>Exp Eye Res</u> **73**(4): 449-459.

Li, D. Q., T. Y. Shang, et al. (2003a). "Regulated expression of collagenases MMP-1, -8, and -13 and stromelysins MMP-3, -10, and -11 by human corneal epithelial cells." <u>Invest Ophthalmol Vis</u> <u>Sci</u> **44**(7): 2928-2936.

Li, D. Q. and S. C. Tseng (1995). "Three patterns of cytokine expression potentially involved in epithelial-fibroblast interactions of human ocular surface." J Cell Physiol **163**(1): 61-79.

Li, F., D. Carlsson, et al. (2003b). "Cellular and nerve regeneration within a biosynthetic extracellular matrix for corneal transplantation." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **100**(26): 15346-15351.

Li, L. and J. R. Davie (2010). "The role of Sp1 and Sp3 in normal and cancer cell biology." <u>Ann</u> <u>Anat</u> **192**(5): 275-283.

Li, L., S. He, et al. (2004). "Gene regulation by Sp1 and Sp3." Biochem Cell Biol 82(4): 460-471.

Li, W., Y. Hayashida, et al. (2007). "Niche regulation of corneal epithelial stem cells at the limbus." <u>Cell Res</u> **17**(1): 26-36.

Li, W. Y., S. S. Chong, et al. (2003c). "Plasminogen activator/plasmin system: a major player in wound healing?" <u>Wound Repair Regen</u> **11**(4): 239-247.

Li, Z., Y. Guo, et al. (2014a). "Differential regulation of MMPs by E2F1, Sp1 and NF-kappa B controls the small cell lung cancer invasive phenotype." <u>BMC Cancer</u> 14: 276.

Liao, Y. C., W. G. Liang, et al. (2002b). "IL-19 induces production of IL-6 and TNF-alpha and results in cell apoptosis through TNF-alpha." J Immunol **169**(8): 4288-4297.

Liao, Y. F., P. J. Gotwals, et al. (2002a). "The EIIIA segment of fibronectin is a ligand for integrins alpha 9beta 1 and alpha 4beta 1 providing a novel mechanism for regulating cell adhesion by alternative splicing." J Biol Chem 277(17): 14467-14474.

Lijnen, H. R. (2001). "Elements of the fibrinolytic system." Ann N Y Acad Sci 936: 226-236.

Lim, M., M. H. Goldstein, et al. (2003). "Growth factor, cytokine and protease interactions during corneal wound healing." <u>Ocul Surf</u> 1(2): 53-65.

Liminga, M., L. Hornsten, et al. (1994). "Arachidonate 15-lipoxygenase in human corneal epithelium and 12- and 15-lipoxygenases in bovine corneal epithelium: comparison with other bovine 12-lipoxygenases." <u>Biochim Biophys Acta</u> **1210**(3): 288-296.

Lin, A., J. Frost, et al. (1992). "Casein kinase II is a negative regulator of c-Jun DNA binding and AP-1 activity." <u>Cell</u> **70**(5): 777-789.

Lin, C. P. and M. Boehnke (1997). "A new model for in vitro corneal epithelial wound healing study." <u>Kaohsiung J Med Sci</u> **13**(8): 475-479.

Lin, K. T., S. H. Yeh, et al. (2005). "Epigenetic activation of alpha4, beta2 and beta6 integrins involved in cell migration in trichostatin A-treated Hep3B cells." *J Biomed Sci* **12**(5): 803-813.

Lindberg, K., M. E. Brown, et al. (1993). "In vitro propagation of human ocular surface epithelial cells for transplantation." Invest Ophthalmol Vis Sci **34**(9): 2672-2679.

Linhares-Lacerda, L., M. Ribeiro-Alves, et al. (2010). "RNA interference-mediated knockdown of CD49e (alpha5 integrin chain) in human thymic epithelial cells modulates the expression of multiple genes and decreases thymocyte adhesion." <u>BMC Genomics</u> **11 Suppl 5**: S2.

Liu, H., J. Zhang, et al. (2010). "Cell therapy of congenital corneal diseases with umbilical mesenchymal stem cells: lumican null mice." <u>PLoS One</u> **5**(5): e10707.

Liu, J., B. D. Lawrence, et al. (2012). "Silk fibroin as a biomaterial substrate for corneal epithelial cell sheet generation." <u>Invest Ophthalmol Vis Sci</u> **53**(7): 4130-4138.

Liu, J. J., W. W. Kao, et al. (1999). "Corneal epithelium-specific mouse keratin K12 promoter." <u>Exp</u> Eye Res **68**(3): 295-301.

Liu, S., D. A. Calderwood, et al. (2000). "Integrin cytoplasmic domain-binding proteins." <u>J Cell Sci</u> **113 (Pt 20)**: 3563-3571.

Liu, W., C. Deng, et al. (2009). "Collagen-phosphorylcholine interpenetrating network hydrogels as corneal substitutes." <u>Biomaterials</u> **30**(8): 1551-1559.

Liu, W., K. Merrett, et al. (2008). "Recombinant human collagen for tissue engineered corneal substitutes." <u>Biomaterials</u> **29**(9): 1147-1158.

Liu, Y., R. Yanai, et al. (2006). "Promotion by fibronectin of collagen gel contraction mediated by human corneal fibroblasts." <u>Exp Eye Res</u> **83**(5): 1196-1204.

Livingstone, C., G. Patel, et al. (1995). "ATF-2 contains a phosphorylation-dependent transcriptional activation domain." <u>EMBO J</u> 14(8): 1785-1797.

Ljubimov, A. V., S. A. Alba, et al. (1998). "Extracellular matrix changes in human corneas after radial keratotomy." <u>Exp Eye Res</u> 67(3): 265-272.

Ljubimov, A. V., R. E. Burgeson, et al. (1996). "Extracellular matrix alterations in human corneas with bullous keratopathy." <u>Invest Ophthalmol Vis Sci</u> **37**(6): 997-1007.

Ljubimov, A. V., R. E. Burgeson, et al. (1995). "Human corneal basement membrane heterogeneity: topographical differences in the expression of type IV collagen and laminin isoforms." <u>Lab Invest</u> **72**(4): 461-473.

Lo, S. H. (2006). "Focal adhesions: what's new inside." Dev Biol 294(2): 280-291.

Lockwood, C. J., C. Oner, et al. (2008). "Matrix metalloproteinase 9 (MMP9) expression in preeclamptic decidua and MMP9 induction by tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 beta in human first trimester decidual cells." <u>Biol Reprod</u> **78**(6): 1064-1072.

Loffek, S., O. Schilling, et al. (2011). "Series "matrix metalloproteinases in lung health and disease": Biological role of matrix metalloproteinases: a critical balance." <u>Eur Respir J</u> **38**(1): 191-208.

Logan, S. K., M. J. Garabedian, et al. (1996). "Synergistic transcriptional activation of the tissue inhibitor of metalloproteinases-1 promoter via functional interaction of AP-1 and Ets-1 transcription factors." J Biol Chem **271**(2): 774-782.

Lopez-Rodriguez, C., M. D. Delgado, et al. (2000). "c-Myc inhibits CD11a and CD11c leukocyte integrin promoters." <u>Eur J Immunol</u> **30**(9): 2465-2471.

Lu, L., P. S. Reinach, et al. (2001). "Corneal epithelial wound healing." <u>Exp Biol Med (Maywood)</u> **226**(7): 653-664.

Lu, P. C., H. Ye, et al. (1999). "Immunolocalization and gene expression of matrilysin during corneal wound healing." <u>Invest Ophthalmol Vis Sci</u> **40**(1): 20-27.

Lund, L. R., J. Romer, et al. (1999). "Functional overlap between two classes of matrix-degrading proteases in wound healing." <u>EMBO J</u> **18**(17): 4645-4656.

Luo, B. H., C. V. Carman, et al. (2007). "Structural basis of integrin regulation and signaling." <u>Annu Rev Immunol</u> **25**: 619-647.

Luo, R. X. and D. C. Dean (1999). "Chromatin remodeling and transcriptional regulation." *J Natl Cancer Inst* **91**(15): 1288-1294.

Lynch, A. P. and M. Ahearne (2013). "Strategies for developing decellularized corneal scaffolds." <u>Exp Eye Res</u> **108**: 42-47. Lyu, J. and C. K. Joo (2005). "Wnt-7a up-regulates matrix metalloproteinase-12 expression and promotes cell proliferation in corneal epithelial cells during wound healing." <u>J Biol Chem</u> **280**(22): 21653-21660.

Lyu, J. and C. K. Joo (2006). "Expression of Wnt and MMP in epithelial cells during corneal wound healing." <u>Cornea</u> **25**(10 Suppl 1): S24-28.

Mackie, E. J., W. Halfter, et al. (1988). "Induction of tenascin in healing wounds." <u>J Cell Biol</u> **107**(6 Pt 2): 2757-2767.

Maguen, E., S. A. Alba, et al. (1997). "Alterations of corneal extracellular matrix after multiple refractive procedures: a clinical and immunohistochemical study." <u>Cornea</u> **16**(6): 675-682.

Maguen, E., N. C. Zorapapel, et al. (2002). "Extracellular matrix and matrix metalloproteinase changes in human corneas after complicated laser-assisted in situ keratomileusis (LASIK)." <u>Cornea</u> **21**(1): 95-100.

Maity, G., T. Sen, et al. (2011). "Laminin induces matrix metalloproteinase-9 expression and activation in human cervical cancer cell line (SiHa)." J Cancer Res Clin Oncol **137**(2): 347-357.

Majumdar, G., A. Harmon, et al. (2003). "O-glycosylation of Sp1 and transcriptional regulation of the calmodulin gene by insulin and glucagon." <u>Am J Physiol Endocrinol Metab</u> **285**(3): E584-591.

Majumdar, G., A. Harrington, et al. (2006). "Insulin dynamically regulates calmodulin gene expression by sequential o-glycosylation and phosphorylation of sp1 and its subcellular compartmentalization in liver cells." J Biol Chem **281**(6): 3642-3650.

Maldonado, B. A. and L. T. Furcht (1995a). "Epidermal growth factor stimulates integrin-mediated cell migration of cultured human corneal epithelial cells on fibronectin and arginine-glycine-aspartic acid peptide." <u>Invest Ophthalmol Vis Sci</u> **36**(10): 2120-2126.

Maldonado, B. A. and L. T. Furcht (1995b). "Involvement of integrins with adhesion-promoting, heparin-binding peptides of type IV collagen in cultured human corneal epithelial cells." <u>Invest</u> <u>Ophthalmol Vis Sci 36(2)</u>: 364-372.

Malley, D. S., R. F. Steinert, et al. (1990). "Immunofluorescence study of corneal wound healing after excimer laser anterior keratectomy in the monkey eye." <u>Arch Ophthalmol</u> **108**(9): 1316-1322.

Marieb, E. N. and K. Hoehn (2010). <u>Anatomie et physiologie humaines (4e Édition)</u>. Saint-Laurent, Québec, Éditions du Renouveau pédagogique.

Marinkovich, M. P., G. P. Lunstrum, et al. (1992). "The dermal-epidermal junction of human skin contains a novel laminin variant." J Cell Biol **119**(3): 695-703.

Marshall, G. E., A. G. Konstas, et al. (1991a). "Immunogold fine structural localization of extracellular matrix components in aged human cornea. I. Types I-IV collagen and laminin." <u>Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol</u> **229**(2): 157-163.

Marshall, G. E., A. G. Konstas, et al. (1991b). "Immunogold fine structural localization of extracellular matrix components in aged human cornea. II. Collagen types V and VI." <u>Graefes Arch</u> <u>Clin Exp Ophthalmol</u> **229**(2): 164-171.

Rapport-gratuit.com

Le numero 1 mondial du mémoires

Martel, V., C. Racaud-Sultan, et al. (2001). "Conformation, localization, and integrin binding of talin depend on its interaction with phosphoinositides." J Biol Chem **276**(24): 21217-21227.

Martin, G. R. and R. Timpl (1987). "Laminin and other basement membrane components." <u>Annu Rev Cell Biol</u> **3**: 57-85.

Martin, S., E. C. Cosset, et al. (2009). "Caveolin-1 regulates glioblastoma aggressiveness through the control of alpha(5)beta(1) integrin expression and modulates glioblastoma responsiveness to SJ749, an alpha(5)beta(1) integrin antagonist." <u>Biochim Biophys Acta</u> **1793**(2): 354-367.

Martínez-Osorio, H., M. F. de la Paz, et al. (2013). Management Options for Limbal Stem Cell Deficiency. <u>In: Ocular surface : anatomy and physiology, disorders and therapeutic care</u>. R. M. Herranz and R. M. Corrales Herran. Boca Raton, FL, CRC Press: p. 198-228.

Maseruka, H., R. E. Bonshek, et al. (1997). "Tenascin-C expression in normal, inflamed, and scarred human corneas." <u>Br J Ophthalmol</u> **81**(8): 677-682.

Mason, S., M. Piper, et al. (2009). "Nuclear factor one transcription factors in CNS development." <u>Mol Neurobiol</u> **39**(1): 10-23.

Masson-Gadais, B., C. Fugere, et al. (2006). "The feeder layer-mediated extended lifetime of cultured human skin keratinocytes is associated with altered levels of the transcription factors Sp1 and Sp3." J Cell Physiol **206**(3): 831-842.

Masur, S. K., J. K. Cheung, et al. (1993). "Identification of integrins in cultured corneal fibroblasts and in isolated keratocytes." <u>Invest Ophthalmol Vis Sci</u> **34**(9): 2690-2698.

Matsubara, M., M. T. Girard, et al. (1991a). "Differential roles for two gelatinolytic enzymes of the matrix metalloproteinase family in the remodelling cornea." <u>Dev Biol</u> **147**(2): 425-439.

Matsubara, M., J. D. Zieske, et al. (1991b). "Mechanism of basement membrane dissolution preceding corneal ulceration." Invest Ophthalmol Vis Sci **32**(13): 3221-3237.

Matsuda, M., J. L. Ubels, et al. (1985). "A larger corneal epithelial wound closes at a faster rate." Invest Ophthalmol Vis Sci 26(6): 897-900.

Maycock, N. J. and J. Marshall (2014). "Genomics of corneal wound healing: a review of the literature." <u>Acta Ophthalmol</u> **92**(3): e170-184.

McCall-Culbreath, K. D., Z. Li, et al. (2011). "Selective, alpha2beta1 integrin-dependent secretion of il-6 by connective tissue mast cells." J innate Immun **3**(5): 459-470.

McCartney, M. D. and D. Cantu-Crouch (1992). "Rabbit corneal epithelial wound repair: tight junction reformation." <u>Curr Eye Res</u> **11**(1): 15-24.

McCawley, L. J. and L. M. Matrisian (2001). "Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore!" <u>Curr Opin Cell Biol</u> **13**(5): 534-540.

McIntosh Ambrose, W., A. Salahuddin, et al. (2009). "Collagen Vitrigel membranes for the in vitro reconstruction of separate corneal epithelial, stromal, and endothelial cell layers." J Biomed Mater Res B Appl Biomater **90**(2): 818-831.

Mechta-Grigoriou, F., D. Gerald, et al. (2001). "The mammalian Jun proteins: redundancy and specificity." <u>Oncogene</u> **20**(19): 2378-2389.

Mechta-Grigoriou, F., F. Giudicelli, et al. (2003). "c-jun regulation and function in the developing hindbrain." <u>Dev Biol</u> **258**(2): 419-431.

Meek, K. M. and N. J. Fullwood (2001). "Corneal and scleral collagens--a microscopist's perspective." <u>Micron</u> **32**(3): 261-272.

Meek, K. M. and D. W. Leonard (1993). "Ultrastructure of the corneal stroma: a comparative study." <u>Biophys J</u> 64(1): 273-280.

Meek, K. M., D. W. Leonard, et al. (2003). "Transparency, swelling and scarring in the corneal stroma." Eye (Lond) 17(8): 927-936.

Mercurio, A. M. and L. M. Shaw (1991). "Laminin binding proteins." Bioessays 13(9): 469-473.

Mermod, N., E. A. O'Neill, et al. (1989). "The proline-rich transcriptional activator of CTF/NF-I is distinct from the replication and DNA binding domain." <u>Cell</u> **58**(4): 741-753.

Merrett, K., P. Fagerholm, et al. (2008). "Tissue-engineered recombinant human collagen-based corneal substitutes for implantation: performance of type I versus type III collagen." <u>Invest</u> <u>Ophthalmol Vis Sci</u> **49**(9): 3887-3894.

Mettouchi, A., S. Klein, et al. (2001). "Integrin-specific activation of Rac controls progression through the G(1) phase of the cell cycle." <u>Mol Cell</u> **8**(1): 115-127.

Meyer-Blazejewska, E. A., M. K. Call, et al. (2011). "From hair to cornea: toward the therapeutic use of hair follicle-derived stem cells in the treatment of limbal stem cell deficiency." <u>Stem Cells</u> **29**(1): 57-66.

Mi, S., B. Chen, et al. (2010a). "Ex vivo construction of an artificial ocular surface by combination of corneal limbal epithelial cells and a compressed collagen scaffold containing keratocytes." <u>Tissue Eng Part A</u> **16**(6): 2091-2100.

Mi, S., B. Chen, et al. (2010b). "Plastic compression of a collagen gel forms a much improved scaffold for ocular surface tissue engineering over conventional collagen gels." J Biomed Mater Res <u>A</u> 95(2): 447-453.

Mi, S. and C. Connon (2013). The Formation of a Tissue-Engineered Cornea Using Plastically Compressed Collagen Scaffolds and Limbal Stem Cells. <u>In: Corneal Regenerative Medicine (Methods in Molecular Biology)</u>. B. Wright and C. J. Connon. New York City, Humana Press. **1014:** p. 143-155.

Mi, S., V. V. Khutoryanskiy, et al. (2011). "Photochemical cross-linking of plastically compressed collagen gel produces an optimal scaffold for corneal tissue engineering." J Biomed Mater Res A **99**(1): 1-8.

Michel, M., N. L'Heureux, et al. (1999). "Characterization of a new tissue-engineered human skin equivalent with hair." In Vitro Cell Dev Biol Anim **35**(6): 318-326.

Michelacci, Y. M. (2003). "Collagens and proteoglycans of the corneal extracellular matrix." <u>Braz J</u> <u>Med Biol Res</u> **36**(8): 1037-1046.

Midwood, K. S. and G. Orend (2009). "The role of tenascin-C in tissue injury and tumorigenesis." J <u>Cell Commun Signal</u> **3**(3-4): 287-310.

Mierke, C. T., B. Frey, et al. (2011). "Integrin alpha5beta1 facilitates cancer cell invasion through enhanced contractile forces." J Cell Sci **124**(Pt 3): 369-383.

Mikkola, I., J. A. Bruun, et al. (1999). "Phosphorylation of the transactivation domain of Pax6 by extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinase." J Biol Chem **274**(21): 15115-15126.

Milanini-Mongiat, J., J. Pouyssegur, et al. (2002). "Identification of two Sp1 phosphorylation sites for p42/p44 mitogen-activated protein kinases: their implication in vascular endothelial growth factor gene transcription." J Biol Chem 277(23): 20631-20639.

Miles, A. J., J. R. Knutson, et al. (1995). "A peptide model of basement membrane collagen alpha 1 (IV) 531-543 binds the alpha 3 beta 1 integrin." J Biol Chem **270**(49): 29047-29050.

Miles, L. A., F. J. Castellino, et al. (2003). "Critical Role for Conversion of Glu-Plasminogen to Lys-Plasminogen for Optimal Stimulation of Plasminogen Activation on Cell Surfaces." <u>Trends</u> <u>Cardiovas Med</u> **13**(1): 21-30.

Mimura, T. and N. C. Joyce (2006). "Replication competence and senescence in central and peripheral human corneal endothelium." <u>Invest Ophthalmol Vis Sci</u> **47**(4): 1387-1396.

Mimura, T., S. Yamagami, et al. (2010). "Isolation of adult progenitor cells with neuronal potential from rabbit corneal epithelial cells in serum- and feeder layer-free culture conditions." <u>Mol Vis</u> 16: 1712-1719.

Minami, Y., H. Sugihara, et al. (1993). "Reconstruction of cornea in three-dimensional collagen gel matrix culture." <u>Invest Ophthalmol Vis Sci</u> **34**(7): 2316-2324.

Miner, J. H. and P. D. Yurchenco (2004). "Laminin functions in tissue morphogenesis." <u>Annu Rev</u> <u>Cell Dev Biol</u> 20: 255-284.

Mishima, H., T. Hibino, et al. (1998). "SPARC from corneal epithelial cells modulates collagen contraction by keratocytes." Invest Ophthalmol Vis Sci **39**(13): 2547-2553.

Mishima, H., M. Nakamura, et al. (1992). "Transforming growth factor-beta modulates effects of epidermal growth factor on corneal epithelial cells." <u>Curr Eye Res</u> **11**(7): 691-696.

Mitchison, T. J. and L. P. Cramer (1996). "Actin-based cell motility and cell locomotion." <u>Cell</u> 84(3): 371-379.

Miyazaki, K. (2006). "Laminin-5 (laminin-332): Unique biological activity and role in tumor growth and invasion." <u>Cancer Sci</u> 97(2): 91-98.

Moali, C. and D. J. Hulmes (2009). "Extracellular and cell surface proteases in wound healing: new players are still emerging." <u>Eur J Dermatol</u> **19**(6): 552-564.

Mohan, R., S. K. Chintala, et al. (2002). "Matrix metalloproteinase gelatinase B (MMP-9) coordinates and effects epithelial regeneration." J Biol Chem 277(3): 2065-2072.

Mohan, R., W. B. Rinehart, et al. (1998). "Gelatinase B/lacZ transgenic mice, a model for mapping gelatinase B expression during developmental and injury-related tissue remodeling." J Biol Chem **273**(40): 25903-25914.

Mohan, R. R., W. J. Kim, et al. (2000). "Modulation of TNF-alpha-induced apoptosis in corneal fibroblasts by transcription factor NF-kappaB." <u>Invest Ophthalmol Vis Sci</u> **41**(6): 1327-1336.

Mohan, R. R., Q. Liang, et al. (1997). "Apoptosis in the cornea: further characterization of Fas/Fas ligand system." <u>Exp Eye Res</u> **65**(4): 575-589.

Moldovan, S. M., V. Borderie, et al. (1999). "[Treatment of unilateral limbal stem cell deficiency syndrome by limbal autograft]." J Fr Ophtalmol **22**(3): 302-309.

Monje, P., J. Hernandez-Losa, et al. (2005). "Regulation of the transcriptional activity of c-Fos by ERK. A novel role for the prolyl isomerase PIN1." J Biol Chem **280**(42): 35081-35084.

Monje, P., M. J. Marinissen, et al. (2003). "Phosphorylation of the carboxyl-terminal transactivation domain of c-Fos by extracellular signal-regulated kinase mediates the transcriptional activation of AP-1 and cellular transformation induced by platelet-derived growth factor." <u>Mol Cell Biol</u> **23**(19): 7030-7043.

Monteiro, B. G., R. C. Serafim, et al. (2009). "Human immature dental pulp stem cells share key characteristic features with limbal stem cells." <u>Cell Prolif</u> **42**(5): 587-594.

Morgan, S. and A. Murray (1996). "Limbal autotransplantation in the acute and chronic phases of severe chemical injuries." Eye (Lond) **10 (Pt 3)**: 349-354.

Morimoto, K., H. Mishima, et al. (1993). "Role of urokinase type plasminogen activator (u-PA) in corneal epithelial migration." <u>Thromb Haemost</u> **69**(4): 387-391.

Mort, R. L., T. Ramaesh, et al. (2009). "Mosaic analysis of stem cell function and wound healing in the mouse corneal epithelium." <u>BMC Dev Biol</u> **9**: 4.

Moser, M., K. R. Legate, et al. (2009). "The tail of integrins, talin, and kindlins." <u>Science</u> **324**(5929): 895-899.

Moser, M., B. Nieswandt, et al. (2008). "Kindlin-3 is essential for integrin activation and platelet aggregation." <u>Nat Med</u> 14(3): 325-330.

Mould, A. P., S. K. Akiyama, et al. (1995). "Regulation of integrin alpha 5 beta 1-fibronectin interactions by divalent cations. Evidence for distinct classes of binding sites for Mn2+, Mg2+, and Ca2+." J Biol Chem **270**(44): 26270-26277.

Mould, A. P., J. A. Askari, et al. (1997). "Defining the topology of integrin alpha5beta1-fibronectin interactions using inhibitory anti-alpha5 and anti-beta1 monoclonal antibodies. Evidence that the synergy sequence of fibronectin is recognized by the amino-terminal repeats of the alpha5 subunit." J Biol Chem **272**(28): 17283-17292.

Mould, A. P., A. Komoriya, et al. (1991). "The CS5 peptide is a second site in the IIICS region of fibronectin recognized by the integrin alpha 4 beta 1. Inhibition of alpha 4 beta 1 function by RGD peptide homologues." J Biol Chem 266(6): 3579-3585.

Mould, A. P., E. J. Symonds, et al. (2003). "Structure of an integrin-ligand complex deduced from solution x-ray scattering and site-directed mutagenesis." J Biol Chem **278**(41): 39993-39999.

Mukhopadhyay, S. S. and J. M. Rosen (2007). "The C-terminal domain of the nuclear factor I-B2 isoform is glycosylated and transactivates the WAP gene in the JEG-3 cells." <u>Biochem Biophys Res</u> <u>Commun</u> **358**(3): 770-776.

Mulholland, B., S. J. Tuft, et al. (2005). "Matrix metalloproteinase distribution during early corneal wound healing." Eye (Lond) **19**(5): 584-588.

Muller, L. J., C. F. Marfurt, et al. (2003). "Corneal nerves: structure, contents and function." <u>Exp</u> Eye Res **76**(5): 521-542.

Muller, S., M. Berger, et al. (2000). "c-Jun and p53 activity is modulated by SUMO-1 modification." J Biol Chem 275(18): 13321-13329.

Murad, S., S. Tajima, et al. (1983). "Collagen synthesis in cultured human skin fibroblasts: effect of ascorbic acid and its analogs." J Invest Dermatol **81**(2): 158-162.

Murakami, J., T. Nishida, et al. (1992). "Coordinated appearance of beta 1 integrins and fibronectin during corneal wound healing." <u>J Lab Clin Med</u> **120**(1): 86-93.

Murphy, G., S. Atkinson, et al. (1992). "The role of plasminogen activators in the regulation of connective tissue metalloproteinases." <u>Ann N Y Acad Sci</u> 667: 1-12.

Murphy, G., H. Stanton, et al. (1999). "Mechanisms for pro matrix metalloproteinase activation." <u>APMIS</u> **107**(1): 38-44.

Murphy, L. O., J. P. MacKeigan, et al. (2004). "A network of immediate early gene products propagates subtle differences in mitogen-activated protein kinase signal amplitude and duration." <u>Mol Cell Biol</u> **24**(1): 144-153.

Murphy, L. O., S. Smith, et al. (2002). "Molecular interpretation of ERK signal duration by immediate early gene products." <u>Nat Cell Biol</u> **4**(8): 556-564.

Murtagh, J., F. Martin, et al. (2003). "The Nuclear Factor I (NFI) gene family in mammary gland development and function." J Mammary Gland Biol Neoplasia **8**(2): 241-254.

Murthy, S., A. J. Ryan, et al. (2012). "SP-1 regulation of MMP-9 expression requires Ser586 in the PEST domain." <u>Biochem J</u> 445(2): 229-236.

Musti, A. M., M. Treier, et al. (1997). "Reduced ubiquitin-dependent degradation of c-Jun after phosphorylation by MAP kinases." <u>Science</u> **275**(5298): 400-402.

Nagai, T., N. Yamakawa, et al. (1991). "Monoclonal antibody characterization of two distant sites required for function of the central cell-binding domain of fibronectin in cell adhesion, cell migration, and matrix assembly." J Cell Biol 114(6): 1295-1305.

Nagase, H., R. Visse, et al. (2006). "Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs." <u>Cardiovasc Res</u> 69(3): 562-573.

Nagase, H. and J. F. Woessner, Jr. (1999). "Matrix metalloproteinases." J Biol Chem 274(31): 21491-21494.

Nagata, D., E. Suzuki, et al. (2001). "Transcriptional activation of the cyclin D1 gene is mediated by multiple cis-elements, including SP1 sites and a cAMP-responsive element in vascular endothelial cells." J Biol Chem 276(1): 662-669.

Nakagawa, S., T. Nishida, et al. (1990). "Spreading of cultured corneal epithelial cells on fibronectin and other extracellular matrices." Cornea 9(2): 125-130.

Nakagawa, S., T. Nishida, et al. (1985). "Actin organization in migrating corneal epithelium of rabbits in situ." <u>Exp Eye Res</u> **41**(3): 335-343.

Nakamura, K., D. Kurosaka, et al. (2002). "Injured corneal epithelial cells promote myodifferentiation of corneal fibroblasts." Invest Ophthalmol Vis Sci **43**(8): 2603-2608.

Nakamura, M., T. Chikama, et al. (1998b). "Up-regulation of integrin alpha 5 expression by combination of substance P and insulin-like growth factor-1 in rabbit corneal epithelial cells." <u>Biochem Biophys Res Commun</u> **246**(3): 777-782.

Nakamura, M., T. Chikama, et al. (1999). "Synergistic effect with Phe-Gly-Leu-Met-NH2 of the C-terminal of substance P and insulin-like growth factor-1 on epithelial wound healing of rabbit cornea." <u>Br J Pharmacol</u> **127**(2): 489-497.

Nakamura, M., M. Kawahara, et al. (2003). "Restoration of corneal epithelial barrier function and wound healing by substance P and IGF-1 in rats with capsaicin-induced neurotrophic keratopathy." Invest Ophthalmol Vis Sci 44(7): 2937-2940.

Nakamura, M., T. Nagano, et al. (1998c). "Up-regulation of phosphorylation of focal adhesion kinase and paxillin by combination of substance P and IGF-1 in SV-40 transformed human corneal epithelial cells." <u>Biochem Biophys Res Commun</u> **242**(1): 16-20.

Nakamura, M. and T. Nishida (1999). "Differential effects of epidermal growth factor and interleukin 6 on corneal epithelial cells and vascular endothelial cells." <u>Cornea</u> **18**(4): 452-458.

Nakamura, M., T. Nishida, et al. (1994). "Combined effects of hyaluronan and fibronectin on corneal epithelial wound closure of rabbit in vivo." <u>Curr Eye Res</u> **13**(5): 385-388.

Nakamura, M., T. Nishida, et al. (1997). "Synergistic effect of substance P with epidermal growth factor on epithelial migration in rabbit cornea." <u>Exp Eye Res</u> **65**(3): 321-329.

Nakamura, M., T. Okura, et al. (2001). "Nuclear factor 1 is a negative regulator of gadd153 gene expression in vascular smooth muscle cells." <u>Hypertension</u> **37**(2 Pt 2): 419-424.

Nakamura, T., T. Inatomi, et al. (2004b). "Transplantation of cultivated autologous oral mucosal epithelial cells in patients with severe ocular surface disorders." <u>Br J Ophthalmol</u> **88**(10): 1280-1284.

Nakamura, T., T. Inatomi, et al. (2004a). "Successful primary culture and autologous transplantation of corneal limbal epithelial cells from minimal biopsy for unilateral severe ocular surface disease." <u>Acta Ophthalmol Scand</u> **82**(4): 468-471.

Nakamura, T., K. Takeda, et al. (2011). "Long-term results of autologous cultivated oral mucosal epithelial transplantation in the scar phase of severe ocular surface disorders." <u>Br J Ophthalmol</u> **95**(7): 942-946.

Nakamura, Y., C. Sotozono, et al. (1998a). "Inflammatory cytokines in normal human tears." <u>Curr Eye Res</u> **17**(6): 673-676.

Nakamura, Y., C. Sotozono, et al. (2001). "The epidermal growth factor receptor (EGFR): role in corneal wound healing and homeostasis." <u>Exp Eye Res</u> **72**(5): 511-517.

Nakashima, Y., Y. Kariya, et al. (2005). "Regulation of cell adhesion and type VII collagen binding by the beta3 chain short arm of laminin-5: effect of its proteolytic cleavage." J Biochem 138(5): 539-552.

Nakayasu, K., M. Tanaka, et al. (1986). "Distribution of types I, II, III, IV and V collagen in normal and keratoconus corneas." <u>Ophthalmic Res</u> **18**(1): 1-10.

Nam, E. H., Y. Lee, et al. (2012). "ZEB2 upregulates integrin alpha5 expression through cooperation with Sp1 to induce invasion during epithelial-mesenchymal transition of human cancer cells." <u>Carcinogenesis</u> **33**(3): 563-571.

Nam, E. H., Y. Lee, et al. (2014). "ZEB2-Sp1 cooperation induces invasion by upregulating cadherin-11 and integrin alpha5 expression." <u>Carcinogenesis</u> **35**(2): 302-314.

Nam, J. M., K. M. Ahmed, et al. (2013). "beta1-Integrin via NF-kappaB signaling is essential for acquisition of invasiveness in a model of radiation treated in situ breast cancer." <u>Breast Cancer Res</u> **15**(4): R60.

Natarajan, E., J. D. Omobono, 2nd, et al. (2006). "A keratinocyte hypermotility/growth-arrest response involving laminin 5 and p16INK4A activated in wound healing and senescence." <u>Am J Pathol</u> **168**(6): 1821-1837.

Natarajan, E., J. D. Omobono, 2nd, et al. (2005). "Co-expression of p16INK4A and laminin 5 by keratinocytes: a wound-healing response coupling hypermotility with growth arrest that goes awry during epithelial neoplastic progression." J Investig Dermatol Symp Proc **10**(2): 72-85.

Nehls, M. C., M. L. Grapilon, et al. (1992). "NF-I/Sp1 switch elements regulate collagen alpha 1(I) gene expression." DNA Cell Biol 11(6): 443-452.

Nelson, J. D., V. Silverman, et al. (1990). "Corneal epithelial wound healing: a tissue culture assay on the effect of antibiotics." Curr Eye Res 9(3): 277-285.

Nesti, L. J., E. J. Caterson, et al. (2002). "TGF-beta1 calcium signaling increases alpha5 integrin expression in osteoblasts." J Orthop Res **20**(5): 1042-1049.

Nesvizhskii, A. I., A. Keller, et al. (2003). "A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry." <u>Anal Chem</u> **75**(17): 4646-4658.

Newsome, D. A., J. Gross, et al. (1982). "Human corneal stroma contains three distinct collagens." Invest Ophthalmol Vis Sci 22(3): 376-381.

Nguyen, B. P., M. C. Ryan, et al. (2000). "Deposition of laminin 5 in epidermal wounds regulates integrin signaling and adhesion." <u>Curr Opin Cell Biol</u> **12**(5): 554-562.

Nievers, M. G., R. Q. Schaapveld, et al. (1999). "Biology and function of hemidesmosomes." <u>Matrix Biol</u> 18(1): 5-17.

Nilsson, J., G. Bjursell, et al. (2006). "Nuclear Jak2 and transcription factor NF1-C2: a novel mechanism of prolactin signaling in mammary epithelial cells." <u>Mol Cell Biol</u> **26**(15): 5663-5674.

Nishida, K., S. Kinoshita, et al. (1994). "Immunohistochemical localization of transforming growth factor-beta 1, -beta 2, and -beta 3 latency-associated peptide in human cornea." <u>Invest Ophthalmol</u> <u>Vis Sci</u> **35**(8): 3289-3294.

Nishida, K., C. Sotozono, et al. (1995). "Transforming growth factor-beta 1, -beta 2 and -beta 3 mRNA expression in human cornea." <u>Curr Eye Res</u> 14(3): 235-241.

Nishida, K., M. Yamato, et al. (2004a). "Functional bioengineered corneal epithelial sheet grafts from corneal stem cells expanded ex vivo on a temperature-responsive cell culture surface." <u>Transplantation</u> 77(3): 379-385.

Nishida, K., M. Yamato, et al. (2004b). "Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of autologous oral mucosal epithelium." <u>N Engl J Med</u> **351**(12): 1187-1196.

Nishida, T. (2005). "Neurotrophic mediators and corneal wound healing." Ocul Surf 3(4): 194-202.

Nishida, T., S. Nakagawa, et al. (1983). "Fibronectin promotes epithelial migration of cultured rabbit cornea in situ." J Cell Biol **97**(5 Pt 1): 1653-1657.

Nishida, T., S. Nakagawa, et al. (1982). "Fibronectin in corneal wound healing: appearance in cultured rabbit cornea." Jpn J Ophthalmol **26**(4): 410-415.

Nishida, T., M. Nakamura, et al. (1990). "Differential modes of action of fibronectin and epidermal growth factor on rabbit corneal epithelial migration." J Cell Physiol **145**(3): 549-554.

Nishida, T., M. Nakamura, et al. (1992b). "Interleukin 6 promotes epithelial migration by a fibronectin-dependent mechanism." J Cell Physiol **153**(1): 1-5.

Nishida, T., M. Nakamura, et al. (1992a). "Interleukin 6 facilitates corneal epithelial wound closure in vivo." <u>Arch Ophthalmol</u> **110**(9): 1292-1294.

Nishida, T., M. Nakamura, et al. (1992c). "Epidermal growth factor stimulates corneal epithelial cell attachment to fibronectin through a fibronectin receptor system." <u>Invest Ophthalmol Vis Sci</u> **33**(8): 2464-2469.

Nishida, T., M. Nakamura, et al. (1996). "Synergistic effects of substance P with insulin-like growth factor-1 on epithelial migration of the cornea." J Cell Physiol **169**(1): 159-166.

Nishida, T. and S. Saika (2011). Cornea and Sclera: Anatomy and Physiology. In: Cornea (3rd Edition). J. H. Krachmer, M. J. Mannis and E. Holland. St. Louis, Mo., Mosby/Elsevier: p. 3-24.

Nishida, T. and T. Tanaka (1996). "Extracellular matrix and growth factors in corneal wound healing." <u>Curr Opin Ophthalmol</u> 7(4): 2-11.

Nishimura, T., S. Toda, et al. (1998). "Effects of hepatocyte growth factor, transforming growth factor-beta1 and epidermal growth factor on bovine corneal epithelial cells under epithelial-keratocyte interaction in reconstruction culture." Exp Eye Res 66(1): 105-116.

Nishiuchi, R., O. Murayama, et al. (2003). "Characterization of the ligand-binding specificities of integrin alpha3beta1 and alpha6beta1 using a panel of purified laminin isoforms containing distinct alpha chains." J Biochem 134(4): 497-504.

Nishiuchi, R., J. Takagi, et al. (2006). "Ligand-binding specificities of laminin-binding integrins: a comprehensive survey of laminin-integrin interactions using recombinant alpha3beta1, alpha6beta1, alpha7beta1 and alpha6beta4 integrins." <u>Matrix Biol</u> **25**(3): 189-197.

Nomizu, M., Y. Kuratomi, et al. (1997). "Identification of cell binding sequences in mouse laminin gamma1 chain by systematic peptide screening." J Biol Chem **272**(51): 32198-32205.

Noti, J. D., C. Reinemann, et al. (1996). "Regulation of the leukocyte integrin gene CD11c is mediated by AP1 and Ets transcription factors." <u>Mol Immunol</u> **33**(2): 115-127.

Novak, A., N. Goyal, et al. (1992). "Four conserved cysteine residues are required for the DNA binding activity of nuclear factor I." J Biol Chem **267**(18): 12986-12990.

Novak, U., B. G. Cocks, et al. (1991). "A labile repressor acts through the NFkB-like binding sites of the human urokinase gene." <u>Nucleic Acids Res</u> **19**(12): 3389-3393.

Nusgens, B. V., P. Humbert, et al. (2001). "Topically applied vitamin C enhances the mRNA level of collagens I and III, their processing enzymes and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 1 in the human dermis." J Invest Dermatol **116**(6): 853-859.

Nykvist, P., H. Tu, et al. (2000). "Distinct recognition of collagen subtypes by alpha(1)beta(1) and alpha(2)beta(1) integrins. Alpha(1)beta(1) mediates cell adhesion to type XIII collagen." <u>J Biol</u> <u>Chem</u> **275**(11): 8255-8261.

O'Brien, T. P., Q. Li, et al. (1998). "Inflammatory response in the early stages of wound healing after excimer laser keratectomy." <u>Arch Ophthalmol</u> **116**(11): 1470-1474.

Ogawa, T., Y. Tsubota, et al. (2004). "Regulation of biological activity of laminin-5 by proteolytic processing of gamma2 chain." J Cell Biochem **92**(4): 701-714.

Ogino, H. and K. Yasuda (1998). "Induction of lens differentiation by activation of a bZIP transcription factor, L-Maf." <u>Science</u> **280**(5360): 115-118.

O'Hagan, R. C., R. G. Tozer, et al. (1996). "The activity of the Ets transcription factor PEA3 is regulated by two distinct MAPK cascades." <u>Oncogene</u> **13**(6): 1323-1333.

Ohashi, H., T. Maeda, et al. (1995). "Up-regulation of integrin alpha 5 beta 1 expression by interleukin-6 in rabbit corneal epithelial cells." <u>Exp Cell Res</u> **218**(2): 418-423.

Ohji, M., N. SundarRaj, et al. (1993). "Transforming growth factor-beta stimulates collagen and fibronectin synthesis by human corneal stromal fibroblasts in vitro." <u>Curr Eye Res</u> **12**(8): 703-709.

Ohyagi-Hara, C., K. Sawada, et al. (2013). "miR-92a inhibits peritoneal dissemination of ovarian cancer cells by inhibiting integrin alpha5 expression." <u>Am J Pathol</u> **182**(5): 1876-1889.

Okazaki, K. and N. Sagata (1995). "The Mos/MAP kinase pathway stabilizes c-Fos by phosphorylation and augments its transforming activity in NIH 3T3 cells." <u>EMBO J</u> 14(20): 5048-5059.

Ollivier, F. J., B. C. Gilger, et al. (2007). "Proteinases of the cornea and preocular tear film." <u>Vet</u> <u>Ophthalmol</u> **10**(4): 199-206.

Ono, K., S. Yokoo, et al. (2007). "Autologous transplantation of conjunctival epithelial cells cultured on amniotic membrane in a rabbit model." <u>Mol Vis</u> **13**: 1138-1143.

Opitz, O. G. and A. K. Rustgi (2000). "Interaction between Sp1 and cell cycle regulatory proteins is important in transactivation of a differentiation-related gene." <u>Cancer Res</u> **60**(11): 2825-2830.

Ordonez, P. and N. Di Girolamo (2012). "Limbal epithelial stem cells: role of the niche microenvironment." <u>Stem Cells</u> **30**(2): 100-107.

Orend, G. and R. Chiquet-Ehrismann (2006). "Tenascin-C induced signaling in cancer." <u>Cancer Lett</u> **244**(2): 143-163.

Ortega, N. and Z. Werb (2002). "New functional roles for non-collagenous domains of basement membrane collagens." J Cell Sci 115(Pt 22): 4201-4214.

Orwin, E. J. and A. Hubel (2000). "In vitro culture characteristics of corneal epithelial, endothelial, and keratocyte cells in a native collagen matrix." <u>Tissue Eng</u> 6(4): 307-319.

Osada, S., S. Daimon, et al. (1996). "Identification of DNA binding-site preferences for nuclear factor I-A." FEBS Lett **390**(1): 44-46.

O'Shea, E. K., R. Rutkowski, et al. (1992). "Mechanism of specificity in the Fos-Jun oncoprotein heterodimer." <u>Cell</u> **68**(4): 699-708.

Ottersen, O. P. and T. Vegge (1977). "Ultrastructure and distribution of intercellular junctions in corneal endothelium." <u>Acta Ophthalmol (Copenh)</u> **55**(1): 69-78.

Ouellet, S., F. Vigneault, et al. (2006). "Transcriptional regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21) gene by NFI in proliferating human cells." <u>Nucleic Acids Res</u> **34**(22): 6472-6487.

Ozanne, B. W., H. J. Spence, et al. (2007). "Transcription factors control invasion: AP-1 the first among equals." <u>Oncogene</u> **26**(1): 1-10.

Paallysaho, T., T. Tervo, et al. (1992). "Integrins in the normal and healing corneal epithelium." <u>Acta Ophthalmol Suppl</u>(202): 22-25.

Page, M. J. and E. Di Cera (2008). "Serine peptidases: classification, structure and function." <u>Cell</u> <u>Mol Life Sci</u> 65(7-8): 1220-1236.

Page-McCaw, A., A. J. Ewald, et al. (2007). "Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling." <u>Nat Rev Mol Cell Biol</u> **8**(3): 221-233.

Rapport-gratuit.com Le numero 1 mondial du mémoires

Pahl, H. L. (1999). "Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors." <u>Oncogene</u> **18**(49): 6853-6866.

Pal-Ghosh, S., A. Pajoohesh-Ganji, et al. (2014). "Cytokine deposition alters leukocyte morphology and initial recruitment of monocytes and gammadeltaT cells after corneal injury." <u>Invest</u> <u>Ophthalmol Vis Sci 55(4)</u>: 2757-2765.

Pancholi, S., A. Tullo, et al. (1998). "The effects of growth factors and conditioned media on the proliferation of human corneal epithelial cells and keratocytes." <u>Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol</u> **236**(1): 1-8.

Pang, K., L. Du, et al. (2010). "A rabbit anterior cornea replacement derived from acellular porcine cornea matrix, epithelial cells and keratocytes." <u>Biomaterials</u> **31**(28): 7257-7265.

Pankov, R., E. Cukierman, et al. (2000). "Integrin dynamics and matrix assembly: tensin-dependent translocation of alpha(5)beta(1) integrins promotes early fibronectin fibrillogenesis." <u>J Cell Biol</u> **148**(5): 1075-1090.

Pankov, R. and K. M. Yamada (2002). "Fibronectin at a glance." J Cell Sci 115(Pt 20): 3861-3863.

Park, S. J., J. Gadi, et al. (2011). "The forkhead transcription factor Foxc2 promotes osteoblastogenesis via up-regulation of integrin beta1 expression." <u>Bone</u> **49**(3): 428-438.

Parks, W. C. (1999). "Matrix metalloproteinases in repair." Wound Repair Regen 7(6): 423-432.

Parnigotto, P. P., V. Bassani, et al. (1998). "Bovine corneal stroma and epithelium reconstructed in vitro: characterisation and response to surfactants." Eye (Lond) 12 (Pt 2): 304-310.

Passegue, E. and E. F. Wagner (2000). "JunB suppresses cell proliferation by transcriptional activation of p16(INK4a) expression." <u>EMBO J</u> **19**(12): 2969-2979.

Pastor, J. C. and M. Calonge (1992). "Epidermal growth factor and corneal wound healing. A multicenter study." <u>Cornea</u> 11(4): 311-314.

Payne, J., H. Gong, et al. (2000). "Tyrosine phosphorylation: a critical component in the formation of hemidesmosomes." <u>Cell Tissue Res</u> **300**(3): 401-411.

Pei, D. and S. J. Weiss (1995). "Furin-dependent intracellular activation of the human stromelysin-3 zymogen." <u>Nature</u> **375**(6528): 244-247.

Pellegrini, G., C. E. Traverso, et al. (1997). "Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium." <u>Lancet</u> **349**(9057): 990-993.

Petroutsos, G., R. Guimaraes, et al. (1983). "Antibiotics and corneal epithelial wound healing." Arch Ophthalmol **101**(11): 1775-1778.

Petruzzelli, L., M. Takami, et al. (1999). "Structure and function of cell adhesion molecules." <u>Am J</u> <u>Med</u> **106**(4): 467-476.

Petsch, C., U. Schlotzer-Schrehardt, et al. (2014). "Novel collagen membranes for the reconstruction of the corneal surface." <u>Tissue Eng Part A</u> **20**(17-18): 2378-2389.

Philipsen, S. and G. Suske (1999). "A tale of three fingers: the family of mammalian Sp/XKLF transcription factors." <u>Nucleic Acids Res</u> **27**(15): 2991-3000.

Piccard, H., P. E. Van den Steen, et al. (2007). "Hemopexin domains as multifunctional liganding modules in matrix metalloproteinases and other proteins." J Leukoc Biol **81**(4): 870-892.

Plow, E. F., T. A. Haas, et al. (2000). "Ligand binding to integrins." J Biol Chem 275(29): 21785-21788.

Poole, C. A., N. H. Brookes, et al. (1993). "Keratocyte networks visualised in the living cornea using vital dyes." J Cell Sci 106 (Pt 2): 685-691.

Poree, B., M. Kypriotou, et al. (2008). "Interleukin-6 (IL-6) and/or soluble IL-6 receptor down-regulation of human type II collagen gene expression in articular chondrocytes requires a decrease of Sp1.Sp3 ratio and of the binding activity of both factors to the COL2A1 promoter." J Biol Chem **283**(8): 4850-4865.

Portales-Casamar, E., S. Thongjuea, et al. (2010). "JASPAR 2010: the greatly expanded openaccess database of transcription factor binding profiles." <u>Nucleic Acids Res</u> **38**(Database issue): D105-110.

Poschl, E., U. Schlotzer-Schrehardt, et al. (2004). "Collagen IV is essential for basement membrane stability but dispensable for initiation of its assembly during early development." <u>Development</u> **131**(7): 1619-1628.

Pothier, F., M. Ouellet, et al. (1992). "An improved CAT assay for promoter analysis in either transgenic mice or tissue culture cells." DNA Cell Biol **11**(1): 83-90.

Pouliot, R., D. Larouche, et al. (2002). "Reconstructed human skin produced in vitro and grafted on athymic mice." <u>Transplantation</u> **73**(11): 1751-1757.

Powell, D. W., R. C. Mifflin, et al. (1999). "Myofibroblasts. I. Paracrine cells important in health and disease." <u>Am J Physiol</u> 277(1 Pt 1): C1-9.

Prieto, A. L., G. M. Edelman, et al. (1993). "Multiple integrins mediate cell attachment to cytotactin/tenascin." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(21): 10154-10158.

Proulx, S., C. Audet, et al. (2009a). "Tissue engineering of feline corneal endothelium using a devitalized human cornea as carrier." <u>Tissue Eng Part A</u> **15**(7): 1709-1718.

Proulx, S., T. Bensaoula, et al. (2009b). "Transplantation of a tissue-engineered corneal endothelium reconstructed on a devitalized carrier in the feline model." <u>Invest Ophthalmol Vis Sci</u> **50**(6): 2686-2694.

Proulx, S., J. d'Arc Uwamaliya, et al. (2010). "Reconstruction of a human cornea by the self-assembly approach of tissue engineering using the three native cell types." <u>Mol Vis</u> 16: 2192-2201.

Proulx, S., S. L. Guerin, et al. (2003). "Effect of quiescence on integrin alpha5beta1 expression in human retinal pigment epithelium." Mol Vis **9**: 473-481.

Proulx, S., S. Landreville, et al. (2004). "Integrin alpha5 expression by the ARPE-19 cell line: comparison with primary RPE cultures and effect of growth medium on the alpha5 gene promoter strength." <u>Exp Eye Res</u> **79**(2): 157-165.

Puangsricharern, V. and S. C. Tseng (1995). "Cytologic evidence of corneal diseases with limbal stem cell deficiency." <u>Ophthalmology</u> **102**(10): 1476-1485.

Pulai, J. I., M. Del Carlo, Jr., et al. (2002). "The alpha5beta1 integrin provides matrix survival signals for normal and osteoarthritic human articular chondrocytes in vitro." <u>Arthritis Rheum</u> **46**(6): 1528-1535.

Pytela, R., M. D. Pierschbacher, et al. (1985). "Identification and isolation of a 140 kd cell surface glycoprotein with properties expected of a fibronectin receptor." <u>Cell</u> **40**(1): 191-198.

Qian, F., U. Kruse, et al. (1995). "Chromosomal localization of the four genes (NFIA, B, C, and X) for the human transcription factor nuclear factor I by FISH." <u>Genomics</u> **28**(1): 66-73.

Qin, L., X. Chen, et al. (2011). "Steroid receptor coactivator-1 upregulates integrin alpha(5) expression to promote breast cancer cell adhesion and migration." <u>Cancer Res</u> **71**(5): 1742-1751.

Qin, P. and M. A. Kurpakus (1998). "The role of laminin-5 in TGF alpha/EGF-mediated corneal epithelial cell motility." <u>Exp Eye Res</u> 66(5): 569-579.

Ra, H. J. and W. C. Parks (2007). "Control of matrix metalloproteinase catalytic activity." <u>Matrix</u> <u>Biol</u> **26**(8): 587-596.

Radner, W., M. Zehetmayer, et al. (1998). "Interlacing and cross-angle distribution of collagen lamellae in the human cornea." <u>Cornea</u> 17(5): 537-543.

Rafty, L. A., F. S. Santiago, et al. (2002). "NF1/X represses PDGF A-chain transcription by interacting with Sp1 and antagonizing Sp1 occupancy of the promoter." <u>EMBO J</u> **21**(3): 334-343.

Rajagopal, S., S. Huang, et al. (1997). "Control of fibronectin receptor expression by fibronectin: antisense fibronectin RNA downmodulates the induction of fibronectin receptor by transforming growth factor beta1." J Cell Physiol **170**(2): 138-144.

Ralph, W. M., Jr., K. Liu, et al. (2006). "CCAAT/enhancer-binding protein beta represses human papillomavirus 11 upstream regulatory region expression through a promoter-proximal YY1-binding site." J Gen Virol **87**(Pt 1): 51-59.

Rama, P., S. Bonini, et al. (2001). "Autologous fibrin-cultured limbal stem cells permanently restore the corneal surface of patients with total limbal stem cell deficiency." <u>Transplantation</u> **72**(9): 1478-1485.

Rama, P., S. Matuska, et al. (2010). "Limbal stem-cell therapy and long-term corneal regeneration." <u>N Engl J Med</u> **363**(2): 147-155.

Ramos, D. M., B. L. Chen, et al. (1997). "Stromal fibroblasts influence oral squamous-cell carcinoma cell interactions with tenascin-C." Int J Cancer **72**(2): 369-376.

Rao, S. K., R. Rajagopal, et al. (1999). "Limbal allografting from related live donors for corneal surface reconstruction." <u>Ophthalmology</u> **106**(4): 822-828.

Rayment, E. A., Z. Upton, et al. (2008). "Increased matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) activity observed in chronic wound fluid is related to the clinical severity of the ulcer." <u>Br J Dermatol</u> **158**(5): 951-961.

Reichl, S., J. Bednarz, et al. (2004). "Human corneal equivalent as cell culture model for in vitro drug permeation studies." <u>Br J Ophthalmol</u> **88**(4): 560-565.

Reichl, S. and C. C. Muller-Goymann (2003). "The use of a porcine organotypic cornea construct for permeation studies from formulations containing befunolol hydrochloride." <u>Int J Pharm</u> **250**(1): 191-201.

Reifel-Miller, A. E., D. S. Calnek, et al. (1994). "Tyrosine phosphorylation regulates the DNA binding activity of a nuclear factor 1-like repressor protein." J Biol Chem **269**(39): 23861-23864.

Reim, M., A. Kottek, et al. (1997). "The cornea surface and wound healing." <u>Prog Retin Eye Res</u> **16**(2): 183-225.

Remington, L. A. (2012). <u>Clinical anatomy and physiology of the visual system (3rd Edition)</u>. St. Louis, Mo, Elsevier/Butterworth-Heinemann.

Ren, R., A. E. Hutcheon, et al. (2008). "Human primary corneal fibroblasts synthesize and deposit proteoglycans in long-term 3-D cultures." <u>Dev Dyn</u> **237**(10): 2705-2715.

Reuning, U. (2011). "Integrin alphavbeta3 promotes vitronectin gene expression in human ovarian cancer cells by implicating rel transcription factors." J Cell Biochem **112**(7): 1909-1919.

Ricard-Blum, S. (2011). "The collagen family." Cold Spring Harb Perspect Biol 3(1): a004978.

Ricard-Blum, S. and F. Ruggiero (2005). "The collagen superfamily: from the extracellular matrix to the cell membrane." <u>Pathol Biol (Paris)</u> **53**(7): 430-442.

Richard, N. R., J. A. Anderson, et al. (1991). "Air/liquid corneal organ culture: a light microscopic study." <u>Curr Eye Res</u> **10**(8): 739-749.

Ristiniemi, J. and J. Oikarinen (1989). "Histone H1 binds to the putative nuclear factor I recognition sequence in the mouse alpha 2(I) collagen promoter." J Biol Chem **264**(4): 2164-2174.

Ritchie, C. K., A. Giordano, et al. (2000). "Integrin involvement in glioblastoma multiforme: possible regulation by NF-kappaB." J Cell Physiol **184**(2): 214-221.

Robbins, K. C., L. Summaria, et al. (1967). "The peptide chains of human plasmin. Mechanism of activation of human plasminogen to plasmin." J Biol Chem **242**(10): 2333-2342.

Robert, L., J. M. Legeais, et al. (2001). "Corneal collagens." Pathologie Biologie 49(4): 353-363.

Roberts, A. B., K. C. Flanders, et al. (1988). "Transforming growth factor beta: biochemistry and roles in embryogenesis, tissue repair and remodeling, and carcinogenesis." <u>Recent Prog Horm Res</u> **44**: 157-197.

Roberts, A. B., U. I. Heine, et al. (1990). "Transforming growth factor-beta. Major role in regulation of extracellular matrix." <u>Ann N Y Acad Sci</u> **580**: 225-232.

Robinson, E. E., R. A. Foty, et al. (2004). "Fibronectin matrix assembly regulates alpha5beta1mediated cell cohesion." <u>Mol Biol Cell</u> **15**(3): 973-981.

Robinson, E. E., K. M. Zazzali, et al. (2003). "Alpha5beta1 integrin mediates strong tissue cohesion." J Cell Sci 116(Pt 2): 377-386.

Romberger, D. J. (1997). "Fibronectin." Int J Biochem Cell Biol 29(7): 939-943.

Roos, M. D., K. Su, et al. (1997). "O glycosylation of an Sp1-derived peptide blocks known Sp1 protein interactions." <u>Mol Cell Biol</u> **17**(11): 6472-6480.

Rose, J. L., H. Huang, et al. (2005). "Integrin engagement increases histone H3 acetylation and reduces histone H1 association with DNA in murine lung endothelial cells." *Mol Pharmacol* **68**(2): 439-446.

Rosmarin, A. G., M. Luo, et al. (1998). "Sp1 cooperates with the ets transcription factor, GABP, to activate the CD18 (beta2 leukocyte integrin) promoter." J Biol Chem **273**(21): 13097-13103.

Rotheneder, H., S. Geymayer, et al. (1999). "Transcription factors of the Sp1 family: interaction with E2F and regulation of the murine thymidine kinase promoter." J Mol Biol **293**(5): 1005-1015.

Roulet, E., P. Bucher, et al. (2000). "Experimental analysis and computer prediction of CTF/NFI transcription factor DNA binding sites." J Mol Biol **297**(4): 833-848.

Roulet, E., S. Busso, et al. (2002). "High-throughput SELEX SAGE method for quantitative modeling of transcription-factor binding sites." <u>Nat Biotechnol</u> **20**(8): 831-835.

Roy, R. J., P. Gosselin, et al. (1991). "A short protocol for micro-purification of nuclear proteins from whole animal tissue." <u>Biotechniques</u> **11**(6): 770-777.

Ruberti, J. W. and J. D. Zieske (2008). "Prelude to corneal tissue engineering - gaining control of collagen organization." <u>Prog Retin Eye Res</u> 27(5): 549-577.

Ruggiero, F., C. Burillon, et al. (1996). "Human corneal fibrillogenesis. Collagen V structural analysis and fibrillar assembly by stromal fibroblasts in culture." <u>Invest Ophthalmol Vis Sci</u> **37**(9): 1749-1760.

Ruoslahti, E. (1996). "RGD and other recognition sequences for integrins." <u>Annu Rev Cell Dev</u> <u>Biol</u> **12**: 697-715.

Ruoslahti, E. and J. C. Reed (1994). "Anchorage dependence, integrins, and apoptosis." <u>Cell</u> 77(4): 477-478.

Saffer, J. D., S. P. Jackson, et al. (1991). "Developmental expression of Sp1 in the mouse." <u>Mol</u> <u>Cell Biol</u> **11**(4): 2189-2199.

Saghizadeh, M., D. J. Brown, et al. (2001). "Overexpression of matrix metalloproteinase-10 and matrix metalloproteinase-3 in human diabetic corneas: a possible mechanism of basement membrane and integrin alterations." <u>Am J Pathol</u> **158**(2): 723-734.

Saghizadeh, M., I. Epifantseva, et al. (2013). "Enhanced wound healing, kinase and stem cell marker expression in diabetic organ-cultured human corneas upon MMP-10 and cathepsin F gene silencing." <u>Invest Ophthalmol Vis Sci</u> **54**(13): 8172-8180.

Saika, S. (1992). "Ultrastructural effect of L-ascorbic acid 2-phosphate on cultured keratocytes." <u>Cornea</u> **11**(5): 439-445.

Saika, S., Y. Ohnishi, et al. (2002). "Epithelial repair: roles of extracellular matrix." <u>Cornea</u> 21(2 Suppl 1): S23-29.

Saika, S., A. Shiraishi, et al. (2000). "Role of lumican in the corneal epithelium during wound healing." J Biol Chem 275(4): 2607-2612.

Sakai, L. Y., D. R. Keene, et al. (1986). "Type VII collagen is a major structural component of anchoring fibrils." J Cell Biol **103**(4): 1577-1586.

Sakakura, T. and I. Kusano (1991). "Tenascin in tissue perturbation repair." <u>Acta Pathol Jpn</u> **41**(4): 247-258.

Sakamoto, S., K. Inada, et al. (1991). "[Production of IL-6 and IL-1 alpha by human corneal epithelial cells]." <u>Nihon Ganka Gakkai Zasshi</u> **95**(8): 728-732.

Salmivirta, M., M. Mali, et al. (1994). "A novel laminin-binding form of syndecan-1 (cell surface proteoglycan) produced by syndecan-1 cDNA-transfected NIH-3T3 cells." <u>Exp Cell Res</u> **215**(1): 180-188.

Sambursky, R. and T. P. O'Brien (2011). "MMP-9 and the perioperative management of LASIK surgery." <u>Curr Opin Ophthalmol</u> 22(4): 294-303.

Sanders, M. A. and M. D. Basson (2000). "Collagen IV-dependent ERK activation in human Caco-2 intestinal epithelial cells requires focal adhesion kinase." J Biol Chem **275**(48): 38040-38047.

Sanders, M. A. and M. D. Basson (2004). "Collagen IV regulates Caco-2 migration and ERK activation via alpha1beta1- and alpha2beta1-integrin-dependent Src kinase activation." <u>Am J</u> <u>Physiol Gastrointest Liver Physiol</u> **286**(4): G547-557.

Sangwan, V. S. (2001). "Limbal stem cells in health and disease." Biosci Rep 21(4): 385-405.

Sangwan, V. S., G. K. Vemuganti, et al. (2003). "Successful reconstruction of damaged ocular outer surface in humans using limbal and conjuctival stem cell culture methods." <u>Biosci Rep</u> **23**(4): 169-174.

Santhiago, M. R., M. V. Netto, et al. (2012). "Mitomycin C: biological effects and use in refractive surgery." <u>Cornea</u> **31**(3): 311-321.

Sasaki, S., S. Funamoto, et al. (2009). "In vivo evaluation of a novel scaffold for artificial corneas prepared by using ultrahigh hydrostatic pressure to decellularize porcine corneas." <u>Mol Vis</u> **15**: 2022-2028.

Sasaki, T., R. Fässler, et al. (2004). "Laminin: the crux of basement membrane assembly." <u>J Cell</u> <u>Biol</u> **164**(7): 959-963. Sato, N., M. Nakamura, et al. (1999). "Abnormal deposition of laminin and type IV collagen at corneal epithelial basement membrane during wound healing in diabetic rats." Jpn J Ophthalmol **43**(5): 343-347.

Sawada, H., H. Konomi, et al. (1990). "Characterization of the collagen in the hexagonal lattice of Descemet's membrane: its relation to type VIII collagen." J Cell Biol **110**(1): 219-227.

Sawada, K., A. K. Mitra, et al. (2008). "Loss of E-cadherin promotes ovarian cancer metastasis via alpha 5-integrin, which is a therapeutic target." <u>Cancer Res</u> **68**(7): 2329-2339.

Sawhney, R. S., M. M. Cookson, et al. (2006). "Integrin alpha2-mediated ERK and calpain activation play a critical role in cell adhesion and motility via focal adhesion kinase signaling: identification of a novel signaling pathway." J Biol Chem **281**(13): 8497-8510.

Schermer, A., S. Galvin, et al. (1986). "Differentiation-related expression of a major 64K corneal keratin in vivo and in culture suggests limbal location of corneal epithelial stem cells." <u>J Cell Biol</u> **103**(1): 49-62.

Schlotzer-Schrehardt, U., T. Dietrich, et al. (2007). "Characterization of extracellular matrix components in the limbal epithelial stem cell compartment." <u>Exp Eye Res</u> **85**(6): 845-860.

Schlotzer-Schrehardt, U. and F. E. Kruse (2005). "Identification and characterization of limbal stem cells." <u>Exp Eye Res</u> **81**(3): 247-264.

Schmidinger, G., G. Hanselmayer, et al. (2003). "Effect of tenascin and fibronectin on the migration of human corneal fibroblasts." <u>J Cataract Refract Surg</u> **29**(2): 354-360.

Schnapp, L. M., N. Hatch, et al. (1995). "The human integrin alpha 8 beta 1 functions as a receptor for tenascin, fibronectin, and vitronectin." J Biol Chem **270**(39): 23196-23202.

Schneider, A. I., K. Maier-Reif, et al. (1999). "Constructing an in vitro cornea from cultures of the three specific corneal cell types." In Vitro Cell Dev Biol Anim **35**(9): 515-526.

Schneider, R., I. Gander, et al. (1986). "A sensitive and rapid gel retention assay for nuclear factor I and other DNA-binding proteins in crude nuclear extracts." <u>Nucleic Acids Res</u> **14**(3): 1303-1317.

Schonbeck, U., F. Mach, et al. (1998). "Generation of biologically active IL-1 beta by matrix metalloproteinases: a novel caspase-1-independent pathway of IL-1 beta processing." <u>J Immunol</u> **161**(7): 3340-3346.

Schreiber, M., A. Kolbus, et al. (1999). "Control of cell cycle progression by c-Jun is p53 dependent." <u>Genes Dev</u> **13**(5): 607-619.

Schwab, I. R. (1999). "Cultured corneal epithelia for ocular surface disease." <u>Trans Am Ophthalmol</u> <u>Soc</u> **97**: 891-986.

Schwab, I. R., M. Reyes, et al. (2000). "Successful transplantation of bioengineered tissue replacements in patients with ocular surface disease." <u>Cornea</u> **19**(4): 421-426.

Schwarzbauer, J. E. and D. W. DeSimone (2011). "Fibronectins, their fibrillogenesis, and in vivo functions." <u>Cold Spring Harb Perspect Biol</u> **3**(7): a005041.

Scott, J. E. (1991). "Proteoglycan: collagen interactions and corneal ultrastructure." <u>Biochem Soc</u> <u>Trans</u> **19**(4): 877-881.

Seldeen, K. L., C. B. McDonald, et al. (2009). "Single nucleotide variants of the TGACTCA motif modulate energetics and orientation of binding of the Jun-Fos heterodimeric transcription factor." <u>Biochemistry</u> **48**(9): 1975-1983.

Selden, R. F., K. B. Howie, et al. (1986). "Human growth hormone as a reporter gene in regulation studies employing transient gene expression." <u>Mol Cell Biol</u> **6**(9): 3173-3179.

Sen, T., A. Dutta, et al. (2010). "Fibronectin induces matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in human laryngeal carcinoma cells by involving multiple signaling pathways." <u>Biochimie</u> **92**(10): 1422-1434.

Seoane, J., H. V. Le, et al. (2002). "Myc suppression of the p21(Cip1) Cdk inhibitor influences the outcome of the p53 response to DNA damage." <u>Nature</u> **419**(6908): 729-734.

Seoane, J., C. Pouponnot, et al. (2001). "TGFbeta influences Myc, Miz-1 and Smad to control the CDK inhibitor p15INK4b." <u>Nat Cell Biol</u> **3**(4): 400-408.

Shafiq, M. A., R. A. Gemeinhart, et al. (2012). "Decellularized human cornea for reconstructing the corneal epithelium and anterior stroma." <u>Tissue Eng Part C Methods</u> **18**(5): 340-348.

Shang, M., N. Koshikawa, et al. (2001). "The LG3 module of laminin-5 harbors a binding site for integrin alpha3beta1 that promotes cell adhesion, spreading, and migration." J Biol Chem 276(35): 33045-33053.

Sharma, H. W., K. Higgins-Sochaski, et al. (1995). "A DNA motif present in alpha V integrin promoter exhibits dual binding preference to distinct transcription factors." <u>Anticancer Res</u> **15**(5B): 1857-1867.

Shaulian, E. and M. Karin (2001). "AP-1 in cell proliferation and survival." Oncogene 20(19): 2390-2400.

Shaulian, E. and M. Karin (2002). "AP-1 as a regulator of cell life and death." <u>Nat Cell Biol</u> 4(5): E131-136.

Sheppard, D. (1996). "Epithelial integrins." Bioessays 18(8): 655-660.

Shimada, N., T. Aya-Murata, et al. (2003). "Cooperative action between L-Maf and Sox2 on deltacrystallin gene expression during chick lens development." <u>Mech Dev</u> **120**(4): 455-465.

Shimazaki, J., M. Aiba, et al. (2002). "Transplantation of human limbal epithelium cultivated on amniotic membrane for the treatment of severe ocular surface disorders." <u>Ophthalmology</u> **109**(7): 1285-1290.

Shinde, A. V., C. Bystroff, et al. (2008). "Identification of the peptide sequences within the EIIIA (EDA) segment of fibronectin that mediate integrin alpha9beta1-dependent cellular activities." J Biol Chem **283**(5): 2858-2870.

Shiraishi, A., R. L. Converse, et al. (1998). "Identification of the cornea-specific keratin 12 promoter by in vivo particle-mediated gene transfer." <u>Invest Ophthalmol Vis Sci</u> **39**(13): 2554-2561.

Shirasaki, F., H. A. Makhluf, et al. (1999). "Ets transcription factors cooperate with Sp1 to activate the human tenascin-C promoter." <u>Oncogene</u> **18**(54): 7755-7764.

Silverman, G. A., P. I. Bird, et al. (2001). "The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. Evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and a revised nomenclature." J Biol Chem **276**(36): 33293-33296.

Simmons, S. J., M. M. Jumblatt, et al. (1987). "Corneal epithelial wound closure in tissue culture: an in vitro model of ocular irritancy." <u>Toxicol Appl Pharmacol</u> **88**(1): 13-23.

Sincock, P. M., G. Mayrhofer, et al. (1997). "Localization of the transmembrane 4 superfamily (TM4SF) member PETA-3 (CD151) in normal human tissues: comparison with CD9, CD63, and alpha5beta1 integrin." J Histochem Cytochem **45**(4): 515-525.

Sisci, D., E. Middea, et al. (2010). "17beta-estradiol enhances alpha(5) integrin subunit gene expression through ERalpha-Sp1 interaction and reduces cell motility and invasion of ERalpha-positive breast cancer cells." <u>Breast Cancer Res Treat</u> **124**(1): 63-77.

Sivak, J. M. and M. E. Fini (2002). "MMPs in the eye: emerging roles for matrix metalloproteinases in ocular physiology." <u>Prog Retin Eye Res</u> **21**(1): 1-14.

Sivak, J. M., R. Mohan, et al. (2000). "Pax-6 expression and activity are induced in the reepithelializing cornea and control activity of the transcriptional promoter for matrix metalloproteinase gelatinase B." <u>Dev Biol</u> **222**(1): 41-54.

Sivak, J. M., J. A. West-Mays, et al. (2004). "Transcription Factors Pax6 and AP-2alpha Interact To Coordinate Corneal Epithelial Repair by Controlling Expression of Matrix Metalloproteinase Gelatinase B." <u>Mol Cell Biol</u> **24**(1): 245-257.

Smeal, T., M. Hibi, et al. (1994). "Altering the specificity of signal transduction cascades: positive regulation of c-Jun transcriptional activity by protein kinase A." <u>EMBO J</u> **13**(24): 6006-6010.

Solomon, A., P. Ellies, et al. (2002). "Long-term outcome of keratolimbal allograft with or without penetrating keratoplasty for total limbal stem cell deficiency." <u>Ophthalmology</u> **109**(6): 1159-1166.

Somerville, R. P., S. A. Oblander, et al. (2003). "Matrix metalloproteinases: old dogs with new tricks." <u>Genome Biol</u> 4(6): 216.

Sonnenberg, A., C. J. Linders, et al. (1990). "Integrin recognition of different cell-binding fragments of laminin (P1, E3, E8) and evidence that alpha 6 beta 1 but not alpha 6 beta 4 functions as a major receptor for fragment E8." J Cell Biol **110**(6): 2145-2155.

Sotozono, C., T. Inatomi, et al. (1995). "Keratinocyte growth factor accelerates corneal epithelial wound healing in vivo." <u>Invest Ophthalmol Vis Sci</u> **36**(8): 1524-1529.

Spangenberg, C., E. U. Lausch, et al. (2006). "ERBB2-mediated transcriptional up-regulation of the alpha5beta1 integrin fibronectin receptor promotes tumor cell survival under adverse conditions." <u>Cancer Res 66(7)</u>: 3715-3725.

Spengler, M. L. and M. G. Brattain (2006). "Sumoylation inhibits cleavage of Sp1 N-terminal negative regulatory domain and inhibits Sp1-dependent transcription." J Biol Chem **281**(9): 5567-5574.

Spengler, M. L., L. W. Guo, et al. (2008). "Phosphorylation mediates Sp1 coupled activities of proteolytic processing, desumoylation and degradation." <u>Cell Cycle</u> 7(5): 623-630.

Srichai, M. B. and R. Zent (2010). Integrin Structure and Function. <u>In: Cell-Extracellular Matrix</u> <u>Interactions in Cancer</u>. R. Zent and A. Pozzi, Springer New York: p. 19-41.

Srinivasan, B. D. and K. E. Eakins (1979). "The reepithelialization of rabbit cornea following single and multiple denudation." <u>Exp Eye Res</u> **29**(6): 595-600.

Sriramarao, P., M. Mendler, et al. (1993). "Endothelial cell attachment and spreading on human tenascin is mediated by alpha 2 beta 1 and alpha v beta 3 integrins." <u>J Cell Sci</u> **105 (Pt 4)**: 1001-1012.

Sta Iglesia, D. D. and M. A. Stepp (2000). "Disruption of the basement membrane after corneal debridement." <u>Invest Ophthalmol Vis Sci</u> **41**(5): 1045-1053.

Staller, P., K. Peukert, et al. (2001). "Repression of p15INK4b expression by Myc through association with Miz-1." <u>Nat Cell Biol</u> **3**(4): 392-399.

Stamenkovic, I. (2003). "Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases." J Pathol **200**(4): 448-464.

Stanisavljevic, J., M. Porta-de-la-Riva, et al. (2011). "The p65 subunit of NF-kappaB and PARP1 assist Snail1 in activating fibronectin transcription." <u>J Cell Sci</u> **124**(Pt 24): 4161-4171.

Stanton, H., J. Gavrilovic, et al. (1998). "The activation of ProMMP-2 (gelatinase A) by HT1080 fibrosarcoma cells is promoted by culture on a fibronectin substrate and is concomitant with an increase in processing of MT1-MMP (MMP-14) to a 45 kDa form." <u>J Cell Sci</u> **111 (Pt 18)**: 2789-2798.

Starnes, L. M., A. Sorrentino, et al. (2009). "NFI-A directs the fate of hematopoietic progenitors to the erythroid or granulocytic lineage and controls beta-globin and G-CSF receptor expression." <u>Blood</u> **114**(9): 1753-1763.

Stephens, P., M. Caley, et al. (2013). Alternatives for Animal Wound Model Systems. <u>In: Wound Regeneration and Repair (Methods in Molecular Biology)</u>. R. G. Gourdie and T. A. Myers. New York City, Humana Press. **1037:** p. 177-201.

Stepp, M. A. (2006). "Corneal integrins and their functions." Exp Eye Res 83(1): 3-15.

Stepp, M. A., S. Spurr-Michaud, et al. (1993). "Integrins in the wounded and unwounded stratified squamous epithelium of the cornea." Invest Ophthalmol Vis Sci **34**(5): 1829-1844.

Stepp, M. A., S. Spurr-Michaud, et al. (1990). "Alpha 6 beta 4 integrin heterodimer is a component of hemidesmosomes." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **87**(22): 8970-8974.

Stepp, M. A. and L. Zhu (1997). "Upregulation of alpha 9 integrin and tenascin during epithelial regeneration after debridement in the cornea." J Histochem Cytochem 45(2): 189-201.

Rapport-gratuit.com Le numero 1 mondial du mémoires

Stepp, M. A., L. Zhu, et al. (1996). "Changes in beta 4 integrin expression and localization in vivo in response to corneal epithelial injury." <u>Invest Ophthalmol Vis Sci</u> **37**(8): 1593-1601.

Stepp, M. A., L. Zhu, et al. (1995). "Localized distribution of alpha 9 integrin in the cornea and changes in expression during corneal epithelial cell differentiation." J Histochem Cytochem 43(4): 353-362.

Stepp, M. A., J. D. Zieske, et al. (2014). "Wounding the cornea to learn how it heals." <u>Exp Eye Res</u> **121**: 178-193.

Sternlicht, M. D. and Z. Werb (1999). ECM proteinases. <u>In: Guidebook to the Extracellular Matrix</u>, <u>Anchor, and Adhesion Proteins</u>. T. Kreis and R. Vale. Oxford, UK, Oxford University Press: p. 503-562.

Sternlicht, M. D. and Z. Werb (2001). "How matrix metalloproteinases regulate cell behavior." <u>Annu Rev Cell Dev Biol</u> **17**: 463-516.

Strongin, A. Y., I. Collier, et al. (1995). "Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease." J Biol Chem **270**(10): 5331-5338.

Strongin, A. Y., B. L. Marmer, et al. (1993). "Plasma membrane-dependent activation of the 72-kDa type IV collagenase is prevented by complex formation with TIMP-2." J Biol Chem **268**(19): 14033-14039.

Sudhakar, A., P. Nyberg, et al. (2005). "Human alpha1 type IV collagen NC1 domain exhibits distinct antiangiogenic activity mediated by alpha1beta1 integrin." J Clin Invest **115**(10): 2801-2810.

Suhr, K. B., R. Tsuboi, et al. (2003). "Sphingosylphosphorylcholine stimulates cellular fibronectin expression through upregulation of IL-6 in cultured human dermal fibroblasts." <u>Arch Dermatol Res</u> **294**(10-11): 433-437.

Sun, Q. L., H. F. Sha, et al. (2011). "Comparative proteomic analysis of paclitaxel sensitive A549 lung adenocarcinoma cell line and its resistant counterpart A549-Taxol." <u>J Cancer Res Clin Oncol</u> **137**(3): 521-532.

Sun, T. T., S. C. Tseng, et al. (2010). "Location of corneal epithelial stem cells." <u>Nature</u> **463**(7284): E10-11; discussion E11.

Suske, G. (1999). "The Sp-family of transcription factors." Gene 238(2): 291-300.

Suske, G., E. Bruford, et al. (2005). "Mammalian SP/KLF transcription factors: bring in the family." <u>Genomics</u> **85**(5): 551-556.

Suzuki, K., J. Saito, et al. (2003). "Cell-matrix and cell-cell interactions during corneal epithelial wound healing." <u>Prog Retin Eye Res</u> **22**(2): 113-133.

Suzuki, K., T. Tanaka, et al. (2000a). "Coordinated reassembly of the basement membrane and junctional proteins during corneal epithelial wound healing." <u>Invest Ophthalmol Vis Sci</u> **41**(9): 2495-2500.
Suzuki, M., G. Raab, et al. (1997). "Matrix metalloproteinase-3 releases active heparin-binding EGF-like growth factor by cleavage at a specific juxtamembrane site." J Biol Chem 272(50): 31730-31737.

Suzuki, T., A. Kimura, et al. (2000b). "Regulation of interaction of the acetyltransferase region of p300 and the DNA-binding domain of Sp1 on and through DNA binding." <u>Genes Cells</u> **5**(1): 29-41.

Sweeney, D. F., R. Z. Xie, et al. (2003). "A comparison of biological coatings for the promotion of corneal epithelialization of synthetic surface in vivo." <u>Invest Ophthalmol Vis Sci</u> 44(8): 3301-3309.

Symington, B. E. (1995). "Growth signalling through the alpha 5 beta 1 fibronectin receptor." <u>Biochem Biophys Res Commun</u> **208**(1): 126-134.

Symington, B. E., Y. Takada, et al. (1993). "Interaction of integrins alpha 3 beta 1 and alpha 2 beta 1: potential role in keratinocyte intercellular adhesion." J Cell Biol **120**(2): 523-535.

Tadokoro, S., S. J. Shattil, et al. (2003). "Talin binding to integrin beta tails: a final common step in integrin activation." <u>Science</u> **302**(5642): 103-106.

Tajima, A., Y. Miyamoto, et al. (2000). "Mouse integrin alphav promoter is regulated by transcriptional factors Ets and Sp1 in melanoma cells." <u>Biochim Biophys Acta</u> **1492**(2-3): 377-384.

Takahara, T., L. P. Zhang, et al. (2003). "Modulation of matrix metalloproteinase-9 in hepatic stellate cells by three-dimensional type I collagen: its activation and signaling pathway." <u>Hepatol Res</u> **26**(4): 318-326.

Takahra, T., D. E. Smart, et al. (2004). "Induction of myofibroblast MMP-9 transcription in threedimensional collagen I gel cultures: regulation by NF-kappaB, AP-1 and Sp1." <u>Int J Biochem Cell</u> <u>Biol</u> **36**(2): 353-363.

Taliana, L., M. D. Evans, et al. (2000). "Vitronectin or fibronectin is required for corneal fibroblastseeded collagen gel contraction." <u>Invest Ophthalmol Vis Sci</u> **41**(1): 103-109.

Talior-Volodarsky, I., P. D. Arora, et al. (2015). "Glycated Collagen Induces $\alpha 11$ Integrin Expression Through TGF- $\beta 2$ and Smad3." <u>J Cell Physiol</u> **230**(2): 327-336.

Tamura, Y., H. Konomi, et al. (1991). "Tissue distribution of type VIII collagen in human adult and fetal eyes." <u>Invest Ophthalmol Vis Sci</u> **32**(9): 2636-2644.

Tan, D. T., L. A. Ficker, et al. (1996). "Limbal transplantation." Ophthalmology 103(1): 29-36.

Tan, N. Y. and L. M. Khachigian (2009). "Sp1 phosphorylation and its regulation of gene transcription." <u>Mol Cell Biol</u> **29**(10): 2483-2488.

Tan, N. Y., V. C. Midgley, et al. (2008). "Angiotensin II-inducible platelet-derived growth factor-D transcription requires specific Ser/Thr residues in the second zinc finger region of Sp1." <u>Circ Res</u> **102**(4): e38-51.

Tanaka, T., S. Furutani, et al. (1999). "Changes in extracellular matrix components after excimer laser photoablation in rat cornea." Jpn J Ophthalmol **43**(5): 348-354.

Tanelian, D. L. and K. Bisla (1992). "A new in vitro corneal preparation to study epithelial wound healing." <u>Invest Ophthalmol Vis Sci</u> **33**(11): 3024-3028.

Tanioka, H., S. Kawasaki, et al. (2006). "Establishment of a cultivated human conjunctival epithelium as an alternative tissue source for autologous corneal epithelial transplantation." <u>Invest</u> <u>Ophthalmol Vis Sci</u> **47**(9): 3820-3827.

Tapias, A., C. J. Ciudad, et al. (2008). "Regulation of Sp1 by cell cycle related proteins." <u>Cell Cycle</u> 7(18): 2856-2867.

Tawil, N. J., M. Houde, et al. (1990). "Alpha 1 beta 1 integrin heterodimer functions as a dual laminin/collagen receptor in neural cells." <u>Biochemistry</u> **29**(27): 6540-6544.

Tegtmeyer, S., I. Papantoniou, et al. (2001). "Reconstruction of an in vitro cornea and its use for drug permeation studies from different formulations containing pilocarpine hydrochloride." <u>Eur J</u> <u>Pharm Biopharm</u> **51**(2): 119-125.

Tegtmeyer, S., S. Reichl, et al. (2004). "Cultivation and characterization of a bovine in vitro model of the cornea." <u>Pharmazie</u> **59**(6): 464-471.

Tempe, D., E. Vives, et al. (2014). "SUMOylation of the inducible (c-Fos:c-Jun)/AP-1 transcription complex occurs on target promoters to limit transcriptional activation." <u>Oncogene</u> **33**(7): 921-927.

Tervo, K., T. Tervo, et al. (1991a). "Integrins in human corneal epithelium." Cornea 10(6): 461-465.

Tervo, K., G. B. van Setten, et al. (1991b). "Expression of tenascin and cellular fibronectin in the rabbit cornea after anterior keratectomy. Immunohistochemical study of wound healing dynamics." Invest Ophthalmol Vis Sci **32**(11): 2912-2918.

Tervo, T., J. Sulonen, et al. (1986). "Distribution of fibronectin in human and rabbit corneas." <u>Exp</u> <u>Eye Res</u> **42**(4): 399-406.

Tervo, T., G. B. van Setten, et al. (1990). "Immunohistochemical demonstration of tenascin in the normal human limbus with special reference to trabeculectomy." <u>Ophthalmic Res</u> **22**(2): 128-133.

Thant, A. A., A. Nawa, et al. (2000). "Fibronectin activates matrix metalloproteinase-9 secretion via the MEK1-MAPK and the PI3K-Akt pathways in ovarian cancer cells." <u>Clin Exp Metastasis</u> **18**(5): 423-428.

Thoft, R. A. and J. Friend (1983). "The X, Y, Z hypothesis of corneal epithelial maintenance." Invest Ophthalmol Vis Sci **24**(10): 1442-1443.

Thoft, R. A. and J. Sugar (1993). "Graft failure in keratoepithelioplasty." Cornea 12(4): 362-365.

Thomas, R. S., M. J. Tymms, et al. (1997). "ETS1, NFkappaB and AP1 synergistically transactivate the human GM-CSF promoter." <u>Oncogene</u> 14(23): 2845-2855.

Tiffany, J. M. (2008). "The normal tear film." Dev Ophthalmol 41: 1-20.

Tiger, C. F., F. Fougerousse, et al. (2001). "alpha11beta1 integrin is a receptor for interstitial collagens involved in cell migration and collagen reorganization on mesenchymal nonmuscle cells." <u>Dev Biol</u> **237**(1): 116-129.

Tisato, V. and E. Cozzi (2012). Xenotransplantation: An Overview of the Field. <u>In:</u> <u>Xenotransplantation (Methods in Molecular Biology)</u>. C. Costa and R. Máñez. New-York City, Humana Press. **885:** p. 1-16.

To, W. S. and K. S. Midwood (2011). "Plasma and cellular fibronectin: distinct and independent functions during tissue repair." <u>Fibrogenesis Tissue Repair</u> **4**: 21.

Torricelli, A. A., V. Singh, et al. (2013). "The corneal epithelial basement membrane: structure, function, and disease." <u>Invest Ophthalmol Vis Sci</u> 54(9): 6390-6400.

Toth, M., I. Chvyrkova, et al. (2003). "Pro-MMP-9 activation by the MT1-MMP/MMP-2 axis and MMP-3: role of TIMP-2 and plasma membranes." <u>Biochem Biophys Res Commun</u> **308**(2): 386-395.

Toth, M. and R. Fridman (2001). "Assessment of Gelatinases (MMP-2 and MMP-9 by Gelatin Zymography." <u>Methods Mol Med</u> **57**: 163-174.

Treisman, R. (1996). "Regulation of transcription by MAP kinase cascades." <u>Curr Opin Cell Biol</u> **8**(2): 205-215.

Tsai, R. J., L. M. Li, et al. (2000). "Reconstruction of damaged corneas by transplantation of autologous limbal epithelial cells." <u>N Engl J Med</u> **343**(2): 86-93.

Tsai, R. J. and S. C. Tseng (1994). "Human allograft limbal transplantation for corneal surface reconstruction." <u>Cornea</u> **13**(5): 389-400.

Tseng, L., M. Tang, et al. (2003). "Progesterone receptor (hPR) upregulates the fibronectin promoter activity in human decidual fibroblasts." <u>DNA Cell Biol</u> **22**(10): 633-640.

Tsubota, K., I. Toda, et al. (1995). "Reconstruction of the corneal epithelium by limbal allograft transplantation for severe ocular surface disorders." <u>Ophthalmology</u> **102**(10): 1486-1496.

Tucker, R. P. (1991). "The distribution of J1/tenascin and its transcript during the development of the avian cornea." <u>Differentiation</u> **48**(2): 59-66.

Tulla, M., O. T. Pentikainen, et al. (2001). "Selective binding of collagen subtypes by integrin alpha 1I, alpha 2I, and alpha 10I domains." J Biol Chem **276**(51): 48206-48212.

Tunggal, P., N. Smyth, et al. (2000). "Laminins: structure and genetic regulation." <u>Microsc Res</u> <u>Tech</u> **51**(3): 214-227.

Tuori, A., H. Uusitalo, et al. (1996). "The immunohistochemical composition of the human corneal basement membrane." <u>Cornea</u> **15**(3): 286-294.

Tuori, A., I. Virtanen, et al. (1997). "The expression of tenascin and fibronectin in keratoconus, scarred and normal human cornea." <u>Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol</u> **235**(4): 222-229.

Turgeon, P. W., R. C. Nauheim, et al. (1990). "Indications for keratoepithelioplasty." <u>Arch</u> <u>Ophthalmol</u> 108(2): 233-236.

Tzu, J. and M. P. Marinkovich (2008). "Bridging structure with function: structural, regulatory, and developmental role of laminins." Int J Biochem Cell Biol **40**(2): 199-214.

Underwood, P. A., F. A. Bennett, et al. (1995). "Evidence for the location of a binding sequence for the alpha 2 beta 1 integrin of endothelial cells, in the beta 1 subunit of laminin." <u>Biochem J</u> **309 (Pt 3)**: 765-771.

Urbich, C., E. Dernbach, et al. (2002). "Shear stress-induced endothelial cell migration involves integrin signaling via the fibronectin receptor subunits alpha(5) and beta(1)." <u>Arterioscler Thromb</u> <u>Vasc Biol</u> **22**(1): 69-75.

Vadori, M. and E. Cozzi (2014). "Immunological challenges and therapies in xenotransplantation." <u>Cold Spring Harb Perspect Med</u> **4**(4): a015578.

Van der Flier, A. and A. Sonnenberg (2001). "Function and interactions of integrins." <u>Cell Tissue</u> <u>Res</u> **305**(3): 285-298.

Van Gent, D., P. Sharp, et al. (2003). "Serpins: structure, function and molecular evolution." <u>Int J</u> <u>Biochem Cell Biol</u> **35**(11): 1536-1547.

Van Horn, D. L., D. J. Doughman, et al. (1975). "Ultrastructure of human organ-cultured cornea. II. Stroma and epithelium." <u>Arch Ophthalmol</u> **93**(4): 275-277.

Van Setten, G. B., J. W. Koch, et al. (1992b). "Expression of tenascin and fibronectin in the rabbit cornea after excimer laser surgery." <u>Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol</u> **230**(2): 178-183.

Van Setten, G. B., T. Tervo, et al. (1992a). "Epidermal growth factor (EGF) in ocular fluids: presence, origin and therapeutical considerations." <u>Acta Ophthalmol Suppl</u>(202): 54-59.

Van Slambrouck, S., A. R. Jenkins, et al. (2009). "Reorganization of the integrin alpha2 subunit controls cell adhesion and cancer cell invasion in prostate cancer." Int J Oncol **34**(6): 1717-1726.

Vandenberg, P., A. Kern, et al. (1991). "Characterization of a type IV collagen major cell binding site with affinity to the alpha 1 beta 1 and the alpha 2 beta 1 integrins." <u>J Cell Biol</u> **113**(6): 1475-1483.

Vantrappen, L., K. Geboes, et al. (1985). "Lymphocytes and Langerhans cells in the normal human cornea." <u>Invest Ophthalmol Vis Sci</u> **26**(2): 220-225.

Vigneault, F., K. Zaniolo, et al. (2007). "Control of integrin genes expression in the eye." <u>Prog</u> <u>Retin Eye Res</u> **26**(2): 99-161.

Vij, N. and P. L. Zeitlin (2006). "Regulation of the ClC-2 lung epithelial chloride channel by glycosylation of SP1." <u>Am J Respir Cell Mol Biol</u> **34**(6): 754-759.

Vinogradova, O., A. Velyvis, et al. (2002). "A structural mechanism of integrin alpha(IIb)beta(3) "inside-out" activation as regulated by its cytoplasmic face." <u>Cell</u> **110**(5): 587-597.

Violand, B. N. and F. J. Castellino (1976). "Mechanism of the urokinase-catalyzed activation of human plasminogen." J Biol Chem **251**(13): 3906-3912.

Visse, R. and H. Nagase (2003). "Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry." <u>Circ Res</u> **92**(8): 827-839.

Vlieghe, D., A. Sandelin, et al. (2006). "A new generation of JASPAR, the open-access repository for transcription factor binding site profiles." <u>Nucleic Acids Res</u> **34**(Database issue): D95-97.

Vrana, N. E., N. Builles, et al. (2008). "Development of a reconstructed cornea from collagenchondroitin sulfate foams and human cell cultures." <u>Invest Ophthalmol Vis Sci</u> **49**(12): 5325-5331.

Wang, C. Y., A. G. Bassuk, et al. (1994b). "Activation of the granulocyte-macrophage colonystimulating factor promoter in T cells requires cooperative binding of Elf-1 and AP-1 transcription factors." <u>Mol Cell Biol</u> **14**(2): 1153-1159.

Wang, H. Y., R. H. Wei, et al. (2013). "Evaluation of corneal cell growth on tissue engineering materials as artificial cornea scaffolds." Int J Ophthalmol **6**(6): 873-878.

Wang, X., K. Kamiyama, et al. (1994a). "Enhancement of fibronectin-induced migration of corneal epithelial cells by cytokines." <u>Invest Ophthalmol Vis Sci</u> **35**(12): 4001-4007.

Wang, X., W. Wang, et al. (2015). "All-trans retinoid acid promotes allogeneic corneal graft survival in mice by regulating Treg-Th17 balance in the presence of TGF-beta." <u>BMC Immunol</u> **16**: 17.

Wang, Y. N. and W. C. Chang (2003). "Induction of disease-associated keratin 16 gene expression by epidermal growth factor is regulated through cooperation of transcription factors Sp1 and c-Jun." J Biol Chem **278**(46): 45848-45857.

Wang, Y. T., J. Y. Chuang, et al. (2008). "Sumoylation of specificity protein 1 augments its degradation by changing the localization and increasing the specificity protein 1 proteolytic process." J Mol Biol **380**(5): 869-885.

Wang, Y. T., W. B. Yang, et al. (2011). "Interplay of posttranslational modifications in Sp1 mediates Sp1 stability during cell cycle progression." J Mol Biol **414**(1): 1-14.

Wang, Z., R. Juttermann, et al. (2000). "TIMP-2 is required for efficient activation of proMMP-2 in vivo." J Biol Chem **275**(34): 26411-26415.

Watanabe, M., W. Yano, et al. (2003). "Up-regulation of urokinase-type plasminogen activator in corneal epithelial cells induced by wounding." <u>Invest Ophthalmol Vis Sci</u> 44(8): 3332-3338.

Wayner, E. A., A. Garcia-Pardo, et al. (1989). "Identification and characterization of the T lymphocyte adhesion receptor for an alternative cell attachment domain (CS-1) in plasma fibronectin." J Cell Biol **109**(3): 1321-1330.

Wegener, K. L. and I. D. Campbell (2008). "Transmembrane and cytoplasmic domains in integrin activation and protein-protein interactions (review)." <u>Mol Membr Biol</u> **25**(5): 376-387.

Wegener, K. L., A. W. Partridge, et al. (2007). "Structural basis of integrin activation by talin." <u>Cell</u> **128**(1): 171-182.

Wei, S., H. C. Chuang, et al. (2009). "Thiazolidinediones mimic glucose starvation in facilitating Sp1 degradation through the up-regulation of beta-transducin repeat-containing protein." <u>Mol</u> <u>Pharmacol</u> **76**(1): 47-57.

Wei, Y. Y., Y. J. Chen, et al. (2008). "Osteoblasts-derived TGF-beta1 enhance motility and integrin upregulation through Akt, ERK, and NF-kappaB-dependent pathway in human breast cancer cells." <u>Mol Carcinog</u> **47**(7): 526-537.

Weljie, A. M., P. M. Hwang, et al. (2002). "Solution structures of the cytoplasmic tail complex from platelet integrin alpha IIb- and beta 3-subunits." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **99**(9): 5878-5883.

Weller, A., S. Beck, et al. (1991). "Amino acid sequence of mouse tenascin and differential expression of two tenascin isoforms during embryogenesis." <u>J Cell Biol</u> **112**(2): 355-362.

Weng, J., R. R. Mohan, et al. (1997). "IL-1 upregulates keratinocyte growth factor and hepatocyte growth factor mRNA and protein production by cultured stromal fibroblast cells: interleukin-1 beta expression in the cornea." <u>Cornea</u> **16**(4): 465-471.

Werb, Z. (1997). "ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology." <u>Cell</u> **91**(4): 439-442.

Werner, A., M. Braun, et al. (2008). "Establishing and functional testing of a canine corneal construct." <u>Vet Ophthalmol</u> **11**(5): 280-289.

West-Mays, J. A. and D. J. Dwivedi (2006). "The keratocyte: corneal stromal cell with variable repair phenotypes." Int J Biochem Cell Biol **38**(10): 1625-1631.

West-Mays, J. A., K. J. Strissel, et al. (1995). "Competence for collagenase gene expression by tissue fibroblasts requires activation of an interleukin 1 alpha autocrine loop." <u>Proc Natl Acad Sci U</u> <u>S A 92(15)</u>: 6768-6772.

Whitcher, J. P., M. Srinivasan, et al. (2001). "Corneal blindness: a global perspective." <u>Bull World</u> <u>Health Organ</u> **79**(3): 214-221.

White, L. R., J. B. Blanchette, et al. (2007). "The characterization of alpha5-integrin expression on tubular epithelium during renal injury." <u>Am J Physiol Renal Physiol</u> **292**(2): F567-576.

Whitmarsh, A. J., P. Shore, et al. (1995). "Integration of MAP kinase signal transduction pathways at the serum response element." <u>Science</u> **269**(5222): 403-407.

Wierstra, I. (2008). "Sp1: emerging roles--beyond constitutive activation of TATA-less housekeeping genes." <u>Biochem Biophys Res Commun</u> **372**(1): 1-13.

Will, H., S. J. Atkinson, et al. (1996). "The soluble catalytic domain of membrane type 1 matrix metalloproteinase cleaves the propeptide of progelatinase A and initiates autoproteolytic activation. Regulation by TIMP-2 and TIMP-3." J Biol Chem **271**(29): 17119-17123.

Wilson, S. E. (2012). "Corneal myofibroblast biology and pathobiology: generation, persistence, and transparency." <u>Exp Eye Res</u> **99**: 78-88.

Wilson, S. E., S. S. Chaurasia, et al. (2007). "Apoptosis in the initiation, modulation and termination of the corneal wound healing response." <u>Exp Eye Res</u> **85**(3): 305-311.

Wilson, S. E. and A. Esposito (2009). "Focus on molecules: interleukin-1: a master regulator of the corneal response to injury." <u>Exp Eye Res</u> **89**(2): 124-125.

Wilson, S. E., Y. G. He, et al. (1992). "EGF, EGF receptor, basic FGF, TGF beta-1, and IL-1 alpha mRNA in human corneal epithelial cells and stromal fibroblasts." <u>Invest Ophthalmol Vis Sci</u> **33**(5): 1756-1765.

Wilson, S. E., Y. G. He, et al. (1996). "Epithelial injury induces keratocyte apoptosis: hypothesized role for the interleukin-1 system in the modulation of corneal tissue organization and wound healing." <u>Exp Eye Res</u> **62**(4): 325-327.

Wilson, S. E., Y. G. He, et al. (1994). "Effect of epidermal growth factor, hepatocyte growth factor, and keratinocyte growth factor, on proliferation, motility and differentiation of human corneal epithelial cells." <u>Exp Eye Res</u> **59**(6): 665-678.

Wilson, S. E. and W. J. Kim (1998). "Keratocyte apoptosis: implications on corneal wound healing, tissue organization, and disease." Invest Ophthalmol Vis Sci **39**(2): 220-226.

Wilson, S. E., J. J. Liu, et al. (1999). "Stromal-epithelial interactions in the cornea." <u>Prog Retin Eye</u> <u>Res</u> **18**(3): 293-309.

Wilson, S. E., R. R. Mohan, et al. (2001). "The corneal wound healing response: cytokine-mediated interaction of the epithelium, stroma, and inflammatory cells." <u>Prog Retin Eye Res</u> **20**(5): 625-637.

Wilson, S. H., A. V. Ljubimov, et al. (2003). "Fibronectin fragments promote human retinal endothelial cell adhesion and proliferation and ERK activation through alpha5beta1 integrin and PI 3-kinase." Invest Ophthalmol Vis Sci 44(4): 1704-1715.

Wilson, S. L., L. E. Sidney, et al. (2013). "Keeping an eye on decellularized corneas: a review of methods, characterization and applications." J Funct Biomater 4(3): 114-161.

Wisniewska, M. B., M. Ameyar-Zazoua, et al. (2007). "Dimer composition and promoter context contribute to functional cooperation between AP-1 and NFAT." J Mol Biol **371**(3): 569-576.

Wozniak, M. A., K. Modzelewska, et al. (2004). "Focal adhesion regulation of cell behavior." <u>Biochim Biophys Acta</u> 1692(2-3): 103-119.

Wu, C. Y., H. L. Hsieh, et al. (2004). "Involvement of p42/p44 MAPK, p38 MAPK, JNK and nuclear factor-kappa B in interleukin-1beta-induced matrix metalloproteinase-9 expression in rat brain astrocytes." J Neurochem **90**(6): 1477-1488.

Wu, H. T., S. S. Sie, et al. (2013). "Identifying the regulative role of NF-kappaB binding sites within promoter region of human matrix metalloproteinase 9 (mmp-9) by TNF-alpha induction." Appl Biochem Biotechnol **169**(2): 438-449.

Wu, S., C. Cetinkaya, et al. (2003b). "Myc represses differentiation-induced p21CIP1 expression via Miz-1-dependent interaction with the p21 core promoter." <u>Oncogene</u> **22**(3): 351-360.

Wu, Y., X. Guo, et al. (2011). "Three-dimensional collagen represses cyclin E1 via beta1 integrin in invasive breast cancer cells." <u>Breast Cancer Res Treat</u> **127**(2): 397-406.

Wu, Y., X. Zhang, et al. (2003a). "c-Jun and the dominant-negative mutant, TAM67, induce vimentin gene expression by interacting with the activator Sp1." <u>Oncogene</u> **22**(55): 8891-8901.

Wu, Z., Q. Zhou, et al. (2014). "Reconstruction of auto-tissue-engineered lamellar cornea by dynamic culture for transplantation: a rabbit model." <u>PLoS One</u> **9**(4): e93012.

Wu, Z., Y. Zhou, et al. (2009). "The use of phospholipase A(2) to prepare acellular porcine corneal stroma as a tissue engineering scaffold." <u>Biomaterials</u> **30**(21): 3513-3522.

Xia, H., R. Nho, et al. (2008). "Polymerized collagen inhibits fibroblast proliferation via a mechanism involving the formation of a beta1 integrin-protein phosphatase 2A-tuberous sclerosis complex 2 complex that suppresses S6K1 activity." J Biol Chem **283**(29): 20350-20360.

Xiao, H., J. T. Lis, et al. (1994). "The upstream activator CTF/NF1 and RNA polymerase II share a common element involved in transcriptional activation." <u>Nucleic Acids Res</u> **22**(11): 1966-1973.

Xiao, T., J. Takagi, et al. (2004). "Structural basis for allostery in integrins and binding to fibrinogen-mimetic therapeutics." <u>Nature</u> **432**(7013): 59-67.

Xiao, X., S. Pan, et al. (2014). "In vivo study of the biocompatibility of a novel compressed collagen hydrogel scaffold for artificial corneas." J Biomed Mater Res A **102**(6): 1782-1787.

Xie, C., J. Zhu, et al. (2010b). "Structure of an integrin with an alphaI domain, complement receptor type 4." <u>EMBO J **29**(3)</u>: 666-679.

Xie, R. Z., D. F. Sweeney, et al. (1997). "Effects of biologically modified surfaces of synthetic lenticules on corneal epithelialization in vivo." <u>Aust N Z J Ophthalmol</u> **25 Suppl 1**: S46-49.

Xie, Y., S. C. Rizzi, et al. (2010a). "Development of a three-dimensional human skin equivalent wound model for investigating novel wound healing therapies." <u>Tissue Eng Part C Methods</u> **16**(5): 1111-1123.

Xing, Y., D. Y. Luo, et al. (2014). "High ALDH1A1 expression correlates with poor survival in papillary thyroid carcinoma." <u>World J Surg Oncol</u> **12**: 29.

Xiong, J. P., T. Stehle, et al. (2001). "Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3." <u>Science</u> **294**(5541): 339-345.

Xiong, J. P., T. Stehle, et al. (2002). "Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3 in complex with an Arg-Gly-Asp ligand." <u>Science</u> **296**(5565): 151-155.

Xu, J. and D. Mosher (2011). Fibronectin and Other Adhesive Glycoproteins. <u>In: The Extracellular Matrix: an Overview (Biology of Extracellular Matrix)</u>. R. P. Mecham, Springer Berlin Heidelberg: p. 41-75.

Xu, Y. G., Y. S. Xu, et al. (2008). "Development of a rabbit corneal equivalent using an acellular corneal matrix of a porcine substrate." <u>Mol Vis</u> 14: 2180-2189.

Yakubenko, V. P., R. R. Lobb, et al. (2000). "Differential induction of gelatinase B (MMP-9) and gelatinase A (MMP-2) in T lymphocytes upon alpha(4)beta(1)-mediated adhesion to VCAM-1 and the CS-1 peptide of fibronectin." <u>Exp Cell Res</u> **260**(1): 73-84.

Yamada, K. M. and R. A. F. Clark (1996). Provisional matrix. <u>In: The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair (2nd Edition)</u>. R. A. F. Clark. New York, Plenum Press: p.51-94.

Yan, C. and D. D. Boyd (2007). "Regulation of matrix metalloproteinase gene expression." <u>J Cell</u> <u>Physiol</u> **211**(1): 19-26.

Yan, L., W. Wu, et al. (2013). "Comparative study of the effects of recombinant human epidermal growth factor and basic fibroblast growth factor on corneal epithelial wound healing and neovascularization in vivo and in vitro." Ophthalmic Res **49**(3): 150-160.

Yana, I. and S. J. Weiss (2000). "Regulation of membrane type-1 matrix metalloproteinase activation by proprotein convertases." <u>Mol Biol Cell</u> **11**(7): 2387-2401.

Yanez-Soto, B., S. J. Liliensiek, et al. (2013). "The influence of substrate topography on the migration of corneal epithelial wound borders." <u>Biomaterials</u> **34**(37): 9244-9251.

Yang, B. S., J. D. Gilbert, et al. (1993b). "Overexpression of Myc suppresses CCAAT transcription factor/nuclear factor 1-dependent promoters in vivo." <u>Mol Cell Biol</u> **13**(5): 3093-3102.

Yang, J. T., H. Rayburn, et al. (1993a). "Embryonic mesodermal defects in alpha 5 integrindeficient mice." <u>Development</u> **119**(4): 1093-1105.

Yang, W., J. Shen, et al. (2001b). "Repression of transcription of the p27(Kip1) cyclin-dependent kinase inhibitor gene by c-Myc." Oncogene **20**(14): 1688-1702.

Yang, X., K. Su, et al. (2001a). "O-linkage of N-acetylglucosamine to Sp1 activation domain inhibits its transcriptional capability." Proc Natl Acad Sci U S A 98(12): 6611-6616.

Yazgan, O. and C. M. Pfarr (2002). "Regulation of two JunD isoforms by Jun N-terminal kinases." J Biol Chem 277(33): 29710-29718.

Ye, H. Q. and D. T. Azar (1998). "Expression of gelatinases A and B, and TIMPs 1 and 2 during corneal wound healing." <u>Invest Ophthalmol Vis Sci **39**(6): 913-921</u>.

Ye, H. Q., M. Maeda, et al. (2000). "Differential expression of MT1-MMP (MMP-14) and collagenase III (MMP-13) genes in normal and wounded rat corneas." <u>Invest Ophthalmol Vis Sci</u> **41**(10): 2894-2899.

Yee, R. W., M. Matsuda, et al. (1985). "Changes in the normal corneal endothelial cellular pattern as a function of age." <u>Curr Eye Res</u> **4**(6): 671-678.

Yeh, L. K., W. L. Chen, et al. (2005). "Soluble lumican glycoprotein purified from human amniotic membrane promotes corneal epithelial wound healing." Invest Ophthalmol Vis Sci **46**(2): 479-486.

Yoeruek, E., T. Bayyoud, et al. (2012a). "Decellularization of porcine corneas and repopulation with human corneal cells for tissue-engineered xenografts." <u>Acta Ophthalmol</u> **90**(2): e125-131.

Yoeruek, E., T. Bayyoud, et al. (2012b). "Reconstruction of corneal stroma with decellularized porcine xenografts in a rabbit model." <u>Acta Ophthalmol</u> **90**(3): e206-210.

Yokosaki, Y., N. Matsuura, et al. (1998). "Identification of the ligand binding site for the integrin alpha9 beta1 in the third fibronectin type III repeat of tenascin-C." J Biol Chem **273**(19): 11423-11428.

Rapport-gratuit.com

Le numero 1 mondial du mémoires

Yokosaki, Y., E. L. Palmer, et al. (1994). "The integrin alpha 9 beta 1 mediates cell attachment to a non-RGD site in the third fibronectin type III repeat of tenascin." J Biol Chem 269(43): 26691-26696.

Yokoyama, K., H. P. Erickson, et al. (2000). "Identification of amino acid sequences in fibrinogen gamma -chain and tenascin C C-terminal domains critical for binding to integrin alpha vbeta 3." J Biol Chem **275**(22): 16891-16898.

Yoshida, T. and K. Yasuda (2002). "Characterization of the chicken L-Maf, MafB and c-Maf in crystallin gene regulation and lens differentiation." <u>Genes Cells</u> **7**(7): 693-706.

Yousef, G. M., M. B. Elliott, et al. (2004). "Sequence and evolutionary analysis of the human trypsin subfamily of serine peptidases." <u>Biochim Biophys Acta</u> **1698**(1): 77-86.

Yu, F. S., J. Yin, et al. (2010). "Growth factors and corneal epithelial wound healing." <u>Brain Res</u> <u>Bull</u> **81**(2-3): 229-235.

Yuen, H. W., A. F. Ziober, et al. (2005). "Suppression of laminin-5 expression leads to increased motility, tumorigenicity, and invasion." <u>Exp Cell Res</u> **309**(1): 198-210.

Yurchenco, P. D. (2011). "Basement membranes: cell scaffoldings and signaling platforms." <u>Cold</u> <u>Spring Harb Perspect Biol</u> **3**(2): a004911.

Zagon, I. S., J. W. Sassani, et al. (2000). "Reepithelialization of the human cornea is regulated by endogenous opioids." <u>Invest Ophthalmol Vis Sci</u> **41**(1): 73-81.

Zaidel-Bar, R., S. Itzkovitz, et al. (2007). "Functional atlas of the integrin adhesome." <u>Nat Cell Biol</u> **9**(8): 858-867.

Zamir, E. and B. Geiger (2001). "Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions." J Cell Sci 114(Pt 20): 3583-3590.

Zaniolo, K., P. Carrier, et al. (2013). A Tissue-Engineered Corneal Wound Healing Model for the Characterization of Reepithelialization. <u>In: Wound Regeneration and Repair (Methods in Molecular Biology)</u>. R. G. Gourdie and T. A. Myers. New York City, Humana Press. **1037:** p. 59-78.

Zaniolo, K., M. E. Gingras, et al. (2006). "Expression of the gene encoding poly(ADP-ribose) polymerase-1 is modulated by fibronectin during corneal wound healing." <u>Invest Ophthalmol Vis</u> <u>Sci</u> **47**(10): 4199-4210.

Zaniolo, K., S. Leclerc, et al. (2004). "Expression of the alpha4 integrin subunit gene promoter is modulated by the transcription factor Pax-6 in corneal epithelial cells." <u>Invest Ophthalmol Vis Sci</u> **45**(6): 1692-1704.

Zelenka, P. S. and P. Arpitha (2008). "Coordinating cell proliferation and migration in the lens and cornea." <u>Semin Cell Dev Biol</u> **19**(2): 113-124.

Zeltz, C., J. Orgel, et al. (2014). "Molecular composition and function of integrin-based collagen glues-introducing COLINBRIS." <u>Biochim Biophys Acta</u> **1840**(8): 2533-2548.

Zhang, J., W. Li, et al. (2003b). "Regulation of the intestinal epithelial response to cyclic strain by extracellular matrix proteins." <u>FASEB J</u> **17**(8): 926-928.

Zhang, J., W. Li, et al. (2003a). "Fibronectin blocks p38 and jnk activation by cyclic strain in Caco-2 cells." <u>Biochem Biophys Res Commun</u> **306**(3): 746-749.

Zhang, L., C. Che, et al. (2013). "TLR-mediated induction of proinflammatory cytokine IL-32 in corneal epithelium." <u>Curr Eye Res</u> **38**(6): 630-638.

Zhang, W., K. Cveklova, et al. (2001). "Quantitation of PAX6 and PAX6(5a) transcript levels in adult human lens, cornea, and monkey retina." <u>Mol Vis</u> 7: 1-5.

Zhang, W. M., J. Kapyla, et al. (2003c). "alpha 11beta 1 integrin recognizes the GFOGER sequence in interstitial collagens." J Biol Chem **278**(9): 7270-7277.

Zhang, Y., Y. Gong, et al. (2015). "Nuclear SIPA1 activates integrin beta1 promoter and promotes invasion of breast cancer cells." <u>Oncogene</u> **34**(11): 1451-1462.

Zhang, Z., K. Vuori, et al. (1995). "The alpha 5 beta 1 integrin supports survival of cells on fibronectin and up-regulates Bcl-2 expression." Proc Natl Acad Sci U S A 92(13): 6161-6165.

Zhao, C. and A. Meng (2005). "Sp1-like transcription factors are regulators of embryonic development in vertebrates." Dev Growth Differ 47(4): 201-211.

Zhao, M., B. Song, et al. (2003). "Direct visualization of a stratified epithelium reveals that wounds heal by unified sliding of cell sheets." <u>FASEB J</u> 17(3): 397-406.

Zhou, C. and W. M. Petroll (2014). "MMP regulation of corneal keratocyte motility and mechanics in 3-D collagen matrices." <u>Exp Eye Res</u> **121**: 147-160.

Zhou, Y., Z. Wu, et al. (2011). "Development and characterization of acellular porcine corneal matrix using sodium dodecylsulfate." <u>Cornea</u> **30**(1): 73-82.

Zhu, J., B. H. Luo, et al. (2008). "Structure of a complete integrin ectodomain in a physiologic resting state and activation and deactivation by applied forces." <u>Mol Cell</u> **32**(6): 849-861.

Zieske, J. D. (1994). "Perpetuation of stem cells in the eye." Eye (Lond) 8 (Pt 2): 163-169.

Zieske, J. D. (2000). "Expression of cyclin-dependent kinase inhibitors during corneal wound repair." <u>Prog Retin Eye Res</u> **19**(3): 257-270.

Zieske, J. D. (2001). "Extracellular matrix and wound healing." <u>Curr Opin Ophthalmol</u> **12**(4): 237-241.

Zieske, J. D. and I. K. Gipson (1986). "Protein synthesis during corneal epithelial wound healing." Invest Ophthalmol Vis Sci 27(1): 1-7.

Zieske, J. D., A. E. Hutcheon, et al. (2001). "TGF-beta receptor types I and II are differentially expressed during corneal epithelial wound repair." <u>Invest Ophthalmol Vis Sci</u> **42**(7): 1465-1471.

Zieske, J. D., V. S. Mason, et al. (1994). "Basement membrane assembly and differentiation of cultured corneal cells: importance of culture environment and endothelial cell interaction." <u>Exp Cell</u> <u>Res</u> **214**(2): 621-633.

Zieske, J. D., H. Takahashi, et al. (2000). "Activation of epidermal growth factor receptor during corneal epithelial migration." <u>Invest Ophthalmol Vis Sci</u> **41**(6): 1346-1355.

Zimmermann, D. R., B. Trueb, et al. (1986). "Type VI collagen is a major component of the human cornea." <u>FEBS Lett</u> **197**(1-2): 55-58.

Zorn-Kruppa, M., S. Tykhonova, et al. (2005). "A human corneal equivalent constructed from SV40-immortalised corneal cell lines." <u>Altern Lab Anim</u> **33**(1): 37-45.

Zutter, M. M., S. A. Santoro, et al. (1994). "The human alpha 2 integrin gene promoter. Identification of positive and negative regulatory elements important for cell-type and developmentally restricted gene expression." J Biol Chem **269**(1): 463-469.

ANNEXE 1

Influence de matrices extracelluaires humaines reconstruites sur l'expression du gène $\alpha 5$ de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans les cellules épithéliales de cornée de lapin.

A1.1. Contexte et Objectif de l'étude

Cette annexe est un complément au Chapitre II. Nous avons précédemment montré que l'activité du promoteur du gène α 5 de l'intégrine α 5 β 1 est augmentée par la fibronectine (FN) dans des cellules épithéliales de cornées de lapins (CECLs) à faible densité cellulaire, un contexte s'apparentant à celui d'un épithélium en cicatrisation (Larouche et al., 2000 ; Gingras et al., 2009). Toutefois, cette composante a été évaluée individuellement et aucune étude n'a été effectuée sur des matrices complexes. Dans cette étude, nous avons évalué l'influence d'une matrice extracellulaire complexe dévitalisée produite par génie tissulaire sur l'expression du gène α 5 dans des CECLs.

A1.2. Matériel et Méthodes

Des plasmides recombinants α 5/CAT (-954 α 5/CAT, -178 α 5/CAT, -132 α 5/CAT, -92 α 5/CAT et -42 α 5/CAT) (Beliveau et al., 1999; Birkenmeier et al., 1991) ont été transfectés par lipofection (Larouche et al., 2000; Gingras et al., 2003) dans des CECLs cultivées à diverses densités cellulaires (30, 60, 80, 90 ou 100% de recouvrement) sur du BSA 2% (comme contrôle négatif) ou sur des matrices complexes, dévitalisées et produites en cultivant des fibroblastes de cornée en présence d'acide ascorbique pendant 20 ou 35 jours (ECM20d ou ECM35d) (Carrier et al., 2008; Lake et al., 2013). Des analyses en buvardage Western (Larouche et al., 2000) ont été réalisées pour évaluer l'expression des facteurs de transcriptions (FTs) Sp1, AP-1 et NFI participant à la transcription du gène α 5. L'activité de liaison à l'ADN de ces FTs a été déterminée par des analyses de retard sur gel (EMSA) (Larouche et al., 2000).

A1.3. Résultats

La transfection de plasmides recombinants portant le segment basal (-132 α 5/CAT) ou le segment long (-954 α 5/CAT) du promoteur du gène α 5 fusionné au gène rapporteur CAT a permis de démontrer que les matrices reconstruites ECM20d (FN en majorité) ou ECM35d (composée de collagènes et de FN) répriment l'activité du promoteur du gène $\alpha 5$ de l'intégrine α 5 β 1 dans les CECLs et que cette réduction s'accroît progressivement avec l'augmentation de la densité cellulaire jusqu'à une abolition presque complète de l'activité CAT lorsque les cellules sont à confluence (Figure A1.1A-C). Lors de la transfection de différents segments du promoteur a5 dans les CECLs cultivées à sous-confluence sur ECM35d, des délétions jusqu'à la position -92 ont peu d'influence sur les activités CAT avec une réduction relative de 50% par rapport aux cellules cultivées sur BSA. Cependant, la délétion du promoteur $\alpha 5$ des positions -92 à -42, qui élimine aussi l'élément de réponse à la FN (FRE) essentiel pour maintenir l'activité basale de ce promoteur dans ces cellules, cause une forte réduction des activités CAT dans les cellules sous-confluentes (Figure A1.1D). Dans les cellules confluentes, les délétions progressives du promoteur $\alpha 5$ se traduisent par une influence négative beaucoup plus prononcée exercée par la matrice ECM35d sur l'activité du promoteur α 5, la plus forte réduction dans l'activité CAT étant observée entres les plasmides -178a5/CAT et -132a5/CAT (Figure A1.1D).

Les analyses en buvardage Western et de retard sur gel (EMSA) ont démontré que les matrices reconstruites ECM35d exercent leur influence régulatrice négative sur le promoteur α 5 dans les CECLs en modifiant l'expression et/ou l'activité de liaison à l'ADN des FTs régulateurs de ce gène (AP-1, NFI et Sp1) (Figure A1.2). En effet, la culture de CECLs en présence de la matrice ECM35d sans kératocytes provoque une forte réduction de l'activité de liaison à l'ADN et de l'expression de certaines sous-unités AP-1 (activateur d' α 5) et de NFI (répresseur d' α 5), mais pas de Sp1/Sp3 (activateur d' α 5) à sous-confluence et à confluence (faible réduction de Sp1/Sp3 qui est observée, mais seulement à confluence)

(Figure A1.2). Le changement le plus important est observé pour le FTs AP-1 (réduction) dans les CECLs à confluence.

A1.4. Discussion

Des travaux réalisés précédemment ont permis de démontrer que les diverses composantes de la MEC comme la FN et la laminine (LM) exercent des influences régulatrices, positive ou négative respectivement, sur les activités des promoteurs des gènes des sous-unités d'intégrines a4, a5 et a6 dans des CECLs in vitro (Larouche et al., 2000 ; Gingras et al., 2009; Gaudreault et al., 2007; Vigneault et al., 2007; Gaudreault et al., 2008). Contrairement à l'influence régulatrice positive exercée par la FN, les matrices reconstruites 35 jours (composées de FN et de collagènes) exercent une forte influence négative sur l'activité du promoteur du gène a5 en modifiant le ratio intra-nucléaire des FTs AP-1/Sp1-NFI de manière à favoriser l'influence négative de NFI dans les CECLs à sous-confluence et à confluence (Figures A1.1 et A1.2). Cependant, quand des transfections similaires sont effectuées avec le promoteur basal -132a5/CAT en substituant les CECLs par des cellules épithéliales de cornées humaines (CECHs), l'effet régulateur obtenu est inverse. Les analyses en transfection ont révélé une augmentation significative de l'activité du promoteur a5 (70% d'activation pour les deux densités) dans les CECHs en présence des matrices ECM35d/ kératocytes- qui résulte de modifications dans l'expression et les activités de liaison à l'ADN de Sp1/Sp3, AP-1, Pax-6 et NFI favorisant les activités positives de Sp1/Sp3, AP-1, Pax-6 au détriment de l'influence négative de NFI (voir Chap. II). Ainsi, le promoteur du gène α5 humain ne répond pas de la même façon à la présence des matrices complexes reconstruites selon la provenance des cellules épithéliales de cornée utilisées pour la culture, soit le lapin ou l'humain. Ces différences résultent probablement d'influences espèce-spécifiques. Donc, l'utilisation des CECHs en culture primaire est un modèle in vitro plus approprié que l'utilisation des CECLs afin d'étudier l'expression du gène a5 et en conséquence les CECHs ont été sélectionnées comme source cellulaire pour le reste de cette étude présentée au Chapitre II.



Figure A1.1. L'activité du promoteur de gène α 5 dans les CECLs cultivées sur les matrices reconstruites.

Les plasmides -132 α 5/CAT (**A**, **C**) et -954 α 5/CAT (**B**) ont été transfectés dans des CECLs (RCECs) cultivées à différentes densités cellulaires, soit à sous-confluence (SC30%, SC60%, SC80%, SC90%) ou à confluence (C100%) en présence de ECM20d/keratocytes- (**A**, **B**), de ECM35d/keratocytes- (**C**) ou de BSA 2% (contrôle négatif). **D**: Des plasmides recombinants portant différents segments du promoteur α 5 (-954 α 5/CAT, -178 α 5/CAT, -132 α 5/CAT, -92 α 5/CAT, -42 α 5/CAT) ont été transfectés dans des CECLs cultivées à sous-confluence (SC60%) et à confluence (C100%) en présence de ECM35d/keratocytes- ou de BSA 2%. Les valeurs des graphiques représentent les moyennes des activités CAT normalisées ((% d'activité CAT/4h/100µg de protéines)/ng hGH) et sont exprimées en ratio des activités CAT des CECLs cultivées sur les matrices reconstruites par rapport au cellules sur BSA (ratio ECM/BSA). Les astérisques (*) indiquent les activités CAT statistiquement significatives par rapport aux activités CAT mesurées dans les cellules sur BSA (Student's t-test ; P < 0.05). Les écart-types sont également indiqués.



Figure A1.2. Influence des matrices ECM35d sur l'activité de liaison à ADN et sur l'expression de Sp1, NFI et AP-1 dans des CECLs.

A: Des analyses de retard sur gel (EMSA) ont été réalisées avec des extraits de protéines nucléaires (2.5ug pour Sp1 ou 5.0ug pour AP-1 et NFI) de CECLs cultivées à sous-confluence (SC70%) ou à confluence (C100%) en présence de ECM35d/keratocytes- ou de BSA 2% (contrôle). Ces extraits ont été incubés avec des sondes d'oligonucléotides radiomarquées en 5' portant des sites de liaison à haute affinité pour les facteurs de transcription Sp1, NFI et AP-1. Les complexes ADN-protéine ont été séparés par gels de polyacrylamide en conditions natives. Les positions des complexes Sp1/Sp3, NFI et AP-1 ont été identifiés. P: sonde radiomarquée en absence de protéines, U : fraction non-retenue de la sonde. **B:** Des analyses de buvardage Western ont été réalisées avec les extraits de protéines nucléaires utilisés en A et l'utilisation des anticorps contre les FTs NFI, Sp1, Sp3 et les diverses sous-unités de AP-1 dont c-Jun, JunB, JunD, c-Fos, FosB, Fra-1 (FOSL1) et Fra-2 (FOSL2). L'expression de l'actine a été mesurée comme contrôle pour la normalisation. La position du marqueur de poids moléculaire le plus proche est identifié.

ANNEXE 2

de l'expression du gène Modulation α5 de l'intégrine α 5 β 1 et des autres gènes par des matrices extracelluaires humaines reconstruites dans les cellules épithéliales de cornée humaine à sous-confluence.

A2.1. Contexte et Objectif de l'étude

Cette annexe est un complément aux Chapitres II et V. Durant le processus de cicatrisation de la cornée, la composition de la MEC subît des changements transitoires importants permettant l'adhésion et la migration des cellules épithéliales cornéennes (Murakami et al., 1992 ; Anderson et al., 1996 ; Ljubimov et al., 1998 ; Tanaka et al., 1999 ; Kang et al., 1999 ; Zieske et al., 2001 ; Saika et al., 2002 ; Vigneault et al., 2007). Le remodelage de la MEC durant la guérison des plaies cornéennes s'accompagne également par des changements similaires dans l'expression de plusieurs sous-unités d'intégrines exprimées à la surface des cellules épithéliales de la cornée (incluant $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha 9$, αv , $\beta 4$ et $\beta 6$) (Garana et al., 1992 ; Stepp et al., 1996 ; Stepp and Zhu, 1997 ; Vigneault et al., 2007 ; Liu et al., 2006 ; Blanco-Mezquita et al., 2011). Des travaux réalisés précédemment ont permis de démontrer que les diverses composantes de la MEC, dont la FN et la LM exercent des influences régulatrices opposées (positive et négative, respectivement) sur la transcription des gènes $\alpha 4$, $\alpha 5$ et $\alpha 6$ dans des CECLs *in vitro* quand ces composantes sont analysées individuellement (Larouche et al., 2000; Gingras et al., 2009; Gaudreault et al., 2007; Vigneault et al., 2007; Gaudreault et al., 2008). Toutefois, les effets combinés des composantes qui constituent les matrices complexes n'ont pas été déterminés à ce jour. En conséquence, une étude sur l'influence d'une matrice extracellulaire complexe reconstruite sur l'expression du gène α 5 et des autres gènes dans des CECHs à faible densité cellulaire a été réalisée.



A2.2. Matériel et Méthodes

Les CECHs provenant d'un donneur de 61 ans ont été cultivées à sous-confluence (70% de recouvrement) sur du BSA 2% (contrôle) ou sur des matrices complexes (ECM35d keratocytes-) produites en utilisant la méthode d'auto-assemblage (Carrier et al., 2008 ; Lake et al., 2013). Toutes les analyses sur biopuces à ADN de type Agilent (G4851A SurePrint G3 Human GE 8x60K array slide (60 000 probes)) ou de type Illumina (HumanHT-12v3 Expression BeadChip array 48 804 probes)) et celles en qPCR ont été effectuées tel que mentionné dans la section *Matériel et Méthodes* du chapitre II. Les surnageants de culture des CECHs cultivées à sous-confluence sur BSA ou sur matrices 35 jours dévitalisées (ECM35d/keratocytes-) ont été récoltés pour évaluer l'activité des gélatinases (MMP2 et MMP9) par des analyses de zymographie sur gel de gélatine (Beliveau et al., 2000 ; Toth et Fridman, 2001).

A2.3. Résultats

Une analyse 'scatter plot' réalisée sur les 60 000 cibles présentes sur la biopuce indique clairement que les CECHs cultivées sur matrices 35 jours ont un patron d'expressions des gènes distinct des cellules cultivées seulement sur BSA à sous-confluence (Figure A2.1A). Les analyses sur biopuces à ADN ont révélé une augmentation significative du transcrit du gène $\alpha 5$ (2 fois d'activation) dans les CECHs (61 ans) à sous-confluence en présence des matrices 35 jours dévitalisées (ECM35d/keratocytes-) par rapport aux cellules sur BSA (Figure A2.1B). Une autre analyse de profilage génique avec ARN total de CECHs provenant d'un donneur humain différent en utilisant les biopuces à ADN de type Illumina a validé l'augmentation de l'expression de $\alpha 5$ (4 fois d'activation) en présence des matrices reconstruites 35 jours (Section 2.13: Supplementary Table 2.2). Cette augmentation d'expression de α 5 lorsque les CECHs sont cultivées sur les matrices 35 jours a également été validée par des analyses en qPCR (4 fois d'activation) (Figure A2.1C). Un résultat similaire a été observé à confluence (Chap. II, Figure 2.4). Les variations d'expression des FTs modulant le gène α 5 ont également été évaluées par une analyse de type '*heatmap*'. Celle-ci a permis d'observer une hausse d'expression des transcrits Sp1 (2 fois) dans les CECHs cultivées sur ECM35d/keratocytes- à sous-confluence. L'expression de l'isoforme NFIX est faiblement augmentée (1.5 fois), mais celle de l'isoforme NFIA est diminuée (1.5 fois) dans les CECHs cultivées sur ECM35d/keratocytes- à sous-confluence. L'expression des gènes codant pour les sous-unités AP-1 JUND et FOSL2 est faiblement augmentée (1.5 fois), alors que celle de JUN, FOS, FOSB est diminuée (1.7- à 2.8 fois) dans les CECHs cultivées en présence de ECM35d/keratocytes- par rapport aux cellules sur BSA à sous-confluence (Figure A2.1B).

Des analyses d'expressions des gènes en utilisant des biopuces à ADN ont permis d'identifier les gènes les plus dérégulés dans les CECHs (61 ans) cultivées à sousconfluence sur les matrices extracellulaires reconstruites sans kératocytes. Suite à cette analyse, 49 gènes ayant une expression qui diffère de manière similaire d'au moins 4 fois (activation ou répression) dans les CECHs cultivées à sous-confluence sur les matrices 35 jours sans kératocytes (ECM35d/keratocytes- ou dévitalisée) par rapport à l'expression des CECHs cultivées sur BSA ont été identifiés (Figure A2.2). Parmi ceux-ci, plusieurs gènes voient leur expression considérablement accrue dans les CECHs sur matrices 35 jours à sous-confluence, incluant 2 gènes codant pour des composantes de la matrice extracellulaire (FN1 et SPOCK1), 2 gènes codant pour des métalloprotéinases matricielles (MMP9 et MMP10) et 3 gènes codant pour des cytokines (IL6, IL19 et IL32) (Figure A2.2). Des résultats similaires ont été obtenus pour certains de ces gènes dans les CECHs cultivées sur les matrices 35 jours à confluence (FN1, SPOCK1, MMP9, MMP10 et IL6) (Chap. V, Figure 5.1A).

Une analyse de profilage génique de tous les gènes MMPs a démontré que plusieurs métalloprotéinases ont leur expression augmentée par la matrice dévitalisée dans les CECHs à sous-confluence, dont MMP-1, MMP-2, MMP-7, MMP-9, MMP-10, MMP-15, MMP-23 et MMP-24 (Figure A2.3A). Ce sont les gènes MMP-9 et MMP-10, parmi toutes les MMPs, qui sont les plus dérégulés par les matrices 35jours sans kératocytes (24- et 6.5 fois d'activation, respectivement). Ces variations observées sur biopuces à ADN ont été validées par des analyses en qPCR où des augmentations d'expression significatives pour les gènes MMP-9 (23 fois) et MMP-10 (5 fois) ont aussi été observées (Figure A2.3B). Une autre analyse de profilage génique avec ARN total de CECHs provenant d'un donneur

humain différent en utilisant les biopuces à ADN de type Illumina a confirmé les augmentations d'expressions de MMP9 et MMP10 (31- et 9 fois d'activation, respectivement) en présence des matrices reconstruites 35 jours dans des CECHs à sous-confluence (résultats non présentés). L'analyse zymographique sur gel de gélatine démontre que les CECHs cultivées à sous-confluence sur les matrices 35 jours possèdent une activité enzymatique de MMP9 plus élevée que les cellules cultivées sur BSA (Figure A2.3C). Ces résultats pour les MMPs ont été également observés à confluence (Chap. V, Figure 5.3).

A2.4. Discussion

De manière similaire à l'influence exercée par la FN (Larouche et al., 2000 ; Gingras et al., 2009), les analyses sur biopuces à ADN et en qPCR ont révélé une régulation positive de l'expression du gène α 5 par les matrices extracellulaires reconstruites (ECM35d/keratocytes-) dans les CECHs à sous-confluence (70% de recouvrement) et à confluence (100% de recouvrement) qui résultent vraisemblablement de modifications dans l'expression et les activités de liaison à l'ADN des FTs NFI, Sp1, AP-1 et Pax-6 (Figure A2.1 et Chap.II).

Outre le gène ITGA5, les matrices ECM35d augmentent l'expression de plusieurs autres gènes dans les CECHs qui sont communs à sous-confluence et à confluence (Figure A2.2 et Figure 5.1). Parmi ceux-ci, 2 gènes codent pour des protéines qui sont des composantes de la matrice extracellulaire, dont la fibronectine (FN1) et une protéine reliée aux protéoglycans (Testican-1). Des analyses de spectrométrie de masse et par immunofluorescence ont démontré que la FN est présente à 14% dans les matrices ECM35d sécrétées par les kératocytes du stroma (Figure 2.1 et Table 2.1). Ces données suggèrent que les cellules épithéliales de cornée dans un contexte de cicatrisation produisent également cette composante matricielle. Différentes cytokines voient également leur expression accrue par les matrices 35 jours dans les CECHs à sous-confluence, dont IL-6 (commun à sous-confluence et à confluence), IL-19 et IL-32 (Figure A2.2). IL-6 sécrétée par les fibroblastes de cornée (et par les CECHs cultivées sur ECM35d également) joue plusieurs fonctions dans l'épithélium cornéen, dont la stimulation de la migration

(Nishida et al., 1992b ; Nakamura et Nishida, 1999) et la modulation des propriétés de stratification et de différenciation des cellules épithéliales de cornée (Carrier et al., 2009). Certains travaux ont démontré que la cytokine IL-19 induit l'expression des cytokines IL-6 (surexprimée dans CECHs cultivées sur ECM35d) et TNF- α dans des monocytes (Liao et al., 2002b). Une autre étude indique que la cytokine IL-32 induit l'expression des cytokines IL-8, IL1- β , TNF- α dans l'épithélium cornéen (Zhang et al., 2013). Dans notre étude, les expressions des cytokines IL-6, IL1- β et IL-8, régulateurs de l'expression du gène MMP9 (Gordon et al., 2009 ; Joo et Seomun, 2008 ; Lockwood et al., 2008 ; Jovanovic et al., 2010), sont considérablement surexprimées dans les CECHs cultivées à confluence en présence des matrices reconstruites ECM35d (Figure 5.1A). La matrice ECM35d augmente l'expression de plusieurs gènes codant pour des métalloprotéinases matricielles (MMPs) qui exercent des fonctions importantes dans le remodelage de la matrice extracellulaire (Sivak et Fini, 2002) et jouent un rôle primordial dans la cicatrisation des plaies (Ollivier et al., 2007), notamment MMP-9 et MMP-10, dans des CECHs aux deux densités cellulaires (Figure A2.3 et Figure 5.3).

Étant donné que les matrices reconstruites ECM/35d exercent des influences régulatrices positives sur l'expression des gènes d'intérêt, notamment le gène α 5 et le gène MMP-9, indépendamment de la densité cellulaire (tant à sous-confluence qu'à confluence), les analyses, pour le reste de cette étude, ont été réalisées en présence de ECM35d uniquement avec des CECHs cultivées à confluence tel que présenté aux Chapitres II et V.



Figure A2.1. Patrons d'expression des gènes de CECHs cultivées à sous-confluence en présence des matrices reconstruites dévitalisées.

A: Analyse de type 'Scatter plot' en \log_2 de l'intensité du signal pour 60 000 transcrits couvrant le transcriptome humain en entier de CECHs cultivées sur BSA (axe x) contre les cellules sur ECM35d/keratocytes- (axe y) à sous-confluence (HCEC/SC). B: Analyse de type 'heatmap' du profil d'expression transcriptionnelle des CECHs (provenant d'un donneur de 61 ans) cultivées à sous-confluence (SC70%) sur BSA ou sur ECM35d/keratocytes- pour 14 gènes sélectionnés, dont ITGA5 et les FTs modulant ce gène. Selon l'échelle de couleur, les gènes faiblement exprimés sont en bleu et les gènes fortement exprimés sont en rouge. C: Analyses en qPCR de l'expression des ARNm de l'intégrine α 5 dans des CECHs cultivées à sous-confluence sur BSA ou sur ECM35d/keratocytes-. Les niveaux du transcrit d'actine. *P < 0.05 ; Student's t-test.





Analyse de type '*heatmap*' du profil d'expression transcriptionnelle de 49 gènes les plus dérégulés (> 4-fold change of \log_6 of signal intensity) des CECHs cultivées à sous-confluence sur BSA ou sur les matrices 35 jours reconstruites sans kératocytes (ECM35d/keratocytes-). Les gènes communs modifiés par les matrices 35 jours entre les conditions CECHs sous-confluentes et confluentes (voir Figure 5.1A) sont encadrés. Les gènes faiblement exprimés sont en bleu et les gènes fortement exprimés sont en rouge.



Figure A2.3. Patrons d'expression génique des métalloprotéinases matricielles des CECHs cultivées à sous-confluence sur les matrices reconstruites dévitalisées.

A: Analyse de type '*heatmap*' du profil d'expression transcriptionnelle de tous les gènes MMPs humains entre les CECHs cultivées à sous-confluence sur BSA ou sur ECM35d/keratocytes-. Les gènes faiblement exprimés sont en bleu et les gènes fortement exprimés sont en rouge. **B:** Analyses en qPCR de l'expression des ARNm de MMP9 et MMP10 dans des CECHs cultivées à sous-confluence sur BSA ou sur ECM35d/keratocytes-. Les niveaux des transcrits MMP9 et MMP10 ont été normalisés par les niveaux du transcrit d'actine. *P < 0.05 ; Student's t-test. **C:** Les surnageants de culture des CECHs cultivées à sous-confluence en présence de BSA ou de ECM35d/keratocytes- ont été récoltés pour évaluer l'activité enzymatique des gélatinases MMP2 et MMP9 par zymographie sur gel de gélatine. Les formes latentes (pro-MMP2, 72 KDa) et actives (MMP2, 62 KDA et MMP9, 82 KDa) sont identifiées. La masse moléculaire (kDa) des marqueurs protéiques les plus pertinents est indiquée à gauche de la figure.

ANNEXE 3

Les séquences des éléments conservés en amont des promoteurs des gènes α 3, α 5, α 9, α v et leurs sites de liaisons potentiels pour certains facteurs de transcription.

A3.1. Contexte et Objectif de l'étude

Cette annexe est un complément au Chapitre IV. De façon inattendue, une analyse détaillée des séquences des régions régulatrices des sous-unités α d'intégrines humaines (CHAOS+DIALIGN algorithm) a permis d'identifier un segment de 300 nucléotides hautement conservé entre les sous-unités d'intégrines $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 9$ et αv ($\geq 83\%$) et localisé loin en amont du site d'initiation de la transcription de ces gènes (≥1 kpb). Un soussegment d'environ 50 nucléotides presqu'entièrement conservés (jusqu'à 93%) entre les promoteurs des gènes ITGA3, ITGA5, ITGA9 et ITGAV est présent à l'intérieur de cette région de 300 nucléotides conservée (Vigneault et al., 2007) (Figure 4.1). Ces sous-unités α d'intégrines sont toutes exprimées dans les cellules épithéliales de cornée (Lauweryns et al., 1991; Stepp, 2006; Vigneault et al., 2007) et leur expression est augmentée durant la cicatrisation cornéenne (Garana et al., 1992; Stepp and Zhu, 1997; Vigneault et al., 2007; Liu et al., 2006 ; Blanco-Mezquita et al., 2011). Ainsi, ces éléments conservés pourraient exercer une fonction régulatrice particulièrement importante durant la guérison des plaies cornéennes. Dans cette étude, nous avons tenté d'évaluer l'influence régulatrice du segment d'ADN conservé distant (50pb et 300pb) entre les gènes $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 9$ et αv sur la transcription du gène $\alpha 5$ de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ ainsi que les FTs qui participent à ces influences régulatrices.

A3.2. Matériel et méthodes

Les sites de liaison potentiels pour les facteurs de transcription (FTs) contenus dans les séquences conservées de 50 nucléotides des gènes $\alpha 3$ (Positions -1171/-1118), $\alpha 5$ (Positions -1095/-1042), a9 (Positions -1951/-1900), et av (Positions -1725/-1672) ont été l'aide identifiés à des outils de recherche **TFSearch** (http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html) et JASPAR (http://jaspar.genereg.net) (Vlieghe et al., 2006). Les sites de liaison potentiels pour les FTs contenus dans les séquences conservées de 300 nucléotides des gènes $\alpha 5$ (Positions -1181/-866) et $\alpha 9$ (Positions -1951/-1725) ont également été identifiés à l'aide des programmes TFSearch et JASPAR.

A3.3. Résultats

Certaines séquences cibles potentielles pour différents FTs connus (GATA-1, HSF2, Sp1, AP-1, Lyf-1, c-Ets, NFI, Oct-1, Sox-5, C/EBP) ont été identifiées à l'aide des outils de recherche *TFSearch* et *JASPAR* dans les séquences conservées de 50pb des gènes α 3 (positions -1171/-1118), α 5 (positions -1095/-1042), α 9 (positions -1951/-1900), et α v (positions -1725/-1672) (Figure A3.1). Plusieurs de ces sites potentiels sont présents dans l'élément conservé de 50pb de ces quatre gènes et comprennent, entre autres, des séquences cibles pour les FTs Sp1, c-Ets et AP-1 (sauf absent pour α 3) démontrés comme étant des activateurs du gène α 5 (Corbi et al., 2000 ; Larouche et al., 2000 ; Kita et al., 2001 ; Gingras et al., 2003 ; Gingras et al., 2009).

Des sites de liaison potentiels pour les FTs contenus dans les séquences conservées de 300pb des gènes α 5 et α 9 ont été identifiés à l'aide des programmes *TFSearch* et *JASPAR*. Au moins 16 FTs potentiels ont été identifiés comme pouvant lier les régions conservées du gène α 5 et du gène α 9, soit : Sp1, AP-1, c-Ets, NFI, GATA-X, C/EBP, Oct-1, Sox-5, c-Rel, p300, MyoD, c-Myc, N-Myc, Lyf-1, HSF2 et CREB (Figure 4.6A). La région conservée de 315 nucléotides du gène α 5 (-1181/-866) possède, entre autres, 2 sites de liaison potentiels pour Sp1, 3 pour AP-1 et 4 pour c-Ets (activateurs du gène α 5) (Corbi et al., 2000 ;

Larouche et al., 2000; Kita et al., 2001; Gingras et al., 2003; Gingras et al., 2009) et également 8 sites pour NFI (puissant répresseur du gène α5) (Gingras et al., 2009) (Figure A3.2). Par ailleurs, la séquence conservée de 226 nucléotides du gène $\alpha 9$ (-1951/-1725) possède, quant à elle, 3 sites de liaison potentiels pour Sp1, 2 pour AP-1, 1 pour c-Ets et 6 pour NFI (Figure A3.3).

A3.4. Discussion

Une séquence conservée de 300 nucléotides et un sous-segment interne de 50 nucléotides hautement conservé a été identifiée en amont des gènes $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 9$ et αv (Vigneault et al., 2007) (Figure 4.1). Plusieurs sites de liaisons de FTs communs ont été identifiés à l'intérieur de ces segments conservés de 50 et 300 pb pour ces quatre sous-unités d'intégrines (Figures A3.1, A3.2 et A3.3). Ces donnés suggèrent que la région distante conservée de 300pb est composée de plusieurs éléments de régulation positifs (AP-1, Sp1 et Ets) et négatifs (NFI) permettant une régulation commune des gènes de sous-unités d'intégrines $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 9$ et αv dans les cellules épithéliales de cornée. Cette section comprend des informations qui sont complémentaires aux Figures 4.4A et 4.6A présentées au Chapitre IV.

Rapport-gratuit.com

Le numero 1 mondial du mémoires



Figure A3.1. La séquence d'ADN des segments conservés de 50 nucléotides en amont des gènes α 3, α 5, α 9, α v et leurs sites de liaisons potentiels de facteurs de transcription. Les séquences d'ADN des segments conservés de 50pb en amont des gènes α 3 (-1171/-1118), α 5 (-1095/-1042), α 9 (-1951/-1900), et α v (-1725/-1672) sont illustrées avec leurs sites de liaison potentiels pour certains FTs (GATA-1, HSF2, Sp1, AP-1, Lyf-1, c-Ets, NFI, Oct-1, Sox-5, C/EBP) identifiés à l'aide de *TFSearch* et *JASPAR*.

	NFI				
-1181	TTTTTTTTTTTTTTGGATACAG	TC TTGCTCTGTCACCCAGG	GCTAGAGTGCAGT		
	AAAAAAAAAAACCTATGTCAGAACGAGACAGTGGGTCCGATCTCACGTCA				
		Sp1	5.3 A.S.		
-1131	GGTGCAATCGCGGCTCATT	GCAGTCTCTGCCTCCTG	TTTCAACTAATTA		
TTOT	адсттсаттаат				
	00110011110000001101111				
	c-Ets	0 100			
	AP-1				
-1081	THE	стасстсссаттасасст	CCACCACCACA		
TOOT	COCTCCTCCTCT				
	Sp1 g=Ets	CATCOACCCIAAIGICCAC			
	SPI C-ECS				
	NFT	NET	NET		
_1031			CCCATCTTCCCC		
-1031		A A TO A COTOTA COCA A A A			
		AATCACCICIACCCAAAA	ACGGIACAACCGG		
	c-Ets	-954			
	N	FT I	NET		
0.01					
-901		GCCICAGGIGAICIGCIC			
	ICCGACCAGAACIIGAGGA	CGGAGICCACIAGACGAG	JIGGAGCCGIAGG		
		NET NET			
0.21					
-931	AAGTGCTGGGATTACAGGI	BIGAGCCACCGIGCCIGGC			
	TTCACGACCCTAATGTCCA		GTCTCGAGGGTC		
		AP-1			
0.01					
-881	CGTTTACAGCCATTA				

GCAAATGTCGGTAAT

Figure A3.2. Séquence du segment conservé de 300 nucléotides en amont du gène α5 et position des sites de liaisons potentiels de facteurs de transcription.

Séquence de l'élément conservé de 300 nucléotides en amont du gène α 5 (positions -1181/-866) et position des sites de liaisons de FTs potentiels (dont Sp1, AP-1, c-Ets, NFI) identifiés à l'aide de *TFSearch* et *JASPAR*. La séquence de l'élément conservé de 50 nucléotides à l'intérieur du segment de 300 nucléotides est indiquée en caractère gras. Les séquences des motifs AP-1 sont présentées en caractère bleu. Les nucléotides correspondant aux deux moitiés de la séquence consensus de NFI, soit (C/G/T)TGG(C/A) ou (G/T)CCA(A/C/G) sont surlignés en turquoise et les 5 nucléotides séparateurs en mauve.

	AP-1	<u></u>	NFI	
-1951	TTCAAGCGATTCTCCTGCCTC		TAG <mark>CTGGA</mark> AT	TACAGGC <mark>A</mark>
	AAGIICGCIAAGAGGACGGAG	Sp1	c-Ets	AIGICCGI
-1901	NFI T GTGCCACCATGC <mark>TTGGC</mark> TAA A CACGGTGGTACGAACCGATT	<mark>TTT</mark> TTT <mark>G</mark> TATT AAAAAACATAA	'TTTAGTAGAAA AAATCATCTT'	ACAAGGTT TGTTCCAA
-1851	NFI TCACTGTG <mark>TTGGC</mark> CAGGCTGG AGTGACACAACCGGTCCGACC	T <mark>C</mark> TTGAACTC <mark>C</mark> AGAACTTGAGG	NFI <mark>TG</mark> ACCTCAAT ACTGGAGTTA	<mark>CCAC</mark> CCAC GGTGGGTG
-1801	CTCAGCCTCCCAAGTGCTGTG GAGTCGGAGGGTTCACGACAC Sp1	ATTACA <mark>G</mark> G <mark>AGT</mark> TAATGTCCTCA	NFI <mark>'GAGCCAC</mark> T <mark>GC</mark> CTCGGTGACGO AP-1	NFI GCCCA <mark>GCC</mark> CGGGTCGG Sp1
-1751	<mark>AG</mark> TTCATTCTTTCAACAATGT <u>TCA</u> AGTAAGAAAGTTGTTACA	'TTAAG JAATTG		

226pb Cons α9 (-1951/-1725)

Figure A3.3. Séquence du segment conservé de 300 nucléotides en amont du gène α9 et position des sites de liaisons potentiels de facteurs de transcription.

Séquence de l'élément conservé de 300 nucléotides en amont du gène α 9 (positions -1951/-1725) et position des sites de liaisons de FTs potentiels (dont Sp1, AP-1, c-Ets, NFI) identifiés à l'aide de *TFSearch* et *JASPAR*. La séquence de l'élément conservé de 50 nucléotides à l'intérieur du segment de 300 nucléotides est indiquée en caractère gras. Les séquences des motifs AP-1 sont présentées en caractère bleu. Les nucléotides correspondant aux deux moitiés de la séquence consensus de NFI, soit (C/G/T)TGG(C/A) ou (G/T)CCA(A/C/G) sont surlignés en turquoise et les 5 nucléotides séparateurs en mauve.